

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİKRO RNA EKSPRESYON SEVİYELERİ VE GENETİK VARYASYONLARI
İLE EKSFOLİYASYON SENDROMU VE EKSFOLİYATİF GLOKOM
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba ÖZTÜRK BAŞER

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

ARALIK, 2021





TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Tuğba ÖZTÜRK BAŞER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKRORNA EKSPRESYON SEVİYELERİ VE GENETİK VARYASYONLARI İLE EKSFOLİYASYON SENDROMU VE EKSFOLİYATİF GLOKOM İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Tuğba ÖZTÜRK BAŞER

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

Tarih: Aralık 2021

Eksfoliyasyon sendromu (XFS) yaş arttıkça daha fazla gelişim gösterdiği bilinen, anormal fibriler moleküllerin göz dokularında birikmesi ile tanımlanan bir hücre dışı matriks hastalığıdır. XFS'nin patogeneğinde oksidatif ve hücrel stres ile inflamatuvar yollar önemli yer tutmaktadır. Aköz hümör sıvısının drenajını sağlayan kanalların eksfoliyasyon birikintisi ile tıkanması ve bu suretle göz içi basıncının (GİB) artmasıyla ortaya çıkan eksfoliyatif glokom (XFG), tedavi edilmediği takdirde körlüğe sebep olabilmektedir. Bu nedenlerle XFS'nin erken dönemde teşhisinin önemi büyüktür. mikroRNA'lar (miRNA) mesajcı RNA'ların (mRNA) regülasyonunda rol oynayan önemli post-transkripsiyonel düzenleyicilerdir. miRNA ekspresyon seviyelerinin çeşitli hastalıklarda değiştiği belirlenmiştir. *miRNA*'ların genlerinde bulunan tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP), *miRNA*'ların işlenmesini etkilediği ve çeşitli hastalıklara yatkınlıkta rol oynayabildiği bilinmektedir. Bu çalışmada, inflamasyon ile ilişkili yollarda rol oynadığı bilinen miR-146a ve miR-196a-2'nin plazma ekspresyon seviyeleri ile *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'lerinin XFS ve XFG hastalıkları için biyobelirteç olma potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma grubu, genotipleme kısmında, 260 XFG hastası, 260 XFS hastası ve 295 kontrolden oluşurken, ekspresyon seviyesi belirleme kısmında, her grup içerisinde 27 XFG hastası, 25 XFS hastası ve 27 kontrolden oluşmaktadır. Kan örnekleri Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Bölümü (Ankara, Türkiye) tarafından toplanmıştır. SNP'lerin genotiplemeleri PCR-RFLP yöntemi ile, miRNA'ların plazmadaki ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi ise qRT-PCR yöntemi ile yapılmıştır. Relatif ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplanmıştır.

Genotip analizlerine göre, rs2910164 ve rs11614913 için minör alel frekanslarının ve genotip dağılımlarının, XFG, XFS ve kontrol grupları arasında farklı olmadığı görülmüştür. Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFG ve XFS gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir (XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFS vs. kontrol: $P=.001$). Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin ise, gruplar arasında farklı olmadığı görülmüştür. Lojistik regresyon analizleri sonucunda, plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile yaklaşık 6 kat ($P=.001$; dominant model), XFS ile yaklaşık 4 kat ($P=.005$; dominant model) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. ROC analizleri sonucunda, plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFG için “iyi” (AUC=0.897, $P<.001$, duyarlılık=%89, özgüllük=%78), XFS için “orta” (AUC=0.779, $P=.001$, duyarlılık=%52, özgüllük=%93) dereceli bir tanı testi olabileceği görülmüştür.

Bu çalışmada, *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'leri ve miR-146a ve miR-196a-2'nin plazma ekspresyon seviyeleri ile XFS ve XFG arasındaki ilişki ilk kez araştırılmıştır. Sonuç olarak, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFG ve XFS için kan tabanlı biyobelirteç olma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Bu tez çalışması ileride XFG ve XFS'nin erken teşhisi, prognozun takibi ve tedavisinde kullanılabilecek yeni tanı testleri, biyosensörler ve terapötik ajanlar geliştirilmesine öncülük edecek potansiyele sahip sonuçlar ortaya koyması nedeniyle Biyomedikal Mühendisliğine katkı sağlayan bir projedir.

Anahtar Kelimeler: Eksfoliasyon Sendromu (XFS), Eksfoliatif Glokom (XFG), Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP), mikroRNA (miRNA), rs11614913, rs2910164

ABSTRACT

Master of Science

INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN GENETIC VARIATIONS OF MICRORNA AND ITS EXPRESSION LEVELS IN EXFOLIATION SYNDROME AND EXFOLIATIVE GLAUCOMA

Tuğba ÖZTÜRK BAŞER

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering Science Programme

Supervisor: Assoc. Prof. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

Date: December 2021

Exfoliation syndrome (XFS) is an extracellular matrix disease defined by the accumulation of abnormal fibrillary molecules in the eye tissues, which is known to develop more with age. Oxidative and cellular stress and inflammatory pathways play an important role in the pathogenesis of XFS. Exfoliative glaucoma (XFG), which occurs when the channels that provide drainage of aqueous humor fluid are blocked by exfoliation deposits and therefore increase in intraocular pressure, can lead to blindness if left untreated. For these reasons, early diagnosis of XFS is of great importance. microRNAs (miRNA) are significant post-transcriptional regulators that play a role in the regulation of messenger RNAs (mRNA). It has been determined that miRNA expression levels vary in various diseases. It is known that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes of *miRNAs* impact the processing of *miRNAs* and may play a role in susceptibility to various diseases. In this study, it is aimed to examine the potential of plasma expression levels of miR-196a-2 and miR-146a which are known to play a role in inflammation-related pathways, as well as the potential of

mir-146a rs2910164 G/C, *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNPs as biomarkers for XFS and XFG diseases.

The study group consisted of 260 patients with XFG, 260 patients with XFS and 295 control individuals in the genotyping part, and 27 patients with XFG, 25 patients with XFS and 27 controls were selected from each group for expression level determination. Blood samples were collected by Gulhane Training and Research Hospital, Department of Ophthalmology (Ankara, Turkey). Genotyping of SNPs was performed by using PCR-RFLP method, and expression levels of miRNAs in plasma were determined by using qRT-PCR method. Relative expression levels were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

According to the genotype analysis, minor allele frequencies and genotype distributions for rs2910164 and rs11614913 were not different between XFG, XFS and control groups. It was found that the relative expression level of plasma hsa-miR-146a-5p was significantly higher in the XFG and XFS groups compared to the control group (XFG vs. control: $P < .001$, XFS vs. control: $P = .001$). Relative expression levels of hsa-miR-196a-5p were not different between the groups. As a result of logistic regression analysis, it was determined that the relative expression level of plasma hsa-miR-146a-5p was associated approximately 6-fold with XFG ($P = .001$; dominant model), and approximately 4-fold with XFS ($P = .005$; dominant model). As a result of ROC analysis, it was concluded that the relative expression level of hsa-miR-146a-5p in plasma could be a "good" level (AUC=0.897, $P < .001$, sensitivity=89%, specificity=78%) diagnostic test for XFG and a "fair" level (AUC=0.779, $P = .001$, sensitivity=52%, specificity=93%) diagnostic test for XFS.

In this study, the relationship between *mir-146a* rs2910164 G/C and *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNPs, the plasma expression levels of miR-146a and miR-196a-2 and XFS and XFG was investigated for the first time. In conclusion, it was observed that the relative expression level of hsa-miR-146a-5p has the potential to be a blood-based biomarker for XFG and XFS. This thesis is a project that contributes to Biomedical Engineering, as it reveals results that have the potential to lead to the development of new diagnostic tests, biosensors and therapeutic agents that can be used in the early diagnosis, following the prognosis and treatment of XFG and XFS in the future.

Keywords: Exfoliation Syndrome (XFS), Exfoliative Glaucoma (XFG), Single Nucleotide Polymorphism (SNP), microRNA (miRNA), rs11614913, rs2910164

TEŞEKKÜR

İlk olarak bana araştırma grubunda çalışma fırsatı sunan ve yüksek lisans çalışmam boyunca sabrı, tecrübeleri, yardımları ve katkılarıyla beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Birsen Can Demirdöğen'e,

Tecrübelerinden faydalandığım TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerine ve bana burs sağlayan TOBB ETÜ ailesine,

Çalışmamdaki tüm örneklerin toplanmasında yardımcı olan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Bölümü'nden Doç. Dr. Mehmet Talay Köylü ve Dr. Bağım Ayçin Çakır'a,

Önerileri için tez jüri üyelerim Prof. Dr. Fatih Büyükserin ve Doç. Dr. Serdar Karakurt'a,

Yardımlarını ve arkadaşlıklarını her zaman bana hissettiğim laboratuvar arkadaşlarım Canan Akçin ve Osman Oğuzhan Kılıç'a,

Sıkıntılı dönemlerimde hep yanımda olan arkadaşlarım Şeyma Nur Bektaş, Zübeyde Pekdemir ve Merve Demir'e

Her daim maddi manevi yanımda babam Kerim Öztürk, kardeşlerim ve özellikle tez formatının düzenlenmesinde bana yardımcı olan kardeşim Nuri Öztürk'e ve son olarak sevgisi, saygısı ve desteğiyle her daim yanımda olan ve tezimde yazım kurallarını düzenleme konusunda bana yardımcı olan eşim Ethem Başer'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışmamı rahmetli annem Fatma Öztürk'e ithaf ediyorum.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (318S074).



İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET..... | vi |
| ABSTRACT | viii |
| TEŞEKKÜR..... | x |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | xvi |
| ÇİZELGE LİSTESİ..... | xviii |
| KISALTMALAR..... | xxii |
| SEMBO LİSTESİ..... | xxiv |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1 Eksfoliasyon Sendromu (XFS) ve Eksfoliatif Glokom (XFG) | 1 |
| 1.1.1 Eksfoliasyon sendromu (XFS) | 1 |
| 1.1.1.1 Tanımı ve tarihçesi | 1 |
| 1.1.1.2 Eksfoliasyon sendromu (XFS) epidemiyolojisi | 3 |
| 1.1.2 Eksfoliatif glokom (XFG) | 4 |
| 1.1.2.1 Tanımı ve tarihçesi | 4 |
| 1.1.2.2 Eksfoliatif glokom (XFG) epidemiyolojisi | 8 |
| 1.1.3 Eksfoliasyon sendromu (XFS) ve Eksfoliatif glokom (XFG) Patogenezi .. | 9 |
| 1.1.3.1 XFS patogenezi | 9 |
| 1.1.3.2 XFG patogenezi..... | 11 |
| 1.1.3.3 XFS ve XFG ile oksidatif stres ilişkisi..... | 12 |
| 1.1.4 Eksfoliasyon sendromu (XFS) ve Eksfoliatif glokom (XFG) risk faktörleri | 14 |
| 1.1.4.1 Genetik faktörler | 14 |
| 1.1.4.2 Çevresel faktörler | 15 |
| 1.1.4.3 Göz yapısı..... | 16 |
| 1.1.4.4 Yaş..... | 16 |
| 1.1.4.5 Cinsiyet..... | 17 |
| 1.1.4.6 Etnik köken | 17 |
| 1.2 mikroRNA'lar..... | 18 |
| 1.2.1 miRNA biyogenezi..... | 20 |
| 1.2.2 miRNA'ların bazı hastalıklarla ilişkileri | 21 |
| 1.2.3 Hsa-miR-146a | 23 |
| 1.2.4 Hsa-miR-196a-2 | 26 |
| 1.3 Genetik Polimorfizm | 29 |
| 1.3.1 Tek Nükleotit Polimorfizmi | 29 |
| 1.3.2 <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C tek nükleotit polimorfizmi | 30 |
| 1.3.3 <i>mir-196a-2</i> rs11614913 C/T tek nükleotit polimorfizmi | 31 |
| 1.4 Çalışmanın Amacı | 31 |
| 2. MATERYALLER VE METOTLAR | 35 |
| 2.1 Materyaller | 35 |
| 2.1.1 Çalışma grupları ve popülasyon..... | 35 |
| 2.1.2 Genotipleme ve plazma için kanların toplanması | 36 |
| 2.1.3 Kullanılan kimyasallar ve enzimler..... | 37 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.1.4 | Kullanılan cihazlar | 37 |
| 2.1.5 | Primerler..... | 37 |
| 2.1.5.1 | Genotipleme için kullanılan primerler | 37 |
| 2.1.5.2 | Ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan primerler | 38 |
| 2.2 | Metotlar | 38 |
| 2.2.1 | Genotipleme için kullanılan yöntem | 38 |
| 2.2.1.1 | Tam kandan manuel yöntem ile DNA izolasyonu | 39 |
| 2.2.1.2 | Spektrofotometre ile genomik DNA konsantrasyonunun belirlenmesi | 40 |
| 2.2.1.3 | Spektrofotometre ile genomik DNA saflığının belirlenmesi | 41 |
| 2.2.1.4 | Agaroz jel elektroforezi ile genomik DNA saflığının belirlenmesi ... | 41 |
| 2.2.2 | <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C ve <i>mir-196a-2</i> rs11614913 C/T tek nükleotit polimorfizmlerinin genotiplenmesi..... | 43 |
| 2.2.2.1 | <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C SNP'sinin genotiplenmesi | 44 |
| 2.2.2.2 | <i>mir-196a-2</i> rs11614913 C/T SNP'sinin genotiplenmesi | 49 |
| 2.2.3 | miRNA ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan yöntemler..... | 55 |
| 2.2.3.1 | miRNA ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Kantitatif Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemleri | 55 |
| 2.2.3.2 | Toplanan periferik tam kanlardan plazma elde edilmesi | 57 |
| 2.2.3.3 | Plazmalardan RNA izolasyonu | 57 |
| 2.2.3.4 | RNA'lardan cDNA sentezi | 60 |
| 2.2.3.5 | Kantitatif Eş Zamanlı PCR ile miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi | 61 |
| 2.2.4 | İstatistiksel analiz için kullanılan metotlar..... | 64 |
| 3. | BULGULAR | 69 |
| 3.1 | Genotipleme İçin Yapılan Analizler | 69 |
| 3.1.1 | Çalışma grupları..... | 69 |
| 3.1.2.1 | <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve alel frekansları | 70 |
| 3.1.2 | <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C ve <i>mir-196a-2</i> rs11614913 C/T SNP'lerinin genotip ve alel frekansları | 73 |
| 3.1.2.2 | <i>mir-196a-2</i> rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve alel frekansları .. | 78 |
| 3.1.3 | <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C ve <i>mir-196a-2</i> rs11614913 C/T SNP'lerinin göz parametreleri ile ilişkisi..... | 82 |
| 3.1.3.1 | <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C SNP'sinin göz parametreleri ile ilişkisi | 82 |
| 3.1.3.2 | <i>mir-196a-2</i> rs11614913 C/T SNP'sinin göz parametreleri ile ilişkisi | 85 |
| 3.2 | Plazma miRNA Relatif Ekspresyon Seviyeleri..... | 90 |
| 3.2.1 | Çalışma grupları..... | 90 |
| 3.2.2 | Hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p miRNA'larının plazma relatif ekspresyon seviyeleri | 93 |
| 3.2.2.1 | Hsa-miR-146a-5p'nin plazma relatif ekspresyon seviyesi | 93 |
| 3.2.2.2 | Hsa-miR-196a-5p'nin plazma relatif ekspresyon seviyesi | 93 |
| 3.2.3 | <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C ve <i>mir-196a</i> rs11614913 C/T genotipleri ile hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyelerinin birlikte analizi | 95 |
| 3.2.3.1 | <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C genotipleri ile hsa-miR-146a-5p plazma relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) birlikte analizi..... | 95 |
| 3.2.3.2 | <i>mir-196a-2</i> Rs11614913 C/T genotipleri ile hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) birlikte analizi..... | 96 |

| | |
|--|---|
| 3.3 Plazma hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p Relatif Ekspresyon Seviyeleri (Fold Change) ile Bazı Risk Faktörlerinin Korelasyon Analizi | 98 |
| 3.4 Lojistik Regresyon Analizleri..... | 100 |
| 3.4.1 Model 1: Genotipleme kısmında kullanılan tüm bireylerin regresyon analizi | 106 |
| 3.4.2 Model 2: Plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi belirleme kısmında kullanılan tüm bireylerin regresyon analizi..... | 109 |
| 3.5 ROC Analizleri..... | 113 |
| 3.5.1 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi için ROC analizi. 113 | |
| 3.5.1.1 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol grubu arasındaki ROC analizi..... | 113 |
| 3.5.1.2 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grubu arasındaki ROC analizi..... | 113 |
| 3.5.1.3 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile XFS grubu arasındaki ROC analizi | 114 |
| 3.5.2 Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi için ROC analizi. 114 | |
| 3.5.2.1 Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol grubu arasındaki ROC analizi..... | 114 |
| 3.5.2.2 Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grubu arasındaki ROC analizi..... | 116 |
| 3.5.2.3 Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile XFS grubu arasındaki ROC analizi | 116 |
| 3.6 Hata Matrisi Analizi | 116 |
| 3.6.1 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi..... | 119 |
| 3.6.2 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi..... | 120 |
| 4. TARTIŞMA | 123 |
| 5. SONUÇ..... | 145 |
| KAYNAKLAR..... | 149 |
| EKLER..... | 169 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | Hata! Yer işareti tanımlanmamış. |



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

| | | |
|-------------|---|----|
| Şekil 1.1: | Gözün anatomisi . | 2 |
| Şekil 1.2: | Gözün lens yüzeyi ve göz bebeği kenarı üzerinde bulunan eksfoliasyon birikiminin görünümü. | 2 |
| Şekil 1.3: | Aköz hümmör sıvısının normal drenajı. | 7 |
| Şekil 1.4: | Sağlıklı göz ile glokomlu gözün şematik gösterimi. | 7 |
| Şekil 1.5: | XFS ve XFG ile hücrel ve oksidatif stres ilişkisini gösteren şema. | 13 |
| Şekil 1.6: | miRNA'ların genomdaki dağılımı. | 20 |
| Şekil 1.7: | miRNA biyogenezi şeması. | 22 |
| Şekil 1.8: | mir-146a'nın 2 boyutlu stem-loop formu | 23 |
| Şekil 1.9: | Hsa-mir-146a geninin lokasyonu (1), stem loop yapısının sekansı (2) ve olgun hsa-miR-146a-5p'nin sekans (3) gösterimleri. | 24 |
| Şekil 1.10: | mir-196a-2'nin 2 boyutlu stem-loop formu. | 27 |
| Şekil 1.11: | Hsa-mir-196a-2 geninin lokasyonu (1), stem loop yapısının sekansı (2) ve olgun hsa-miR-196a-5p'nin sekansı (3) gösterimleri. | 27 |
| Şekil 2.1: | Genotipleme için kullanılan yöntemin şematik gösterimi. | 39 |
| Şekil 2.2: | İzole edilmiş DNA örneklerinin %0.5'lik agaroz jelde görüntülenmesi. | 41 |
| Şekil 2.3: | mir-146a rs2910164 G/C SNP'sini kapsayan bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı diziler ve restriksiyon enziminin tanıdığı dizi bölgesi. | 44 |
| Şekil 2.4: | mir-146a rs2910164 G/C SNP'sinin PCR agaroz jel görüntüsü. | 46 |
| Şekil 2.5: | mir-146a rs2910164 G/C SNP'sinin bireylerdeki genotiplerin belirlenmesinin şematik gösterimi. | 47 |
| Şekil 2.6: | mir-146a rs2910164 G/C SNP'sinin bireylerdeki genotiplerinin belirlendiği agaroz jel görüntüsü. | 49 |
| Şekil 2.7: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'sini kapsayan bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı diziler ve restriksiyon enziminin tanıdığı dizi bölgesi. | 50 |
| Şekil 2.8: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'sinin PCR agaroz jel görüntüsü. | 52 |
| Şekil 2.9: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'sinin bireylerdeki genotiplerin belirlenmesinin şematik gösterimi. | 53 |
| Şekil 2.10: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'sinin bireylerdeki genotiplerinin belirlendiği agaroz jel görüntüsü. | 55 |
| Şekil 2.11: | RT-PCR ve qRT-PCR yöntemleri ile ekspresyon seviyesi tespit edilmesinin şematik gösterimi. | 56 |
| Şekil 2.12: | SYBR green boyasının çift zincirli DNA'ya bağlanması. | 56 |
| Şekil 2.13: | Ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi. | 57 |
| Şekil 2.14: | RNA izolasyon prosedürünün şematik gösterimi. | 59 |
| Şekil 2.15: | qRT-PCR sonucu amplifiye olan ürünlerin hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-191-5p ve UniSp6 için erime eğrisi grafiği. | 61 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| Şekil 2.16: | Ct değerinin amplifikasyon eğrisi üzerinde saptanması. | 63 |
| Şekil 2.17: | Real-time PCR cihazında, StepOne Software (Version 2.3) programında elde edilen a. Ct değerlerinin plaka üzerinde sonuçları b. amplifikasyon eğrisi..... | 63 |
| Şekil 3.1: | XFG, XFS ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-146a-5p'nin relatif ekspresyon seviyesi (fold change) (kontrol grubunun relatif ekspresyon seviyesi 1 kabul edilerek grafik oluşturulmuştur)..... | 94 |
| Şekil 3.2: | XFG, XFS ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-196a-5p'nin relatif ekspresyon seviyesi (fold change) (kontrol grubunun relatif ekspresyon seviyesi 1 kabul edilerek grafik oluşturulmuştur)..... | 95 |
| Şekil 3.3: | mir-146a rs2910164 G/C genotipleri ile plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) birlikte incelenmesi. | 97 |
| Şekil 3.4: | mir-196a-2 rs11614913 C/T genotipleri ile plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) birlikte incelenmesi. | 99 |
| Şekil 3.5: | Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol gruplarında ROC analizi. | 115 |
| Şekil 3.6: | Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grupları arasındaki ROC analizi. | 115 |
| Şekil 3.7: | Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile XFS grupları arasındaki ROC analizi. | 116 |
| Şekil 3.8: | Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol grupları arasındaki ROC analizi. | 117 |
| Şekil 3.9: | Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grupları arasındaki ROC analizi. | 118 |
| Şekil 3.10: | Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile XFS grupları arasındaki ROC analizi. | 118 |

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

| | | |
|---------------|---|----|
| Çizelge 1.1: | Eksfoliasyon sendromunun (XFS) farklı popülasyonlardaki prevalansları. | 5 |
| Çizelge 1.2: | Eksfoliatif glokomun (XFG) farklı popülasyonlardaki prevalansları..... | 10 |
| Çizelge 2.1: | mir-146a rs2910164 G/C ve mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP bölgelerini kapsayan DNA dizisinin çoğaltılması için tercih edilen primerlerin sekansları ve kaynakları. | 37 |
| Çizelge 2.2: | qRT-PCR yönteminde kullanılan primerlerin bilgileri. | 38 |
| Çizelge 2.3: | mir-146a rs2910164 G/C ve mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'lerinin pozisyonları, genleri, PCR ürün boyutları, kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimi, oluşan kesim ürünlerinin boyutları ve buna karşılık gelen genotipler. | 43 |
| Çizelge 2.4: | mir-146a rs2910164 G/C SNP'sini kapsayan bölge için kullanılan PCR reaksiyon karışımının içeriği. | 45 |
| Çizelge 2.5: | mir-146a rs2910164 G/C SNP bölgesini amplifiye etmek için kullanılan termal döngü programı. | 46 |
| Çizelge 2.6: | mir-146a rs2910164 G/C SNP bölgesinin SacI restriksiyon enzimi ile kesimi için kullanılan koşullar. | 48 |
| Çizelge 2.7: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'sini kapsayan bölge için kullanılan PCR reaksiyon karışımının içeriği. | 51 |
| Çizelge 2.8: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP bölgesini amplifiye etmek için kullanılan termal döngü programı. | 51 |
| Çizelge 2.9: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP bölgesinin MspI restriksiyon enzimi ile kesimi için kullanılan koşullar. | 54 |
| Çizelge 2.10: | Revers transkripsiyon işleminde kullanılan karışım içeriği. | 60 |
| Çizelge 2.11: | Revers transkripsiyon işleminde kullanılan termal döngü programı. | 61 |
| Çizelge 2.12: | qRT-PCR işleminde kullanılan karışım içeriği. | 62 |
| Çizelge 2.13: | qRT-PCR işleminde kullanılan termal döngü programı. | 62 |
| Çizelge 2.14: | Hata matrisi Çizelgesi. | 66 |
| Çizelge 3.1: | XFG, XFS ve kontrol gruplarının bazı bilgileri (sürekli değişkenler)..... | 71 |
| Çizelge 3.2: | XFG, XFS ve kontrol gruplarının bazı bilgileri (kategorik değişkenler). | 72 |
| Çizelge 3.3: | mir-146a rs2910164 SNP'sinin Hardy-Weinberg dengesine uyum analizi. | 73 |
| Çizelge 3.4: | mir-196a-2 rs11614913 SNP'sinin Hardy-Weinberg dengesine uyum analizi. | 73 |
| Çizelge 3.5: | mir-146a rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve alel frekansları dağılımı..... | 75 |
| Çizelge 3.6: | mir-146a rs2910164 G/C SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde yaş ve cinsiyete göre dengelenmiş dağılımı. | 76 |

| | | |
|---------------|--|-----|
| Çizelge 3.7: | mir-146a rs2910164 G/C SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde yaş ve cinsiyete göre dengelenmiş dağılımı sonucunun AIC ve BIC değerleri. | 77 |
| Çizelge 3.8: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve alel frekansları dağılımı. | 79 |
| Çizelge 3.9: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde yaş ve cinsiyete göre dengelenmiş dağılımı. | 80 |
| Çizelge 3.10: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde yaş ve cinsiyete göre dengelenmiş dağılım sonucunun AIC ve BIC değerleri. | 81 |
| Çizelge 3.11: | mir-146a rs2910164 G/C SNP'sinin göz parametreleri ile ilişkisi. . | 86 |
| Çizelge 3.12: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'sinin göz parametreleri ile ilişkisi. | 91 |
| Çizelge 3.13: | XFG, XFS ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-146a-5p'nin relatif ekspresyon seviyesi (fold change). | 93 |
| Çizelge 3.14: | XFG, XFS ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-196a-5p'nin relatif ekspresyon seviyesi (fold change). | 94 |
| Çizelge 3.15: | mir-146a rs2910164 G/C genotipleri ile plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) karşılaştırma analizi. . | 97 |
| Çizelge 3.16: | mir-196a-2 rs11614913 C/T genotipleri ile hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) karşılaştırma analizi. | 99 |
| Çizelge 3.17: | Tüm gruplarda hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyelerinin (fold change) bazı risk faktörleri ile korelasyonu. | 101 |
| Çizelge 3.18: | XFG hastalarında hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyelerinin (fold change) bazı risk faktörleri ile korelasyonu. | 102 |
| Çizelge 3.19: | XFS hastalarında hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyelerinin (fold change) bazı risk faktörleri ile korelasyonu. | 103 |
| Çizelge 3.20: | Kontrol grubu bireylerinde hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyelerinin (fold change) bazı risk faktörleri ile korelasyonu. | 104 |
| Çizelge 3.21: | Lojistik regresyon analizleri için oluşturulan modeller. | 106 |
| Çizelge 3.22: | Lojistik regresyon analizlerinde anlamlı çıkan sonuçların çizelgesi. | 112 |
| Çizelge 3.23: | Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin ROC analizleri sonuç çizelgesi. | 114 |
| Çizelge 3.24: | Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin ROC analizleri sonuç çizelgesi. | 117 |
| Çizelge 3.25: | Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi. | 119 |
| Çizelge 3.26: | Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi. | 120 |
| Çizelge 3.27: | Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin hata matrisi analizi sonuç çizelgesi. | 121 |
| Çizelge 4.1: | mir-146a rs2910164 G/C SNP'sinin bazı çalışmalarda rapor edilen polimorfik alel frekansları. | 132 |
| Çizelge 4.2: | NCBI SNP veritabanında rapor edilen rs2910164 G/C SNP'sinin polimorfik alel frekansları. | 133 |

| | | |
|---------------|---|-----|
| Çizelge 4.3: | mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'sinin bazı çalışmalarda rapor edilen polimorfik alel frekansları..... | 135 |
| Çizelge 4.4: | NCBI SNP veritabanında rapor edilen rs11614913 C/T SNP'sinin polimorfik alel frekansları..... | 136 |
| Çizelge 4.5: | Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin ROC ve Hata matrisi analizlerinde değerlendirilmesi..... | 142 |
| Çizelge Ek.1. | Kullanılan kimyasallar ve enzimlerin listesi..... | 171 |
| Çizelge Ek.2. | Kullanılan cihazların Listesi..... | 172 |





KISALTMALAR

| | |
|----------------|--|
| ACE | : Anjiyotensin dönüştürücü enzim |
| ADM | : Yaşa bağlı makula dejenerasyonu |
| ADM | : Yaşa bağlı makula dejenerasyonu |
| ADORA3 | : Adenosine A3 receptor- adenosin reseptörü A3 |
| Ago-2 | : Argonuate-2 |
| AIC | : Akaike information criterion ailesi |
| APOE | : Apolipoprotein E |
| AUC | : Area under the curve- ROC eğrisinin altında kalan alan), bağımlı alfa 1 alt birimi A |
| BIC | : Bayesian information criterion |
| BIRC6 | : Baculoviral IAP repeat containing 6- baküloviral IAP tekrar içeren 6 |
| CACNA1A | : Calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 A- kalsiyum kanalı voltaj |
| CAT | : Katalaz |
| cDNA | : Komplementer DNA |
| CI | : Confidence interval |
| CLU | : Clusterin |
| CNTNAP2 | : Contactin associated protein 2- kontaktin ilişkili protein 2 |
| COX-2 | : Siklooksijenaz 2 |
| Ct | : Cycle threshold |
| CTFG | : Bağ dokusu büyüme faktörü |
| DGCR8 | : DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 edici büyüme faktörü bağlanma proteini 2 |
| EDTA | : Etilen Diamin Tetra Asetat |
| EtBr | : Etidyum bromür |
| FBN1 | : Fibrillin 1 frekansdır |
| GİB | : Göz içi basıncı |
| GST | : Glutasyon-S-transferaz |
| GSTP1 | : Glutasyon S-transferaz p1 |
| GWAS | : Genom çapında ilişkilendirme çalışması |
| H2O2 | : Hidrojen peroksit |
| HMGA2 | : Yüksek hareketlilik grubu AT-kanca 2 |
| HOXB8 | : Homeobox proteini Hox-B8 |
| HTR4 | : Hidroksitriptamin reseptör 4 |
| IL-1 | : İnterlökin 1 |
| IRAK-1 | : interlökin 1 (IL-1) reseptörü ile ilişkili kinaz 1 |
| İkB | : İnhibitör kappa B |
| iNOS | : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz |
| KOAH | : Kronik obstrüktif akciğer hastalığı |
| LOXL | : Çapraz bağlayıcı enzim lizil oksidaz |
| LOXL1 | : Matriks metalloproteinases |
| LTBP2 | : Latent transforming growth factor beta binding protein 2- latent transforme |

| | |
|----------------|--|
| MAF | : Polimorfizmi nadir varyasyonlardan ayırmak için ikinci en sık görülen alel |
| MAGP1 | : Microfibril-associated glycoprotein 1 - mikrofibril ilişkili glikoprotein 1 |
| MBL2 | : Mannoza bağlayıcı lektin protein C 2 |
| MD | : Mean deviasyon |
| MDA | : Malondialdehit |
| MGST1 | : Microsomal glutathione S-transferase 1- mikrozomal glutatyon-S transferaz 1 |
| MMPs | : Matriks metalloproteinases |
| MYD88 | : Miyeloid farklılaşması birincil yanıt geni 88 |
| NCBI | : National Center for Biotechnology Information |
| NF-κB | : Nükleer faktör kappa B |
| NO | : Nitrik oksit |
| OAG | : Open-angle glaucoma-Açık açılı glokom |
| OH | : Hidroksil radikali |
| OR | : Odds ratio |
| ORF | : Open Reading Frame-Açık Okuma Zinciri |
| PCR | : Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| PDAC | : Pankreatik Duktal Adenokarsinoma |
| PDGFRA | : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü alfa polipeptidi |
| PON1 | : Paraoksonaz 1 |
| PPT2 | : Palmitoil-protein tioesteraz 2 |
| PSD | : Pattern standart deviasyon |
| qRT-PCR | : Quantitative Real Time PCR-Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RISC | : RNA susturma kompleksi |
| ROC | : Receiver operating characteristic- alıcı işlem karakteristikleri |
| ROS | : Reaktif oksijen türlerinin |
| SDS | : Sodyum Dodesil Sülfat |
| SNP | : Single nucleotide polymorphism-tek nükleotid polimorfizmi |
| SOD | : Süperoksit dismutaz |
| Taq | : Thermus aquaticus |
| TBE | : Tris-Borat-EDTA tampon çözeltisi |
| TGFB1 | : Transforming growth factor beta 1- dönüştürücü büyüme faktörü B 1 |
| TGF-β | : Transforming growth factor beta family- dönüştürücü büyüme faktörü beta |
| TIMP1 | : TIMP metalloproteinaz inhibitör 1- matriks metalloproteinaz 1 |
| TIMP2 | : TIMP metalloproteinaz inhibitör 2- matriks metalloproteinaz 2 |
| TIMPs | : MMPs inhibitörü |
| TNF-α | : Tumor necrosis factor alfa- tümör nekroz faktörü alfa |
| TRAF-6 | : TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6 |
| TRBP | : HIV-1 TAR RNA-bağlanma proteini |
| TRIF | : TLR alanı içeren bağdaştırıcıyı indükleyen interferon-β |
| TYRP1 | : Tirozinaza bağlı protein 1 |
| UTR | : Untranslated Region-Çevrim Yapılmayan Bölge |
| UV | : Ultraviyole ışını |
| VFS | : Görme alanı skoru |
| XFG | : Eksfoliyatif glokom |
| XFS | : Eksfoliyasyon sendromu |

SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| Simgeler | Açıklama |
|-------------------|------------------|
| % | Yüzde |
| mmHg | Milimetre cıva |
| °C | Santigrat derece |
| Pmol | Pikomol |
| Nmol | Nanomol |
| uL | Mikrolitre |
| Mg | Mikrogram |
| g | Gram |
| Ng | Nanogram |
| mL | Mililitre |
| kb | Kilobaz |
| mM | Milimolar |
| V | Volt |
| cm | Santimetre |
| bç-bp | Baz çifti |
| nM | Nanomolar |
| U | Unit |
| $\Delta\Delta Ct$ | Delta delta Ct |
| + | Artı |
| \pm | Artı eksi |
| χ^2 | Ki-kare |
| < | Küçüktür |
| > | Büyüktür |



1. GİRİŞ

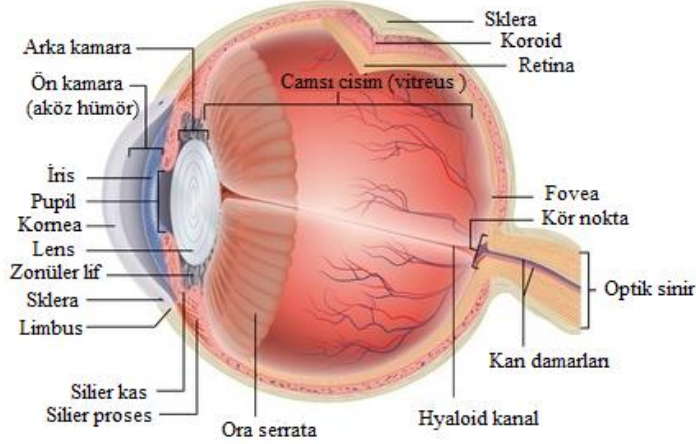
1.1 Eksfoliasyon Sendromu (XFS) ve Eksfoliatif Glokom (XFG)

1.1.1 Eksfoliasyon sendromu (XFS)

1.1.1.1 Tanımı ve tarihçesi

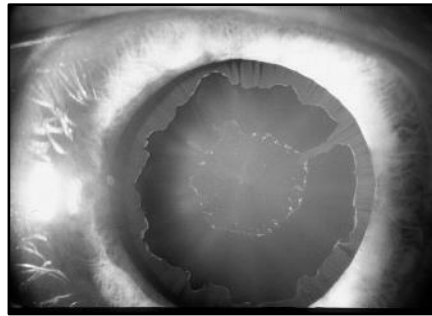
Finlandiya asıllı göz doktoru John Lindberg'in, Helsinki Üniversitesi tarafından 1917 yılında kabul edilen doktora tez çalışmasında, göz bebeğinin kenarında ve lens yüzeyinin üzerinde bulunan beyaz-gri pul ve saçak şeklinde olan birikintiler tarihte ilk kez eksfoliasyon materyali olarak tanımlanmıştır (Tarkkanen, 2018). Oküler patoloğ Georgiana Dvorak-Theobald, gerçek eksfoliasyon ile yalancı eksfoliasyon ayrımını yapmak için "psödoeksfoliasyon" terimini ortaya koymuştur. Gerçek eksfoliasyon, cam üfleyicilik mesleğindeki kişiler gibi yüksek sıcaklığa maruz kalan bireylerde lens kapsüllerinin soyulması ile oluşmakta, psödoeksfoliasyon ise hücre dışı matriks materyalinin birikimi ile oluşmaktadır. Günümüzde gerçek eksfoliasyon kalmadığından, gerçek eksfoliasyon ile psödoeksfoliasyon ayrımı yapılmasına gerek kalmamıştır. Literatürde her iki kullanım da mevcuttur (Bhat, 2010; Tarkkanen, 2018; Grzybowski vd., 2019). Genelde yaş arttıkça daha fazla gelişim gösterdiği bilinen eksfoliasyon sendromu (XFS), anormal fibriler birikintilerin göz dokularında üretilip birikmesi olarak tanımlanan bir hücre dışı matriks hastalığıdır (Bhat, 2010). Eksfoliasyon birikimi daha çok gözün ön segment kısmında olmak üzere gözde iris, silier proses, lens epiteli ve trabeküler ağ gibi farklı dokularda da saptanmıştır (Schlötzer Schrehardt vd., 1991). Göz organı, dış tabaka, orta tabaka ve iç tabaka olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Dış tabaka, kornea, sklera ve limbus isimli kısımlardan; orta tabaka, uvea, iris, silier cisim ve koroid isimli kısımlardan; iç tabaka ise görmeden sorumlu olan retina tabakasından oluşmaktadır. Göz içerisinde her birinin içleri sıvılarla kaplı ön kamara, arka kamara ve vitreus boşluğu olmak üzere üç kısım vardır. Ön kamara aköz hümör adlı sıvıyı içermekte olup, iris, arka kamara, lens ve zonüller arasında kalan bölgede bulunmaktadır. Ön kamara ve arka kamara birbirleriyle bağlantılıdır. Arka kamarada üretilen aköz hümör, pupilla yoluyla ön

kamaraya geçer. Vitreus boşluğu lens ve zonüllerin arkasında olup ağırlıklı olarak kollajen fibriller, protein ve hiyaluronik asitten oluşan vitreus adlı sıvıdan içermektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1: Gözün anatomisi (Url-1).

Deri, kalp, akciğer, karaciğer, böbrekler ve serebral meninks dokularında da eksfoliasyon birikimi saptandığından XFS'nin sistemik bir hastalık olduğu kabul edilmiştir (Schlötzer-Schrehardt vd., 1992). Gözün ön segment kısmında bulunan lens yüzeyinde ve göz bebeği (pupil) kenarında tespit edilen beyaz-gri eksfoliasyon birikintileri XFS hastalığının en önemli tanı kriteridir (Schlötzer-Schrehardt vd., 1992; Rao ve Padhy, 2014; Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001; Naumann vd., 1998) (Şekil 1.2). XFS'nin erken tanısı yoktur. Erken tanısı olmadığı gibi hastalığın ileri aşamalarında meydana gelen görüş alanı daralmasının da kalıcı tedavisi bulunmamaktadır. Eksfoliasyon nedeniyle oluşan glokoma eksfoliatif glokom (XFG) adı verilmektedir. XFG tedavi edilmediği takdirde körlüğe sebep olabilmektedir. Bu sebeple XFS hastalığının erken dönemde teşhisi önem arz etmektedir.



Şekil 1. 2: Gözün lens yüzeyi ve göz bebeği kenarı üzerinde bulunan eksfoliasyon birikiminin görünümü (Wiggs, 2013).

1.1.1.2 Eksfoliasyon sendromu (XFS) epidemiyolojisi

Coğrafya ve etnisite faktörleri itibariyle popülasyonlar arasında farklı prevalanslar gösteren XFS dünya çapında görülen bir hastalıktır (Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001). Dünya genelinde XFS prevalansı yaş arttıkça artış gösterip, 60 yaş üzerindeki bireylerde %10 ile %20 arasında görülmektedir (Schlotzer-Schrehardt, 2011). Finlandiya, Lapponlar (İsveç ve Norveç'in kuzey kutup bölgelerinde yaşayan etnik bir topluluk), İskandinavya, Rusya, Yunanistan ve Tunus'ta XFS prevalansının yüksek olduğu görülmüştür. Bu ülkelerde 50-69 yaş aralığında %3 ile %15 arasında prevalans tespit edilirken, 70 yaşın üstünde prevalansın %19 ile %36 arasında olduğu tespit edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Almanya, Fransa, İsviçre, Norveç, Mısır ve Hindistan'da ise daha düşük prevalans tespit edilmiştir (Forsius, 1988; Shazly vd., 2011; Konstas ve Ringvold, 2018; Andrikopoulos vd., 2009; Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001). Orta Doğu'da Arap Yarımadası'nda bulunan Yemen ve Ürdün ülkelerinde XFS prevalansının yaş ile arttığı görülmüştür. Yemen'de XFS prevalansı %19.5 bulunurken, Ürdün'de %9.1 olarak bulunmuştur (Al-Bdour vd., 2008; Al-Shaer vd., 2010). Amerika Birleşik Devletleri'nde Güney Louisiana'da yapılan bir araştırmada Afro-Amerikalıların (kökeni Afrika'ya dayanan ABD vatandaşları ya da sakinleri) XFS prevalansı oldukça düşük (%0.4) bulunmasına rağmen, Afrika'da yapılan çalışmalarda Güney Afrika, Etiyopya ve Kongo'da (sırasıyla %8.1, %35.8 ve %1.73) XFS prevalansının daha yüksek olduğu bulunmuştur. XFS dünya genelinde daha çok, ileri yaşlarda gözlemlenirken Afrika'da daha genç yaşlarda ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001; Olawoye ve Ritch, 2014). Ülkemizde Doğu Akdeniz bölgesinde yer alan Adana ilinde yapılan bir çalışma, XFS prevalansının 50 yaş ve üstü kişilerde %7.2, 60 yaş ve üstü kişilerde ise %11.2 olduğunu göstermiştir. İstanbul'da ise prevalans 50 yaş ve üstü kişilerde %11'dir (Yalaz vd., 1992; Yildirim vd., 2017). Hastane tabanlı bir çalışmada Orta Karadeniz bölgesinde 45 yaş ve üstü kişilerde XFS prevalansı % 12.1 olarak bulunmuştur (Cumurcu vd., 2010). Popülasyon tabanlı araştırmalar ile hastane tabanlı araştırmalar arasında prevalans değerlerinde farklılık gözlemlendiğinden XFS prevalans değerlerinin yanıltıcı olabileceğine dair düşünceler vardır. Popülasyon tabanlı yapılan bir çalışmada Sivas'ta 40 yaş ve üstü kişilerde XFS prevalansı %5.7 bulunmuştur. Popülasyon tabanlı başka bir çalışmada ise Eskişehir'de 40 yaş ve üstü kişilerde XFS prevalansı %5 bulunmuştur (Kılıç vd., 2016). Dünya üzerinde XFS prevalansına dair

çok fazla araştırma vardır. Ülkemizde bu araştırmaların çoğu hastane tabanlı olduğundan gerçeği yansıtmayabilir; ülkemizi diğer ülkeler ile karşılaştırmak için popülasyon tabanlı XFS prevalans çalışmalarının artması daha çok yardımcı olacaktır (Yıldırım vd., 2017) (Çizelge 1.1).

1.1.2 Eksfoliatif glokom (XFG)

1.1.2.1 Tanımı ve tarihçesi

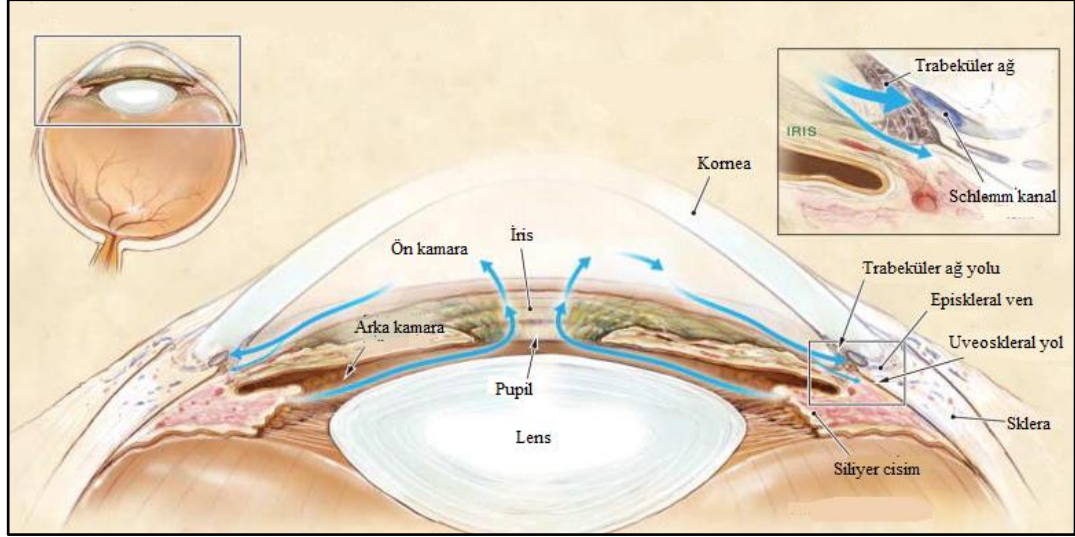
Halk arasında “göz tansiyonu” olarak da bilinen ve dünya üzerinde milyonlarca insanı etkileyen glokom, tedavi edilmediğinde geri dönüşü olmayan bir görme kaybına sebep olmaktadır. Glokom, optik sinirlerde tahribata yol açarak ilk dönemlerinde hastada görme bozuklukları yapan, son dönemlerinde ise körlüğe kadar gidebilen bir görme siniri hastalığıdır (optik nöropati). Optik sinir, beyin ile göz arasında olan ve iletişimi sağlayan sinir hücreleri demetidir. Baktığımız cisimlerden yansıyan ışıklar göze girer ve retinadaki ışık yakalama hücreleri (fotoreseptörler) tarafından algılanır. Fotoreseptörler algıladıkları ışığı elektriksel akıma dönüştürür ve sinir hücrelerine (ganglion hücreleri) aktarır. Bu ganglion hücrelerinde olan uzantılar (akson) birleşerek göz sinirini oluştururlar. Göz siniri oluşturulan bu elektrik akımını beynimizin arka tarafında bulunan görme merkezine (okspital korteks) ulaştırır ve görüntü burada oluşur. Glokom, bu anlatılan görme yolunun ganglion hücreleri bölümünde tahribat oluşturur. Buradaki hücre sayısı çoktur ve hastalığın ilerlemesi ile ölen hücre sayısı artar. Zamanla, ölen hücrelerin sorumlu olduğu görüntü parçaları beynimize taşınmaz ve görüntünün o kısımları görünmemeye başlar. Göz içi basıncı (GİB-IOP) gözün içinde üretilen aköz hümör tarafından oluşturulur. Aköz hümörün üretimi ile gözün dışına çıkışı (aköz hümör drenajı) arasında bir denge bulunmaktadır. Bu denge sayesinde gözün içerisindeki basınç sabittir. Aköz hümör içerdiği oksijen ve besin maddeleri ile gözün içinde başta kornea ve pek çok yapının beslenmesini sağlarken aynı zamanda artık metabolizma ürünlerinin uzaklaştırılmasını da sağlar (Url-2) (Şekil 1.3).

Çizelge 1. 1: Eksfoliasyon sendromunun (XFS) farklı popülasyonlardaki prevalansları.

| Popülasyon | XFS prevalansı | ≥ 50 yaş XFS prevalansı | ≥ 70 yaş XFS prevalansı | Kaynak |
|----------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Adana (Türkiye) | %11.2 (60 yaş ve üstü) | %7.2 | | (Yalaz vd., 1992) |
| Orta Karadeniz bölgesi (Türkiye) | %12.1 (45 yaş ve üstü) | | | (Cumurcu vd., 2010) |
| Sivas (Türkiye) | %5.7 (40 yaş ve üstü) | | | (Kılıç vd., 2016) |
| İstanbul (Türkiye) | | %11 | | (Yildirim vd., 2017) |
| Eskişehir (Türkiye) | %5 (40 yaş ve üstü) | | | (Yildirim vd., 2017) |
| Finlandiya | | %10 | %25.3 | (Forsius, 1988) |
| Laponlar (Norveç ve İsveç) | | %14.8 | %35.3 | (Forsius, 1988) |
| İskandinavya | | %11 | %31.5 | (Forsius, 1988) |
| Rusya | | %13.3 | %21.4 | (Forsius, 1988) |
| Eskimolar | %0 | | | (Forsius, 1988) |
| Avustralya | | | %1.46 | (Mitchell, 1999) |
| Fransa | | | %5.5 | (Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001) |
| ABD | | %0.6 | %5 | (Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001) |
| Ürdün | %9.1 | | | (Al-Bdour vd., 2008) |
| Yunanistan | %27.9 | | | (Andrikopoulos vd., 2009) |
| Yemen | %19.5 (40 yaş ve üstü) | | | (Al-Shaer vd., 2010) |
| Hindistan | %7.1 | | | (Bhat, 2010) |

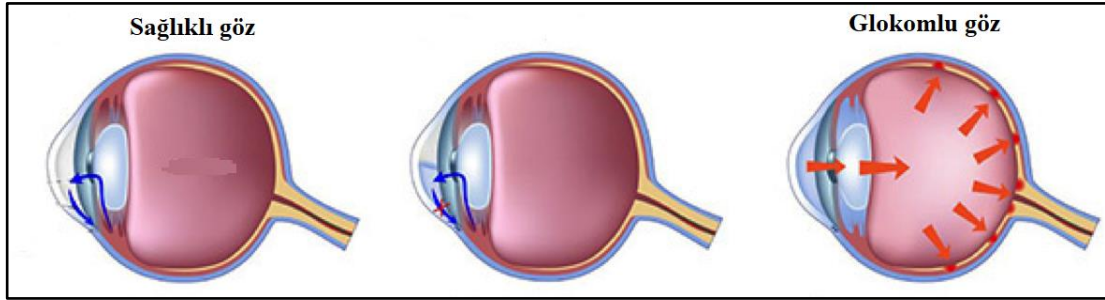
Çizelge 1. 1: (devam) Eksfoliasyon sendromunun (XFS) farklı popülasyonlardaki prevalansları.

| Popülasyon | XFS prevalansı | ≥ 50 yaş XFS prevalansı | ≥ 70 yaş XFS prevalansı | Kaynak |
|---|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Pakistan | %6.45 | | | (Bhat, 2010) |
| Çin | %0.4 | | | (Bhat, 2010) |
| Japonya | %3.4 | | | (Bhat, 2010) |
| Norveç | %6.3 | | | (Shazly vd., 2011) |
| Eskimolar | %0 | | | (Shazly vd., 2011) |
| İngiltere | %4 | | | (Shazly vd., 2011) |
| Almanya | %4.7 | | | (Shazly vd., 2011) |
| Suudi Arabistan | %25 | | | (Shazly vd., 2011) |
| Mısır | %4.14 (40 yaş ve üstü) | %6.02 (60 yaş ve üstü) | | (Shazly vd., 2011) |
| Tunus | | %3.8 | %19.1 | (Shazly vd., 2011) |
| İspanya | %13.19 | | | (Romero-Aroca vd., 2011) |
| Etiyopya | %35.8 (40 yaş ve üstü) | | | (Gelaw & Tibebe, 2012) |
| Güney Afrika | %8.1 (40 yaş ve üstü) | | | (Olawoye ve Ritch, 2014) |
| Afro-Amerikalılar (Güney Louisiana-ABD) | %0.4 | | | (Olawoye ve Ritch, 2014) |
| Etiyopya | %35.8 (40 yaş ve üstü) | | | (Olawoye & Ritch, 2014) |
| Kongo | | %1.73 | | (Olawoye ve Ritch, 2014) |
| Güney Afrika | %8.1 (40 yaş ve üstü) | | | (Olawoye ve Ritch, 2014) |



Şekil 1. 3. Aköz hümör sıvısının normal drenajı (Weinreb ve Aung, 2014).

Glokom, ortaya çıkış zamanı, oluşum mekanizması ve göz yapısı itibariyle farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Glokom hastalığı primer ve sekonder olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. Primer glokom, gözün kendi anatomik yapısı ve genetik faktörler gibi nedenlerden dolayı gelişirken sekonder glokom, sonradan meydana gelen travma, kullanılan ilaçlar ve eksfoliasyon birikiminin oluşması gibi nedenlerden gelişmektedir (Weinreb ve Aung, 2014). Glokom, aköz hümörün yeteri kadar dışa çıkamaması sonucu göz içinde birikmesi, göz içi basıncının artışı ve görme siniri üzerinde hasarların oluşmasıyla meydana gelir (Şekil 1.4).



Şekil 1. 4: Sağlıklı göz ile glokomlu gözün şematik gösterimi (Url-3).

Genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkan açık açılı glokom (open-angle glaucoma, OAG) en sık görülen glokomdur. Bu hastalıkta, aköz hümörün göz dışına akımındaki azalma basınç artışına neden olur; ancak göz içi basıncının yavaş yavaş artması nedeniyle hastanın bu duruma uyum göstermesinden dolayı glokom sessiz bir şekilde ilerleyip hissedilmeyen görme alanı kayıplarına yol açmaktadır. Açı kapanması glokomu (angle-closure glaucoma) ise aköz hümörün dışa akışındaki ani duraklamaya bağlı

olarak göz içi basıncının hızlı bir şekilde oldukça yüksek değerlere çıkması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıkta şikayetler ani ve belirgindir (King vd., 2013) (Url-2). Aköz hümör sıvısının drenajını sağlayan kanalların eksfoliasyon birikintisi ile tıkanması ve bu suretle GİB'in artması sonucunda meydana gelen glokoma eksfoliatif glokom (XFG) adı verilmektedir. Eksfoliasyon, glokomun en sık görülen nedenlerinden biridir. XFG en çok açık açılı glokoma yol açsa da açılı kapanması glokomuna da yol açabilmektedir (Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001; Mitchell, 1999).

1.1.2.2 Eksfoliatif glokom (XFG) epidemiyolojisi

XFS olan gözlerde olmayan gözlerle nazaran daha fazla glokom hastalığı oluşmaktadır. Glokom teşhisinden bağımsız olarak, XFS hastalarının %22.7'sinde yüksek GİB değeri bulunmasına karşın, XFS olmayan hastaların %1.2'sinde yüksek GİB değeri bulunmuştur (Aasved, 1971). Norveç'te yapılan bir çalışmada XFS hastalarının %30'unda yüksek GİB değeri görülürken, XFS olmayan hastaların %4.8'inde görülmektedir (Hoff vd., 1991). Orta Doğu, Avustralya ve Japonya için de benzer sonuçlar gözlemlenmiştir (Mitchell, 1999; Hoff vd., 1991; Kaljurand ve Teesalu, 2010; Summanen ve Tönjum, 1988; Aasved, 1971). XFS ve glokom arasında anlamlı ölçüde ilişki vardır; XFS'li gözlerde glokom görülmesi XFS olmayan gözlerle nazaran 8 kat fazladır. Avustralya'da yapılan bir çalışmada, 70-79 yaş aralığında glokom teşhisi konmuş XFS bulunan hastaların prevalans değeri yaklaşık %14.5 olarak bulunurken glokom teşhisi konmuş XFS bulunmayan hastaların prevalans değeri yaklaşık %4.5 olarak bulunmuştur. 80 yaş ve üstü olup glokom teşhisi konulan XFS bulunan hastaların prevalans değeri yaklaşık %32 olarak saptanırken, glokom teşhisi konulan XFS bulunmayan hastaların prevalans değeri yaklaşık %10 olarak saptanmıştır (Mitchell, 1999). İspanya'da yapılan bir çalışmada glokom teşhisi konulan XFS bulunmayan hastaların prevalansı %2.19 olarak saptanırken, glokom teşhisi konulan XFS bulunan hastaların prevalansı %7.9 olarak saptanmıştır. Yine aynı çalışmada, tüm açık açılı glokom (XFS olan ve olmayan) hastalarının prevalansı %2.86 olarak saptanırken, XFS olan ve açık açılı glokom teşhisi konan hastalarının prevalansı %29.48 olarak saptanmıştır (Romero-Aroca vd., 2011). Ülkemizde Adana'da yapılan bir çalışmada, glokom teşhisi konulan, 50 yaş ve üstü hastaların %30.5'inde, 60 yaş ve üstü hastaların % 46.9'unda ve 70 yaş ve üstü hastaların %71.4'ünde XFS bulunmuştur. XFS bulunan ve glokom teşhisi konmuş bireylerin

yüzelikleri yaş ile istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış göstermektedir (Yalaz vd., 1992). Eskişehir’de yapılan bir çalışmada XFS bulunan glokomlu bireylerin insidansı %26 bulunurken, XFS bulunmayan glokomlu bireylerin insidansı %1.70 bulunmuştur. Glokomlu hastaların 40 yaş ve üstü, 50 yaş ve üstü, 60 yaş ve üstü, 70 yaş ve üstü ve 80 yaş ve üstü gruplarda sırasıyla %26, %26.5, %26.8, %30.2 ve %55.6 oranında XFS olduğu görülmüştür (Yildirim vd., 2017). Pek çok çalışma glokom riskinin yaş ile arttığını göstermiştir. Türkiye’de Doğu Akdeniz bölgesinde hastane tabanlı farklı bir çalışmada glokomun insidansı %34.3 bulunurken İstanbul’da %18 olarak bulunmuştur (Alpay ve Ersoy, 1989; Yalaz vd., 1992) (Çizelge 1.2).

1.1.3 Eksfoliasyon sendromu (XFS) ve Eksfoliatif glokom (XFG) Patogenezi

1.1.3.1 XFS patogenezi

XFS, göz dokularında anormal hücre dışı fibriler materyallerin üretilip birikmesiyle karakterize olan bir hastalıktır. Anormal hücre dışı fibrillerin yetersiz yıkımı veya fazla üretilmesi bu hastalığın oluşma sebebidir. Eksfoliasyon materyali göz içerisinde lens, iris, silier epitel ve konjonktiva tarafından üretilmektedir (Streeten, 1986; Streeten, 1987; Mitchell, 1999; Ritch, 2008). Çok fazla araştırma yapılmasına rağmen eksfoliasyon materyalinin kesin kimyasal içeriği ve yapısı tam olarak bilinmemektedir. Morfolojik ve *in vitro* çalışmalar neticesinde eksfoliasyon materyali patogenezi için 3 temel teori öne sürülmüştür. Diğer teorilerden daha fazla kabul görmüş olan elastik mikrofibril teorisi, biyokimyasal, immünohistokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemler ile kanıtlanıp gösterilmiştir (Streeten, 1986; Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001). Bu teoriye göre, eksfoliasyon materyali glikoprotein ve proteoglikan yapılardan oluşmaktadır ve bu yapıların immünohistokimyasal olarak elastik fibriller (elastin, tropoelastin, amilod P ve vitronektin) ve elastik mikrofibril bileşenlerinden [fibrillin 1, *MAGP1* (Microfibril-associated glycoprotein 1 – mikrofibril ilişkili glikoprotein 1), TGF- β (Transforming growth factor beta family-dönüştürücü büyüme faktörü beta ailesi)] oluştuğu gösterilmiştir (Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001). Kromatografik yöntemler ile elastik fibriler yapıların içerisinde fibrillin-1, fibulin-2, vitronektin, sindekan, versikan, hüce dışı şaperon clusterin, çapraz bağlayıcı enzim lizil oksidaz (*LOXL*) ve başka proteinlerin varlığı gösterilmiştir (Ovodenko vd., 2007).

Çizelge 1. 2: Eksfoliatif glokomun (XFG) farklı popülasyonlardaki prevalansları.

| Popülasyon | XFG prevalansı | ≥ 50 yaş XFG prevalansı | ≥ 80 yaş XFG prevalansı | Kaynak |
|---------------------|--|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Adana (Türkiye) | %46.9 (60 yaş ve üstü) %71.4 (70 yaş ve üstü) | %30.5 | | (Yalaz vd., 1992) |
| Eskişehir (Türkiye) | %26 (40 yaş ve üstü) %26.8 (60 yaş ve üstü) %30.7 (70 yaş ve üstü) | %26.5 | %55.6 | (Yildirim vd., 2017) |
| Avustralya | %14.5 (70-79 yaş) | | %32 | (Mitchell, 1999) |
| İspanya | %7.9 (tüm glokomlarda) %29.48 (açık açılı glokomlarda) | | | (Romero-Aroca vd., 2011) |

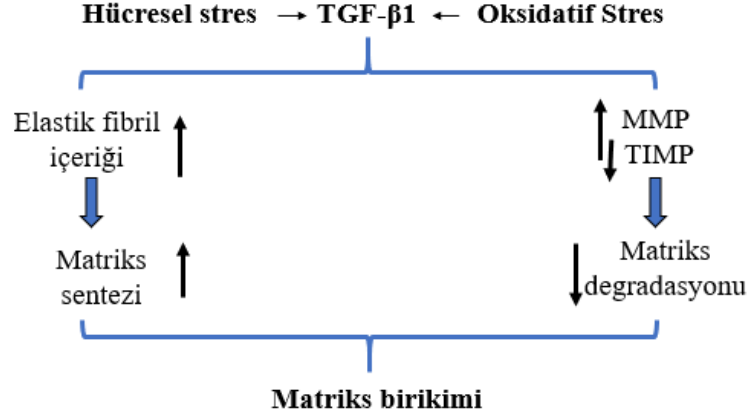
Günümüzde, XFS'li hastaların göz dokularında hücre dışı matriks metabolizması ve hücrel stres ile ilgili genlerin seviyelerinin farklı olduğu tespit edilmiştir. XFS hastalığının oluşum sürecinde elastik fibrillerin fazla üretimi, büyüme faktörlerinin özellikle *TGFBI*'in (Transforming growth factor beta 1- dönüştürücü büyüme faktörü B1) fazla eksprese olması, MMPs (matriks metalloproteinases) ve TIMPs (MMPs inhibitörü) arasındaki dengesizlik, artmış hücrel stres, oksidatif stres ve hücrel strese karşı korunma mekanizmalarındaki bozuklukların yer aldığı gösterilmiştir (Ho vd., 2005; Schlötzer-Schrehardt vd., 2003; Rönkkö vd., 2007). Ayrıca, 2010 yılında yapılan bir çalışmada, doku inflamasyonunun, XFS başlangıç sürecinin ilk dönemlerinde rol oynadığı gösterilmiştir (Zenkel vd., 2010). Buna benzer bir çalışmada, lokal ve kronik inflamasyonun XFS gelişiminde merkezi role sahip olduğu bulunmuştur (Yildirim vd., 2013). Farklı bir çalışmada, inflamasyonun XFS'nin patogeneğinde rol oynadığı belirtilmiştir (Okutucu vd., 2020).

1.1.3.2 XFG patogenezi

Glokomun patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır ancak GİB seviyesinin retinal gangliyon hücrelerin ölümü ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Aköz hümör GİB dengesini sağlar. Bu denge bozulduğunda GİB artarak göz sinirlerine zarar verir ve glokoma sebep olur (Weinreb ve Aung, 2014). XFG aköz hümör akışının dışa akım direnci ve yüksek GİB ile ilişkilidir. Oluşum mekanizmasında trabeküler ağın eksfoliasyon materyali veyahut iris pigmenti ile tıkanması ve trabeküler hücre bozuklukları rol almaktadır. XFG'nin temel patolojisi eksfoliasyon materyalinin trabeküler ağda birikmesi gibi görünse de Schlemm kanalındaki ve jukstakanaliküler dokudaki tahribat en temel patolojidir (Ritch vd., 2003). XFS'li gözlerde glokom oluşma riski 5 kat artmaktadır. Bu riskin diğer glokom risklerinden bağımsız olduğu da gösterilmiştir (Mitchell, 1999). XFS'nin, kendi başına, GİB artışı olmadan da glokoma eğilimli olduğu, her GİB seviyesinde XFS'li gözde XFS'li olmayan göze göre daha çok glokom hasarının oluşabileceği gösterilmiştir (Davanger vd., 1991). XFS, açık açılı glokom için en önemli ve tek başına tanımlanabilir risk faktörüdür (Schlötzer-Schrehardt ve Naumann, 2006). Farklı bir çalışmada, inflamasyonun XFG'nin patogeneğinde rol oynadığı belirtilmiştir (Okutucu vd., 2020). 2017 yılında bir çalışmada, açık açılı glokom ve XFG hastalarının, göz kapaklarının içini ve gözlerin beyaz kısmını (sklera) kaplayan zar olan konjonktivalarında oksidatif stresin ve inflamasyonun olduğu görülmüştür (Helin-Toiviainen vd., 2017).

1.1.3.3 XFS ve XFG ile oksidatif stres ilişkisi

Oksidatif stres, oksidanlar ile antioksidanlar arasında bir dengesizlik durumu veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) fizyolojik değerlere göre, hücre içi konsantrasyonlarında bir artış olarak tanımlanır. Hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH) ve nitrik oksit (NO) gibi ROS'lar, proteinlere, lipitlere, karbohidratlara ve nükleik asitlere zarar vererek DNA hasarına ve hücrel hasara yol açarlar. Antioksidan savunma sistemi, hücreleri ROS'lardan koruyabilmektedir (Sies vd., 2017). Kabul görmüş olan XFS patogenezi teorisi, XFS'nin büyüme faktörünü (*TGF- β 1*), oksidatif stresi ve bozulmuş hücrel koruma mekanizmalarından oluşan elastik fibrilleri anahtar faktör olarak tanımlar. Tüm göz içi dokuları aköz hümör ile yıkandığından, aköz hümör içeriğinin XFS patogenezi etkileyebileceği düşünülmüştür. Eksfoliasyon içeriğinin XFS patogenezi etkileyebileceği ve aköz hümörün göz içi cerrahi işlemler sırasında kolay elde edilebilmesinden dolayı çok fazla çalışma yapılmıştır (Schlötzer-Schrehardt ve Naumann, 2006) (Şekil 1.5). Aköz hümör çalışmalarında, büyüme faktörlerinde (özellikle *TGF- β 1*), oksidatif stres belirteçlerinde (8-isoprostaglandin- $F2\alpha$) ve sitokin (interlökin 8) seviyelerinde artış görülürken, antioksidanlarda (absorbik asit, katalaz, glutatyon peroxidaz, A, C ve E vitaminleri) azalma ve matriks metalloproteinazlar (MMP) ve bunların doku inhibitörleri (TIMP) arasında dengesizlikler görülmüştür. Hücrel stres koşullarının XFS'nin temel patogeneziinde yer aldığını gösteren çalışmaların sayısı gittikçe artmaktadır (Ghanem vd., 2011; Koliakos vd., 2002; Koliakos vd., 2003; Schlötzer-Schrehardt ve Naumann, 2006; Takai vd., 2012). Ekibimiz tarafından Türk popülasyonunda yapılan çalışmalardan birinde, XFS ve XFG gruplarındaki hastaların aköz hümör örneklerinde hücrel stres durumlarında artış gösteren clusterin ve total protein konsantrasyonlarının, kontrol grubundaki hastalara nazaran istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur (Demirkaya Budak, 2018). Diğer bir çalışmada ise, XFG grubundaki hastaların gözyaşlarındaki *TGF- β* tarafından indüklenen bağ dokusu büyüme faktörü (CTFG) ve total protein konsantrasyonlarının, kontrol grubundaki hastalara nazaran istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (Can Demirdögen vd., 2019a; Koçan, 2018).



Şekil 1. 5: XFS ve XFG ile hüresel ve oksidatif stres ilişkisini gösteren şema.

Hidrojen peroksit veya nitrik oksit gibi oksidanların seviyeleri ve lipit peroksidasyon ürünleri, okside ve metillenmiş proteinlerin bozunma ürünleri gibi oksidatif stres belirteçlerinin XFS hastalarının aköz hümoürlerinde, dokularında ve serumlarında önemli ölçüde artmış olduğu gösterilmiştir (Schlötzer-Schrehardt, 2009). 2018 yılında serumda yapılan bir çalışmada, XFG, XFS ve kontrol grupları arasındaki oksidatif stres belirteci olan lipit peroksidasyonu ürünü malondialdehit (MDA) seviyeleri karşılaştırıldığında en yüksek MDA seviyesinin XFG grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Yüksek MDA seviyelerinde, eksfoliasyon materyali oluşumunda ve XFG gelişiminde oksidatif stresin etkilerinin rol oynadığını düşündürmüştür. ROS metabolizmasında anahtar rol oynayan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin aktiviteleri, XFS ve XFG hastalarında kontrol grubuna nazaran anlamlı olarak düşük bulunurken, XFS ve XFG hastaları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar, oksidatif stresin XFS patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Özellikle, lipit peroksidasyonu ve azalmış antioksidan enzim aktivitelerinin eksfoliasyon gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yaz vd., 2018). Oksidatif stres ve enflamasyon arasındaki ilişki birçok yazar tarafından belgelenmiştir. Kanıtlar, oksidatif stresin kronik enflamatuvar hastalıklarda patojenik bir rol oynadığını göstermektedir. Oksitlenmiş proteinler, glikolize ürünler ve lipit peroksidasyonu gibi oksidatif stres hasarının, çoğunlukla beyin bozukluklarında bildirilen nöron dejenerasyonlarına neden olduğu bilinmektedir. Beyin dokularında üretilen ROS'un nöronlar arasındaki sinaptik ve sinaptik olmayan iletişimi modüle ederek nöroenflamasyona yol açabildiği ve bu durumun hücre ölümü, nörodejenerasyon ve hafıza kaybıyla sonuçlanabildiği gösterilmiştir (Hussain vd., 2016).

1.1.4 Eksfoliasyon sendromu (XFS) ve Eksfoliatif glokom (XFG) risk faktörleri

1.1.4.1 Genetik faktörler

Gen ekspresyon analiz çalışmaları eksfoliasyon materyalinin patolojik üretiminde önemli olabilecek birkaç gen sınıfını ortaya çıkarmıştır. Bu genler, hücre dışı matris metabolizması [*FBNI* (fibrillin 1), *TIMP1* ve *TIMP2* (TIMP metalloproteinaz 1 ve 2'nin doku inhibitörleri), *TGFBI*] ve hücrel stres yanıtı ve regülasyonu [*ADORA3* (adenosine A3 receptor- adenosin reseptörü A3), *CLU* (clusterin) ve *MGST1* (Microsomal glutathione S-transferase 1- mikrozomal glutatyon-S transferaz 1)] ile ilişkili olan genlerdir. Ailesel kümelenme ve genetik bağlantı analizleri de dahil olmak üzere çeşitli çalışmalar ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda XFS hastalığında genetik faktörlerin rol oynadığı gösterilmiştir (Zenkel vd., 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalarda XFS ve *LOXLI* (lysyl oksidaz like 1- lizil oksidaz benzeri 1) enzimini kodlayan gen bölgesi arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. *LOXLI* glokom için en önemli genetik risk faktörüdür. *LOXLI* geninin ürünü olan lizil oksidaz benzeri 1, XFS patofizyolojisinde elastik lif sentezinde anahtar rol oynayan bir enzimdir. 2007 yılında, İskandinav popülasyonunda gerçekleştirilen bir genom çapında ilişkilendirme çalışmasında (GWAS), *LOXLI* geninde XFS ve XFG gelişme riski ile güçlü bir şekilde ilişkili olan 3 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tanımlanmıştır (Thorleifsson vd., 2007). Yakın tarihli bir GWAS çalışmasında *CACNA1A* (calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 A- kalsiyum kanalı voltaj bağımlı alfa 1 alt birimi A) lokusu ile XFS arasında önemli bir ilişki olduğu bildirildi. Bu ilişki ilk olarak büyük bir Japon XFS veri kümesinde, daha sonra ise yaklaşık 7.000 XFS vakası ve 17 ülkeden türetilen 20.000'den fazla kontrolden oluşan çok büyük ve çok ırklı bir veri kümesinde tanımlanmıştır. İlişkili bulunan rs4926244 SNP'si, *CACNA1A*'nın 3' ucuna yakın bir intronik bölgede yer alır. Rs4926244 için risk aleli, *LOXLI*'den farklı olarak, tüm büyük popülasyonlarda %10 ila %40 arasında değişen bir alel frekansı ile tutarlılık göstermektedir (Aung vd., 2015). Çeşitli stres ve patolojik durumlarda *CLU* fazla ifade edilmesine rağmen eksfoliasyonlu gözlerin ön kamarasında ifade edilme seviyesinde azalma görülür; bu durum XFS gelişiminde *CLU* varyantlarının rol alabileceğini göstermektedir (Ghaffari Sharaf vd., 2019). Ekibimiz tarafından yapılan önceki çalışmada, Türk popülasyonunda, gözyaşı örneklerinde, XFG için, *CLU* rs11136000 C/T, rs1532278 C/T ve rs2279590 C/T SNP'lerinde, CT ve CC genotiplerinin gerek

ayrı ayrı gerekse beraber olmak üzere, TT genotipine nazaran yaklaşık 3 kat daha riskli olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre C alelinin XFS ve XFG ile ilişkisi olabileceği düşünülmektedir. *CLU* rs3087554 A/G SNP'sinde ise AA genotipinin XFG için yaklaşık 2.4 kat daha koruyucu olduğu görülmüştür (Demirkaya Budak, 2018). İki farklı çalışmada, primer açık açılı glokom hastalarının aköz hümlerinde kontrol grubundaki kişilere nazaran *CTGF* geninin ürünü olan bağ doku büyüme faktörünün konsantrasyonunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Ghanem vd., 2011; Browne vd., 2011). Ekibimiz tarafından yapılan bir çalışmada, Türk popülasyonunda *CTGF* geninde bulunan rs6918698 G/C, rs9399005 C/T, rs12526196 T/C ve rs9402373 C/G SNP'leri ile XFS ve XFG arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir (Koçan, 2018). Antioksidan ve antienflamatuar olarak bilinen bir enzim olan Paraoksonaz 1'i kodlayan *PON1* geninde ekibimiz tarafından yapılan bir çalışmada da, *PON1* geninde bulunan -107 TC ve CC genotiplerinin XFS ile arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ilişki olduğu bulunmuştur (Can Demirdöğen vd., 2019a; Koçan, 2018). Aday gen çalışmalarında, *CNTNAP2* (contactin associated protein 2- kontaktin ilişkili protein 2) , *APOE* (apolipoprotein E), glutatyon-S-transferaz genleri (*GST*'ler), TNF- α genleri (tumor necrosis factor alfa- tümör nekroz faktörü alfa), MMP'ler, *LTBP2* (latent transforming growth factor beta binding protein 2- latent transforme edici büyüme faktörü bağlanma proteini 2) ve *BIRC6* (baculoviral IAP repeat containing 6- baküloviral IAP tekrar içeren 6) ile XFS arasında ilişki tespit edilmiştir; ancak bu sonuçları tüm ırklarla ilişkilendirmek için daha büyük bir GWAS çalışması yapılmalıdır (Aboobakar vd., 2016). Genetik ve çevresel faktörlerin yanı sıra diğer kompleks hastalık ve bozukluklarda da görüldüğü gibi epigenetik varyasyonların da XFS'de önemli bir rol oynayabileceğine inanılmaktadır. Uzun kodlama yapmayan RNA'lar ve mikroRNA'lar da bu epigenetik faktörler arasındadır (Ghaffari Sharaf vd., 2019). Uygur popülasyonunda yapılan bir çalışmada, XFS hastalarından toplanan ön lens kapsülü epitel hücrelerinde bulunan *LOXLI* geninin promotor bölgesindeki CpG adalarının hipermetile olduğu gösterilmiştir. Hipermetile olan *LOXLI* geninin aşağı doğru düzenlenmesi (downregulation) durumunun XFS oluşumuna ve gelişimine dahil olduğu görülmüştür (Ye vd., 2015).

1.1.4.2 Çevresel faktörler

Çevresel faktörler *LOXLI* geninin ürünü olan lizil oksidaz benzeri 1 enziminin aktivitesini değiştirebilir. Bu husus ekfoliasyon birikintilerini oluşturma riski

altındaki bireylerin hastalığa yatkınlığını arttırabilmektedir (Dewundara ve Pasquale, 2015). Enlem farklılığı, güneşe maruz kalma süresi farklılığı ve iklim farklılığı XFS'ye etki eden çevresel faktörlerdendir (Taylor, 1980; Stein vd., 2011a; Kang vd., 2012). Ayrıca, folat alımı ve kahve tüketimi gibi diyet faktörlerinin, muhtemelen homosistein düzeylerini etkileyerek XFS riskini değiştirdiği bulunmuştur (Urgert vd., 2000; Pasquale vd., 2012; Xu vd., 2012). Çevresel faktörlerdeki değişikliklerin genetik olarak XFS geliştirmeye yatkın kişilerde hastalık değişikliğine yol açabileceğini düşündürmektedir (Dewundara ve Pasquale, 2015). Epidemiyolojik çalışmalar, coğrafyanın ve daha yüksek ultraviyole (UV) ışınına maruziyet seviyelerinin XFS gelişimine etki edebileceğini düşündürmektedir. Yapılan retrospektif çalışmalarda, Amerikalılarda XFS riskinin artması açık havada ve güneşli günlerde daha fazla vakit geçirmeleri ile ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde, ABD ve İsrail'de yaşayan bireyleri inceleyen bir çalışmada, yaşamları boyunca yaz aylarında açık havada daha fazla vakit geçiren, su veya kar üzerinde çalışma öyküsü olanların XFS geliştirme riskinin arttığı bulunmuştur (Stein vd., 2011a; Pasquale vd., 2014; Olawoye ve Ritch, 2014).

1.1.4.3 Göz yapısı

İsrail'deki farklı kökenlerden gelen Yahudi'ler arasında yapılan karşılaştırma sonucunda, kahverengi gözlü insanların açık renkli gözlere sahip insanlara göre daha fazla eksfoliasyon birikintilerine sahip oldukları bulunmuştur (Meyer vd., 1984). Laponlar veya Finlandiyalıların iris rengi ile eksfoliasyon birikintisi arasında ise bir ilişki bulunmamıştır (Forsius, 1988). Yapı olarak küçük, merkezi ön kamara derinliği sığ, lensi kalın ve daha önde olan gözün açılı kapanması glokomu için risk oluşturduğu yakın zamanda tanımlanmıştır. Benzer şekilde, kısa aksenal uzunluk, daha kısa ön kamara genişliği ile alan ve hacim gibi anatomik yapıların da açılı kapanması glokomu için risk oluşturduğu yakın zamanda tanımlanmıştır (Nongpiur vd., 2011; Lavanya vd., 2008).

1.1.4.4 Yaş

Dünya çapında XFS dağılımı yaşa bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte çoğunlukla 60 yaş ve üzerinde olan kişilerde görülmektedir. Afrika'da yapılan bir çalışmada, XFS'li hastaların yaş ortalaması 66.2 olarak bulunurken XFS olmayan hastalarda bu ortalama 64.6 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada, 41-50 yaş grubunda %10.1, 51-60 yaş grubunda %17.9, 61-70 yaş grubunda %19, 71-80 yaş grubunda

%27.2, 81 yaş ve üzeri grupta ise % 28.8 oranında XFS hastası olduğu gösterilmiştir (Al-Shaer vd., 2010). Afrikalılarda XFS prevalansı yaşla birlikte artış göstermekle birlikte diğer ülkelerle kıyaslandığında XFS, Afrikalılarda daha küçük yaşta bireylerde görülmektedir (Olawoye ve Ritch, 2014). Türkiye’de yapılan bir çalışmada glokomlu hastalarda XFS görülme sıklığı 50 yaş ve üzeri grupta %30.5, 60 yaş ve üzeri grupta %46.9, 70 yaş ve üzeri grupta ise %71.4 olarak bulunmuştur. Glokomlu hastalarda XFS yüzdesi artan yaşla birlikte artış göstermiştir ve yaş grupları arasındaki farklar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ilişki bulunmuştur (Yalaz vd., 1992).

1.1.4.5 Cinsiyet

Erkek ve kadın arasında XFS dağılımı ülkeler ve popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Bazı yayınlarda XFS’nin kadınlarda daha yaygın olduğu görülmüştür. Örneğin bir çalışmada, XFS’nin kadınlarda erkeklerden 3 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Kozart ve Yanoff, 1982). Farklı bir çalışmada da XFS’nin insidansı kadınlarda daha yüksek olduğu bulunmuştur (Karger vd., 2003). Bazı yayınlarda ise XFS’nin erkeklerde daha yaygın olduğu görülmüştür. Örneğin Kongo’da yapılan bir çalışmada, erkeklerde kadınlardan daha çok XFS görüldüğü gösterilmiştir. Farklı çalışmalarda Yugoslavlar, Avustralya yerlilerinde, Peru Kızılderililerinde ve Hintlilerde de erkeklerde daha yaygın olarak bulunmuştur (Olawoye ve Ritch, 2014; Al-Saleh vd., 2015). Türkiye’de de erkek ve kadın arasındaki XFS dağılımını gösteren bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada erkeklerde %8 oranında, kadınlarda %3.6 oranında XFS görüldüğü ve bu dağılımın iki cinsiyet arasında anlamlı ölçüde istatistiksel olarak farklı olduğu gösterilmiştir (Kılıç vd., 2016). Glokomun erkeklerde daha erken, daha sık ve daha şiddetli gelişebileceği görülmüştür. Pek çok çalışmada ise glokomlu hastalarda cinsiyet dağılımında farklılık bulunmamıştır (Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001).

1.1.4.6 Etnik köken

İskandinav, Baltık, Akdeniz ve Arap popülasyonlarında XFS yaygınlığı yüksektir ve genellikle 60 yaş üstü bireylerin %30’unu etkilemektedir. Coğrafi ve etnik popülasyonlar arasındaki yaygınlık oranındaki farklılıkların altında yatan nedenler tam olarak bilinmemekle beraber bu durumun esas olarak genetik faktörler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Schlotzer-Schrehardt, 2011). XFS ve XFG hastalıklarında

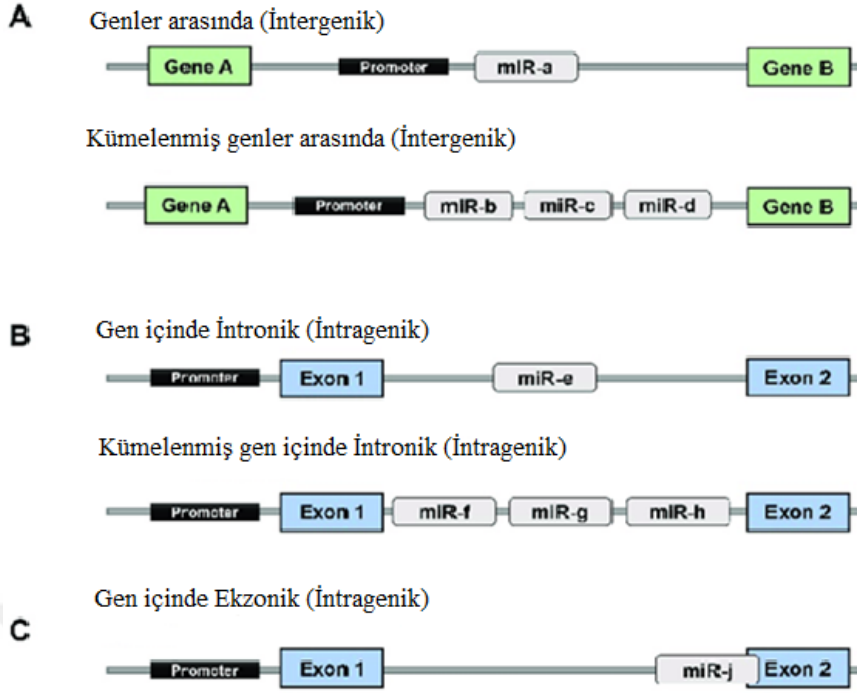
ırk ve prevalans arasındaki bağlantı tam olarak anlaşılammıştır. XFS'nin prevalansı Yunanistan'da yüksektir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada da XFG'nin Yunan kökenli bireylerde daha yaygın olduğu görülmüştür. Chicago'da vakaların %15.6'sının Yunanistan doğumlu olduğu tespit edilerek XFG'nin Yunan kökenli bireylerde daha yaygın olduğu görülmüştür (Gradle ve Sugar, 1947). Benzer şekilde, Avustralya'da Yunan, Leton ve Rus kökenli bireylerde XFS'nin daha yaygın olduğu gösterilmiştir (Gillies, 1972). Pakistan'da yapılan farklı bir çalışmada, XFS'nin ve XFG'nin, Kuzey Batı Sınır Eyaleti'nin dağlık bölgelerinde yaşayan Patan kabilesinde daha yaygın olduğu görülmüştür (Shafiq ve Sharif-ul-hasan, 2007). New Mexico'da, İspanyol kökenli Amerikalı erkeklerin, İngiltere kökenli Amerikalılardan altı kat daha fazla XFS geliştirdiği gösterilmiştir (Jones vd., 1992). Fransa'nın güneydoğusunda bulunan Kelt kökenli kişilerde XFS'nin daha yaygın olduğu görülmüştür (Colin vd., 1988). Nepal'de etnik bir grup olan Gurung'un %12'sinde XFS görülürken benzer yaştaki Gurung kökenli olmayanların sadece %0.24'ünde XFS görülmüştür (Shakya vd., 2004).

1.2 mikroRNA'lar

mikroRNA'lar ilk kez 1993 yılında model bir organizma olan *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) nematodunda keşfedilmiştir. *C.elegans* organizmasında bulunan lin-4'ün, başlangıçta, geleneksel bir protein kodlama geni olduğu sanılmış ise de lin-4'ün bir proteini değil, 22 nükleotitlik düzenleyici bir RNA'yı kodladığı keşfedilmiştir. Lin-4 RNA'sının, *C.elegans*'ta başka bir gen olan lin-14 mRNA'sı ile komplementer olması dolayısıyla, bu mRNA'ya bağlanabildiği ve LIN-14 proteininin sentezini kontrol edebildiği gösterilmiştir (Lee vd., 1993; Wightman vd., 1993). Daha sonra 2000 yılında *C.elegans*'ta bir başka düzenleyici RNA olan let-7 keşfedilmiştir. 21 nükleotitten oluşan let-7'nin, larva döneminden erişkin döneme geçişi kontrol ettiği gözlenmiştir. Söz konusu olan let-7'nin insanlar da dahil olmak üzere birçok organizmada bulunduğu gösterilmiştir (Reinhart vd., 2000; Lee vd., 2016). Bitkilerden hayvanlara çeşitli ökaryot canlılarda keşfedilmesi devrim niteliğinde kabul edilen ve gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu bu kısa (yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda) kodlama yapmayan RNA'lara mikroRNA (miRNA) adı verilmiştir (Griffiths-Jones, 2006). *miRNA*'larda bulunan spesifik tamamlayıcı dizi (çekirdek dizi, seed region), hedef mRNA'nın 3' UTR (Untranslated Region-Çevrim Yapılmayan Bölge), 5'UTR

veya ORF (Open Reading Frame-Açık Okuma Zinciri) bölgelerinde bulunan tamamlayıcı diziyi tanıyıp bağlanarak gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak etkilemektedir. miRNA'nın gen ekspresyonunu etkilemesi, hedef mRNA'nın degradasyonu, translasyon başlangıcının inhibisyonu veya translasyon uzamasının inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalarla meydana gelmektedir (Lee vd., 2016; Undi vd., 2013). 2-8 nükleotit uzunluğundaki bu çekirdek diziler, mRNA'ya komplementer olarak bağlandıkları için büyük önem taşımaktadırlar (Treiber vd., 2012). *miRNA*'lar, genler arasında (intergenik) veya gen içinde (intragenik) dağınık ya da kümelenmiş halde bulunmaktadır. Gen içinde bulunan *miRNA*'lar, intronik ve ekzonik bölgelerde bulunabilmektedirler (Olena ve Patton, 2010; Hinske vd., 2010) (Şekil 1.6).

miRNA'ların adlandırılmaları, keşfedildikleri sıraya göre yapılmaktadır. Bulunmuş ve doğruluğu kanıtlanmış *miRNA*'lara "miR" ekinin ardından bir sayı gelmektedir (örneğin miR-172). Hsa-miR-172'de ilk üç harf türü ifade etmektedir (örneğin; *Homo sapiens* için "hsa", *Triticum aestivum* için "tae"). Olgun *miRNA* miR-172 (büyük harf "R" ile) şeklinde gösterilirken, olgun olmayan için ise mir-172 (küçük harf "r" ile) şeklinde gösterilir. Küçük harf ile gösterilen "r" hem *miRNA* genine hem de stem-loop formuna karşılık gelmektedir. Farklı dizilerden ve farklı genomik lokuslardan kaynaklanan aynı olgun *miRNA* dizilerine hsa-miR-219-1 ve hsa-miR-219-2 örneğindeki gibi sayısal son ek içeren numaralar verilmektedir. Ayrıca 1 veya 2 nükleotit farklılık gösteren hsa-miR-130a ve hsa-miR-130b gibi yakından ilişkili olgun *miRNA* dizileri için son ek içeren harfler verilerek adlandırma yapılmaktadır (Budak vd., 2016). Şimdiye kadar %50'den fazlası beyinde olmak üzere farklı dokularda 2.000'den fazla insan *miRNA*'sı tanımlanmıştır. *miRNA*'lar nörogenez ve sinaptik plastisite ile ilgili birçok beyin fonksiyonunda rol oynamaktadır (Simonato, 2018). *miRNA*'lar hücrel büyüme, proliferasyon, farklılaşma, hücre döngüsü, yaşlanma, apoptoz ve metabolizma gibi yollarda rol oynamaktadırlar. Bazı *miRNA*'ların ekspresyonunun azalması, hücre döngüsü ile ilişkili genleri baskılayarak kanser hücrelerinin farklılaşmasını sağlarken, bazı *miRNA*'lar ise hücre döngüsü ile ilişkili diğer genlerin aşırı ekspresyonuna sebep olarak apoptozun inhibisyonuna neden olmaktadır (Croce, 2009). Anormal *miRNA* ekspresyonu, kanser ve nörolojik bozukluklar da dahil olmak üzere birçok farklı hastalık ile ilişkilendirilmiştir. *miRNA* inhibitörleri, inanılmaz bir hızla tedaviye yönelik geliştirilmektedirler (Treiber vd., 2019).



Şekil 1.6 : miRNA'ların genomdaki dağılımı (Wong vd., 2016).

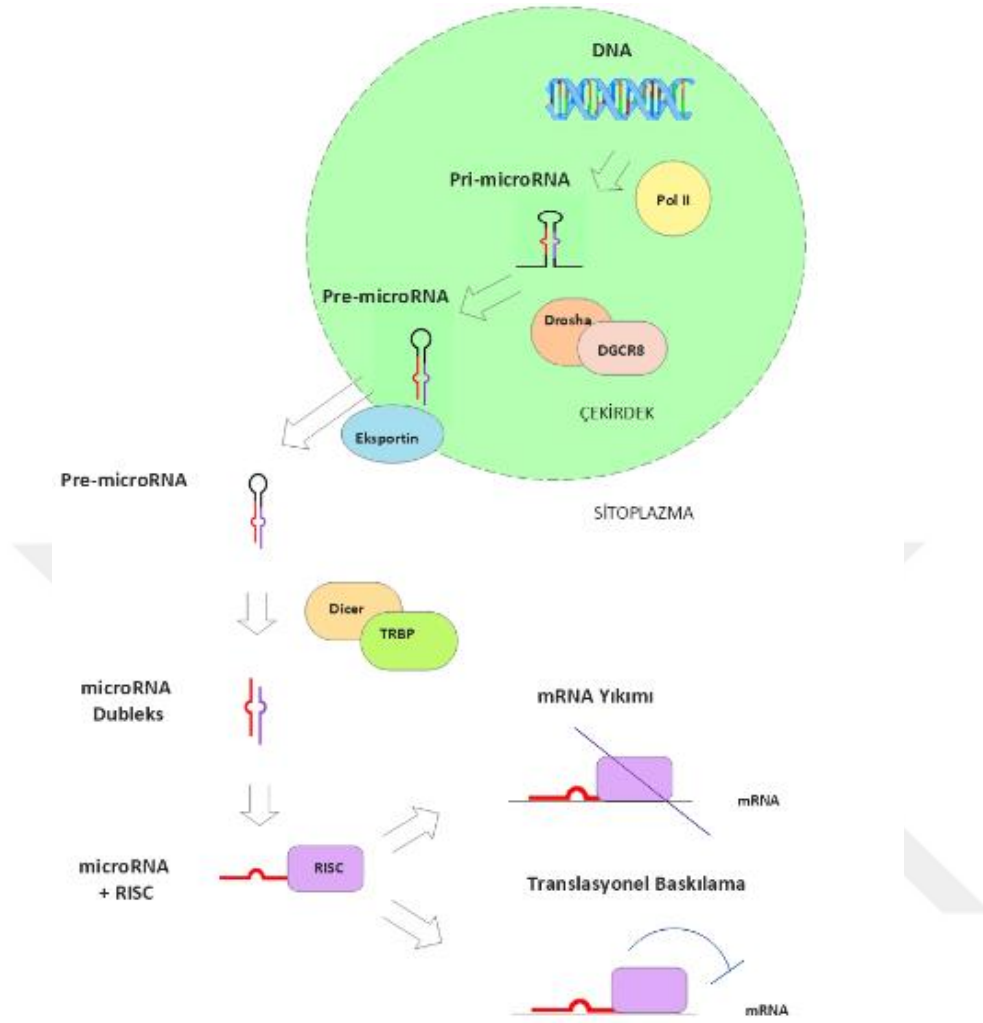
1.2.1 miRNA biyogenezi

Günümüzde yapılan çok sayıda çalışma, miRNA'nın fonksiyonunun ve biyogenezinin moleküler detaylarının sıkı bir şekilde düzenlenmiş halde olduğunu göstermiştir. Bu suretle, miRNA'nın fonksiyonunun ve biyogenezinin temel prensiplerinin anlaşılması olduğu söylenebilir. Araştırmalar devam etmekte olup bilinmeyenler keşfedilmeyi beklemektedir (Treiber vd., 2019). miRNA biyogenezi nükleer kesim ve sitoplazmik kesim olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Bu iki aşamada *miRNA* geni transkribe olduktan sonra ilk olarak olgun miRNA dizisini içeren uzun öncül miRNA (*pri-miRNA*), sonrasında öncül prekürsör miRNA (*pre-miRNA*) ve son olarak da olgun miRNA dubleksi (*miRNA:miRNA**) oluşur (anlamsız iplik yıldız işareti ile ifade edilmektedir). Genellikle insanda, çoğunlukla RNA polimeraz II enzimleri tarafından *pri-miRNA* sentezlenir. *Pri-miRNA*'ların tıpkı mRNA'lardaki gibi, 5' ucunda 7 metilguanozin başlığı ve 3' ucunda poli A kuyruğu bulunmaktadır. Tek zincirli olan *pri-miRNA*'lar kendi üzerlerinde kıvrılarak saç tokası yapısını (*hairpin structure*) oluştururlar. Sonrasında ilk kesim aşaması olan nükleer kesim gerçekleşir. RNAaz III enzimi (Drosha), kofaktörü olan DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8) alt ünitesi ile birleşerek *pri-miRNA*'yı keser ve miRNA'lar 70-100 nükleotit uzunluğundaki *pre-miRNA*'ya dönüşürler. *Pre-miRNA*, nükleer transport reseptörü

(Exportin 5) ile çekirdekten sitoplazmaya geçer. Sonrasında ikinci kesim aşaması olan sitoplazmik kesim gerçekleşir. Sitoplazmada RNAaz III enzimi (Dicer) kofaktörü olan HIV-1 TAR RNA-bağlanma proteini (TRBP) alt ünitesi ile birleşerek pre-*miRNA*'nın saç tokası yapısını keser. Dicer enzimi tarafından kesilen pre-*miRNA*'lar, 3' uçlarında 2 nükleotitlik çıkıntı (overhang) kalacak biçimde 18-25 nt uzunluğunda kısa çift iplikli olgun *miRNA*'lara (*miRNA* dupleks) dönüşürler. Son olarak çift iplikli *miRNA*'ların bir ipliği bozulurken, diğer ipliği, Argonuate-2 (Ago-2) bağlı RNA susturma kompleksine (RISC) bağlanır. Oluşan *miRNA*-RISC kompleksi, hedef mRNA'nın 3'UTR, 5'UTR, ORF bölgelerini tanıyarak mRNA'yı parçalayarak translasyonu engeller veya hedef genin promotör bölgelerine bağlanarak mRNA'yı baskılar (Auyeung vd., 2013; Treiber vd., 2012; Hammond, 2015; Macfarlane ve Murphy, 2010) (Şekil 1.7).

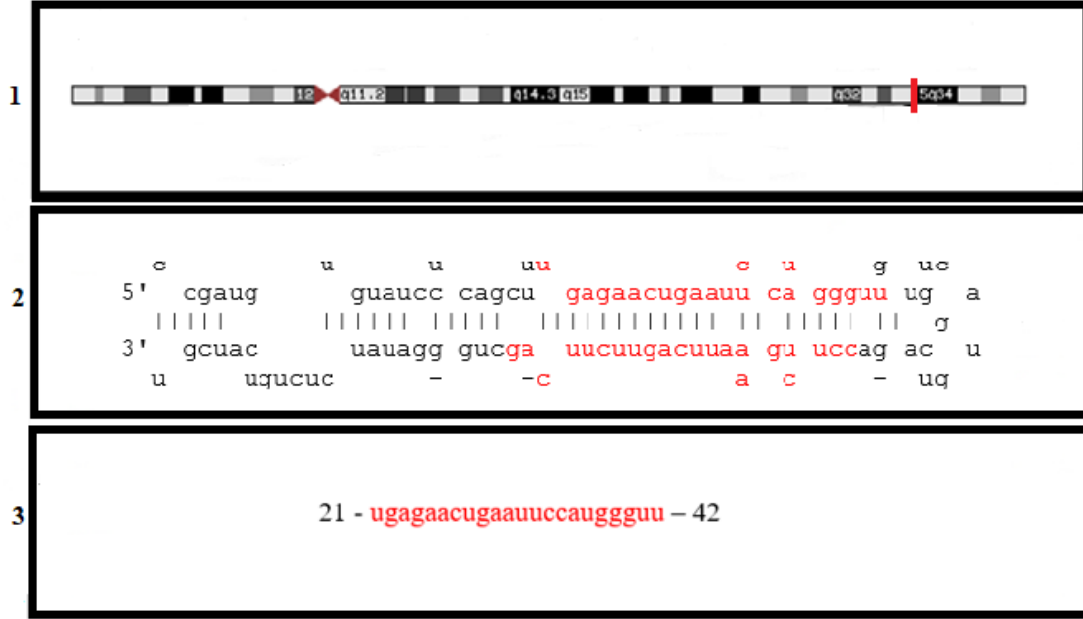
1.2.2 *miRNA*'ların bazı hastalıklarla ilişkileri

miRNA'ların apoptoz, lipid metabolizması, insülin salgılanması, kök hücre farklılaşması, kalp gelişimi, kas farklılaşması ve yaşlanma gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynadıkları bilinmektedir (Lynam-Lennon vd., 2009; Fernández-Hernando vd., 2014; Kong vd., 2011; Gangaraju ve Lin, 2009; Hodgkinson vd., 2015; Sun vd., 2017; Huang vd., 2019). Birçok çalışmada, *miRNA*'ların ekspresyon seviyelerinin hastalıkların farklı süreçlerinde rolünün olduğu belirlenmiştir. Bu zamana kadar çok fazla *miRNA* tanımlanmıştır ve *miRNA*'ların işlevleri hastalıkların tanısında ve tedavisinde araştırılmaktadır (Güzelgöl ve Aksoy, 2015). Pek çok hastalıkta, hastalıklı doku ile normal doku karşılaştırıldığında *miRNA* ekspresyon profillerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farklılıklar kanserde, obezitede, diyabette, Parkinson'da, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklarda gözlemlenmiştir (Hu vd., 2014; Baldeón vd., 2014; Ciccacci vd., 2014; Wang vd., 2008; Agiannitopoulos vd., 2021; Park vd., 2016). Çeşitli çalışmalarda *miRNA*'ların farklı dokularda benzersiz ekspresyon seviyelerine sahip oldukları görülmüştür. *miRNA*'lar, vücut sıvılarında bulunmaları, stabiliteleri ve kanser tiplerine özgüllükleri nedeniyle en umut verici biyobelirteçler arasında görülmektedirler. Ayrıca *miRNA*'lar, tümör ilerlemesinin, hastalığın klinik prognozunun ve metastaz varlığının takibini sağlayabilmeleri bakımından kanser hastalıkları için uygun biyobelirteçlerdendir (Uddin ve Chakraborty, 2018).



Şekil 1. 7: miRNA biyogenezi şeması.

Nükleazların her yerde olduğu bilinmesinden dolayı miRNA'ların kan ve vücut sıvılarında stabil olabileceği düşüncesine başlangıçta şüpheyle yaklaşılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda miRNA'ların kan, idrar, serum, plazma ve tükürük gibi diğer vücut sıvılarında yüksek miktarda oldukları bulunmuştur (Grasedieck vd., 2013; Cortez ve Calin, 2009; Kim, 2015; Turchinovich vd., 2011). 2019 yılında yapılan bir çalışmada, Japon ve Kafkas popülasyonlarında, glokom ve XFS hastalarının plazma ve aköz hüner sıvılarında miRNA ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda yirmi tane dolaşımda olan miRNA'nın ekspresyon seviyesinin, XFS ve açık açılı glokom hastalarının plazmalarında ve aköz hünerlerinde, kontrol grubundaki bireylere nazaran arttığı ve bu yirmi miRNA arasından üç tanesinin (miR-637, miR-1306-5p, miR-3159) glokomlu hastalarda en yüksek özgüllüğü ve duyarlılığı



Şekil 1. 9: *Hsa-mir-146a* geninin lokasyonu (1), stem loop yapısının sekansı (2) ve olgun hsa-miR-146a-5p'nin sekansı (3) gösterimleri (Url-5, Url-6).

TargetScan ve mirDB veritabanlarına bakıldığında, hsa-miR-146a-5p'nin yüzlerce tahmin edilen hedef geni olduğu görülmüştür. Bunlar arasında, *IGSF1* (immunoglobulin superfamily member 1), *PPP1R11* (protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 11), *WWC2* (WW and C2 domain containing 2), *SRSF6* (serine and arginine rich splicing factor 6), *USP6* (ubiquitin specific peptidase 6), *NOS1* (nitric oxide synthase 1), *CACNA2D1* (calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha 2 delta 1), *MMP16* (membrane-inserted matrix metalloproteinase 16), *ZBTB2* (zinc finger and BTB domain containing 2), *CASP7* (caspase 7) gibi genlerin olduğu görülmüştür (Url-8,Url-9).

mir-146a geninin ürünü olan miR-146a, toll benzeri reseptörü (TLR) ve transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B'nin (NF-κB) sinyal yolunun negatif düzenleyicisidir. NF-κB aktivasyonunun miR-146a ekspresyonunu indükleyebileceği bildirilmiştir (Ma vd., 2011). Diğer yandan *mir-146a* geni, TLR/NF-κB yolağında yer alan anahtar adaptör moleküllerini oluşturan TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6'nın (TRAF-6) ve interlökin 1 (IL-1) reseptörü ile ilişkili kinaz 1'in (IRAK-1) ekspresyonunu etkilemektedir. miR-146a'ya bağlı TRAF-6 ve IRAK-1'in aşağı düzenlenmesi (downregulation) TLR/NF-κB sinyalleme ekseninin inhibisyonuna neden olabilir. *mir-146a* geni, öncelikli olarak, TLR ve IL-1 reseptörünü kapsayan

IRAK-1'i ve TRAF-6'yı hedefler. TLR'nin uyarılması üzerine, adaptör proteinleri miyeloid farklılaşması birincil yanıt geni 88 (*MYD88*) ve TLR alanı içeren bağdaştırıcıyı indükleyen interferon- β (TRIF) hücre sitoplazmasından reseptöre alınır; bu süreç, iki TLR sinyalleşmesinin iki bağımsız dalının aktivasyonu ile sonuçlanır. MyD88'e bağlı dalda, MyD88, IRAK-1 ile TRAF-6'yı fosforile ederek aktive eder. Bu olaylar zinciri, inhibitör kappa B'nin ($\text{I}\kappa\text{B}$) fosforilasyonuna ve inhibisyonuna yol açarak, NF- κB 'nin hücre çekirdeğine girmesini ve enflamatuar genlerin transkripsiyonun etkinleşmesini sağlar. *mir-146a*'nın promoter bölgesi NF- κB için birkaç bağlanma bölgesi içerdiğinden, *mir-146a*'nın indüklenen ekspresyonu NF- κB 'ye bağlı bir şekilde gerçekleşir. Yüksek miR-146a seviyeleri, IRAK-1'in ve TRAF-6'nın inhibisyonunun artmasına yol açarak IL-1, IL-6, IL-8 ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi pro-enflamatuar sitokin seviyelerinin azalmasını sağlayarak enflamasyonu düşürebileceği gösterilmiştir (Bogunia-Kubik vd., 2016; Ramkaran vd., 2014; Taganov vd., 2006; Li vd., 2010; Pauley vd., 2008). miRNA'ların, hem doğuştan gelen bağışıklıkta hem de adaptif bağışıklık yanıtlarında, hücrelerin gelişmesinde ve farklılaşmasında rol oynadığı pek çok çalışmada gösterilmiştir. *mir-146a*'nın, TLR sinyalleşmesinin negatif regülasyonunun modüle edilmesinin yanında, TNF- α , siklooksijenaz 2 (COX-2), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), IL-8 ve IL-6 gibi önemli enflamatuar sitokinlerinin ekspresyonunda da rol oynadığı gösterilmiştir (Chen vd., 2013; Jiménez-Morales vd., 2012; Li vd., 2010; Xu vd., 2012).

Yapılan bazı çalışmalarda, hsa-miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin farklı hastalık gruplarında kontrol gruplarına göre daha düşük seviyede olduğu görülmüştür. *mir-146a*'nın, TGF- β /Smad4 sinyal yolunu baskılayarak iskelet kası fibrozunu inhibe ettiği, iskelet kası fibrozunun gelişimini azaltıcı yönde bir rol oynadığı gösterilmiştir. *miR-146a* ekspresyon seviyesinin hasta grubunda daha düşük seviyede olduğu ve iskelet kası fibrozunu azaltmak için terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Sun vd., 2017). *miR-146a*'nın diyabetik nefropati, retinopati, nöropati gibi çeşitli diyabetik komplikasyonların ve kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde anti-enflamatuar etki gösterdiği görülmüştür. Diyabetik sıçanların hipokampus dokularında ve Tip-2 diyabet hastalarının serumunda miR-146a ekspresyon seviyesinin azaldığı görülmüştür. Bu çalışmalar, miR-146a'nın kronik enflamasyon biyobelirteci olarak kullanılabilirliğini göstermiştir (Yousefzadeh vd., 2015; Bhatt vd., 2016; Yavari vd., 2016; Baldeón vd., 2014; Xie vd., 2018).

Yapılan bazı çalışmalarda ise, tam tersi sonuçlar gösterilmiştir. Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin farklı hastalık gruplarında kontrol gruplarına göre daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, miR-146a ekspresyon seviyesinin, Graves orbitopati (Tiroit oftalmopati, guatra bağlı göz çıkıklığı) dokularında hastalık olmayan dokulara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. miR-146a'nın ekspresyonun yukarı düzenlenmesinde enflamatuvar stres ilişkili *IL-1B* geninin ürünü olan interlökin 1 beta'nın rol oynadığı gösterilmiştir (Jang vd., 2016). ADM (yaşa bağlı makula dejenerasyonu), dünyada 50 yaş ve üstü bireyleri etkileyen bir körlük nedenidir. Bu hastalığı araştıran bir çalışmada, miR-146a ekspresyon seviyesi, ADM'li hastaların plazmasında yaklaşık 2.5 kat, gözün vitreus kısmında bulunan vitreus sıvısında da benzer şekilde 3 kat arttığı gösterilmiştir. (Ménard vd., 2016). Farklı bir çalışmada, ADM'li hastaların retinasında, miR-146a ekspresyon seviyesinin 3 kat artmış olduğu görülmüştür (Lukiw vd., 2012). Bu çalışmalar, ADM hastalığında miR-146a'nın potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini gösterilmiştir.

1.2.4 Hsa-miR-196a-2

İnsanda (*Homo sapiens* türünde) *hsa-mir-196a-2* geni 12q13.13 (12 kromozom üzerinde q kolunun 13.13 bölgesinde) sitogenetik lokasyonunda ve 12:53,991,737-53,991,846 genomik koordinatında bulunmaktadır. Transkribe olduktan sonra *primiRNA* haline yani stem-loop formuna dönüşmektedir.

Stem-loop halindeki *hsa-mir-196a-2*, biyogenez sonucu *hsa-mir-196a-5p* (5'kolundan) ve *hsa-mir-196a-3p** (3'kolundan, anlamsız iplik) yapılarına dönüşür ve sonrasında anlamlı olan 22 nükleotitlik olgun *hsa-miR-196a-5p* yapısı meydana gelir (Şekil 1.12). *mir-196a-2* geninin, *HOXB8* geninin ürünü olan Homeobox proteini Hox-B8, *HMGA2* geninin ürünü olan yüksek hareketlilik grubu AT-kanca 2 ve annexin A1 dahil olmak üzere çeşitli düzenleyici molekülleri hedeflediği, bu suretle normal gelişimin ve kanser patogenezinin yanında viral bağışıklıkta ve hücre farklılaşma süreçlerinde de rol oynayabileceği gösterilmiştir.

metabolik sürecin düzenlenmesi gibi yollar başta olmak üzere yüzlerce yolda rol oynadığı görülmüştür (Url-13).

TargetScan veritabanına bakıldığında, hsa-miR-196a-5p'nin yüzlerce tahmin edilen hedef geni olduğu görülmüştür. Bunlar arasında, *HOXC8* (homeobox C8), *HOXA7* (homeobox A7), *HOXA9* (homeobox A9), *ZBTB39* (zinc finger and BTB domain containing 39), *E2F7* (E2F transcription factor 7), *CDKN1B* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), *USP31* (ubiquitin specific peptidase 31), *USP15* (ubiquitin specific peptidase 15), *LCOR* (ligand dependent nuclear receptor corepressor), *TRERF1* (transcriptional regulating factor 1) gibi genlerin olduğu görülmüştür (Url-14).

Yapılan bir *in silico* analizde, miR-196a-2'nin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü alfa polipeptidi (*PDGFRA*), Interlökin 2 (*IL-2*) ve mannoz bağlayıcı lektin protein C 2 (*MBL2*) gibi genleri etkileyebileceği bulunmuştur. Bu genlerin çeşitli oksidatif stres bağlantılı oküler hastalıklarla bağlantılı olduğu bilinmektedir. Vitiligo hastalığında erken hücre ölümü, melanositlerin oksidatif strese karşı artan duyarlılıkları ile ilişkilidir; bunun da TYRP1'in anormal sentezi ve işlenmesinden kaynaklanabileceği gösterilmiştir. miR-196a-2'nin ekspresyonunun yukarı düzenlenmesinin (upregulation) *TYRP1* geninin ürünü olan tirozinaza bağlı protein 1 düzeylerini azalttığı, ekspresyonunun inhibisyonunun ise *TYRP1* geninin ürünü olan tirozinaza bağlı protein 1 düzeylerini artırdığı deneysel olarak gösterilmiştir (Huang et al., 2013). miR-196a-2'nin, bazı apoptotik hücre ölümü ve hücre döngüsü ile ilgili genleri hedef alarak, kanserin patogeneğinde rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmalarda çeşitli kanser türlerinde değişen miR-196a-2 ekspresyon seviyeleri bildirilmiştir (Toraih vd., 2016; Xue vd., 2013). Farklı bir çalışmada, miR-196a-2'nin, bazı anahtar genleri hedefleyerek kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu genler arasında, hücreler arası sinyal iletimi, bağışıklık sistemi ve enflamasyon ile bağlantılı olan, glutatyon S-transferaz p1 (*GSTP1*), anjiyotensin dönüştürücü enzim (*ACE*), hidroksitriptamin reseptör 4 (*HTR4*) ve palmitoil-protein tioesteraz 2 (*PPT2*) bulunmaktadır (Fawzy vd., 2016).

Yapılan çalışmalarda, hsa-miR-196a-5p ekspresyon seviyesinin hasta grubunda hasta olmayan gruba göre daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, PDAC (Pankreatik Duktal Adenokarsinoma), glioma (beyin glial hücrelerinde oluşan tümör) ve mide kanseri hastalıklarında anlamlı ölçüde

artmış olduğu gösterilmiştir (Xue vd., 2013; Qu vd., 2021; Lee vd., 2017). Kronik böbrek hastalarının idrarında hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin artmış olduğu görülmüştür (Donderski vd., 2021).

1.3 Genetik Polimorfizm

Genomda nadir görülen kalıcı ve kalıtılabilir sonuçlara yol açan değişikliklere “mutasyon” adı verilmektedir. Genetik polimorfizm aynı popülasyonda bir genin iki veya daha fazla alelinin mutasyondan daha yaygın olarak görülmesidir. Genetik polimorfizmi mutasyondan ayıran fark popülasyonda görülme oranıdır. Mutasyonlar polimorfizmlere göre çok daha nadirdir. Genom üzerindeki bir değişikliği genetik polimorfizm olarak adlandırabilmemiz için, popülasyondaki bireylerin en az %1’inde ilgili DNA bölgesinde farklılığın olması gerekmektedir. Farklı popülasyonlarda bu genetik polimorfizmlerin görülme sıklığı değişkenlik gösterebilmektedir. Genetik polimorfizmler hastalığa yakalanma riskini, hastalığa verilen yanıtı ve ilaçların yan etkilerini farklı kılmaktadır (Bozkaya, 2009).

1.3.1 Tek Nükleotit Polimorfizmi

Tek nükleotit polimorfizmi (SNP-single nucleotide polymorphism), bireylerin DNA’ları arasında görülen tek baz farklılıklarıdır. Sıklıkla görülen bu durum SNP’yi nadir görülen nokta mutasyonlarından ayırmakta ve SNP’nin genetik belirteç olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Tek nükleotid pozisyonundaki farklılık terminolojisi alel frekansı ile açıklanmaktadır (Sönmezoğlu, 2010). *miRNA*’ların DNA dizilerindeki SNP’leri, olgun *miRNA* dizisinin sekansını değiştirmekle kalmayıp *miRNA*’nın ekspresyonunu veya olgunlaşmasını da değiştirebilmektedir. Ayrıca, mRNA’ların hedef bölgelerinde SNP’lerin varlığı, bu mRNA’ların *miRNA*’lar tarafından tanınmasının engellenmesi ile sonuçlanabilir. Bu durum, hedef mRNA’ların baskılanmasına veya yıkılma eksikliğine yol açabilir (Chin vd., 2008; Ryan vd., 2010; Vreca vd., 2018; Li vd., 2015). Yapılan çalışmalarda, *miRNA*’larda bulunan SNP’ler ile pek çok hastalık ve kanser ilişkili bulunmuştur (Ramírez-bello ve Jiménez-morales, 2017). Ayrıca pek çok çalışma, *miRNA*’larda bulunan SNP’ler ile kanserin teşhisi, tedavisi ve prognozu arasında anlamlı ölçüde ilişki olduğunu göstermiştir. *miRNA*’ları etkileyen genetik polimorfizmlerin tam olarak anlaşılması, çeşitli hastalık ve kanser

türlerinin patogenezi anlamaya ve bu hastalıkların tanı ve prognozu için biyobelirteçlerin belirlenmesine katkı sağlayabilecektir (Soyocak, 2018).

1.3.2 *mir-146a* rs2910164 G/C tek nükleotit polimorfizmi

mir-146a geninde bilinen 10.11.2021 tarihi itibarı ile NCBI SNP veritabanındaki bilgilere göre 542 SNP vardır. Bu çalışmada incelenen rs2910164 G/C SNP'si, 5'inci kromozom üzerinde 5:160485411 lokasyonunda bulunmaktadır (Url-15, Url-16). Bu SNP'nin minör alel frekansı, farklı popülasyonlarda 0.230 ile 0.589 arasında değiştiği görülmektedir (Url-17). MAF, polimorfizmi nadir varyasyonlardan ayırmak için ikinci en sık görülen alel frekansıdır. *miR-146a*'nın immün yanıt ve enflamasyonda anahtar bir role sahip olduğu bilinmektedir (Rusca ve Monticelli, 2011). Bazı çalışmalarda *mir-146a* geninde bulunan birkaç SNP'nin fonksiyonel öneme sahip olduğu bulunmuş ve bu SNP'lerin olgun miRNA-146a'nın ekspresyon seviyesini değiştirebileceği doğrulanmıştır (Luo vd., 2011). *mir-146a* geninde bulunan rs2910164 (G/C) SNP'si olgun miRNA'nın seviyesinde azalmaya yol açmaktadır. Bu durum hedef genlerin transkripsiyonunu ve hastalığın patogenezi etkileyebilecektir (Jazdzewski vd., 2008). Bağışıklık ve enflamasyon ile ilgili olan, ülseratif kolit, Alzheimer, Behçet ve tip 2 diyabet gibi çeşitli hastalıkların rs2910164 SNP'si ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Oner vd., 2015; Okubo vd., 2011; Cui vd., 2014; Zhou vd., 2012; Ciccacci vd., 2014). Bazı araştırmalarda, rs2910164 SNP'si ile bazı otoimmün hastalıklar arasındaki ilişki incelenmiştir (Yang vd., 2011; Xu vd., 2012; Fenoglio vd., 2011). Yapılan çalışmaların birinde, rs2910164 SNP'sinin multipl skleroz (MS) hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Fenoglio vd., 2011). Rs2910164 SNP'si ile otoimmün hastalıklar arasındaki olası ilişkinin belirlenmesi, bu otoimmün hastalıkların önlenmesine yönelik katkı sağlayabilecektir (Chen vd., 2013). Yapılan bir çalışmada, rs2910164 SNP'sinde, CC genotipli olan kişilerin akciğer kanserine yakalanma riskinin daha yüksek görüldüğü gösterilmiştir (Ren vd., 2016). Başka bir çalışmada da, rs2910164 SNP'sinin enflamatuar bağırsak hastalıkları ile önemli ölçüde bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Gong vd., 2019). Pek çok enflamasyon ve otoimmün hastalıklarıyla ilişkili bulunan rs2910164 SNP'si ile patogenezi oksidatif stresin ve hücrel stresin rol aldığı bilinen XFG ve XFS'nin ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

1.3.3 *mir-196a-2* rs11614913 C/T tek nükleotit polimorfizmi

mir-196a-2 geninde bilinen 10.11.2021 tarihi itibarı ile NCBI SNP veritabanındaki bilgilere göre 697 SNP vardır. Bu çalışmada incelenen rs11614913 C/T SNP'si 12'nci kromozom üzerinde 12:53991815 lokasyonunda bulunmaktadır (Url-18, Url-19). Bu SNP'nin minör alel frekansı, farklı popülasyonlarda 0.104 ile 0.394 arasında değiştiği görülmektedir (Url-20). Bazı çalışmalar olgun ve öncül miRNA dizilerindeki dizi varyasyonlarının miRNA biyogenezini etkilediğini göstermiştir. Rs11614913 SNP'sindeki CC genotipi ile artmış olgun miR-196a-2 seviyesi arasında anlamlı ölçüde istatistiksel ilişki olduğu bulunmuştur (Hu vd., 2008; Akkız vd., 2010). Yapılan bir çalışmada, rs11614913 SNP'sindeki C alelinin, *TYRP1* gen ekspresyonunu önemli ölçüde aşağı doğru düzenlediği (downregulation) görülmüştür. Aynı çalışmada, hidrojen peroksit (H₂O₂) tedavisine yanıt olarak gelişen düşük hücre içi ROS seviyesi ve azalmış erken apoptoz ile düşük *TYRP1* gen ekspresyonunun ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, rs11614913 SNP'sindeki C alelinin, oksidatif stres altındaki insan melanositleri üzerinde potansiyel koruyucu etkiye sahip olduğu ve Çin popülasyonunda vitiligo riskini azalttığı gösterilmiştir (Huang vd., 2013). Çeşitli çalışmalarda, farklı etnik gruplarda ve çeşitli kanser türlerinde, rs11614913 SNP'si ile kanser riski arasındaki ilişki incelenmiş ve tutarsız sonuçlarla karşılaşmıştır. Ortaya çıkan sonuçlar, *miRNA* SNP'lerinin, pek çok hastalık ve kanser ile genetik ilişkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaların karmaşık olduğunu, etnik köken ve hastalığın türüne göre bu mekanizmaların değiştiğini göstermektedir (Ramírez-bello ve Jiménez-morales, 2017; Toraih vd., 2016). Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada, rs11614913 SNP'sindeki CC genotipinin karaciğer kanseri riskini önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur (Akkız vd., 2010). Pek çok enflamasyon ve otoimmün hastalıklarıyla ilişkili bulunan rs11614913 SNP'si ile patogenezinde oksidatif stresin ve hücrel stresin rol aldığı bilinen XFG ve XFS'nin ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

1.4 Çalışmanın Amacı

Genelde yaş arttıkça daha fazla gelişim gösterdiği bilinen XFS, anormal fibriler birikintilerin göz dokularında üretilip birikmesi olarak tanımlanan bir hücre dışı matriks hastalığıdır (Bhat, 2010). XFS'nin erken tanısı yoktur ve hastalığın ileri aşamalarında meydana gelen görüş alanı daralmasının da kalıcı tedavisi

bulunmamaktadır. Eksfoliasyon nedeniyle oluşan XFG tedavi edilmediği takdirde körlüğe sebep olabilmektedir. Bu nedenlerden ötürü XFS hastalığının erken dönemde teşhisi önem arz etmektedir. XFS oluşum sürecinde elastik fibrillerin fazla üretimi, büyüme faktörlerinin (özellikle TGF- β) fazla eksprese olması, MMPs ve TIMPs arasındaki dengesizliğin, artmış hücrel stresin, oksidatif stres ve hücrel strese karşı korunma mekanizmalarındaki bozuklukların yer aldığı gösterilmiştir (Ho vd., 2005; Schlötzer-Schrehardt vd., 2003; Rönkkö vd., 2007). miRNA'ların gen ekspresyonunu etkilemesi, hedef mRNA'nın degradasyonu, translasyon başlangıcının inhibisyonu veya translasyon uzamasının inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalarla meydana gelmektedir (Lee vd., 2016; Undi vd., 2013). miRNA'ların, pek çok hastalığın patogeneğinde rol oynayabileceği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, bazı miRNA ekspresyon seviyelerinin, XFS ve açık açılı glokom hastalarının plazmalarında ve aköz hümlerinde, kontrol grubundaki bireylere nazaran arttığı görülmüştür. Bu durum, miRNA'ların XFS ve XFG hastalıklarının erken teşhisi için kan tabanlı biyobelirteçler olabilecekleri yönünde yorumlanmıştır (Ghaffari Sharaf vd., 2019).

Bu tez çalışmasının amacı, bağışıklık ve enflamasyon kaynaklı hastalıklar ile ilişkili bulunan miR-146a ve miR-196a-2'nin, patogeneğinde oksidatif stresin ve hücrel stresin rol aldığı XFS ile XFG hastalıklarıyla ilişkisini inceleyerek bu miRNA'ların plazmadaki ekspresyon seviyeleri ve genetik varyasyonlarının XFS ve XFG erken teşhisi için biyobelirteç olma potansiyelinin değerlendirilmesidir. Çalışmamız, Türk popülasyonunda, *mir-146a*'daki rs2910164 ve *mir-196a-2*'deki rs11614913 SNP'leri ve bu genlerin ekspresyon seviyeleri ile XFS, XFG ve kontrol grupları arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk araştırma olan TÜBİTAK 1002 (318S074) araştırma projesini kapsamaktadır. Bu tez çalışmasında aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

- XFS, XFG ve kontrol gruplarından tam kan toplanması; ayrıca bu gruplardaki kişilerin bir kısmından plazma eldesi için ikinci tam kan örneklerinin toplanması,
- Genotipleme için kullanılacak tam kan örneklerinden genomik DNA izolasyonunun yapılması,
- DNA'ları izole edilen örneklerdeki rs2910164 ve rs11614913 SNP'lerinin bulunduğu bölgelerin PCR yöntemi ile çoğaltılması,
- Çoğaltılan PCR ürünlerinin uygun restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve genotiplerinin belirlenmesi,

- Ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılacak tam kan örneklerinden bekletilmeden plazma fazının elde edilmesi
- Elde edilen plazmalardan RNA izolasyonu yapılması,
- RNA'sı izole edilen örneklerin cDNA sentezinin gerçekleştirilmesi,
- Oluşturulmuş cDNA'lar ile, hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p'nin XFS, XFG ve kontrol gruplarının plazmasındaki ekspresyon seviyelerinin kantitatif eş zamanlı PCR yöntemi ile belirlenmesi,
- rs2910164 ve rs11614913 SNP'lerinin alel frekansları ile XFS, XFG ve kontrol grupları arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak incelenmesi,
- Hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p ekspresyon seviyeleri ile XFS, XFG ve kontrol grupları arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak incelenmesi,
- Hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p ekspresyon seviyeleri ile rs2910164 ve rs11614913 SNP genotipleri arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak incelenmesi,
- Yukarıda bahsedilen çalışmaya, yaş, cinsiyet, GİB, görme alanı skoru (VFS), mean deviasyon (MD), pattern standart deviasyon (PSD), diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon ve sigara kullanımı faktörlerinin de dahil edilmesi ve bu risklerin XFS, XFG ile ilişkisinin istatistiksel olarak incelenmesi.



2. MATERYALLER VE METOTLAR

2.1 Materyaller

2.1.1 Çalışma grupları ve popülasyon

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından desteklenmiş olup, 318S074 kodlu “MikroRNA ekspresyon seviyeleri ve genetik varyasyonları ile eksfoliyatif sendrom/glokom ilişkisinin incelenmesi” adlı TÜBİTAK 1002 projesini kapsamaktadır.

Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu tarafından 16.10.2018 tarihinde 18/1243 kayıt numaralı, “MikroRNA ekspresyon seviyeleri ve genetik varyasyonları ile eksfoliyatif sendrom/ glokom ilişkisinin incelenmesi” başlıklı yüksek lisans tezi önerisi, etik açıdan uygun bulunmuştur (Ek 1). Bu çalışma Helsinki Bildirgesi’ne göre yürütülmüştür.

Çalışma grubu periferik tam kan örnekleri 260 XFG hastası (154 erkek ve 104 kadın), 260 XFS hastası (139 erkek ve 121 kadın) ve 295 kontrol (145 erkek ve 150 kadın) bireyden oluşmaktadır. Her grup içerisinde 27 XFG hastası, 25 XFS hastası ve 27 kontrol bireyden periferik tam kan plazması bu tez çalışmasına dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen kontrol grubunda olan bireylerin yaşlarının XFG ve XFS gruplarındaki hastaların yaşlarının ortalamasıyla benzerliğine dikkat edilmiştir ve her grup için kadınlar ve erkekler dahil edilmiştir.

Genetik çalışma için tam kan örnekleri 2015-2021 tarihleri arasında, miRNA çalışması için plazma elde etmek üzere kan örnekleri ise 2019-2021 tarihleri arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Bölümü tarafından toplanmıştır (Ankara, Türkiye). Çalışmanın tüm katılımcılarına bilgilendirilmiş onam formu imzalatılmıştır. Tüm hasta grupları ve kontrol grubu aynı coğrafi bölgeden (Türkiye) ve aynı ırktandır (Caucasian).

XFS tanısı koyabilmek için tam oftalmoloji muayenesi yapılmıştır. Muayene sırasında eksfoliyasyon materyalinin biyomikroskopik incelemesi yapılmıştır ve eksfoliyasyon materyalinin görüldüğü durumlarda XFS tanısı konmuştur. XFG tanısı koyabilmek

için, rutin olarak optik disk, tam göz ve gonyoskopik muayeneleri ile gözün arka ve ön segment yapıları ve GİB ölçümü (GİB ilk olarak nonkontakt tonometresi, gerek duyulan kişilerde ise aplanasyon tonometresi ile saptanmıştır) değerlendirmeleri yapılmıştır. GİB değeri yüksek olan ve optik sinir muayenesinde glokom şüphesi görülen hastalarda görme alanı, optik koherans tomografi (retinada bulunan sinirin lif kalınlığının ölçülmesi) ve gerek görülen hastalarda optik sinir ileri yorumlaması yapmak için tarayıcı lazer oftalmoskopi gibi testler yapılmıştır. Eksfoliasyon materyalinin görünmüş olmasına ilaveten, hastada, tedavi olmadan GİB değerinin 21 mmHg'den yüksek veya tedavi ile GİB değerinin 21 mmHg'den düşük olduğu tespit edildiğinde, tipik optik sinir başı değişiklikleri ve görme alanı kusurları da mevcut olduğunda XFG tanısı konmuştur.

Normal optik disk görünümüne sahip, görme alanı normal, ön segment muayenesinde ön lens kapsülü ve pupil kenarında eksfoliasyon materyali görünmeyen kişiler kontrol olarak kabul edilmiştir (Can Demirdöğen vd., 2019a).

Bu tez çalışması için bu şekilde tanısı koyulmuş XFS, XFG hastalarından ve kontrol grubu bireylerinden tam kanlar EDTA (antikoagülan, Etilen Diamin Tetra Asetat) içeren tüplere alınmıştır. EDTA pıhtılaşma önleyici bir ajandır, kalsiyum iyonunu bağlayarak kanın pıhtılaşmasını önler. Her gruptan bireylerin tam kan örneği ve her bir grup içerisinde bazı bireylerden ilave olarak ikinci bir tüp tam kan örneği daha alınmıştır. Birinci tüp hemen dondurulup saklanmıştır, ikinci tüp ise santrifüj edilerek plazması ayrılmıştır ve plazma kısmı dondurularak saklanmıştır.

2.1.2 Genotipleme ve plazma için kanların toplanması

Bu tez çalışması kapsamında popülasyon ve çalışma grubu kısmında yazıldığı gibi tanısı konmuş, bilgilendirilmiş onam formu imzalatılmış, tüm XFS ve XFG hasta grupları ile kontrol grubu bireylerinin tam kan örnekleri EDTA içeren tüplere alınmıştır. Genotipleme için alınan tam kanlar Göz Hastalıkları Bölümü tarafından toplanıp -20°C derin dondurucuya kaldırılmıştır. Bu örnekler 1-2 hafta gibi bir zaman diliminde teslim alınarak buz akülü kutu içerisinde laboratuvara getirilip DNA izolasyonu yapılacağı zamana kadar -86°C derin dondurucuya kaldırılmıştır. Plazma için toplanan tam kan örnekleri de EDTA içeren tüplere alınarak Göz Hastalıkları Bölümü tarafından toplanmıştır. Bu tam kan örnekleri gönüllülerden alındıktan sonra 2-3 saat içerisinde laboratuvara getirilip hiç bekletilmeden santrifüj işlemi yapılarak

plazma kısımları elde edilmiştir. Plazma örnekleri, RNA izolasyonu yapılacağı zamana kadar -86°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

2.1.3 Kullanılan kimyasallar ve enzimler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve enzimlerin üretici firma adları ve katalog numaraları Ek 2’de verilmiştir. Bütün çalışmalar için moleküler biyoloji araştırmalarına uygun malzemeler belirlenmiş ve kullanılmıştır.

2.1.4 Kullanılan cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan tüm cihazlar, markaları ve üretici ülkeleri Ek 3’te verilmiştir.

2.1.5 Primerler

2.1.5.1 Genotipleme için kullanılan primerler

mir-146a rs2910164 G/C SNP’si için primerlerin dizisi Chae ve arkadaşlarının (2013) makalesinden alınıp Primer-Blast (Url-21) programından ve Oligo Analysis Tool (Url-22) programından kontrol edilmiştir (Chae vd., 2013). *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP’si için primer sekansı proje yürütücüsü tarafından Primer-Blast programı ve Oligo Analysis Tool kullanılarak tasarlanmıştır.

Çizelge 2. 1: *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP bölgelerini kapsayan DNA dizisinin çoğaltılması için tercih edilen primerlerin sekansları ve kaynakları.

| SNP | Primer Sekansları | Kaynak |
|-------------------|---|---|
| rs2910164 G/C | İleri Primer 5’-TGGGTTGTGTCAGTGTCAGAGC- 3’ Geri Primer 5’-TGCCTTCTGTCTCCAGTCTTCC- 3’ | Bir yayından alınıp Primer-Blast ve Oligo Analysis Tool programı kullanılarak kontrol edilmiştir (Chae vd., 2013) (Url-21, Url-22). |
| rs11614913 C/T | İleri Primer 5’-CCCTCCCTTCTCCTCCAGATA- 3’ Geri Primer 5’-GAAAACCGACTGATGTA ACTCCG- 3’ | Primer-Blast ve Oligo Analysis Tool programı kullanılarak tasarlanmıştır (Url-21, Url-22). |

Bu tez çalışmasında SNP’yi kapsayan bölgeyi çoğaltarak elde etmek için kullanılan primerler Sentebiolab Biyoteknoloji firmasından (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir (HPLC saflaştırılmalı). Liyofilize halde gelen primerlerin stok konsantrasyonu 100 pmol/µL olacak şekilde sulandırıldıktan sonra alikotlanarak -20°C’de muhafaza

edilmiştir. PCR (Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) için kullanılacağı zaman bu alikotların konsantrasyonu 10 pmol/μL olacak şekilde steril apirojen su ile dilüe edilerek kullanılmıştır. *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'si için tercih edilen primerlerin sekansları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

2.1.5.2 Ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan primerler

Bu çalışmada miR-146a ve miR-196a-2'nin ekspresyon seviyelerini belirlemek için qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR-Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için Qiagen markasının miRNA ekspresyon seviyesi belirleme kitleri temin edilmiştir (miRCURY LNA miRNA PCR Assay). Bu çalışmada iki tane incelenen miRNA (hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p), bir tane sentetik spike-in kontrol RNA (UniSp6) ve bir tane de referans miRNA (hsa-miR-191-5p) olmak üzere toplamda 4 adet miRNA'nın ekspresyon seviyesini belirlemek için bu miRNA'ların dizilerine uygun valide ve optimize edilmiş primer setleri temin edilmiştir. Ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılmış olan primerlerin bilgileri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2. 2: qRT-PCR yönteminde kullanılan primerlerin bilgileri.

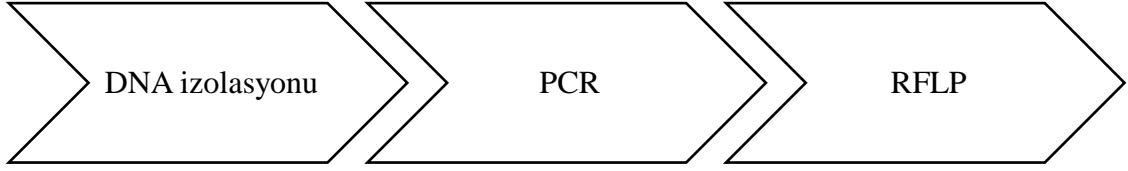
| miRNA | miRNA PCR Assay | Katalog Numarası |
|---|---|------------------|
| hsa-miR-196a-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay | MIMAT0000226: 5'UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG | YP00204386 |
| hsa-miR-146a-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay | MIMAT0000449: 5'UGAGAACUGAAUCCAUGGGU | YP00204688 |
| hsa-miR-191-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay | MIMAT0000440: 5'CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG | YP00204306 |
| UniSp6 miRCURY LNA miRNA PCR Assay | --- | YP00203954 |

2.2 Metotlar

2.2.1 Genotipleme için kullanılan yöntem

Bu çalışmada yer alan 2 SNP bölgesinin genotiplemesi için PCR-RFLP metodu kullanılmıştır. Genotipleme için ilk olarak toplanmış olan periferik tam kanlardan DNA izolasyonu yapılmıştır ve sonrasında SNP'nin bulunduğu bölgeye uygun

primerler kullanılarak hedef bölge PCR ile çoğaltılmıştır. PCR işlemi başarılı olan numunelerin, SNP'ye uygun restriksiyon enzimi kullanılarak RFLP yöntemi ile genotipleri belirlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1: Genotipleme için kullanılan yöntemin şematik gösterimi.

2.2.1.1 Tam kandan manuel yöntem ile DNA izolasyonu

EDTA'lı tüplere alınan tam kan örneklerinden tuzla çöktürme yöntemi ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Lahiri ve Schnabel, 1993). Kullanılan çözeltiler Ek 4'te verilmiştir.

DNA izolasyonu prosedürü:

-750 µL tam kan ile TKM tampon çözeltisi 2 mL'lik tüpte karıştırılır.

-Karışıma 20 µL Triton X-100 eklenerek tüpler yavaşça alt üst edilir. Triton X-100 deterjanı ile hücrenin zarı parçalanarak, tüm hücrel materyaller serbest hale getirilir. Sonrasında ise hücrel materyalleri ayırmak amacıyla tüplere oda sıcaklığında 1.000 g'de, 10 dakika boyunca mini santrifüj cihazında santrifüj işlemi yapılır. DNA haricindeki hücrel materyali içeren supernatant (üstte olan faz) seyreltilmiş çamaşır suyuna aktarılır.

-Pelete (altta çökerek kalan faz) 750 µL TKM tampon çözeltisi eklenerek tüplere 1.000 g'de, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca mini santrifüj cihazında santrifüj işlemi yapılır. Bu işlem renksiz berrak bir pelet elde edilene kadar tekrarlanır.

-Renksiz berrak pelet elde edildikten sonra 200 µL TKM tampon çözeltisi eklenerek, pelet tampon çözelti içinde çözdürülür.

-Çözdürülen peletin üzerine 10 µL SDS (%10'luk) eklenir ve 58°C'de 10 dakika boyunca inkübasyon işlemi yapılır.

-Sonrasında hemen 75 µL çözeltisi (soğuk ve doymuş) eklenerek, tüpler alt üst edilir. Soğuk NaCl çözeltisi proteinlerin alt faza çökmesini sağlayarak genomik DNA'nın üst fazda kalmasını sağlar.

-Sonrasında bu tüplere +4°C 'de 10 dakika boyunca 14.000 g'de, santrifüj cihazında santrifüj işlemi yapılır. Bu işlem proteinlerin alt faza çökmesi sağlayarak, DNA'ların üst fazda toplanmasını sağlar. Oluşan üst faz (~300 µL) yeni bir 1.5 mL'lik tüpe alınır.

-Yeni tüpe alınan DNA'yı içeren üst faza hacminin iki katı kadar (~600 µL) etanol (%100'lük ve -20°C'de beklemiş) eklenerek DNA'nın çökmesi sağlanır. Etanol eklenen tüpler birkaç kez yavaşça alt üst edilir. DNA'ların ipliksi şekilde görülmesinden sonra numuneler -20°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilir. İnkübasyon sonunda numunelerden DNA'nın eldesi için +4°C'de 10 dakika boyunca 10.000 g'de santrifüj işlemi gerçekleştirilir.

-Üstte toplanan faz dökülerek alt fazda toplanan DNA peletinin kuruması ve etanolün uzaklaşması için tüplerin kapağı açık olacak şekilde bekletilir. Peletler tamamen kuruduktan sonra ise DNA, 100 µL TE tampon çözeltisi içerisinde tamamen homojen olana kadar çözdürülüp 37°C'de gece boyunca inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında izole edilen DNA'lar -20°C derin dondurucuya kaldırılır.

2.2.1.2 Spektrofotometre ile genomik DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

Tam kandan DNA izolasyonu yapılmış DNA'ların bir kısmının konsantrasyonları Hitachi U-5100 spektrofotometre ile; diğer kısmının konsantrasyonları ise NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanılarak belirlenmiştir. DNA 260 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir, bundan dolayı 260 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri DNA'nın konsantrasyonunu hesaplamada kullanılmaktadır. DNA'nın 50 µg/mL konsantrasyonunda 260 nm dalga boyundaki absorbansının 1 olduğu bilinmektedir. Bu bilgi ile DNA konsantrasyonu hesaplanması için aşağıda yer alan formül kullanılmaktadır:

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL}) = \text{Absorbans } 260 \text{ nm} \times 50 (\mu\text{g/mL}) \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer cihazı ile seyreltme yapılmasına gerek duyulmadan sadece 2 µL örnek kullanılarak örneğin konsantrasyonu belirlenebilmektedir. Böylece cihaz direkt olarak numunenin konsantrasyon bilgisini vermektedir.

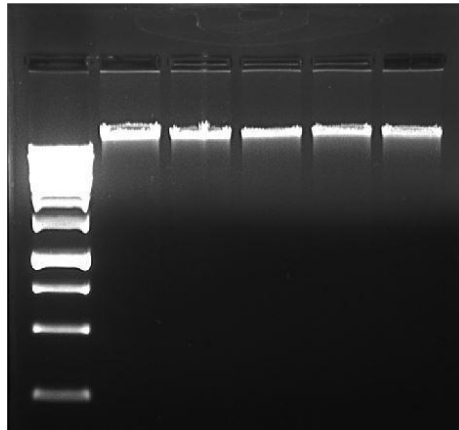
2.2.1.3 Spektrofotometre ile genomik DNA saflığının belirlenmesi

DNA'nın saflığı 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranlarına bakılarak karar verilmektedir. Proteinler 280 nm dalga boyunda maksimum absorbans verirlerken nükleik asitler 260 nm dalga boyunda maksimum absorbans verirler. 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerinin 280 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerine oranı (A_{260}/A_{280}) örneğin saflığını göstermektedir. Bu oran hesaplandığında 3 farklı tespit yapılabilmektedir: oran 1.8 olduğunda DNA'nın saf olduğu, oran 1.8'den yüksek olduğunda RNA kontaminasyonu olduğu ve oran 1.8'den düşük olduğunda protein kontaminasyonu olduğu tespit edilir.

NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer cihazı yine kullanıcı tarafından bu oranın hesabının yapılmasına gerek kalmadan direkt olarak oranı belirlemekte ve herhangi bir kontaminasyon durumunda kontaminasyonun kaynağı hakkında bilgi vermektedir.

2.2.1.4 Agaroz jel elektroforezi ile genomik DNA saflığının belirlenmesi

DNA izolasyonu sonrasında DNA'nın saflığı ve bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Yatay agaroz jel elektroforez sisteminde DNA örnekleri %0.5'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Yürütülen DNA örneklerinin jelde Şekil 2.2' de olduğu gibi tek bant halinde görüldüklerinde bütün ve saf olduklarına karar verilmiştir. Kullanılan çözeltiler Ek 4'te verilmiştir.



Şekil 2. 2: İzole edilmiş DNA örneklerinin %0.5'lik agaroz jelde görüntülenmesi.

Agaroz jel prosedürü:

-Agaroz jeli hazırlamak için gerekli plastik tabla, kalıp ve tarak %70'lik etanol ile temizlenir, saf sudan geçirilir sonrasında ise tabla ve tarak kalıp içerisine yerleştirilir.

-30 mL %0.5'lik agaroz jeli için 0.15 g agaroz tartılır ve 0.5X TBE tampon çözeltisi ile erlenmayer behere konulur. Karışım, agaroz tozunun tamamen çözünerek berrak bir görüntü oluşana kadar mikrodalga fırında ısıtılır.

-Hazırlanan jel, akan su altında erlenmayer flaskı yavaşça çalkalamak suretiyle soğutulur. Ardından, stok konsantrasyonu 10 mg/mL olan etidyum bromürden son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde hesaplanıp gerekli miktar (1.5 µL) hazırlanan jele eklenerek yavaşça karıştırılır. EtBr kanserojen bir ajan olduğundan buharını solumamak için EtBr eklenmeden önce jelin soğutulması gerekmektedir.

-Hazırlanan agaroz jel hazırlanmış olan jel tablasına dikkatlice dökülür ve homojen yayılması sağlanır. Eğer hava kabarcığı oluşursa, pipet ucu ile kabarcık giderilmelidir. Jelin tamamen kuruması için oda sıcaklığında yaklaşık 20-30 dakika beklenir.

-Elektroforez tankı 0.5X TBE tampon çözeltisi ile yeterince doldurulur. Hazırlanan jelin içinde olduğu tabla kalıptan çıkartılıp elektroforez tank ünitesinin içerisine yerleştirilir. Yerleştirirken jelin tarak takılı olan kısmı elektroforez tankının negatif kutuplu olan tarafında olmasına dikkat edilir. Gerekirse jeli tamamen kaplayacak şekilde üzerine 0.5X TBE tampon çözeltisi ilave edilir ve sonrasında tarak jelden çok dikkatli bir biçimde çıkartılır.

-Jelin taraklar ile oluşturulmuş ilk kuyucuğuna 1 kb'lik DNA belirteci yüklenir; böylece oluşacak bantların boyutları yorumlanabilir, diğer kuyucuklara ise DNA örnekleri yüklenir. DNA örnekleri yüklerken 5 µL DNA örneği ile 2 µL 6X jel yükleme tampon boyası (10 mM Tris- HCl (pH 7.6), 0.03% bromofenol mavisi, 0.03% xylene cyanol FF, 60% gliserol ve 60 mM EDTA) karıştırılıp, örnekler yavaşça yüklenir. Yükleme tampon boyası, içerisindeki gliserol sayesinde DNA'nın kuyucuğun içerisine yerleşerek tampon çözeltiliye karışmasını önler ve içerisindeki boyalar sayesinde yüklenen örneklere renk vererek örneklerin kuyucuklara daha rahat yüklenmesini ve yürütme işleminin daha kolay takip edilmesini sağlar.

-Tankın kapağı kapatılarak kabloları güç kaynağına bağlanır ve 90 volt olacak şekilde ayarlanarak jel yaklaşık 50 dakika yürütülür. Jelin yürütüleceği voltaj elektrotlar arasındaki mesafe ölçülerek ve önerilen 4-10 V/cm kuralına göre karar verilmektedir.

-Jel UV (ultraviyole) ışığı görüntüleme cihazı altında görüntülenir ve bu cihazın Vision-Capture (Version 16.09) bilgisayar yazılımı ile jelin görüntüsü dijital olarak elde edilerek yorumlanır.

Agaroz jelin yorumlanması:

-DNA örnekleri tek bir bant olarak görünüyorsa DNA'ların bütünlüğü korunmuş, saf ve sağlam olduklarını yorumlayabiliriz.

-İki bant olarak görünüyorsa örneklerin RNA ile kontamine olmuş olduğunu söyleyebiliriz.

-Sürüntü gibi yayılmış olarak görünüyorsa ise, bu görüntü örneklerin kırıldığını gösterir ve izolasyonun tekrarlanması gerekir.

2.2.2 *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T tek nükleotit polimorfizmlerinin genotiplenmesi

mir-146a rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'lerinin genotip analizi için PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle SNP'leri içeren bölgeler uygun primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılır, sonrasında ise uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak bu PCR ürünleri restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile kesilir. Bu tez çalışmasında genotipler bu şekilde belirlenmiştir.

Çizelge 2. 3: *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'lerinin pozisyonları, genleri, PCR ürün boyutları, kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimi, oluşan kesim ürünlerinin boyutları ve buna karşılık gelen genotipler.

| Polimorfizm | Pozisyon | Gen | PCR ürün Boyutları | Restriksiyon Enzimleri | Kesim ürünlerinin uzunlukları |
|-------------|----------------|---|--------------------|------------------------|---|
| rs2910164 | chr5:160485411 | MIR146A Non Coding Transcript Variant | 145 bç | <i>SacI</i> | GG:145 bç GC:145bç+122 bç+23 bç CC: 122 bç, 23 bç |
| rs11614913 | chr12:53991815 | MIR196A2 Non Coding Transcript Variant | 149 bç | <i>MspI</i> | CC: 125 bç, 24 bç TC: 149 bç+125 bç +24 bç TT:149 bç |

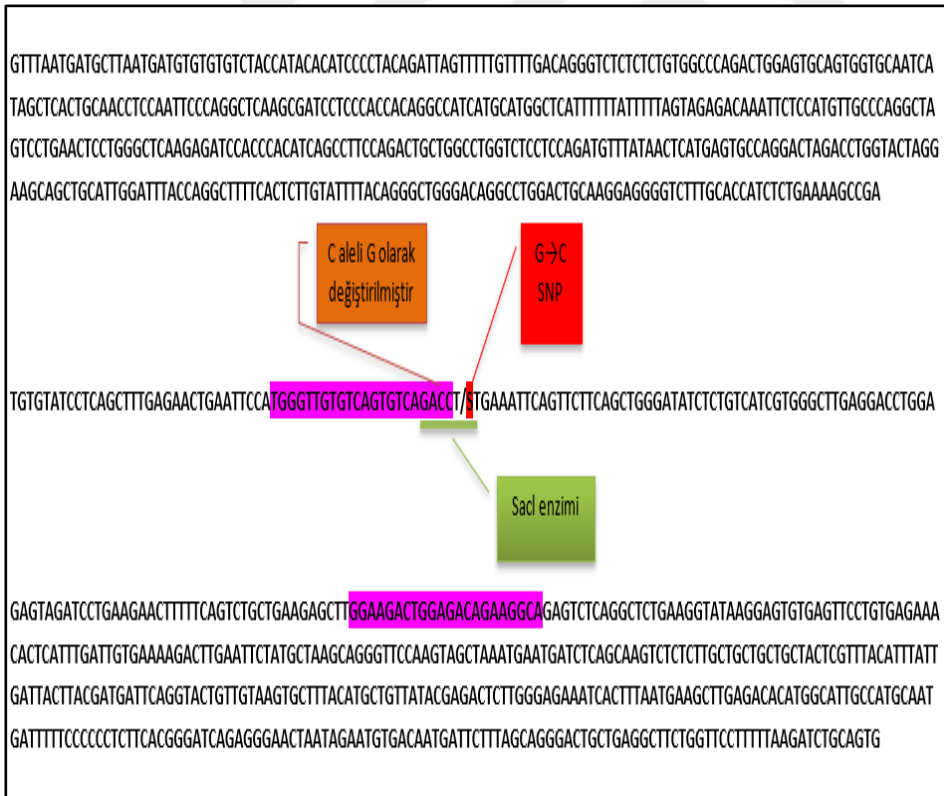
Her SNP için kullanılan uygun primerlerin sekansları Çizelge 2.3'te verilmiştir. Her iki bölge için PCR koşullarının optimizasyonları yapıldıktan sonra PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi sisteminde yürütülerek bu ürünlerin kalitesi ve boyutları kontrol edilmiştir. İstenilen boyutta elde edilen PCR ürünlerinin uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak RFLP yöntemi ile kesimleri yapılmış ve sonrasında agaroz jel elektroforezi kullanılarak oluşan kesim ürünlerinin boyutlarına göre her bireyin genotipleme işlemi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.3). PCR işleminde konvansiyonel

PCR cihazı kullanılırken, RFLP prosedüründe inkübe etme işlemi için kuru blok ısıtıcı kullanılmıştır.

2.2.2.1 *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin genotiplenmesi

mir-146a rs2910164 G/C SNP'si için PCR:

mir-146a rs2910164 G/C SNP'si için primerlerin dizisi Chae ve arkadaşlarının (2013) makalesinden alınıp Primer-Blast (Url-21) ve Oligo Analysis Tool (Url-22) programları tarafından kontrol edilmiştir (Chae vd., 2013) (Çizelge 2.3). *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sini kapsayan bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı diziler ve restriksiyon enziminin tanıdığı dizi bölgesi Şekil 2.3'te yer almaktadır. SNP, S harfi ve kırmızı ok ile belirtilmiştir. Pembe renk ile vurgulanan kısımlar ileri ve geri primerleri, yeşil ile altı çizili dizi kısmı ise *SacI* kesim enzimin tanıdığı ve kestiği bölgeyi göstermektedir. Turuncu ok ile işaretli C aleli kesim enziminin bölgeyi tanıması için ileri primerde G aleli olarak değiştirilerek tasarlanmıştır.



Şekil 2. 3: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sini kapsayan bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı diziler ve restriksiyon enziminin tanıdığı dizi bölgesi.

PCR ile beklenen büyüklükte ürünün elde edilmesi için reaksiyon koşulları ve termal döngü programında çeşitli optimizasyonlar yapılarak bu bölge için en uygun reaksiyon koşulları ve termal döngü programı kullanılmıştır. MgCl₂ konsantrasyonu için 1 mM, 2 mM ve 3 mM denenmiştir. Primer konsantrasyonu için 200 nM ve 300 nM denenmiştir. MgCl₂ konsantrasyonu 1.5 mM, primer konsantrasyonu 300 nM olacak şekilde kullanılmıştır. *mir-146a* rs2910164 G/C SNP bölgesi için optimize edilen ve kullanılan PCR karışımının içeriği Çizelge 2.4'te yer almaktadır.

Çizelge 2. 4: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sini kapsayan bölge için kullanılan PCR reaksiyon karışımının içeriği.

| İçerik | 1 tüp için gerekli hacim | Stok konsantrasyonu | 50 µL reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon |
|------------------------------|--------------------------|---------------------|---|
| Steril H₂O | Değişken | --- | --- |
| Amplifikasyon tamponu | 5 µL | 10X | 1X |
| MgCl₂ | 3 µL | 25 mM | 1.5 mM |
| dNTP karışımı | 1 µL | 10 mM | 0.2 mM |
| İleri primer | 1.5 µL | 10 pmol/µL | 15 pmol/µL (300 nM) |
| Geri primer | 1.5 µL | 10 pmol/µL | 15 pmol/µL (300nM) |
| Taq DNA polimeraz | 0.25 µL | 5 U/µL | 1.25 U |
| DNA | Değişken | --- | --- |

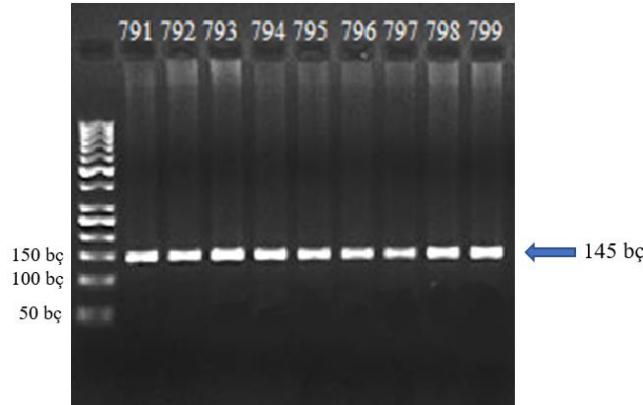
Bu bölge için kullanılan termal döngü programı değerleri, Zhu ve arkadaşlarının (2018) çalışmasındaki değerleri baz alınarak ve gradient PCR tekniği kullanılarak optimize edilmiştir (Zhu vd., 2018). Gradient PCR tekniğinde bağlanma sıcaklığı için 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C ve 61°C sıcaklıkları denenmiştir. Uygun döngü sayısının belirlenmesi için ise 30 ve 35 döngü denemeleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda primer bağlanma sıcaklığının 61°C ve uygun döngü sayısının 30 olduğu tespit edilmiştir. *mir-146a* rs2910164 G/C SNP bölgesi için optimize edilen termal döngü programı Çizelge 2.5'te yer almaktadır.

Çizelge 2. 5: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP bölgesini amplifiye etmek için kullanılan termal döngü programı.

| | | | |
|--------------------------|------|-------|------------|
| İlk denatürasyon | 94°C | 3 dk | |
| Denatürasyon | 94°C | 1 dk | } 35 döngü |
| Primer bağlanması | 61°C | 45 sn | |
| Sentez | 72°C | 1 dk | |
| Son uzama | 72°C | 2 dk | |

***mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin PCR ürünlerinin yorumlanması:**

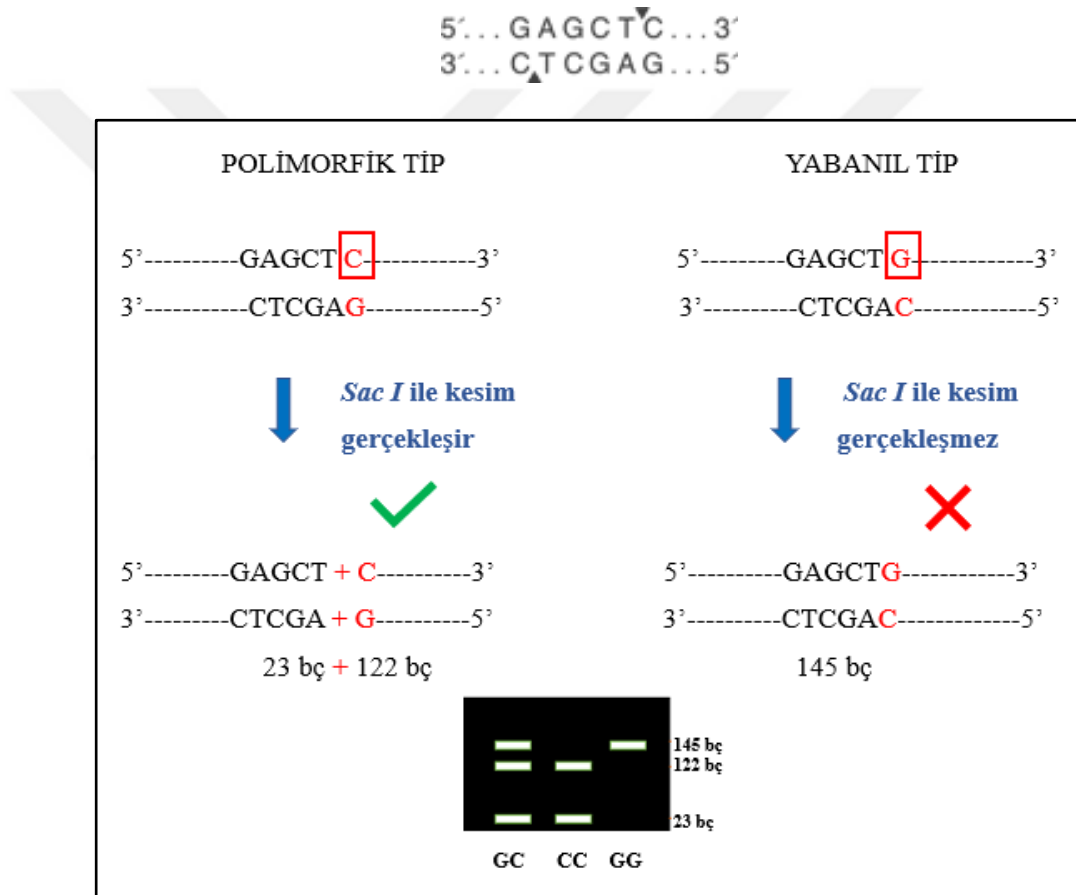
PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforez sistemi ile kontrol edilmiştir. PCR ürünlerinin beklenen büyüklükte olup olmadığını kontrol etmek için 2.2.1.4 bölümünde anlatılan yöntem ile %2'lik olacak şekilde bir agaroz jel yapılmıştır. Agaroz jelde bantların büyüklüklerini yorumlamak için agaroz jelin ilk kuyucuğuna 2 µL 50 bç'lik DNA belirteci (DNA markör) ile 2 µL 6X yükleme tamponu, diğer kuyucuklara ise 15 µL PCR ürünü ile 2 µL 6X jel yükleme tamponu karıştırılarak yüklenmiştir. Tankın kapağı kapatılıp elektrik kabloları güç kaynağına bağlanıp 120 voltta yaklaşık 1 saat ürünler ve DNA belirteci yürütüldükten sonra UV ışığı görüntüleme cihazı ile jelin görüntüsü elde edilmiş ve sonuçlar kontrol edilmiştir. PCR ürünlerinin beklenen bant büyüklüğü Çizelge 2.3'te verildiği gibi 145 bç büyüklüğündedir. Beklenen büyüklükte ve temiz sonuç veren PCR ürünleri (Şekil 2.4) ile genotipleme işlemine devam edilmiştir ve beklenmedik sonuç verenler için PCR işlemi tekrarlanmıştır.



Şekil 2. 4: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin PCR agaroz jel görüntüsü.

***mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin PCR ürünlerinin restriksiyon enzimi ile kesilmesi:**

mir-146a rs2910164 G/C tek nükleotit polimorfizminin kişilerdeki genotiplerini belirlemek için SNP'yi kapsayan ve istenilen boyutta elde edilen PCR ürünleri SNP bölgesine uygun *SacI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir; sonrasında ise oluşan kesim ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile yürütülerek kesim ürünlerinin büyüklüklerine göre genotip belirlenmesi yapılmıştır. *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin bireylerdeki genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 2.5'te gösterilmiştir. *SacI* kesim enziminin tanıdığı bölge aşağıda yer almaktadır:



Şekil 2. 5: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin bireylerdeki genotiplerinin belirlenmesinin şematik gösterimi.

***mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin RFLP prosedürü:**

RFLP koşulları çeşitli denemeler yapılarak optimize edilmiştir. Kullanılan *SacI* enzimi fast-digest bir enzimdir ve inkübasyonun 5-15 dakika arasında yapılması tavsiye edilmektedir. Ancak optimizasyon çalışmalarında bu sürenin yeterli olmadığı görülmüştür. Uygulanan optimizasyonlar neticesinde PCR ürününün *SacI*

enzimiyle 60 dakika boyunca 37°C’de inkübe edilmesine karar verilmiştir. Aynı zamanda 5 U ve 10 U gibi farklı kesim enzimi konsantrasyonları denenmiştir ve 10 U kesim enzimini konsantrasyonunun daha uygun olduğu görülmüştür. *mir-146a* rs2910164 G/C SNP bölgesi için optimize edilen ve kullanılan *SacI* enzimi ile kesim içeriği Çizelge 2.6’da verilmiştir.

Çizelge 2. 6: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP bölgesinin *SacI* restriksiyon enzimi ile kesimi için kullanılan koşullar.

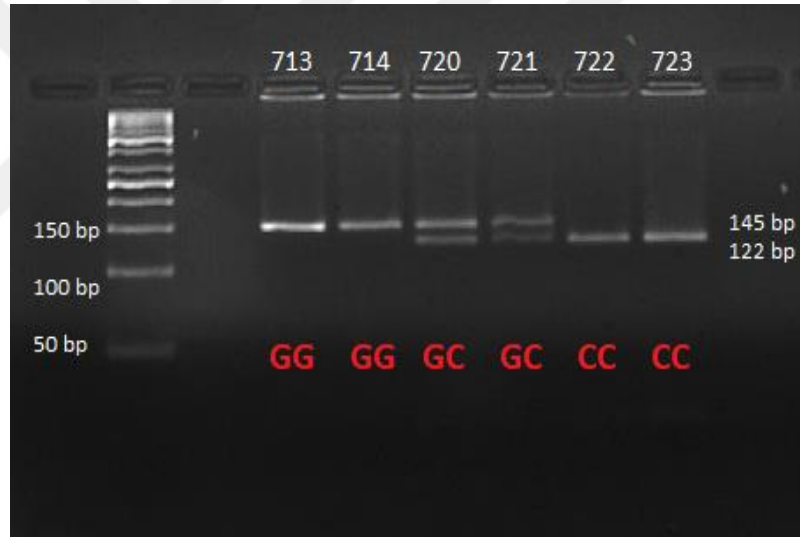
| İçerik | 1 tüp için gerekli hacim | Stok konsantrasyonu | 30 µL reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon |
|-------------------------|--------------------------|---------------------|---|
| Steril H ₂ O | 6.5 µL | --- | --- |
| NEB reaksiyon tamponu | 3 µL | 10X | 1X |
| <i>SacI</i> | 0.5 µL | 20 000 U/mL | 10 U |
| PCR ürünü | 20 µL | --- | --- |

***mir-146a* rs2910164 G/C SNP’sinin kesim ürünlerinin yorumlanması:**

Kesim ürünleri agaroz jel elektroforez sistemi ile yürütülüp genotipleri belirlenmiştir. Kesim ürünlerini yürütebilmek için 2.2.1.4 bölümünde anlatılan yöntem ile %3’lük olacak şekilde agaroz jel hazırlanmıştır. Agaroz jelde bantların büyüklüklerini yorumlamak için agaroz jelin ilk kuyucuğuna 2 µL 50 bç’lik DNA belirteci ile 2 µL 6X yükleme tamponu, diğer kuyucuklara ise 15 µL kesim ürünü ile 2 µL 6X jel yükleme tamponu karıştırılarak yüklenmiştir. Tankın kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlanmış ve 120 volt olacak şekilde yaklaşık 1.5 saat yürütülmüş. Jel UV (ultraviyole) ışığı görüntüleme cihazı altında görüntülenerek yorumlanmıştır. Genotipler aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

mir-146a rs2910164 G/C SNP genotiplerinin belirlenmesinde SNP bölgesine uygun *SacI* restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Restriksiyon enzimleri DNA üzerindeki belirli uzunlukta olan nükleotit dizisini tanıyarak kesim yapmaktadırlar. *mir-146a* rs2910164 G/C SNP bölgesi için oluşturulan PCR ürünlerinde Şekil 2.5’te belirtilen *SacI* enziminin tanıdığı dizi bulunuyorsa kesim gerçekleşir. 145 bç boyutunda olan PCR

ürününün iki banda ayrılarak kesim ürününün agaroz jelde yürütülmesi sonucunda 122 bç ve 23 bç boyutunda bantlar gözlenir. Bu sonuç gözleendiğinde bu bireyin CC genotipli (polimorfik homozigot genotip) olduğu tespit edilir. PCR ürünlerinde Şekil 2.3'te belirtilen *SacI* enziminin tanıdığı dizi bulunmuyorsa kesim gerçekleşmez, 145 bç boyutunda olan PCR ürünü aynı boyutta kalarak kesim ürününün agaroz jelde yürütülmesi sonucunda sadece 145 bç boyutunda tek bir bant gözlenir. Bu sonuç gözleendiğinde bu bireyin GG genotipli (yabanıl homozigot genotip) olduğu tespit edilir. GC genotipli (heterozigot genotip) bir bireyin tespit edilmesi ise kesimi gerçekleştirmiş PCR ürününün agaroz jelde yürütülmesi sonucunda elde edilen jel görüntüsünde 145 bç, 122 bç ve 23 bç boyutunda bantlar görüldüğünde olur. Homozigot genotip homolog kromozomlarda birbirine karşılık gelen alellerin aynı olması durumu iken, heterozigot genotip homolog kromozomlarda birbirine karşılık gelen alellerin farklı olması durumudur (Şekil 2.6).



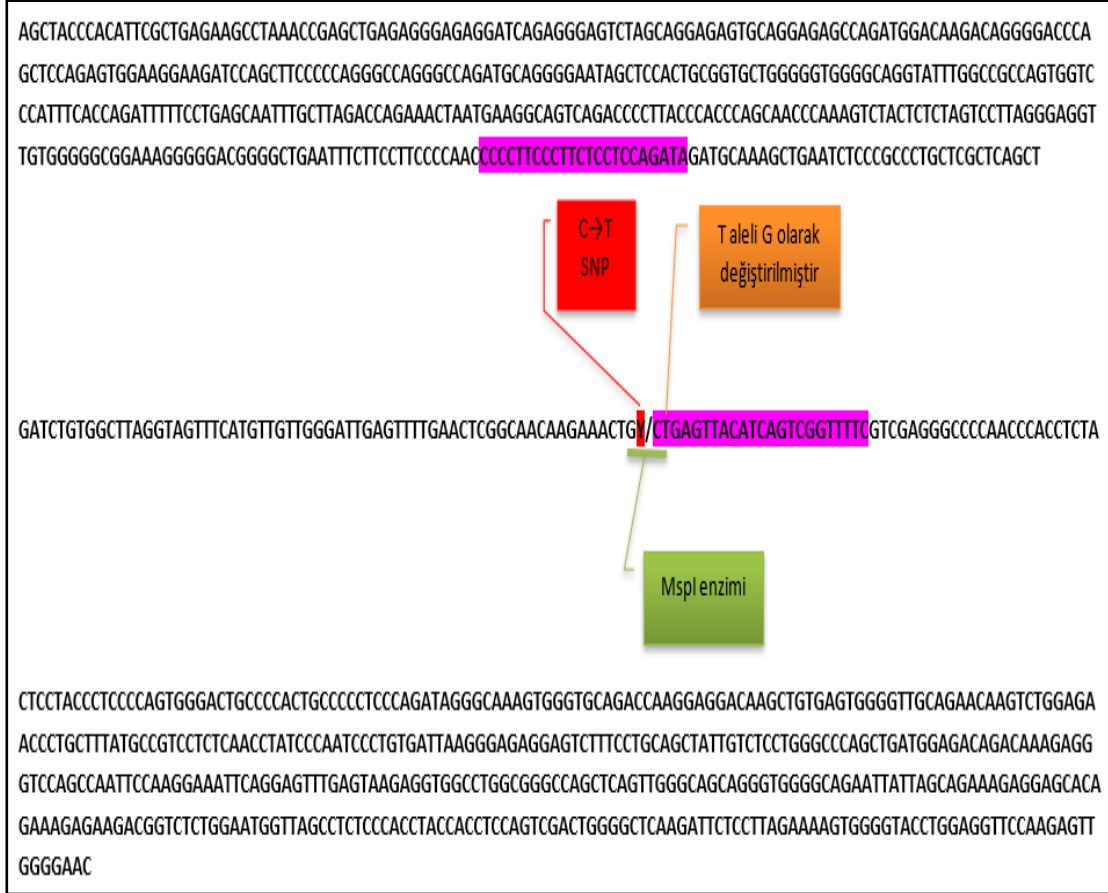
Şekil 2. 6: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin bireylerdeki genotiplerinin belirlendiği agaroz jel görüntüsü.

2.2.2.2 *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotiplenmesi

mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'si için PCR:

mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'sini kapsayan bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerler Primer-Blast ve Oligo Analysis Tool programı kullanılarak tasarlanmıştır (Çizelge 2.3). *mir-196a-2* geninde rs11614913 C/T SNP'sini kapsayan bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı diziler ve restriksiyon enziminin tanıdığı dizi bölgesi Şekil 2.7'de yer almaktadır. SNP, Y harfi ve kırmızı ok ile

belirtilmiştir. Pembe renk ile vurgulanan kısımlar ileri ve geri primerleri, yeşil ile altı çizili dizi kısmı ise *MspI* kesim enzimin tanıdığı ve kestiği bölgeyi göstermektedir, Turuncu ok ile işaretli T aleli kesim enziminin bölgeyi tanınması için ileri primerde G aleli olarak değiştirilerek tasarlanmıştır.



Şekil 2. 7: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sini kapsayan bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı diziler ve restriksiyon enziminin tanıdığı dizi bölgesi.

PCR için reaksiyon koşulları ve termal döngü programında beklenen büyüklükteki ürünün elde edilmesi için çeşitli optimizasyonlar yapılarak bu bölge için en uygun reaksiyon koşulları ve termal döngü programı kullanılmıştır. MgCl₂ konsantrasyonu için 1.5 mM, 2 mM ve 3 mM denenmiştir. Primer konsantrasyonu için 400 nM ve 300 nM denenmiştir. En iyi sonuçların MgCl₂ konsantrasyonu 2 mM, primer konsantrasyonu 300 nM kullanıldığında elde edildiği sonucuna varılmıştır. *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP bölgesi için optimize edilen ve kullanılan PCR karışımının içeriği Çizelge 2.7'de yer almaktadır.

Çizelge 2. 7: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sini kapsayan bölge için kullanılan PCR reaksiyon karışımının içeriği.

| İçerik | 1 tüp için gerekli hacim | Stok konsantrasyonu | 50µL reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon |
|-------------------------|--------------------------|---------------------|--|
| Steril H ₂ O | Değişken | --- | --- |
| Amplifikasyon tamponu | 5 µL | 10X | 1X |
| MgCl ₂ | 3 µL | 25 mM | 2mM |
| dNTP karışımı | 1 µL | 10mM | 0.2 mM |
| İleri primer | 1.5 µL | 10 pmol/µL | 15 pmol (300 nM) |
| Geri primer | 1.5 µL | 10 pmol/µL | 15 pmol (300 nM) |
| Taq DNA polimeraz | 0.25 µL | 5U/µL | 1.25 U |
| DNA | Değişken | --- | --- |

Bu bölge için kullanılan termal döngü programı değerleri, Zhu ve arkadaşlarının (2018) çalışmasındaki değerleri baz alınarak ve gradient PCR tekniği kullanılarak optimize edilmiştir (Zhu vd., 2018). Gradient PCR tekniğinde bağlanma sıcaklığı için 51°C, 53°C, 55°C, 57°C, 59°C, 60°C ve 61°C denenmiştir, döngü sayısı için ise 30 ve 35 döngü denenmiştir. Primer bağlanma sıcaklığı için 51°C ve döngü sayısı için 30 döngü kullanılmıştır. *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP bölgesi için optimize edilen termal döngü programı Çizelge 2.8'de yer almaktadır.

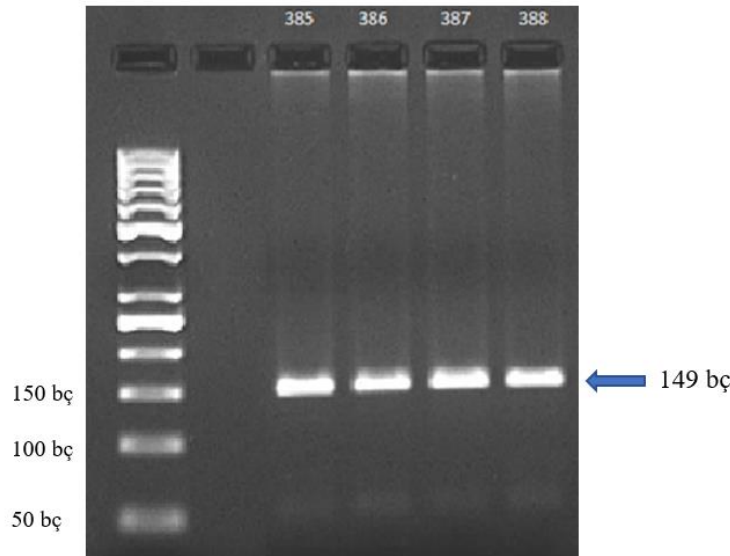
Çizelge 2. 8: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP bölgesini amplifiye etmek için kullanılan termal döngü programı.

| | | | |
|--------------------------|------|-------|------------|
| İlk denatürasyon | 94°C | 3 dk | |
| Denatürasyon | 94°C | 1 dk | } 30 döngü |
| Primer bağlanması | 51°C | 45 sn | |
| Sentez | 72°C | 1 dk | |
| Son uzama | 72°C | 2 dk | |

***mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin PCR ürünlerinin yorumlanması:**

PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforez sistemi ile kontrol edilmiştir. PCR ürünlerinin beklenen büyüklükte olup olmadığını kontrol etmek için 2.2.1.4 bölümünde anlatılan yöntem ile %2'lik olacak şekilde bir agaroz jel yapılmıştır. Agaroz jelinde bantların büyüklüklerini yorumlamak için agaroz jelin ilk kuyucuğuna 2 µL 50 bç'lik DNA belirteci ile 2 µL yükleme tamponu, diğer kuyucuklara ise 15 µL PCR ürünü ile 2 µL 6X jel yükleme tampon boyası karıştırılarak yüklenmiştir. Tankın kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlanır ve 120 volt olacak şekilde yaklaşık 1 saat yürütülür. Jel UV (ultraviyole) ışığı görüntüleme cihazı altında görüntülenir ve sonuçlar kontrol edilir.

PCR ürünlerinin beklenen bant büyüklüğü Çizelge 2.5'te verildiği gibi 149 bç büyüklüğündedir. Beklenen büyüklükte ve temiz sonuç veren PCR ürünleri (Şekil 2.8) ile genotipleme işlemine devam edilmiştir ve beklenmedik sonuç verenler için PCR işlemi tekrarlanmıştır.

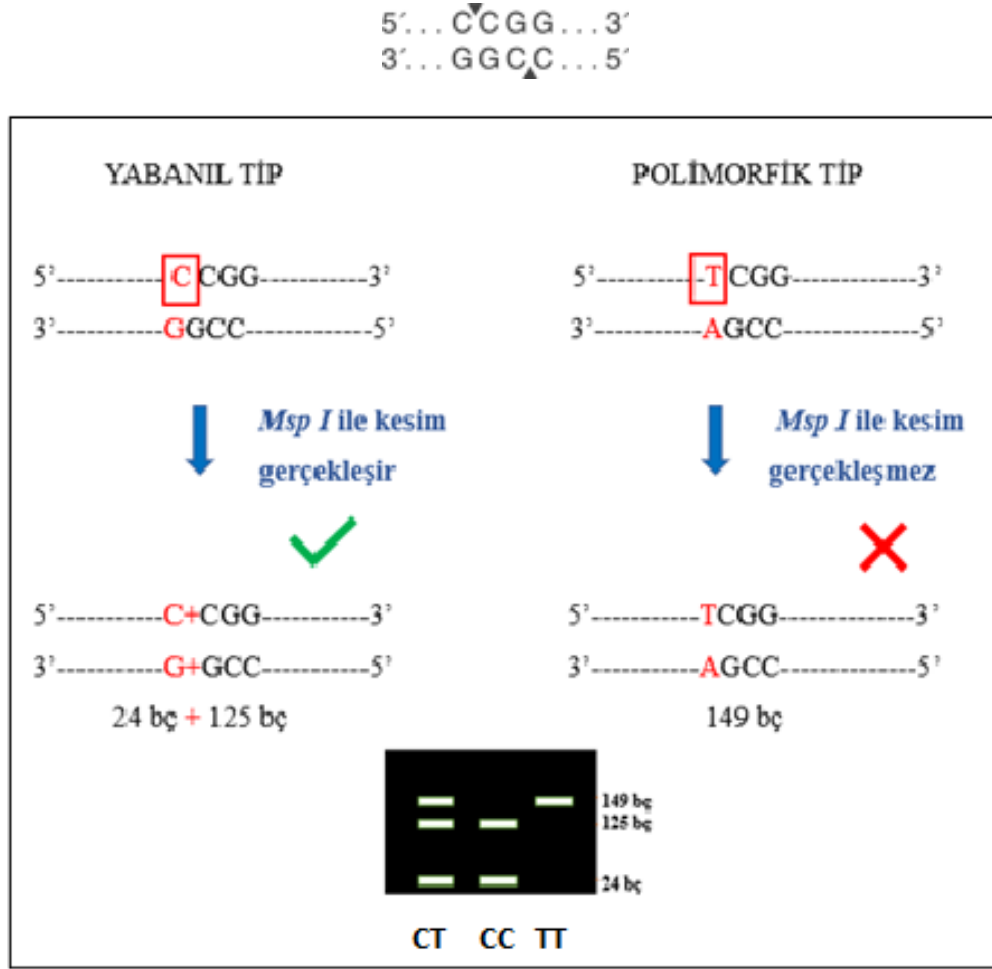


Şekil 2. 8: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin PCR agaroz jel görüntüsü.

***mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin PCR ürünlerinin restriksiyon enzimi ile kesilmesi:**

mir-196a-2 rs11614913 C/T tek nükleotit polimorfizminin kişilerdeki genotiplerini belirlemek için SNP'yi kapsayan ve istenilen boyutta elde edilen PCR ürünleri, SNP için uygun *MspI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir; sonrasında ise oluşan kesim ürünlerinin boyutları agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenerek kesim

ürünlerinin büyüklüklerine göre genotipler belirlenmiştir. *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP' sinin bireylerdeki genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 2.9'da gösterilmiştir. *MspI* kesim enziminin tanıdığı bölge aşağıda yer almaktadır:



Şekil 2. 9: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin bireylerdeki genotiplerinin belirlenmesinin şematik gösterimi.

***mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin RFLP prosedürü:**

RFLP koşulları çeşitli denemeler yapılarak optimize edilmiştir. Kullanılan *MspI* enzimi fast-digest bir enzimdir ve inkübasyonun 5-15 dakika arasında yapılması tavsiye edilmektedir. Ancak optimizasyon çalışmalarında bu sürenin yeterli olmadığı görülmüştür. Uygulanan optimizasyonlar neticesinde PCR ürününün *MspI* enzimiyle 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmesine karar verilmiştir. Aynı zamanda 5 U ve 10 U kesim enzimi konsantrasyonları denenmiştir ve 10 U kesim enziminin daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP bölgesi için

optimize edilen ve kullanılan *MspI* enziminin karışım içeriği Çizelge 2.9'de verilmiştir.

Çizelge 2. 9: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP bölgesinin *MspI* restriksiyon enzimi ile kesimi için kullanılan koşullar.

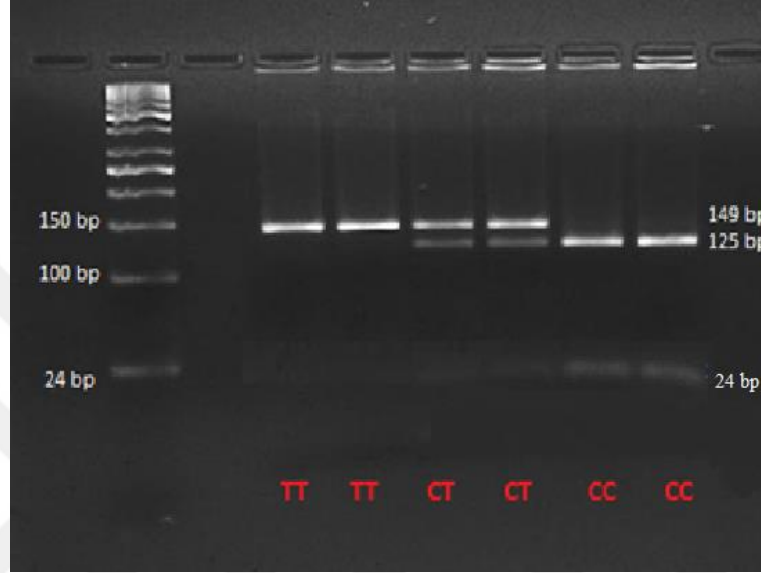
| İçerik | 1 tüp için gereken hacim | Stok konsantrasyonu | 30 µL reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon |
|-------------------------|--------------------------|---------------------|---|
| Steril H ₂ O | 11.5 µL | --- | --- |
| NEB reaksiyon tamponu | 3 µL | 10X | 1X |
| <i>MspI</i> | 0.5 µL | 20 000 U/mL | 10 U |
| PCR ürünü | 15 µL | --- | --- |

***mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin kesim ürünlerinin yorumlanması:**

Kesim ürünleri agaroz jel elektroforez sistemi ile yürütülüp genotip belirlenmesi yapılmıştır. Kesim ürünlerini analiz etmek için 2.2.1.4 bölümünde anlatılan yöntem ile %3'lük olacak şekilde bir agaroz jel hazırlanmıştır. Jelde oluşacak bantların büyüklüklerini yorumlamak için agaroz jelin ilk kuyucuğuna 2 µL 50 bç'lik DNA belirteci ile 2 µL yükleme tamponu, diğer kuyucuklara ise 15 µL kesim ürünü örneği ile 2 µL 6X jel yükleme tampon boyası karıştırılarak yüklenmiştir. Tankın kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlanmış ve 120 volt olacak şekilde yaklaşık 1.5 saat yürütülmüştür. Jel UV (ultraviyole) ışığı görüntüleme cihazı altında görüntülenerek yorumlanmıştır. Genotipler aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP genotiplerinin belirlenmesinde SNP bölgesine uygun *MspI* restriksiyon enzimi kullanılmıştır. *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP bölgesi için oluşturulan PCR ürünlerinde Şekil 2.9'da belirtilen *MspI* enziminin tanıdığı dizi bulunuyorsa kesim gerçekleşir. 149 bç boyutunda olan PCR ürününün iki banda ayrılarak kesim ürününün agaroz jelde yürütülmesi sonucunda 125 bç ve 24 bç boyutunda bantlar gözlenir. Bu sonuç gözleendiğinde bu bireyin CC genotipli (yabanıl homozigot genotip) olduğu tespit edilir. PCR ürünlerinde Şekil 2.9'da belirtilen *MspI* enziminin tanıdığı dizi bulunmuyorsa kesim gerçekleşmez, 149 bç boyutunda olan

PCR ürünü aynı boyutta kalarak kesim ürününün agaroz jelde yürütülmesi sonucunda sadece 149 bç boyutunda tek bir bant gözlenir. Bu sonuç gözleendiğinde bu bireyin TT genotipli (polimorfik homozigot genotip) olduğu tespit edilir. CT genotipli (heterozigot genotip) bir bireyin tespit edilmesi ise kesimi gerçekleşmiş PCR ürününün agaroz jelde yürütülmesi sonucunda elde edilen jel görüntüsünde 149 bç, 125 bç ve 24 bç boyutunda bantlar görüldüğünde olur (Şekil 2.10).



Şekil 2. 10: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin bireylerdeki genotiplerinin belirlendiği agaroz jel görüntüsü.

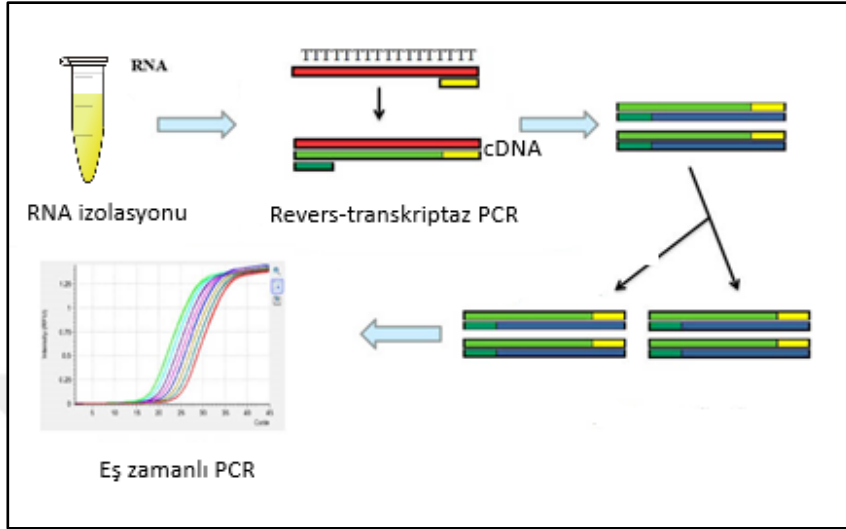
2.2.3 miRNA ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan yöntemler

2.2.3.1 miRNA ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Kantitatif Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemleri

Bu çalışmada yer alan miRNA'lar ile önce RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiş, ardından qRT-PCR (Kantitatif Eş Zamanlı PCR) yöntemi kullanılarak ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Her miRNA'nın hasta ve kontrol gruplarındaki ekspresyon seviyeleri belirlenerek karşılaştırmalar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemine göre yapılmıştır (Şekil 2.11).

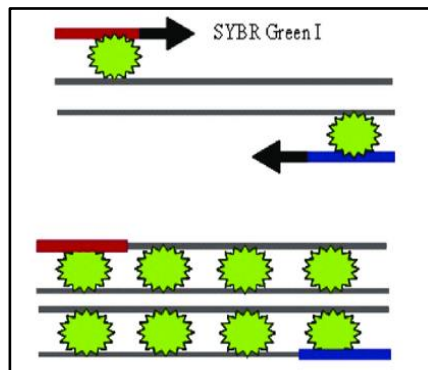
RT-PCR, çeşitli dokulardan izole edilen RNA moleküllerinden retrovirüslerden izole edilen revers transkriptaz enzimi aracılığıyla komplementer DNA (cDNA) sentezinin gerçekleşmesini sağlayan hassas bir yöntemdir. Bu yöntem gen

ekspresyonu çalışmaları için kullanılmaktadır. qRT-PCR, nükleik asitlerin çoğaltılması ve ortamdaki ürün miktarının kantitatif olarak floresan işaretli prob veya floresan boya kullanılarak tespit edilmesi amacıyla kullanılan moleküler bir yöntemdir.



Şekil 2. 11: RT-PCR ve qRT-PCR yöntemleri ile ekspresyon seviyesi tespit edilmesinin şematik gösterimi.

Günümüzde qRT-PCR tekniğinde ortamdaki ürün miktarını takip etmek için kullanılan farklı teknolojiler mevcuttur. Taq-Man gibi özgül floresan işaretli proplar veya SYBR Green gibi özgül olmayan floresan boyalar kullanılmaktadır. Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğalmasını takip etmek amacıyla SYBR Green boyası kullanılır. SYBR Green ortamdaki çift zincirlere bağlanır. DNA çoğaldıkça boyanın çift zincirlere bağlanmasıyla birlikte RT-PCR cihazında okunan floresanın miktarı eş zamanlı olarak artış gösterir (Şekil 2.12).



Şekil 2. 12: SYBR Green boyasının çift zincirli DNA'ya bağlanması.

İlk olarak toplanmış tam kan örneklerinin plazmaları elde edilmiştir; sonrasında plazmalardan total RNA izolasyonları yapılmıştır ve bu RNA'lar konvansiyonel PCR cihazı kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. Son olarak eş zamanlı PCR cihazı kullanılarak ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir (Şekil 2.13).



Şekil 2. 13: Ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi.

2.2.3.2 Toplanan periferik tam kanlardan plazma elde edilmesi

Plazma eldesi için toplanan periferik tam kanlar EDTA içeren 10 mL hacimli tüplere alınmıştır ve sonrasında 2-3 saat içerisinde plazma fazı ayrılmıştır. Kullanılan cihazlar ve malzemeler Ek 2 ve Ek 3'te verilmiştir.

Plazma eldesi prosedürü:

- Toplanmış periferik tam kan örneklerinin tüpleri 1.900 g, +4°C'de 10 dakika soğutmalı santrifüj cihazında santrifüj edilerek ilk plazma ayrımı yapılır.
- Faz ayrımı gerçekleşmiş olan kan tüplerinden üst fazda yer alan plazma 2 mL'lik RNase free eppendorf tüplerine aktarılır.
- Tüplere aktarılmış olan plazmalarla 16.000 g, +4°C'de 10 dakika soğutmalı santrifüj cihazında ikinci kez santrifüj işlemi yapılır.
- İkinci kez santrifüj işlemi uygulanan plazma tüplerinden üst faz yeni 2 mL'lik RNase free eppendorf tüplere alınarak saklamak üzere -86°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

2.2.3.3 Plazmalardan RNA izolasyonu

Plazmadan total RNA izolasyonu için Qiagen markasının miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit'i optimize edilerek kullanılmıştır (Şekil 2.14). Kullanılan cihazlar ve malzemeler Ek 2 ve Ek 3'te verilmiştir.

RNA izolasyonu prosedürü:

-200 µL plazma üzerine 1.9 µL carrier RNA ve 1000 µL Qiazol eklenerek 5 dakika boyunca 2 mL'lik tüpte ilk olarak vorteks ile karıştırılır, sonra el ile alt üst edilerek karıştırılmaya devam edilir.

-Bu karışıma 300 µL kloroform eklenir ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında el ile alt üst ederek karıştırılır.

-Karışım 12.000 g, +4°C'de 15 dakika soğutmalı santrifüj kullanılarak santrifüj edilir.

-Üst fazda yer alan süpernatant kısmı yeni bir tüpe aktarılır (~600 µL) ve üzerine 1.12×10^{-9} nmol sentetik UniSp6 spike-in kontrol RNA eklenerek alt üst ederek karıştırılır.

-Karışıma elde edilen süpernatantın 1.5 katı kadar (~900 µL) %100'lük etanol eklenerek karıştırılır.

-Karışım RNeasy MinElute spin kolonuna 2 seferde (tek seferde max 700 µL olacak şekilde) aktarılarak 8.000 g, oda sıcaklığında 15 saniye mini santrifüj cihazında santrifüj işlemi yapılır ve kolondan süzülen sıvı kısım atılır.

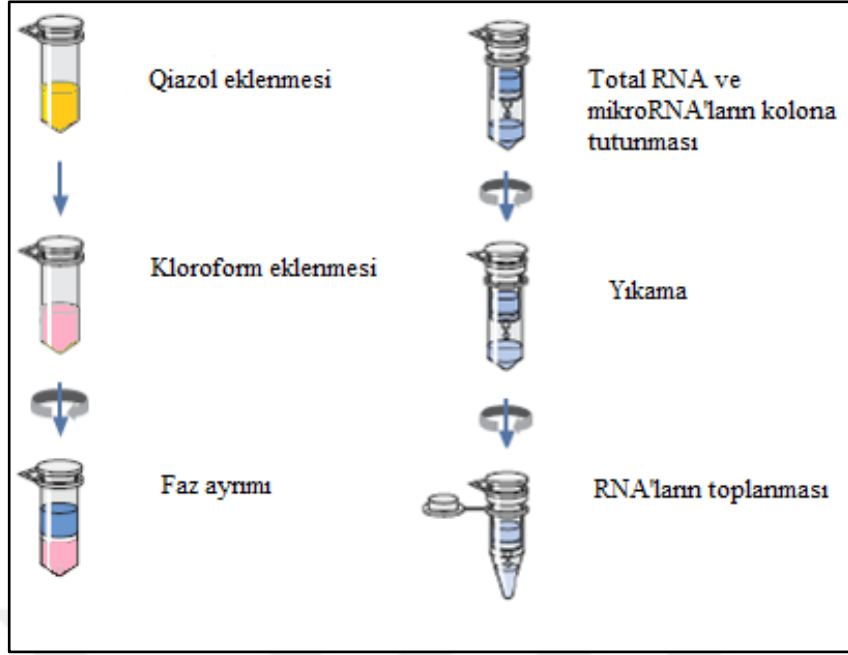
-700 µL RWT tamponu spin kolon üzerine eklenerek 8.000 g'de, mini santrifüj cihazında oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj işlemi yapılır ve kolondan süzülen sıvı kısım atılır.

-600 µL RPE tamponu spin kolon üzerine eklenerek 8.000 g'de, mini santrifüj cihazında oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj işlemi yapılır ve kolondan süzülen sıvı kısım atılır.

-700 µL %80'lik etanol spin kolona eklenerek 8.000 g'de, mini santrifüj cihazında oda sıcaklığında 2 dakika santrifüj işlemi yapılır ve kolondan süzülen sıvı kısım atılır. Bu basamak iki kere yapılır.

-Spin kolonu, kolona uygun yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilerek kolon kapağı açık bir şekilde maksimum hızda, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca santrifüj işlemi yapılır.

-Spin kolonu, kolona uygun yeni bir 1.5 mL'lik toplama tüpüne alınarak, kolonun üzerine 14 µL RNase içermeyen su eklenerek 5 dakika inkübe edilir ve maksimum hızda, oda sıcaklığında 1 dakika boyunca mini santrifüj cihazında santrifüj işlemi yapılarak RNase içermeyen su içinde çözünen RNA tüpte toplanır. Bu şekilde izole edilen RNA analiz edileceği zamana kadar -86°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.



Şekil 2. 14: RNA izolasyon prosedürünün şematik gösterimi.

NanoDrop ile total RNA konsantrasyonunun belirlenmesi:

Plazmadan RNA izolasyonu yapılan örneklerin konsantrasyonu NanoDrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. RNA 260 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir, bundan dolayı 260 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri RNA'nın konsantrasyonunu hesaplamada kullanılmaktadır. RNA'nın 40 µg/mL konsantrasyonunda 260 nm dalga boyundaki absorbansının 1 olduğu bilinmektedir. Bu bilgi doğrultusunda RNA konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmaktadır:

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL}) = \text{Absorbans } 260 \text{ nm} \times 40 (\mu\text{g/mL}) \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer cihazı seyreltme yapılmasına gerek duyulmadan direkt 2 µL RNA örneği ile ölçüm yapıp, örneğin konsantrasyonunu saptayabilmektedir.

NanoDrop ile total RNA saflığının belirlenmesi:

RNA'nın saflığına 230 nm, 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerine bakılarak karar verilmektedir. EDTA ve fenol yaklaşık 230 nm dalga boyunda, proteinler 280 nm dalga boyunda, nükleik asitler ise 260 dalga boyunda maksimum absorbans vermektedirler. 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerinin 280 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerine oranı (A_{260}/A_{280})

örneğin saflığını göstermektedir. Bu oran 1.9-2.1 arasında ise RNA'nın saf olduğuna yorumlanır. 230 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerinin 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerine oran da (A260/A230) örneğin saflığını göstermektedir. Bu oran 2.0-2.2 arasında ise RNA'nın saf olduğuna yorumlanır.

NanoDrop cihazı bu hesabı yaparak saflık oranlarını vermekte ve herhangi bir kontaminasyon durumunda sebebini göstermektedir. Fenol kontaminasyonu çıkan RNA örnekleri kullanılmamalıdır ve RNA izolasyonu tekrar edilmelidir. 100 mM'e kadar guanadine tiyosiyanat kontaminasyonu çıkan RNA örnekleri kullanılabilir fakat 100 mM'den fazla guanadin tiyosiyanat çıkanlar kullanılmamalıdır ve izolasyonu tekrar edilmelidir.

2.2.3.4 RNA'lardan cDNA sentezi

İzole edilen RNA'ların revers transkripsiyon işlemi için Qiagen markasının cDNA sentez kiti olan miRCURY LNA RT Kiti kullanılmıştır. Revers transkripsiyon aşaması miRCURY LNA RT kitinde yer alan prosedüre göre yapılmıştır. Karışım buz üzerinde hazırlanıp PCR cihazına koyulmuştur ve sonrasında elde edilen cDNA'lar ile iki alikot oluşturulup -20°C derin dondurucuya kaldırılmıştır. Kullanılan karışım içeriği Çizelge 2.10'da ve kullanılan termal döngü programı Çizelge 2.11'de verilmiştir.

Çizelge 2. 10: Revers transkripsiyon işleminde kullanılan karışım içeriği.

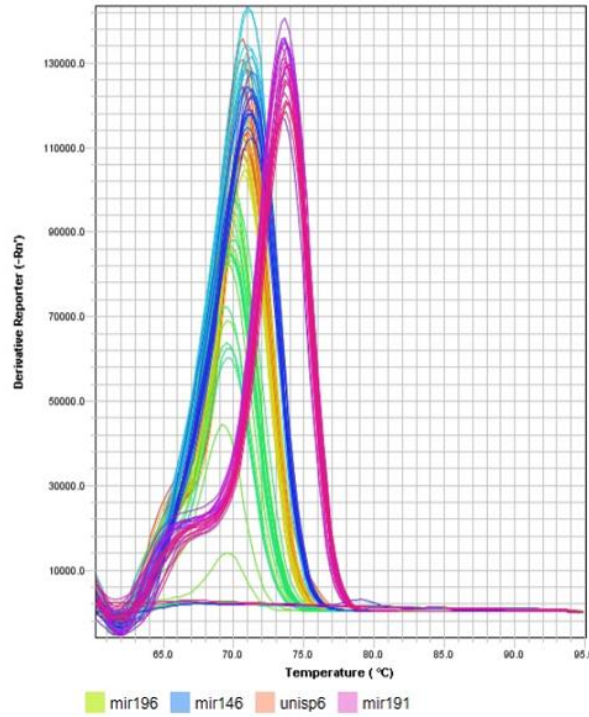
| İçerik | 1 tüp için gereken miktar | Son konsantrasyon |
|--|---------------------------|-------------------|
| Steril H ₂ O | 5 µL | |
| 10X miRCURY RT enzim karışımı | 1 µL | 1X |
| 5X miRCURY RT SYBR Green reaksiyon çözeltisi | 2 µL | 1X |
| RNA | 2 µL | |
| Toplam | 10 µL | |

Çizelge 2. 11: Revers transkripsiyon işleminde kullanılan termal döngü programı.

| | | |
|-------------------------------|------|-------|
| Revers transkripsiyon aşaması | 42°C | 60 dk |
| Sonlandırma | 95°C | 5 dk |
| Saklama | 4°C | --- |

2.2.3.5 Kantitatif Eş Zamanlı PCR ile miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

RNA'ların cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra qRT-PCR işlemini yapabilmek için spesifik primerler ve Qiagen markasının miRCURY LNA SYBR Green PCR Kiti kullanılmıştır. Bu çalışma için araştırılan iki miRNA (hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p), bir sentetik spike-in kontrol RNA (UniSp6) ve bir de referans miRNA (hsa-miR-191-5p) olmak üzere 4 adet miRNA'nın ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için bu miRNA'ların dizilerine uygun valide ve optimize edilmiş primer setleri satın alınmıştır. Bu yöntem için kullanılmış olan primerlerin bilgileri Çizelge 2.4'te verilmiştir. qRT-PCR sonucu amplifiye olan ürünlerin özgül olup olmadıkları erime eğrisi ile analiz edilmiştir. Amplifiye olan bütün ürünlerin 4 primer için de özgül olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.15).



Şekil 2. 15: qRT-PCR sonucu amplifiye olan ürünlerin hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-191-5p ve UniSp6 için erime eğrisi grafiği.

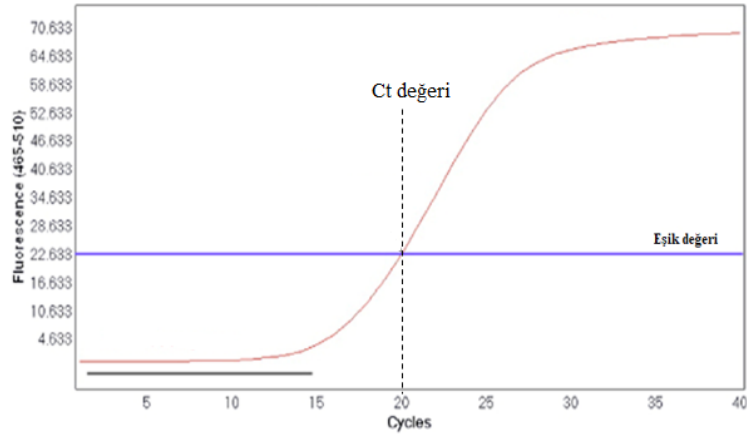
qRT-PCR aşaması için miRCURY LNA SYBR Green kitinin prosedürü ve karışım içeriği kullanılmıştır. Soğuk rack üzerinde 96 kuyucuklu real-time PCR plakası hazırlanıp real-time PCR cihazına yerleştirilir. StepOne Software (Version 2.3) yazılım programı kullanılarak PCR döngüsü koşulları girilir ve işlem başlatılır. Kullanılan karışım içeriği Çizelge 2.12’de ve kullanılan termal döngü programı Çizelge 2.13’te verilmiştir. Her bir örnek duplike çalışılmıştır. Ct (cycle threshold) gerçek zamanlı PCR deneylerinde kullanılan floresan sinyal miktarının gözlemlenebilmesi için gerekli eşik değerinin geçildiği döngü sayısına denir (Şekil 2.16). Real-Time PCR işlemi bittikten sonra Ct değerleri elde edilmiştir (Şekil 2.17). Bu Ct değerleri aşağıda anlatıldığı gibi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile analiz sırasında kullanılmıştır.

Çizelge 2. 12: qRT-PCR işleminde kullanılan karışım içeriği.

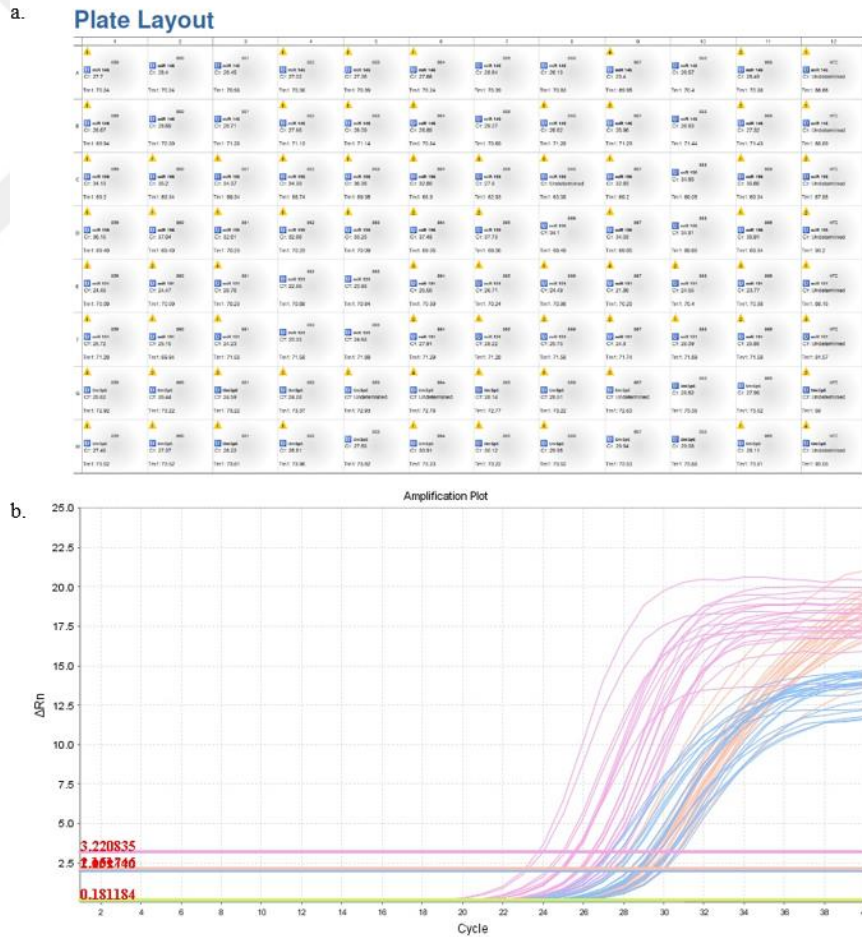
| İçerik | 1 tüp için gereken miktar |
|----------------------------------|---------------------------|
| Steril H ₂ O | 1 µL |
| 2X miRCURY SYBR Green master mix | 5 µL (1X) |
| Primer karışımı | 1 µL |
| cDNA | 3 µL |
| Toplam | 10 µL |

Çizelge 2. 13: qRT-PCR işleminde kullanılan termal döngü programı.

| | | | |
|--------------------------------------|---------|-------------------------|------------|
| PCR başlangıcı için aktivasyon ısısı | 95°C | 2 dk | } 40 döngü |
| Denatürasyon | 95°C | 10 sn | |
| Primer bağlanması ve uzaması | 56°C | 1 dk | |
| Erime Eğrisi | 60-95°C | 0.3 °C’de bir ölçülüyor | |



Şekil 2. 16: Ct değerinin amplifikasyon eğrisi üzerinde saptanması.



Şekil 2. 17: Real-time PCR cihazında, StepOne Software (Version 2.3) programında elde edilen a. Ct değerlerinin plaka üzerinde sonuçları b. amplifikasyon eğrisi.

XFS, XFG ve kontrol gruplarındaki her bir kişi için hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p (incelenen miRNAlar) ile hsa-miR-191-5p (referans miRNA) ve sentetik UniSp6 spike-in kontrol RNA'nın Ct değerleri elde edilmiştir. Deneysel bir hatanın olup olmadığını kontrol etmek için sentetik UniSp6 Spike-in kontrol RNA'sı RNA izolasyonu aşamasında her bir plazma örneğine eklenmiştir. Her birey için sentetik UniSp6 spike-in kontrol RNA Ct değerinin birbirine yakın olması gerekmektedir (6 Ct farka kadar) ve yakın olmayan örneklerin çalışmadan çıkartılması gerekmektedir. Bizim çalışmamızda çıkartılması gereken bir örnek olmamıştır. Daha sonra duplike çalışıldığı için tüm bireylerin ortalama Ct değerleri hesaplanmıştır ve sonrasında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi uygulanmıştır. Yöntem formülü aşağıdaki gibidir (Livak ve Schmittgen, 2001).

$$\Delta Ct = Ct (\text{incelenen miRNA}) - Ct (\text{referans miRNA})$$

$$\Delta\Delta Ct = [Ct (\text{incelenen miRNA}) - Ct (\text{referans miRNA})]_{\text{hasta}} - [Ct (\text{incelenen miRNA}) - Ct (\text{referans miRNA})]_{\text{kontrol}}$$

$$\text{Relatif ekspresyon seviyesi} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Bu yönteme göre hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p incelenen miRNAlar ile hsa-miR-191-5p referans miRNA arasındaki ΔCt değerleri, XFS, XFG ve kontrol gruplarındaki her kişi için hesaplanmıştır. Sonrasında XFS ve XFG gruplarındaki bireylerin ΔCt değerlerinden kontrol grubunun ortalama ΔCt değeri çıkartılarak her bireyin $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan $\Delta\Delta Ct$ değerlerinin üstel fonksiyonları hesaplanmış ve relatif ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir

2.2.4 İstatistiksel analiz için kullanılan metotlar

GİB, VFS, MD, PSD, yaş ve miRNA ekspresyon seviyeleri gibi sürekli değişkenlik gösteren parametrelerin normallik dağılımlarını görmek için Kolmogorov-Smirnov testi uygulanmıştır. miRNA ekspresyon seviyeleri gibi sürekli değişkenlik gösteren parametrelerin normallik dağılımlarını görmek için ise Shapiro-Wilk testi uygulanmıştır. Bu testlerin dağılımı P değerine göre değerlendirilip P değeri 0.05'ten büyük olduğunda ve 0.05'ten küçük olduğunda sırasıyla normal dağılan ve normal dağılmayan olduklarına karar verilmiştir. Parametreler XFG, XFS ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında normal dağılım göstermediklerinden parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. Kruskal-Wallis testi uygulandığında ve üçlü gruplarda P değeri 0.05'ten küçük olduğunda ikili grupları karşılaştırmak için

Conover formülü uygulanmıştır (Conover, 1980). Parametreler risksiz ve riskli durumlar arasında karşılaştırıldığında normal dağılım göstermediklerinden parametrik olmayan testlerden Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

Cinsiyet, hipertansiyon, diyabet, kalp hastalıkları, sigara, inme, genotip ve alel frekansları gibi kategorik değişkenler yüzde veya oran şeklinde gösterilmiştir. Kategorik değişkenlerin gruplar arası karşılaştırması ki-kare (chi-square, χ^2) analizi ile yapılmıştır. χ^2 analizinde teorik frekans 25'ten büyük olduğunda Pearson ki-kare testi, 25'ten küçük olduğunda Yates ki-kare testi, 5'ten küçük olduğunda ise Fisher exact testi uygulanmıştır. χ^2 testi ile gruplar arasındaki OR (Odds ratio) değerleri belirlenmiştir. Bir olayın olma olasılığı olmama olasılığına bölüldüğünde OR oran değeri elde edilir. Hasta grupları ve kontrol grubu arasında genotip ve alel frekansı karşılaştırması yapılmadan önce gözlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyup uymadığı kontrol edilmiştir. Gözlenen genotip frekansları ile beklenen genotip frekansları arasındaki karşılaştırma χ^2 analizi ile yapılmıştır. Beklenen genotip frekansları aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

Alel frekanslarının hesaplanması (gözlenen genotipler AA, AB ve BB olduğunda):

$$A \text{ 'nın alel frekansı} = p = (AA \times 2 + AB) / ((AA + AB + BB) \times 2)$$

$$B \text{ 'nin alel frekansı} = q = (BB \times 2 + AB) / ((AA + AB + BB) \times 2)$$

Beklenen genotip frekanslarının hesaplanması:

$$\text{Beklenen AA genotipi} = p^2 \times (AA + AB + BB)$$

$$\text{Beklenen AB genotipi} = 2 \times p \times q \times (AA + AB + BB)$$

$$\text{Beklenen BB genotipi} = q^2 \times (AA + AB + BB)$$

OR, CI ve P değerleri SNPStats programı kullanılarak yaş ve cinsiyet bilgisi dahil edilerek farklı genetik modeller altında hesaplanmıştır. SNPStats programında resesif, dominant, codominant, overdominant ve log-additive gibi farklı genetik modeller için OR, CI ve P değerleri elde edilebilmekte olup bunlardan hangisinin daha uyumlu olduğu AIC ve BIC değerlerine bakılarak belirlenebilmektedir. AIC ve BIC değerlerinin en düşük olduğu modellerin SNP'ye en uygun olduğu kabul edilmektedir (Url-23). Tüm gruplarda birlikte ve tek tek, miRNA ekspresyon seviyeleri ile sürekli değişkenlerin ilişkisi Pearson ve Spearman korelasyonu yöntemi ile bakılmıştır.

Alellerin, genotiplerin, yaş, cinsiyet, kalp hastalıkları, diyabet, sigara, inme, hipertansiyon ve miRNA ekspresyon seviyeleri gibi parametrelerin tek tek veya birlikte gruplar ile ilişkili olup olmadığını görmek için geriye doğru olabilirlik oranı seçim (backward:LR- Likelihood Ratio) metodu kullanılarak iki durumlu lojistik regresyon (binary logistic regression) analizi ve Hosmer-Lemeshow kalibrasyonu yapılmıştır.

miRNA relatif ekspresyon seviyelerinin XFG ve XFS hastalıklarında klinik tanı belirteci olarak kullanılıp kullanılmayacağını ve ne ölçüde yararlı olabileceklerini görmek için tanı değerlendirme analizi yapılmıştır. Farklı modellerde ilk olarak ROC (receiver operating characteristic- alıcı işlem karakteristikleri) eğrisi analizi yapılmış, yapılan analiz sonucunda da istatistiksel olarak anlamlı çıkan modellerde hata matrisi analizi yapılmıştır.

Tanı testlerinin değerlendirilmesinde belli başlı ölçütler vardır. Bunlardan, sensitivity (hassasiyet; duyarlılık), gerçek hastaların yeni tanı yöntemi ile tespit edebilme yüzdesi olarak; specificity (özgüllük), gerçek kontrollerin yeni tanı yöntemi ile tespit edebilme yüzdesi olarak; accuracy (doğruluk) ise, hastaların ve kontrollerin yeni tanı yöntemi ile tespit edebilme yüzdesi olarak tanımlanmaktadır. Bu ölçütler, hata matrisi Çizelgesinde oluşan sınıflandırmalara göre hesaplanır (Çizelge 2.14).

Çizelge 2. 14: Hata matrisi Çizelgesi.

| | | Gerçek durum | | Toplam |
|-------------------|---------|--------------|---------|-------------|
| | | Hasta | Kontrol | |
| Tanı testine göre | Hasta | a (DP) | b (YP) | a + b |
| | Kontrol | c (YN) | d (DN) | c + d |
| Toplam | | a + c | b + d | a + b+ c+ d |

Hata matrisi çizelgesinde yer alan sınıflandırmalar:

a,DP (Doğru pozitif): Gerçekte hasta olup, tanı testine göre de hasta olma durumudur.

b,YP (Yanlış pozitif): Gerçekte kontrol olup, tanı testine göre de hasta olma durumudur.

c,YN (Yanlış negatif): Gerçekte hasta olup, tanı testine göre de kontrol olma durumudur.

d,DN (Doğru negatif): Gerçekte kontrol olup, tanı testine göre de kontrol olma durumudur.

Tanı testlerinin değerlendirilmesi için ölçütlerin hesaplanması:

Duyarlılık (Sensitivity): $a / a + c = DP / DP + YN$

Özgüllük (Specificity): $d / b + d = DN / DN + YP$

Doğruluk (Accuracy): $a + d / a + b + c + d = DP + DN / DP + YP + YN + DN$

ROC eğrilerinde, X ekseninde 1- specificity yer alırken, Y ekseninde sensitivity yer alır. Her kesim noktasındaki 1-özgüllük (specificity) ve duyarlılık (sensitivity)'a karşılık gelen noktalar birleştirilerek ROC eğrisi oluşturulmaktadır. ROC eğrisi (0,0) ile (1,1) arasında artan bir fonksiyon grafiğidir. AUC (area under the curve- ROC eğrisinin altında kalan alan), en küçük 0.5 ve en büyük 1 değerini alabilmektedir (Kılıç, 2013). AUC, tanı testinin, hastalar ile kontrolleri tespit etmedeki doğruluk oranını göstermektedir. Test sonucunda AUC değeri 0.90-1.00 arasında olduğunda “mükemmel” (excellent), 0.80-0.90 arasında olduğunda “iyi” (good), 0.70-0.80 arasında olduğunda “orta” (fair), 0.60-0.70 arasında olduğunda “zayıf” (poor) ve 0.50-0.60 arasında olduğunda “başarısız” (fail) kabul edilmektedir. Böylece, ROC analizinde, tanı testlerinin gücünü değerlendirmede kullanılan özgüllük (specificity), duyarlılık (sensitivity) ve AUC değerleri belirlenmiştir. Analiz sonucunda, AUC değerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu durumda cut-off değerleri hesaplanmıştır. Hem duyarlılık (sensitivity) hem de özgüllük (specificity) değerlerinin maksimum olduğu noktayı bulmak için duyarlılık (sensitivity) + özgüllük (specificity)-1 değerine karşılık gelen youden index değeri hesaplanmış; youden index'in maksimum olduğu değere karşılık gelen Positive if Greater Than or Equal To değeri cut-off noktası olarak belirlenmiştir.

ROC analizinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç veren modellerde şekil 2.14' deki gibi hata matrisi yapılarak, modelin duyarlılık (sensitiviy), özgüllük (specificity) ve doğruluk (accuracy) değerleri belirlenmiştir. Hata matrisinde, tanı testine göre satırındaki hastalar ve kontroller cut-off değerine göre belirlenmiş, cut-off değerinin üstünde olanlar hasta, altında olanlar kontrol olarak kabul edilmiştir. Gerçek durum

sütunundaki hastalar ve kontroller ise analiz edilen modeldeki popülasyonu ifade etmektedir.

Her test uygulandığında P değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı sayılmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS (Version 23) programı kullanılmıştır.



3. BULGULAR

3.1 Genotipleme İçin Yapılan Analizler

3.1.1 Çalışma grupları

Bu tez çalışmasında, 260 XFG hastasından, 260 XFS hastasından ve 295 kontrol bireyden periferik tam kanlar toplanıp, *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'lerinin genotiplemeleri yapılmıştır. Kullanılan yöntemler 2.2.2 bölümünde anlatılmıştır. Çalışma gruplarının demografik verileri ve görme parametrelerinden bir bölümü Çizelge 3.1'de (sürekli değişkenler), diğer bir bölümü ise Çizelge 3.2'de (kategorik değişkenlerin) verilmiştir.

Sürekli değişkenlerin istatistiksel analizi sonucunda, yaş ortalamasının, XFG grubundaki hastalarda 71.5 ± 8.1 , XFS grubundaki hastalarda 70.9 ± 6.5 ve kontrol grubundaki bireylerde 70.3 ± 7.8 olduğu ve aralarında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür ($P=.09$). Göz içi basınç ortalamasının, XFG grubundaki hastalarda 21.6 ± 5.4 , XFS grubundaki hastalarda 20.1 ± 5.8 ve kontrol grubundaki bireylerde 19.5 ± 5.6 olduğu ve aralarında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür ($P<.001$). Görme alanı skoru (VFS) ortalamasının, XFG grubundaki hastalarda 2.6 ± 0.8 , XFS grubundaki hastalarda 1.0 ± 0.0 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.0 ± 0.0 olduğu ve aralarında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür ($P<.001$). Mean deviasyon (MD) ortalamasının, XFG grubundaki hastalarda -7.2 ± 6.6 , XFS grubundaki hastalarda -1.8 ± 3.6 ve kontrol grubundaki bireylerde -1.1 ± 0.9 olduğu ve aralarında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür ($P<.001$). Pattern standart deviasyon (PSD) ortalamasının, XFG grubundaki hastalarda 5.0 ± 3.0 , XFS grubundaki hastalarda 1.8 ± 1.4 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.5 ± 0.3 olduğu ve aralarında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür ($P<.001$) (Çizelge 3.1).

Kategorik değişkenlerin analizi sonucunda, cinsiyet değişkenine bakıldığında erkeklerin oranının, XFG grubunda %60.00, XFS grubunda %53.46 ve kontrol

grubunda %49.15 olduğu ve aralarında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür ($P=.04$). Cinsiyet değişkeninde ikili gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında XFG ve kontrol grupları arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olduğu ($P=.01$), diğer ikili karşılaştırmalarda ise istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür. Diğer kategorik değişkenlerin analiz sonucunda gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (Çizelge 3.2).

3.1.2.1 *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve alel frekansları

mir-146a rs2910164 G/C SNP genotip ve alel frekanslarının analiz sonucuna göre, polimorfik CC genotipinin XFG grubunda %5.00, XFS grubunda %7.69 ve kontrol grubunda %5.42 oranında olduğu görülmüştür. Resesif ve dominant modellerde ikili gruplar arasında OR, CI ve P değerleri öncelikle χ^2 testi ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.5'te gösterilmiştir. Resesif modelde, CC genotipi GC ve GG genotiplerine göre karşılaştırıldığında ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (XFG vs. kontrol: $P=.82$, XFS vs. kontrol: $P=.28$, XFG vs. XFS: $P=.21$). Dominant modelde, CC ve GC genotipi GG genotipine göre karşılaştırıldığında ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (XFG vs. kontrol: $P=.21$, XFS vs. kontrol: $P=.43$, XFG vs. XFS: $P=.66$). Polimorfik C alel frekansının XFG grubunda 0.262, XFS grubunda 0.265 ve kontrol grubunda 0.237 olduğu görülmüş ve ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (XFG vs. kontrol: $P=.35$, XFS vs. kontrol: $P=.28$, XFG vs. XFS: $P>.99$) (Çizelge 3.5).

mir-146a rs2910164 G/C SNP analizi, çalışma grubunun yaş ve cinsiyetine göre düzeltme yapılmasını sağlayan SNPstats web aracı (Url-23) ile farklı genotip modelleri altında gerçekleştirilmiştir. SNPStats programında OR, CI ve P değerlerinin hesaplanması için öncelikle eldeki veri yaş ve cinsiyete göre düzenlenmekte ve farklı genetik modellerde bu değerler lojistik regresyon analizi ile belirlenmektedir. Bu analizde de dominant ve resesif modelde ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (dominant modelde: XFG vs. kontrol: $P=.28$, XFS vs. kontrol: $P=.42$, XFG vs. XFS: $P=.62$; resesif modelde: XFG vs. kontrol: $P=.90$, XFS vs. kontrol: $P=.30$, XFG vs. XFS: $P=.20$).

Çizelge 3. 1: XFG, XFS ve kontrol gruplarının bazı bilgileri (sürekli değişkenler).

| | XFG (n=260) | XFS (n=260) | Kontrol (n=295) | P |
|---|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|
| Yaş ortalama ± SD Medyan (Q1-Q3) | 71.5 ± 8.1 72.0 (51.0-88.0) | 70.9 ± 6.5 69.0 (60.0-86.0) | 70.3 ± 7.8 69.0 (33.0-102.0) | .09 ^a |
| Göz içi Basıncı (GİB, mmHg) ortalama ± SD Medyan (Q1-Q3) | 21.6 ± 5.4 21.0 (12.0-55.0) | 20.1 ± 5.8 19.0 (11.0-50.0) | 19.5 ± 5.6 18.0 (9.0-38.0) | <.001 ^a <.001 ^b .25 ^c .001 ^d |
| Görme alanı skoru (VFS) ortalama ± SD Medyan (Q1-Q3) | 2.6 ± 0.8 2.0 (2.0-5.0) | 1.0 ± 0.0 1.0 (1.0-1.0) | 1.0 ± 0.0 1.0 (1.0-1.0) | <.001 ^a <.001 ^b >.99 ^c <.001 ^d |
| Mean deviasyon (MD) ortalama ± SD Medyan (Q1-Q3) | -7.2 ± 6.6 -4.2 (-33.7- -1.5) | -1.8 ± 3.6 -1.1 (-27.3- -0.1) | -1.1 ± 0.9 -0.9 (-6.0-0.2) | <.001 ^a <.001 ^b .07 ^c <.001 ^d |
| Pattern standart deviasyon (PSD) ortalama ± SD Medyan (Q1-Q3) | 5.0 ± 3.0 4.1 (1.0-13.3) | 1.8 ± 1.4 1.5 (1.0-10.0) | 1.5 ± 0.3 1.5 (1.0-2.8) | <.001 ^a <.001 ^b .05 ^c <.001 ^d |
| <p>Parametre değerleri ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir. Üçlü karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır. İkili gruplar arasında karşılaştırma ise Conover formülü ile hesaplanmıştır. ^a 3 grubun, ^bXFG vs. kontrol, ^cXFS vs. kontrol, ^dXFG vs. XFS arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir.</p> | | | | |

Çizelge 3. 2: XFG, XFS ve kontrol gruplarının bazı bilgileri (kategorik değişkenler).

| | XFG (n=260) | XFS (n=260) | Kontrol (n=295) | P |
|---|------------------------|------------------------|----------------------------|--|
| Cinsiyet Erkek /kadın Erkek % | 156 / 104 60.00 | 139 / 121 53.46 | 145 / 150 49.15 | .04^a .01^b .31 ^c .13 ^d |
| Hipertansiyon, n (%) | 121 (46.54) | 129 (49.62) | 151 (51.19) | .54 ^a .27 ^b .71 ^c .48 ^d |
| Diyabet, n (%) | 60 (23.08) | 70 (26.92) | 67 (22.71) | .45 ^a .92 ^b .25 ^c .31 ^d |
| Kalp Hastalıkları, n (%) | 71 (27.31) | 74 (28.46) | 86 (29.15) | .89 ^a .63 ^b .86 ^c .77 ^d |
| Sigara, n (%) | 36 (13.85) | 38 (14.62) | 36 (12.20) | .70 ^a .57 ^b .40 ^c .80 ^d |
| İnme, n (%) | 4 (1.54) | 3 (1.15) | 11 (3.73) | .08 ^a .19 ^{b**} .10 ^{c**} >.99 ^{d*} |
| <p>Karşılaştırmalarda Ki-kare testi kullanılmıştır. *Fisher exact testi kullanılmıştır. **Yates Ki-kare testi kullanılmıştır. ^a3 grubun, ^bXFG vs. kontrol, ^cXFS vs. kontrol, ^dXFG vs. XFS arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir.</p> | | | | |

3.1.2 *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'lerinin genotip ve alel frekansları

mir-146a rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'lerinin, hasta ve kontrol gruplarındaki genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olduğu görülmüştür. Gözlenen genotip frekansları ile beklenen genotip frekansları arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık görülmemiştir (Çizelge 3.3 ve 3.4).

Çizelge 3. 3: *mir-146a* rs2910164 SNP'sinin Hardy-Weinberg dengesine uyum analizi.

| <i>mir-146a</i> rs2910164 SNP | | | | |
|-------------------------------|---------|----------------------|----------------------|-----|
| Grup | Genotip | Gözlenen Genotip (n) | Beklenen Genotip (n) | P |
| Kontrol | GG | 171 | 171.61 | .99 |
| | GC | 108 | 106.78 | |
| | CC | 16 | 16.61 | |
| | Toplam | 295 | | |
| XFS | GG | 142 | 140.31 | .93 |
| | GC | 98 | 101.38 | |
| | CC | 20 | 18.31 | |
| | Toplam | 260 | | |
| XFG | GG | 137 | 141.79 | .53 |
| | GC | 110 | 100.43 | |
| | CC | 13 | 17.78 | |
| | Toplam | 260 | | |

P değerleri χ^2 testi ile belirlenmiştir.

Çizelge 3. 4: *mir-196a-2* rs11614913 SNP'sinin Hardy-Weinberg dengesine uyum analizi.

| <i>mir-196a-2</i> rs11614913 SNP | | | | |
|----------------------------------|---------|----------------------|----------------------|-----|
| Grup | Genotip | Gözlenen Genotip (n) | Beklenen Genotip (n) | P |
| Kontrol | CC | 116 | 108.01 | .39 |
| | TC | 125 | 140.98 | |
| | TT | 54 | 46.01 | |
| | Toplam | 295 | | |
| XFS | CC | 93 | 93.60 | .99 |
| | TC | 126 | 124.80 | |
| | TT | 41 | 41.60 | |
| | Toplam | 260 | | |
| XFG | CC | 98 | 94.20 | .78 |
| | TC | 117 | 124.60 | |
| | TT | 45 | 41.20 | |
| | Toplam | 260 | | |

P değerleri χ^2 testi ile belirlenmiştir.

Codominant, overdominant ve log-additive gibi farklı modellerde de ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (codominant modelde: XFG vs. kontrol: $P=.51$, XFS vs. kontrol: $P=.51$, XFG vs. XFS: $P=.30$; overdominant modelde: XFG vs. kontrol: $P=.25$, XFS vs. kontrol: $P=.76$, XFG vs. XFS: $P=.26$ ve log-additive modelde: XFG vs. kontrol: $P=.40$, XFS vs. kontrol: $P=.28$, XFG vs. XFS: $P=.92$) (Çizelge 3. 6).

mir-146a rs2910164 G/C SNP analizi, çalışma grubunun yaş ve cinsiyetine göre düzeltme yapılmasını sağlayan SNPstats web aracı (Url-23) ile farklı genotip modelleri altında gerçekleştirilmiştir. SNPStats programında OR, CI ve P değerlerinin hesaplanması için öncelikle eldeki veri yaş ve cinsiyete göre düzenlenmekte ve farklı genetik modellerde bu değerler lojistik regresyon analizi ile belirlenmektedir. Bu analizde de dominant ve resesif modelde ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (dominant modelde: XFG vs. kontrol: $P=.28$, XFS vs. kontrol: $P=.42$, XFG vs. XFS: $P=.62$; resesif modelde: XFG vs. kontrol: $P=.90$, XFS vs. kontrol: $P=.30$, XFG vs. XFS: $P=.20$). Codominant, overdominant ve log-additive gibi farklı modellerde de ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (codominant modelde: XFG vs. kontrol: $P=.51$, XFS vs. kontrol: $P=.51$, XFG vs. XFS: $P=.30$; overdominant modelde: XFG vs. kontrol: $P=.25$, XFS vs. kontrol: $P=.76$, XFG vs. XFS: $P=.26$ ve log-additive modelde: XFG vs. kontrol: $P=.40$, XFS vs. kontrol: $P=.28$, XFG vs. XFS: $P=.92$) (Çizelge 3. 6).

mir-146a rs2910164 G/C SNP'si, SNPstats programında yaş ve cinsiyete göre düzenlenip analiz edildiğinde, XFG ile kontrol karşılaştırmasında AIC ve BIC değerleri en düşük Overdominant modelde (AIC:764.0, BIC:781.3), XFS ile kontrol karşılaştırmasında AIC ve BIC değerleri en düşük resesif modelde (AIC:772.0, BIC:789.2) ve XFG ile XFS karşılaştırmasında AIC ve BIC değerleri en düşük resesif modelde (AIC:724.3, BIC:741.4) görüldüğünden her bir karşılaştırma için bu modellerin en uygun model olduğu kabul edilmektedir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3. 5: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve alel frekansları dağılımı.

| | XFG (n=260) | XFS (n=260) | Kontrol (n=295) | XFG vs. Kontrol | | XFS vs. Kontrol | | XFG vs. XFS | |
|-----------------------|----------------|----------------|--------------------|----------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | | | | OR (%95 CI) | P | OR (%95 CI) | P | OR (%95 CI) | P |
| Genotip, n (%) | | | | | | | | | |
| GG | 137 (52.69) | 142 (54.62) | 171 (57.97) | 0.92 ^a (0.43-1.95) | .82 ^a | 1.45 ^a (0.74-2.87) | .28 ^a | 0.63 ^a (0.31-1.30) | .21 ^a |
| GC | 110 (42.31) | 98 (37.69) | 108 (36.61) | 1.24 ^b (0.89-1.73) | .21 ^b | 1.15 ^b (0.82 -1.60) | .43 ^b | 1.08 ^b (0.77-1.53) | .66 ^b |
| CC | 13 (5.00) | 20 (7.69) | 16 (5.42) | | | | | | |
| Alel frekansı | | | | | | | | | |
| G | 0.738 | 0.735 | 0.763 | 1.14 ^c (0.87-1.50) | .35 ^c | 1.16 ^c (0.89-1.52) | .28 ^c | 0.98 ^c (0.74- 1.29) | >.99 ^c |
| C | 0.262 | 0.265 | 0.237 | | | | | | |

Resesif model için: ^aCC vs. GC & GG, Dominant model için: ^bCC & GC vs. GG, ^cC vs. G
 Gruplar arası genotip frekansı karşılaştırması için OR, CI ve P değerleri χ^2 testi ile belirlenmiştir.
 Gruplar arası alel frekansı karşılaştırması için OR, CI ve P değerleri χ^2 testi ile belirlenmiştir.

Çizelge 3. 6: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde yaş ve cinsiyete göre dengelenmiş dağılımı.

| Genotip modelleri | Genotip, n (%) | XFG (n=260) | XFS (n=260) | Kontrol (n=295) | XFG vs. Kontrol | | XFS vs. Kontrol | | XFG vs. XFS | |
|---------------------|----------------|-------------|-------------|-----------------|-------------------------------|-----|-------------------------------|-----|-------------------------------|-----|
| | | | | | OR (%95 CI) | P | OR (%95 CI) | P | OR (%95 CI) | P |
| Codominant | GG | 137 (52.7) | 142 (54.6) | 171 (58.0) | 1.00* | .51 | 1.00* | .51 | 1.00* | .30 |
| | GC | 110 (42.3) | 98 (37.7) | 108 (36.6) | 1.23 ^a (0.86-1.75) | | 1.10 ^a (0.77-1.57) | | 1.18 ^a (0.82-1.69) | |
| | CC | 13 (5.0) | 20 (7.7) | 16 (5.4) | 1.03 ^b (0.48-2.24) | | 1.49 ^b (0.74-2.98) | | 0.67 ^b (0.32-1.41) | |
| Dominant | GG | 137 (52.7) | 142 (54.6) | 171 (58.0) | 1.00* | .28 | 1.00* | .42 | 1.00* | .62 |
| | GC-CC | 123 (47.3) | 118 (45.4) | 124 (42.0) | 1.20 ^c (0.86-1.69) | | 1.15 ^c (0.82-1.61) | | 1.09 ^c (0.77-1.54) | |
| Resesif | GG-GC | 247 (95.0) | 240 (92.3) | 279 (94.6) | 1.00* | .90 | 1.00* | .30 | 1.00* | .20 |
| | CC | 13 (5.0) | 20 (7.7) | 16 (5.4) | 0.95 ^d (0.44-2.03) | | 1.43 ^d (0.73-2.83) | | 0.63 ^d (0.31-1.30) | |
| Overdominant | GG-CC | 150 (57.7) | 162 (62.3) | 187 (63.4) | 1.00* | .25 | 1.00* | .76 | 1.00* | .26 |
| | GC | 110 (42.3) | 98 (37.7) | 108 (36.6) | 1.22 ^e (0.87-1.73) | | 1.06 ^e (0.75-1.49) | | 1.23 ^e (0.86-1.75) | |
| Log-additive | --- | --- | --- | --- | 1.13 ^f (0.85-1.50) | .40 | 1.16 ^f (0.88-1.52) | .28 | 0.99 ^f (0.74-1.31) | .92 |

Gruplar arası genotip frekansı karşılaştırması için OR, CI ve P değerleri SNPStats programı kullanılarak lojistik regresyon analizi ile yaş ve cinsiyete göre dengelenerek belirlenmiştir. *Referans değer, ^aGC vs. GG, ^bCC vs. GG, ^cGC & CC vs. GG, ^dCC vs. GG & GC, ^eGC vs. GG & CC, ^fC vs. G

Çizelge 3. 7: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde yaş ve cinsiyete göre dengelenmiş dağılımı sonucunun AIC ve BIC değerleri.

| Genotip modelleri | Genotip, n (%) | XFG (n=260) | XFS (n=260) | Kontrol (n=295) | AIC | | | BIC | | |
|---------------------|----------------|-------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|-------------|
| | | | | | XFG vs. Kontrol | XFS vs. Kontrol | XFG vs. XFS | XFG vs. Kontrol | XFS vs. Kontrol | XFG vs. XFS |
| Codominant | GG | 137 (52.7) | 142 (54.6) | 171 (58.0) | 766.0 | 773.7 | 725.6 | 787.6 | 795.3 | 746.8 |
| | GC | 110 (42.3) | 98 (37.7) | 108 (36.6) | | | | | | |
| | CC | 13 (5.0) | 20 (7.7) | 16 (5.4) | | | | | | |
| Dominant | GG | 137 (52.7) | 142 (54.6) | 171 (58.0) | 764.2 | 772.4 | 725.7 | 781.4 | 789.7 | 742.7 |
| | GC-CC | 123 (47.3) | 118 (45.4) | 124 (42.0) | | | | | | |
| Resesif | GG-GC | 247 (95.0) | 240 (92.3) | 279 (94.6) | 765.3 | 772.0 | 724.3 | 782.6 | 789.2 | 741.4 |
| | CC | 13 (5.0) | 20 (7.7) | 16 (5.4) | | | | | | |
| Overdominant | GG-CC | 150 (57.7) | 162 (62.3) | 187 (63.4) | 764.0 | 772.9 | 724.7 | 781.3 | 790.2 | 741.7 |
| | GC | 110 (42.3) | 98 (37.7) | 108 (36.6) | | | | | | |
| Log-additive | --- | --- | --- | --- | 764.6 | 771.9 | 725.9 | 781.9 | 789.2 | 743.0 |

Gruplar arası genotip frekansı karşılaştırması için OR, CI ve P değerleri SNPStats programı kullanılarak yaş ve cinsiyete göre dengelenerek lojistik regresyon analizi ile belirlenmiştir. AIC: Akaike information criterion, BIC: Bayesian information criterion

3.1.2.2 *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve alel frekansları

mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP genotip ve alel frekansları analiz sonucuna göre, polimorfik TT genotipinin XFG grubunda %17.31, XFS grubunda %15.77 ve kontrol grubunda %18.31 oranında olduğu görülmüştür. Resesif ve dominant modellerde ikili gruplar arasında OR, CI ve P değerleri χ^2 testi ile belirlenmiştir. Resesif modelde, TT genotipi TC ve CC genotipine göre karşılaştırıldığında ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (XFG vs. kontrol: $P=.76$, XFS vs. kontrol: $P=.43$, XFG vs. XFS: $P=.64$). Dominant modelde, TT ve TC genotipi CC genotipine göre karşılaştırıldığında ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (XFG vs. kontrol: $P=.69$, XFS vs. kontrol: $P=.39$, XFG vs. XFS: $P=.65$). Polimorfik T alel frekansının XFG grubunda 0.398, XFS grubunda 0.400 ve kontrol grubunda 0.395 olduğu görülmüş ve ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (XFG vs. kontrol: $P>.99$, XFS vs. kontrol: $P=.86$, XFG vs. XFS: $P>.99$) (Çizelge 3.8).

mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP genotip frekansları farklı genotip modellerinde de analiz edilmiştir. Farklı modellerde OR, CI ve P değerleri SNPStats programı kullanılarak yaş ve cinsiyete göre düzenlenip belirlenmiştir. Bu analizde de dominant ve resesif modelde ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (dominant modelde: XFG vs. kontrol: $P=.76$, XFS vs. kontrol: $P=.39$, XFG vs. XFS: $P=.67$; resesif modelde: XFG vs. kontrol: $P=.56$, XFS vs. kontrol: $P=.37$, XFG vs. XFS: $P=.67$). Codominant, overdominant ve log-additive gibi farklı modellerde de ikili gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir (codominant modelde: XFG vs. kontrol: $P=.72$, XFS vs. kontrol: $P=.30$, XFG vs. XFS: $P=.76$; overdominant modelde: XFG vs. kontrol: $P=.46$, XFS vs. kontrol: $P=.13$, XFG vs. XFS: $P=.46$ ve log-additive modelde: XFG vs. kontrol: $P=.92$, XFS vs. kontrol: $P=.91$, XFG vs. XFS: $P=.95$) (Çizelge 3. 9).

mir-196a-2 rs11614913 C/T SNP'si SNPstats programında yaş ve cinsiyete göre düzenlenip analiz edildiğinde, XFG ile kontrol, XFS ile kontrol ve XFG ile XFS karşılaştırmalarında AIC ve BIC değerleri en düşük overdominant modelde görüldüğünden her bir model için en uygun model olduğu kabul edilmektedir (XFG vs. kontrol için AIC: 764.8, BIC:782.0; XFS vs. kontrol için AIC:770.7, BIC:788.0 ve XFG vs. XFS için AIC:725.4, BIC: 742.4) (Çizelge 3.10)

Çizelge 3. 8: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve alel frekansları dağılımı.

| | XFG (n=260) | XFS (n=260) | Kontrol (n=295) | XFG vs. Kontrol | | XFS vs. Kontrol | | XFG vs. XFS | |
|-----------------------|----------------|----------------|--------------------|----------------------------------|-------------------|----------------------------------|------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | | | | OR (%95 CI) | P | OR (%95 CI) | P | OR (%95 CI) | P |
| Genotip, n (%) | | | | | | | | | |
| CC | 98 (37.69) | 93 (35.77) | 116 (39.32) | 0.93 ^a (0.60-1.45) | .76 ^a | 0.84 ^a (0.54-1.30) | .43 ^a | 1.12 ^a (0.70-1.77) | .64 ^a |
| TC | 117 (45.00) | 126 (48.46) | 125 (42.37) | 1.07 ^b (0.76-1.51) | .69 ^b | 1.16 ^b (0.82-1.64) | .39 ^b | 0.92 ^b (0.64- 1.32) | .65 ^b |
| TT | 45 (17.31) | 41 (15.77) | 54 (18.31) | | | | | | |
| Allel frekansı | | | | | | | | | |
| C | 0.602 | 0.600 | 0.605 | 1.01 ^c (0.80-1.29) | >.99 ^c | 1.02 ^c (0.80-1.30) | .86 ^c | 0.99 ^c (0.77- 1.27) | >.99 ^c |
| T | 0.398 | 0.400 | 0.395 | | | | | | |

Resesif model için: ^aTT vs. TC & CC, Dominant model için: ^bTT & TC vs. CC, ^cT vs. C
 Gruplar arası genotip frekansı karşılaştırması için OR, CI ve P değerleri χ^2 testi ile belirlenmiştir.
 Gruplar arası allel frekansı karşılaştırması için OR, CI ve P değerleri χ^2 testi ile belirlenmiştir.

Çizelge 3. 9: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde yaş ve cinsiyete göre dengelenmiş dağılımı.

| Genotip modelleri | Genotip, n (%) | XFG (n=260) | XFS (n=260) | Kontrol (n=295) | XFG vs. Kontrol | | XFS vs. Kontrol | | XFG vs. XFS | |
|---------------------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---|-----|---|-----|---|-----|
| | | | | | OR (%95 CI) | P | OR (%95 CI) | P | OR (%95 CI) | P |
| Codominant | CC TC TT | 98 (37.7) 117 (45.0) 45 (17.3) | 93 (35.8) 126 (48.5) 41 (15.8) | 116 (39.3) 125 (42.4) 54 (18.3) | 1.00* 1.11 ^a (0.77-1.61) 0.93 ^b (0.57-1.51) | .72 | 1.00* 1.27 ^a (0.88-1.84) 0.93 ^b (0.57-1.52) | .30 | 1.00* 0.89 ^a (0.61-1.30) 1.04 ^b (0.62-1.73) | .76 |
| Dominant | CC TC-TT | 98 (37.7) 162 (62.3) | 93 (35.8) 167 (64.2) | 116 (39.3) 179 (60.7) | 1.00* 1.05 ^c (0.75-1.49) | .76 | 1.00* 1.16 ^c (0.82-1.65) | .39 | 1.00* 0.93 ^c (0.65-1.32) | .67 |
| Resesif | CC-TC TT | 215 (82.7) 45 (17.3) | 219 (84.2) 41 (15.8) | 241 (81.7) 54 (18.3) | 1.00* 0.88 ^d (0.56-1.36) | .56 | 1.00* 0.82 ^d (0.52-1.28) | .37 | 1.00* 1.11 ^d (0.70-1.76) | .67 |
| Overdominant | CC-TT TC | 143 (55.0) 117 (45.0) | 134 (51.5) 126 (48.5) | 170 (57.6) 125 (42.4) | 1.00* 1.14 ^e (0.81-1.60) | .46 | 1.00* 1.30 ^e (0.93-1.82) | .13 | 1.00* 0.88 ^e (0.62-1.24) | .46 |
| Log-additive | --- | --- | --- | --- | 0.99 ^f (0.78-1.25) | .92 | 1.01 ^f (0.80-1.28) | .91 | 0.99 ^f (0.78-1.27) | .95 |

Gruplar arası genotip frekansı karşılaştırması için OR, CI ve P değerleri SNPStats programı kullanılarak lojistik regresyon analizi ile yaş ve cinsiyete göre dengelenerek belirlenmiştir. *Referans değer, ^aTC vs. CC, ^bTT vs. CC, ^cTT & TC vs. CC, ^dTT vs. TC & CC, ^eTC vs. CC & TT, ^fT vs. C

Çizelge 3. 10: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde yaş ve cinsiyete göre dengelenmiş dağılım sonucunun AIC ve BIC değerleri.

| Genotip modelleri | Genotip, n (%) | XFG (n=260) | XFS (n=260) | Kontrol (n=295) | AIC | | | BIC | | |
|---------------------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|-------------|
| | | | | | XFG vs. Kontrol | XFS vs. Kontrol | XFG vs. XFS | XFG vs. Kontrol | XFS vs. Kontrol | XFG vs. XFS |
| Codominant | CC TC TT | 98 (37.7) 117 (45.0) 45 (17.3) | 93 (35.8) 126 (48.5) 41 (15.8) | 116 (39.3) 125 (42.4) 54 (18.3) | 766.7 | 772.6 | 727.4 | 788.3 | 794.2 | 748.7 |
| Dominant | CC TC-TT | 98 (37.7) 162 (62.3) | 93 (35.8) 167 (64.2) | 116 (39.3) 179 (60.7) | 765.2 | 772.3 | 725.8 | 782.5 | 789.6 | 742.8 |
| Resesif | CC-TC TT | 215 (82.7) 45 (17.3) | 219 (84.2) 41 (15.8) | 241 (81.7) 54 (18.3) | 765.0 | 772.2 | 725.8 | 782.3 | 789.5 | 742.8 |
| Overdominant | CC-TT TC | 143 (55.0) 117 (45.0) | 134 (51.5) 126 (48.5) | 170 (57.6) 125 (42.4) | 764.8 | 770.7 | 725.4 | 782.0 | 788.0 | 742.4 |
| Log-additive | --- | --- | --- | --- | 765.3 | 773.0 | 726.0 | 782.6 | 790.3 | 743.0 |

Gruplar arası genotip frekansı karşılaştırması için OR, CI ve P değerleri SNPStats programı kullanılarak yaş ve cinsiyete göre dengelenerek lojistik regresyon analizi ile belirlenmiştir. AIC: Akaike information criterion, BIC: Bayesian information criterion

3.1.3 *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'lerinin göz parametreleri ile ilişkisi

3.1.3.1 *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin göz parametreleri ile ilişkisi

mir-146a rs2910164 SNP'sinin dominant ve resesif modellerde göz parametreleri ile ilişkisi analiz edilmiştir. Resesif modelde GC ile GG genotipleri risksiz durumu, polimorfik CC genotipi riskli durumu, dominant modelde GG genotipi risksiz durumu, polimorfik CC genotipi ile GC genotipi riskli durumu oluşturacak biçimde hesaplama yapılmıştır. Göz parametrelerinin 3 grup arasında karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. Test, anlamlı sonuç verdiğinde ikili gruplar arasındaki karşılaştırmayı görmek için Conover formülü kullanılmıştır. Göz parametrelerinin resesif ve dominant modellerde risksiz ve riskli kabul edilen durumlar arasında karşılaştırılması için de Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

İstatistiksel analiz sonucunda, GİB değeri ortalamasının, resesif model GC & GG genotiplerinde XFG grubundaki hastalarda 21.49 ± 4.91 , XFS grubundaki hastalarda 20.11 ± 5.41 ve kontrol grubundaki bireylerde 19.66 ± 5.69 olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (Üç grup arasında $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFG vs. XFS: $P = .001$). GİB değeri ortalamasının, resesif model CC genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 20.82 ± 4.60 , XFS grubundaki hastalarda 19.88 ± 6.14 ve kontrol grubundaki bireylerde 20.00 ± 4.24 olduğu görülmüştür. Üç grup arasında anlamlı ölçüde farklılık olmadığı ($P = .94$) belirlenmiştir. GİB değeri ortalamasının, dominant model GG genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 21.99 ± 5.20 , XFS grubundaki hastalarda 20.33 ± 6.28 ve kontrol grubundaki bireylerde 19.82 ± 6.13 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P = .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFG vs. XFS: $P = .004$). GİB değeri ortalamasının, dominant modelde CC & GC genotipi taşıyanlar arasından XFG grubundaki hastalarda 20.91 ± 4.50 , XFS grubundaki hastalarda 19.84 ± 4.44 ve kontrol grubundaki bireylerde 19.50 ± 4.88 olduğu belirlenmiş ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P = .02$, XFG vs. kontrol: $P = .007$). Resesif modelde CC genotipi ile GC & GG genotipi taşıyanlar arasında GİB yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P = .34$, XFS: $P = .63$ ve kontrol: $P = .88$). Dominant modelde de CC & GC genotipi ile GG genotipi taşıyanlar arasında GİB

yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P=.24$, XFS: $P=.82$ ve kontrol: $P=.96$).

VFS değeri ortalamasının, resesif model GC & GG genotiplerinde XFG grubundaki hastalarda 2.65 ± 0.84 , XFS grubundaki hastalarda 1.00 ± 0.00 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.00 ± 0.00 olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (üç grup arasında: $P<.001$, XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$). VFS değeri ortalamasının, resesif model CC genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 2.36 ± 0.51 , XFS grubundaki hastalarda 1.00 ± 0.00 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.00 ± 0.00 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P<.001$, XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$). VFS değeri ortalamasının, dominant model GG genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 2.58 ± 0.82 , XFS grubundaki hastalarda 1.00 ± 0.00 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.00 ± 0.00 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P<.001$, XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$). VFS değeri ortalamasının, dominant modelde CC & GC genotipi taşıyanlar arasından XFG grubundaki hastalarda 2.70 ± 0.83 , XFS grubundaki hastalarda 1.00 ± 0.00 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.00 ± 0.00 olduğu belirlenmiş ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P<.001$, XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$). Resesif modelde CC genotipi ile GC & GG genotipi taşıyanlar arasında VFS yönünde anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P=.35$, XFS: $P>.99$ ve kontrol: $P>.99$). Dominant modelde de CC & GC genotipi ile GG genotipi taşıyanlar arasında VFS yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P=.16$, XFS: $P>.99$ ve kontrol: $P>.99$).

MD değeri ortalamasının, resesif model GC & GG genotiplerinde XFG grubundaki hastalarda -6.78 ± 6.02 , XFS grubundaki hastalarda -0.96 ± 0.54 ve kontrol grubundaki bireylerde -0.96 ± 0.57 olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (üç grup arasında: $P<.001$, XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$). MD değeri ortalamasının, resesif model CC genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda -5.26 ± 3.53 , XFS grubundaki hastalarda -1.14 ± 0.65 ve kontrol grubundaki bireylerde -0.73 ± 0.54 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç

grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFS vs. kontrol: $P = .02$, XFG vs. XFS: $P < .001$). MD değeri ortalamasının, dominant model GG genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda -6.33 ± 5.79 , XFS grubundaki hastalarda -0.96 ± 0.55 ve kontrol grubundaki bireylerde -0.97 ± 0.59 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFG vs. XFS: $P < .001$). MD değeri ortalamasının, dominant modelde CC & GC genotipi taşıyanlar arasından XFG grubundaki hastalarda -7.09 ± 6.07 , XFS grubundaki hastalarda -0.99 ± 0.54 ve kontrol grubundaki bireylerde -0.93 ± 0.54 olduğu belirlenmiş ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFS vs. kontrol: $P = .03$, XFG vs. XFS: $P < .001$). Resesif modelde CC genotipi ile GC & GG genotipi taşıyanlar arasında MD yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P = .48$, XFS: $P = .10$ ve kontrol: $P = .10$). Dominant modelde de CC & GC ile GG genotipi taşıyanlar arasında MD yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P = .50$, XFS: $P = .93$ ve kontrol: $P = .23$).

PSD değeri ortalamasının, resesif model GC & GG genotiplerinde XFG grubundaki hastalarda 5.02 ± 3.01 , XFS grubundaki hastalarda 1.46 ± 0.23 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.44 ± 0.24 olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFS vs. kontrol: $P = .04$, XFG vs. XFS: $P < .001$). PSD değeri ortalamasının, resesif model CC genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 3.52 ± 1.08 , XFS grubundaki hastalarda 1.38 ± 0.23 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.53 ± 0.20 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P = .001$, XFG vs. kontrol: $P = .001$, XFG vs. XFS: $P < .001$). PSD değeri ortalamasının, dominant model GG genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 4.68 ± 2.89 , XFS grubundaki hastalarda 1.47 ± 0.23 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.44 ± 0.25 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFG vs. XFS: $P = .03$). PSD değeri ortalamasının, dominant modelde CC & GC genotipi taşıyanlar arasından XFG grubundaki hastalarda 5.21 ± 3.03 , XFS grubundaki hastalarda 1.43 ± 0.22 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.44 ± 0.23 olduğu belirlenmiş ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol:

$P < .001$, XFG vs. XFS: $P < .001$). Resesif modelde CC genotipi ile GC & GG genotipi taşıyanlar arasında PSD yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P = .06$, XFS: $P = .70$ ve kontrol: $P = .23$). Dominant modelde de CC & GC genotipi ile GG genotipi taşıyanlar arasında PSD yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P = .06$, XFS: $P = .22$ ve kontrol: $P = .68$) (Çizelge 3.11).

3.1.3.2 *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin göz parametreleri ile ilişkisi

mir-196a-2 rs11614913 SNP'sinin dominant ve resesif modellerde göz parametreleri ile ilişkisi analiz edilmiştir. Resesif modelde TC ile CC genotipleri risksiz durumu, polimorfik TT genotipi riskli durumu, dominant modelde CC genotipi risksiz durumu, polimorfik TT genotipi ile TC genotipi riskli durumu oluşturacak biçimde hesaplama yapılmıştır. Göz parametrelerinin 3 grup arasında karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. Test, anlamlı sonuç verdiğinde ikili gruplar arasındaki karşılaştırmayı görmek için Conover formülü kullanılmıştır. Göz parametrelerinin resesif ve dominant modellerde risksiz ve riskli kabul edilen durumlar arasında karşılaştırılması için de Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

İstatistiksel analiz sonucunda, GİB değeri ortalamasının, resesif model TC & CC genotiplerinde XFG grubundaki hastalarda 21.32 ± 4.77 , XFS grubundaki hastalarda 19.91 ± 5.21 ve kontrol grubundaki bireylerde 19.94 ± 5.73 olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (üç grup arasında: $P = .001$, XFG vs. kontrol: $P = .001$, XFG vs. XFS: $P = .002$). GİB değeri ortalamasının, resesif model TT genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 22.02 ± 5.38 , XFS grubundaki hastalarda 21.03 ± 6.59 ve kontrol grubundaki bireylerde 18.67 ± 5.06 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P = .01$, XFG vs. kontrol: $P = .002$). GİB değeri ortalamasının, dominant model CC genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 21.06 ± 4.38 , XFS grubundaki hastalarda 19.70 ± 4.46 ve kontrol grubundaki bireylerde 19.50 ± 5.53 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P = .01$, XFG vs. kontrol: $P = .004$, XFG vs. XFS: $P = .006$).

Çizelge 3. 11: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin göz parametreleri ile ilişkisi.

| Parametreler | <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C | XFG | XFS | Kontrol | P^A | P^B | P^C | P^D |
|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|
| GİB | Resesif model GC & GG | 21.49 ± 4.91 | 20.11 ± 5.41 | 19.66 ± 5.69 | <.001 | .23 | <.001 | .001 |
| | CC | 20.82 ± 4.60 | 19.88 ± 6.14 | 20.00 ± 4.24 | .94 | | | |
| | P^E | .35 | .63 | .88 | | | | |
| | Dominant model GG | 21.99 ± 5.20 | 20.33 ± 6.28 | 19.82 ± 6.13 | .001 | .50 | <.001 | .004 |
| | CC & GC | 20.91 ± 4.50 | 19.84 ± 4.44 | 19.50 ± 4.88 | .02 | .31 | .007 | .09 |
| | P^F | .24 | .82 | .96 | | | | |
| VFS | Resesif model GC & GG | 2.65 ± 0.84 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | <.001 | >.99 | <.001 | <.001 |
| | CC | 2.36 ± 0.51 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | <.001 | >.99 | <.001 | <.001 |
| | P^E | .35 | >.99 | >.99 | | | | |
| | Dominant model GG | 2.58 ± 0.82 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | <.001 | >.99 | <.001 | <.001 |
| | CC & GC | 2.70 ± 0.83 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | <.001 | >.99 | <.001 | <.001 |
| | P^F | .16 | >.99 | >.99 | | | | |
| MD | Resesif model GC & GG | -6.78 ± 6.02 | -0.96 ± 0.54 | -0.96 ± 0.57 | <.001 | .31 | <.001 | <.001 |
| | CC | -5.26 ± 3.53 | -1.14 ± 0.65 | -0.73 ± 0.54 | <.001 | .02 | <.001 | <.001 |
| | P^E | .48 | .10 | .10 | | | | |
| | Dominant model GG | -6.33 ± 5.79 | -0.96 ± 0.55 | -0.97 ± 0.59 | <.001 | .45 | <.001 | <.001 |
| | CC & GC | -7.09 ± 6.07 | -0.99 ± 0.54 | -0.93 ± 0.54 | <.001 | .03 | <.001 | <.001 |
| | P^F | .50 | .93 | .23 | | | | |

Çizelge 3. 11: (devam) *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin göz parametreleri ile ilişkisi.

| Parametreler | <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C | XFG | XFS | Kontrol | <i>P</i> ^A | <i>P</i> ^B | <i>P</i> ^C | <i>P</i> ^D |
|--|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| PSD | Resesif model GC & GG | 5.02 ± 3.01 | 1.46 ± 0.23 | 1.44 ± 0.24 | <.001 | .04 | <.001 | <.001 |
| | CC | 3.52 ± 1.08 | 1.38 ± 0.23 | 1.53 ± 0.20 | .001 | .66 | .001 | <.001 |
| | <i>P</i> ^E | .06 | .70 | .23 | | | | |
| | Dominant model GG | 4.68 ± 2.89 | 1.47 ± 0.23 | 1.44 ± 0.25 | <.001 | .17 | <.001 | .03 |
| | CC & GC | 5.21 ± 3.03 | 1.43 ± 0.22 | 1.44 ± 0.23 | <.001 | .36 | <.001 | <.001 |
| | <i>P</i> ^F | .06 | .22 | .68 | | | | |
| <p>GİB: göz içi basıncı, VFS: görme alanı skoru, MD: mean deviasyon, PSD: pattern standart deviasyon. Parametre değerleri ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir. ^AÜç grubun, ^BXFS vs. kontrol, ^CXFG vs. kontrol ve ^DXFS vs. XFG arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir. Üçlü karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmalarda ise Conover formülü kullanılmıştır. ^EResesif model, ^FDominant model. İkili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.</p> | | | | | | | | |

GİB değeri ortalamasının, dominant modelde TT & TC genotipi taşıyanlar arasından XFG grubundaki hastalarda 21.70 ± 5.17 , XFS grubundaki hastalarda 20.32 ± 5.97 ve kontrol grubundaki bireylerde 19.80 ± 5.68 olduğu belirlenmiş ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P=.001$, XFG vs. kontrol: $P=.001$). Resesif modelde TT genotipi ile TC & CC genotipi taşıyanlar arasında GİB yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P=.54$, XFS: $P=.69$ ve kontrol: $P=.20$). Dominant modelde de TT & TC genotipi ile CC genotipi taşıyanlar arasında GİB yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P=.61$, XFS: $P=.90$ ve kontrol: $P=.86$).

VFS değeri ortalamasının, resesif model TC & CC genotiplerinde XFG grubundaki hastalarda 2.63 ± 0.80 , XFS grubundaki hastalarda 1.00 ± 0.00 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.00 ± 0.00 olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (üç grup arasında: $P<.001$, XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$). VFS değeri ortalamasının, resesif model TT genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 2.69 ± 0.95 , XFS grubundaki hastalarda 1.00 ± 0.00 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.00 ± 0.00 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P<.001$, XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$). VFS değeri ortalamasının, dominant model CC genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 2.68 ± 0.73 , XFS grubundaki hastalarda 1.00 ± 0.00 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.00 ± 0.00 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P<.001$, XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$). VFS değeri ortalamasının, dominant modelde TT & TC genotipi taşıyanlar arasından XFG grubundaki hastalarda 2.61 ± 0.88 , XFS grubundaki hastalarda 1.00 ± 0.00 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.00 ± 0.00 olduğu belirlenmiş ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P<.001$, XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$). Resesif modelde TT genotipi ile TC & CC genotipi taşıyanlar arasında VFS yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P=.98$, XFS: $P>.99$ ve kontrol: $P>.99$). Dominant modelde de TT & TC genotipi ile CC genotipi taşıyanlar arasında VFS yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P=.15$, XFS: $P>.99$ ve kontrol: $P>.99$).

MD değeri ortalamasının, resesif model TC & CC genotiplerinde XFG grubundaki hastalarda -6.68 ± 5.77 , XFS grubundaki hastalarda -0.98 ± 0.54 ve kontrol grubundaki bireylerde -0.96 ± 0.57 olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFG vs. XFS: $P < .001$). MD değeri ortalamasının, resesif model TT genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda -6.83 ± 6.64 , XFS grubundaki hastalarda -0.90 ± 0.58 ve kontrol grubundaki bireylerde -0.92 ± 0.56 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFG vs. XFS: $P < .001$). MD değeri ortalamasının, dominant model CC genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda -6.70 ± 4.74 , XFS grubundaki hastalarda -1.01 ± 0.52 ve kontrol grubundaki bireylerde -0.96 ± 0.56 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFG vs. XFS: $P < .001$). MD değeri ortalamasının, dominant modelde TC & TT genotipi taşıyanlar arasından XFG grubundaki hastalarda -6.71 ± 6.57 , XFS grubundaki hastalarda -0.95 ± 0.56 ve kontrol grubundaki bireylerde -0.94 ± 0.57 olduğu belirlenmiş ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFG vs. XFS: $P < .001$). Resesif modelde TT genotipi ile TC & CC genotipi taşıyanlar arasında MD yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P = .36$, XFS: $P = .60$ ve kontrol: $P = .77$). Dominant modelde de TT & TC genotipi ile CC genotipi taşıyanlar arasında MD yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P = .36$, XFS: $P = .62$ ve kontrol: $P = .68$).

PSD değeri ortalamasının, resesif model TC & CC genotiplerinde XFG grubundaki hastalarda 4.90 ± 2.81 , XFS grubundaki hastalarda 1.45 ± 0.23 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.45 ± 0.24 olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFG vs. XFS: $P < .001$). PSD değeri ortalamasının, resesif model TT genotipine sahip kişiler arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 5.12 ± 3.61 , XFS grubundaki hastalarda 1.48 ± 0.23 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.40 ± 0.24 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık bulunduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFS vs. kontrol: $P = .048$, XFG vs. XFS: $P < .001$). PSD değeri ortalamasının, dominant model CC genotipine sahip kişiler

arasındaki karşılaştırmasında XFG grubundaki hastalarda 5.15 ± 2.75 , XFS grubundaki hastalarda 1.42 ± 0.23 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.44 ± 0.23 olduğu ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFG vs. XFS: $P < .001$). PSD değeri ortalamasının, dominant modelde TC & TT genotipi taşıyanlar arasından XFG grubundaki hastalarda 4.81 ± 3.09 , XFS grubundaki hastalarda 1.47 ± 0.22 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.44 ± 0.24 olduğu belirlenmiş ve bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFS vs. kontrol: $P = .02$, XFG vs. XFS: $P < .001$). Resesif modelde TT genotipi ile TC & CC genotipi taşıyanlar arasında PSD yönünden - anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P = .63$, XFS: $P = .27$ ve kontrol: $P = .29$). Dominant modelde de TT & TC genotipi ile CC genotipi taşıyanlar arasında PSD yönünden anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür (XFG: $P = .24$, XFS: $P = .12$ ve kontrol: $P = .82$) (Çizelge 3.12).

3.2 Plazma miRNA Relatif Ekspresyon Seviyeleri

3.2.1 Çalışma grupları

Genotipleme için toplanan periferik tam kanların bir kısmından relatif ekspresyon seviyesi analizi için plazmalar ayrılmıştır. Her grup içerisinde olmak üzere, 25 XFS grubu hastası, 27 XFG grubu hastası ve 27 kontrol grubu bireyden periferik tam kan plazması toplanıp, hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p miRNA'larının relatif ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Kullanılan yöntemler 2.2.3 bölümünde anlatılmıştır.

Bu çalışma grubunda, yaş ortalamasının, XFG grubundaki hastalarda 71.4 ± 7.9 , XFS grubundaki hastalarda 75.0 ± 5.2 ve kontrol grubundaki bireylerde 69.4 ± 11.2 olduğu ve aralarında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür ($P = .16$). Cinsiyet değişkenine bakıldığında erkeklerin oranının, XFG grubunda %70.4, XFS grubunda %52.0 ve kontrol grubunda %44.4 olduğu ve aralarında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür ($P = .14$).

Çizelge 3. 12: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin göz parametreleri ile ilişkisi.

| Parametreler | <i>mir-196a-2</i> rs11614913 C/T | XFG | XFS | Kontrol | P^A | P^B | P^C | P^D |
|--------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|
| GİB | Resesif model TC & CC | 21.32 ± 4.77 | 19.91 ± 5.21 | 19.94 ± 5.73 | .001 | .65 | .001 | .002 |
| | TT | 22.02 ± 5.38 | 21.03 ± 6.59 | 18.67 ± 5.06 | .01 | .11 | .002 | .18 |
| | P^E | .54 | .69 | .20 | | | | |
| | Dominant model CC | 21.06 ± 4.38 | 19.70 ± 4.46 | 19.50 ± 5.53 | .01 | .36 | .004 | .006 |
| | TT & TC | 21.70 ± 5.17 | 20.32 ± 5.97 | 19.80 ± 5.68 | .001 | .45 | .001 | .05 |
| | P^F | .61 | .90 | .86 | | | | |
| VFS | Resesif model TC & CC | 2.63 ± 0.80 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | <.001 | >.99 | <.001 | <.001 |
| | TT | 2.69 ± 0.95 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | <.001 | >.99 | <.001 | <.001 |
| | P^E | .98 | >.99 | >.99 | | | | |
| | Dominant model CC | 2.68 ± 0.73 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | <.001 | >.99 | <.001 | <.001 |
| | TT & TC | 2.61 ± 0.88 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | <.001 | >.99 | <.001 | <.001 |
| | P^F | .15 | >.99 | >.99 | | | | |
| MD | Resesif model TC & CC | -6.68 ± 5.77 | -0.98 ± 0.54 | -0.96 ± 0.57 | <.001 | .10 | <.001 | <.001 |
| | TT | -6.83 ± 6.64 | -0.90 ± 0.58 | -0.92 ± 0.56 | <.001 | .56 | <.001 | <.001 |
| | P^E | .36 | .60 | .77 | | | | |
| | Dominant model CC | -6.70 ± 4.74 | -1.01 ± 0.52 | -0.96 ± 0.56 | <.001 | .28 | <.001 | <.001 |
| | TT & TC | -6.71 ± 6.57 | -0.95 ± 0.56 | -0.94 ± 0.57 | <.001 | .12 | <.001 | <.001 |
| | P^F | .36 | .62 | .68 | | | | |

Çizelge 3. 12: (devam) *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin göz parametreleri ile ilişkisi.

| Parametreler | <i>mir-196a-2</i> rs11614913 C/T | XFG | XFS | Kontrol | P^A | P^B | P^C | P^D |
|--|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------|-------|-------|-------|
| PSD | Resesif model TC & CC | 4.90 ± 2.81 | 1.45 ± 0.23 | 1.45 ± 0.24 | <.001 | .28 | <.001 | <.001 |
| | TT | 5.12 ± 3.61 | 1.48 ± 0.23 | 1.40 ± 0.24 | <.001 | .048 | <.001 | <.001 |
| | P^E | .63 | .27 | .29 | | | | |
| | Dominant model CC | 5.15 ± 2.75 | 1.42 ± 0.23 | 1.44 ± 0.23 | <.001 | .99 | <.001 | <.001 |
| | TT & TC | 4.81 ± 3.09 | 1.47 ± 0.22 | 1.44 ± 0.24 | <.001 | .02 | <.001 | <.001 |
| | P^F | .24 | .12 | .82 | | | | |
| <p>GİB: göz içi basıncı, VFS: görme alanı skoru, MD: mean deviasyon, PSD: pattern standart deviasyon. Parametre değerleri ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir. ^AÜç grubun, ^BXFS vs. kontrol, ^CXFG vs. kontrol ve ^DXFS vs. XFG arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir. Üçlü karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmalarda Conover formülü kullanılmıştır. ^EResesif model, ^FDominant model. İkili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.</p> | | | | | | | | |

3.2.2 Hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p miRNA'larının plazma relatif ekspresyon seviyeleri

3.2.2.1 Hsa-miR-146a-5p'nin plazma relatif ekspresyon seviyesi

Hsa-miR-146a-5p'nin relatif ekspresyon seviyesi hesaplama yöntemi 2.2.3.5 bölümünde verilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, XFG grubundaki hastalarda 3.94 ± 3.50 , XFS grubundaki hastalarda 2.70 ± 1.99 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.11 ± 0.64 olduğu tespit edilmiştir. 3 grup arasındaki karşılaştırma için Kruskal-Wallis testi, ikili gruplar arasında karşılaştırma yapmak için ise Conover formülü kullanılmıştır. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu görülmüştür (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFS vs. kontrol: $P = .001$) (Çizelge 3.13) (Şekil 3.1).

Çizelge 3. 13: XFG, XFS ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-146a-5p'nin relatif ekspresyon seviyesi (fold change).

| | XFG (n=27) | XFS (n=25) | Kontrol (n=27) | P |
|-------------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|---|
| Ortalama \pm SD | 3.94 \pm 3.50 | 2.70 \pm 1.99 | 1.11 \pm 0.64 | <.001 ^a .001 ^b <.001 ^c .10 ^d |
| Medyan (Q1-Q3) | 3.41 (0.59-18.94) | 2.16 (0.57-7.13) | 0.95 (0.35-2.92) | |

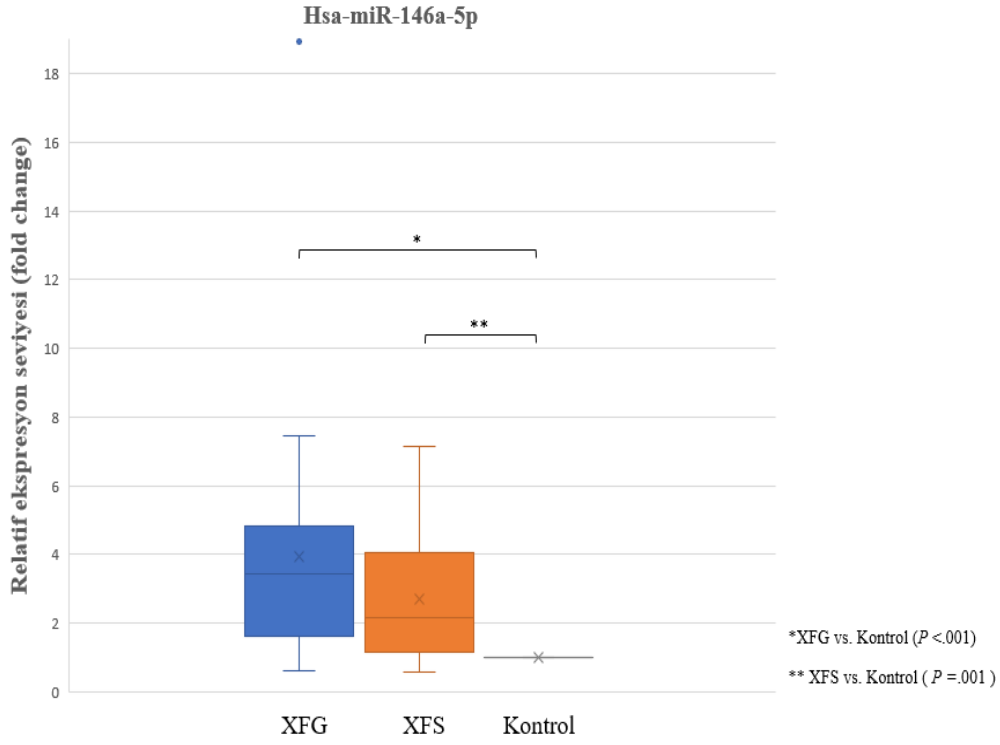
Relatif ekspresyon seviyeleri ortalama \pm standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir.

Üçlü gruplar arasında karşılaştırma Kruskal-Wallis testi ile hesaplanmıştır. İkili gruplar arasında karşılaştırma ise Conover formülü ile hesaplanmıştır.

^a3 grubun, ^bXFS vs. kontrol, ^cXFG vs. kontrol ve ^dXFG vs. XFS arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir

3.2.2.2 Hsa-miR-196a-5p'nin plazma relatif ekspresyon seviyesi

Hsa-miR-196a-5p'nin relatif ekspresyon seviyesi hesaplama yöntemi 2.2.3.5 bölümünde verilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, XFG grubundaki hastalarda 1.78 ± 1.99 , XFS grubundaki hastalarda 2.48 ± 2.70 ve kontrol grubundaki bireylerde 0.98 ± 0.99 olduğu tespit edilmiştir. 3 grup arasındaki karşılaştırma için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Üç grup arasında anlamlı ölçüde farklılık olmadığı ($P = .23$) görülmüştür (Çizelge 3.14) (Şekil 3.2).



Şekil 3. 1: XFG, XFS ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-146a-5p'nin relatif ekspresyon seviyesi (fold change) (kontrol grubunun relatif ekspresyon seviyesi 1 kabul edilerek grafik oluşturulmuştur).

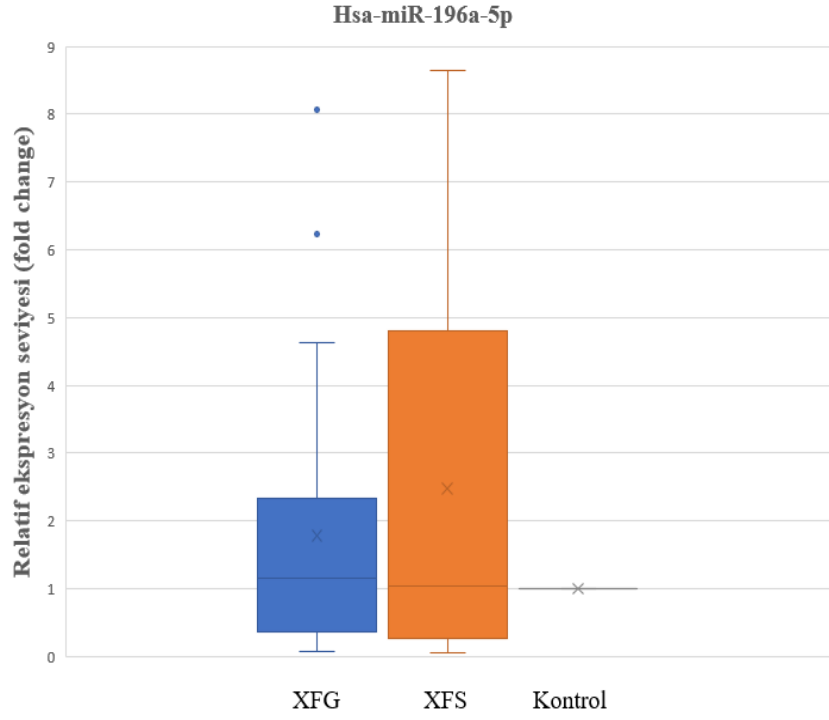
Çizelge 3.14: XFG, XFS ve Kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-196a-5p'nin relatif ekspresyon seviyesi (fold change).

| | XFG (n=27) | XFS (n=25) | Kontrol (n=27) | P |
|-----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|------------------|
| Ortalama ± SD | 1.78 ± 1.99 | 2.48 ± 2.70 | 0.98 ± 0.99 | .23 ^a |
| Medyan (Q1-Q3) | 1.15 (0.07-8.06) | 1.03 (0.05-8.65) | 0.83 (0.06-4.16) | |

Relatif ekspresyon seviyeleri ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir.

Üçlü gruplar arasında karşılaştırma Kruskal-Wallis testi ile hesaplanmıştır.

^a3 grubun arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir.



Şekil 3. 2: XFG, XFS ve kontrol gruplarındaki plazma hsa-miR-196a-5p'nın relatif ekspresyon seviyesi (fold change) (kontrol grubunun relatif ekspresyon seviyesi 1 kabul edilerek grafik oluşturulmuştur).

3.2.3 *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a* rs11614913 C/T genotipleri ile hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyelerinin birlikte analizi

3.2.3.1 *mir-146a* rs2910164 G/C genotipleri ile hsa-miR-146a-5p plazma relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) birlikte analizi

XFG, XFS ve kontrol gruplarındaki kişilerin hsa-miR-146a-5p plazma relatif ekspresyon seviyeleri *mir-146a* rs2910164 G/C genotiplerine göre gruplandırılarak incelenmiştir. 3 grup arasındaki karşılaştırma için Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. 3 grup arasında istatistikî değerlendirilmede anlamlı ölçüde farklılık izlendiğinde, ikili gruplar arasında karşılaştırma yapmak için Conover formülü kullanılmıştır. CC genotipi sadece iki grupta görünmüştür. Bundan dolayı iki grup arasındaki karşılaştırma için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

Grupların, GG, GC ve CC genotiplerinde resesif (CC vs. GC & GG) ve dominant (CC & GC vs. GG) modele göre ekspresyon seviyelerinin analizi yapılmıştır. İkili karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

İstatistiksel analiz sonucunda hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, GG genotipli XFG grubundaki hastalarda 4.31 ± 3.86 , XFS grubundaki hastalarda 2.60 ± 2.14 ve kontrol grubundaki bireylerde 0.98 ± 0.65 olduğu görülmüştür. Bazı gruplar arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir (üç grup arasında: $P < .001$, XFG vs. kontrol: $P < .001$, XFS vs. kontrol: $P = .002$, XFG vs. XFS: $P = .04$).

Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, GC genotipli XFG grubundaki hastalarda 2.64 ± 1.13 , XFS grubundaki hastalarda 2.81 ± 1.76 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.30 ± 0.66 olduğu görülmüştür. XFG ile kontrol grupları arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu belirlenmiştir ($P = .02$). Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, CC genotipli XFS grubundaki 1 hastada 3.95 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.02 ± 0.50 olduğu görülmüştür. İki grup arasında anlamlı ölçüde farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P = .22$).

Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, gruplarda, resesif ve dominant modellerde anlamlı ölçüde farklı olmadığı tespit edilmiştir (resesif model: XFS: $P = .41$ ve kontrol: $P > .99$; dominant model: XFG: $P = .29$, XFS: $P = .55$ ve kontrol: $P = .17$) (Çizelge 3.15) (Şekil 3.3).

3.2.3.2 mir-196a-2 Rs11614913 C/T genotipleri ile hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) birlikte analizi

XFG, XFS ve kontrol gruplarındaki kişilerin hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyeleri *mir-196a-2* rs11614913 C/T genotiplerine göre gruplandırılarak incelenmiştir. Genotiplerin, XFG, XFS ve kontrol gruplarındaki ekspresyon seviyelerinin analizi yapılmıştır. 3 grup arasındaki karşılaştırma için Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. İkili gruplar arasında karşılaştırma yapmak için Conover formülü kullanılmıştır

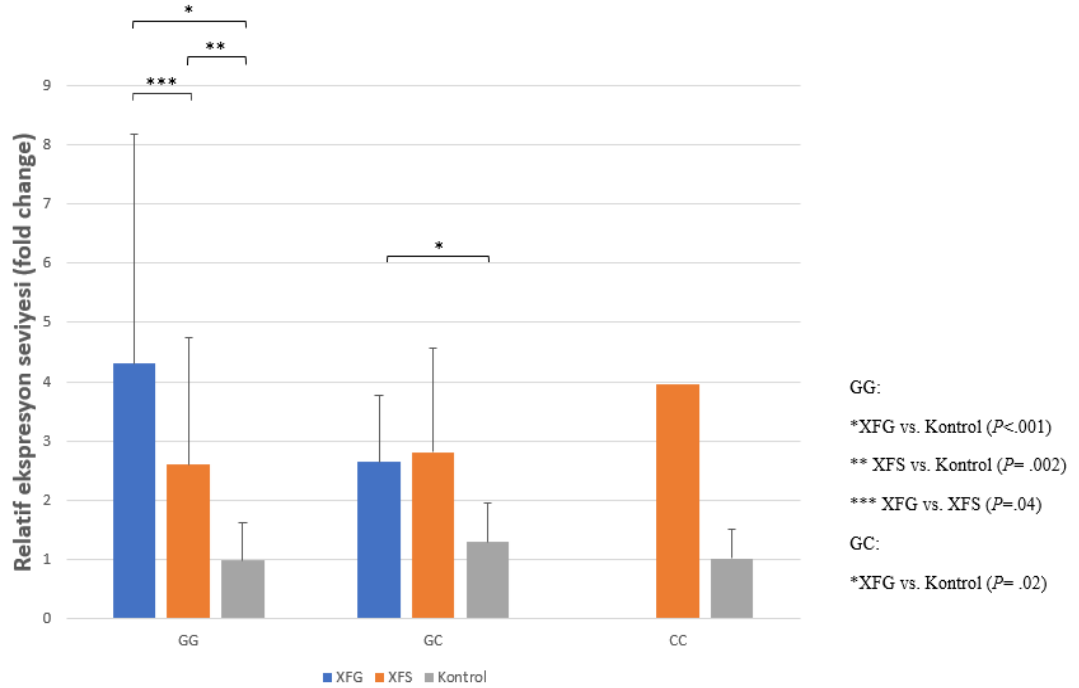
Grupların, CC, TC ve TT genotiplerinde resesif (TT vs. TC & CC) ve dominant (TT & TC vs. CC) modele göre ekspresyon seviyelerinin analizi yapılmıştır. İkili karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır

Çizelge 3. 15: *mir-146a* rs2910164 G/C genotipleri ile plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) karşılaştırma analizi.

| <i>mir-146a</i> rs2910164 G/C | XFG (n=27) | XFS (n=25) | Kontrol (n=27) | <i>P</i> ^A | <i>P</i> ^B | <i>P</i> ^C | <i>P</i> ^D |
|---|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| GG (XFG n= 21, XFS n= 18, Kontrol n= 14) | 4.31 ± 3.86 3.91 (0.59- 18.94) | 2.60 ± 2.14 1.58 (0.57- 7.13) | 0.98 ± 0.65 0.74 (0.35- 2.92) | <.001 | .002 | <.001 | .04 |
| GC (XFG n= 6, XFS n= 6, Kontrol n= 11) | 2.64 ± 1.13 2.66 (1.40- 4.03) | 2.81 ± 1.76 2.66(0.90- 5.46) | 1.30 ± 0.66 1.11 (0.52- 2.84) | .05 | .06 | .02 | .67 |
| CC (XFG n= 0, XFS n= 1, Kontrol n= 2) | - | 3.95 | 1.02 ± 0.50 1.02 (0.67- 1.37) | | .22 ^x | | |
| <i>P</i> [*] | | .41 | >.99 | | | | |
| <i>P</i> ^{**} | .29 | .55 | .17 | | | | |

Relatif ekspresyon seviyeleri ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir.
^A 3 grubun, ^B XFS vs. kontrol, ^C XFG vs. kontrol ve ^D XFG vs. XFS arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir.
Üçlü karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testleri kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalarda Conover formülü kullanılmıştır.
*Resesif modelin: CC vs. GC & GG, **dominant modelin: CC & GC vs. GG karşılaştırmasını göstermektedir.
Karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.
^xMann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Hsa-miR-146a-5p



Şekil 3. 3: *mir-146a* rs2910164 G/C genotipleri ile plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) birlikte incelenmesi.

İstatistiksel analiz sonucunda hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, CC genotipli XFG grubundaki hastalarda 2.61 ± 2.54 , XFS grubundaki hastalarda 1.68 ± 2.36 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.18 ± 1.35 olduğu görülmüştür. Üç grup arasında anlamlı ölçüde farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P=.40$).

Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, TC genotipli XFG grubundaki hastalarda 1.23 ± 1.56 , XFS grubundaki hastalarda 2.90 ± 3.06 ve kontrol grubundaki bireylerde 0.79 ± 0.60 olduğu görülmüştür. Üç grup arasında anlamlı ölçüde farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P=.19$).

Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, TT genotipli XFG grubundaki hastalarda 1.78 ± 0.16 , XFS grubundaki hastalarda 3.70 ± 1.07 ve kontrol grubundaki bireylerde 7.28 ± 0.00 olduğu görülmüştür. Üç grup arasında anlamlı ölçüde farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P=.17$).

Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, gruplarda, resesif ve dominant modellerde anlamlı ölçüde farklı olmadığı tespit edilmiştir (resesif model: XFG: $P=.46$, XFS: $P=.32$ ve kontrol: $P=.52$; dominant model: XFG: $P=.27$, XFS: $P=.09$ ve kontrol: $P=.88$) (Çizelge 3.16) (Şekil 3.4).

3.3 Plazma hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p Relatif Ekspresyon Seviyeleri (Fold Change) ile Bazı Risk Faktörlerinin Korelasyon Analizi

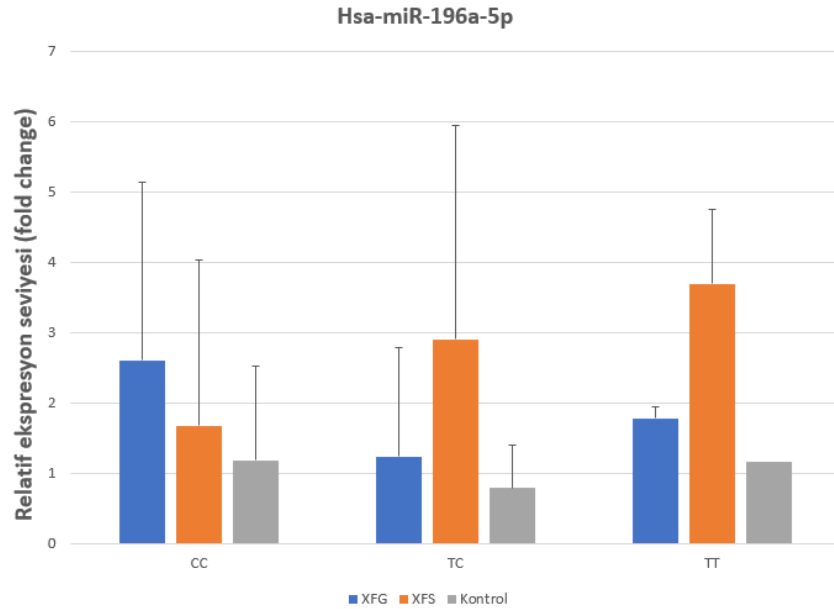
Plazma örneği toplanan hastalarda, yaş, GİB, VFS, MD, PSD, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ve hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi için korelasyon analizleri yapılmıştır. XFG (n=27), XFS (n=25) ve kontrol (n=27) gruplarında birlikte (Çizelge 3.17) ve tek tek (Çizelge 3.18, 3.19 ve 3.20) korelasyon analizleri yapılmıştır.

Tüm gruplarda birlikte yapılan korelasyon analiz sonucunda, VFS ile PSD ($r=.961$, $P=.009$) arasında korelasyonun pozitif olduğu görülürken VFS ile MD ($r=-.928$, $P=.02$) arasında korelasyonun negatif olduğu görülmüştür. Yaş, GİB, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) ve hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile herhangi bir başka parametre arasında korelasyon görülmemiştir (Çizelge 3.17).

Çizelge 3.16: *mir-196a-2* rs11614913 C/T genotipleri ile hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) karşılaştırma analizi.

| <i>mir-196a-2</i> rs11614913 C/T | XFG (n=27) | XFS (n=25) | Kontrol (n=27) | <i>P</i> ^A | <i>P</i> ^B | <i>P</i> ^C | <i>P</i> ^D |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| CC (XFG n= 10, XFS n= 10, Kontrol n= 12) | 2.61 ± 2.54 2.19 (0.07- 8.06) | 1.68 ± 2.36 0.39 (0.05- 6.48) | 1.18 ± 1.35 0.81 (0.06- 4.16) | .40 | .86 | .28 | .23 |
| TC (XFG n= 15, XFS n= 13, Kontrol n= 14) | 1.23 ± 1.56 0.70 (0.11- 6.23) | 2.90 ± 3.06 1.37 (0.10- 8.65) | 0.79 ± 0.60 0.76 (0.08- 1.76) | .19 | .08 | .58 | .20 |
| TT (XFG n= 2, XFS n= 2, Kontrol n= 1) | 1.78 ± 0.16 1.78 (1.67- 1.90) | 3.70 ± 1.07 3.70 (2.94- 4.45) | 7.28 | .17 | .06 | .23 | .11 |
| <i>P</i> [*] | .46 | .32 | .52 | | | | |
| <i>P</i> ^{**} | .27 | .09 | .88 | | | | |

Relatif ekspresyon seviyeleri ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir.
^A 3 grubun, ^B XFS vs. kontrol, ^C XFG vs. kontrol ve ^D XFG vs. XFS arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir.
Üçlü karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testleri kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalarda Conover formülü kullanılmıştır.
*Resesif modelin: CC vs. GC & GG, **dominant modelin: CC & GC vs. GG karşılaştırmasını göstermektedir.
Karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.



Şekil 3. 4: *mir-196a-2* rs11614913 C/T genotipleri ile plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) birlikte incelenmesi.

XFG grubunda yapılan korelasyon analizi sonucunda, yaş ile VFS ($r=-.981$, $P=.02$) yaş ile PSD ($r=-.606$, $P=.048$), VFS ile MD ($r=-.972$, $P=.03$) arasında korelasyonun negatif olduğu görülmüştür. GİB, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) ve hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile herhangi bir başka parametre arasında korelasyon görülmemiştir (Çizelge 3.18).

XFS grubunda yapılan korelasyon analizi sonucunda, parametreler arasında korelasyon görülmemiştir (Çizelge 3.19).

Kontrol grubunda yapılan korelasyon analizi sonucunda, yaş ile hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) ($r=.546$, $P=.003$), MD ile yaş ($r=1.000$, $P<.001$), PSD ile yaş ($r=1.000$, $P<.001$), PSD ile MD ($r=1.000$, $P<.001$), hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile MD ($r=1.000$, $P<.001$), hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile PSD ($r=1.000$, $P<.001$), hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile MD ($r=-1.000$, $P<.001$), hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) ile PSD ($r=-1.000$, $P<.001$) arasında korelasyonun negatif olduğu görülmüştür. GİB ile herhangi bir başka parametre arasında korelasyon görülmemiştir (Çizelge 3.20).

3.4 Lojistik Regresyon Analizleri

Tüm parametrelerin hastalıklarla olan ilişkisi lojistik regresyon analizi ile bir arada incelenmiştir. İki durumlu lojistik regresyon (binary logistic regression) analizi yapılarak tüm modellerde geriye doğru seçim (backward: LR) metodu kullanılmıştır. Yapılan tüm iki durumlu lojistik regresyon analizlerinde parametrelerin XFG ile kontrol, XFS ile kontrol ve XFG ile XFS gruplarında olan ilişkisine bakılmıştır. Tüm analizlerde iki durumlu lojistik regresyondan önce eş lineerlik istatistiği (collinearity statistics) yapılmıştır. Yapılan tüm analizlerde değişkenler arasında eş lineerlik görülmediğinden bağımsız değişkenlerin hepsi birlikte modellere eklenmiştir.

Analizler için 2 ana model oluşturulmuştur. Model 1 genotipleme için kullanılan tüm bireylerden oluşurken, Model 2 plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan tüm bireylerden oluşmaktadır. Her ana modelde genotipler için dominantlık ve resesiflik durumu varsayılarak alt modeller oluşturulmuştur. Model 1.1, genotipleme için kullanılan tüm bireylerde dominant modeli, Model 1.2 ise resesif modeli ifade etmektedir.

Çizelge 3. 17: Tüm gruplarda hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyelerinin (fold change) bazı risk faktörleri ile korelasyonu.

| | | Yaş | GİB | VFS | MD | PSD | Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi |
|--|---------------------------------------|--------------|--------------|----------------|---------------|----------------|---|---|
| Yaş | Pearson Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | 1 | -.059 .73 | -.303 .62 | .046 .86 | -.068 .79 | .088 .44 | .030 .79 |
| GİB | Pearson Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | -.059 .73 | 1 | .670 .22 | -.259 .44 | .471 .14 | .066 .70 | .076 .66 |
| VFS | Pearson Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | -.303 .62 | .670 .22 | 1 | -.928* .02 | .961** .009 | .512 .38 | .402 .50 |
| MD | Pearson Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | .046 .86 | -.259 .44 | -.928* .02 | 1 | -.347 .16 | -.095 .71 | .030 .91 |
| PSD | Pearson Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | -.068 .79 | .471 .14 | .961** .009 | -.347 .16 | 1 | .052 .84 | .129 .61 |
| Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Pearson Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | .088 .44 | .066 .70 | .512 .38 | -.095 .71 | .052 .84 | 1 | .063 .58 |
| Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Pearson Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | .030 .79 | .076 .66 | .402 .50 | .030 .91 | .129 .61 | .063 .58 | 1 |

* Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).
** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Çizelge 3.18: XFG hastalarında hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyelerinin (fold change) bazı risk faktörleri ile korelasyonu.

| | | Yaş | GİB | VFS | MD | PSD | Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi |
|--|---------------------|--------|-------|--------|--------|--------|---|---|
| Yaş | Pearson Korelasyonu | 1 | -.192 | -.981* | .381 | -.606* | -.032 | .122 |
| | Sig. (2-yönlü) | | .45 | .02 | .25 | .048 | .87 | .55 |
| GİB | Pearson Korelasyonu | -.192 | 1 | .000 | -.086 | .444 | -.094 | .141 |
| | Sig. (2-yönlü) | .45 | | >.99 | .84 | .27 | .71 | .58 |
| VFS | Pearson Korelasyonu | -.981* | .000 | 1 | -.972* | .938 | -.432 | .312 |
| | Sig. (2-yönlü) | .02 | >.99 | | .03 | .06 | .57 | .69 |
| MD | Pearson Korelasyonu | .381 | -.086 | -.972* | 1 | .127 | .334 | .243 |
| | Sig. (2-yönlü) | .25 | .84 | .03 | | .71 | .32 | .47 |
| PSD | Pearson Korelasyonu | -.606* | .444 | .938 | .127 | 1 | -.355 | -.094 |
| | Sig. (2-yönlü) | .048 | .27 | .06 | .71 | | .28 | .78 |
| Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Pearson Korelasyonu | -.032 | -.094 | -.432 | .334 | -.355 | 1 | -.067 |
| | Sig. (2-yönlü) | .87 | .71 | .57 | .32 | .28 | | .74 |
| Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Pearson Korelasyonu | .122 | .141 | .312 | .243 | -.094 | -.067 | 1 |
| | Sig. (2-yönlü) | .55 | .58 | .69 | .47 | .78 | .74 | |

* Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Çizelge 3.19: XFS hastalarında hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyelerinin (fold change) bazı risk faktörleri ile korelasyonu.

| | | Yaş | GİB | MD | PSD | Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi |
|--|--|--------------|--------------|--------------|--------------|---|---|
| Yaş | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | 1 | .242 .47 | -.200 .75 | .000 >.99 | .185 .38 | -.230 .27 |
| GİB | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | .242 .47 | 1 | -.866 .33 | .866 .33 | .046 .89 | -.197 .56 |
| MD | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | -.200 .75 | -.866 .33 | 1 | -.800 .10 | -.700 .19 | -.100 .87 |
| PSD | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | .000 >.99 | .866 .33 | -.800 .10 | 1 | .300 .62 | -.100 .87 |
| Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | .185 .38 | .046 .89 | -.700 .19 | .300 .62 | 1 | .055 .79 |
| Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | -.230 .27 | -.197 .56 | -.100 .87 | -.100 .87 | .055 .79 | 1 |

Çizelge 3.20: Kontrol grubu bireylerinde hsa-miR-146a-5p ve hsa-miR-196a-5p plazma relatif ekspresyon seviyelerinin (fold change) bazı risk faktörleri ile korelasyonu.

| | | Yaş | GİB | MD | PSD | Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi |
|--|--|------------------|--------------|-------------------|-------------------|---|---|
| Yaş | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | 1 | -.608 .11 | 1.000 . | 1.000 . | .546** .003 | -.081 .69 |
| GİB | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | -.608 .11 | 1 | . . | . . | .132 .76 | -.467 .24 |
| MD | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | 1.000** <.001 | . . | 1 | 1.000 | 1.000 | -1.000 |
| PSD | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | 1.000** <.001 | . . | 1.000** <.001 | 1 | 1.000 | -1.000 |
| Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | .546** .003 | .132 .76 | 1.000** <.001 | 1.000** <.001 | 1 | .106 .60 |
| Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi | Spearman's rho Korelasyonu Sig. (2-yönlü) | -.081 .69 | -.467 .24 | -1.000** <.001 | -1.000** <.001 | .106 .60 | 1 |

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Model 2.1 relatif ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan tüm bireylerde dominant modeli, Model 2.2 ise resesif modeli ifade etmektedir. Her alt modelde XFG ile kontrol, XFS ile kontrol ve XFG ile XFS grupları arasındaki analiz için bir alt model daha oluşturulmuştur. Model 1.1.1 genotipleme için kullanılan tüm bireylerde dominant modelde XFG ile kontrol arasındaki modeli, Model 1.1.2 yine dominant modelde XFS ile kontrol arasındaki modeli ve Model 1.1.3 yine dominant modelde XFG ile XFS arasındaki modeli ifade etmektedir. Model 1.2.1 genotipleme için kullanılan tüm bireylerde resesif modelde XFG ile kontrol arasındaki modeli, Model 1.2.2 yine resesif modelde XFS ile kontrol arasındaki modeli ve Model 1.2.3 yine resesif modelde XFG ile XFS arasındaki modeli ifade etmektedir. Model 2.1.1 relatif ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan tüm bireylerde dominant modelde XFG ile kontrol arasındaki modeli, Model 2.1.2 yine dominant modelde XFS ile kontrol arasındaki modeli ve Model 2.1.3 yine dominant modelde XFG ile XFS arasındaki modeli ifade etmektedir. Model 2.2.1 relatif ekspresyon seviyesi belirlemek için kullanılan tüm bireylerde resesif modelde XFG ile kontrol arasındaki modeli, Model 2.2.2 yine resesif modelde XFS ile kontrol arasındaki modeli ve Model 2.2.3 yine resesif modelde XFG ile XFS arasındaki modeli ifade etmektedir (Çizelge 3.21).

Model 1 ve alt modellerinde kategorik değişken olan cinsiyet, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara ve inme parametreleri, analizde kategorik değişken olarak işaretlenerek bağımsız değişken olarak seçilmiştir. Kategorik değişken olmayan yaş, GİB, VFS, MD ve PSD parametreleri de bağımsız değişken olarak seçilmiştir. Model 2 ve alt modellerinde cinsiyet, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara ve inme parametreleri analizde kategorik değişken olarak işaretlenerek bağımsız değişken olarak seçilmiştir. Model 2 ve alt modellerindeki gruplarda GİB, VFS, MD ve PSD parametrelerine dair verilerde eksiklik olduğu için analizleri yapılmamıştır. Bu model ve alt modellerinde, model 1 ve alt modellerine ilaveten hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ve hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi parametreleri analiz edilmiştir. Kategorik değişken olmayan yaş, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi, ve hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi parametreleri de bağımsız değişken olarak

seçilmiştir. Bu modellerin uygunluğu ve güvenilirliği Hosmer–Lemeshow goodness of fit testi ile incelenmiştir.

Çizelge 3.21: Lojistik regresyon analizleri için oluşturulan modeller.

| Ana Modeller | Birinci alt modeller | İkinci alt modeller |
|---|--|--|
| <p>Model 1 (genotipleme grubu) Bağımsız değişkenler:</p> <p>yaş, cinsiyet, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara, inme, GİB, VFS, MD, PSD, <i>mir-146a</i> rs2910164 genotipleri, <i>mir-196a-2</i> rs11614913 genotipleri</p> | <p>Model 1.1 (dominant model)</p> | <p>Model 1.1.1 (XFG ve kontrol grubu arasındaki analiz)</p> |
| | | <p>Model 1.1.2 (XFS ve kontrol grubu arasındaki analiz)</p> |
| | | <p>Model 1.1.3 (XFG ve XFS grubu arasındaki analiz)</p> |
| | <p>Model 1.2 (resesif model)</p> | <p>Model 1.2.1 (XFG ve kontrol grubu arasındaki analiz)</p> |
| | | <p>Model 1.2.2 (XFS ve kontrol grubu arasındaki analiz)</p> |
| | | <p>Model 1.2.3 (XFG ve XFS grubu arasındaki analiz)</p> |
| <p>Model 2 (plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi incelenen grup) Bağımsız değişkenler:</p> <p>yaş, cinsiyet, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara, inme, <i>mir-146a</i> rs2910164 genotipleri, <i>mir-196a-2</i> rs11614913 genotipleri, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi</p> | <p>Model 2.1 (dominant model)</p> | <p>Model 2.1.1 (XFG ve kontrol grubu arasındaki analiz)</p> |
| | | <p>Model 2.1.2 (XFS ve kontrol grubu arasındaki analiz)</p> |
| | | <p>Model 2.1.3 (XFG ve XFS grubu arasındaki analiz)</p> |
| | <p>Model 2.2 (resesif model)</p> | <p>Model 2.2.1 (XFG ve kontrol grubu arasındaki analiz)</p> |
| | | <p>Model 2.2.2 (XFS ve kontrol grubu arasındaki analiz)</p> |
| | | <p>Model 2.2.3 (XFG ve XFS grubu arasındaki analiz)</p> |

3.4.1 Model 1: Genotipleme kısmında kullanılan tüm bireylerin regresyon analizi

Genotipleme kısmında kullanılan XFG (n=260), XFS (n=260) ve kontrol (n=295) gruplarındaki tüm bireylerle model 1 oluşturulmuştur. Model 1.1 dominant modeli ifade ederken, Model 1.2 resesif modeli ifade etmektedir.

Model 1.1: Genotipleme kısmında kullanılan tüm bireylerde dominant genetik model

Bu modelde genotipleri iki durumlu değişken (binary) haline getirmek için dominant genetik modele uydukları varsayılmıştır. miR146a rs2910164 için polimorfik CC genotipi ile GC genotipi riskli (1), GG genotipi risksiz (0) olarak kodlanırken; miR196a2 rs11614913 için polimorfik TT genotipi ile TC genotipi riskli (1), CC genotipi ise risksiz (0) olarak kodlanmıştır. Model 1.1.1, dominant modelde XFG ve kontrol grupları arasındaki analizi; Model 1.1.2, dominant modelde XFS ve kontrol grupları arasındaki analizi ve Model 1.1.3, dominant modelde XFG ve XFS grupları arasındaki analizi göstermektedir.

Model 1.1.1: Genotipleme kısmında kullanılan tüm bireylerde dominant modelde XFG ile kontrol grubu arasındaki analiz

Bu modelde, cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara, inme, GİB, VFS, MD, PSD parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFG ile kontrol grupları bağımlı değişken olarak atanmıştır. Parametrelerin hiçbiri XFG ile ilişkili bulunmamıştır. Bu modelde hastaların %100'ü doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=.000$, 1 df, $P=.99$).

Model 1.1.2: Genotipleme kısmında kullanılan tüm bireylerde dominant modelde XFS ile kontrol grubu arasındaki analiz.

Bu modelde, cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara, inme, GİB, VFS, MD, PSD parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFS ile kontrol grupları bağımlı değişken olarak atanmıştır. Parametrelerin hiçbiri XFS ile ilişkili bulunmamıştır. Bu modelde hastaların %51.2'si doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=6.414$, 8 df, $P=.60$).

Model 1.1.3: Genotipleme kısmında kullanılan tüm bireylerde dominant modelde XFG ile XFS grubu arasındaki analiz.

Bu modelde, cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara, inme, GİB, VFS, MD, PSD

parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFG ile XFS grupları bağımlı değişken olarak atanmıştır. Parametrelerin hiçbiri XFG ile ilişkili bulunmamıştır. Bu modelde hastaların %100'ü doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=.000$, 7 df, $P=.99$).

Model 1.2: Genotipleme kısmında kullanılan tüm bireylerde resesif genetik model

Bu modelde genotipleri iki durumlu değişken haline getirmek için resesif genetik modele uydukları varsayılmıştır. miR146a rs2910164 için polimorfik CC genotipi riskli (1), GC ve GG genotipleri risksiz (0) olarak kodlanırken, miR196a2 rs11614913 için polimorfik TT genotipi riskli (1), TC ve CC genotipleri risksiz (0) olarak kodlanmıştır. Model 1.2.1 dominant modelde XFG ve kontrol grupları arasındaki analizi, Model 1.2.2 dominant modelde XFS ve kontrol grupları arasındaki analizi ve Model 1.2.3 dominant modelde XFG ve XFS grupları arasındaki analizi göstermektedir.

Model 1.2.1: Genotipleme kısmında kullanılan tüm bireylerde resesif modelde XFG ile kontrol grubu arasındaki analiz.

Bu modelde, cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara, inme, GİB, VFS, MD, PSD parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFG ile kontrol grupları bağımlı değişken olarak atanmıştır. Parametrelerin hiçbiri XFG ile ilişkili bulunmamıştır. Bu modelde hastaların %100'ü doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=.000$, 1 df, $P=.99$).

Model 1.2.2: Genotipleme kısmında kullanılan tüm bireylerde resesif model XFS ile kontrol grubu arasındaki analiz.

Bu modelde, cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara, inme, GİB, VFS, MD, PSD parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFS ile kontrol grupları bağımlı değişken olarak atanmıştır. Parametrelerin hiçbiri XFS ile ilişkili bulunmamıştır. Bu modelde hastaların %51.2'i doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=6.414$, 8 df, $P=.60$).

Model 1.2.3: Genotipleme kısmında kullanılan tüm bireylerde resesif model XFG ile XFS grubu arasındaki analiz.

Bu modelde, cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara, inme, GİB, VFS, MD, PSD parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFG ile XFS grupları bağımlı değişken olarak atanmıştır. Parametrelerin hiçbiri XFG ile ilişkili bulunmamıştır. Bu modelde hastaların %100'ü doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=.000$, 1 df, $P=.99$).

3.4.2 Model 2: Plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi belirleme kısmında kullanılan tüm bireylerin regresyon analizi

Relatif ekspresyon seviyesi belirleme kısmında kullanılan XFG (n=27), XFS (n=25) ve kontrol (n=27) gruplarındaki tüm bireylerle model 2 oluşturulmuştur. Model 2.1 dominant modeli oluştururken model 2.2 resesif modeli oluşturmaktadır.

Model 2.1: Plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi belirleme kısmında kullanılan tüm bireylerde dominant genetik model

Bu modelde genotipleri iki durumlu değişken haline getirmek için dominant genetik modele uydukları varsayılmıştır. miR146a rs2910164 için polimorfik CC genotipi ile GC genotipi riskli (1), GG genotipi risksiz (0) olarak kodlanırken; miR196a2 rs11614913 için polimorfik TT genotipi ile TC genotipi riskli (1), CC genotipi ise risksiz (0) olarak kodlanmıştır. Model 2.1.1, dominant modelde XFG ve kontrol grupları arasındaki analizi; Model 2.1.2, dominant modelde XFS ve kontrol grupları arasındaki analizi ve Model 2.1.3, dominant modelde XFG ve XFS grupları arasındaki analizi göstermektedir.

Model 2.1.1: Plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi belirleme kısmında kullanılan tüm bireylerde dominant modelde XFG ile kontrol grubu arasındaki analiz.

Bu modelde cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara ve inme parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFG ile kontrol grupları bağımlı

değişken olarak atanmıştır. Analiz sonunda plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG olma durumu ile yaklaşık 6 kat ilişkili olduğu tespit edilmiştir (OR=5.826, %95 CI=2.121-16.006, $P=.001$). Bu modelde hastaların %83.3'ü doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=2.381$, 8 df, $P=.97$) (Çizelge 3.22).

Model 2.1.2: Plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi belirleme kısmında kullanılan tüm bireylerde dominant modelde XFS ile kontrol grubu arasındaki analiz.

Bu modelde cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara ve inme parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFS ile kontrol grupları bağımlı değişken olarak atanmıştır. Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile yaklaşık 4 kat ilişkili olduğu belirlenmiştir (OR=3.585, %95 CI=1.481-8.673, $P=.005$). Bu modelde hastaların %80.8'i doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=7.047$, 8 df, $P=.53$) (Çizelge 3.22).

Model 2.1.3: Plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi belirleme kısmında kullanılan tüm bireylerde dominant modelde XFG ile XFS grubu arasındaki analiz.

Bu modelde, cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara ve inme parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFG ile XFS grupları bağımlı değişken olarak atanmıştır. Parametrelerin hiçbiri XFG ile ilişkili bulunmamıştır. Bu modelde hastaların %51.9'u doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=13.480$, 8 df, $P=.10$). (Çizelge 3.22).

Model 2.2: Plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi belirleme kısmında kullanılan tüm bireylerde resesif genetik model

Bu modelde genotipleri iki durumlu değişken haline getirmek için resesif genetik modele uydukları varsayılmıştır. miR146a rs2910164 için polimorfik CC genotipi

riskli (1), GC ve GG genotipleri risksiz (0) olarak kodlanırken, miR196a2 rs11614913 için polimorfik TT genotipi riskli (1), TC ve CC genotipleri risksiz (0) olarak kodlanmıştır. Model 2.2.1 dominant modelde XFG ve kontrol grupları arasındaki analizi, model 2.2.2 dominant modelde XFS ve kontrol grupları arasındaki analizi ve model 2.2.3 dominant modelde XFG ve XFS grupları arasındaki analizi göstermektedir.

Model 2.2.1: Plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi belirleme kısmında kullanılan tüm bireylerde resesif modelde XFG ile kontrol grubu arasındaki analiz.

Bu modelde cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara ve inme parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFG ile kontrol grupları bağımlı değişken olarak atanmıştır. Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile yaklaşık 5 kat ilişkili olduğu belirlenmiştir (OR=4.874, %95 CI=1.995-11.909, $P=.001$). Bu modelde hastaların %83.3'ü doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=6.398$, 8 df, $P=.60$) (Çizelge 3.22).

Model 2.2.2: Plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi belirleme kısmında kullanılan tüm bireylerde resesif modelde XFS ile kontrol grubu arasındaki analiz.

Bu modelde, cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet, sigara ve inme parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFS ile kontrol grupları bağımlı değişken olarak atanmıştır. Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile yaklaşık 3 kat ilişkili olduğu görülmüştür (OR=2.947, %95 CI=1.353-6.421, $P=.007$). Ayrıca, plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin de XFS olma durumu ile yaklaşık 2 kat ilişkili olduğu sonucu elde edilmiştir (OR=1.518, %95 CI=1.016-2.267, $P=.04$). Bu modelde hastaların %75'i doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=6.398$, 8 df, $P=.60$) (Çizelge 3.22).

Model 2.2.3: Plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesi belirleme kısmında kullanılan tüm bireylerde resesif modelde XFG ile XFS grubu arasındaki analiz.

Bu modelde, cinsiyet, yaş, *mir-146a* rs2910164 genotipleri, *mir-196a-2* rs11614913 genotipleri, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi, hipertansiyon, kalp hastalığı, diyabet ve sigara parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. XFG ile XFS grupları bağımlı değişken olarak atanmıştır. Parametrelerin hiçbiri XFG ile ilişkili bulunmamıştır. Bu modelde hastaların %51.9'u doğru tahmin edilmiştir. Bu modelin lojistik regresyon için uygulanabilir ve güvenilir olduğu görülmüştür ($\chi^2=13.480$, 8 df, $P=.10$) (Çizelge 3.22).

Çizelge 3. 22: Lojistik regresyon analizlerinde anlamlı çıkan sonuçların çizelgesi.

| Model | İlişkili bulunan parametreler | P | OR | CI | Hosmer– Lemeshow goodness of fit testi | | |
|--------------------------|--|------|-------|--------------|--|----|-----|
| | | | | | χ^2 | df | P |
| Model 2.1.1 ^a | XFG ile hsa-miR-146a-5p ekspresyon seviyesi ilişkili bulunmuştur. | .001 | 5.826 | 2.121-16.006 | 2.381 | 8 | .97 |
| Model 2.1.2 ^b | XFS ile hsa-miR-146a-5p ekspresyon seviyesi ilişkili bulunmuştur. | .005 | 3.585 | 1.481-8.673 | 7.047 | 8 | .53 |
| Model 2.2.1 ^c | XFG ile hsa-miR-146a-5p ekspresyon seviyesi ilişkili bulunmuştur | .001 | 4.874 | 1.995-11.909 | 6.390 | 8 | .60 |
| Model 2.2.2 ^d | XFS ile hsa-miR-146a-5p ekspresyon seviyesi ve hsa-miR-196a-5p ekspresyon seviyesi ile ilişkili bulunmuştur. | .007 | 2.947 | 1.353-6.421 | 6.398 | 8 | .60 |
| | | .04 | 1.518 | 1.016-2.267 | | | |

Modeller binary lojistik regresyon yöntemi ile Backward: LR seçilerek yapılmıştır.

^aEkspresyon seviyesi grubunda XFG vs. kontrol karşılaştırması (XFG n=27 ve kontrol n=27).

Genotipler dominant modele göre kodlanarak eklenmiş, *mir-146a* için CC ve GC riskli, GG risksiz ve *mir-196a-2* için TT ve TC riskli, CC risksiz olarak belirlenmiştir. Cinsiyet, yaş, *mir-146a* genotipi, *mir-196a-2* genotipi, hsa-miR-146a-5p ekspresyon seviyesi, hsa-miR-196a-5p ekspresyon seviyesi, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme ve sigara parametreleri dahil edilmiştir.

^bEkspresyon seviyesi grubunda XFS vs. kontrol karşılaştırması (XFS n=25 ve kontrol n=27).

Genotipler dominant modele göre kodlanarak eklenmiş, *mir-146a* için CC ve GC riskli, GG risksiz ve *mir-196a-2* için TT ve TC riskli, CC risksiz olarak belirlenmiştir. Cinsiyet, yaş, *mir-146a* genotipi, *mir-196a-2* genotipi, hsa-miR-146a-5p ekspresyon seviyesi, hsa-miR-196a-5p ekspresyon seviyesi, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme ve sigara parametreleri dahil edilmiştir.

^cEkspresyon seviyesi grubunda XFG vs. kontrol karşılaştırması (XFG n=27 ve kontrol n=27).

Genotipler resesif modele göre kodlanarak eklenmiş, *mir-146a* için CC riskli, GC ve GG risksiz ve *mir-196a-2* için TT riskli, TC ve CC risksiz olarak belirlenmiştir. Cinsiyet, yaş, *mir-146a* genotipi, *mir-196a-2* genotipi, hsa-miR-146a-5p ekspresyon seviyesi, hsa-miR-196a-5p ekspresyon seviyesi, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme ve sigara parametreleri dahil edilmiştir.

Çizelge 3.22 (devam): Lojistik regresyon analizlerinde anlamlı çıkan sonuçların çizelgesi.

^dEkspresyon seviyesi grubunda XFS vs. kontrol karşılaştırması (XFS n=25 ve kontrol n=27). Genotipler resesif modele göre kodlanarak eklenmiş, *miR-146a* için CC riskli, GC ve GG risksiz ve *miR-196a-2* için TT riskli, TC ve CC risksiz olarak belirlenmiştir. Cinsiyet, yaş, *mir-146a* genotipi, *mir-196a-2* genotipi, hsa-miR-146a-5p ekspresyon seviyesi, hsa-miR-196a-5p ekspresyon seviyesi, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme ve sigara parametreleri dahil edilmiştir. Modeller binary lojistik regresyon yöntemi ile Backward: LR seçilerek yapılmıştır

3.5 ROC Analizleri

Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin ve plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ve XFS hastalıklarında klinik tanı belirteci olarak kullanılıp kullanılmayacağını görmek için ROC analizleri yapılmıştır. Her iki plazma miRNA relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol, XFS ile kontrol ve XFG ile XFS grupları arasındaki ROC analizi yapılmıştır.

3.5.1 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi için ROC analizi

3.5.1.1 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol grubu arasındaki ROC analizi

Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol gruplarında ROC analizinde elde edilen AUC değerine göre sonucun “iyi” (good) olduğu görülmüştür (AUC=0.897, $P<.001$, %95 CI=0.81-0.98). Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi için cut-off değeri 1.38 olarak belirlenmiştir. Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi 1.38’den yüksek olanlar XFG, daha düşük olanlar ise kontrol olarak yorumlanmıştır. Testin duyarlılığının (sensitivity) %89, özgüllüğünün (specificity) ise %78 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.5) (Çizelge 3.23).

3.5.1.2 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grubu arasındaki ROC analizi

Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS vs. kontrol gruplarında ROC analizinde elde edilen AUC değerine göre sonucun “orta” (fair) olduğu görülmüştür (AUC=0.779, $P=.001$, %95 CI=0.65-0.91). Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin cut-off değeri 1.96 olarak belirlenmiştir. Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi 1.96’dan yüksek olanlar XFS, daha düşük olanlar ise

kontrol olarak yorumlanmıştır. Testin duyarlılığının (sensitivity) %52, özgüllüğünün (specificity) ise %93 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.6) (Çizelge 3.23).

3.5.1.3 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile XFS grubu arasındaki ROC analizi

Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile XFS grupları arasındaki ROC analizi sonucunda testin “zayıf” (poor) olduğu görülmüştür (AUC=0.641, $P=.08$, %95 CI=0.49-0.79) (Şekil 3.7) (Çizelge 3.23). Bu nedenle cut-off değeri hesaplanmamıştır.

Çizelge 3. 23: Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin ROC analizleri sonuç çizelgesi.

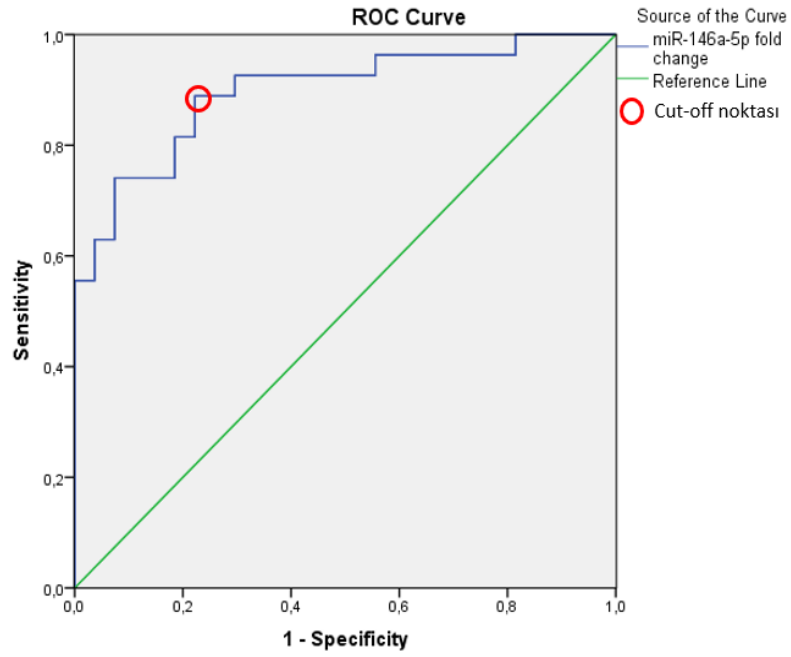
| Karşılaştırılan gruplar | AUC | CI (%95) | <i>P</i> | Cut-off değeri | Duyarlılık (Sensitivity) | Özgüllük (Specificity) |
|-----------------------------|----------------|-----------|----------|----------------|--------------------------|------------------------|
| XFG (n=27) & Kontrol (n=27) | 0.897 (iyi) | 0.81-0.98 | <.001 | 1.38 | %89 | %78 |
| XFS (n=25) & Kontrol (n=27) | 0.779 (orta) | 0.65-0.91 | .001 | 1.96 | %52 | %93 |
| XFS (n=25) & XFG (n=27) | 0.641 (zayıf) | 0.49-0.79 | .08 | --- | --- | --- |

AUC: Area Under the Curve

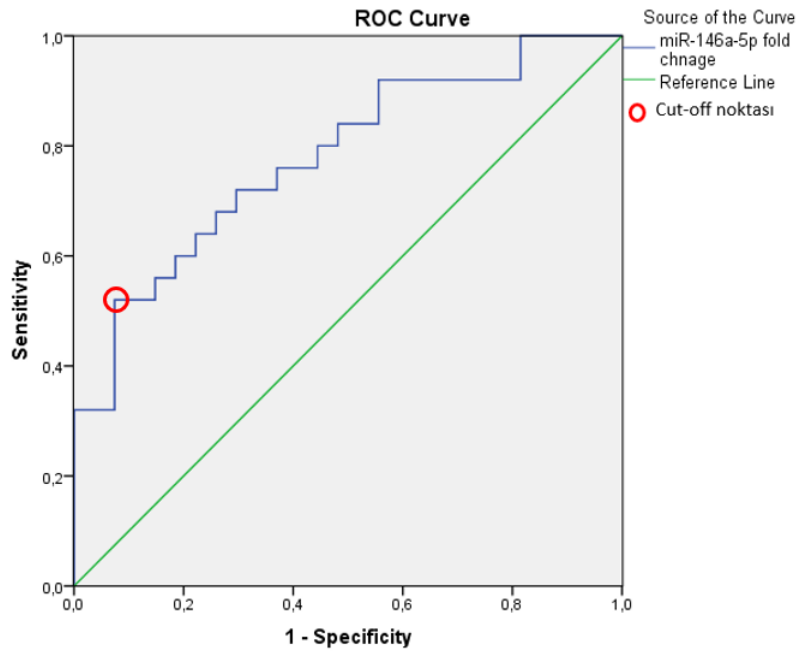
3.5.2 Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi için ROC analizi

3.5.2.1 Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol grubu arasındaki ROC analizi

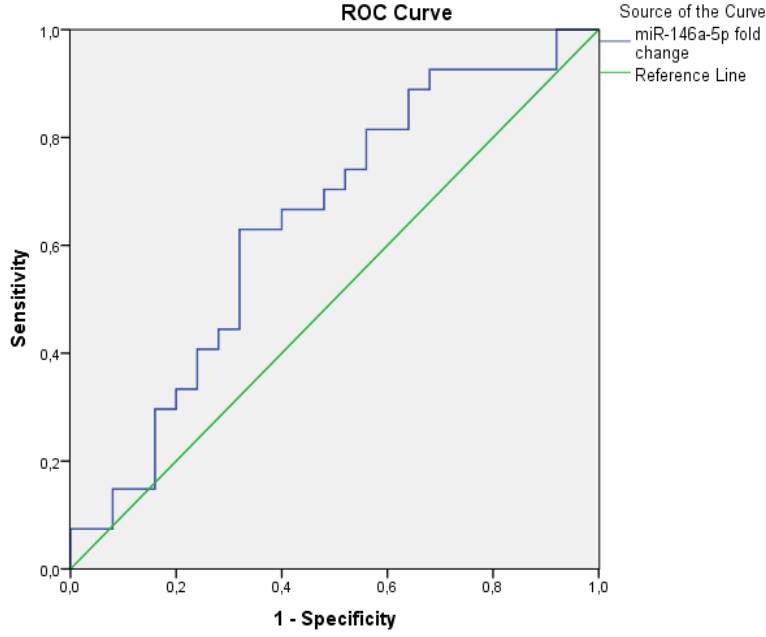
Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol gruplarında ROC analizi sonucunda testin “zayıf” (poor) olduğu görülmüştür (AUC=0.626, $P=.11$, %95 CI=0.47-0.78) (Şekil 3.8) (Çizelge 3.24).



Şekil 3. 5: Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol gruplarında ROC analizi.



Şekil 3. 6: Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grupları arasındaki ROC analizi.



Şekil 3. 7: Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile XFS grupları arasındaki ROC analizi.

3.5.2.2 Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grubu arasındaki ROC analizi

Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grupları arasındaki ROC analizi sonucunda testin “zayıf” (poor) olduğu görülmüştür (AUC=0.610, $P=.$ 17, %95 CI=0.45-0.77) (Şekil 3.9) (Çizelge 3.24).

3.5.2.3 Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile XFS grubu arasındaki ROC analizi

Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile XFS grupları arasındaki ROC analizi sonucunda testin “başarısız” (fail) olduğu görülmüştür (AUC=0.530, $P=.$ 71, %95 CI=0.37-0.69) (Şekil 3.10) (Çizelge 3.24).

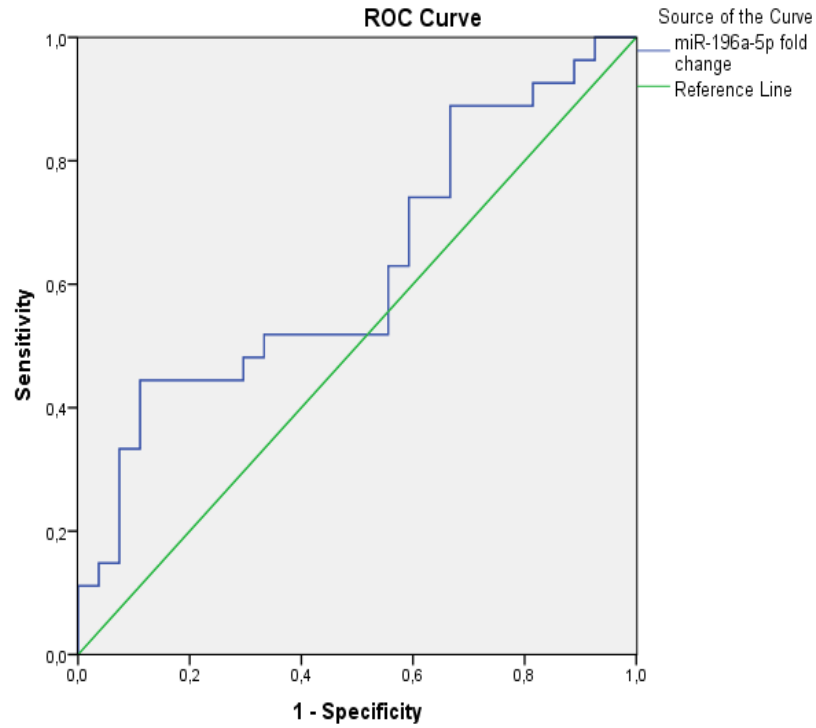
3.6 Hata Matrisi Analizi

ROC analizinde anlamlı çıkan sonuçlar hata matrisi analizi ile de değerlendirilmiştir. ROC analizlerinde hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi parametresi XFG ile kontrol ve XFS ile kontrol grupları arasındaki incelemelerde istatistiksel olarak anlamlı çıkmış, bu ikisi için hata matrisi analizi yapılmıştır.

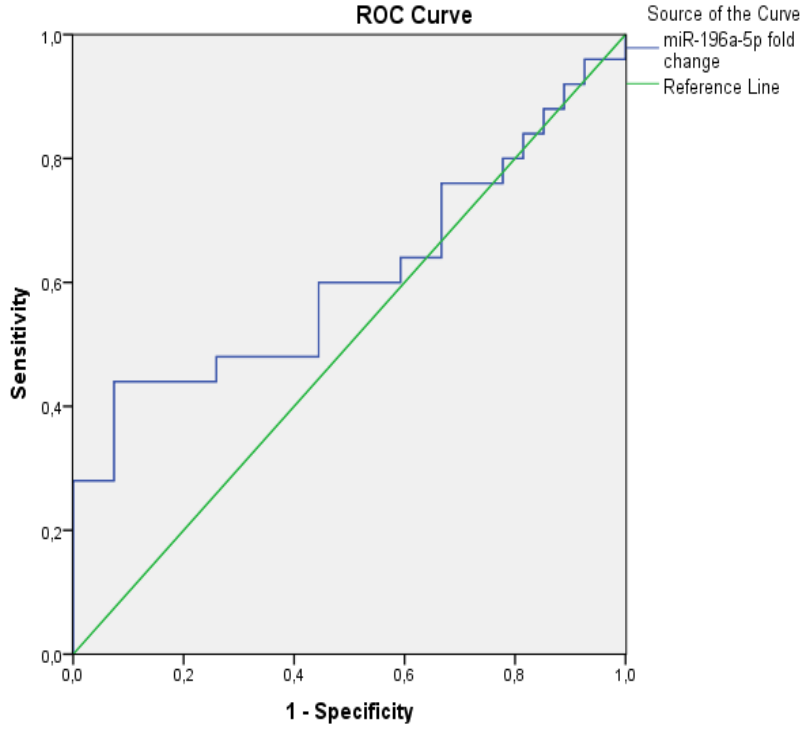
Çizelge 3.24: Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin ROC analizleri sonuç çizelgesi.

| Karşılaştırılan gruplar | AUC | CI (95%) | P | Cut-off değeri | Duyarlılık (Sensitivity) | Özgüllük (Specificity) |
|-----------------------------|-------------------|-----------|-----|----------------|--------------------------|------------------------|
| XFG (n=27) & Kontrol (n=27) | 0.626 (zayıf) | 0.47-0.78 | .11 | --- | --- | --- |
| XFS (n=25) & Kontrol (n=27) | 0.610 (zayıf) | 0.45-0.77 | .17 | --- | --- | --- |
| XFS (n=25) & XFG (n=27) | 0.530 (başarısız) | 0.37-0.69 | .71 | --- | --- | --- |

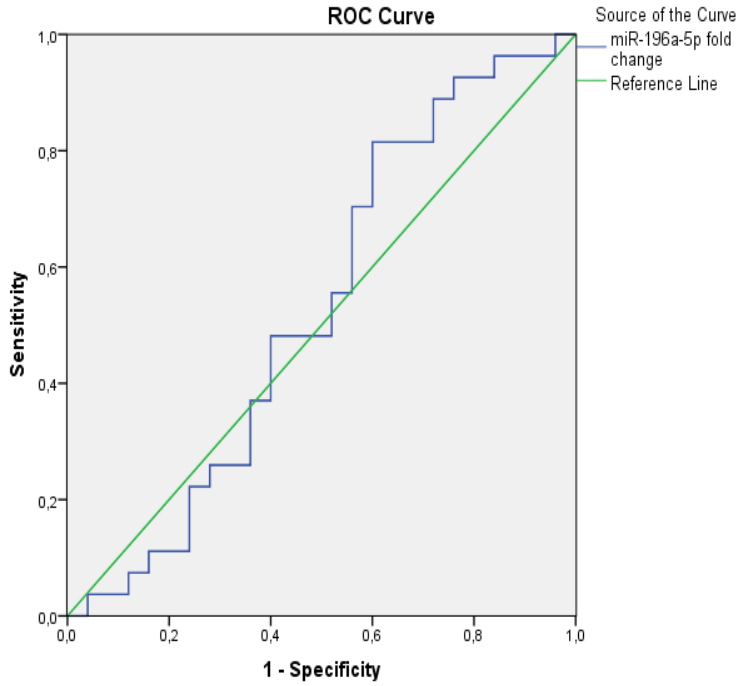
AUC: Area Under the Curve



Şekil 3. 8: Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol grupları arasındaki ROC analizi.



Şekil 3. 9: Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grupları arasındaki ROC analizi.



Şekil 3. 10: Plazma hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile XFS grupları arasındaki ROC analizi.

3.6.1 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi

Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol gruplarında ROC analizi sonucunda test “iyi” olarak değerlendirilmiş ve cut-off değerinin 1.38 olduğu belirlenmiştir. Hata matrisi analizinde tahmin değerler cut-off değerine göre belirlenmiştir. Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi 1.38’den yüksek olanlar XFG, daha düşük olanlar ise sağlıklı kontrol olarak kabul edilmiştir. Gerçekte kontrol olup, tanı testine göre de kontrol olan (DN-doğru negatif) 21, gerçekte XFG olup tanı testine göre de XFG olan (DP-doğru pozitif) 24, gerçekte kontrol olup tanı testine göre XFG olan (YP-yanlış pozitif) 6 ve gerçekte XFG olup tanı testine göre kontrol olan (YN-yanlış negatif) 3 birey görülmüştür. Bu sınıflandırma değerleri ile hata matrisi oluşturulmuştur. Hata matrisine göre duyarlılık (sensitivity), özgüllük (specificity) ve doğruluk (accuracy) değerleri hesaplanmıştır. Bu analiz sonucunda duyarlılık (sensitivity) %89, özgüllük (specificity) %78 ve doğruluk (accuracy) %83 olduğu görülmüştür (Çizelge 3.25 ve 3.27).

Çizelge 3.25: Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFG ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.

| | | Gerçek durum | | Toplam |
|--|---------|--------------|---------|--------|
| | | XFG | Kontrol | |
| Hsa-miR-146 a-5p relatif ekspresyon seviyesine göre belirlenenler | XFG | 24 (DP) | 6 (YP) | 30 |
| | Kontrol | 3 (YN) | 21 (DN) | 24 |
| | Toplam | 27 | 27 | 54 |

$$\text{Duyarlılık (Sensitivity)} = \text{DP}/(\text{DP} + \text{YN}) = 24/(24 + 3) = 0.89 = \%89$$

$$\text{Özgüllük (Specificity)} = \text{DN}/(\text{DN} + \text{YP}) = 21/(21 + 6) = 0.78 = \%78$$

$$\text{Doğruluk (Accuracy)} = (\text{DN} + \text{DP})/(\text{DN} + \text{DP} + \text{YN} + \text{YP}) = (21 + 24)/(21 + 24 + 3 + 6) = 0.83 = \%83$$

3.6.2 Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grubu arasındaki hata matrisi analizi

Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol gruplarında ROC analizi sonucunda test “iyi” olarak değerlendirilmiş ve cut-off değeri 1.96 olarak belirlenmiştir. Hata matrisi analizinde tahmin değerler cut-off değerine göre belirlenmiştir. Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi 1.96’dan yüksek olanlar XFS, daha düşük olanlar ise sağlıklı kontrol olarak kabul edilmiştir. Gerçekte kontrol olup tanı testine göre de kontrol olan (DN-doğru negatif) 25, gerçekte XFG olup tanı testine göre de XFG olan (DP-doğru pozitif) 13, gerçekte kontrol olup tanı testine göre XFG olan (YP-yanlış pozitif) 2 ve gerçekte XFG olup tanı testine göre kontrol olan (YN-yanlış negatif) 12 birey görülmüştür. Bu sınıflandırma değerleri ile hata matrisi oluşturulmuştur. Hata matrisine göre duyarlılık (sensitiviy), özgüllük (specificity) ve doğruluk (accuracy) değerleri hesaplanmıştır. Bu analiz sonucunda duyarlılık (sensitivity) %52, özgüllük (specificity) %93 ve doğruluk (accuracy) %73 olduğu görülmüştür (Çizelge 3.26 ve 3.27).

Çizelge 3.26: Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin XFS ile kontrol grupları arasındaki hata matrisi analizi.

| | | Gerçek durum | | Toplam |
|--|---------|--------------|---------|--------|
| | | XFS | Kontrol | |
| Hsa-miR-146 a-5p relatif ekspresyon seviyesine göre belirlenenler | XFS | 13 (DP) | 2 (YP) | 15 |
| | Kontrol | 12 (YN) | 25 (DN) | 37 |
| Toplam | | 25 | 27 | 52 |

$$\text{Duyarlılık (Sensitivity)} = \text{DP}/(\text{DP} + \text{YN}) = 13/(13 + 12) = 0.52 = \%52$$

$$\text{Özgüllük (Specificity)} = \text{DN}/(\text{DN} + \text{YP}) = 25/(25 + 2) = 0.93 = \%93$$

$$\text{Doğruluk (Accuracy)} = (\text{DN} + \text{DP}) / (\text{DN} + \text{DP} + \text{YN} + \text{YP}) = (25 + 13) / (25 + 13 + 12 + 2) = 0.73 = \%73$$

Çizelge 3.27: Plazma hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin hata matrisi analizi sonuç çizelgesi.

| Modeller | Duyarlılık (Sensitivity) | Özgüllük (Specificity) | Doğruluk (Accuracy) |
|---|--------------------------|------------------------|---------------------|
| Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ¹ | %89 | %78 | %83 |
| Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ² | %52 | %93 | %73 |
| ¹ XFG vs. kontrol arasında yapılan analiz ² XFS vs. kontrol arasında yapılan analiz Sonuçlar hata matrisi analizi ile belirlenmiştir. | | | |



4. TARTIŞMA

Eksfoliasyon sendromu (XFS), genelde yaş arttıkça daha fazla gelişim gösterdiği bilinen, anormal fibriler birikintilerin göz dokularında üretilip birikmesi ile tanımlanan bir hücre dışı matriks hastalığıdır (Bhat, 2010). XFS'nin erken tanısı yoktur ve hastalığın ileri aşamalarında meydana gelen görüş alanı daralmasının da kalıcı tedavisi bulunmamaktadır. Eksfoliasyon nedeniyle oluşan eksfoliatif glokom (XFG) tedavi edilmediği takdirde körlüğe sebep olabilmektedir. Bu nedenlerden ötürü XFS hastalığının erken dönemde teşhisi önem arz etmektedir. XFS oluşum sürecinde elastik fibrillerin fazla üretimi, büyüme faktörlerinin (özellikle TGF- β) fazla eksprese olması, MMPs ve TIMPs arasındaki dengesizliğin, artmış hücrel stresin, oksidatif stres ve hücrel strese karşı korunma mekanizmalarındaki bozuklukların yer aldığı gösterilmiştir (Ho vd., 2005; Rönkkö vd., 2007; Schlötzer-Schrehardt vd., 2003). Son zamandaki araştırmalar, oksidatif stresin ve inflamasyonun, eksfoliasyon materyali üretiminin patofizyolojisinde rol oynayabileceğini göstermiştir (Can Demirdöğen vd., 2019b).

Bitkilerden hayvanlara çeşitli ökaryot canlılarda keşfedilmesi devrim niteliğinde kabul edilen ve gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu kısa (yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda) kodlama yapmayan RNA'lara mikroRNA (miRNA) adı verilmiştir (Griffiths-Jones, 2006). *miRNA*'larda bulunan spesifik tamamlayıcı dizi (çekirdek dizi, seed region), hedef mRNA'nın 3' UTR (Untranslated Region-Çevrim Yapılmayan Bölge), 5'UTR veya ORF (Open Reading Frame-Açık Okuma Zinciri) bölgelerinde bulunan tamamlayıcı diziyi tanıyıp bağlanarak gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak etkilemektedir. miRNA'nın gen ekspresyonunu etkilemesi, hedef mRNA'nın degradasyonu, translasyon başlangıcının inhibisyonu veya translasyon uzamasının inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalarla meydana gelmektedir (Lee vd., 2016; Undi vd., 2013). 2-8 nükleotit uzunluğundaki *miRNA*'larda bulunan çekirdek diziler, mRNA'ya komplementer olarak bağlandıkları için büyük önem taşımaktadırlar (Treiber vd., 2012). miRNA'ların pek çok hastalığın patogeneğinde rol oynayabileceği gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalarda miRNA'ların farklı dokularda

benzersiz ekspresyon seviyelerine sahip oldukları görülmüştür. miRNA'lar, vücut sıvılarında bulunmaları, stabiliteyi nedeniyle en umut verici biyobelirteçler arasında görülmektedirler (Uddin ve Chakraborty, 2018). Bu tez çalışmasının amacı, inflamasyon ile ilişkili yollarda rol oynadığı bilinen miR-146a ve miR-196a-2'nin plazma ekspresyon seviyeleri ile *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'lerinin XFS ve XFG hastalıkları için biyobelirteç olma potansiyellerinin değerlendirilmesidir. Çalışmamız, Türk popülasyonunda, *mir-146a*'daki rs2910164 G/C ve *mir-196a-2*'deki rs11614913 C/T SNP'leri ve bu genlerin plazma ekspresyon seviyeleri ile XFS, XFG ve kontrol grupları arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk araştırmadır.

Coğrafya ve etnisite faktörleri yönünden popülasyonlar arasında farklı prevalanslar gösteren XFS tüm dünya çapında görülen bir hastalıktır (Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001). Dünya genelinde XFS prevalansı yaş arttıkça artış gösterip, 60 yaş üzerindeki bireylerde %10 ile %20 arasında görülmektedir (Schlotzer-Schrehardt, 2011). Finlandiya, Lapponlar (İsveç ve Norveç'in kuzey kutup bölgelerinde yaşayan etnik bir topluluk), İskandinavya, Rusya, Yunanistan ve Tunus'ta XFS prevalansının yüksek olduğu görülmüştür. Bu ülkelerde 50-69 yaş aralığında %3 ile %15 arasında, 70 yaşın üstünde %19 ile %36 arasında prevalans tespit edilmiştir. Bunlara karşın, Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Almanya, Fransa, İsviçre, Norveç, Mısır ve Hindistan'da ise daha düşük prevalans tespit edilmiştir (Andrikopoulos vd., 2009; Forsius, 1988; Konstas ve Ringvold, 2018; Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001; Shazly vd., 2011). XFS bulunan ve glokom teşhisi konmuş bireylerin yüzdeleri yaş ile anlamlı ölçüde artış göstermektedir (Yalaz vd., 1992). Bu çalışmada, yaş ortalaması XFG grubunda 71.5 ± 8.1 , XFS grubunda 70.9 ± 6.5 ve kontrol grubunda 70.3 ± 7.8 olarak hesaplanmıştır ve yapılan analiz sonucunda gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir. Grupların yaş ortalamasının, sonraki analizlerin etkilenmemesi için mümkün olduğunca birbirine yakın olmasına ve aralarında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olmamasına özellikle dikkat edilmiştir.

Çalışma popülasyonunda görme parametreleri incelenmiştir. İncelenen görme parametrelerinden biri GİB (göz içi basıncı) değeridir. Önceki bölümlerde anlatıldığı gibi, XFG'nin, aköz hümör sıvısının drenajını sağlayan kanalların eksfoliasyon birikintisi ile tıkanması ve bu suretle GİB'in artması sonucunda meydana geldiği bilinmektedir. Bu durum bilindiğinden GİB değerinin XFG hastalarında yüksek

olması beklenir. Beklenildiği gibi, Türk popülasyonunda GİB için yapılan bir çalışmada, XFG tanısı konmamış kişilerde GİB değeri 21 mmHg altında olduğu görülürken, XFG hastalarında GİB değerleri yüksek görülmüştür (23 ve 24 mmHg) (Şahin, 2019). Buna ilaveten, farklı çalışmalarda ekfoliasyon bulunan gözlerde yüksek GİB değeri bulunmasına karşın, ekfoliasyon bulunmayan gözlerde daha düşük GİB değerleri bulunmuştur. GİB değeri arttıkça glokom gelişme riskinin arttığı görülmüştür (Aasved, 1971; Mitchell, 1999). Ayrıca, XFS hastalarında, XFS olmayan hastalara göre daha yüksek GİB değerleri görülmüştür (Summanen ve Tönjum, 1988; Kaljurand ve Teesalu, 2010). Ekibimiz tarafından yapılan önceki çalışmalarda, XFG, XFS ve kontrol grupları arasında GİB değerinin istatistiki farklılık gösterdiği ve XFG grubunda XFS ve kontrol gruplarına göre GİB değerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Can Demirdöğen vd., 2019a; Can Demirdöğen vd., 2019b). Bizim çalışmamızın sonucunun, Şahin ve arkadaşlarının (2019), Aasved'in (1971), Mitchell'in (1999) ve daha önceden ekibimizin yaptığı çalışmaların sonuçlarına benzer olduğu görülmüştür. GİB değerinin XFG hastalarında XFS ve kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür (XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$). Önceki bölümlerde bahsedildiği gibi, XFS ve XFG'nin erken teşhisi yapılamamaktadır. Teşhis yapıldığında GİB değerinin düşürülmesiyle hastalığın ilerlemesinin önlenmesi mümkün ise de, hastalığın ileri aşamalarında meydana gelen tahribatın kalıcı tedavisi mümkün olmamaktadır. Bu nedenle XFS ve XFG için erken teşhis önemlidir.

Çalışmamızda incelenen görme parametrelerinden bir diğeri VFS (visual field score) değeridir. VFS, görme alanında meydana gelen hasara göre puanlandırılarak kategorilere ayrılmaktadır. İlk olarak "0" puan, normal görme alanına denk gelmekte ve birinci kategori olarak sınıflandırılmaktadır. İkinci kategori "1-5" puan aralığındadır ve görme alanındaki hafif hasarı ifade eder. Üçüncü kategori "6-11" puan aralığındadır ve görme alanındaki orta derecede hasarı ifade eder. Dördüncü kategori "12-17" puan aralığındadır ve görme alanındaki ciddi hasarı ifade eder. 18-20 puan aralığına denk gelen ve görme alanı hasarının en fazla olduğu kategori de beşinci kategoridir (Can Demirdöğen vd., 2019b; Ng vd., 2012). Ekibimizin önceki çalışmalarında, VFS değerinin XFG ve XFS hastaları ile kontrol bireyleri arasında anlamlı ölçüde istatistiki farklılık gösterdiği bulunmuş, XFG grubunda diğer gruplara göre anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür (Can Demirdöğen vd., 2019a; Can Demirdöğen vd., 2019b; Can Demirdöğen vd., 2020). Bu çalışmamızın sonucuna

göre XFG, XFS ve kontrol gruplarındaki hastaların görme alanı ikinci kategoridedir, fakat XFG hastalarında daha yüksek puan görülmüştür. Bu tez çalışmasının sonucunda da ekibimizin önceki çalışmalarında olduğu gibi, VFS değerinin XFG hastalarında XFS ve kontrol gruplarına göre anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür (XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$).

Çalışmamızda MD (mean deviation) ve PSD (pattern standart deviation) değerleri de incelenmiştir. Literatürdeki çalışmalarda, primer açık açılı glokomlu hastalar ile kontrol bireyler arasında MD ve PSD değerlerinin istatistiki farklılık gösterdiği (Dursun vd., 2016) ve PSD değerinin primer açık açılı glokomlu hastalarda anlamlı ölçüde daha yüksek ($P<.001$), MD değerinin ise anlamlı ölçüde daha düşük olduğu ($P<.001$) görülmüştür (Uchida vd., 1996). Ekibimizin önceki çalışmalarında, MD ve PSD değerlerinin XFG, XFS ve kontrol grupları arasında istatistiki farklılık gösterdiği bulunmuştur. XFG hastalarındaki PSD değerinin XFS ve kontrol gruplarına göre daha yüksek, MD değerinin ise daha düşük olduğu görülmüştür (Can Demirdöğen vd., 2019a; Can Demirdöğen vd., 2019b; Can Demirdöğen vd., 2020). Bizim çalışmamızın sonucunun, Dursun ve arkadaşlarının (2016), Uchida ve arkadaşlarının (1996) ve daha önceden ekibimizde yapılan çalışmaların sonuçlarına benzer olduğu görülmüştür. PSD değerinin XFG hastalarında XFS ve kontrol gruplarına göre daha yüksek (XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$), MD değerinin ise daha düşük (XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFG vs. XFS: $P<.001$) olduğu görülmüştür. XFG için PSD ve MD göz parametresi değerlerinin önemli olduğu ve XFS ve kontrol gruplarındaki bireylere kıyasla anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur. XFS için ise PSD ve MD göz parametresi değerlerinin önemli olmadığı ve kontrol grubundaki bireylere kıyasla anlamlı farklılık göstermediği bulunmuştur.

Çalışma popülasyonunda risk faktörleri de incelenmiştir. İncelenen risk faktörlerinden biri cinsiyettir. Literatürde XFG ve XFS üzerinde cinsiyetin etkisine dair çalışmalar mevcuttur. Bazı yayınlarda XFS ve XFG'nin kadınlarda daha yaygın olduğu gösterilmişken (Kozart ve Yanoff, 1982; Mitchell, 1999; Karger vd., 2003), bazı yayınlarda XFS ve XFG'nin erkeklerde daha yaygın olduğu gösterilmiştir (Kozobolis vd., 1997; McCarty ve Taylor, 2000; Challa, 2009; Stein vd., 2011b). Bu çalışmalara karşın, literatürde XFS ve XFG görülme sıklığının cinsiyetler arasında farklılık göstermediği çalışmalar da mevcuttur (Moreno-Montanis vd., 1989; Yalaz vd., 1992; Yüksel vd., 2001). Bazı yayınlarda, XFS'nin erkeklerde daha yaygın olduğu gösterilmiştir (Al-Saleh vd., 2015; Kılıç vd., 2016; Olawoye ve Ritch, 2014). Bunlara

ilaveten, İrlanda toplumunda yapılan bir çalışmada, XFG geliştirme olasılığının erkeklerde daha fazla olduğu belirlenmiştir (Madden ve Crowley, 1982). Buna benzer olarak, ekibimizin önceki çalışmalarında, XFG geliştirme olasılığının erkeklerde daha yüksek olduğu (Can Demirdöğen vd., 2019a), erkek olmanın XFG ve XFS ile anlamlı ölçüde ilişkili olduğu (Can Demirdöğen vd., 2020) görülmüştür. Bu tez çalışmasında da Al-Saleh ve arkadaşlarının (2015), Kılıç ve arkadaşlarının (2016), Olawoye ve Ritch'in (2014) ve ekibimizin önceki çalışmalarının sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada, XFG hastaları grubundaki erkeklerin sayısının kadınlara oranla anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($P=.01$). XFG ile cinsiyet arasında ilişki bulunurken, XFS ile cinsiyet arasında ilişki bulunmamıştır. Böylece XFS'li erkek hastalarının XFG oluşturma riskinin kadınlara göre daha yüksek olduğu söylenebilir. Bu sebeple bizim toplumumuzda XFS'li erkek hastalarının takibi daha sık yapılmalıdır. Bunlara ilave olarak, bu çalışmanın hastane tabanlı bir çalışma olması dolayısıyla, vardığımız sonucun tüm popülasyonu yansıtmaması ihtimali de dikkate alınmalıdır. Türk popülasyonunda XFG ve XFS hastalıklarının cinsiyetler arasındaki dağılımını popülasyon bazlı bir çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar ile değerlendirmek daha doğru olacaktır. Ayrıca, bu çalışmada grupların yaş ortalamasının sonraki analizlerin etkilenmemesi için mümkün olduğunca birbirine yakın olmasına dikkat edildiğinden vardığımız sonucun tüm popülasyonu yansıtmama ihtimali dikkate alınmalıdır.

Risk faktörlerinden bir diğeri hipertansiyondur. Pek çok çalışmada, miRNA'lar ile hipertansiyon arasında bağlantı olduğu saptanmıştır (Marques vd., 2011; Kontaraki vd., 2014; Dluzen vd., 2016; Qi vd., 2017). Kore toplumunda yapılan bir çalışmada, mir-146a ile hipertansiyon arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir (Kim ve Hong, 2016). Hipertansiyon ile oksidatif stres arasındaki ilişkiye dair bazı çalışmalarda oksidatif stres ile hipertansiyon arasında pozitif korelasyon olduğu ve oksidatif stresin hipertansiyonun nedeni değil sonucu olarak geliştiği belirtilmektedir (Grossman, 2008; Montezano vd., 2015). XFS ve XFG hastalıklarında üretilen ve biriken eksfoliasyon materyalinin oluşumda oksidatif stresin rol oynadığı düşünülmektedir. Mitchell ve arkadaşlarının (1997) elde ettikleri çalışma sonucunda hipertansiyon ile XFG ve XFS arasında korelasyonun pozitif olduğu görülmüştür. Bazı çalışmalarda hipertansiyon hastalığının, XFS ve XFG hastalarında kontrol bireylere göre daha çok olduğu görülürken (Miyazaki vd., 2005; Yaz ve Yıldırım, 2018), ABD'de yapılan bir çalışmada XFS ile hipertansiyon arasında ilişki görülmemiştir (Siordia vd., 2016).

Ekibimizin de önceki çalışmalarında, hipertansiyonla XFG ve XFS arasında ilişki görülmemiştir. (Can Demirdöğen vd., 2019a; Can Demirdöğen vd., 2019b; Can Demirdöğen vd., 2020). Miyazaki ve arkadaşlarının (2005), Yaz ve Yıldırım'ın (2018) çalışmalarının tersine bizim çalışmamızda da ekibimizin vardığı sonuca benzer şekilde XFS ve XFG hastalıkları ile hipertansiyon arasında bir ilişki görülmemiştir.

Risk faktörü olarak ele alınan faktörlerden bir diğeri diyabettir. Yapılan bir çalışmada, XFS insidansının, diyabetli hastalarda kontrol bireylere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Her iki hastalığın patofizyolojisinde de kollajen metabolizmasındaki değişiklikler rol oynadığından, diyabetin XFS ve XFG için risk faktörü olabileceği düşünülmüştür (Sollosy, 2004). Tip 2 diyabet hastalarında açık açılı glokom geliştirme riskinin 2.53 kat arttığı ($P=.04$) (Shen vd., 2016), kadınlarda tip 2 diyabeti ile artmış açık açılı glokom riskinin ilişkili olduğu görülmüştür (Pasquale vd., 2006). Bu çalışmalara karşın, XFS ve XFG hastalıkları ile diyabet hastalığı arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, bu hastalıklar arasında ilişki görülmemiştir (Bikbov vd., 2020; Jonas ve Gründler, 1998; Miyazaki vd., 2005; Topouzis vd., 2011). Benzer biçimde, ekibimizin önceki çalışmalarında da, XFG, XFS ve kontrol grupları arasında diyabet sıklığı yönünden anlamlı ölçüde fark görülmemiştir (Can Demirdöğen vd., 2019a; Can Demirdöğen vd., 2019b; Can Demirdöğen vd., 2020). Bazı miRNA'ların tip 1 diyabetle (hsa-miR-152, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-181a, hsa-miR-24, hsa-miR-148a, hsa-miR-210, hsa-miR-27a, hsa-miR-29a, hsa-miR-27b, hsa-miR-26a, hsa-miR-25 ve hsa-miR-200a) (Nielsen vd., 2012; El-Samahy vd., 2017) ve tip 2 diyabetle (hsa-miR-126) (Liu vd., 2014) ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu tez çalışmasında da Bikbov ve arkadaşlarının (2020), Jonas ve Gründler'in (1998), Miyazaki ve arkadaşlarının (2005), Topouzis ve arkadaşlarının (2011) ve ekibimizin çalışmalarının sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiş, XFS ve XFG hastalıkları ile diyabet arasında bir ilişki olmadığı görülmüştür.

Kalp hastalıkları da risk faktörlerinden biri olarak ele alınmıştır. Kalp hastalıkları ile XFS (Brajković vd., 2007) ve XFG (Ritland vd., 2004) arasında anlamlı ilişki olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Ancak, XFS ve XFG hastalıkları ile kalp hastalıkları arasında bağlantı olup olmadığını araştıran çoğu çalışmada, bu hastalıklar arasında ilişki görülmemiştir (Anastasopoulos vd., 2011; Bikbov vd., 2020; Topouzis vd., 2011). Yalnızca XFS için yapılan bir çalışmada da aynı şekilde ilişki görülmemiştir (Chung vd., 2018). Benzer şekilde ekibimizin önceki çalışmalarında da, XFG, XFS ve kontrol grupları ile kalp hastalıkları arasında anlamlı ölçüde fark

görülmemiştir (Can Demirdöğen vd., 2019a; Can Demirdöğen vd., 2019b; Can Demirdöğen vd., 2020). Bu çalışmalara ilaveten, kalp hastalıklarıyla miRNA'lar arasında ilişki olduğunu belirten çalışmalar vardır (miR-489, miR-23a ve miR-675) (Wang vd., 2014; Wei vd., 2017; Liu vd., 2016). Bu tez çalışmasında da Anastasopoulos ve arkadaşlarının (2011), Bikbov ve arkadaşlarının (2020), Topouzis ve arkadaşlarının (2011) ve ekibimizin çalışmalarının sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiş, XFS ve XFG hastalıkları ile kalp hastalıkları arasında bir ilişki olmadığı görülmüştür.

Sigara kullanımı da risk faktörlerinden bir diğeridir. Farklı çalışmalarda sigaranın XFS ve XFG ile ilişkili olduğu (Doucette vd., 2015; McMonnies, 2017), erkeklerde sigara kullanımı ile artan GİB arasında önemli bir ilişki olduğu görülmüştür ($P=.01$) (Yoshida vd., 2014). Öte yandan, XFS ve XFG hastalıkları ile sigara arasındaki ilişkiyi inceleyen yayınların bazılarında, bu hastalıklar ile sigara arasında anlamlı ölçüde ilişki izlenmemiştir (Bikbov vd., 2020; Topouzis vd., 2011). Ekibimizin önceki çalışmalarında, XFG, XFS ve kontrol grupları ile sigara arasında anlamlı ölçüde ilişki görülmemiştir (Can Demirdöğen vd., 2019a; Can Demirdöğen vd., 2019b). Bu yayınların aksine, bu tez çalışmasında da Bikbov ve arkadaşlarının (2020), Topouzis ve arkadaşlarının (2011) ve ekibimizin çalışmalarının sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiş, XFS ve XFG hastalıkları ile sigara arasında bir ilişki olmadığı görülmüştür.

İncelenen risk faktörlerinden bir diğeri de inmedir. XFS hastalığı ile inme arasındaki bağlantıyı araştıran çalışmalarda, iki hastalık arasında ilişki olduğu (Mitchell vd., 1997; Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001; Rumelaitiené vd., 2020) ve XFS hastalarında XFS olmayan hastalara göre inmenin 1.5 kat daha çok görüldüğü belirtilmiştir (Mitchell vd., 1997). Bunlara karşın, ekibimizin önceki tez çalışmalarında, XFG ve XFS hastalıkları ile inme arasında ilişki görülmemiştir (Demirkaya Budak, 2018; Koçan, 2018). Bu tez çalışmasının sonucunun ekibimiz tarafından yapılan tez çalışmalarının sonucuna benzer olduğu ve XFS ve XFG hastalıkları ile inme arasında bir ilişki olmadığı görülmüştür.

Genotip analizleri

Bu çalışmamızda, XFG hastaları, XFS hastaları ve kontrol bireylerde *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP genotipleri ve alel frekansları Türk popülasyonunda ilk defa belirlenmiş ve istatistiksel analizleri yapılmıştır. Bu

SNP'lerin XFG ve/veya XFS hastalıklarında rol oynayıp oynamadığı araştırılmıştır. Ayrıca *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP genotipleri ile plazma miR-146a ve miR-196a2 ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu tez çalışmasının sonuçları ve *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'lerinin literatür bilgilerinin karşılaştırması aşağıda verilmiştir.

***mir-146a* rs2910164 G/C**

Finlandiya, Polonya ve ABD popülasyonlarında yapılan bir çalışmada, *mir-146a* geninde bulunan rs2910164 G/C SNP'sinin olgun miRNA'nın seviyesinde azalmaya yol açtığı görülmüştür. C alelinin G aleline göre öncül prekürsör miR-146a seviyesini 1.9 kat, olgun miR-146a seviyesini ise 1.8 kat düşürdüğü gösterilmiştir (Jazdzewski vd., 2008). Ayrıca İran toplumundaki bir çalışmada, plazmadaki miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin, rs2910164 G/C SNP'si için GG genotipine sahip tip 2 diyabetli hastalarda CC genotipine sahip tip 2 diyabetli hastalara göre daha yüksek olduğu görülmüş ($P < .05$) ve bunlara ilaveten rs2910164 C alelinin miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin düşmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Alipoor vd., 2018). Bu çalışmalarla rs2910164 G/C genotiplerinin olgun miR-146a seviyesini etkilediği gösterilmiştir. Önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi, farklı hastalık gruplarında kontrol gruplarına göre hsa-miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin daha düşük seviyede (Yousefzadeh vd., 2015; Bhatt vd., 2016; Yavari vd., 2016; Baldeón vd., 2014; Xie vd., 2018) yahut daha yüksek seviyede (Jang vd., 2016; Ménard vd., 2016; Lukiw vd., 2012) olduğu çalışmalar görülmüştür. Tüm bunlar, rs2910164 G/C SNP genotiplerinin, hsa-miR-146a relatif ekspresyon seviyesini değiştirmesi dolayısıyla hastalıkların gelişmesinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda da, XFG ve XFS hastalıklarında, rs2910164 G/C SNP genotiplerinin hsa-miR-146a relatif ekspresyon seviyesi üzerinde etkilerinin olup olmadığı da incelenmek istenmiştir.

Literatürde rapor edilmiş farklı çalışmalarda *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin hasta ve kontrol gruplarındaki polimorfik alel frekansları ve P değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu Çizelge 'de XFG ve XFS hastalıklarından farklı, ancak patogenez olarak benzer olabilecek hastalıkların dataları da verilmiştir. Bu hastalıklardan birisi, XFS'ye benzer şekilde, temel patogenezinde hücrel stres koşullarının rol aldığı düşünülen Behçet hastalığıdır (Glennon-Alty vd., 2018). Behçet hastalığı ile rs2910164 G/C SNP'si arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda, CC genotipli bireylerin GG genotipli bireylere göre daha düşük Behçet hastalığı riski taşıdığı

gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, Behçet hastaları ile kontrol bireyler arasında yapılan karşılaştırmada, C alel frekansının, Behçet hastalarında daha düşük olduğu ve iki grup arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde fark olduğu görülmüştür (her iki çalışmada da $P<.001$). C alelinin, Behçet hastalığında koruyucu olduğu görülmüştür (Oner vd., 2015; Zhou vd., 2012). Brezilya toplumunda yapılan bir çalışmada, rs2910164 G/C SNP'sinde GC genotipinin epilepsi hastalığına yatkınlık oluşturduğu gösterilmiş, epilepsi hastaları ile kontrol bireyler arasında yapılan karşılaştırmada, C alel frekansının, epilepsi hastalarında daha yüksek olduğu ve iki grup arasında anlamlı ölçüde fark olduğu görülmüştür ($P=.02$) (Boschiero vd., 2020).

Bu tez çalışmasında, *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olduğu görülmüştür. Öte yandan, gruplar arasında genotip dağılımları yönünden istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir. SNPStats programında yaş ve cinsiyete göre düzenlenip yapılan analiz sonucunda da, hiçbir genotip modelinde, gruplar arasında genotip dağılımında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir. Gruplar arasında, polimorfik C alel frekansının XFG grubunda 0.262, XFS grubunda 0.265 ve kontrol grubunda 0.237 olduğu görülmüş ve gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir.

Bu çalışmada, Türk popülasyonunda ilk defa, XFG ve XFS hastalıklarında rs2910164 G/C SNP'si incelenip, polimorfik C alel frekansı belirlenmiştir. Çizelge 4.1'de *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'si ile ilgili farklı popülasyonlarda yapılmış çalışmalara göre hasta ve kontrol gruplarında C alel frekansları verilmiştir. Bizim bu tez çalışmamızda, kontrol grubunda görülen C alel frekansının (0.237), yine Türk popülasyonunda yapılan farklı bir çalışmada görülen frekansa göre düşük olduğu tespit edilmiştir (kontrol: 0.334), (Oner vd., 2015). Farklı popülasyonlardaki çalışmalarda kontrol gruplarında C alel frekansları farklılık göstermektedir. Finlandiya, Polonya, Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya ve Yunanistan popülasyonlarında C alel frekansının bizim sonucumuza benzer olduğu görülürken, Çin, Çinli Han ve Mısır popülasyonlarında C alel frekansının bizim sonucumuza göre yüksek olduğu görülmüştür. Diğer taraftan İran popülasyonunda birbirine zıt sonuçlar görülmüş, bazı çalışmalarda C alel frekansı bizim sonucumuza benzer iken (kontrol:0.246, kontrol:0.245) (Farokhizadeh vd., 2018; Dezfuli vd., 2020), farklı bir çalışmada C alel

frekansının bizim sonucumuza göre yüksek olduğu görülmüştür (kontrol:0.546), (Gao vd., 2018).

Çizelge 4. 1: *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin bazı çalışmalarda rapor edilen polimorfik alel frekansları.

| Popülasyon | Hastalık | C alel frekansı | | P | Kaynak |
|---|---------------------------------------|-----------------|---------|-------|-------------------------|
| | | Hasta | Kontrol | | |
| Türk | XFG | 0.262 | 0.237 | .35 | Bu çalışma |
| Türk | XFS | 0.265 | 0.237 | .28 | Bu çalışma |
| Finlandiya, Polonya ve Amerika Birleşik Devletleri | Tiroit papiller kanseri | 0.262 | 0.239 | .15 | (Jazdzewski vd., 2008) |
| Çinli Han | Behçet | 0.566 | 0.635 | <.001 | (Zhou vd., 2012) |
| Çin | Alzheimer | 0.650 | 0.625 | .36 | (Cui vd., 2014) |
| Çinli Han | Pediyatrik üveit | 0.544 | 0.635 | <.001 | (Wei vd., 2014) |
| Türk | Behçet | 0.175 | 0.334 | <.001 | (Oner vd. 2015) |
| İran | Hepatosellüler karsinom | 0.250 | 0.246 | .91 | (Farokhzadeh vd., 2018) |
| İran | Kolon kanseri | 0.513 | 0.546 | .10 | (Gao vd., 2018) |
| Çin | Hepatosellüler karsinom | 0.350 | 0.380 | .79 | (Zhang vd., 2020) |
| Brezilya | Epilepsi | 0.360 | 0.293 | .02 | (Boschiero vd., 2020) |
| İran | Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri | 0.336 | 0.245 | .01 | (Dezfuli vd., 2020) |
| Yunanistan | Koroner arter hastalığı | 0.308 | 0.285 | .54 | (Agiannitou vd., 2021) |
| Mısır | Behçet | 0.388 | 0.500 | .02 | (Kamal vd., 2021) |
| Çin | Hepatosellüler karsinom | 0.350 | 0.380 | .79 | (Zhang vd., 2020) |
| Brezilya | Epilepsi | 0.360 | 0.293 | .02 | (Boschiero vd., 2020) |
| İran | Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri | 0.336 | 0.245 | .01 | (Dezfuli vd., 2020) |
| Yunanistan | Koroner arter hastalığı | 0.308 | 0.285 | .54 | (Agiannitou vd., 2021) |
| Mısır | Behçet | 0.388 | 0.500 | .02 | (Kamal vd., 2021) |

NCBI SNP veritabanındaki bilgilere göre, *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin minör alel frekansının, farklı popülasyonlarda 0.230 ile 0.635 arasında değiştiği görülmektedir (Url-14).

Çizelge 4. 2: NCBI SNP veritabanında rapor edilen rs2910164 G/C SNP'sinin polimorfik alel frekansları (Url-14).

| Popülasyon | C alel frekansı |
|-------------------|-----------------|
| Avrupa | 0.230 |
| Afrika | 0.367 |
| Afro-Amerikalılar | 0.361 |
| Diğer Afrikalılar | 0.367 |
| Asya | 0.589 |
| Doğu Asya | 0.616 |
| Güney Asya | 0.290 |
| Diğer Asyalılar | 0.540 |
| Latin Amerika | 0.354 |

NCBI SNP veritabanında rapor edilen sonuçlara göre, rs2910164 SNP'sinde C alel frekansı, Avrupa popülasyonunda 0.230 olarak, Afrika popülasyonunda 0.367 olarak, Afro-Amerikalılar popülasyonunda 0.361 olarak, Diğer Afrikalılar popülasyonunda 0.367, Asya popülasyonunda 0.589, Doğu Asya popülasyonunda 0.616, Güney Asya popülasyonunda 0.290, Diğer Asyalılar popülasyonunda 0.540, Latin Amerika popülasyonunda 0.354 olarak görülmüştür. Bizim bulduğumuz sonuç Avrupa popülasyonunda olan C alel frekansına benzer çıkmıştır (Çizelge 4.2).

***mir-196a-2* rs11614913 C/T**

Türk ve Çin toplumunda yapılan çalışmalarda, *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sindeki CC genotipinin olgun miR-196a-2 seviyesini anlamlı ölçüde arttırdığı görülmüştür (Akkız vd., 2010; Hu vd., 2008). Bu ve benzeri çalışmalarla rs11614913 C/T SNP genotiplerinin olgun miR-196a-2 seviyesini etkilediği gösterilmiştir. Önceki bölümlerde de yazıldığı gibi, bazı çalışmalarda farklı hastalık gruplarında kontrol

gruplarına göre hsa-miR-196a relatif ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Xue vd., 2013; Lee vd., 2017; Qu vd., 2021; Donderski vd., 2021). Tüm bunlar rs11614913 C/T SNP genotiplerinin, hsa-miR-196a relatif ekspresyon seviyesini değiştirmesi dolayısıyla hastalıklarda rol oynayabileceğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda da, XFG ve XFS hastalıklarında, rs11614913 C/T genotiplerinin hsa-miR-196a relatif ekspresyon seviyesi üzerinde etkilerinin olup olmadığı incelenmek istenmiştir.

Literatürde olan, farklı popülasyonlardaki, *mir-196a* rs11614913 C/T SNP'sinin hasta ve kontrol gruplarındaki polimorfik alel frekansları ve *P* değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu Çizelge 'de XFG ve XFS hastalıklarından farklı ve patogenez olarak benzer olabilecek hastalıkların dataları verilmiştir.

Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada, Hepatosellüler karsinom ile *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'si arasındaki ilişki incelenmiş, CC genotipinin hepatosellüler karsinom riskini 2.41 kat artırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, hepatosellüler karsinom hastaları ile kontrol bireyler arasında yapılan karşılaştırmada, T alel frekansının, kontrol grubunda daha yüksek olduğu ve iki grup arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde fark olduğu izlenmiştir (*P*=.006) (Akkız vd., 2010). Farklı bir çalışmada, meme kanseri ile rs11614913 C/T SNP'si arasındaki ilişki incelenmiş, CC genotipinin meme kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir. Meme kanseri hastaları ile kontrol bireyler arasında yapılan karşılaştırmada, T alel frekansının, kontrol grubunda daha yüksek olduğu ve iki grup arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde fark olduğu izlenmiştir (*P*=.001) (Dai vd., 2016).

Bu tez çalışmasında *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olduğu görülmüştür. Gruplar arasında genotiplerin dağılımında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir. SNPStats programında yaş ve cinsiyete göre düzenlenip yapılan analiz sonucunda da, hiçbir genotip modelinde, gruplar arasında genotiplerde istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir. Gruplar arasında, polimorfik T alel frekansının, XFG grubunda 0.398, XFS grubunda 0.400 ve kontrol grubunda 0.395 olduğu görülmüş ve gruplar arasındaki istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir. SNPStats programında yaş ve cinsiyete göre düzenlenip yapılan analiz sonucunda da, hiçbir genotip modelinde, gruplar arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir.

Bu çalışmada, Türk popülasyonunda ilk defa, XFG ve XFS hastalıklarında rs11614913 C/T SNP'si incelenip, polimorfik T alelinin frekansı belirlenmiştir. Çizelge 4.3'te *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'si ile ilgili farklı popülasyonlarda yapılmış çalışmalara göre hasta ve kontrol gruplarında T alel frekansları verilmiştir. Bizim bu tez çalışmamızda, kontrol grubunda görülen T alel frekansının, yine Türk popülasyonunda yapılan farklı bir çalışmada görülen frekansla aynı olduğu tespit edilmiştir (kontrol: 0.395), (Kirik vd., 2020). Buna karşın, yine Türk popülasyonunda farklı bir çalışmada T alel frekansının bizim sonucumuza göre yüksek olduğu görülmüştür (kontrol:0.451), (Akkız vd., 2010). Farklı popülasyonlardaki çalışmalarda kontrol gruplarında T alel frekansları farklılık göstermektedir. Mısır popülasyonunda T alel frekansının bizim sonucumuza benzer olduğu görülürken, Çin ve Kore popülasyonlarında T alel frekansının bizim sonucumuza göre yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.3). Diğer taraftan İran popülasyonunda birbirine zıt sonuçlar görülmüş, bir çalışmada T alel frekansı bizim sonucumuza benzer iken (kontrol:0.321) (Hashemi vd., 2016), farklı bir çalışmada T alel frekansının bizim sonucumuza göre yüksek olduğu görülmüştür (kontrol:0.421), (Farokhizadeh vd., 2018).

Çizelge 4. 3: *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin bazı çalışmalarda rapor edilen polimorfik alel frekansları.

| Popülasyon | Hastalık | T alel frekansı | | P | Kaynak |
|------------|---------------------------------------|-----------------|---------|------|--------------------------|
| | | Hasta | Kontrol | | |
| Türk | XFG | 0.398 | 0.395 | >.99 | Bu çalışma |
| Türk | XFS | 0.400 | 0.395 | .86 | Bu çalışma |
| Çin | Hepatosellüler karsinom | 0.506 | 0.581 | .02 | (Xiao Dong Li vd., 2010) |
| Kore | Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri | 0.512 | 0.544 | .36 | (Hong vd., 2011) |
| Türk | Hepatosellüler karsinom | 0.351 | 0.451 | .006 | (Akkız vd., 2010) |
| Kore | Akciğer kanseri | 0.512 | 0.544 | .36 | (Hong vd., 2011) |
| Çin | Vitiligo | 0.544 | 0.526 | .31 | (Huang vd., 2013) |
| Çin | Mesane kanseri | 0.535 | 0.534 | .98 | (Deng vd., 2015) |
| İran | Prostat kanseri | 0.361 | 0.321 | .30 | (Hashemi vd., 2016) |
| Çin | Meme kanseri | 0.412 | 0.491 | .001 | (Dai vd., 2016) |

Çizelge 4. 3 (devam): *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin bazı çalışmalarda rapor edilen polimorfik alel frekansları

| Popülasyon | Hastalık | T alel frekansı | | P | Kaynak |
|------------|-------------------------|-----------------|---------|------|---------------------------|
| | | Hasta | Kontrol | | |
| İran | Prostat kanseri | 0.361 | 0.321 | .30 | (Hashemi vd., 2016) |
| Çin | Meme kanseri | 0.412 | 0.491 | .001 | (Dai vd., 2016) |
| İran | Hepatosellüler karsinom | 0.455 | 0.421 | .47 | (Farokhiz adeh vd., 2018) |
| Mısır | Astım | 0.266 | 0.302 | .43 | (Hussein vd., 2016) |
| Türk | Multipl miyelom | 0.378 | 0.395 | .66 | (Kirik vd., 2020) |

NCBI SNP veritabanındaki bilgilere göre rs11614913 C/T SNP'sinin minör alel frekansı, farklı popülasyonlarda 0.104 ile 0.581 arasında değişmektedir (Url-18).

Çizelge 4. 4: NCBI SNP veritabanında rapor edilen rs11614913 C/T SNP'sinin polimorfik alel frekansları (Url-18).

| Popülasyon | T alel frekansı |
|-------------------|-----------------|
| Avrupa | 0.394 |
| Afrika | 0.168 |
| Afro-Amerikalılar | 0.170 |
| Diğer Afrikalılar | 0.104 |
| Asya | 0.493 |
| Doğu Asya | 0.487 |
| Güney Asya | 0.301 |
| Diğer Asyalılar | 0.513 |
| Latin Amerika | 0.289 |

NCBI SNP veritabanında rapor edilen sonuçlara göre, rs11614913 SNP'sinde T alel frekansı, Avrupa popülasyonunda 0.394 olarak, Afrika popülasyonunda 0.168 olarak, Afro-Amerikalılar popülasyonunda 0.170 olarak, Diğer Afrikalılar popülasyonunda

0.104, Asya popülasyonunda 0.493, Doğu Asya popülasyonunda 0.487, Güney Asya popülasyonunda 0.301, Diğer Asyalılar popülasyonunda 0.513, Latin Amerika popülasyonunda 0.289 olarak görülmüştür. Bizim bulduğumuz sonuç Avrupa popülasyonunda olan T alel frekansına benzer çıkmıştır (Çizelge 4.4).

***mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'lerinin görme parametreleri ile ilişkisi:**

Ekibimizin daha önceki bir çalışmasında, *PONI* geninde bulunan bazı SNP genotiplerinin görme parametreleri ile ilişkisi incelendiğinde görme parametreleri ile *PONI* geninde bulunan bazı SNP'ler arasında anlamlı ölçüde bağlantı görülmemiştir. Diğer taraftan PSD, GİB ve MD değerleri ile *PONI* geninde incelenen SNP genotipleri arasında korelasyon olduğu görülmüştür (Can Demirdögen vd., 2019b).

Bu çalışmada da benzer şekilde *mir-146a* rs2910164 G/C (Çizelge 3.11) ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'leri ile (Çizelge 3.12) görme parametreleri arasında ilişki olup olmadığını incelemek için, görme parametrelerinin, dominant ve resesif genetik modellere göre analizi yapılmıştır.

XFG, XFS ve kontrol gruplarında, *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'si ile görme parametrelerinin ilişkisi incelendiğinde, CC genotipi ile GC ve GG genotipleri arasında (resesif model) ve CC ve GC genotipi ile GG genotipleri arasında (dominant model) GİB, VFS, MD ve PSD değerlerinin anlamlı ölçüde farklılık göstermediği görülmüştür. *mir-146a* rs2910164 C alelinin görme parametrelerine etki etmediği görülmüştür. Bu sonuçlara ilaveten, GİB, VFS ve PSD değerlerinin rs2910164 G/C SNP genotiplerinden bağımsız olarak XFG ve XFS hastalarında kontrol bireylere göre daha yüksek, MD değerinin ise daha düşük olduğu görülmüştür.

XFG, XFS ve kontrol gruplarında, *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'si ile görme parametrelerinin ilişkisi incelendiğinde, TT genotipi ile TC ve CC genotipleri arasında (resesif model) ve TT ve TC genotipi ile CC genotipleri arasında (dominant model) GİB, VFS, MD ve PSD değerlerinin anlamlı ölçüde farklılık göstermediği görülmüştür. *mir-196a-2* rs11614913 T alelinin görme parametrelerine etki etmediği görülmüştür. Bu sonuçlara ilaveten, GİB, VFS ve PSD değerlerinin rs11614913 C/T SNP genotiplerinden bağımsız olarak XFG ve XFS hastalarında kontrol bireylere göre daha yüksek, MD değerinin ise daha düşük olduğu görülmüştür.

Plazma miRNA relatif ekspresyon seviyeleri

XFG ve XFS hastalıkları ile mikroRNA'lar arasındaki ilişkiyi inceleyen pek çok çalışma vardır. Bu çalışmaların birinde, glokom ve XFS hastalarının plazma ve aköz hümör sıvılarında miRNA ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve sonuçta üç tane (hsa-miR-637, hsa-miR-1306-5p ve hsa-miR-3159) dolaşımda olan miRNA'nın ekspresyon seviyesinin, XFS ve açık açılı glokom hastalarının plazmalarında ve aköz hümörlerinde, kontrol grubundaki bireylere nazaran arttığı ve yüksek özgüllük ve duyarlılık gösterdikleri bulunmuştur (AUC:0.91, duyarlılık:%85 ve özgüllük:%87.5) (Hindle vd., 2018). Bu sonuçlar, miRNA'ların XFS ve XFG hastalıklarının erken teşhisi için kan tabanlı biyobelirteçler olabilecekleri yönünde yorumlanmıştır. ABD toplumunda yapılan bir çalışmada, primer açık açılı glokom (POAG) ve XFG hastalarının aköz hümör sıvılarında miRNA ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda üç tane (hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-302d-3p ve hsa-miR-451a) miRNA'nın primer açık açılı glokom hastaları ile kontrol bireyleri arasında, beş tane (hsa-miR-122-5p, hsa-miR-3144-3p, hsa-miR-320a, hsa-miR-320e ve hsa-miR-630) miRNA'nın XFG hastaları ile kontrol bireyleri arasında ve bir tane (hsa-miR-302d-3p) miRNA'nın XFG hastaları ile primer açık açılı glokom hastaları arasında anlamlı ölçüde farklı ekspresyonlara sahip olduğu bulunmuştur (Drewry vd., 2018). Ayrıca, Polonya'da yapılan bir çalışmada, XFG hastalarının göz içi lens dokularında kontrol bireylerin göz içi lens dokularına kıyasla, hsa-miR-125b relatif ekspresyon seviyesinin 3.3 kat daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.02$) (Tomczyk-Socha vd., 2020).

Hsa-miR-146a-5p'nin plazma relatif ekspresyon seviyesi

Çin popülasyonunda yapılan bir çalışmada, miR-146a'nın, TGF- β /Smad4 sinyal yolunu baskılayarak iskelet kası fibrozunun gelişimini azaltıcı yönde bir rol oynadığı ve hsa-miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin hasta grubunda daha düşük seviyede olduğu gösterilmiştir ($P<.001$) (Sun vd., 2017). Farklı çalışmalarda, miR-146a'nın diyabete bağlı nefropati, retinopati, nöropati gibi komplikasyonların ve kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde anti-enflamatuar etki gösterdiği görülmüş ve diyabetik sıçanların hipokampus dokularında ve tip-2 diyabet hastalarının serumunda hsa-miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin azaldığı belirlenmiştir. (Baldeón vd., 2014; Bhatt vd., 2016; Xie vd., 2018; Yavari vd., 2016; Yousefzadeh vd., 2015). Bunlara karşın, Kore popülasyonunda yapılan bir çalışmada, hsa-miR-146a

relatif ekspresyon seviyesinin Graves orbitopati (tiroit oftalmopati, guatra bağı göz çıkıklığı) dokularında hastalık olmayan dokulara göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.03$) (Jang vd., 2016). Benzer şekilde, dünyada 50 yaş ve üstü bireyleri etkileyen bir körlük nedeni olan ADM (yaşa bağı makula dejenerasyonu) hastalığını araştıran Kanada toplumunda yapılan bir çalışmada, hsa-miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin, ADM'li hastaların plazmasında yaklaşık 2.5 kat, gözün vitreus kısmında bulunan vitreus sıvısında da benzer şekilde 3 kat arttığı gösterilmiştir (sırasıyla: $P=.04$, $P=.004$) (Ménard vd., 2016). Rusya'da yapılan farklı bir çalışmada, ADM'li hastaların retinasında kontrol bireylerin retinasına kıyasla, hsa-miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin yaklaşık 3 kat fazla olduğu görülmüştür ($P<0.01$) (Lukiw vd., 2012). Bu tez çalışmasının sonucunda ise, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) ortalamasının, XFG grubundaki hastalarda 3.94 ± 3.50 , XFS grubundaki hastalarda 2.70 ± 1.99 ve kontrol grubundaki bireylerde 1.11 ± 0.64 olduğu görülmüştür. Üç grup arasında anlamlı ölçüde farklılık olduğu ($P<.001$) ayrıca XFG ile kontrol ve XFS ile kontrol grupları arasında da istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılıklar olduğu izlenmiştir (XFG vs. kontrol: $P<.001$, XFS vs. kontrol: $P=.001$). Bu çalışmada, Türk popülasyonunda ilk defa, XFG ve XFS hastalıklarının plazmalarında hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) incelenmiş ve XFG ve XFS hastalarının plazmalarında, kontrol bireylerin plazmalarına göre hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) daha yüksek olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamız, Jang ve arkadaşlarının (2016), Ménard ve arkadaşlarının (2016) ve Lukiw ve arkadaşlarının (2012) göz hastalıklarıyla ilgili çalışmalarına benzer sonuç vermiştir.

Lojistik regresyon analizleri sonucunda, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFG ile yaklaşık 6 kat ($OR=5.826$, $CI=2.121-16.006$, $P=.001$; dominant genetik model) ve yaklaşık 5 kat ($OR=4.874$, $CI=1.995-11.909$, $P=.001$; resesif genetik model) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFS ile yaklaşık 4 kat ($OR=3.585$, $CI=1.481-8.673$, $P=.005$; dominant genetik model) ve yaklaşık 3 kat ($OR=2.947$, $CI=1.353-6.421$, $P=.007$; resesif genetik model) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. ROC analizleri sonucunda, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFG hastalığı için "iyi" ($AUC=0.897$, $P<.001$, duyarlılık=%89, özgüllük=%78, cut-off=1.38), XFS hastalığı için "orta" ($AUC=0.779$, $P=.001$, duyarlılık=%52, özgüllük=%93, cut-off=1.96) dereceli bir tanı testi olabileceği görülmüştür. ROC analizlerinde anlamlı ölçüde sonuç veren modeller

hata matrisi analizi ile de değerlendirilmiştir. XFG ile kontrol grupları arasında, duyarlılık (sensitivity) %89, özgüllük (specificity) %78 ve doğruluk (accuracy) %83 olarak hesaplanmıştır. XFS ile kontrol grupları arasında, duyarlılık (sensitivity) %52, özgüllük (specificity) %93 ve doğruluk (accuracy) %73 olarak hesaplanmıştır. ROC analizi ve hata matrisi analizlerinin sonuçları aynı çıkmıştır (Çizelge 4.5). Bu tez çalışmasının sonucuna göre, XFG ve XFS hastalıklarında, plazmadaki hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin önemli role sahip olabileceği görülmüştür. Plazmadaki hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesindeki artışın XFG ve XFS'nin oluşum mekanizmalarına etkisinden söz edebileceği gibi, başka bir bakışla, plazmadaki hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin artmasına XFG ve XFS oluşumunun etki edebileceği de söylenebilir. Bu ilişkinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması için daha kapsamlı deneysel çalışmaların yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak bu çalışmada, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFG ve XFS için kan tabanlı biyobelirteç olma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. miR-146a ekspresyon seviyesinin Graves orbitopati, ADM, meme kanseri, mesane kanseri gibi hastalıklarda da arttığı gözlenmiştir (Jang vd., 2016; Ménard vd., 2016; Lukiw vd., 2012; Liang vd., 2019; Sasaki vd., 2016). Bu nedenle, miR-146a'nın XFS ve XFG teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılması halinde, miR-146a plazma ekspresyon seviyesinde artış görülen diğer Graves orbitopati, ADM, meme kanseri ve mesane kanseri için dışlama kriterlerinin dikkate alınması gerekir.

mir-146a rs2910164 G/C genotipleri ile hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin birlikte analizi sonucunda ise, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, GG genotipli XFG hastaları, XFS hastaları ve kontrol grubundaki bireyler arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık gösterdiği görülmüştür (üç grup arasında: $P<.001$). Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, GG genotipli XFG hastalarında, XFS grubundaki hastalara ve kontrol grubundaki bireylere göre anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu ($P<.001$), GG genotipli XFS hastalarında, kontrol grubundaki bireylere göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu ($P=.002$) ve GG genotipli XFG hastalarında, XFS grubundaki hastalara göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür ($P=.04$). GC genotipli XFG grubundaki hastalar ile kontrol grubundaki bireyler arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olduğu izlenmiştir ($P=.02$). CC genotipli XFS grubundaki hastalar ve kontrol grubundaki bireyler arasında anlamlı ölçüde

farklılık izlenmemiştir. Literatürde olan çalışmalarda, *mir-146a* geninde bulunan rs2910164 G/C SNP'sinin olgun miRNA'nın seviyesinde azalmaya yol açtığı görülmüştür. C alelinin G aleline göre öncül prekürsör miR-146a seviyesini 1.9 kat, olgun miR-146a seviyesini ise 1.8 kat düşürdüğü gösterilmiştir (Jazdzewski vd., 2008). Ayrıca başka bir çalışmada plazmadaki miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin, rs2910164 G/C SNP'sinde GG genotipine sahip tip 2 diyabetli hastalarda CC genotipine sahip tip 2 diyabetli hastalara göre daha yüksek olduğu görülmüş ($P<.05$) ve bunlara ilaveten rs2910164 G/C SNP'sinde C alelinin miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin düşmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Alipoor vd., 2018). Bizim elde ettiğimiz sonuçlar ise literatürden farklı çıkmıştır. Plazmadaki miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin, rs2910164 G/C SNP'sinde GG genotipine sahip XFG hastaları ve GC genotipine sahip XFG hastaları arasında anlamlı ölçüde fark göstermediği görülmüştür. Buna ilaveten, plazmadaki miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin, rs2910164 GG genotipine sahip XFS hastaları, GC hastaları ve CC genotipine sahip XFS hastası arasında anlamlı ölçüde fark göstermediği görülmüştür. Plazmadaki miR-146a relatif ekspresyon seviyesinin, rs2910164 GG genotipine sahip kontrol bireyleri, GC genotipine sahip kontrol bireyleri ve CC genotipine sahip kontrol bireyleri arasında anlamlı ölçüde fark göstermediği görülmüştür. Sonuç olarak, XFG ve XFS hastalıklarında veya kontrol grubunda rs2910164 G/C SNP genotipleri ile hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi arasında ilişki görülmemiştir. Fakat, bizim çalışmamızda XFG grubunda rs2910164 CC genotipine sahip bir hasta yoktur; XFS grubunda sadece bir hasta, kontrol grubunda ise 2 kişi bu genotipe sahiptir. Bu nedenle XFG grubunda GG ile CC genotipi arasında karşılaştırma yapılamamıştır. XFS ve kontrol grubunda ise karşılaştırma sonucunun çok güçlü olmadığı söylenebilir. İlerde daha büyük bir popülasyonda bu analizler yapılırsa daha güçlü ve doğru sonuçlar elde edilebilir.

Yapılan korelasyon analizleri sonucunda kontrol grubunda, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ile yaş arasında korelasyonun pozitif olduğu belirlenmiştir ($P=.003$). Benzer şekilde, Alzheimer hastalığı ile ilgili yapılan bir çalışmada, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ile yaş arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (Maffioletti vd., 2020). Ayrıca, bu çalışmada kontrol grubunda, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ile MD ve PSD değerleri arasındaki korelasyonun pozitif olduğu görülmüştür ($P<.001$ ve $P<.001$). Literatürde hsa-miR-146a-5p relatif

ekspresyon seviyesi ile MD ve PSD arasında korelasyon analizi yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çizelge 4. 5: Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin ROC ve Hata matrisi analizlerinde değerlendirilmesi.

| Karşılaştırılan gruplar | ROC analizi sonucu | | | | Duyarlılık (sensitivity) | | Özgüllük (specificity) | | Doğruluk (accuracy) |
|--|--------------------|-----------|-------|----------------|--------------------------|--------------|------------------------|--------------|---------------------|
| | AUC | CI (95%) | P | Cut-off değeri | ROC | Hata matrisi | ROC | Hata matrisi | Hata matrisi |
| Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ¹ | 0.897 (iyi-good) | 0.81-0.98 | <.001 | 1.38 | %89 | %89 | %78 | %78 | %83 |
| Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi ² | 0.779 (orta-fair) | 0.65-0.91 | .001 | 1.96 | %52 | %52 | %93 | %93 | %73 |

¹XFG vs. kontrol, ²XFS vs. Kontrol. AUC: Area Under the Curve

Hsa-miR-196a-5p'nin plazma relatif ekspresyon seviyesi

Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin PDAC (Pankreatik Duktal Adenokarsinoma), glioma (beyin glial hücrelerinde oluşan tümör) ve mide kanseri hastalıklarında anlamlı ölçüde artmış olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Xue vd., 2013; Qu vd., 2021; Lee vd., 2017). Polonya toplumunda yapılan bir çalışmada, kronik böbrek hastalarının idrarında hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin artmış olduğu görülmüştür ($P<.05$) (Donderski vd., 2021). Bu tez çalışmasının sonucunda ise, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinde (fold change) XFG, XFS ve kontrol grupları arasındaki istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür. Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) ortalamasının, XFG grubundaki hastalarda 1.78 ± 1.99 , XFS grubundaki hastalarda 2.48 ± 2.70 ve kontrol grubundaki bireylerde 0.98 ± 0.99 olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, Türk popülasyonunda ilk defa, XFG ve XFS hastalıklarında hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) incelenmiştir. Lojistik regresyon

analizinde, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFS ile yaklaşık 2 kat (OR=1.518, CI=1.016-2.267, $P=.04$; resesif genetik model) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFG ile kontrol ve XFS ile kontrol gruplarında ROC analizi sonucundaki testin “zayıf” (poor) olduğu, XFG ile XFS gruplarında ise ROC analizi sonucunda testin “başarısız” (fail) olduğu hesaplanmıştır. Bu tez çalışmasının sonucuna göre, XFG ve XFS hastalıkları ile plazmadaki hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi arasında bir ilişki olmadığı görülmüştür. Plazmadaki hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFS ile yaklaşık 2 kat ilişkili olduğu bulunmuş olmasına rağmen, XFG ve XFS hastalıklarında, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin tanı testi olarak kullanılamayacağı görülmüştür.

mir-196a-2 rs11614913 C/T genotipleri ile hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin birlikte analizi sonucunda ise, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi ortalamasının, CC, TC ve TT genotiplerinde, XFG grubundaki hastalar, XFS grubundaki hastalar ve kontrol grubundaki bireyler arasında istatistiki değerlendirmede anlamlı ölçüde fark göstermediği görülmüştür. Literatürde olan çalışmalarda, rs11614913 C/T SNP’sindeki CC genotipinin olgun miR-196a-2 seviyesini anlamlı ölçüde arttırdığı görülmüştür (Akkız vd., 2010; Hu vd., 2008). Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre ise rs11614913 C/T SNP genotipleri ile hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi arasında ilişki görülmemiştir.

Bu çalışmada hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi ile görme parametreleri arasındaki korelasyon incelendiğinde, kontrol grubunda, hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi ile MD ve PSD arasındaki korelasyonun negatif olduğu görülmüştür (sırasıyla: $P<.001$ ve $P<.001$). Literatürde hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi ile MD ve PSD değerleri arasında korelasyon analizi yapılan bir çalışma görülmemiştir.



5. SONUÇ

XFS, anormal fibriler birikintilerin göz dokularında üretilip birikmesi olarak tanımlanan bir hücre dışı matriks hastalığıdır (Bhat, 2010). XFS'nin patogeneğinde oksidatif ve hücrel stres ile inflamatuvar yolların rol oynadığı bilinmektedir. Aköz hümör sıvısının drenajını sağlayan kanalların eksfoliasyon birikintisi ile tıkanması ve bu suretle göz içi basıncının (GİB) artmasıyla ortaya çıkan XFG, tedavi edilmediği takdirde körlüğe sebep olabilmektedir. Genelde yaş arttıkça daha fazla gelişim gösterdiği bilinen XFS'nin erken tanısı ve hastalığın ilerlemesiyle meydana gelen görüş alanı daralmasının da kalıcı tedavisi bulunmamaktadır. Bu nedenle XFS'nin erken dönemde teşhisi önem arz etmektedir. Pek çok hastalıkta, hastalıklı doku ile normal doku miRNA'ları karşılaştırıldığında, aralarında önemli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir. Birçok çalışmada, miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin farklı biyolojik süreçlerde rolünün olduğu, hastalıkların tanı ve tedavisi gibi birçok alanda işlevlerinin olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, inflamasyon ile ilişkili yollarda rol oynadığı bilinen miR-146a ve miR-196a-2'nin plazma ekspresyon seviyeleri ile *mir-146a* rs2910164 G/C ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'lerinin XFS ve XFG hastalıkları için biyobelirteç olma potansiyelleri incelenmiştir.

Yapılan çalışmada, XFG hastalığında GİB, VFS ve PSD değerlerinin XFS ve kontrol gruplarına göre anlamlı ölçüde yüksek, MD değerinin ise düşük olduğu görülmüştür. XFG ile cinsiyet arasında ilişki bulunurken, XFS ile cinsiyet arasında ilişki bulunmamıştır. XFG hastalarında erkeklerin sayısının kadınlara oranla anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak XFS'li erkek hastalarının XFG oluşturma riskinin kadınlara göre daha yüksek olduğu söylenebilir. Bu sebeple bizim toplumumuzda XFS'li erkek hastalarının takibi daha sık yapılmalıdır.

Bu çalışmamızda, Türk popülasyonunda, XFS ve XFG hastalıklarında, *mir-146a* rs2910164 G/C SNP'sinin polimorfik C alel frekansı ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinin polimorfik T alel frekansı ilk defa belirlenmiştir. Bu SNP'lerin XFG ve XFS ile ilişkili olmadığı görülmüştür. Lojistik regresyon analizinde de SNP'ler ile XFG ve XFS arasında ilişki görülmemiştir.

mir-146a rs2910164 G/C SNP'sinde C alelinin ve *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP'sinde T alelinin görme parametrelerine etki etmediği görülmüştür.

Türk popülasyonunda ilk defa, XFS ve XFG hastalarının plazmalarında, hsa-miR-146a-5p ekspresyon seviyesi (fold change) belirlenmiştir. Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin (fold change) XFG ve XFS gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür. XFG ve XFS hastalıklarında *mir-146a* rs2910164 G/C SNP genotipleri ile hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesi arasında ilişki görülmemiştir. Lojistik regresyon analizleri sonucunda, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFG ile yaklaşık 6 kat (dominant genetik model) ve yaklaşık 5 kat (resesif genetik model) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFS ile yaklaşık 4 kat (dominant genetik model) ve yaklaşık 3 kat (resesif genetik model) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. XFG ve XFS hastalıklarında, plazmadaki hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin önemli role sahip olabileceği görülmüştür. Yapılan ROC ve hata matrisi analizlerine göre hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFG ve XFS için kan tabanlı biyobelirteç olma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Hastalarda, sadece plazma sıvısında hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesine (fold change) bakılarak hem XFG hem de XFS'nin erken teşhisinin yapılabileceği görülmüştür

Daha büyük popülasyonlarda ve farklı popülasyonlarda bizim çalışmamızı doğrulayacak ileri araştırmalar gerekmektedir. Bizim çalışmamız doğrultusunda, ileri araştırmalarda hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin (fold change), XFG ve XFS hastalıklarının tanı ve prognozunda biyobelirteç olma durumu incelenebilir. miR-146a ekspresyon seviyesinin Graves orbitopati, ADM, meme kanseri, mesane kanseri gibi hastalıklarda da arttığı gözlenmiştir (Jang vd., 2016; Ménard vd., 2016; Lukiw vd., 2012; Liang vd., 2019; Sasaki vd., 2016). Bu nedenle, miR-146a'nın XFS ve XFG teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılması halinde, miR-146a plazma ekspresyon seviyesinde artış görülen diğer Graves orbitopati, ADM, meme kanseri ve mesane kanseri için dışlama kriterlerinin dikkate alınması gerekir.

Türk popülasyonunda ilk defa, XFG ve XFS hastalıklarında hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi (fold change) incelenmiş ve XFG ve XFS hastalarının plazmaları ile kontrol bireylerin plazmalarında hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi bakımından (fold change) farklılık olmadığı görülmüştür. XFG ve XFS hastalıklarında *mir-196a-2* rs11614913 C/T SNP genotipleri ile hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesi arasında ilişki görülmemiştir. Lojistik regresyon analizinde, hsa-miR-196a-

5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFS ile yaklaşık 2 kat (resesif genetik model) ilişkili olduğu tespit edilmiştir Buna karşın, yapılan ROC analizlerine göre hsa-miR-196a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFG ve XFS hastalıklarında, tanı testi olarak kullanılamayacağı görülmüştür.

Özetle, hsa-miR-146a-5p relatif ekspresyon seviyesinin, XFG ve XFS için kan tabanlı biyobelirteç olma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Bu tez çalışması ileride XFG ve XFS'nin erken teşhisi, prognozun takibi ve tedavisinde kullanılabilecek yeni tanı testleri, biyosensörler ve terapötik ajanlar geliştirilmesine öncülük edecek potansiyele sahip sonuçlar ortaya koyması nedeniyle Biyomedikal Mühendisliğine katkı sağlayan bir projedir.





KAYNAKLAR

- Aasved, H.** (1971). Intraocular Pressure in Eyes With. *Acta*,**49**.
- Aboobakar, I.F., Johnson, W.M., Stamer, W.D., Hauser, M.A., Allingham, R.R.** (2016). Major review: Exfoliation syndrome; advances in disease genetics, molecular biology, and epidemiology. *Experimental Eye Research*,**154**, 88–103.
- Agiannitopoulos, K., Samara, P., Papadopoulou, M., Efthymiadou, A., Papadopoulou, E., Tsaousis, G.N., Mertzanos, G., Babalis, D., Lamnissou, K.** (2021). miRNA polymorphisms and risk of premature coronary artery disease. *Hellenic Journal of Cardiology*,**62**(4), 278–284.
- Akkız, H., Bayram, S., Bekar, A., Akgöllü, E., Ülger, Y.** (2010). A functional polymorphism in pre-microRNA-196a-2 contributes to the susceptibility of hepatocellular carcinoma in a Turkish population: A case-control study. *Journal of Viral Hepatitis*,**2011**(18), e399–e407.
- Al-Bdour, M.D., Al-Till, M.I., Idrees, G.M., Abu Samra, K.M.** (2008). Pseudoexfoliation syndrome at Jordan University Hospital. *Acta Ophthalmologica*,**86**(7), 755–757.
- Al-Saleh, S.A., Al-Dabbagh, N.M., Al-Shamrani, S.M., Khan, N.M., Arfin, M., Tariq, M., Al-Faleh, H.M.** (2015). Prevalence of ocular pseudoexfoliation syndrome and associated complications in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Med J*,**36**(1), 108–112.
- Al-Shaer, M., Bamashmus, M., Al-Barrag, A.** (2010). Point prevalence of pseudoexfoliation syndrome in patients scheduled for cataract surgery in eye camps in yemen. *Middle East African journal of ophthalmology*,**17**(1), 74–747.
- Alipoor, B., Ghaedi, H., Meshkani, R., Omrani, M.D., Sharifi, Z., Golmohammadi, T.** (2018). The rs2910164 variant is associated with reduced miR-146a expression but not cytokine levels in patients with type 2 diabetes. *Journal of Endocrinological Investigation*,**41**(5), 557–566.
- Alpay, H., Ersoy, G.** (1989). Pseudoexfoliation syndrome (a statistical study). *Turkish Journal of Ophthalmology*,**19**(1), 63–66.
- Anastasopoulos, E., Topouzis, F., Wilson, M.R., Harris, A., Pappas, T., Yu, F., Koskosas, A., Founti, P., Coleman, A.L.** (2011). Characteristics of Pseudoexfoliation in the Thessaloniki Eye Study.
- Andrikopoulos, G.K., Mela, E.K., Georgakopoulos, C.D., Papadopoulos, G.E., Damelou, A.N., Alexopoulos, D.K., Gartaganis, S.P.** (2009). Pseudoexfoliation syndrome prevalence in Greek patients with cataract and its association to glaucoma and coronary artery disease. *Eye*,**23**(2), 442–447.

- Aung, T., Ozaki, M., Mizoguchi, T.** (2015). HHS Public Access. *Nat Genet.*,**47**(4), 387–392.
- Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E., Bartel, D.P.** (2013). Beyond secondary structure: Primary-sequence determinants license Pri-miRNA hairpins for processing. *Cell*,**152**(4), 844–858.
- Baldeón R., L., Weigelt, K., de Wit, H., Ozcan, B., van Oudenaren, A., Sempértegui, F., Sijbrands, E., Grosse, L., Freire, W., Drexhage, H.A., Leenen, P.J.M.** (2014). Decreased Serum Level of miR-146a as Sign of Chronic Inflammation in Type 2 Diabetic Patients W. Lukiw, ed. *PLoS ONE*,**9**(12), e115209.
- Bhat, S.** (2010). Pseudo Exfoliation Syndrome: An identifiable cause of Open Angle Glaucoma. *Kerala Journal of Ophthalmology* **XXII** (4), 330–335.
- Bhatt, K., Lanting, L.L., Jia, Y., Yadav, S., Reddy, M.A., Magilnick, N., Boldin, M., Natarajan, R.** (2016). Anti-inflammatory role of microrna-146a in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*,**27**(8), 2277–2288.
- Bikbov, M.M., Zainullin, R.M., Gilmanshin, T.R., Kazakbaeva, G.M., Yakupova, D.F., Nuriev, I.F., Zaynetdinov, A.F., Khalimov, T.A., Panda-Jonas, S., Uzianbaeva, Y. V., Rakhimova, E.M., Rusakova, I.A., Salavatova, V.F., Arslangareeva, I.I., Bikbova, G.M., Nikitin, N.A., Jonas, J.B.** (2020). Prevalence and Associated Factors of Pseudoexfoliation in a Russian Population: The Ural Eye and Medical Study. *American journal of ophthalmology*,**210**, 158–166.
- Bogunia-Kubik, K., Wysoczańska, B., Piątek, D., Iwaszko, M., Ciechomska, M., Świerkot, J.** (2016). Significance of Polymorphism and Expression of miR-146a and NFkB1 Genetic Variants in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*,**64**(2016), 131–136
- Boschiero, M.N., Camporeze, B., Silva dos Santos, J., Borsari da Costa, L., Bonafé, G.A., de Souza Queiroz, L., Roost, D.V., Marson, F.A.L., Pires de Aguiar, P.H., Ortega, M.M.** (2020). The single nucleotide variant n.60G>C in the microRNA-146a associated. *Epilepsi Research* ,**162**,106305
- Bozkaya, Ö.** (2009). Klinisyenler İçin Mutasyon ve Polimorfizm. *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*,**18**(2), 47–53.
- Brajković, J., Kalauz-Surać, I., Ercegović, A., Miletić-Jurić, A., Sušić, N., Burić, Ž.** (2007). Ocular pseudoexfoliation syndrome and internal systemic diseases. *Acta Clinica Croatica*,**46**(1 SUPPL.1), 57–61.
- Browne, J.G., Ho, S.L., Kane, R., Oliver, N., Clark, A.F., O'Brien, C.J., Crean, J.K.** (2011). Connective tissue growth factor is increased in pseudoexfoliation glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*,**52**(6), 3660–3666.
- Budak, H., Bulut, R., Kantar, M., Alptekin, B.** (2016). MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. ,**15**(July 2015), 65–71.

- Can Demirdögen, B., Kocaç Akçin, C., Özge, G., Mumcuoğlu, T.** (2019a). Evaluation of tear and aqueous humor level, and genetic variants of connective tissue growth factor as biomarkers for early detection of pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *Experimental Eye Research*,**189**, 107837.
- Can Demirdögen, B., Koçan Akçin, C., Göksoy, E., Yakar, G., Öztepe, T., Demirkaya-Budak, S., Oflaz, S.** (2019b). Paraoxonase 1 (PON1) promoter (-107T/C) and coding region (192Q/R and 55L/M) genetic variations in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliative glaucoma risk. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*,**257**(10), 2257–2270.
- Can Demirdögen, B., Demirkaya-Budak, S., Özge, G., Mumcuoğlu, T.** (2020). Evaluation of Tear Fluid and Aqueous Humor Concentration of Clusterin as Biomarkers for Early Diagnosis of Pseudoexfoliation Syndrome and Pseudoexfoliative Glaucoma. *Current Eye Research*,**45**(7), 805–813.
- Chae, Y.S., Kim, J.G., Lee, S.J., Kang, B.W., Lee, Y.J., Park, J.Y., Jeon, H.S., Park, J.S., Choi, G.S.** (2013). A miR-146a polymorphism (rs2910164) predicts risk of and survival from colorectal cancer. *Anticancer Research*,**33**(8), 3233–3240.
- Challa, P.** (2009). Genetics of Pseudoexfoliation Syndrome Pratap. *Bone*,**23**(1), 1–7.
- Chen, C.J., Zhang, Y., Zhang, L., Weakley, S.M., Yao, Q.** (2011). MicroRNA-196: Critical roles and clinical applications in development and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*,**15**(1), 14–23.
- Chen, H.F., Hu, T.T., Zheng, X.Y., Li, M.Q., Luo, M.H., Yao, Y.X., Chen, Q., Yu, S.Y.** (2013). Association between miR-146a rs2910164 polymorphism and autoimmune diseases susceptibility: A meta-analysis. *Gene*,**521**(2), 259–264.
- Chin, L.J., Ratner, E., Leng, S., Zhai, R., Nallur, S., Babar, I., Muller, R.U., Straka, E., Su, L., Burki, E.A., Crowell, R.E., Patel, R., Kulkarni, T., Homer, R., Zelterman, D., Kidd, K.K., Zhu, Y., Christiani, D.C., Belinsky, S.A., Slack, F.J., Weidhaas, J.B.** (2008). A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Research*,**68**(20), 8535–8540.
- Ciccacci, C., Morganti, R., Di Fusco, D., D'Amato, C., Cacciotti, L., Greco, C., Rufini, S., Novelli, G., Sangiuolo, F., Marfia, G.A., Borgiani, P., Spallone, V.** (2014). Common polymorphisms in MIR146a, MIR128a and MIR27a genes contribute to neuropathy susceptibility in type 2 diabetes. *Acta Diabetologica*,**51**(4), 663–671.

- Colin, J., Gall, G. Le, Jeune, B. Le, Cambrai, M.D.** (1988). the Prevalence of Exfoliation Syndrome in Different Areas of France. *Acta Ophthalmologica*,**66**(184 S), 86–89.
- Conover, W.J.** (1980). *Practical Nonparametric Statistics*. Second Edi. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Cortez, M.A., Calin, G.A.** (2009). MicroRNA identification in plasma and serum: A new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy*,**9**(6), 703–711.
- Croce, C.** (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *PLoS ONE*,**10**(10), 704–714.
- Cui, L., Li, Y., Ma, G., Wang, Y., Cai, Y., Liu, S., Chen, Y., Li, J., Xie, Y., Liu, G., Zhao, B., Li, K.** (2014). A functional polymorphism in the promoter region of microRNA-146a is associated with the risk of alzheimer disease and the rate of cognitive decline in patients. *PLoS ONE*,**9**(2).
- Cumurcu, T., Kilic, R., Yologlu, S.** (2010). The frequency of pseudoexfoliation syndrome in the middle Black Sea region of Turkey. *European Journal of Ophthalmology*,**20**(6), 1007–1011.
- Dai, Z.M., Kang, H.F., Zhang, W.G., Li, H.B., Zhang, S.Q., Ma, X.B., Lin, S., Wang, M., Feng, Y.J., Liu, K., Liu, X.H., Xu, P., Dai, Z.J.** (2016). The Associations of Single Nucleotide Polymorphisms in miR196a2, miR-499, and miR-608 With Breast Cancer Susceptibility. *Medicine*,**95**(7), e2826.
- Davanger, M., Ringvold, A., Blika, S.** (1991). The frequency distribution of the glaucoma tolerance limit. *Acta Ophthalmologica*,**69**(6), 782–785.
- Demirkaya Budak, S.** (2018). PSÖDOEKSFOLİASYON SENDROMU VE GLOKOMU İLE CLUSTERİN GENETİK POLİMORFİZMLERİ VE CLUSTERİN GÖZYAŞI VE AKÖZ HUMOR SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ. (*Yüksek Lisans tezi*).
- Deng, S., Wang, W., Li, X., Zhang, P.** (2015). Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs and risk of bladder cancer. *World Journal of Surgical Oncology*,**13**(1), 1–8.
- Dewundara, S., Pasquale, L.R.** (2015). Exfoliation syndrome: a disease with an environmental component. *Current opinion in ophthalmology*,**26**(2), 78.
- Dezfuli, N.K., Adcock, I.M., Alipoor, S.D., Seyfi, S., Salimi, B., Mafi Golchin, M., Dalil Roofchayee, N., Varhram, M., Mortaz, E.** (2020). The miR-146a SNP Rs2910164 and miR-155 SNP rs767649 Are Risk Factors for Non-Small Cell Lung Cancer in the Iranian Population. *Canadian Respiratory Journal*,**2020**.
- Dluzen, D.F., Noren Hooten, N., Zhang, Y., Kim, Y., Glover, F.E., Tajuddin, S.M., Jacob, K.D., Zonderman, A.B., Evans, M.K.** (2016). Racial differences in microRNA and gene expression in hypertensive women. *Scientific Reports*,**6**(April), 1–14.

- Donderski, R., Szczepanek, J., Naruszewicz, N., Naruszewicz, R., Tretyn, A., Skoczylas-Makowska, N., Tyloch, J., Odrowąż-Sypniewska, G., Manitus, J.** (2021). Analysis of profibrogenic microRNAs (miRNAs) expression in urine and serum of chronic kidney disease (CKD) stage 1-4 patients and their relationship with proteinuria and kidney function. *International urology and nephrology*.
- Doucette, L.P., Rasnitsyn, A., Seifi, M., Walter, M.A.** (2015). The interactions of genes, age, and environment in glaucoma pathogenesis. *Survey of Ophthalmology*,**60**(4), 310–326.
- Drewry, M.D., Challa, P., Kuchtey, J.G., Navarro, I., Helwa, I., Hu, Y., Mu, H., Stamer, W.D., Kuchtey, R.W., Liu, Y.** (2018). Differentially expressed microRNAs in the aqueous humor of patients with exfoliation glaucoma or primary open-angle glaucoma. *Human Molecular Genetics*,**27**(7), 1263–1275.
- Dursun, B., Keklikçi, S.U., Dursun, M.E., Yıldırım, M., Erdem, S.** (2016). Primer açık açılı glokom tanı ve takibinde bilgisayarlı görme alanı ile optikal koherens tomografinin karşılaştırılması Comparasion of computerized visual field and optical coherence tomography in diagnosis and follow-up of primary open-angle glaucoma. *Dicle Medical Journal*,**43**(3), 441–451.
- El-Samahy, M.H., Adly, A.A., Elhenawy, Y.I., Ismail, E.A., Pessar, S.A., Mowafy, M.E.S., Saad, M.S., Mohammed, H.H.** (2017). Urinary miRNA-377 and miRNA-216a as biomarkers of nephropathy and subclinical atherosclerotic risk in pediatric patients with type 1 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*,**32**(2), 185–192.
- Farokhizadeh, Z., Dehbidi, S., Geramizadeh, B., Yaghobi, R., Malekhosseini, S.A., Behmanesh, M., Sanati, M.H., Afshari, A., Moravej, A., Karimi, M.H.** (2018). Association of MicroRNA polymorphisms with hepatocellular carcinoma in an iranian population. *Annals of Laboratory Medicine*,**39**(1), 58–66.
- Fawzy, M.S., Hussein, M.H., Abdelaziz, E.Z., Yamany, H.A., Ismail, H.M., Toraih, E.A.** (2016). Association of microRNA-196a2 variant with response to short-acting β 2-agonist in COPD: An Egyptian pilot study. *PLoS ONE*,**11**(4), 1–15.
- Fenoglio, C., Cantoni, C., De Riz, M., Ridolfi, E., Cortini, F., Serpente, M., Villa, C., Comi, C., Monaco, F., Mellesi, L., Valzelli, S., Bresolin, N., Galimberti, D., Scarpini, E.** (2011). Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience Letters*,**504**(1), 9–12.
- Fernández-Hernando, C.C.M.R., Goedeke, L., Suárez, Y.** (2014). MicroRNAs in Metabolic Disease Carlos. ,**33**(2), 178–185.
- Forsius, H.** (1988). Exfoliation Syndrome in Various Ethnic Populations. *Acta Ophthalmologica*,**66**(184 S), 71–85.
- Gangaraju, V.K., Lin, H.** (2009). MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*,**10**(2), 116.

- Gao, X., Zhu, Z., Zhang, S.** (2018). MIR-146a rs2910164 polymorphism and the risk of colorectal cancer in Chinese population. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*,**14**(8), S97–S99.
- Gelaw, Y., Tibebe, Y.** (2012). Clinical characteristics of cataract patients with pseudoexfoliation syndrome at jimma university specialized hospital, Southwest ethiopia. *Ethiopian journal of health sciences*,**22**(1), 1–6.
- Ghaffari Sharaf, M., Damji, K.F., Unsworth, L.D.** (2019). Recent advances in risk factors associated with ocular exfoliation syndrome. *Acta Ophthalmologica*,**98**(2), 113–120.
- Ghanem, A.A., Arafa, L.F., El-Baz, A.** (2011). Connective tissue growth factor and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in patients with exfoliative glaucoma. *Current Eye Research*,**36**(6), 540–545.
- Gillies, W.E.** (1972). Racial incidence of pseudoexfoliation of the lens capsule. *British Journal of Ophthalmology*,**56**(6), 474–477.
- Glennon-Alty, L., Hackett, A.P., Chapman, E.A., Wright, H.L.** (2018). Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. *Free Radical Biology and Medicine*,**125**, 25–35.
- Gong, H.B., Zhang, S.L., Wu, X.J., Pu, X.M., Kang, X.J.** (2019). Association of rs2910164 polymorphism in MiR-146a gene with psoriasis susceptibility: A meta-analysis. *Medicine*,**98**(6), e14401.
- Gradle, H.S., Sugar, H.S.** (1947). Glaucoma capsulare. *American Journal of Ophthalmology*,**30**(1), 12–19.
- Grasedieck, S., Sorrentino, A., Langer, C., Buske, C., Döhner, H., Mertens, D., Kuchenbauer, F.** (2013). Circulating microRNAs in hematological diseases: Principles, challenges, and perspectives. *Blood*,**121**(25), 4977–4984.
- Griffiths-Jones, S.** (2006). miRBase: microRNA sequences, targets, and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*,**34**(90001), D140–D144.
- Grossman, E.** (2008). Does increased oxidative stress cause hypertension? *Diabetes care*,**31** Suppl 2(17).
- Grzybowski, A., Kanclerz, P., Ritch, R.** (2019). The history of exfoliation syndrome. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*,**8**(1), 55–61.
- Güzelgöl, F., Aksoy, K.** (2015). Bir Gen İfade Düzenleyicisi miRNA. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*,**24**(4), 472.
- Hammond, S.M.** (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Review*,**87**, 3–14.
- Hashemi, M., Moradi, N., Ziaee, S.A.M., Narouie, B., Soltani, M.H., Rezaei, M., Shahkar, G., Taheri, M.** (2016). Association between single nucleotide polymorphism in miR-499, miR-196a2, miR-146a and miR-149 and prostate cancer risk in a sample of Iranian population. *Journal of Advanced Research*,**7**(3), 491–498.

- Helin-Toiviainen, M., Rönkkö, S., Kaarniranta, K., Puustjärvi, T., Rekonen, P., Ollikainen, M., Uusitalo, H.** (2017). Oxidized low-density lipoprotein, lipid and calcium aggregates reveal oxidative stress and inflammation in the conjunctiva of glaucoma patients. *Acta Ophthalmologica*,**95**(4), 378–385.
- Hindle, A.G., Thoonen, R., Jasien, J. V, Grange, R.M.H., Amin, K., Wise, J., Ozaki, M., Ritch, R., Malhotra, R., Buys, E.S.** (2018). Identification of Candidate miRNA Biomarkers for Glaucoma.
- Hinske, L.C.G., Galante, P.A.F., Kuo, W.P., Ohno-Machado, L.** (2010). A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome. *BMC Genomics*,**11**(1).
- Ho, S.L., Dogar, G.F., Wang, J., Crean, J., Wu, Q.D., Oliver, N., Weitz, S., Murray, A., Cleary, P.E., O'Brien, C.** (2005). Elevated aqueous humour tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome. *British Journal of Ophthalmology*,**89**(2), 169–173.
- Hodgkinson, C.P., Kang, M.H., Dal-Pra, S., Mirotso, M., Dzau, V.J.** (2015). MicroRNAs and cardiac regeneration. *Circulation research*,**116**(10), 1700.
- Hoff, K., Herisen, H., Kjerrsvik, S., Rossvold, I.** (1991). The Middle-Norway eye-screening study. ,**69**, 273–280.
- Hong, Y.S., Kang, H.J., Kwak, J.Y., Park, B.L., You, C.H., Kim, Y.M., Kim, H.** (2011). Association between MicroRNA196a2 rs11614913 genotypes and the risk of non-small cell lung cancer in Korean population. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*,**44**(3), 125–130.
- Hu, Y., Yu, C.Y., Wang, J.L., Guan, J., Chen, H.Y., Fang, J.Y.** (2014). MicroRNA sequence polymorphisms and the risk of different types of cancer. *Scientific Reports*,**4**, 1–8.
- Hu, Z., Chen, J., Tian, T., Zhou, X., Gu, H., Xu, L., Zeng, Y., Miao, R., Jin, G., Ma, H., Chen, Y., Shen, H.** (2008). Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *The Journal of Clinical Investigation*,**118**, 2600–2608.
- Huang et al.** (2013). A single-nucleotide polymorphism of miR-196a-2 and vitiligo: an association study and functional analysis in a Han Chinese population.
- Huang, Y., Xiao, Ye, Liu, Y., Guo, M., Guo, Q., Zhou, F., Liu, T., Su, T., Xiao, Yuzhong, Luo, X.H.** (2019). MicroRNA-188 regulates aging-associated metabolic phenotype. *Aging Cell*,**19**(1).
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C.B., Rahu, N.** (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?
- Jang, S.Y., Chae, M.K., Lee, J.H., Lee, E.J., Yoon, J.S.** (2016). Role of miR-146a in the Regulation of Inflammation in an In Vitro Model of Graves' Orbitopathy., (57), 4027–4034.

- Jazdzewski, K., Murray, L., Franssila, K., Jarzab, B., Schoenberg, D.R., Chapelle, A.** (2008). Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**105**(20), 7269.
- Jiménez-Morales, S., Gamboa-Becerra, R., Baca, V., Del Río-Navarro, B.E., López-Ley, D.Y., Velázquez-Cruz, R., Saldaña-Alvarez, Y., Salas-Martínez, G., Orozco, L.** (2012). MiR-146a polymorphism is associated with asthma but not with systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis in Mexican patients. *Tissue Antigens*,**80**(4), 317–321.
- Jonas, J.B., Gründler, A.E.** (1998). Prevalence of diabetes mellitus and arterial hypertension in primary and secondary open-angle glaucomas. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*,**236**(3), 202–206.
- Jones, W., White, R., Magnus, D.** (1992). Increased occurrence of exfoliation in the male, Spanish American population of New Mexico. *Journal Am Optom Assoc.*,**63**(9), 643–8.
- Kaljurand, K., Teesalu, P.** (2010). Prevalence of exfoliation syndrome in Estonia. *European Journal of Ophthalmology*,**20**(6), 1012–1017.
- Kamal, A., Elgengehy, F.T., Elawady, Z., Fawzy, N.A., El Sisi, O.** (2021). Role of miR-146a rs2910164 and UTS2 rs228648 Genetic Variants in Behçet's Disease. *Immunological Investigations*,**00**(00), 1–10.
- Kang, J.H., Loomis, S., Wiggs, J.L., Stein, J.D., Pasquale, L.R.** (2012). Demographic and Geographic Features of Exfoliation Glaucoma in Two United States-based Prospective Cohorts. *Ophthalmology*,**119**(1), 27.
- Karger, R.A., Jeng, S.M., Johnson, D.H., Hodge, D.O., Good, M.S.** (2003). Estimated Incidence of Pseudoexfoliation Syndrome and Pseudoexfoliation Glaucoma in Olmsted County, Minnesota., 193–197.
- Kim, Y.-K.** (2015). Extracellular microRNAs as Biomarkers in Human Disease. *Chonnam Medical Journal*,**51**(2), 51.
- Kim, Y.R., Hong, S.H.** (2016). Associations of MicroRNA Polymorphisms (MIR-146a, MIR-196a2, and MIR-499) with the Risk of Hypertension in the Korean Population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*,**20**(8), 420–426.
- King, A., Azuara-Blanco, A., Tuulonen, A.** (2013). Glaucoma. *BMJ (Online)*,**346**(7912), 1–9.
- Kirik, M.P., Pehlivan, M., Nursal, A.F., Oyaci, Y., Pehlivan, S., Serin, I.** (2020). The miRNA 196a2 rs11614913 variant has prognostic impact on Turkish patients with multiple myeloma. *BMC Research Notes*,**13**(1), 1–6.

- Kılıç, R., Karagöz, N., Çetin, A.B., Çakmak, Y., Sezer, H., Özay, Y.** (2016). The prevalence of exfoliation syndrome in Turkey. *Acta Ophthalmologica*,**94**, e105–e108.
- Kılıç, S.** (2013). ROC Analysis in Clinical Decision Making. *Journal of Mood Disorders*,**3**(3), 135.
- Koçan, C.** (2018). PSÖDOEKSFOLİASYON SENDROMU VE GLOKOMU İLE BAĞ DOKUSU BÜYÜME FAKTÖRÜ (CTGF) GENETİK POLİMORFİZMLERİ VE CTGF GÖZYAŞI VE AKÖZ SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ. (*Yüksek Lisans tezi*).
- Koliakos, G.G., Konstas, A.G.P., Schlötzer-Schrehardt, U., Bufidis, T., Georgiadis, N., Ringvold, A.** (2002). Ascorbic acid concentration is reduced in the aqueous humor of patients with exfoliation syndrome. *American Journal of Ophthalmology*,**134**(6), 879–883.
- Koliakos, G.G., Konstas, A.G.P., Schlötzer-Schrehardt, U., Hollo, G., Katsimbris, I.E., Georgiadis, N., Ritch, R.** (2003). 8-Isoprostaglandin F2a and ascorbic acid concentration in the aqueous humour of patients with exfoliation syndrome. *British Journal of Ophthalmology*,**87**(3), 353–356.
- Kong, L., Zhu, J., Han, W., Jiang, X., Xu, M., Zhao, Y., Dong, Q., Pang, Z., Guan, Q., Gao, L., Zhao, J., Zhao, L.** (2011). Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. *Acta Diabetologica*,**48**(1), 61–69.
- Konstas, A.G.P., Ringvold, A.** (2018). Epidemiology of Exfoliation Syndrome. *Journal of glaucoma*,**27**(7), S4–S11.
- Kontaraki, J.E., Marketou, M.E., Zacharis, E.A., Parthenakis, F.I., Vardas, P.E.** (2014). Differential expression of vascular smooth muscle-modulating microRNAs in human peripheral blood mononuclear cells: Novel targets in essential hypertension. *Journal of Human Hypertension*,**28**(8), 510–516.
- Kozart, D.M., Yanoff, M.** (1982). Intraocular Pressure Status in 100 Consecutive Patients with Exfoliation Syndrome. *Ophthalmology*,**89**(3), 214–218.
- Kozobolis, V.P., Papatzanaki, M., Vlachonikolis, I.G., Pallikaris, I.G., Tsambarlakis, I.G.** (1997). Epidemiology of pseudoexfoliation in the island of Crete (Greece). *Acta Ophthalmologica Scandinavica*,**75**(6), 726–729.
- Lahiri, D.K., Schnabel, B.** (1993). DNA isolation by a rapid method from human blood samples: Effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochemical Genetics*,**31**(7–8), 321–328.
- Lavanya, R., Wong, T.Y., Friedman, D.S., Aung, H.T., Alfred, T., Gao, H., Seah, S.K., Kashiwagi, K., Foster, P.J., Aung, T.** (2008). Determinants of angle closure in older Singaporeans. *Archives of Ophthalmology*,**126**(5), 686–691.
- Lee, H., Han, S., Kwon, C.S., Lee, D.** (2016). Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein & Cell*,**7**(2), 100.

- Lee, J.W., Kim, N., Park, J.H., Kim, H.J., Chang, H., Kim, J.M., Kim, J.W., Lee, D.H.** (2017). Differential MicroRNA Expression Between Gastric Cancer Tissue and Non-cancerous Gastric Mucosa According to Helicobacter pylori Status. *Journal of Cancer Prevention*,**22**(1), 33–39.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V.** (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*,**75**(5), 843–854.
- Li, C., Fu, W., Zhang, Y., Zhou, L., Mao, Z., Lv, W., Li, J., Zhou, Y.** (2015). Meta-analysis of microRNA-146a rs2910164 G>C polymorphism association with autoimmune diseases susceptibility, an update based on 24 studies. *PLoS ONE*,**10**(4), 1–12.
- Li, L., Chen, X.P., Li, Y.J.** (2010). MicroRNA-146a and human disease. *Scandinavian Journal of Immunology*,**71**(4), 227–231.
- Li, X. D., Li, Z.G., Song, X.X., Liu, C.F.** (2010). A variant in microRNA-196a2 is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese patients with cirrhosis. *Pathology*,**42**(7), 669–673.
- Liang, H., Huang, W., Wang, Y., Ding, L., Zeng, L.** (2019). Overexpression of MiR-146a-5p Upregulates lncRNA HOTAIR in Triple-Negative Breast Cancer Cells and Predicts Poor Prognosis. *Technology in cancer research & treatment*, **18**, 1533033819882949.
- Liu, L., An, X., Li, Z., Song, Y., Li, L., Zuo, S., Liu, N., Yang, G., Wang, H., Cheng, X., Zhang, Y., Yang, X., Wang, J.** (2016). The H19 long noncoding RNA is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovascular Research*,**111**(1), 56–65.
- Liu, Y., Gao, G., Yang, C., Zhou, K., Shen, B., Liang, H., Jiang, X.** (2014). The role of circulating microRNA-126 (miR-126): A novel biomarker for screening prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*,**15**(6), 10567–10577.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*,**25**(4), 402–408.
- Lukiw, W.J., Surjyadipta, B., Dua, P., Alexandrov, P.N.** (2012). Common micro RNAs (miRNAs) target complement factor H (CFH) regulation in Alzheimer's disease (AD) and in age-related macular degeneration (AMD). *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*,**3**(1), 105.
- Luo, X., Yang, W., Ye, D.Q., Cui, H., Zhang, Y., Hirankarn, N., Qian, X., Tang, Y., Lau, Y.L., de Vries, N., Tak, P.P., Tsao, B.P., Shen, N.** (2011). A functional variant in microRNA-146a promoter modulates its expression and confers disease risk for systemic lupus erythematosus. *PLoS Genetics*,**7**(6).
- Lynam-Lennon, N., Maher, S.G., Reynolds, J. V.** (2009). The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*,**84**(1), 55–71.

- Ma, X., Becker Buscaglia, L.E., Barker, J.R., Li, Y.** (2011). MicroRNAs in NF- κ B signaling. *Journal of Molecular Cell Biology*,**3**(3), 159–166.
- Macfarlane, L., Murphy, P.R.** (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer., 537–561.
- Madden, J.G., Crowley, M.J.** (1982). Factors in the exfoliation syndrome. *British Journal of Ophthalmology*,**66**(7), 432–437.
- Maffioletti, E., Milanesi, E., Ansari, A., Zanetti, O., Galluzzi, S., Geroldi, C., Gennarelli, M., Bocchio-Chiavetto, L.** (2020). miR-146a Plasma Levels Are Not Altered in Alzheimer’s Disease but Correlate with Age and Illness Severity. *Frontiers in Aging Neuroscience*,**11**(January), 11–14.
- Marques, F.Z., Campain, A.E., Tomaszewski, M., Zukowska-Szczechowska, E., Yang, Y.H.J., Charchar, F.J., Morris, B.J.** (2011). Gene expression profiling reveals renin mRNA overexpression in human hypertensive kidneys and a role for microRNAs. *Hypertension*,**58**(6), 1093–1098.
- McCarty, C.A., Taylor, H.R.** (2000). Pseudoexfoliation syndrome in Australian adults. *American Journal of Ophthalmology*,**129**(5), 629–633.
- McMonnies, C.W.** (2017). Glaucoma history and risk factors. *Journal of Optometry*,**10**(2), 71.
- Ménard, C., Rezende, F.A., Miloudi, K., Wilson, A., Tétreault, N., Hardy, P., SanGiovanni, J.P., De Guire, V., Sapieha, P.** (2016). MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD. *Oncotarget*,**7**(15), 19171–19184.
- Meyer, E., Haim, T., Zonis, S., Gidoni, O., Gitay, H., Levanon, D., Nir, I.** (1984). Pseudoexfoliation: Epidemiology, Clinical and Scanning Electron Microscopic Study. *Ophthalmologica*,**188**, 141–147.
- Mitchell, P.** (1999). The relationship between glaucoma and Pseudoexfoliation. *Arch Ophthalmology*,**117**.
- Mitchell, P., Jie J. W., Smith, W.** (1997). Association of Pseudoexfoliation Syndrome with Increased Vascular Risk. *American Journal of Ophthalmology*,**124**(5), 685–687.
- Miyazaki, M., Kubota, T., Kubo, M., Kiyohara, Y., Iida, M., Nose, Y., Ishibashi, T.** (2005). The prevalence of pseudoexfoliation syndrome in a Japanese population: the Hisayama study. *Journal of glaucoma*,**14**(6), 482–484.
- Montezano, A.C., Dulak-Lis, M., Tsiropoulou, S., Harvey, A., Briones, A.M., Touyz, R.M.** (2015). Oxidative stress and human hypertension: Vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Canadian Journal of Cardiology*,**31**(5), 631–641.
- Moreno-Montanis, J., Alcolea-Paredes, A., Campos-Garcia, S.** (1989). Prevalence of pseudoexfoliation syndrome in the northwest of Spain. *Acta Ophthalmol.*, (67), 383-385.
- Naumann, G.O.H., Schlötzer-Schrehardt, U., Küchle, M.** (1998). Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist: Intraocular and systemic manifestations. *Ophthalmology*,**105**(6), 951–968.

- Ng, M., Sample, P.A., Pascual, J.P., Girkin, C.A., Liebmann, J.M., Weinreb, R.N., Racette, L.** (2012). Comparison of visual field severity classification systems for glaucoma. *Journal of glaucoma*, 21(8), 551–561.
- Nielsen, L.B., Wang, C., Sørensen, K., Bang-Berthelsen, C.H., Hansen, L., Andersen, M.L.M., Hougaard, P., Juul, A., Zhang, C.Y., Pociot, F., Mortensen, H.B.** (2012). Circulating levels of MicroRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: Evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Experimental Diabetes Research*, 2012.
- Nongpiur, M.E., Ku, J.Y.F., Aung, T.** (2011). Angle closure glaucoma: A mechanistic review. *Current Opinion in Ophthalmology*, 22(2), 96–101.
- Okubo, M., Tahara, T., Shibata, T., Yamashita, H., Nakamura, M., Yoshioka, D., Yonemura, J., Kamiya, Y., Ishizuka, T., Nakagawa, Y., Nagasaka, M., Iwata, M., Yamada, H., Hirata, I., Arisawa, T.** (2011). Association study of common genetic variants in pre-microRNAs in patients with ulcerative colitis. *Journal of Clinical Immunology*, 31(1), 69–73.
- Okutucu, M., Findik, H., Aslan, M.G., Arpa, M.** (2020). Is Netrin-1 Deficiency Responsible for Inflammation and Systemic Diseases Related to Pseudoexfoliation? *Journal of Glaucoma*, 29(11), 1077–1081.
- Olawoye, O.O., Ritch, L.R.P.R.** (2014). Exfoliation syndrome in sub-Saharan Africa. *International Ophthalmology*, 34(5), 1165–1173.
- Olena, A., Patton, J.** (2010). NIH Public Access. *J Cell Physiol.*, 222(3), 540–545.
- Oner, T., Yenmis, G., Tombulturk, K., Cam, C., Kucuk, O.S., Yakicier, M.C., Dizman, D., Sultuybek, G.K.** (2015). Association of Pre-miRNA-499 rs3746444 and Pre-miRNA-146a rs2910164 Polymorphisms and Susceptibility to Behcet's Disease. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 19(8), 424–430.
- Ovodenko, B., Rostagno, A., Neubert, T.A., Shetty, V., Thomas, S., Yang, A., Liebmann, J., Ghiso, J., Ritch, R.** (2007). Proteomic analysis of exfoliation deposits. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(4), 1447–1457.
- Park, R., Lee, W.J., Ji, J.D.** (2016). Association between the three functional miR-146a single-nucleotide polymorphisms, rs2910164, rs57095329, and rs2431697, and autoimmune disease susceptibility: A meta-analysis. *Autoimmunity*, 49(7), 451–458.
- Pasquale, L.R., Kang, J.H., Manson, J.A.E., Willett, W.C., Rosner, B.A., Hankinson, S.E.** (2006). Prospective Study of Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Primary Open-Angle Glaucoma in Women. *Ophthalmology*, 113(7), 1081–1086.
- Pasquale, L.R., Kang, J.H., Wiggs, J.L.** (2014). Prospects for gene-environment interactions in exfoliation syndrome. *Journal of Glaucoma*, 23(8), S64–S67.
- Pasquale, L.R., Wiggs, J.L., Willett, W.C., Kang, J.H.** (2012). The Relationship between caffeine and coffee consumption and exfoliation glaucoma or glaucoma suspect: a prospective study in two cohorts. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(10), 6427–6433.

- Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., Chan, E.K.L.** (2008). Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Research and Therapy*,**10**(4).
- Qi, H., Liu, Z., Liu, B., Cao, H., Sun, W., Yan, Y., Zhang, L.** (2017). Micro-RNA screening and prediction model construction for diagnosis of salt-sensitive essential hypertension. *Medicine (United States)*,**96**(17).
- Qu, S., Qiu, O., Huang, J., Liu, J., Wang, H.** (2021). Upregulation of hsa-miR-196a-5p is associated with MIR196A2 methylation and affects the malignant biological behaviors of glioma. *Genomics*,**113**(3), 1001–1010.
- Ramírez-bello, J., Jiménez-morales, M.** (2017). Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases.
- Ramkaran, P., Khan, S., Phulukdaree, A., Moodley, D., Chuturgoon, A.A.** (2014). miR-146a Polymorphism Influences Levels of miR-146a, IRAK-1, and TRAF-6 in Young Patients with Coronary Artery Disease. *Cell Biochemistry and Biophysics*,**68**(2), 259–266.
- Rao, A., Padhy, D.** (2014). Pattern of pseudoexfoliation deposits on the lens and their clinical correlation- clinical study and review of literature. *PLoS ONE*,**9**(12), 1–15.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquienelli, A.E., Bettlinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G.** (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*,**403**(6772), 901–906.
- Ren, Y.G., Zhou, X.M., Cui, Z.G., Hou, G.** (2016). Effects of common polymorphisms in miR-146a and miR-196a2 on lung cancer susceptibility: A meta-analysis. *Journal of Thoracic Disease*,**8**(6), 1297–1305.
- Ritch, R.** (2008). The management of exfoliative glaucoma. *Progress in Brain Research*,**173**(08), 211–224.
- Ritch, R., Schlötzer-Schrehardt, U.** (2001). Exfoliation syndrome. *Survey of Ophthalmology*,**45**(4).
- Ritch, R., Schlötzer-Schrehardt, U., Konstas, A.G.P.** (2003). Why is glaucoma associated with exfoliation syndrome? *Progress in Retinal and Eye Research*,**22**(3), 253–275.
- Ritland, J.S., Egge, K., Lydersen, S., Juul, R., Semb, S.O.** (2004). Exfoliative glaucoma and primary open-angle glaucoma: Associations with death causes and comorbidity. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*,**82**(4), 401–404.
- Romero-Aroca, P., Masip-Serra, R., Martínez-Salcedo, I., Salvat-Serra, M., Fernández-Ballart, J., Bautista-Pérez, Á.** (2011). High prevalence of pseudoexfoliation syndrome and its complications in Tarragona in northeast Spain. *European Journal of Ophthalmology*,**21**(5), 580–588.

- Rönkkö, S., Rekonen, P., Kaarniranta, K., Puustjärvi, T., Teräsvirta, M., Uusitalo, H.** (2007). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the chamber angle of normal eyes and patients with primary open-angle glaucoma and exfoliation glaucoma. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*,**245**(5), 697–704.
- Rumelaitienė, U., Žaliūnienė, D., Špečkauskas, M., Tamošiūnas, A., Radišauskas, R., Jusevičiūtė, E., Vainauskas, V., Bernotienė, G.** (2020). Link of ocular pseudoexfoliation syndrome and vascular system changes: results from 10-year follow-up study. *International ophthalmology*,**40**(4), 957–966.
- Rusca, N., Monticelli, S.** (2011). MiR-146a in Immunity and Disease. *Molecular Biology International*,**2011**, 1–7.
- Ryan, B.M., Robles, A.I., Harris, C.C.** (2010). Genetic variation in microRNA networks: The implications for cancer research. *Nature Reviews Cancer*,**10**(6), 389–402.
- Şahin, T.** (2019). How to Approach the Patients with High Intraocular Pressure? *BOĞAZIÇI Ti Dergisi*,**6**(2), 49–53.
- Sasaki, H., Yoshiike, M., Nozawa, S., Usuba, W., Katsuoka, Y., Aida, K., Kitajima, K., Kudo, H., Hoshikawa, M., Yoshioka, Y., Kosaka, N., Ochiya, T., Chikaraisshi, T.** (2016). Expression Level of Urinary MicroRNA-146a-5p Is Increased in Patients with Bladder Cancer and Decreased in Those After Transurethral Resection. *Clinical genitourinary cancer*, *14*(5), e493–e499.
- Schlötzer-Schrehardt, U.** (2011). Genetics and genomics of pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *Middle East African Journal of Ophthalmology*,**18**(1), 30–36.
- Schlötzer-Schrehardt, U.** (2009). Oxidativer stress beim pseudoexfoliationsglaukom. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*,**227**(2), 108–113.
- Schlötzer-Schrehardt, U., Lommatzsch, J., Küchle, M., Konstas, A.G.P., Naumann, G.O.H.** (2003). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in aqueous humor of patients with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma and primary open-angle glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*,**44**(3), 1117–1125.
- Schlötzer-Schrehardt, U., Naumann, G.O.H.** (2006). Ocular and Systemic Pseudoexfoliation Syndrome. *American Journal of Ophthalmology*,**141**(5).
- Schlötzer-Schrehardt vd** (1992). Syndrome Systemic Ocular Manifestation of a. *Arch*,**110**, 1752–2756.
- Schlötzer Schrehardt, U., Küchle, M., Naumann, G.O.H.** (1991). Electron-microscopic Identification of Pseudoexfoliation Material in Extrabulbar Tissue. *Archives of Ophthalmology*,**109**(4), 565–570.
- Shafiq, I., Sharif-ul-hasan, K.** (2007). Pseudoexfoliation (PEX) Glaucoma Over the Age of 40 Years; a Hospital Based Study. *23*(4), 221–227.

- Shakya, S., Koirala, S., Kamcharya, P.C.** (2004). Pseudoexfoliation syndrome in Nepal: a hospital-based retrospective study. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*,**16**, 13–16.
- Shazly, T.A., Farrag, A.N., Kamel, A., Al-Hussaini, A.K.** (2011). Prevalence of pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma in Upper Egypt. *BMC Ophthalmology*,**11**(1), 18.
- Shen, L., Walter, S., Melles, R.B., Glymour, M.M., Jorgenson, E.** (2016). Diabetes Pathology and Risk of Primary Open-Angle Glaucoma: Evaluating Causal Mechanisms by Using Genetic Information. *American Journal of Epidemiology*,**183**(2), 147–155.
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.** (2017). Oxidative stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*,**36**(2), 147–154.
- Simonato, M.** (2018). Epilepsy an Update on Disease Mechanisms: The Potential Role of MicroRNAs. *9*(March).
- Siordia, J.A., Franco, J., Golden, T.R., Dar, B.** (2016). Ocular Pseudoexfoliation Syndrome Linkage to Cardiovascular Disease. *Current cardiology reports*,**18**(7).
- Sollosy, M.** (2004). Incidence of the uveal pseudoexfoliation syndrome in patients with diabetes mellitus. *Ophthalmologia*, 76–80.
- Sönmezoğlu, Ö.A.** (2010). Tek Nükleotid Farklılıkları (Snp) ve Buğdayda Kullanımı. *3*(2), 55–66.
- Soyocak, A.** (2018). MikroRNA Polimorfizmleri ve Kanser. *Tıp Fakültesi Klinikleri*,**1**(1), 1–18.
- Stein, J.D., Pasquale, L.R., Talwar, N., Kim, D.S., Reed, D.M., Nan, B., Kang, J.H., Wiggs, J.L., Richards, J.E.** (2011a). Geographic and climatic factors associated with exfoliation syndrome. *Archives of Ophthalmology*,**129**(8), 1053–1060.
- Stein, J.D., Pasquale, L.R., Talwar, N., Kim, D.S., Reed, D.M., Nan, B., Kang, J.H., Wiggs, J.L., Richards, J.E.** (2011b). Geographic and Climatic Factors Associated with the Exfoliation Syndrome. *Archives of ophthalmology*,**129**(8), 1053.
- Streeten, B.W.** (1987). Pseudoexfoliative Fibrilopathy in the Conjunctiva: A Relation to Elastic Fivers and Elastosis. *Ophthalmology*,**94**(11), 1439–1449.
- Streeten, B.W.** (1986). Pseudoexfoliative material contains an elastic microfibrillar-associated glycoprotein. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, **Vol. 84**, 304–317.
- Summanen, P., Tönjum, A.M.** (1988). Exfoliation Syndrome Among Saudis. *Acta Ophthalmologica*,**66**(184 S), 107–111.
- Sun, Y., Li, Y., Wang, H., Li, H., Liu, S., Chen, J., Ying, H.** (2017). MIR-146a-5p acts as a negative regulator of TGF- β signaling in skeletal muscle after acute contusion. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*,**49**(7), 628–634.

- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., Baltimore, D.** (2006). NF- B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,**103**(33), 12481–12486.
- Takai, Y., Tanito, M., Ohira, A.** (2012). Multiplex cytokine analysis of aqueous humor in eyes with primary open-angle glaucoma, exfoliation glaucoma, and cataract. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*,**53**(1), 241–247.
- Tarkkanen, A.** (2018). Exfoliation Syndrome: A Historical Perspective. *Journal of glaucoma*,**27**(7), 1–3.
- Taylor, H.R.** (1980). The prevalence of corneal disease and cataracts in Australian aborigines in Northwestern Australia. *Australian journal of ophthalmology*,**8**(4), 289–301.
- Thorleifsson, G., Magnusson, K.P., Sulem, P., Walters, G.B., Gudbjartsson, D.F., Stefansson, H., Jonsson, T., Jonasdottir, Adalbjorg, Jonasdottir, Aslaug, Stefansdottir, G., Masson, G., Hardarson, G.A., Petursson, H., Arnarsson, A., Motallebipour, M., Wallerman, O., Wadelius, C., Gulcher, J.R., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., Jonasson, F., Stefansson, K.** (2007). Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science*,**317**(5843), 1397–1400.
- Tomczyk-Socha, M., Baczyńska, D., Przeździecka-Dolyk, J., Turno-Kręcicka, A.** (2020). MicroRNA-125b overexpression in pseudoexfoliation syndrome. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*,**29**(12), 1399–1405.
- Topouzis, F., Wilson, M.R., Harris, A., Founti, P., Yu, F., Anastasopoulos, E., Pappas, T., Koskosas, A., Salonikiou, A., Coleman, A.L.** (2011). Risk factors for primary open-angle glaucoma and pseudoexfoliative glaucoma in the Thessaloniki eye study. *American journal of ophthalmology*,**152**(2).
- Toraih, E.A., Fawzy, M.S., Mohammed, E.A., Hussein, M.H., EL-Labban, M.M.** (2016). MicroRNA-196a2 Biomarker and Targetome Network Analysis in Solid Tumors. *Molecular Diagnosis and Therapy*,**20**(6), 559–577.
- Treiber, T., Treiber, N., Meister, G.** (2012). Regulation of microRNA biogenesis and function., (16), 605–610.
- Treiber, T., Treiber, N., Meister, G.** (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,**20**(1), 5–20.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., Burwinkel, B.** (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*,**39**(16), 7223–7233.
- Uchida, H., Brigatti, L., Caprioli, J.** (1996). Detection of structural damage from glaucoma with confocal laser image analysis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*.

- Uddin, A., Chakraborty, S.** (2018) . Role of miRNAs in lung cancer., (December 2017).
- Undi, R.B., Kandi, R., Gutti, R.K.** (2013). MicroRNAs as Haematopoiesis Regulators. ,2013.
- Urgert, R., Van Vliet, T., Zock, P.L., Katan, M.B.** (2000). Heavy coffee consumption and plasma homocysteine: a randomized controlled trial in healthy volunteers. *The American journal of clinical nutrition*,72(5), 1107–1110.
- Vreca, M., Andjelkovic, M., Tomic, N., Zekovic, A., Damjanov, N., Pavlovic, S., Spasovski, V.** (2018). Impact of alterations in X-linked IRAK1 gene and miR-146a on susceptibility and clinical manifestations in patients with systemic sclerosis. *Immunology Letters*,204, 1–8.
- Wang, G., van der Walt, J.M., Mayhew, G., Li, Y.J., Züchner, S., Scott, W.K., Martin, E.R., Vance, J.M.** (2008). Variation in the miRNA-433 Binding Site of FGF20 Confers Risk for Parkinson Disease by Overexpression of α -Synuclein. *American Journal of Human Genetics*,82(2), 283.
- Wang, K., Liu, F., Zhou, L.Y., Long, B., Yuan, S.M., Wang, Y., Liu, C.Y., Sun, T., Zhang, X.J., Li, P.F.** (2014). The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. *Circulation Research*,114(9), 1377–1388.
- Wei, W., Chen, Y., Gao, J., Li, C.** (2017). Retraction: WITHDRAWN: The lncRNA-GAS5/miR-23a/Foxo3a axis regulates cardiac hypertrophy by Wnt/ β -catenin signal pathway (Biochemical and biophysical research communications (1016) PII: S0006-291X (17)31796-5). *Biochemical and biophysical research communications*,494(1–2), 424.
- Weinreb R.N., Aung T, M.F.A.** (2014). The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma: A Review Robert. *JAMA*,311(18).
- Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G.** (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*,75(5), 855–862.
- Xie, Y., Chu, A., Feng, Y., Chen, L., Shao, Y., Luo, Q.** (2018). MicroRNA-146a: A Comprehensive Indicator of Inflammation and Oxidative Stress Status Induced in the Brain of Chronic T2DM Rats. ,9(May), 1–11.
- Xu, F., Zhang, L., Li, M.** (2012). Plasma homocysteine, serum folic acid, serum vitamin B12, serum vitamin B6, MTHFR and risk of pseudoexfoliation glaucoma: a meta-analysis. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*,250(7), 1067–1074.
- Xu, W.D., Lu, M.M., Pan, H.F., Ye, D.Q.** (2012). Association of MicroRNA-146a with Autoimmune Diseases. *Inflammation*,35(4), 1525–1529.
- Xue, Y., Tayoun, A.N.A., Abo, K.M., Pipas, J.M., Gordon, S.R., Gardner, T.B., Barth, R.J., Suriawinata, A.A., Tsongalis, G.J.** (2013). MicroRNAs as diagnostic markers for pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursor, pancreatic intraepithelial neoplasm. *Cancer Genetics*,206(6), 217–221.

- Yalaz, M., Othman, I., Nas, K., Eroğlu, A., Homurlu, D., Çikintas, Z., Ashouri, A.** (1992). The frequency of pseudoexfoliation syndrome in the Eastern Mediterranean area of Turkey. *Acta Ophthalmologica*,**70**(2), 209–213.
- Yang, B., Zhang, J.L., Shi, Y.Y., Li, D.D., Chen, J., Huang, Z.C., Cai, B., Song, X.B., Li, L.X., Ying, B.W., Wang, L.L.** (2011). Association study of single nucleotide polymorphisms in premiRNA and rheumatoid arthritis in a Han Chinese population. *Molecular Biology Reports*,**38**(8), 4913–4919.
- Yavari, R., Badalzadeh, R., Alipour, M., Tabatabaei, S.** (2016). Modulation of hippocampal gene expression of microRNA-146a/microRNA-155-nuclear factor-kappa B inflammatory signaling by troxerutin in healthy and diabetic rats. *Indian Journal of Pharmacology*,**48**(6), 675.
- Yaz, Y.A., Yıldırım, N.** (2018). Role of Oxidative Stress in Pseudoexfoliation Syndrome and Pseudoexfoliation Glaucoma. *Turk J Ophthalmol*,**49**, 61–67.
- Yaz, Y.A., Yıldırım, N., Yaz, Y., Tekin, N., İnal, M., Şahin, F.M.** (2018). Role of Oxidative Stress in Pseudoexfoliation Syndrome and Pseudoexfoliation Glaucoma. *Turkish Journal of Ophthalmology*,**49**(2), 61.
- Ye, H., Jiang, Y., Jing, Q., Li, D., Maimaiti, T., Kasimu, D., Lu, Y.** (2015). LOXL1 hypermethylation in pseudoexfoliation syndrome in the uighur population. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*,**56**(10), 5838–5843.
- Yildirim, N., Yasar, E., GURSOY, H., Colak, E.** (2017). Prevalence of pseudoexfoliation syndrome and its association with ocular and systemic diseases in Eskisehir, Turkey. *International Journal of Ophthalmology*,**10**(1), 128–134.
- Yildirim, Z., Yildirim, F., Uçgun, N.I., Sepici-Dinçel, A.** (2013). The role of the cytokines in the pathogenesis of pseudoexfoliation syndrome. *International Journal of Ophthalmology*,**6**(1), 50–53.
- Yoshida, M., Take, S., Ishikawa, M., Kokaze, A., Karita, K., Harada, M., Ohno, H.** (2014). Association of smoking with intraocular pressure in middle-aged and older Japanese residents. *Environmental Health and Preventive Medicine*,**19**(2), 100–107.
- Yousefzadeh, N., Reza, M., Farhad, A.&, Soufi, G.** (2015). Deregulation of NF-κB-miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Journal of Physiology and Biochemistry Official Journal of the University*,**71**, 51–58.
- Yüksel, N., Karabaş, V.L., Arslan, A., Demirci, A., Çalar, Y.** (2001). Ocular hemodynamics in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Ophthalmology*,**108**(6), 1043–1049.
- Zenkel, M., Lewczuk, P., Jünemann, A., Kruse, F.E., Naumann, G.O.H., Schlötzer-Schrehardt, U.** (2010). Proinflammatory cytokines are involved in the initiation of the abnormal matrix process in pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *American Journal of Pathology*,**176**(6), 2868–2879.

- Zenkel, M., Pöschl, E., Von Der Mark, K., Hofmann-Rummelt, C., Naumann, G.O.H., Kruse, F.E., Schlötzer-Schrebar, U.** (2005). Differential gene expression in pseudoexfoliation syndrome. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*,**46**(10), 3742–3752.
- Zhou, Q., Hou, S., Liang, L., Li, X., Tan, X., Wei, L., Lei, B., Kijlstra, A., Yang, P.** (2012). MicroRNA-146a and Ets-1 gene polymorphisms in ocular Behçet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*,**73**(1), 170–176.
- Zhu, X., Hou, R., Ma, A., Yang, S., Pan, X.** (2018). Associations of miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 polymorphisms with ischemic stroke in the northern Chinese Han population. *Medical Science Monitor*,**24**, 7366–7374.
- Url-1:**<https://www.anatomynote.com/humananatomy/ophthalmology-eye-anatomy/hyaloid-canal-of-eye-anatomy/> alındığı tarih 07.05.2020.
- Url-2:**<https://www.todnet.org/glokom/> alındığı tarih 08.05.2020.
- Url-3:**<https://gokhangulkilik.com/glokom-goz-tansiyonu/> alındığı tarih 05.02.2021.
- Url-4:**https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/SecondaryStructure?db=core;g=ENSG00000283733;r=5:160485352-160485450;t=ENST00000385201/ alındığı tarih 21.08.2020.
- Url-5:**http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;g=ENSG00000283733;r=5:160485352-160485450;t=ENST00000385201;v=rs2910164;vdb=variation;vf=50740573/ alındığı tarih 19.08.2020.
- Url-6:**http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000477/ alındığı tarih 19.08.2020.
- Url-7:**<https://mpd.bioinf.uni-sb.de/mirna.html?mirna=hsa-miR-146a-5p&organism=hsa/> alındığı tarih 30.12.2021.
- Url-8:**http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?mirg=hsa-miR-146a-5p/ alındığı tarih 20.12.2021.
- Url-9:**<http://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi?searchType=miRNA&searchBox=hsa-miR-146a-5p&full=1/> alındığı tarih 20.12.2021.
- Url-10:**http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/SecondaryStructure?db=core;g=ENSG00000207924;r=12:53991738-53991847;t=ENST00000385189/ alındığı tarih 21.08.2020.
- Url-11:**http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr12%3A53991738%2D53991847&hgside=882186885_m6NyxyMFrHBfw6aUIkIUV79nrsxz/ alındığı tarih 20.08.2020.
- Url-12:**http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000279/ alındığı tarih 20.08.2020.
- Url-13:**<https://mpd.bioinf.uni-sb.de/mirna.html?mirna=hsa-miR-196a5p&organism=hsa/> alındığı tarih 30.12.2021.
- Url-14:**http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?mirg=hsa-miR-196a-5p/ alındığı tarih 20.12.2021.
- Url-15:**http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;g=ENSG00000283733;r=5:160485352-160485450;t=ENST00000385201;v=rs2910164;vdb=variation;vf=50740573/ alındığı tarih 21.08.2020.

- Url-16:**https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2910164?vertical_tab=true#frequency_tab /alındığı tarih 11.10.2021.
- Url-17:**<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2910164/> alındığı tarih 01.02.2021.
- Url-18:**https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?LinkName=gene_snp&from_uid=406973/alındığı tarih 21.08.2020.
- Url-19:**http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=12:53991315-53992315;v=rs11614913;vdb=variation;vf=98539841/alındığı tarih 21.08.2020.
- Url-20:**https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11614913?vertical_tab=true#frequency_tab /alındığı tarih 11.10.2021.
- Url-21:**<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> alındığı tarih 15.02.2021.
- Url-22:**<https://eurofinsgenomics.com/en/resources/design-tools/oligo-analysis/> alındığı tarih 15.02.2021.
- Url-23:**<https://www.snpstats.net/start.htm> /alındığı tarih 07.02.2021.



EKLER

EK 1: Etik kurul belgesi

EK 2: Kullanılan kimyasallar ve enzimlerin listesi

EK 3: Kullanılan cihazların listesi

EK 4: Kullanılan çözeltiler



EK 1 Etik Kurul Belgesi



Sayı : 46418926

Konu : Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul Kararları

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

TOPLANTI TARİHİ : 16 EKİM 2018 SALI
TOPLANTI NO : 2018/11
PROJE/ KARAR NO : 18/243 (Değerlendirilme Tarihi: (16.10.2018))

TOBB ETÜ Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliğinde görevli Doç. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN'in sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Tarkan MUMCUOĞLU, Uzm. Dr. Gökhan ÖZGE, Uzm. Dr. Mehmet Talay KÖYLÜ ve Asistan Tuğba ÖZTÜRK'ün yardımcı araştırmacı oldukları, 18/243 kayıt numaralı, "**MikroRNA Ekspresyon Seviyeleri ve Genetik Varyasyonları ile Eksfoliyatif Sendrom/ Glokom İlişkisinin İncelenmesi**" başlıklı yüksek lisans tezi önerisi, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

EK 2 Kullanılan kimyasallar ve enzimlerin listesi

Çizelge Ek. 1. Kullanılan kimyasallar ve enzimlerin listesi

| Kimyasallar ve Enzimler | Üretici Firma | Katalog Numarası |
|--|-----------------------------------|------------------|
| Tris amino metan (hidroksimetil) | Sigma Aldrich-ABD | 252859 |
| Trizma hidroklorür (Tris HCl) | Sigma Aldrich-ABD | T5941 |
| Etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu (EDTA) | Sigma Aldrich-ABD | E5134 |
| Sodyum hidroksit (NaOH) | Sigma Aldrich-ABD | 31434 |
| Hidroklorik asit (HCl) | Sigma Aldrich-ABD | 07102 |
| Potasyum klorür (KCl) | Santa Cruz Biotechnology-ABD | sc-203207 |
| Magnezyum klorür (MgCl ₂) | Sigma Aldrich-Çin | M8266 |
| Sodyum dodesil sülfat (SDS) | Sigma Aldrich-Japonya | L3771 |
| Sodyum klorür (NaCl) | Sigma Aldrich-ABD | 31434 |
| Triton X-100 | Sigma Aldrich-ABD | T8787 |
| Etanol | Sigma Aldrich-Almanya | 32221 |
| dNTP miks | Thermo Fischer Scientific-ABD | R0192 |
| Taq DNA polimeraz | Thermo Fischer Scientific-ABD | EP0402 |
| Etidyum bromür | Thermo Fischer Scientific-ABD | 15585011 |
| Gene Ruler™ 50 bp DNA markör | Thermo Fischer Scientific-ABD | SM0372 |
| 6X Loading dye | Thermo Fischer Scientific-ABD | R0611 |
| PCR için primerler | Sentebiolab Biyoteknoloji-Türkiye | --- |
| Agaroz | Thermo Fischer Scientific-ABD | 16500 |
| <i>Msp I</i> - rekombinant | New England Biolabs (NEB)-ABD | R0106S |
| <i>Sac I</i> -HF (High Fidelity) | New England Biolabs (NEB)-ABD | R3156S |
| Dietil pirokarbonat (DEPC) | Sigma Aldrich-ABD | D5758 |
| RNase yüzey arındırıcı (RNase AWAY™ Surface Decontaminant) | Thermo Fischer Scientific-ABD | MBP-7000 |
| Kloroform | Sigma Aldrich-ABD | 34854 |
| QIAzol | Qiagen-Almanya | 79306 |
| Carrier RNA | Qiagen-Almanya | --- |
| RNA izolasyon kiti (miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit) | Qiagen-Almanya | 217204 |
| cDNA sentez kiti (miRCURY LNA RT Kit) | Qiagen-Almanya | 339340 |
| SYBR Green kit (miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit) | Qiagen-Almanya | 339346 |
| qRT-PCR için primerler (miRCURY LNA miRNA PCR Assay) | Qiagen-Almanya | 339306 |

EK 3 Kullanılan cihazların listesi

Çizelge Ek. 2. Kullanılan Cihazların Listesi

| Cihaz | Marka ve Üretici ülke |
|-----------------------------------|------------------------------|
| +4°C Buzdolabı | Liebherr-Almanya |
| -20°C Buzdolabı | Liebherr-Almanya |
| -86°C Buzdolabı | Panasonic-Japonya |
| Soğutmalı santrifüj | Hettich-Almanya |
| Minispin | Eppendorf-Almanya |
| Vortex | FINEPCR-Kore |
| Manyetik karıştırıcı | Biosan-Letonya |
| Kuru blok ısıtıcı | Biosan-Letonya |
| pH metre | VWR-ABD |
| UV-görünür bölge spektrofotometre | Hitachi-Japonya |
| NanoDrop | Thermo Fisher Scientific-ABD |
| Laminar hava akımı kabini | Metisafe-Türkiye |
| Biyogüvenlik kabini | Thermo Fisher Scientific-ABD |
| PCR cihazı | Eppendorf-Almanya |
| Yatay elektroforez sistemi | Thermo Fisher Scientific-ABD |
| UV görüntüleme sistemi | Vilber Loumart-Fransa |
| Eş zamanlı PCR cihazı | Applied Biosystems-ABD |

EK 4 Kullanılan Çözeltiler

DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

-TKM tamponu (10 mM KCl, 2 mM EDTA ve 4 mM MgCl₂ içeren Tris-HCl, pH 7.6, 200 mL)

10 mM Trizma base (pH 7.6)

10 mM KCl

4 mM MgCl₂

2 mM EDTA.H₂O

Çözelti hazırlandıktan sonra kullanılmadan önce otoklavlanıp uzun süreli kullanım için +4°C'de muhafaza edilmiştir.

-%10 SDS solüsyonu (Sodyum dodesil sülfat) (100 mL)

10 g SDS deterjanı 100 mL saf suyun içinde çözdürülüp uzun süreli kullanım için +4°C'de muhafaza edilmiştir.

-Doymuş NaCl solüsyonu (100 mL)

35.7 g NaCl 100 mL saf suyun içinde çözdürülüp uzun süreli kullanım için +4°C'de muhafaza edilmiştir.

-TE tamponu (Tris-EDTA, pH 8.0, 100 mL)

100 mM Tris-HCl

500 mM EDTA

Çözelti hazırlandıktan sonra otoklav işlemi yapılmıştır ve uzun süreli kullanım için +4°C'de muhafaza edilmiştir.

-Tris-HCl (pH 8.0, 100 mM, 100 mL)

Çözelti hazırlandıktan sonra kullanılmadan önce otoklavlanıp uzun süreli kullanım için +4°C'de muhafaza edilmiştir.

-EDTA (pH 8.0, 500 mM, 100 mL)

Çözelti hazırlandıktan sonra kullanılmadan önce otoklav işlemi yapılmıştır ve uzun süreli kullanım için +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler

-5X TBE tamponu (Tris-Borat-EDTA) (pH 8.3, 1 Litre)

450 mM Trizma bazı

450 mM Borik asit

10 mM EDTA.2H₂O

0.5X TBE tamponununun hazırlanması için öncelikle 5X TBE tamponu hazırlanmış, kullanılacağı zaman 5X tamponun 10 kat seyreltilmesi ile 0.5X TBE tamponu elde edilmiştir. Bu çözelti daha uzun süre muhafaza edilebilmesi için 5X TBE tamponu şeklinde hazırlanmıştır ve kullanılmadan önce otoklavlanıp uzun süreli kullanım için oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.



