

Tuberoskleroz Tanılı Hastalarda Mikro RNA Düzeyi Değerlendirilmesi

Dr. Mine Yüksel

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Akın İşcan

Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

İSTANBUL-2016

TEŞEKKÜR

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalımızın eski başkanının, uzmanlık eğitimim boyunca gösterdiği her türlü destekten dolayı sayın Prof. Dr. Ruşen DÜNDARÖZ'e;

Hem hekimlik mesleğine hem de hasta hayatına yaklaşımıyla bizlere örnek olan, yanında çalışmaktan onur duyduğum tez yöneticim ve Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Akın İŞCAN'a

Tez çalışmamda araştırma laboratuvarını bana açan Doç. Dr. Şahabettin SELEK, Doç Dr. Fahri Akbaş ve Arş. Gör. Huri DEDEAKAY'a,

Asistanlık hayatımın her anına varlıklarıyla değer katan can arkadaşlarım sevgili Dr. Nurhan Aruçi ve Dr. Seçil ÇAKIR GÜNDOĞAN'a,

Desteklerinden dolayı başta Dr. Bilge BAYRAKTAR ve Dr. Ayşegül DOĞAN DEMİR olmak üzere kliniğimizin tüm hocalarına, uzman hekimlerine, asistan arkadaşlarıma ve tüm pediatri personeline,

Her zaman çocuğu olduğum için kendimi şanslı hissettiğim canım annem Sevgi YÜKSEL'e, canım babam Fatih YÜKSEL'e ve bitanecik kardeşlerime,

Ve hayatımın tüm karmaşasının ortasında bana bambaşka bir alemin kapısını açan eşim Fatih KALYONCU'ya,

Teşekkür ederim.

Dr. Mine YÜKSEL

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TABLO DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
KISALTMA DİZİNİ	X

ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Tuberoskleroz	7
2.1.1. Tanım.....	7
2.1.2. Epidemiyoloji	7
2.1.2.1 Prevelans/İnsidans	7
2.1.2.2 Demografi.....	8
2.1.2.3 Mortalite	8
2.1.2.4 Morbidite	8
2.1.3. Etiyoloji	9
2.1.4. Moleküler Genetik ve Patogenez.....	9
2.1.5. Klinik Bulgular	11
2.1.5.1 Dermatolojik Tutulum	11
2.1.5.2. Santral Sinir Sistemi Tutulumu	12
2.1.5.2.1. Santral Sinir Sistemi Lezyonları	12
2.1.5.2.1.1. Hamartomlar	12
2.1.5.2.1.2. Subependimal Dev Hücreli Tümörler.....	13
2.1.5.2.1.3. Diğer Lezyonlar	13
2.1.5.2.2. Nöbetler	13
2.1.5.2.3. Kognitif Bozukluk	14
2.1.5.2.4. Otizm Spektrum Bozuklukları.....	14
2.1.5.3. Kardiyovasküler Tutulum.....	15
2.1.5.4. Renal Tutulum	16
2.1.5.5. Pulmoner Tutulum.....	17
2.1.5.6. Oftalmik Tutulum.....	17
2.1.6. Tanı	18

2.1.7. Takip ve Tedavi.....	20
2.2. Oksidan Ve Antioksidan Sistemler.....	22
2.2.1. Oksidan Sistemler.....	22
2.2.1.1. Serbest Radikaller.....	22
2.2.1.2. Serbest Radikallerin Etkileri.....	23
2.2.1.3. Hücre Membranlarının Lipit Peroksidasyonu	23
2.2.1.4. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu	23
2.2.1.5. Karbonhidratlar üzerine etkileri.....	24
2.2.1.6. DNA üzerine etkileri	24
2.2.2. Antioksidan Sistemler.....	24
2.2.2.1.Enzimatik Antioksidanlar	25
2.2.2.2.Non-enzimatik Antioksidanlar	25
2.2.3. Total Antioksidan Durum, Oksidatif Stres Ve DNA Hasarı	26
2.2.3.1. Oksidatif Strese Bağlı DNA Hasarının Oluşum Mekanizması	27
2.2.3.2. Oksidatif Strese Bağlı DNA Hasarı Tespit Yöntemleri.....	27
2.2.3.3. Total Oksidan-Antioksidan Durum Tespit Yöntemleri	27
2.3. MikroRNA ve diğer “Non-Coding” RNA’lar	28
2.3.1. MikroRNA	29
2.3.1.1. MikroRNA’ların Yapısı ve Keşfi	29
2.3.1.2. MikroRNA’ların Tarihçesi	30
2.3.1.3. MikroRNA’nın Biyogenezi	31
2.3.1.4 MikroRNA’ların Fonksiyonu	31
2.3.1.5. MikroRNA’ların Hastalık Oluşumundaki Yeri	32
2.3.1.6 MikroRNA’ların Tanı Stratejileri geliştirilmesindeki yeri.....	32
2.3.1.7. MikroRNA ve Kanser.....	33
2.3.1.8. Onkogen Olarak İşlev Gösteren mikroRNA’lar	33
2.3.1.9. Tümör Supressör Gen Olarak mikroRNA’lar	34
2.3.1.10. MikroRNA’ların Biyomarker olarak kullanımı.....	34
2.3.1.11. Nörolojik Hastalıklarda MikroRNA genleri.....	35
2.4. Oksidatif Dna Hasarı-Tuberoskleroz-MikroRNA İlişkisi	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM	37
3.1. Kan Analizi.....	37
3.2. Gereçler	37
3.3. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü	38
3.3.1. Kullanılan Reaktifler	38

3.3.2. Prensiip	38
3.4. Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü	38
3.4.1. Kullanılan Reaktifler	38
3.4.2. Prensiip	39
3.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)'Nin Hesaplanması.....	39
3.6. DNA Hasarı (Comet Assay) Analizi	39
3.7. DNA Hasarı (Commet Assay) Protokolü	40
3.8. RNA Ekstraksiyonu	41
3.8.1. Serumlardan Eksozom İzolasyonu	41
3.8.2. Total RNA eldesi	42
3.8.3. RNA'dan cDNA Sentezi	42
3.8.4. Kantitatif PCR	42
3.9. İstatistiksel İncelemeler	43
4. BULGULAR	44
4.1. Gruplarda TAS, TOS, OSİ ve DNA Hasarı.....	47
5. TARTIŞMA.....	52
KAYNAKLAR.....	62

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Tuberoskleroz kompleksi tanı ölçütleri	19
Tablo 2: Tuberoskleroz Kompleksi Tanı Ölçütleri	19
Tablo 3: 30 Tuberoskleroz vakasının ve 29 sağlıklı kontrolün demografik özellikleri	44
Tablo 4: Tuberosklerozlu 30 vakanın tanı yaşı ve başvuru özellikleri.....	44
Tablo 5: Anti Epileptik İlaç Dağılımı	45
Tablo 6: 30 vakada cilt bulguları.....	46
Tablo 7: Renal kist ve renal anjiomyolipom bulguları.....	46
Tablo 8: Kranial Tutulum.....	47
Tablo 9: EEG bulguları	47
Tablo 10: Gruplara Göre TAS, TOS ve OSI Ölçümlerinin Değerlendirmesi	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: MikroRNA'ların oluşumu ve fonksiyonu	30
Şekil 2: Comet sınıflamasının fotomikrografik farklı görüntüleri.	41
Şekil 3: Gruplarda MikroRna Sonuçlarının Dağılımı	49



KISALTMA DİZİNİ

Kısaltma	Açıklama
TS	: Tuberoskleroz
TSK	: Tuberoskleroz kompleksi
RM	: Rabdomiyom
TSC1	: Tuberoskleroz kompleks geni 1
TSC2	: Tuberoskleroz kompleks geni 2
mTOR	: Mammalian target of rapamycin
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
RNA	: Ribo nükleik asit
MikroRNA/miRNA	: Mikro Ribo Nükleik Asit
miR	: Mikro Ribo Nükleik Asit
BT	: Bilgisayarlı tomografi
USG	: Ultrasonografi
SSS	: Santral sinir sistemi
LAM	: Lenfanjiyoleiyomyomatozis
PKD1	: Polikistik Kidney Disease 1
GTP	: Guanozin trifosfat
GAP	: GTP aktive eden protein
RHEB	: Ras homologu
SGCT	: Subependimal dev hücreli tümör
SEGA	: Subependimal dev hücreli astrositom
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntülemesi
EEG	: Elektroensefalografi
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
O ₂ -	: Süperoksit radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HO-	: Hidroksil radikali
O ₂ ↑↓	: Singlet oksijen
MDA	: Malondialdehit
8-OhdG	: 8-hydroxydeoxyguanosine
SOD	: Süperoksit dismutaz

GPx	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
GR	: Glutasyon redüktaz
ROT	: Reaktif oksijen türleri
TAS	: Total antioksidan durum
ABTS	: 2,2-azino-bis 3-etilbenz-tiazolin-6-sülfonic asit
ABAP	: 2,2-azo-bis (2-amidinopropan)
TOS	: Total oksidan durum
ROM	: Reaktif oksijen metabolitleri
OSİ	: Oksidatif stres indeksi
mRNA	: Mesajcı RNA
ncRNA	: Non-coding RNA
siRNA	: Small interfering RNA
PIWI	: P-element-induced Wimpily Testis
piRNA	: PIWI interacting RNAs
lncRNA	: Long non-coding RNA
ORF	: Open reading frame
DGCR8 (PASHA)	: DiGeorge syndrome critical region gene 8
Pre-miRNA	: Prekürsor miRNA
Pri-miRNA	: Primer miRNA
dsRNA	: Çift sarmallı RNA
ds-miRNA	: Çift sarmallı miRNA
RISC	: RNA induced silencing complex
UTR	: Untranslated region
Ago2	: Argonaute2
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
LATS2	: Large tumor suppressor 2
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
PTEN	: Phosphatase-and-tensin homologue
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
SLITRK1	: SLIT And NTRK-Like Family, Member 1
REEP1	: Receptor expression-enhancing protein 1
SNPs	: Single nucleotide polymorphisms; tek nükleotid polimorfizmleri
FGF20	: Fibroblast growth factor 20

BACE1	: Beta-secretase 1
AD	: Alzheimer hastalığı
APP	: Amyloid precursor protein
PBS	: Phosphate Buffer Saline
LB	: Lizis buffer
Ct	: Cycle threshold
NCSS	: Number Cruncher Statistical System
PCR	: Polymerase chain reaction
ER	: Endoplazmik retikulum
DICER1	: Ribonuclease type III geni
DM	: Diabetes Mellitus
PTEN	: Phosphatase and tensin homolog
RB2	: Retinoblastoma-like protein 2
OGG1	: 8-OxoGuanine DNA Glycosylase
SREBPs	: Sterol regulator element-bağlayıcı proteinleri
HDL	: High density lipoprotein
ABCA1	: ATP-binding cassette transporter A1
LNA	: A locked nucleic acid
SMAD7	: Sma and Mad Related Family Gene 7
MMP	: Matrix metalloproteinases
BDKRB2	: Bradikinin reseptör B2
GALNT1	: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 1
SOX4	: Sex Determining Region Bo

ÖZET

Tuberoskleroz Tanılı Hastalarda Mikro RNA Düzeyi Değerlendirilmesi Amaç:

Tuberoskleroz otozomal dominant geçişli, multipl organ sistemlerinde hamartomlarla karakterize genetik bir hastalıktır. MikroRNA'lar; küçük, kodlanmayan, 20-24 nükleotidden oluşan, gen ekspresyonunda post-transkripsiyonel seviyede regülatör görevi alan RNA molekülleridir.

Oksidatif stres ise, başta kanser olmak üzere birçok hastalığın patogenezinde sorumludur. Genetik geçişli hastalıkların patogenezinde oksidatif stresin ve buna bağlı DNA hasarının olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden tuberosklerozun patogenezinde oksidatif stresin ve buna bağlı DNA hasarı ve miRNA'ların önemli yer aldığı bilinmektedir.

Çalışmamızda tuberoskleroz tanılı hastaların total oksidan-antioksidan seviye, oksidatif stres indeksi, DNA hasarı ve ve mikroRNA düzeylerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Nöroloji polikliniği'ne başvuran 0-16 yaş arası, 30 tuberoskleroz hastası ve kontrol grubu olarak da aynı yaş grubunda 29 sağlıklı çocuk dahil edildi. Alınan kan örnekleri santrifüj edilip serumlarına ayrıldı. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, serum örneklerinde Total Antioksidan Seviye (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS) plak okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) sırasıyla 240 nm ve 520 nm dalga boylarında ölçüldü. Ölçülen TAS ve TOS değerleri Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplamasında kullanıldı. Örneklerden ayrıca Comet Assay Yöntemi ile DNA hasar tayini yapıldı. Kalan serum örneklerinde RNA izolasyon kiti Qiagen™ kullanılarak total RNA'nın saflaştırılması ile RNA'lar cDNA'ya çevrildi ve bunlar Real-Time PCR yöntemi ile incelendi. Elde edilen veriler SPSS programında analiz edildi.

Bulgular:

1. Tuberoskleroz kompleksi (TSK) tanılı hastalar ve kontrol grubu arasında TAS, TOS ve OSİ değerleri bakıldı. Hasta grubu vakaların TAS ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı olarak düzeyde düşük ($p=0,001$; $p<0,01$), TOS ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ($p=0,001$; $p<0,01$) ve OSİ ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,001$; $p<0,01$).

2. TSK tanılı hastalar ve kontrol grubu arasında DNA hasarı (Comet Assay) ölçümleri bakıldı. Hasta grubu vakaların Comet Assay ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,001$; $p<0,01$).

3. TSK tanılı hastalar ve kontrol grubu arasında 10 farklı mikroRNA (hsa-let-7d-3p, hsa-let-7f-1-3p, hsa-let-7f-2-3p, hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-326, hsa-miR-33b-5p, hsa-miR-431-3p, hsa-miR-129-1-3p) bakıldı. Bunlardan let-7 grubu, miR-193a-3p, miR-326, miR-33b-5p ve miR-129-1-3p hasta grubunda up-regüle; miR-18a-3p, miR-324-3p ve miR-431-3p ise hasta grubunda down regüle bulundu.

Sonuç: Günümüzde oksidatif stres ve buna bağlı DNA hasarı birçok hastalık ile ilişkili olup hastalıkların oluşumunda birçok miRNA'yı etkilemektedir. Bu miRNA'lar ise hastalıkların tedavisine yönelik yapılan ilaç çalışmaları için hedef teşkil etmekte ve gelecekte kanser gibi birçok hastalığın saptanmasında güçlü bir biyomarker olarak kullanılabilir.

ABSTRACT

Assessment of Micro RNA Level of Patients Diagnosed with Tuberous Sclerosis

Purpose: Tuberous sclerosis is a genetic disease characterized by hamartomas in multiple organ systems, with autosomal dominant passage. MicroRNAs are RNA molecules which are small, uncodable, consisting of 20-24 nucleotides, assuming regulator level at post-transcriptional level in gene expression.

Oxidative stress is responsible for pathogenesis of many diseases, in particular, cancer. It is considered that oxidative stress and related DNA damage occurs in pathogenesis of genetically inherited diseases. Therefore, it is known that oxidative stress and related DNA damage and miRNAs play an important role in pathogenesis tuberous sclerosis.

Our study aims to assess total oxidant-antioxidant level, oxidative stress index, DNA damage and microRNA levels of patients diagnosed with tuberous sclerosis.

Material and Method: The study includes 30 tuberous sclerosis patients of ages in the range of 0-16 years consulting to Bezmialem Foundation University Medical Faculty, Pediatric Neurology polyclinic and as control group, 29 healthy children from the same age group. Blood samples that are taken are subjected to centrifuge to separate the serum. Total Antioxidant Level (TAL) and Total Oxidant Level (TOL) were measured from serum samples at wavelengths of 240 nm and 520 nm, respectively in plate the reader (Thermo Scientific Multiscan FC, 2011-06, USA) at Medical Biochemistry Department. Measured TAL and TOS values were used in Oxidative Stress Index (OSI) calculation. Also, DNA damage determination was carried out from the samples by using Comet Assay Method. In the remaining serum samples, RNAs were converted to cDNA through purification of total RNA by using RNA isolation kit Qiagen™ and these were analyzed by using Real-Time PCR method. Obtained data was analyzed in SPSS software.

Results:

1. TAL, TOL, and OSI values of patients with Tuberous Sclerosis Complex (TSC) diagnosis and the control group were compared. TAL measurements of patient group cases were found to be low at statistically significant level ($p=0.001$; $p<0.01$), TOL measurements thereof were found to be high at statistically significant level ($p=0.001$; $p<0.01$) and OSI measurements thereof were found to be high at statistically significant level ($p=0.001$; $p<0.01$).

1. GİRİŞ

Tuberoskleroz (TS) otozomal dominant geçişli, multipl organ sistemlerinde hamartomlarla karakterize genetik bir hastalıktır. İnsidansı, yaklaşık 5000-10000 doğumda birdir (1,2). En çok beyin, deri, kalp, böbrek, akciğer, göz gibi organları tutar (2-5). Yeni tanımlamayla tuberoskleroz kompleksi (TSK); klinik olarak glionöronal hamartomlara bağlı olarak dirençli epilepsi, kognitif bozukluklar, deride anjiyofibrom, hipomelanotik maküller, fibröz plaklar, kalpte rabdomyom (RM), böbrekte anjiomyolipom ve gözde retinal hamartomlarla karakterizedir.

Hastalığın etiyopatogenezinden 2 gen sorumlu tutulmaktadır. Bunlar tuberoskleroz kompleks geni 1 (TSC1) ve tuberoskleroz kompleks geni 2 (TSC2) genleridir. TSC1 geni hamartin proteini ve TSC2 geni tuberin proteinini kodlar. Bu proteinler, tümör supresör protein olarak mammalian target of rapamycin (mTOR) kompleksi aktivitesini düzenlerler. mTOR kompleksi ise hücre büyümesi, proliferasyonu, protein sentezi gibi birçok yaşamsal işlevi kontrol eder. Bu genlerde oluşan mutasyonlar, mTOR kompleksi aktivitesinin aşırı artmasına ve dolayısıyla anormal hücre büyüme ve çoğalmasıyla karakterize multipl organlarda hamartom oluşumuna neden olan TS hastalığına yol açar (6,7).

Serbest radikaller, organizmada güçlü radikal reaksiyonları başlatarak biyomoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar (8,9). Normal fizyolojik şartlar altında, serbest oksijen radikallerinin üretimi ile antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge vardır (8). Bazı durumlarda, oksidanların düzeylerindeki artışa ve/veya antioksidanların düzeyindeki azalmaya bağlı olarak oksidatif/antioksidatif denge, oksidatif yöne kayar ve birçok hastalığın patogenezi ile ilişkili olan oksidatif strese yol açar (8,9). Oksidatif stres ise, farklı mekanizmalar ile deoksiribo nükleik asit (DNA) üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açmaktadır (10).

Mikro Ribo Nükleik Asit (mikroRNA/miRNA/miR); küçük, kodlanmayan, 20-24 nükleotidden oluşan, gen ekspresyonunda post-transkripsiyonel seviyede regülatör görevi alan ribo nükleik asit (RNA) molekülleridir. Gen ürünü olması nedeniyle hücrelerin gelişim, olgunlaşma, farklılaşma, apoptozis, hücre sinyalizasyonu, hücrel etkileşim gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynar. Ayrıca kanser oluşumu, otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde de öneme sahiptir (11,12). Oksidatif stres ve buna bağlı DNA hasarının TS'nin patogenezinde aktivitesi artmış mTOR kompleksinin oluşmasında yer aldığı

ve bu mekanizma içerisinde birçok miRNA'nın rol aldığı düşünülmektedir. Ancak bu konuda yapılmış çalışmalar, hayvan çalışmaları düzeyinde sınırlı kalmıştır (13-15). Bu yüzden biz bu çalışmamızda, TSK tanılı hastalarda total oksidan ve antioksidan durumları, oksidatif stres düzeyini ve buna bağlı DNA hasarını belirlemeyi ve böylelikle patogeneizde rol alan miRNA çeşitlerini ve düzeylerini değerlendirmeyi amaçladık. Elde edilen sonuçlar ile tuberoskleroza spesifik microRNA düzeylerini belirlemeyi ve böylece hastalığın patogenezinin anlaşılmasına ve yeni tedavi seçeneklerinin önünün açılmasına katkıda bulunmayı planladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tuberoskleroz

2.1.1. Tanım

Tuberoskleroz (TS); beyin, retina, böbrekler, kalp, deri ve akciğer gibi birçok sistemi etkileyen, benign tümörlerin gelişmesiyle karakterize nörokütanöz genetik bir hastalıktır (5, 16).

İlk kez 1862'de Von Recklinghausen tarafından bir bebeğin otopsi bulguları, beyinde sklerotik alanlar ve kalpte tümör ile tarif edilmiştir. Désiré-Magloire Bourneville ise, 1880'de tüberleri keşfetmiş ve TS hastalığını ilk kez ayrı bir patolojik antite olarak tanımlamıştır (5, 17, 18).

1908' de Vogt epilepsi, mental gerilik ve deride adenoma sebaceumdan oluşan tanı triadını ileri sürmüştür (19-22). Epiloia olarak da tanımlanan (19) bu hastalık, klasik triadı olan epilepsi (epi), zeka geriliği (low intelligence": lo-i) ve adenoma sebace simetrik (a) şeklindeki bulguların kısaltmasından dolayı bu adı almıştır (23, 24).

Bu ilk tanımlamalar, doğruluğunu korumakla birlikte yaygın sistem tutulumları nedeniyle, artık tuberosklerozis kompleksi (TSK) tercih edilmektedir (25).

Tuberosklerozis kompleksi, başta merkezi sinir sistemi, deri, retina, kalp ve böbrek olmak üzere akciğer, sindirim sistemi, endokrin bezler ve kemik gibi birçok organı tutan bir hamartomatozudur (5, 18).

2.1.2. Epidemiyoloji

2.1.2.1 Prevelans/İnsidans

Tuberosklerozis kompleksi her yaş, ırk ve cinsiyette görülebilmektedir ve dünya çapında 1-2,000,000 insanın etkilendiği tahmin edilmektedir. Prevelansın 1956 yılında 1/150,000 saptanmasına rağmen, 1989 ve 1998 yılında yapılan çalışmalarda ortalama 1/20.000 olarak prevelansta belirgin artış olduğu ve insidansın 1/6000 - 1/10,000 canlı doğumda bir olduğu görülmüştür (26,27). 10 yaş altındaki çocuklarda yapılan başka çalışmalarda yaklaşık 1/12,000-14,000 oranında TSK tanısı aldığı saptanmıştır (26, 28).

Görülme sıklığının artması tanıda bilgisayarlı tomografi (BT) ve ultrasonografi (USG) gibi görüntüleme tekniklerinin karakteristik semptomların olmadığı bireylerde de kullanılmaya başlanmasıyla açıklanmaktadır.

Tuberosklerozis kompleksi nadir bir hastalık olarak tanımlansa da benzer genetik hastalıklara kıyasla daha sık görülmektedir (26).

2.1.2.2 Demografi

Tuberosklerozis kompleksi her iki cinsiyette eşit oranda görülmektedir. Buna rağmen kız hastalarda daha yüksek mortalite ve morbidite oranlarına rastlanılmaktadır. Bu durum kız hastalarda akciğer tutulumunun daha sık olmasına bağlanmaktadır. Konjenital bir hastalık olmasına rağmen tanı alma adolesan döneme kadar sarkabilmektedir (26,27).

Amerika Birleşik Devletleri'nde ve İngiltere'de, Kore ve Çin gibi ülkelere kıyasla daha yüksek prevalansta görüldüğü düşünülmese rağmen bu kanıtlanamamıştır ve her ırkta aynı oranda görüldüğü tahmin edilmektedir (26,27).

2.1.2.3 Mortalite

Çoğu TSK tanılı hastada sağ kalım normal popülasyona benzer olarak tanımlansa da komplekse bağlı semptomlar fatal seyredebilmektedir. En sık ölüm santral sinir sistemi (SSS) benign tümörleri nedeni gelişen status epileptikus veya bronkopnömoni nedeni görülmektedir. İkinci sıklıkta ölüm nedeni böbrek tümörlerinin sebep olduğu böbrek yetmezliğidir (28,29).

Tuberosklerozis kompleksi tanılı hastalarda lenfanjiyoleiyomyomatozis (LAM) nadir görülmekle birlikte, görüldüğünde letal seyretmektedir ve bu hastalardaki en sık mortalite nedenidir (29).

2.1.2.4 Morbidite

Benign tümörlerle karakterize olan TS'da tümör tutulum yerleri hayat kalitesini belirlemektedir. Beyin tutulumu olan hastalarda nöbetler, hidrosefali ve gelişim kusurları görülmektedir. Gelişim geriliği hastaların üçte birinde saptanmakta ve ciddiyetini belirleyen faktörler tümörlerin büyüklüğü, sayısı ve lokasyonudur (29).

Çeşitli davranışsal bozukluklar, hiperaktivite sendromu ve obsesif kompulsif hastalık gibi, durumlarda hayat kalitesini etkilemektedir(29).

Böbrekte saptanabilen kistler veya anjiyomiyolipomlar böbrek yetmezliği veya kanamaya yol açabilir. Ancak hafif olgularda renal kistler böbrek fonksiyonlarını etkilememekte ancak yakın izlem önerilmektedir (29).

Kardiyak RM kapak disfonksiyonuna veya ventrikül çıkış obstrüksiyonuna neden olabilmektedir. Bu durum genellikle sadece neonatal dönemde fatal ve sonraki dönemlerde de aritmi sebebi olabilmektedir (29).

Tuberoskleroz tanılı çoğu hastada deri ve tırnaklarda çeşitli lezyonlar saptanmaktadır. Yüzde kırmızı noktalar olarak ortaya çıkan fasiyal anjiyofibromlar estetik sorunlara yol açan önemli morbidite nedenidir (28).

2.1.3. Etiyoloji

Tuberosklerozis kompleksi, spontan mutasyon oranı yüksek olan nörokutanöz kompleks bir hastalık grubudur (29, 30). Olguların 1/3' ü otozomal dominant geçişli (ailesel), 2/3' ü ise sporadiktir (30-32). Olguların 3/4'ünde aile hikayesi olmayabilir (15,33).

Tuberoskleroz, tuberin ve hamartin adı verilen iki proteini kodlayan TSC1 (9q34.3) ve TSC2 (16p13.3) genlerini inaktive eden mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu proteinlerin hücrenin çoğalması üzerine baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu, tümör baskılayıcı proteinler gibi fonksiyon gördükleri kabul edilmektedir (34, 36).

Hastalığın ağır formlarında TSC2 gen mutasyonunun daha fazla olduğu gösterilmiştir (36).

2.1.4. Moleküler Genetik ve Patogenez

Tuberosklerozis kompleksi birçok organ sisteminde benign tumoral oluşumların gelişmesi ile karakterize olup en sık beyin, retina, böbrek, kalp, akciğer, karaciğer ve deriyi etkilemektedir (5, 18, 30).

Beyinde bulunan tüber olarak adlandırılan hamartomlar anormal glial ve nöral hücrelerden oluşmakta ve büyüklükleri, sayıları ve lokasyonları farklılık göstermektedir. TSK'de beyaz cevherde görülen difüzyon özellikleri ile desorganize kontrol mekanizmaları arasındaki farklılıklar nedeniyle aksonlarda demiyelinizasyon gelişmektedir (37).

Sık görülen deri lezyonlarından hipomelanotik maküllerde (ash-leaf bulgusu) görülen hipopigmentasyon küçük melanozomların varlığı ve keratinositlere defektif melanin transferi nedeni görülmektedir. Fibromalar ve plak gibi deri lezyonları anormal kollajen ve damar birikimi nedeni gelişmektedir (28,29).

Böbrek tutulumunda görülen anjiomiyolipoamlar kan damarları, düz kas, adipoz dokusu ve konnektif dokuda oluşmaktadır. Polikistik Kidney Disease 1 (PKD1) geni,

Kromozom 16'da bulunan TSC2 geni ile yakın olduğundan dolayı TSK hastalarında polikistik böbrek hastalığı semptomları da görülebilmektedir (38).

Kromozom 9q34'te lokalize TSC1 geninin kodladığı hamartin ve kromozom 16p13'te lokalize TSC2 geninin kodladığı tuberin proteinleri hücre içerisinde birbirine bağlanarak ortak işlev görürler (6). Özellikle tuberin geni vücutta hücre çoğalması ve değişiminden sorumludur. Günümüzde TS hastalarında bilinen bu iki gende mutasyon bulunma oranı %85-90 oranındadır (37).

Bu genler üzerinde yapılan mutasyon çalışmalarında, TSC2 geninde TSC1 genine oranla çok daha fazla delesyon veya yeniden düzenleme olduğu görülmüştür. Bu delesyonların %2-3'ü TSC2 geninin yanında bulunan ve polikistik böbrek hastalığından sorumlu olan PKD1 genini de etkiler (37, 38). Yine bu mutasyon çalışmalarında bu genlerin kodladığı protein içindeki tek amino asitin değişimine yol açan mutasyonların (missense mutasyon) TSC2 geninde TSC1 geninden daha fazla görüldüğü bildirilmiştir ve bu mutasyonlar genellikle guanozin trifosfataz (GTPaz) aktive eden protein (GAP) bağlayan bölgelerde kümelenir (39).

Tuberoskleroza yol açan TSC1 ve TSC2 genlerinin keşfinden ve bu iki genin kodladığı hamartin ve tuberin proteinleri ortaya konduktan sonra bu gen ve proteinlerdeki bozuklukların TS hastalığına nasıl yol açtığı araştırılmıştır. Bu manada aydınlatılan rapamisin'in memelilerdeki hedefi (mTOR) yolağıdır (40-42). Ras ailesinin bir G proteini olan beyinde zenginleşmiş Ras homoloğu (RHEB) mTOR'u uyarır. RHEB, GTP'ye bağlı olduğunda aktif haldedir. Tuberin ve hamartinin birleşerek oluşturduğu hücre içi kompleks GTPaz'ı aktifleştirir ve GTP'yi parçalar. Sonuç olarak mTOR'un uyarılması azalmış olur (43-45). Bu bağlamda, tuberin veya hamartinin kaybı veya disfonksiyonu vücutta hamartom adı verilen sayısız iyi huylu tümörün oluşumuyla sonuçlanır. Özellikle fetal germinal matriks içinde yer alan kök hücrelerdeki sıra dışı gen geçişi sonucu, bu kök hücrelerden olacak normal gelişim, değişim ve göç olamadığından subependimal alanda dağınık, kortekse kadar uzanan beyin bölgelerinde ise çizgisel veya nodüler nitelikte displastik lezyonlar izlenir (7).

Hipoksi, besin varlığı ve büyüme faktörü uyarısı gibi sinyaller mTOR tarafından saptanır ve bu da mTOR'un hücrede hücre siklusünün ilerlemesi, transkripsiyon ve translasyon kontrolü ve besin alımı gibi birçok süreçte etkin olmasını sağlar (46, 47). mTOR sinyal yolundaki baskılayıcı etki bozulduğu için klinik bulgular ortaya çıkmaktadır (48,49). mTOR katabolik ve anabolik metabolizmalar arasında anahtar işlevi olan bir kinazdır (13).

2.1.5. Klinik Bulgular

Tuberoskleroza kompleks, başlıca klinik triadı zeka geriliği, epilepsi ve adenoma sebaceum olan çok sayıda sistemi tutan bir sendromdur (51). En sık SSS, deri, kalp, böbrek ve gözde bulguları olan hamartomatöz tümörler ile karakterizedir (5,18). Akciğerler, gastrointestinal sistem, dalak; lenf nodları, gonadlar, endokrin bezler (tiroid, paratiroid, böbreküstü bezleri) ve kemik daha az oranda etkilenmektedir (25, 52).

Tuberoskleroza çok geniş klinik spektruma sahip heterojen bir hastalıktır. Aynı aile içinde dahi ağır mental retardasyon ve durdurulamayan nöbetlerden, normal zekâ ve nöbetsiz yaşama kadar değişebilen bulgularla kliniğe yansıyabilir (53, 54).

Ek olarak malignensi riskinde artış görülmektedir. Nerdeyse bütün hastalarda bir yada birden fazla deri bulguları saptanması karakteristiktir. Çoğu hastada epilepsi, yarısından fazlasında bilişsel defisitler ve öğrenme zorlukları saptanmaktadır ve TSK'ne bağlı nöropsikiyatrik hastalıklar olarak (TAND; TSC-associated neuropsychiatric disorders) tanımlanmaktadır (55, 56).

2.1.5.1 Dermatolojik Tutulum

Yapılan toplum tabanlı çalışmalarda TSK tanılı hastaların 81-95%'inde en az bir deri lezyonu olduğu görülmüştür (57, 58).

Tuberosklerozun deri belirtileri hipopigmente maküller, anjiyofibromlar, shagreen lekeleri, periungual-subungual fibromlar olarak dört grup altında incelenebilir (57).

Hipopigmente maküller genellikle ilk belirtidir, bazen doğumda bulunabilir. Olguların % 50-85'inde görülür. Ortalama 1-3 cm. uzunlukta oval veya yaprak biçiminde maküllerdir. Gövde ve ekstremitelerde tek veya multipl bulunur. Hipomelanotik maküller de, patognomonik olmamakla birlikte, karakteristik deri lezyonlarıdır; "Ash leaf" lekeleri olarak da bilinirler. Diğer deri lezyonları, 2-6. dekata kadar ortaya çıkmayabilirken, hipomelanotik maküller genellikle doğumda mevcuttur. Vitiligidan farklı olarak melanositlerin ve keratinositlerin sayısı normal iken, melanini azdır veya yoktur (57).

Anjiyofibromlar; fibroadenom veya adenoma sebaceum olarak da adlandırılan ve tanı için şart kabul edilen lezyonların olguların ancak %47'sinde görülebileceği bildirilmiştir. Fasial anjiyofibrom olarak da tanımlanan bu lezyon, yanak, çene, nazolabial kıvrımlar ve bunun hemen üzerinde yerleşen yüze ait hamartomlardır. En sık 3-10 yaş arası ortaya çıkarlar (57).

Shagreen lekeleri, gövdede, özellikle lumbosakral bölgede yerleşen, yumuşak, deri renginde, deriden hafif kabarık, üzeri portakal kabuğu gibi girintili çıkıntılı, konnektif doku nevuslarıdır. "Shagreen patch" olarak adlandırılan kabarık yüzeyle, deri rengi veya hafif sarı renkli olabilen; hastaların 1/4-1/5'inde görülür. Bazen fibromlar gingiva ve oral mukozada da bulunabilir. Anjiyofibromlardan daha az görülür. Alın ve skalp üzerinde doğumda da mevcut olabilen fibröz plak ise, hastalığı en erken tanımlayan bulgulardan biridir (57).

Periungual-subungual fibromlar (Koenen tümörleri), TSK için patognomoniktir. Adolesan dönemde ortaya çıkabilir ve ayak parmaklarında el parmaklarına kıyasla daha sık olarak görülür (57, 59, 60).

Deri lezyonları puberte döneminde sayı ve büyüklükte artışa meyillidir ancak sonrasında stabil seyretmektedir. Malign transformasyon görülmemektedir (57).

2.1.5.2. Santral Sinir Sistemi Tutulumu

2.1.5.2.1. Santral Sinir Sistemi Lezyonları

TSK hastalarında üç tip merkezi sinir sistemi nodüler lezyonları tanımlanmıştır; gliyonöronal hamartomalar ya da diğer adıyla kortikal tüberler, beyaz cevher heterotopileri (displastik ya da demyelinizan beyaz cevher lezyonları), subependimal nodüller, subependimal dev hücreli tümörler (SGCTs; Subependymal giant cell tumors) ve subependimal dev hücreli astrositomlardır (SEGAs; subependymal giant cell astrocytomas) (61-63).

2.1.5.2.1.1. Hamartomlar

Gliyonöronal hamartomlar (kortikal tüberler) ve subependimal nodüller hamartom olarak kabul edilmektedir. Büyük atipik desorganize nöronal ve glial elementlerden oluşmaktadırlar (64).

Gliyonöronal hamartomlarda beynin kortikal yapısı bozulmuştur ve bu bölgelerde görüntüleme kolaylıkla görülebilen kalsifikasyonlar gelişir. Hastaların %80-90'ında görülmekte (64, 65), boyut ve sayılarının ise klinikle ilişkisiz olduğu düşünülmektedir (66). En sık frontal ve temporal alanlarda yerleşirler ve epilepsi ve davranışsal sorunlardan sorumlu oldukları düşünülür. Diğer TSK ilişkili lezyonlardan farklı olarak, postnatal yeni tüber oluşmaz. Tüberlerden neoplastik transformasyon görülmez ve tüberler zamanla kalsifiye olurlar (67-70).

Subependimal nodüllerin %50-100 arasında değişen oranda görüldüğü bildirilmektedir (71,72). Subependimal nodüller fetal hayatta oluşan, lateral ventrikül ve üçüncü ventrikül

yüzeyinde yerleşmiş, büyük sıradışı astrositlerden oluşan, 1 cm'den küçük oluşumlardır. Histolojik olarak ince bir ependimal hücre katmanı ile çevrilmiş ve damarlanması yoğun, astrosit içeren hamartomatöz oluşumlardır. Epilepsi ve davranışsal sorunlar ile ilişkiz oldukları kabul edilmektedir. Literatürde subependimal nodüllerin %50 oranında görüldüğünü bildiren yayınlar bulunmasına rağmen (73), bazı çalışmalarda %80-90'ında görüldüğü (61, 68, 69, 70) Baron ve ark. Yaptığı çalışmada ise %100 oranında görüldüğü bildirilmiştir (64).

2.1.5.2.1.2. Subependimal Dev Hücreli Tümörler

Subependimal dev hücreli tümörler; benign, yavaş büyüyen ve genelde periventriküler yerleşim gösteren tümörlerdir (62, 74, 75, 76). Olguların %10-15'in de ve sıklıkla ilk 20 yılda görülmektedir (77). Olguların ancak %6-9'u belirti vermektedir (62, 74, 77). TSK tanılı hastalarda gelişen SGCTs %85-90 subependimal nodüllerden orijin almaktadır (78,79). Hastalar tipik olarak baş ağrısı, kusma, görme kaybı gibi fokal nörolojik defisitler gibi obstrüktif hidrosefali semptomlarıyla prezente olurlar (74,75, 80, 81). Tümör büyüklüğü kriteri olarak 10 mm veya üzeri olarak belirlenerek tümörler tanımlanmaktadır.

Tuberosklerozda en sık görülen beyin tümörü dev hücreli astrositomdur (SEGAs), literatürde %17-20 oranında bildirilmiştir (64, 65, 82). Epileptojenik olduğu kanıtlanmamıştır (83). Fakat bazı çalışmalarda dev hücreli astrositomun nöbet sıklığını arttırdığı bildirilmektedir (84).

2.1.5.2.1.3. Diğer Lezyonlar

Beyaz cevher tutulumu TSK tanılı hastalarda sık görülmektedir (85). Manyetik Rezonans Görüntülemesi (MRG) ile lineer lezyonlar %15 saptanabilir (85). Tipik olarak ventrikülden kortekse uzanan, subependimal nodül veya subkortikal lezyon ile sonlanırlar ve demiyelizasyon özelliği gösterirler (86). Difüzyon MRG ile mikroskopik beyaz cevher tutulumu gösterilebilmektedir (87).

Tuberoskleroz tanılı 220 hastada beyin MRG ile yapılan retrospektif bir çalışmada, %5 oranında araknoid kist saptanmıştır (88), bu da TS klinik spektrumunda araknoid kistlerinin tanımlanabileceğini düşündürmektedir.

2.1.5.2.2. Nöbetler

Tuberosklerozda epilepsi ve kortikal tüber ilişkisi en çok ilgi çeken konulardan biridir (83, 89, 90, 91). Toplum tabanlı yapılan çalışmalarda %79-90 oranında olduğu saptanmıştır (92). %60 oranında Yaşamın ilk yılında nöbetler başlamasına rağmen adolesan dönemde de

başlama riski devam etmektedir (58, 93, 94). İki yüz kırk sekiz TSK tanılı hastada yapılan bir çalışmada takiplerinde %99 hastada epilepsi geliştiği görülmüştür (94).

Tuberoskleroz hastalarında epilepsi en sık başvuru nedenidir ve en sık infantil spazm tipi görülmektedir (%36-69) (95). Basit parsiyel, kompleks parsiyel ve sekonder jeneralize epilepsi tipleri de görülebilmektedir (94). Hastaların rutin elektroensefalografilerinde (EEG) %75 epileptiform aktivite saptanmaktadır. Multifokal deşarjlar, hipsaritmi ve generalize diken dalgalar gibi EEG bulguları sırayla %48, %19 ve %8 oranlarında görülmektedir (96).

Tüberlerin epileptojenik olduğu düşünölmekte fakat kortikal tüberlerdeki epileptojenezin moleküler temeli tam olarak bilinmemektedir (97,98). Kortikal tüber ve epilepsi seyri hakkında farklı görüşler bulunmaktadır (89-91). Bazı araştırmacılar kortikal tüber sayısı ile nöbet seyri arasında ilişki olduğunu, bazı araştırmacılar ise tüber sayısından ziyade tüber yükünün (tüber/beyin oranı) nöbet kontrolü üzerine etkisi olduğunu bildirmektedir (89, 91, 99). Yapılan bir meta-analizde beş çalışma değerlendirilmiş ve TSK tanılı ciddi serebral disfonksiyonu olan hastalardaki glionöronal hamartomların sayısının, hafif etkilenmiş hastalarda görölenenden altı kat daha fazla olduğu saptanmıştır (70). Farklı bir görüş ise tüber sayısı ile epilepsi seyri arasında ilişki bulunmadığı yönündedir (100).

2.1.5.2.3. Kognitif Bozukluk

Tuberosklerozda primer özellik olan kognitif defisitler %44-65 oranında görölmektedir (58,92). İnfantil spazm (92, 94, 101, 102), tekrarlayan nöbetler (94, 103, 104) ve daha az ölçüde glionöral hamartomların sayısı ile bağlantılı olduğu düşünölmektedir (105,106).

Zeka seviyesinde belirgin değişkenlik görölmektedir. IQ skorlarının ölçüldüğü 108 hasta ile yapılan bir çalışmada %55 normal, %14 orta-ciddi düşüş, %30 ciddi düşüş (IQ <21) saptanmıştır (92). Kognitif bozukluğu olan tüm hastalarda nöbet hikayesi, özellikle 1 yaş öncesi başlayan infantil spazm olduğu görölmüştür (92).

2.1.5.2.4. Otizm Spektrum Bozuklukları

Tuberoskleroz hastalarında otizm ve davranışsal sorunlar olarak hiperaktivite, dikkat eksikliği ve kendine zarar verme ön plandadır (107,108). %40-90 oranında görölmektedir. Yapılan bir çalışmada düşük entelektüel seviyenin ve tekrarlayan nöbetlerin davranışsal bozukluklara sebep olduğu gösterilmiştir (108).

Otizm spektrum bozuklukları gelişiminde hamartomların lokasyonu keskin bir ilişki saptanamamıştır. Yapılan bir çalışmada temporal lobe hamartomların, temporal lobda saptanan epileptiform deşarjların ve erken başlangıçlı persisan infantil spazm nöbetlerinin

otizm gelişiminde rolü olduğu bildirilmiştir (109). Buna karşın yapılan diğer çalışmalarda hamartomların görülme yerleri ile otizm arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır (55,110).

2.1.5.3. Kardiyovasküler Tutulum

Yapılan çalışmalarda TS'lu olguların %43-60'ında kalpte RM görülmektedir. RM çocuklarda en sık görülen kalp tümörüdür ve %4-6 oranında fetal ölüm riski vardır (111,112). Sık birlikteliği nedeniyle kalpte RM saptanan olgularda TS düşünölmelidir (111).

Uzun dönem periyodik yapılan 125 TS tanılı hastanın yer aldığı bir çalışmada %58 oranında RM, bunların %61 oranında 0-4 yaş arası, %36 oranında ise 5-18 yaş arası olduğu saptanmıştır (58).

Kardiyak tümörlerin prenatal tanısı ilk kez De Voreve ark. tarafından 1982'de rapor edilmiştir (113). Prenatal taramada TS'nun ilk tipik bulguları kalp ve beyinde görülür (114). Kalpte RM'lerin, TS için en erken bulgularından biri olabileceği bildirilmiştir (115). Gerek intrauterin dönemde, gerekse yenidoğan döneminde tüberosklerozun diğer klinik bulguları ortaya çıkmadan, TS sadece RM'le kendini gösterebilir. Bu durumda tanıya ulaşmada aile öyküsünün ve genetik danışmanlığın önemi artmaktadır (116).

Rabdomyomların yenidoğan döneminde görülme sıklığı 1/40000'dir (117). Kalpteki RM'lerin doğum öncesi ve doğum sonrası tanı ve izleminde ekokardiyografi oldukça değerli bir yöntemdir. Aile öyküsü olan olgularda fetal ekokardiyografi ile RM'nin belirlenmesi tüberosklerozun en erken bulgusudur (112, 115, 118). Literatürde kardiyak tümörlerin antenatal olarak en erken 15. gestasyon haftasında saptandığı bildirilmektedir (119). Chao ve ark.nın yapmış olduğu kardiyak RM'lerin incelendiği meta-analizde ise olguların çoğunun 24. gestasyon haftasından sonra tespit edildiği, olguların sadece %13,7'sinin 24. Gestasyon haftasından önce olduğu belirtilmiştir (120). Atalay ve ark.nın yaptığı çalışmada antenatal olarak en erken saptanan kardiyak rabdomyom olgusu 25. gestasyon haftasında idi (121).

Rabdomyomlar kalbin herhangi bir bölümüne yerleşebilmekle birlikte genellikle ventriküllerde ve septuma yakın bölgelerde görülürler. Çoğunlukla TS tanılı hastalarda birden çok kitle şeklinde bulunurlar (118,122).

Rabdomyomların klinik bulguları oldukça değişkendir. Kalpte RM'ler doğum öncesi dönemde kalp yetersizliği, hidrops fetalis ve ölü doğuma neden olabilirler. TS tanılı hastalarda görölen RM'ların semptomatik olma ihtimali daha yüksektir (123,124). YD döneminde ise hiç belirti vermeyebilecekleri gibi yerleşim yerlerine, büyüklüklerine ve sayılarına bağlı olarak kalpte mekanik darlığa, kalp yetmezliğine, aritmilere hatta ani ölümlere yol açabilirler (112,118).

Aritmiler tümörün anatomik lokalizasyonuna göre ektopik atriyal taşikardiler, ventriküler taşikardiler, atriyoventriküler nodda disfonksiyon ve Wolf-Parkinson-White sendromu şeklinde kendini gösterebilir (125).

Kalpdeki RM'lerin en önemli özelliği kendiliğinden gerileme gösterebilmesidir. Tümör fetal hayatta en büyük boyutlara sahipken, yaşla birlikte küçülür ve hatta tamamen kaybolabilir. Bu nedenle çocuklarda erişkinlerden daha sık görülmektedir (112, 118, 126).

Aort koarktasyon ve majör arterlerin konstriksiyonu (renal arter darlığı gibi) TS ile birlikteliği saptanmıştır (123). Aort anevrizması da görülebilmektedir (127).

2.1.5.4. Renal Tutulum

Böbrek lezyonları değişik ağırlıklarda olup anjiomyolipom, basit kist, polikistik böbrek hastalığı, renal hücreli karsinom şeklinde olabilir. En sık TSK de görülen iki renal patoloji anjiomyolipom ve renal kistlerdir (128).

Tuberosklerozda böbrek lezyonları, genelde bulgusuz olup, lezyonun derecesine bağlı olarak bulgu verebilirler (129). Böbrek bulguları yaşamın ilk yılında hatta doğumda bulunabilir.

Anjiomyolipomların görülme sıklığı daha fazladır. Anjiomyolipomlar, hastaların yaklaşık olarak %50-80'ninde görülür. Anjiomyolipomlar genellikle kortekste yerleşirler anormal vaskülarizasyon gösterirler, yağ hücreleri ve düz kas hücrelerinden oluşurlar. Anjiomyolipomların en potansiyel komplikasyonları kanamadır. Hastaların %20'sinde hemorajik şok da görülebilir (5,77). Kanama riski anjiomyolipomun boyutunun ve vaskülarizasyonunun artışı ile artar (128,129).

Tuberosklerozda böbrek kistleri %14-32 sıklıkla görülür. Böbrek kistlerinin en sık görülen tipi tek histolojik yapıda bir veya çok sayıda olan küçük lezyonlardır. Bu kistler çoğunlukla semptom vermezler. Daha az sıklıkla görülen şekilleri polikistik böbrek hastalığıyla birlikte olan büyük, çok sayıda, semptomatik ve renal prognozu kötü olan formdur.

Tuberoskleroz tanılı olgularda böbrek tümörlerin (astrositik hamartomlar) yaygınlığının daha önceden yapılan çalışmalarda %3-100 arasında değişkenlik gösterdiği bildirilirken (130,131), Mayo kliniğinin yaptığı bir çalışmada bu oran %49 olarak bildirilmiştir (132).

Renal hücreli karsinomun genel topluma göre TSK hastalarında daha erken yaşta ve daha sıklıkla görüldüğü kesin doğrulanmamış olsa da anekdotal bir bilgidir (128,129).

Böbrek toplayıcı sisteminin kısmi darlığı, idrar yolu enfeksiyonu, nefrolitiazis oluşumuna TSK de rastlanabilir (6, 129, 130).

2.1.5.5. Pulmoner Tutulum

Bazı TSK tanılı erişkinlerde difüz interstisyel fibroz olarak bilinen lenfanjiyomatozis (LAM) ile ayırt edilemeyen pulmoner tutulum geliştiği görülmüştür. Bu hastalık, ilerleyici pulmoner kistik değişiklikler, tekrarlayan pnömotoraks, şilöz plevral koleksiyonlar ve çoğu zaman ilerleyici solunum yetmezliği ile karakterizedir. Lenfadenopati, kistik lenfatik kitleler (lenfanjiyoleyomiyomlar), şilöz asit ve anjiyomiyolipom (benign tümör) abdominal belirtileridir (133).

Tuberoskleroza erkek ve çocuklarda çok az sayıda LAM olgusu bildirilmiştir; bununla birlikte, bu son derece nadirdir ve sporadik LAM'da ortaya çıkmaz (133). LAM neredeyse yalnızca kadınları etkileyerek, genellikle menopoz öncesinde gelişmektedir. TS'li erişkin kadınların %40'ında hastalık belirtileri saptanabilir (134-136). Hastalık menarş ile menopoz arasında ortaya çıkabilir ve ortalama başlangıç yaşı 34'tur.

Tuberoskeroz ilişkili LAM'da hastalık spektrumu daha geniştir. TS tanılı hastaların yalnızca %2-3'ünde LAM semptomları gelişir (137, 138); bununla birlikte, tarama yapılırsa, TS'li erişkin kadınların %40'ında LAM ile uyumlu kistik akciğer hastalığı vardır (135, 136, 139).

2.1.5.6. Oftalmik Tutulum

Tuberoskerozun göz bulguları fundusa ait olmayan ve fundus lezyonları olarak ayrılabilir. Fundusa ait olmayan bulgular, göz kapaklarında anjiofibromlar, poliosis, irislenkoroid kolobomu, iriste fokal hipopigmente lezyon ve iridosilier hamartomlardır (19, 140). Fundus lezyonları retina ve optik sinirin astrositik hamartomları ve retinada depigmente lezyonlardır. Retinanın astrositik hamartomları multifokal veya bilateraldir, soliter lezyonlar olabilir ancak tanısal değeri düşüktür. Retinal hamartomların morfolojik olarak iki tipi vardır; geniş, kabarık, beyaz (kalsifiye), dut görünümünde nodüler olanlar ve düz, translusen (nonkalsifiye), yumuşak görümlü lezyonlar. Her iki tip lezyonun beraber görülmesi de mümkündür; intermediate tip (19- 21).

Tuberoskerozda fundus lezyonları %53 görülürken olguların yarısında tutulum bilateraldir. Retinanın hemen bütün astrositik hamartomları endofitiktir, ancak bir adet ekzofitik olgu bildirilmiştir. Endofitik tümörler retinanın sinir lifi tabakasına ait hamartomlar olup ekzofitik tümörler subretinal boşluğun tümörleridir. Bu tümörler iyi huyludur ve neoplastik değildir. Ancak çok az veya yavaş büyüme gösterebilirler, kalsifiye olabilirler ve

kalsifikasyonun gelişmesiyle ilerleyici büyüme olabilir (19, 21). Böbrek ve beyinde gerçek neoplazmların gelişebileceği (141), retinal hamartomlarda seyrek olarak malign değişim olabileceği bilinmektedir. Son yıllarda agresif büyüme gösteren dev hücreli retinal astrositik hamartom (142) ve retinal astrositik hamartomlarda spontan gerileme (143) olan iki ayrı olgu bildirilmiştir. TS hastalarının görmesi sıklıkla normaldir, ancak vitreus hemorajisi, retinal vasküler anomaliler (talenjiektazi, neovaskülarizasyon ve eksudasyon), vitreusa tohumlanma, kafa içi basınç artışına bağlı papilödem, eksudatif retina dekolmanı ve neovasküler glokom gibi komplikasyonlara bağlı olarak görme kaybı olabilir (19,21).

Yaşları 2-76 arasında değişen 100 TSK tanılı olgunun göz bulgularının incelendiği bir çalışmada, hastaların 44'ünde retinal hamartom saptanmıştır (144). Retinal akromik yamalar ise olguların 39'unda saptanmıştır (144). Retinal olmayan lezyonlar ise sırası ile 39 hastada göz kapağında anjiofibrom, beş hastada parolitik olmayan strabismus, üç hastada kolobom ve iki hastada irisde depigmentasyon olarak gözlenmiştir (144).

Retinal gliomlar vakaların % 40-50'sinde görülür. Bunlar optik sinir hamartomlarıdır. Anjioid çizgilenme, nistagmus, strabismus, katarakt, göz kapaklarında anjiofibromlar ve iriste pigmenter değişikliklerde olabilir (145).

2.1.6. Tanı

Tuberoskleroz tanısı için 1990 yılında klinik kriterler üzerinde görüş birliğine varılmıştır. Önerilen klinik sınıflama; kesin, olası ve şüpheli TS' dur. Klinik bulgular hastalığa özgül olmalarına göre birincil, ikincil ve üçüncül olarak ayrılmıştır (146). Birincil bulgular tanı koydurucudur ve adenoma sebaceum, unguall fibromlar, histolojik olarak gösterilmiş kortikal tüberler, subependimal nodüller veya dev hücreli astrositom, radyolojik olarak gösterilmiş ventrikül içine doğru uzanan multiple kalsifiye subependimal nodüller ve multiple retinal astrositomlardır. SSS, deri ve göz dışında visseral organlar (böbrek, karaciğer, akciğer, kalp, tiroid, pankreas ve testis) ve iskelet sisteminde de TS' a ait bulgular tanımlanmıştır (19-21).

Roach ve Arkadaşları 1998 yılında Tuberoskleroz tanı kriterlerini revize ettiler (147). Buna göre yüzde anjiomyofibrom, hipomelanotik makül, Shagreen plakları, kortikal tuber, subependimal nodül, subependimal dev hücreli tümör, retinal hamartom, kardiyak RM, renal anjiomyolipom ve pulmoner LAM majör bulgulardır. Minör bulgular ise konfeti şeklinde cilt lezyonları, jinjival fibrom, dişin enamel kısmında çukurlar, sebebral beyaz maddede radial çizgi, retinal akromatik yama, kemik kistleri ve hamartomatöz rektal poliplerdir. Bu bulgulardan 2 majör veya 1 majör 2 minör kriterin varlığı tanı koydurucudur (147,148). Şüph

duyduğumuz bir olguda (ki bu şüphe çoğu zaman cilt bulgularıyla olmaktadır) erken dönemde detaylı görüntüleme yöntemleri ile doğru tanıya gidilebilir.

Tablo 1: Tuberoskleroz kompleksi tanı ölçütleri (1998)

Majör bulgular	Minör bulgular
1. Kortikal tüber	1. Retinada hipopigmente yama
2. Subependimal nodül	2. Hamartomatöz rektal polip
3. Dev hücreli astrositom	3. Kemik kisti
4. Hipomelanotik maküller (ash-leaf bulgusu)	4. Beyin beyaz maddede radyal migrasyon çizgisi
5. Shagreen yaması	5. Diş minesinde çok sayıda çukurlar
6. Adenoma sebaceum (Yüzde anjiyofibrom) ya da alında fibröz plak	6. Gömgeval fibrom
7. Çok sayıda retinal hemartomlar	7. Böbrek dışı hemartom
8. Ungual ya da perungual fibromlar	8. Konfeti deri lezyonları
9. Kalpte rabdomiyom	9. Çok sayıda böbrek kisti
10. Akciğerde lenfanjiyomatöz ya da böbrek anjiyomyolipomu	

Kesin tanı: iki majör ya da bir majör + iki minör ölçütü olabildiği tanı bir majör + bir minör
Olası tanı: bir majör ya da iki minör

Tablo 2: Tuberoskleroz Kompleksi Tanı Ölçütleri (2012)

A.Genetik tanı ölçütleri	
Tuberosklerozis kompleksi (TSC) kesin tanısı için, normal bir doküdan patojenik TSC mutasyonu göstermek yeterlidir. Patolojik mutasyon TSC1 ve TSC2 proteinlerinin işlevlerinde inaktivasyon olmasıdır (örneğin; protein sentezini önleyen çerçeve dışı insersiyon, delesyon ya da sessiz mutasyon yada büyük delesyonlar ya da işlevsel kayıplara neden olan "missense mutasyon"lar gibi). Proteinlerin işlevleri üzerine etkileri bilinmeyen TSC1 ya da TSC2 mutasyonları ise TSC'nin kesin tanısına koymakta yeterli değildir. Yaklaşık olarak TSC'li bireylerin %10-25'i konvansiyonel genetik testlerde tanımlanmış bir mutasyona sahip değildir. Mutasyon gösterilmemiş olması TSC tanısını dışlatmaz ve klinik tanısal ölçütlerin kullanımı üzerine etkisi yoktur.	
B. Klinik Tanı Kriterleri	
Majör bulgular	Minör bulgular
1. Hipomelanotik maküller (≥3; en az 5 mm çap)	1. Konfeti deri lezyonları
2. Anjiyofibromatöz (≥3) ya da fibröz sefalik plaklar	2. Diş minesinde çok sayıda çukurlar
3. Ungual fibrom (≥2)	3. İntraoral fibrom
4. Shagreen yaması	4. Retinada hipopigmente yama
5. Çok sayıda retinal hemartomlar	5. Çok sayıda böbrek kist
6. Kortikal displazilere	6. Böbrek dışı hemartom
7. Subependimal nodüller	
8. Subependimal Dev hücreli astositomlar	
9. Kalpte rabdomiyom	
10. Lenfanjiyoleiomyomatosis (LAM) ^a	
11. Anjiomyolipoma(≥2) ^b	
Kesin Tanı: 2 majör faktör yada 1 majör + ≥2 minör faktör	
Olası Tanı: 1 majör ya da ≥2 minör faktör	
^a Tuberler ve serebral beyaz cevher radial göç çizgileri dahildir	
^b Sadece lenfanjiyoleiomyomatosis ve anjiomyolipom varlığı kesin tanı için yeterli	

2012 yılında Uluslararası Tuberosklerozis Kompleks Konsensus Grubu tarafından yeniden belirlenen tanı ölçütlerinin 1998 tanı ölçütlerinden farkı, genetik sonuçların tanı ölçütleri içine alınmış olması ve tanı gruplarının üçden (kesin, yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı), ikiye düşmesidir (kesin, olası) (Tablo 2) (149).

TSK'nin antemortem tanısı için, bu sistem tutulumlarına bağlı klinik ve nöroradyolojik bulgulara dayalı bazı kriterler belirlenmiştir. Bu kriterlere göre TSK tanısı için şunlar gereklidir: 1) En az iki karakteristik lezyon varlığı (iki beyin, deri, retina hamartomu gibi), 2) İki farklı organda en az bir karakteristik hamartom varlığı veya, 3) 1. derece akrabalarından birinde kesin hastalık varken, tek bir organ tutulumu olması.

Klinik olarak kesin tanı kriterlerine uyan hastalar için genetik test yapılması şart değildir. Olası TSK tanısı düşünülen hastalar için, gebelik öncesi genetik danışma verilmesi için ve ailedeki riskli bireylerin belirlenmesinde tanıyı doğrulamada genetik inceleme yapılması faydalıdır. Klinik olarak TSK özellikleri olan klinik kesin tanıli hastalarda genetik mutasyonun negatif olması tanıyı dışlatmaz çünkü mosaisizmin olma olasılığı unutulmamalıdır. Ayrıca aile öyküsü olmayan bir çocuk TSK tanısı aldığı anda aile bireylerinin taranması gerektiği unutulmamalıdır (128).

2.1.7. Takip ve Tedavi

Tanı sırasında hastanın yaşına bakılmaksızın abdominal görüntüleme yapılmalıdır, beyin ve abdominal MRG anesteziden kaçınmak için tek seansta yapılabilir (7). Abdominal MRG aortik aneurizmaları, ekstrarenal hamartomları gösterebilir. Anjiomyolipom ve renal kistik hastalığın ilerlemesinin değerlendirilmesi için her 1-3 yılda bir karın MRG incelemesi yapılmalıdır (51).

Tuberosklerozda nadiren son dönem böbrek yetersizliği gelişebilir (129). TSK tanısı konulan çocuklar böbrek incelemesinden geçirilmeli, izlemde var olan renal bulguların değişkenlik gösterebileceği yeni renal bulguların ortaya çıkabileceği unutulmamalıdır.

Tuberoskleroz hastalarında sekonder hipertansiyon riski artmış olduğu için kan basıncı ölçüm değerlendirmeleri önemlidir (51). Hipertansiyonu olan hastalar grubunda renin anjiotensin aldosteron sistemi inhibitörleri ilk seçenek tedavidir ve mTOR inhibitörü alan hastalarda anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinden kaçınılması gerektiği unutulmamalıdır (51).

Asemptomatik büyüyen 3 cm den büyük anjiomyolipom için mTOR inhibitör tedavisi ilk seçenek olarak önerilmektedir. Asemptomatik anjiomyolipom için böbrek koruyucu rezeksiyon veya selektif embolizasyon ikinci tedavi seçeneğidir (51). Eğer lezyonla ilgili

malignansi şüphesi varsa ve lezyonlar yılda 0,5 cm'den daha fazla büyüyorlarsa iğne biyopsisi veya açık biyopsi alınması düşünülebilir. Asemptomatik olup büyüyen 3 cm den büyük anjiomyolipom için mTOR inhibitör tedavisi günümüzde önerilen kısa dönemde en etkili birincil tedavi yöntemidir. İlaç uyumundaki güçlükler nedeniyle anjiomyolipomun neden olduğu renal hasarın ilerlemesinde tercih edilmekten çok bir tedavi olarak görülmektedir. Yine aynı şekilde cerrahi ve embolik ablatif tedaviler hala çalışmalarla uzun dönem fayda yarar ve güvenliklerinin doğrulanmasını gerektiriyor (7).

Tuberoskleroz tanısı konulan çocukların böbrek incelemesinden geçirilmeli, izlemde var olan renal bulguların değişkenlik gösterebileceği yeni renal bulguların ortaya çıkabileceği unutulmamalı nefrolojik izlemleri düzenli olarak yapılmalıdır. Hastaların, renal fonksiyon testleri en az yıllık kontrol edilmeli ve GFR değerleri hesaplanmalıdır (51).

Göz lezyonlarındaki değişikliklerin ve komplikasyonların belirlenmesi amacıyla hastaların düzenli aralıklarla takip edilmesi gereklidir. Muayeneler sırasında, özellikle iris anormalliği olan hastalarda, iris ve silier cisim hamartomlarının da varlığı araştırılmalıdır. Hastamızın yaklaşık bir yıllık takibinde göz bulgularında değişiklik izlenmemiştir (19).

Rabdomyomlar zamanla gerileyebildikleri için ekokardiyografi ile izlenmesi önerilmekte, kalpte mekanik darlığa yol açması, kalp yetmezliği gelişmesi veya yaşamı tehdit edici aritmilere neden olması durumunda cerrahi tedavi uygulanmalıdır (112, 118, 150).

Lenfanjiyomatozis hücre biyolojisindeki son gelişmeler, bu hastalarda tüberoskleroz ile ilişkili genlerde somatik mutasyonlar bulunduğunu ve rapamisinin sonuçtaki hücrel bozukluğu düzeltilebileceğini göstermiştir. LAM'da rapamisin çalışmaları bugün devam etmektedir ve hastalığın kanıta dayalı tedavisi için ümit vermektedir (134).

Otozomal baskın geçiş gösteren TS tanılı hastalarda, olguların 3/4'ünde aile öyküsü saptanmayabilir (33). Yüksek geçirgenliğe sahip olup, fenotipik özelliklerin ortaya çıkışı çok değişkenlik gösterebilmektedir. Bu nedenle, TS tanısı konduğunda mutlaka aile taraması yapılmalıdır. Bu tarama özellikle, deri bulgularına yönelik fizik muayene, göz dibi muayenesi, BT veya beynin MR görüntülemesi ve karın USG'sini içermelidir. TS tanısının konulması, genetik danışma verilmesi ve yeni ortaya çıkacak olguların önlenmesi açısından önem taşımaktadır.

2.2. Oksidan Ve Antioksidan Sistemler

2.2.1. Oksidan Sistemler

2.2.1.1. Serbest Radikaller

Serbest oksijen radikalleri (SOR), metabolik ve fizyolojik süreçler sırasında meydana gelen ve enzimatik olan veya olmayan antioksidan mekanizmalar ile uzaklaştırılan maddelerdir. Bütün organizmalarda SOR üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasında hassas bir denge vardır. Oksidatif stres, serbest oksijen radikallerinin üretimi ile bunların antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılması arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır (151,152).

Serbest oksijen radikalleri, hücre metabolizmasında oksijen içeren pek çok biyokimyasal reaksiyon sonucu oluşmaktadır. Bu kimyasal reaksiyonlar sırasında oksijen, elektron transport zincirinde suya kadar indirgenirken her basamakta serbest oksijen radikalleri açığa çıkmaktadır (151,152). En önemli serbest oksijen radikalleri; süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (HO^-) ve singlet oksijen ($O_2^{\uparrow\downarrow}$)'dir (152,153).

Süperoksit radikali (O_2^-): Süperoksit radikali, kendisi zayıf bir serbest oksijen radikali olmakla birlikte, H_2O_2 'nin ana kaynağıdır. Oksitleyici ve metal iyonlarını redükleyici etkisi vardır. Mitokondride tüketilen oksijenin %1-5'i süperoksit yapımı ile sonlanmaktadır. Aktive olan fagositik hücrelerde fazla miktarda süperoksit üretimi olmaktadır. Antibakteriyel etki için gerekli olan süperoksit radikali, aynı zamanda daha reaktif olan radikallerin oluşumunu da tetiklemektedir (152,153).

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Serbest radikal değildir. Ancak metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olmasından dolayı oksitleyici olarak kabul edilmektedir. Hidrojen peroksitin kaynağı süperoksit radikalleridir. Hidrojen peroksit, proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile reaksiyona girerek yüksek oksidasyon özelliği olan reaktif demir formlarının oluşturmaktadır. Reaktif demir, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatmaktadır (152).

Hidroksil radikali (HO^-): Hidroksil radikali, en reaktif radikal olarak bilinir. Fagositoz ve çeşitli enzimatik katalizlerde üretilen, normal biyolojik reaksiyonlarda da kullanılan reaktif bir ajandır. Hidroksil radikalının meydana getirdiği en önemli biyolojik reaksiyon, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur (152,153).

Singlet oksijen (O₂^{↑↓}): Oksijenin uyarılmış şekline singlet (tekil) oksijen denir. Radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Reaktivitesi çok yüksektir. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksil radikalini oluşturmakta ve hidroksil radikali kadar etkili bir lipit peroksidasyonunu başlatmaktadır (152).

2.2.1.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrenin lipit, protein, karbonhidrat metabolizması ve DNA üzerine çeşitli derecelerde hasara neden olabilmektedir (152,153).

2.2.1.3. Hücre Membranlarının Lipit Peroksidasyonu

Serbest radikallerin hücre üzerindeki en önemli etkisi membran lipitlerinin peroksidasyonudur. Bu reaksiyonda serbest radikaller çoklu doymamış yağ asitlerine, membranlardaki kolesterol ve lipoproteinlere saldırır. Lipit peroksidasyonu enzimler ve redoks sensitif genler tarafından düzenlenen fizyolojik bir süreçtir. Ancak kontrolsüz lipit peroksidasyonu hücre disfonksiyonuna neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen hasar geri dönüşümsüzdür (153). Membran lipitlerinin peroksidasyonu permeabilitede ve membran akışkanlığında değişikliklere yol açmaktadır. Sinir liflerindeki miyelin kılıfının peroksidasyonu dismiyelinizasyona neden olarak nörolojik hastalıklara yol açmaktadır. Akciğer sürfaktanının peroksidasyonu ise atelektazi ve pulmoner disfonksiyona yol açabilmektedir (154). Membrandaki fosfolipitlerin peroksidasyonu hücrenin geçirgenliğini bozarak hücre içi organellerinin hasarına yol açar. SOR'i çoklu doymamış yağ asidi moleküllerini okside ederek aldehytlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Aldehytler uzun ömürlü oldukları için hücre hasarının yayılmasına neden olurlar. En iyi bilinen aldehyd malondialdehyt (MDA)'dir. MDA lipit peroksidasyonu derecesiyle korelasyon göstermektedir. MDA membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyona yol açarak membran özelliklerini değiştirmektedir. Membrandaki yağ asitlerinin peroksidasyonuyla oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve aminoasitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır (155).

2.2.1.4. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu

Proteinler serbest radikallerden çoklu doymamış yağ asitlerine göre daha az etkilenirler. Proteinler serbest oksijen radikallerine maruz kaldıklarında aminoasit yan zincirlerinde modifikasyonlar oluşur ve protein yapısı bozulur. Bu da fonksiyonel değişikliğe yol açarak hücre metabolizmasını bozmaktadır. Oksidasyon reaksiyonları sonucu protein

moleküllerinin yapısı değişir ve denatürasyon oluşur. Aynı şekilde oksidatif modifikasyon yoluyla, sitozolik nötral proteazlar kritik enzimlerin yıkımını gerçekleştirebilirler. Ayrıca serbest radikaller enzimlerin, nörotransmitterlerin ve reseptör proteinlerin ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarında bozulmasına neden olabilirler (152).

2.2.1.5. Karbonhidratlar üzerine etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelmektedir. Örneğin; enflamatuar eklem hastalıklarında, sinoviyal sıvıya geçen lökositlerden hücre dışı sıvıya salınan H₂O₂ ve O₂ buradaki mukopolisakkarit olan hyalüronik asiti parçalamaktadır. Gözün vitreus sıvısında bol miktarda hyalüronik asit bulunduğundan bunun oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunmaktadır (152).

2.2.1.6. DNA üzerine etkileri

Nükleik asitler, serbest radikallere bağlı değişikliklere duyarlıdır. Hidroksil radikallerin pürin ve pirimidin bazlarını okside ederek; baz modifikasyonları, baz delesyonları ve zincir kırılmaları neden olabilmektedir. Oksijen radikalleri, oksidatif yarılma ile DNA hasarına yol açabilmektedir. Özellikle pirimidinler en hassas yapılardır. DNA zincirinin kopması, DNA çift sarmalı ayrılması sonucu hücrede mutasyonlar ve ölüm gerçekleşebilmektedir. 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OhdG) oksidatif DNA hasarının bir göstergesi olarak yenidoğan ve hipoksiye maruz kalan bebeklerde daha yüksek olduğu bildirilmektedir (152).

2.2.2. Antioksidan Sistemler

Vücutta oluşan serbest oksijen radikallerini metabolize eden, serbest oksijen radikali oluşumunu önleyen, temizlenmesini arttıran, oluşabilecek hasarı onaran veya önleyen savunma maddeleri vardır. Savunma yapan bu maddelere antioksidan madde denir. Aerobik hücrelerde bulunan antioksidan maddeler ekzojen veya endojen kaynaklı olabilmektedir (152). Endojen antioksidanlar; enzimatik (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon transferaz, mitokondriyal oksidaz sistemi) veya non-enzimatik (bilirubin, albumin, ürik asit, α-tokoferol, seruloplazmin, transferin, ferritin, glutatyon) maddelerdir. Bunlar oksijen radikallerine karşı ilk savunma sistemini oluşturmaktadır (156,157). Ekzojen antioksidanlar; C vitamini, E vitamini, folik asit, N-asetilsistein, mannitol, adenzin, demir şelatörleri, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar sayılabilir (152,157).

Antioksidanlar işlevlerine göre primer, sekonder ve tersiyer olarak üçe ayrılır. Primer antioksidanlar (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, ferritin, seruloplazmin,

haptoglobulin, metal bağlayıcı proteinler, hemopeksin), yeni serbest radikal oluşumunu önler. Sekonder antioksidanlar (vitamin-C, vitamin-E, ürik asit, bilirubin), zincir kırıcı reaksiyonlar sayesinde serbest radikalleri uzaklaştırırlar. Tersiyer antioksidanlar (DNA onarımı yapan enzimler) ise serbest radikaller tarafından hasar gören biyomolekülleri onarırlar (152).

2.2.2.1.Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD): SOD substrat olarak oksijen radikalini kullanarak süperoksiti hidrojen peroksite çeviren bir metalloenzimdir. Lipit peroksidasyonunu inhibe etmektedir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. Hücre dışı aktivitesi düşüktür. SOD, lösemi, iskemik olaylar, hepatit, preeklampsi ve sepsis gibi olaylarda koruyucu rol oynamaktadır (158).

Katalaz: Katalaz hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırmaktadır. Peroksizomlarda bulunur. Bulunduğu hücreyi oksidatif strese karşı korumaktadır (159).

Glutasyon peroksidaz (GPx): Hücre sitozolünde bulunan bir enzimdir. SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksit ve yağ asiti peroksitlerini inhibe ederler. Kofaktör olarak selenyum kullanır. Fagositik hücrelerin ve eritrositlerin oksidatif strese karşı korunmasında rol alırlar (152).

Glutasyon-S-transferaz (GST): Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda görev alırlar. Araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri başta olmak üzere lipit hidroperoksitlere karşı GST'ler selenyum bağımsız aktivite göstermektedir (152).

Glutasyon redüktaz (GR): Glutasyon peroksidaz tarafından hidrojen peroksit ve diğer lipit peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında glutasyon, okside glutatyona dönüşmektedir. Oksidasyona uğramış bu yapıyı tekrar kullanmak için redükte glutatyona dönüştüren enzim glutasyon redüktazdır (152).

Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Süperoksit radikalini suya çevirerek etki gösterir (152).

2.2.2.2.Non-enzimatik Antioksidanlar

Vitamin E: Yağda çözünen ve zincir kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipitlerindeki yağ asitlerini korumaktır (152).

Vitamin C: Lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur. Antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. Fagositozda oksidatif parçalanma ürünlerinin zararlı etkilerini önler (152).

Vitamin A: Serbest radikalleri biyolojik hedeflerle etkileşime girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak da etki ederek peroksit radikallerinin oluşumunu önler (152).

Bilirubin: Lipit peroksidasyonunda zincirleme gelişen reaksiyonu engelleyici antioksidan olarak en az α -tokoferol kadar etkilidir. Bilirubin yüksek serum düzeylerinde toksik bir bileşiktir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda konjuge çift bağ içeren bilirubinin *in vivo* ve *in-vitro* güçlü bir antioksidan olduğu ispatlanmıştır. Oksidatif stresle tetiklenen bilirubinin hızlı ve uzun süreli oksidanlara bağlı hücre yıkımında fizyolojik koruyucu olarak rol oynamaktadır (160).

Ürik Asit: Kuvvetli olarak demir ve bakır bağlama yeteneği, antioksidatif rolünün önemli bir parçasıdır. Lipit peroksidasyonunu inhibe etme ve radikalleri temizleme görevine sahiptir (152).

Albümin: Albümin kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Albumin yüzeyinde oluşacak olan OH- radikali albumin tarafından temizlenir (152).

Seruloplazmin: Demir ve bakır bağımlı lipit peroksidasyonu inhibe eder. Daha az önemli olmakla birlikte süperoksit radikali ile reaksiyona da girer (152).

Transferin ve Laktoferrin: Demiri bağlayarak lipid peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır (152).

Polifenoller: Fenoller, aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren etkili antioksidanlardır (152).

2.2.3. Total Antioksidan Durum, Oksidatif Stres Ve DNA Hasarı

Biyolojik sistemlerde hücreler, reaktif oksijen türlerinin (ROT) zararlı etkilerine karşı antioksidan savunma sistemleri ile korunurlar (8). Oksidan ve antioksidan moleküller arası sağlanan bu denge ile homeostazis korunur.

Normal koşullarda reaktif oksijen türleri, enzimatik ya da non-enzimatik antioksidatif mekanizmalarla uzaklaştırılmalarına rağmen bazı durumlarda oksidanların düzeylerindeki artışa ve/veya antioksidanların düzeyindeki azalmaya bağlı olarak oksidatif/antioksidatif

denge, oksidatif yöne kayar ve birçok hastalığın patogenezi ile ilişkili olan oksidatif strese yol açar (8,9).

Oksidatif stres, hücrel metabolizma sırasında oluşan serbest oksijen radikallerinin artışı ile onları detoksifiye eden, antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır (8).

Oksidatif stresteki artış sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri hücre içi lipit ve protein yapıların çift bağ içeren gruplarına ve DNA'daki bazların çift bağlarına saldırır ve zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar. Sonuçta hücre içi lipit, protein ve DNA gibi makromoleküller hasarlanarak hücre zedelenmesi veya hücre ölümü meydana gelir (152).

2.2.3.1. Oksidatif Strese Bağlı DNA Hasarının Oluşum Mekanizması

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde endojen veya ekzojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılır. Genomik DNA'nın bütünlüğü çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli olarak tehdit altındadır. DNA replikasyonu ve DNA rekombinasyonu gibi hücrel olaylar sırasında da endojen olarak DNA'nın yapısında değişiklikler oluşabilir (161).

Reaktif oksijen türleri DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar (162). Bu hasarı farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak yaptığı düşünülmektedir (10).

2.2.3.2. Oksidatif Strese Bağlı DNA Hasarı Tespit Yöntemleri

Son 20 yılda hücre DNA'larında gerçekleşen oksidatif baz hasarını tanımlamak amacıyla çok sayıda kimyasal ve biyokimyasal testler geliştirilmiştir. Çeşitli DNA lezyonlarının ölçümünde birtakım analitik teknikler; immunokimyasal teknikler, kapiller elektroforez, tek hücre jel elektroforezi (Comet testi), 32P post labeling ölçüm teknikleri, alkalın elusyon testi ve kromatografik teknikler kullanılmaktadır (163).

2.2.3.3. Total Oksidan-Antioksidan Durum Tespit Yöntemleri

Oksidan ve antioksidan moleküllerin serum veya plazma düzeylerini ölçen çeşitli analitik yöntemler bulunmaktadır (164). Ancak bu moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesi hem zaman alıcı, hem de zordur. Ayrıca ekonomik yönden de zorlayıcıdır. Bu nedenle "total antioksidan durum" ya da "total oksidan durum" ölçümü bir örnekteki oksidan ve antioksidan moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesinden daha pratiktir (165).

Total antioksidan düzeyi, antioksidan aktivite (TAA) (166), total antioksidan durum (TAS) (167) veya total antioksidan kapasite (TAC) (168) olarak da ifade edilmektedir.

Total antioksidan durum ölçümü için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde bir radikal oluşturularak bu radikale karşı örneğin antioksidan aktivitesi ölçülür. En yaygın kullanılan kolorimetrik yöntemler, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (=ABTS) kullanan yöntemlerdir. Renksiz indirgenmiş ABTS molekülü, mavi-yeşil renkli ABTS•+ radikaline okside edilir. Renkli ABTS•+ radikali, okside olabilecek herhangi bir molekül ile karıştırılırsa yeniden orijinal renksiz ABTS formuna dönüşür, reaksiyona giren madde ise okside olur. Bu özellik ABTS kullanan yöntemlerin temelini oluşturur (169, 170, 172).

İndirgenmiş ABTS molekülü çeşitli oksidanlarla okside edilebilir, potasyum persülfat ve 2,2'-azo-bis (2-amidinopropan) (=ABAP) (88) bunlardan bazılarıdır. ABTS molekülünü okside etmek için H₂O₂ ve bir peroksidaz enzimini birlikte kullanan yöntemler de bulunmaktadır (171).

Erel ve ark. (172) tarafından geliştirilen yöntemde, indirgenmiş ABTS molekülü herhangi bir peroksidaz ajan kullanılmadan sadece H₂O₂ varlığında ve asidik ortamda okside edilmekte ve böylece daha dayanıklı bir ABTS•+ radikali üretilmektedir. Asetat tampon solüsyonundaki konsantrasyon (koyu yeşil) ABTS•+ molekülü daha uzun süre dayanıklılığını korumaktadır.

Total oksidan durum için serum oksidan aktivite (SOA) (173) veya reaktif oksijen metabolitleri (ROM) (174) gibi ifadeler kullanılmaktadır. TOS ölçümü için de çeşitli yöntemler bulunmaktadır (175). Erel ve ark. (176), TOS ölçümü için oldukça kolay, dayanıklı, güvenilir ve ekonomik bir yöntem geliştirmişlerdir.

Oksidatif stres indeksi (OSİ), TOS değerinin TAS değerine oranıdır. TAS'ın birimi µmol Trolox Ekvivalent/L'ye çevrildikten sonra oksidatif stres indeksi hesaplanır (177).

2.3. MikroRNA ve diğer “Non-Coding” RNA’lar

Yaklaşık 50 yıldan beri “gen” terimi mesajcı RNA’ları (mRNA) kodlayarak genetik bilgiyi protein diline tercüme eden bölgelerle aynı anlamda kullanılmıştır. Bununla birlikte son yıllarda yapılan tüm genom ve işlevsel analiz çalışmaları insan genomunun yaygın olarak binlerce düzenleyici “non-coding” RNA (ncRNA)’lar transkribe ettiğini ortaya koymuştur. Bunlar arasında mikroRNA (miRNA)’lar, small interfering RNA (siRNA)’lar, P-element-induced Wimpily Testis (PIWI) interacting RNAs (piRNA)’lar ve çeşitli uzun “long non-

coding RNA" (lncRNA)'lar bulunmaktadır (178). Ayrıca genom üzerinde yer alan ve hastalıklarla ilişkili olan genetik varyasyonların büyük bir kısmının, protein kodlayan bölgelerin dışında kalan ve transkripsiyonu kontrol eden "promoter", "enhancer" gibi bölgelerde ve gen ekspresyonunu düzenlemede görev yapan ncRNA'larla ilişkili olduğu da bulunmuştur (179).

Şimdiye kadar tanımlanan sınıflar içerisinde miRNA'lar, siRNA'lar ve piRNA'lar efektör Argonaute proteinlerin klavuzluğunda genomik lokus veya hedef RNA'lara dizi spesifik bir düzende bağlanarak onları kesime uğratarak susturmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı da üzerinde en fazla çalışma yapılan grupları oluşturmaktadırlar (179).

Bu küçük RNA'lar tarafından yönlendirilen gen ekspresyonunun kontrolü, hücresel işlevlerin düzenlenmesinde yer alan temel prensiplerden birisi olarak benimsenmiştir (179).

İnsanlarda 1000'den fazla miRNA, yüzlerce siRNA ve binlerce benzersiz piRNA dizisinin varlığı küçük RNA'ların tüm RNA'lar içerisinde önemli bir işlevsel konuma sahip olduğunu ve bazal düzenleyici sistemde yaygın olarak görev aldıklarını ortaya koymaktadır (179).

2.3.1. MikroRNA

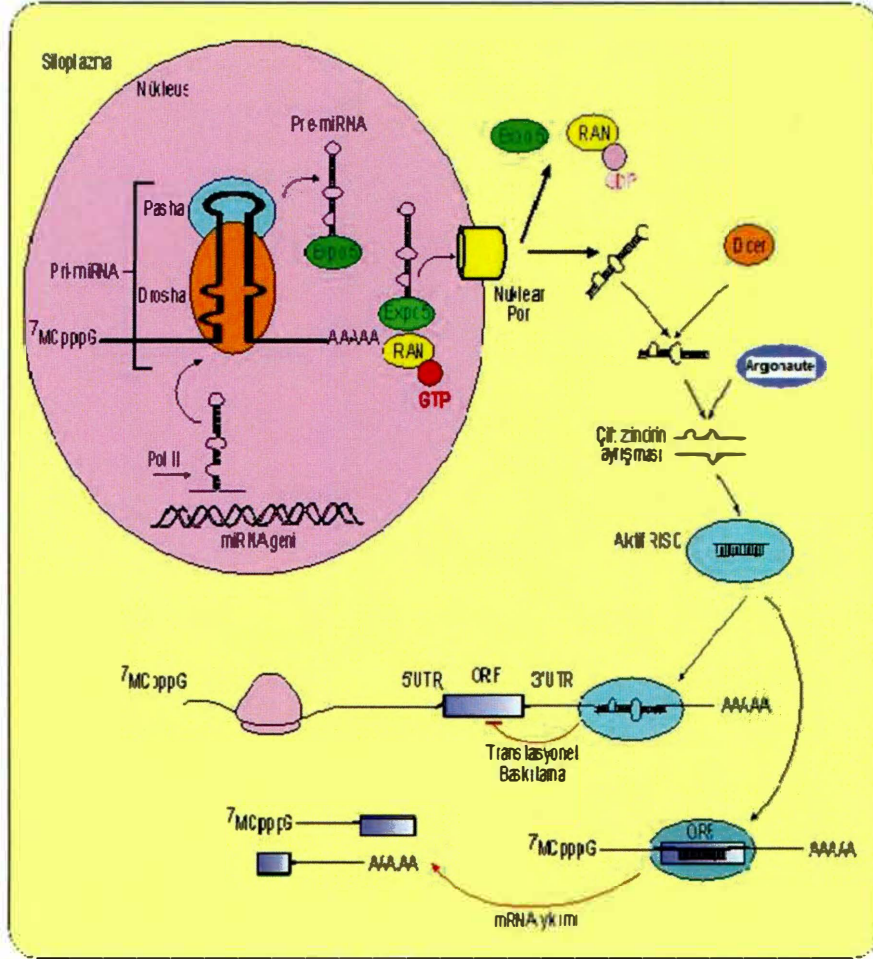
Araştırmalar geniş ölçüde DNA dizisinin çözümlenmesine ve DNA dizisi tarafından kodlanan proteinlerin belirlenmesine odaklanmıştır. İnsan genomunda yer alan DNA'nın büyük bir bölümü, RNA kodlamasına rağmen bu genomun çok küçük bir miktarı (yaklaşık olarak %1.5) fonksiyonel proteinlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar genomun geri kalan kısmının çok az önem içerdiği düşünülmekteydi. Fakat bu görüş, küçük RNA moleküllerinin keşfi ile ortadan kalkmıştır. Bu grup içine giren mikroRNA'lar (miRNA'lar), RNA'ların protein kodlamayan (non-coding) dizileri olarak adlandırılmaktadır. Araştırmacılar, miRNA'ların hücresel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev aldığını, bununla birlikte, hücrede miRNA seviyelerinin normal koşulların dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir (11). Böylece, mikroRNA'ların tümör gelişiminde onkogen veya tümör süpresörler olarak fonksiyon gösterdikleri ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla bu konuda bir çalışma bilgisinin kanserin erken teşhisi ve tedavisi için önemli olabileceği çok açıktır (11).

2.3.1.1. MikroRNA'ların Yapısı ve Keşfi

MikroRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir (12). MikroRNA, fonksiyon

olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli bir RNA molekül çeşididir. Pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler işlenerek, önce pre-miRNA adlı kısa sap-ilmik yapılarına, sonra da fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler. İnsan genomunda miRNA'ları kodlayan yüksek seviyede korunmuş yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir (12).

Şekil 1: MikroRNA'ların oluşumu ve fonksiyonu (11)



2.3.1.2. MikroRNA'ların Tarihçesi

MikroRNA'lar ilk olarak 1990'lı yılların başlarında, nematod türü bir solucan olan *Caenorhabditis Elegans*'ların gelişimi üzerine yapılan genetik taramalar sırasında Ambros ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (180). İlk keşfedilen miRNA, lin-4'tür. Lin-4'ün hedefe spesifik translasyonel inhibisyona neden olması gelişme süresinde gen düzenlenmesindeki yeni bir mekanizma olabileceğini düşündürmüştür. Lin-4'ün tanımlanmasından 7 yıl sonrada diğer bir miRNA olan let-7'ün, *C.elegans*'ın gelişmesindeki düzenleyici işlevi olduğu gösterilmiştir (180).

2.3.1.3. MikroRNA'nın Biyogenezi

Hayvanlarda olgun miRNA'nın oluşumu 2 basamakta gerçekleşmektedir.

1. miRNA transkriptinin (pri-miRNA), 70 nükleotid uzunluğundaki prekürsöre (pre-miRNA) dönüşmesiyle,

2. Pre-miRNA prekürsörünün 21-25 nükleotid uzunluğundaki olgun miRNA'yı oluşturması için kesilmesiyle oluşur (180).

İlk basamakta miRNA geni RNA polimeraz II enzimi tarafından pri-miRNA'ya dönüştürülür. Pri-miRNA'ların transkripsiyonel düzenleme üzerindeki etkileri hakkında bilgiler yeterli olmayıp birkaç kilobaz uzunluğundadırlar ve genellikle 5' ucunda şapka, 3' ucunda poli-A ucuna sahiptirler ve protein kodlayan mRNA'lara benzerlik gösterirler. Bu RNA'lar ORF (open reading frame) içerir ya da içermesinler kesilirler ve de poliadenil kuyruğu takılırken lop özelliği gösterirler (181-183).

Pri-miRNA'lar, nükleusta RNAaz III endonükleaz enzimi olan Drosha ve gerekli bir kofaktör olan Di George syndrome critical region gene 8 (DGCR8/ PASHA) tarafından kesilerek 60-70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'ya dönüşürler. Drosha enzimi başlıca nükleusta yer alır, kesim bölgesinin 3' ucunda 2 nükleotid uzunluğunda çıkıntıya sahiptir. Çift sarmallı RNA (dsRNA) bağlayıcı domain ve amino terminal domain olmak üzere iki domain içerir. Drosha enzimi tarafından kesim olduktan sonra pre-miRNA'lar nükleustan sitoplazmaya Exportin 5 (Exp-5-Ran transport reseptor ailesinin bir üyesi) ile taşınırlar (181-183). Sitoplazmaya geçen pre-miRNA'lar, ikinci bir RNAaz III endonükleaz enzimi olan Dicer tarafından çift sarmallı miRNA'lara (ds-miRNA) dönüştürülür. Dicer enzimi de helikaz domaini, DUF 283 domain, PAZ (Piwi, Argonaute- Zwillie) domaini ve RNAaz III domaini olmak üzere üç domain içerir. miRNA dubleksleri, helikaz enzimi tarafından olgun miRNA'ya dönüştürülür. Olgun miRNA'da, RNA induced silencing complex (RISC) olarak adlandırılan geniş bir protein kompleksiyle etkileşime girerek mRNA kesimini ve translasyonunu inhibe ederek mRNA'ların baskılanmasını yönetirler (181-183). (Şekil 1).

2.3.1.4 MikroRNA'ların Fonksiyonu

Olgun mikroRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. MiRNA'lar kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. MiRNA, RISC ile kompleks oluşturur, baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanır, sonrasında protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkımına neden olur (12).

MikroRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölge olan untranslated region'a (UTR) veya hedef mRNA'nın ORF (open reading frame) bölgesine bağlanır (Şekil 1). Bağlanma pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlıdır. 3' UTR bölgesine bağlanma kusurlu, tam olmayan, eksik komplementerliği ihtiva eder ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. ORF bölgesi içine bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği gösterir ve Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır (184). Ayrıca, miRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir (185).

2.3.1.5. MikroRNA'ların Hastalık Oluşumundaki Yeri

Küçük RNA'lar kök hücre ve germline sürekliliği, gelişmesi ve farklılaşması ve subseleler lokalizasyon gibi hemen hemen tüm gelişim süreçlerinde rol oynamaktadırlar. Bu nedenlerden dolayı süreçteki bir bozukluğun insan hastalıkları ile ilişkili olması sürpriz değildir. Örneğin, karaciğer, pankreatik, özofajiyel, mide, kolon, hematopoetik, over, meme, hipofiz, prostat, tiroid, testiküler ve beyin kanserlerinde miRNA ekspresyonlarında anomaliler gözlenmektedir. miRNA genleri genellikle insan genomunun kırılğan bölgelerinde bulunmakta olup bu bölgeler onkojenik viral integrasyon bölgeleriyle de ilişkilidir (12).

MikroRNA'ların değişen ekspresyon düzeylerinin önemi, hedeflerine bağlı olarak değişmekte olup, ya tümör baskılayıcı veya onkojenik işlev gösterirler ve bu değişimler, üzerinde çalışılan tüm kanser tiplerinde gösterilmiştir. Benzer ilişki, kardiyovasküler hastalıklarda ve diğer birçok hastalıkta da belirlenmiştir (12).

2.3.1.6 MikroRNA'ların Tanı Stratejileri geliştirilmesindeki yeri

MikroRNA'lar ekspresyon düzeylerindeki anomaliler veya kendilerini kodlayan genlerdeki varyasyonlardan dolayı ilişkili oldukları protein sentez düzenlenmesini yeterince yapamazlar ve ilişkili oldukları proteinlerin kritik işlevleri ile ilişkili olarak çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. İşte bu anomalilerin belirlenmesi ilişkili oldukları hastalıkların da özgül tanısını sağlayabilmektedir. Çeşitli çalışmalarda yapılan gözlemler, parafine gömülü klinik örneklerde ve insan plazmasında bulunan miRNA'ların yüksek bir stabiliteye sahip olduğunu ve bu örneklerde yapılan miRNA ekspresyon kalıbı analizinin çeşitli hastalıkların durumları hakkında yararlı bilgiler sunabileceğini ortaya koymuştur (12). Daha ileri çalışmalarda, miRNA ekspresyon kalıpları kanser alttiplerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (11).

Çeşitli kanser türlerinde yapılan araştırmalar, miRNA ekspresyon kalıplarının klinik progresyonun öngörülmesine olanak sağladığını ortaya koymuştur (11).

2.3.1.7. MikroRNA ve Kanser

Kanserleşme sürecine miRNA'ların katkıda bulunduğunun ilk kanıtı, Calin ve arkadaşlarının 2001 yılında Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarda yaptıkları moleküler çalışmayla ortaya konulmuştur (186). KLL hastalarının yaklaşık %50'sinde 13q14 bölgesi delesyona uğramaktadır. Detaylı delesyon analizleri sonucunda bu bölgede yalnızca mir-15-a ve mir-16-1 genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Daha sonra KLL hastalarının %68'inde bu miRNAların ekspresyonlarının azaldığı ya da olmadığı ortaya konmuştur (186).

Kanser ve normal doku arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, miRNA'ların kanser patogenezindeki rollerini güçlendirmiştir. Calin ve arkadaşları, 245 insan ve fare miRNA probu içeren miRNA mikroarray çalışmasıyla mir-15a ve mir-16-1'in ekspresyon düzeylerinin B hücreli KLL hastalarında belirgin şekilde azaldığını rapor etmişlerdir. MiRNA ekspresyon profilinin, KLL hastalarının klinik ve biyolojik davranışıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (186).

Calin ve arkadaşları, 2004 yılında yayınladıkları diğer bir çalışmada, insan miRNA genlerinin kanser ile ilişkisini araştırmak için, 186 adet miRNA geninin DNA üzerindeki pozisyonunu haritalandırmışlardır (187). Bu genlerin kromozomal pozisyonları, daha önceden rapor edilen belirli kanser türlerinin gelişimi ile ilişkili olduğu bilinen genetik değişiklikler ile karşılaştırılmıştır. MiRNA genlerinin çoğunlukla, heterozigozitenin kaybolduğu bölgeler olan kırılma bölgelerine yerleşik olduğu gösterilmiştir. Bu kırılma bölgeleri amplifikasyonun minimal olduğu bölgeler veya genel kromozomal kırılma noktası bölgeleridir. Bu moleküler lezyonlar sonucu oluşan genetik hasar spesifik kanserlere neden olmaktadır (187).

2003 yılında Michael ve arkadaşları, ilk olarak insanlardaki katı tümörlerde (kolonik ve rektal adenom karsinomlar) normal dokular ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyeleri değişmiş olan miRNA'ları rapor etmişlerdir (188). Daha sonraki yıllarda değişikliğe uğramış miRNA seviyeleri meme kanserinde (189), Burkitt's lenfomada (190), malign beyin tümörlerinde (191), tiroid kanserinde (192), akciğer kanserinde (193), prostat kanserinde (194) ve hepatosellüler karsinomda (195) keşfedilmiştir.

2.3.1.8. Onkogen Olarak İşlev Gösteren mikroRNA'lar

Onkogen miRNA'lar "onkomirs" olarak tanımlanmaktadır. Tümör süpresör genleri yada hücre farklılaşmasını veya apoptozisi kontrol eden genleri negatif yönde etkileyerek tümörün gelişmesini teşvik ederler. Pekçok miRNA geni farklı kanserlerde aşırı derecede ekspresyona uğramaktadırlar. Ancak bugüne kadar bunlardan sadece birkaç tanesi çok iyi tanımlanabilmiştir (181,196).

miR 17-92 geni onkogenik işlev gösteren miRNA'lar için iyi bir örnektir. miR-17-92 ekspresyonu, normal dokulara göre kıyaslanırsa akciğer kanseri ve lenfoma içeren özellikle onların en agresif formu olan küçük akciğer kanseri ve insan B hücre lenfomasında artış göstermektedir. Son çalışmalar, miRNA 17-92'nin ekspresyonunun C-Myc geninin ekspresyonu ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (181, 194).

miR 372 ve miR 373 Geni adlı onkomirler large tumor suppressor 2 (LATS2) tümör supresör genin ekspresyonunu direkt inhibe ederek, p53 aracılı siklin bağımlı kinazı (CDK) inhibe ederek hücre proliferasyonu ve tümör gelişimini aktifleştirirler (Şekil 3) (181,197).

miR-21 Geni Meme kanseri, glioblastoma ve pankreatik kanser gibi çeşitli kanserlerde yüksek derecede ekspresyon edilirler. Pro-Apoptotik genleri inhibe ederek onkogen olarak işlev yaparlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda miR-21 geninin tümör supresör olan Phosphatase-and-tensin homologue'u (PTEN) hedefleyerek etkisini gösterdiği bildirilmiştir (181,196).

2.3.1.9. Tümör Supresör Gen Olarak mikroRNA'lar

Bu genler hücre bölünmesinin baskılanmasından sorumlu genlerdir. Birçok tümörde bu genlerin hasar görmesi veya inaktive olması nedeniyle hücre çoğalması negatif yönde düzenlenerek tümör hücreleri anormal çoğalma gösterirler (181).

Let-7 Geni miRNA ailesinin bir üyesidir. İnsan kanserlerinde genelde delesyona uğramış kromozom bölgesinde yer alırlar. Özellikle akciğer kanserinin patogeneğinde önemli rol oynar (180, 181, 197, 198).

miR 15a ve miR 16-1 genleri kanserlerin pekçok tipinde anahtar rol oynayan anti-apoptoz gen olan B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) genini hedefleyerek normal apoptotik bir yanıt meydana getirmektedirler (181,197).

2.3.1.10. MikroRNA'ların Biyomarker olarak kullanımı

Pek çok miRNA'lar normal dokulara kıyasla belirli kanser dokularında farklı şekilde ekspresyon olmaktadır (180,181). Örneğin; Let-7'nin ekspresyonu akciğer kanserinde azalmaktadır, fakat meme yada kolon kanseri gibi diğer kanserlerde ekspresyonu artar. Bu bulgular miRNA'ların biyomarker olarak kullanılabileceğine ve kanserlerin saptanmasında güçlü bir tanısal araç olarak kullanılabileceğini desteklemektedir (180,181). Günümüzde miRNA'ların tanısal amaçlı kullanım alanları hızla çoğalmaktadır.

2.3.1.11. Nörolojik Hastalıklarda MikroRNA genleri

İnsan genomunda bilinen genlerin %1'ini kapsayan miR genleri genomda transkripsiyonu düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler kadar yer tutarlar. Bu genlerin ürünleri (miRNA) hedef mRNA'larda transkripsiyon sonrası susturma (post-transcriptional silencing) mekanizması ile translasyonun ince ayarına olanak sağlarlar. Anlatımları farklı beyin bölgelerinde ve farklı gelişim evrelerinde çeşitlilik gösterir. Nörona özel gen anlatımının düzenlenmesi, mRNA kırılması, nöronal hücre hattı özelleşmesi, nörogenez ve sinaptogenez gibi süreçlerde rolleri bulunmaktadır. MiR genlerinin nükleotid dizilerinin yakın akraba türlerde üst düzeyde korunduğu bilindiği için miR gen mutasyonlarının henüz nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilmemiş olması şaşırtıcı değildir. Ancak nörolojik hastalıklardan sorumlu olduğu bilinen genlerde miRNA bağlanma noktalarında polimorfizmler rapor edilmektedir. Söz konusu polimorfizmlerin miRNA'ların mRNA'lara bağlanmasını engellediği ve mRNA'ların aşırı anlatımına neden olduğu savı kabul görmektedir. Bu polimorfizmlerden ilki Tourette Sendromu için risk faktörü olarak bilinen SLIT And NTRK-Like Family, Member 1 (SLITRK1) mRNA'sında belirlenmiş ve miR-189'un bu mRNA'lara bağlanmasını etkilediği gösterilmiştir (199). Son yıllarda miRNA hedef gen dizisindeki mutasyonların fenotipi etkileyebileceği yönünde raporlar ard arda gelmektedir (200,201). Herediter Spastik Paraparezi hastalarında receptor expression-enhancing protein 1 (REEP1) geninde miRNA'ların bağlandığı 3' bölgesinde tek nükleotid polimorfizmleri (SNP: single nucleotide polymorphisms)'ler belirlenmesi (200), Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilen Fibroblast growth factor 20 (FGF20) geninde bulunan bir SNP'in orta beyine özgün miR-433'ün aktivitesini düşürdüğünün ve FGF20 ve alpha-sinüklein fazla anlatımına neden olduğunun gösterilmesi (201), bu bulgulardan başlıcalarıdır. Bu hastalıkların genetik tanısında genlerin protein kodlayan dizileri dışında miRNA bağlanma bölgelerinin de araştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. miRNA düzeylerindeki değişimler de nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Sporadik Alzheimer hastalarında miR-29 anlatımının azalması veya ortadan kalkmasının Beta-secretase 1 (BACE1) anlatımının artmasına neden olduğu ve miR-298 ve miR-328'in doğrudan BACE1 mRNA'sı 3'UTR bölgesi ile etkileştiği gösterilmiştir (202). miR-20a ailesinin Alzheimer hastalığı (AD) risk faktörlerinden Amyloid precursor protein (APP) anlatımını düzenlediği ve miR-106b anlatımının sporadik AD hastalarının beyin dokusunda azaldığı belirlenmiştir (203).

MikroRNA'lar ile aynı susturma mekanizmasını kullanan ve hücre dışından verilen çift sarmal RNA molekülleri ise özellikle baskın mutasyonların sıklıkla görüldüğü nörolojik hastalıkların tedavisi için yeni bir modeldir. Kuşkusuz, miRNA'lar ve diğer kısa ve

kodlamayan RNA'ların hücre içi hastalık mekanizmalarına katkısının aydınlatılması ve kompleks nörodejeneratif hastalıklardaki rollerinin belirlenmesi bu hastalıklar için yeni nesil RNA-temelli erken tedavinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

2.4. Oksidatif Dna Hasarı-Tuberoskleroz-MikroRNA İlişkisi

Oksidatif stres, başta kanser olmak üzere diyabet, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar, ateroskleroz ve inflamatuvar bozukluklar gibi birçok hastalığın patogenezinden sorumludur (204,205).

Genetik geçişli hastalıkların patogenezinde oksidatif stresin ve buna bağlı DNA hasarının olduğu düşünülmektedir (206,207). Bu yüzden TS patogenezinde oksidatif stresin önemli yer aldığı bilinmektedir. Özcan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, TSC2 defekti olan böbrek tümör hücrelerinde endoplazmik retikulum (ER) stresinin arttığı gösterilmiştir (206). Ayrıca nöronal stres cevabına yanıtta mTOR kompleksi aktivitesinin önemli rol oynadığı ve bu nedenle TSC gen defekti olan hastalarda nöron stres yanıtının yetersiz olması nedeniyle oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (207).

MikroRNA'lar hücrelerin gelişim, olgunlaşma, farklılaşma, apoptozis, hücre sinyalizasyonu, hücrel etkileşim gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynar. Ayrıca kanser oluşumu, otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde de öneme sahiptir (11,12). TS hastalığında oksidatif stres ve buna bağlı DNA hasarı, miRNA'lar arası etkileşimi değiştirmiş, dağılım ve miktarlarında farklılığa neden olmuştur.

Bu yüzden birçok hastalığın patogenezinde önemli olan oksidatif stres, buna bağlı DNA hasarı ve değişen miRNA düzeylerinin TS için de önemli olduğunu düşünmekteyiz.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya 1 Ocak 2015 – 30 Haziran 2016 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Ç. Nöroloji polikliniği'ne başvuran 0-16 yaş arası 30 tuberoskleroz tanılı hasta ve 29 sağlıklı toplam 59 çocuk dahil edildi. Tuberoskleroz tanısı, klinik ve görüntüleme bulgularına dayanılarak konuldu. Klinik tanı için 2012 Roach tanı ölçütleri kullanıldı (149). Hastaların rutin incelemeleri sırasında TAS, TOS, OSİ, DNA hasar tayini ve mikroRNA düzey belirlenmesi amaçlı 2 ml EDTA'lı ve 2 ml heparinli tam kan örneği alınmıştır. Bu kanlar aşağıda tanımlanan işlemler sonrası yukarıda belirtilen parametreler için Tıbbi Biyokimya-Tıbbi Biyoloji laboratuvarında incelenmiştir.

3.1. Kan Analizi

Biyokimya tüpüne alınan kan 3000 xg de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen serum ependorfa alınıp çalışma gününde kullanılmak üzere -80°C ye kaldırıldı.

Serum örneklerinde Total Antioksidan Seviye (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS), plak okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) sırasıyla 240 nm ve 520 nm dalga boylarında ölçüldü. Ölçülen TAS ve TOS değerleri Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplamasında kullanıldı.

Çalışmaya katılan bireylerden ayrıca heparinli tüplere tam kan örneği alındı. Alınan kan örneklerine Comet Assay Yöntemi ile DNA hasar tayini yapıldı.

3.2. Gereçler

- Santrifüj (Nüve NF1200, Nüve NF1200R)
- Distile su cihazı (Nüve Water Distiller-ND112)
- Vorteks (BioCote Voortex Mixer SA8, bibby scientific, UK)
- Orbital karıştırıcı (Biosan, OS-20, EU)
- Etüv (Nüve Cooled Incubator, ES120)
- Manyetik karıştırıcı (Stuart heat stir, CB162, bibby scientific, UK)
- -80°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific. C54285 model)
- ELISA okuyucusu (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA)
- Pipet (1000, 500, 200,100,10 uL'lik; Gilson)
- 8'li multipipet
- Pipet uçları (1000, 200,100,10 uL'lik)

3.3. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü

Erel tarafından 2004'de geliştirilen yeni ölçüm metodu kullanıldı (172).

3.3.1. Kullanılan Reaktifler

Reaktif 1: 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde 10 mM o-Dianisidine ve 45 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O çözülerek hazırlandı.

Reaktif 2: 7,5 mM hidrojen peroksit 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

3.3.2. Prensiy

Fe²⁺-o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenerek düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidine radikallerini oluştururlar. Dianisidil radikalleri, ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artmaktadır. Ancak, örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar.

Çalışma zamanında, daha önce -80 °C'de saklanan serum örnekleri oda ısısına getirildi. Total protein ölçümleri yapılmış doku örnekleri ile beraber çalışmaya dahil edildi. Tüm örneklerden 100'er µl alınıp üzerlerine sırasıyla, 150 µl R1 ve 150 µl R2 eklendi. 1 dakika 37 °C'de bekletildikten sonra spektrofotometrede (Thermo Scientific Multiscan FC, 2011-06,USA) 240 nm'de okundu. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı ve sonuçlar mmol.Trolox.ekivalent/L olarak ifade edildi.

3.4. Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü

Erel tarafından 2005'de geliştirilen yeni ölçüm metodu kullanıldı (176).

3.4.1. Kullanılan Reaktifler

Reaktif 1: 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM H₂SO₄ çözülerek ana solüsyon hazırlandı. Ana solüsyonda, önce% 10 oranında gliserol çözüldü, daha sonra total hacimde 250 µM Xlenol orange çözülerek hazırlandı.

Reaktif 2: Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-Dianisidine dihidrochloride çözüldü, daha sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlandı.

3.4.2. Prensip

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xylenele orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür.

Çalışma zamanında, daha önce -80 °C'de saklanan serum örnekleri oda ısısına getirildi. Total protein ölçümleri yapılmış doku örnekleri ile beraber çalışmaya dahil edildi. Tüm örneklerden 100' er µl alınıp üzerlerine sırasıyla 150 µl R1 ve 150 µl R2 eklendi. 1 dakika 37 °C'de bekledikten sonra spektrofotometrede (Thermo Scientific Multiscan FC, 2011-06,USA) 520 nm'de okundu. Standart olarak H₂O₂ kullanıldı ve sonuçlar µmol.H₂O₂.ekivalent/L olarak ifade edildi.

3.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)'Nin Hesaplanması

TAS'ın birimi mmol.Trolox.ekivalent/L'ye çevrilir ve aşağıdaki formül kullanılarak oksidatif stres indeksi hesaplanır (177).

$$\text{Oksidatif stres indeksi (OSI)} = \frac{\text{TOS (mmol.H}_2\text{O}_2\text{.ekivalent/L)} \times 100}{\text{TAS (mmol.Trolox.ekivalent/L)}}$$

3.6. DNA Hasarı (Comet Assay) Analizi

Comet Assay, Singh ve arkadaşlarının çalışma prensibine göre analiz edildi (208).

Çalışmaya katılan vakalardan heparinli biyokimya tüplerine tam kan örneği alındı. DNA hasarı analizi için kan örnekleri alınır alınmaz lenfosit seperasyonu yapıldı.

Lenfosit seperasyonu:

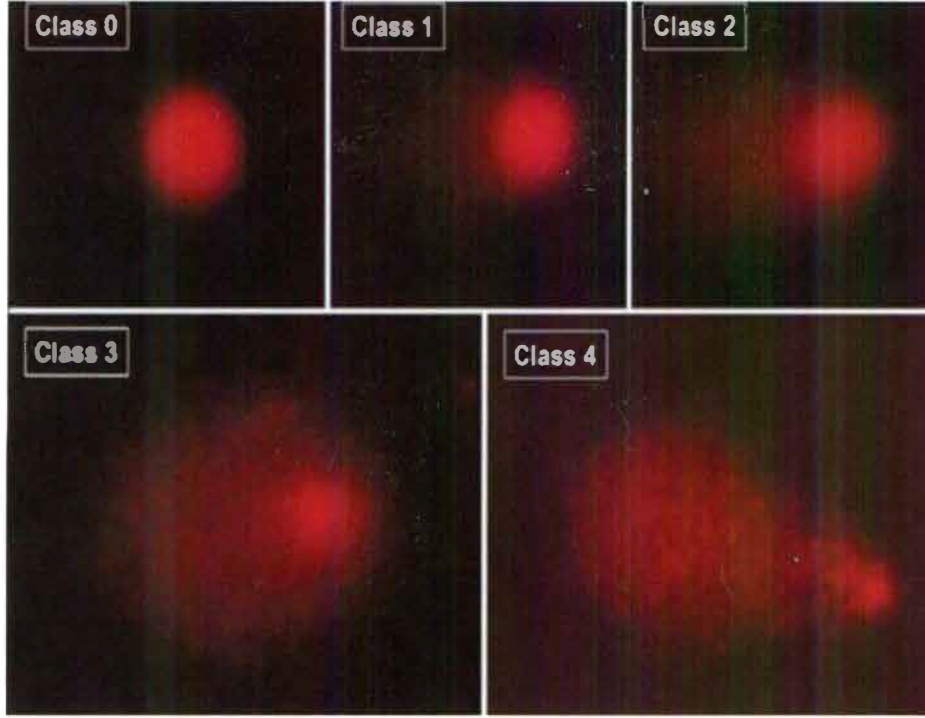
- Cam biyokimya tüpüne 1 ml histopaq konuldu. Üzerine 1 ml gelen tam kan örneğinden pipetlendi
- Cam tüp, 2100 rpm de 25 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra tüpte oluşan bulut tabaka pipet vasıtasıyla alındı ve 1,5 ml'lik ependorfa konuldu. Tüm yüzeyi kaplayacak kadar PBS (Phosphate Buffer Saline) pipetlendi.
- Ependorf, 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısım dökülerek dip kısımdaki lenfositler elde edildi.

Çalışmada kullanılmak üzere aşağıdaki solüsyonlar hazırlandı.

- I. **Lizis Tamponu (pH10) :**
 - 146,1 gr NaCl₂
 - 1,2 gr Trisma Base
 - 37,2 gr EDTA
 - %1 Triton-X
- II. **Elektroforez Tamponu :**
 - 12 gr NaOH (0,3 M)
 - 0,372 g EDTA (tririplex)(E2) (1 Mm)
- III. **Low Melting Agar:**
 - %0,6 lık low melting agar
 - PBS
- IV. **Normal Melting Agar:**
 - %1 lik agar
 - PBS

3.7. DNA Hasarı (Commet Assay) Protokolü

Çalışma boyunca tüm örneklerden lenfositler elde edildi. Çalışmaya başlamadan önce ependorf hafifçe karıştırıcı vasıtasıyla karıştırıldı. Çalışmaya, dipteki lenfositlerden 10 µl olacak kadar dahil edildi. Hazırladığımız normal melting agarın içerisine temiz ve kullanılmamış lamlar daldırılıp çıkarıldı ve kurumaya bırakıldı. Lamlar kuruduktan sonra,, low melting agar ile lenfosit örnekleri karıştırılıp (10 µl örnek+ 85 µl agar) lamların üzerine yüklenip şamel ile kapatıldı. Lamlar daha sonra 5 dakika kadar +4 C°'de bekletildi. Lamların üzerindeki lameller yavaşça çıkarıldı. Tüm lamlar şalelerin içinde lizis tamponunda da + 4 C° de 50 dakika bekletildi. Lizis işlemi bittikten sonra tüm lamlar 3 defa PBS ile yıkandı. Yıkanan lamlar elektroforez tankına yerleştirilip içine 1 lt hazırlanan elektroforez tamponu koyuldu ve 40 dakika inkübasyona bırakıldı. 40 dakikanın bitiminde 18 dakika 25 V da 300 Amperde jeller yürütüldü. Elektroforez işlemi bittikten sonra lamlar 2 kez PBS ve 1 kez distile su ile yıkandı. Lamların üzerlerine 15 er ul Etidyum Bromid (2 mg/ml) eklenip lamel ile kapatılıp floresan mikroskopta (Leica DM 1000 Led, Germany) incelendi. İnceleme işlemi karanlıkta yapıldı. Skorlama, baş ve kuyruk uzunlukları hesaplanarak Comet Assay IV yazılım programı vasıtasıyla değerlendirildi.



Şekil 2: Comet sınıflamasının fotomikrografik farklı görüntüleri (Sınıf 0: hasarsız, sınıf 4: maksimum hasar) (240).

[Renkli figürler wileyonlinelibrary.com sitesinden alınmıştır.]

3.8. RNA Ekstraksiyonu

3.8.1. Serumlardan Eksozom İzolasyonu

Eksozom izolasyonu için ticari olarak elde edilen kit (Thermo Fisher Scientific, Cat Num: 4484550, USA) kullanıldı.

- 1- Alınan kanlar örnekleri 3000 rpm de 10 dk santrifüj edilerek üst süpernatant (serum) kısmı ependorflara alınarak -80 °C’de saklandı.
- 2- Tüm çalışma örnekleri toplandıktan sonra -80 °C’de ki serumlar aşamalı olarak çözdürüldü ve eksozom izolasyon protokolüne başlandı.
- 3- Çözünen serumlardan her örnek için 1ml serum 2000 g de 30 dakika santrifüj edildi.
- 4- Üst süpernatant başka bir ependorfa alındı.
- 5- Süpernatantların üstüne 200 µl eksozom izolasyon reagent eklendi ve vorteks yapıldı.
- 6- Karışım buz üstünde 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 7- İnkübasyon sonrası 10 dakika 10000 g de santrifüj edildi.
- 8- Santrifüj sonrası üst süpernatant atıldı ve alt pellet kısmı PBS ile çözdürüldü.
- 9- Örneklerimiz kısa sürede çalışılacağı için -20 °C’de saklandı.

3.8.2. Total RNA eldesi

Total RNA izolasyonu için ticari olarak elde edilen kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Cat Num: 74106, USA) kullanıldı.

1- Eksozomlardan RNA izolasyon kiti ile önerilen protokole göre total RNA'lar saflaştırıldı.

2- Kit içerisindeki lizis buffer (LB) alınarak eksozomların üzerine 1 ml LB ve 15 µl beta-merkaptoetol eklendikten sonra iyice vorteks yapılarak homojenize edildi.

3- Karışım, 1000 g de 5 dakika santrifüj edilerek parçalanmayan partiküllerin çökmesi sağlandı.

4- Santrifüj sonrası üst faz alınarak 1:1 oranında etanol eklendi ve hafifçe vortekslenildi.

5- Tüm örnekler kitten çıkan kolonlardan geçirildi.

6- Kit içerisinde kullanıma hazır olarak çıkan yıkama solusyonları ile kolonlar 2 defa yıkandı.

7- 50 µl DNA az -RNA az free steril su kolonlara eklendikten sonra 14000 g de 2 dakika santrifüj edildi.

8- Elde edilen total RNA miktarları spektrofotometrede (Thermo scientific Multiscan) konsantrasyon ölçümü ve temizlik oranı ölçüldü. Buna göre hasta ve kontrol grupları konsantrasyon oranları değerlendirilerek çalışmaya dahil edildi.

3.8.3. RNA'dan cDNA Sentezi

1- RT2 miRNA First Strand Kit (Qiagen-USA) kullanılarak önerilen protokole göre mRNA'lar cDNA'ya çevrildi.

2- Poliadenilasyon reaksiyonu ile poly-(A) eklenmesi aşamasından sonra, universal primerler kullanılarak reverstranskripsiyon gerçekleştirildi. Karışımlar hazırlanıp, 37°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra "first strand" sentezlenmiş olup, bir sonraki aşama için hazır olundu.

3.8.4. Kantitatif PCR

1- Bu amaçla "RT2 SYBR Green qPCR Master Mixes (Qiagen-USA)" kiti kullanıldı. Real-time PCR reaksiyonunda SYBR® Green'in floresan özelliğinden yararlanılır.

2- 2X RT2 SYBR® Green qPCR Master Miks, kitin önerdiği miktarda "first strand" reaksiyon numunesi ile karıştırılarak, her kuyucuğa 25µl final volüm olacak şekilde ddH₂O ile tamamlandı.

3- Daha sonra hazırlanan karışım 96 kuyucuklu plakaya paylaştırıldı.

4- Elde edilen cDNA'lar Real-time PCR yöntemiyle incelendi.

5- Real-time PCR cihazında (CFX Biorad) aşağıdaki sıcaklık profillerine göre reaksiyon gerçekleştirildi:

95°C 10 dakika; 40 döngü

95°C, 15 saniye; 40 döngü

60°C 60 saniye; 40 döngü ve 72°C 30 saniye; 40 döngü

Elde edilen mikroRNA'lar "ct" ile ifade edilmiştir. "ct"; İngilizce 'cycle threshold' kelimelerinin baş harflerini temsil etmektedir. MikroRNA'ların miktar olarak düzeyleri bu birimle ifade edilmiştir.

3.9. İstatistiksel İncelemeler

İstatistiksel analizler için SPSS 20. programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin iki grup karşılaştırmalarında Student t Test, normal dağılım göstermeyen parametrelerin iki grup karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeylerinde değerlendirildi.

TOS ölçümü için, Student t Test; TAS ve OSI ölçümü içinse Mann Whitney U testi kullanıldı.

MiRNA sonuçları ise microarray cihazındaki tarama uçlarının sonucu up ve down regüle olan miRNA'lar seçildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya 1 Ocak 2015 – 30 Haziran 2016 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nörolojisi Bilim Dalı'nda tetkik edilen 27'si kız (%45,8), 32'si erkek (%54,2) 30 tuberoskleroz vakası ve kontrol grubu olarak 29 sağlıklı çocuk çalışmaya dahil edildi. Vakaların demografik özellikleri Tablo 3'de sunulmuştur.

Tablo 3: 30 Tuberoskleroz vakasının ve 29 sağlıklı kontrolün demografik özellikleri

	Tuberoskleroz Grubu	Kontrol Grubu
Yaş (min-max)	24 - 192 (ay)	18 - 186 (ay)
Cinsiyet (E/K)	16/14	16/13
Akraba Evliliği (Var/Yok)	7/23	2/27
TOPLAM	30	29

Yedi vakada (%15,3) birinci veya ikinci derece akraba evliliği hikayesi mevcuttu. Anne ve/veya babada tuberoskleroz olan 4 vaka (%13,3) bulundu.

Tablo 4: Tuberosklerozlu 30 vakanın tanı yaşı ve başvuru özellikleri

	Min-Maks	Ort±Ss
Tanı Yaşı (Ay)	0-108	30,6±38,5

Başvuru Şikâyeti veya Tanıya Götüren İşaret	Sayı	%
Ailede tuberoskleroz öyküsü olan	4	13,3
Hipopigmente Makül	1	3,3
Nöbet	22	73,3
Kalpte Kitle	3	10
TOPLAM	30	100

Çocukların tanı yaşları 0 (intrauterin) ile 108 ay arasında değişmekte olup, ortalama $30,6 \pm 38,5$ ay olarak saptandı.

Vakaların 4'ünün (%13,3) başvuru şikayeti veya tanıya götüren işaret ailede tuberoskleroz öyküsü bulunması, 1'inde (%3,3) hipopigmente makül, 22'sinde (%73,3) nöbet, 3'ünde (%10) üfürüm ve kalpte kitle olduğu saptandı.

Yirmi vakada anti-epileptik kullanım öyküsü mevcuttu (Tablo 5). Bunların 5'inde (%16,65) sodyum valproat, 1'inde (%3,33) karbamazepin, 1'inde (%3,33) vigabatrin, 2'sinde (%6,66) levetirasetam, 1'inde (%3,33) sodyum valproat + topiramet, 2'sinde (%6,66) sodyum valproat + karbamazepin + klonazepan, 1'inde (%3,33) sodyum valproat + karbamazepin + vigabatrin, 4'ünde (%13,33) karbamazepin + vigabatrin, 1'inde (%3,33) karbamazepin + levetirasetam, 1'inde (%3,33) karbamazepin + klobozam + lamotrijin, 1'inde (%3,33) vigabatrin + levetirasetam + topiramet kullanma öyküsü mevcuttu. Çocukların 10'unda (%33,33) anti-epileptik kullanımını mevcut değildi.

Tablo 5: Anti Epileptik İlaç Dağılımı

Anti-Epileptik İlaçlar	Sayı	%
Sodyum Valproat	5	16,65
Karbamazepin	1	3,33
Vigabatrin	1	3,33
Levetirasetam	2	6,66
Sodyum Valproat + Topiramet	1	3,33
Sodyum Valproat + Karbamazepin + Klonazepan	2	6,66
Sodyum Valproat + Karbamazepin + Vigabatrin	1	3,33
Karbamazepin + Vigabatrin	4	13,33
Karbamazepin + Levetirasetam	1	3,33
Karbamazepin + Klobozam + Lamotrijin	1	3,33
Vigabatrin + Levetirasetam + Topiramet	1	3,33
İlaçsız	10	33,33
Toplam	30	99,95

Vakaların 29'unun (%96,7) cilt bulgusu hipopigmente makül, 14'ünün (%46,7) fasial anjiofibrom, 2'sinin (%6,7) shagreen yaması ve 2'sinin (%6,7) hiperpigmente makül olduğu saptandı (Tablo 6).

Tablo 6: 30 vakada cilt bulguları

	Sayı	%
Hipopigmente Makül	29	96,7
Fasial Anjiofibrom	14	46,7
Shagreen Yaması	2	6,7
Hiperpigmente Makül	2	6,7

Rapamycin kullanımı

Dirençli epileptik nöbetler nedeniyle 1 vakada ve böbrek tutulumu nedeniyle 1 vakada rapamycin kullanım öyküsü mevcuttu.

Vakalardan 2'sinde (%6,7) retinal hamartom mevcuttu.

Vakaların 6'sında (%20) renal kist ve 6'sında (%20) renal anjiomyolipom görülmüştür. 18 vakada (%60) ise renal bulgu saptanmamıştır (Tablo 7).

Tablo 7: Renal kist ve renal anjiomyolipom bulguları

	Sayı	%
Renal Kist	6	20
Renal Anjiomyolipom	6	20
Renal Bulgu Saptanmayan	18	60
TOPLAM	30	100

Vakaların 19'unda (%63,3) Kortikal / Subkortikal tüber + Subependimal nodül, 9'unda (%30) Kortikal/Subkortikal tüber ve 2'sinde (%6,7) Kortikal / Subkortikal tüber + Subependimal nodülle birlikte dev hücreli astrositom mevcuttu (Tablo 8).

Tablo 8: Kranial Tutulum

	Sayı	%
Kortikal / Subkortikal Tüber + Subependimal Nodül	19	63,3
Kortikal/Subkortikal Tüber	9	30
Dev Hücreli Astrositom	2	6,7
TOPLAM	30	100

Tablo 9: EEG bulguları

	Sayı	%
Fokal Epileptik Bozukluk	5	16,7
Multifokal Epileptik Bozukluk	8	26,7
Normal	17	56,7
TOPLAM	30	100

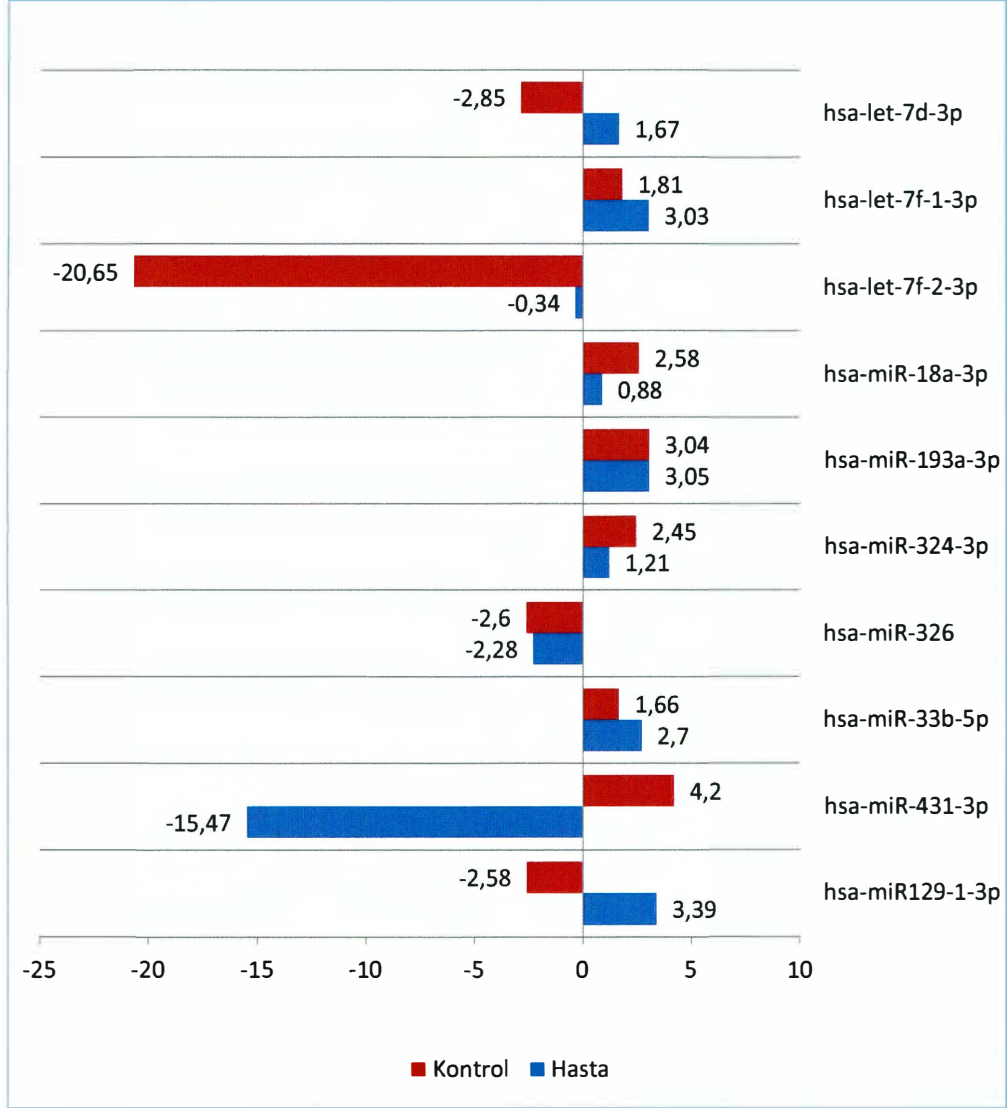
Tetkik alındığı esnada vakaların yapılan EEG incelemesinde; 5 vakada (%16,7) fokal epileptik bozukluk, 8 vakada (%26,7) multifokal epileptik bozukluk saptandı. 17 vakada (%56,7) EEG normal bulundu.

Vakalar mental durumlarına göre değerlendirildiğinde; olağan eğitime devam eden 13 vaka (%43,3), özel eğitim desteği almayı gerektirecek mental geriliği olan 11 vaka (%36,7) ve ciddi derecede rehabilitasyon desteği ve özel eğitim almayı gerektiren mental geriliği olan 6 vaka (%20) mevcuttu.

4.1. Gruplarda TAS, TOS, OSI ve DNA Hasarı

Hasta grubunun TAS ölçümleri 0.830 ± 0.092 mmol Trolox equiv./L, TOS ölçümleri 11.44 ± 1.258 mmol Trolox equiv./L ve OSI 13.913 ± 1.970 arbitrary unit bulundu. Kontrol grubunda ise TAS ölçümleri 1.418 ± 0.421 mmol Trolox equiv./L, TOS ölçümleri 7.818 ± 0.985 mmol Trolox equiv./L ve OSI 6.092 ± 2.259 arbitrary unit bulundu. Hasta grubunun TAS

Şekil 3: Gruplarda MikroRna Sonuçlarının Dağılımı



'Hsa-let-7d-3p' düzeyine bakıldığında, kontrol grubu çocuklarda -2,85 ct, hasta grubu çocuklarda ise 1,67 ct olarak saptanmıştır. Bu durumda 'Hsa-let-7d-3p' isimli miRNA'nın kontrol grubunda bulunan değeri -2,85 ct '0' değeri olarak alındığında, hasta grubunda bu miRNA 4,52 ct yüksek bulundu.

'Hsa-let-7f-1-3p' düzeyine bakıldığında; kontrol grubu çocuklarda 1,81 ct, hasta grubu çocuklarda ise 3,03 ct olarak saptanmıştır. Bu durumda 'Hsa-let-7f-1-3p' isimli miRNA'nın kontrol grubunda bulunan değeri 1,81 ct '0' değeri olarak alındığında, hasta grubunda bu miRNA 1,22 ct yüksek bulundu.

'Hsa-let-7f-2-3p' düzeyine bakıldığında; kontrol grubu çocuklarda -20,65 ct, hasta grubu çocuklarda -0,34 ct olarak saptanmıştır. Bu durumda 'Hsa-let-7f-2-3p' isimli miRNA'nın kontrol grubunda bulunan değeri -20,65 ct '0' değeri olarak alındığında, hasta grubunda bu miRNA 20,31 ct yüksek bulundu.

'Hsa-miR-18a-3p' düzeyine bakıldığında, kontrol grubu çocuklarda 2,58 ct, hasta grubu çocuklarda 0,88 ct olarak saptanmıştır. Bu durumda 'Hsa-miR-18a-3p' isimli miRNA'nın kontrol grubunda bulunan değeri 20,58 ct '0' değeri olarak alındığında, hasta grubunda bu miRNA 1,70 ct düşük bulundu.

'Hsa-miR-193a-3p' düzeyine bakıldığında, kontrol grubu çocuklarda 3,04 ct, hasta grubu çocuklarda 3,05 ct olarak saptanmıştır. Bu durumda 'Hsa-miR-193a-3p' isimli micro RNA'nın kontrol grubunda bulunan değeri 3,04 ct '0' değeri olarak alındığında, hasta grubunda bu micro RNA 0,01 ct yüksek bulundu.

'Hsa-miR-324-3p' düzeyine bakıldığında, kontrol grubu çocuklarda 2,45 ct, hasta grubu çocuklarda 1,21 ct olarak saptanmıştır. Bu durumda 'Hsa-miR-324-3p' isimli miRNA'nın kontrol grubunda bulunan değeri 2,45 ct '0' değeri olarak alındığında, hasta grubunda bu miRNA 1,24 ct düşük bulundu.

'Hsa-miR-326' düzeyine bakıldığında, kontrol grubu çocuklarda -2,60 ct, hasta grubu çocuklarda -2,28 ct olarak saptanmıştır. Bu durumda 'Hsa-miR-326' isimli miRNA'nın kontrol grubunda bulunan değeri -2,60 ct '0' değeri olarak alındığında, hasta grubunda bu miRNA 0,32 ct yüksek bulundu.

'Hsa-miR-33b-5p' düzeyine bakıldığında, kontrol grubu çocuklarda 1,66 ct, hasta grubu çocuklarda 2,70 ct olarak saptanmıştır. Bu durumda 'Hsa-miR-33b-5p' isimli miRNA'nın kontrol grubunda bulunan değeri 1,66 ct '0' değeri olarak alındığında, hasta grubunda bu miRNA 1,04 ct yüksek bulundu..

'Hsa-miR-431-3p' düzeyine bakıldığında, kontrol grubu çocuklarda 4,20 ct, hasta grubu çocuklarda -15,47 ct olarak saptanmıştır. Bu durumda 'Hsa-miR-431-3p' isimli miRNA'nın kontrol grubunda bulunan değeri 4,20 ct '0' değeri olarak alındığında, hasta grubunda bu miRNA 19,67 ct düşük bulundu.

'Hsa-miR-129-1-3p' düzeyine bakıldığında, kontrol grubu çocuklarda -2,58 ct, hasta grubu çocuklarda 3,39 ct olarak saptanmıştır. Bu durumda 'Hsa-miR-129-1-3p' isimli miRNA'nın kontrol grubunda bulunan değeri -2,58 ct '0' değeri olarak alındığında, hasta grubunda bu miRNA 5,97 ct yüksek bulundu.



5. TARTIŞMA

Tuberosklerozun kliniği hastanın yaşına, organ tutulumuna ve organ tutulumunun derecesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Ortalama tanı yaşı beş yaştır. Çalışmamıza katılan hastaların ortalama tanı yaşları ise $30,6 \pm 38,5$ ay olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda vakaların %73,3'ünde ilk başvuru nedeni konvülzyondu. Bu sonuç literatürle uyumlu bulundu (209).

Tuberosklerozlu olgularının yaklaşık % 50-75'inde EEG anormallikleri bildirilmiştir (94, 96). Çalışmamızda tuberosklerozlu vakaların %43,3'ünde EEG anormalliği saptandı.

Tuberosklerozda cilt bulguları sık olarak görülmektedir. En önemli cilt bulgusu hipopigmente deri lezyonlarıdır. Bu lezyonlar oval ya da yaprak şeklinde, değişik boyutlarda olup, en sık gövde ve ekstremitelerde görülür. Genel olarak lezyonlar doğumda var olup, yaşamın ilk yıllarında belirgin hale gelirler (2, 210). Çalışmamızda da literatürle uyumlu şekilde en sık cilt bulgusu %96.7 ile hipopigmente maküldür.

Rowley ve arkadaşları (144) 100 olguluk serisinde 44 olguda (%44) retinal hamartom bildirmişlerdir. Çalışmamızda olgularımızdan 2'sinde (%6.7) retinal hamartom bulundu.

Tuberosklerozda, en sık görülen böbrek lezyonları, anjiyomiyolipomlar ve böbrek kistleridir. Ancak böbrek karsinomları da oluşabilir. Anjiyomiyolipomlar, hastaların yaklaşık olarak %50-80'inde görülür. Fakat böbrek kistlerinin sıklığı tam olarak bilinmemektedir (211). Anjiyomiyolipomların sıklığı yaşla birlikte artış gösterir. Fakat böbrek kistlerinde böyle bir ilişki yoktur (6, 212). Çalışmamızda hastaların 6'sında (%20) renal kist, 6'sında (%20) renal anjiyomiyolipom tespit edildi. Retinal hamartom ve renal anjiyomiyolipom görülme oranının literatüre göre düşük bulunmasının nedeni vakaların ortalama yaşının düşük olması olarak düşünüldü.

Tuberosklerozda, beynin görüntülenmesindeki subependimal nodüller, tuberler ve dev hücreli astrositler tanıda önemli bulgular arasında yer alır. Subependimal nodüller, yan ventriküllerin yüzeyinden kaynaklanan büyük sıradışı astrositlerden oluşur. Literatürde subependimal nodüllerin %50 oranında görüldüğünü bildiren yayınlar bulunmasına rağmen (73), Baron ve ark.(64) bu oranı %100 olarak bildirmişlerdir. Biz de olgularımızın %63.3'ünde kortikal/subkortikal tuberlerle birlikte subependimal nodül saptadık. Tuberosklerozda görülen kortikal tuberlerde beynin kortikal yapısı bozulmuştur ve bu bölgelerde görüntüleme kolaylıkla görülebilen kalsifikasyonlar gelişir. Kortikal tuberlerin varlığı literatürde %90 oranında bildirilmiştir (64, 65). Biz de çalışmamızda %30 oranında tek başına kortikal tüber ve %63.3'ünde subependimal nodülle birlikte kortikal tüber var idi. Dev

hücreli astrositomlar ise literatürde %17-20 oranında bildirilmiştir (64, 65). Bizim serimizde bu oran %6.7 idi.

Tuberosklerozun kalpte en sık rastlanan bulgusu rabdomiyomlar olup, çalışmalarda %50-80 oranında bildirilmektedir (64, 213). Rabdomiyomlarda saptanan klinik ve hemodinamik bulguların tümörün sayısına, yerleşim yerine ve tümörün boyutlarına bağlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hastalar bulgusuz olabildiği gibi, ağır kalp yetersizliği veya ileti yollarına bası nedeniyle aritmi bulgularıyla da gelebilirler (214). Çalışmamızda %10 oranında rabdomiyom görüldü.

Tuberosklerozda mental fonksiyonlar çoğunlukla etkilenmekte ve zekâ geriliği %50 oranında bildirilmektedir (1,64). Zekâ geriliği olan olgularda konvülziyon görülme sıklığı yüksektir. Ayrıca nöbeti erken yaşlarda başlayanlarda nöbet kontrolü ve seyrin kötü olduğu bilinmektedir (215). Çalışmamızda 6 olgunun (%20) ciddi derecede rehabilitasyon desteği ve özel eğitim ihtiyacı mevcuttu. Bu olgular ise literatürle uyumlu şekilde erken yaşta nöbeti olan ve çoklu antiepileptik kullanan hasta grubuydu.

Tuberoskleroz kompleksinde hamartin ve tüberin kompleksinin işlevi bozulmakta ve mTOR sinyal yolundaki baskılayıcı etkisi bozulduğu için klinik bulgular ortaya çıkmaktadır (48, 49). Rapamisin; mTOR inhibitörüdür. Son yıllarda rapamisinin memeli hedefi (mTOR) inhibitörleri TSK tedavisinde kullanıma girmiştir (53). Klasik olarak mTOR baskılayıcılarının kanserli hastalarda güvenilirlikleri ve etkinlikleri kanıtlanmıştır (110). Seçilmiş TSK'lı olgularda, mTOR baskılayıcıları SEGA'larda, kardiyak rabdomiyom ya da anjiomiyolipomlarda yeni yeni kullanılmaktadır (216). Bazı yeni çalışmalarda dirençli epilepsisi olan TSK'lı olgularda bir mTOR baskılayıcısı olan evarilimus'un etkinliği incelenmiş ve altı olgunun dördünde nöbet sıklığının azaldığı gösterilmiştir (217). Everolimus ya da sirolimus tedavisi alan dirençli epilepsisi olan yedi TSK'lı olgunun incelendiği başka bir çalışmada, mTOR baskılayıcılarının dirençli epilepside etkili oldukları bildirilmektedir (218). Ülkemizde yapılan bir çalışmada 86 TSK tanılı olgudan, yedisine değişik nedenlerle rapamisin verildiği, bu olguların beşinde dirençli nöbetler olduğu ve altı aylık tedavi sonrası olguların tümünün nöbetsiz olduğu bildirilmiştir (219). Çalışmamızda iki hasta rapamisin tedavisi almakta idi. Bunlardan birine dirençli epilepsi, diğer hastaya ise renal anjiomiyolipom nedeniyle başlanmıştı.

Oksidatif stresteki artış sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri hücre içi lipit ve protein yapıların çift bağ içeren gruplarına ve DNA'daki bazların çift bağlarına saldırır ve sonuçta hücre içi lipit, protein ve DNA gibi makromoleküller hasarlanarak hücre zedelenmesi veya hücre ölümü meydana gelir. (221). Oksidatif strese bağlı DNA hasarının patogenezi de

bu durum açıklamış olur. Tuberoskleroz; TSC1 ve TSC2 adlı tümör supresör özellik gösteren genlerdeki defektlere bağlı gelişen bir hastalık olması nedeniyle patogenezinde oksidatif strese bağlı DNA hasarının olması düşünülmektedir.

Bu konuda literatüre bakıldığında; Özcan ve arkadaşları, TSC1 ve TSC2 defekti olan hücrelerde endoplazmik retikulum stresinin ve anormal protein yapımının arttığını ve böylelikle mTOR aktivitesinin negatif olarak etkilendiğini göstermiştir (206). Benzer şekilde Di Nardo ve arkadaşları, TSC2 defekli olan sıçan beyin nöronlarında oksidatif stresin ve ER sayısının arttığını, buna bağlı olarak da mTOR aktivitesinin kısıtlandığını göstermiştir (207). Bizim çalışmamızda da hasta grubunun oksidatif stres durumları kontrol grubu ile kıyaslandığında, hasta grupta TOS ve OSİ literatürle benzer şekilde istatistiksel anlamlı bulunmuştur. Reiling ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, mTOR aktivitesinin artışının stres cevabını indüklediğini göstermektedir (222). Bu çalışma ise diğer çalışmalardan farklı olarak stresin mTOR aktivite artışı için bir neden olmadığını, mTOR aktivite artışı sonrası bir sonuç olduğunu göstermektedir.

Oksidatif strese bağlı DNA hasarına bakıldığında, literatürde renal hücrelerde yapılan çalışmada, tuberin defekti olan hücreler incelendiğinde oksidatif DNA hasarının artmış olduğunu göstermiştir (223). Aynı çalışmada tuberinin oksijen radikallerinin oluşum ve temizlenmesinde de önemli rolü olduğunu ve defektif olması halinde oksidatif stresin ve buna bağlı DNA hasarının arttığı bildirilmiştir. Benzer şekilde aynı araştırmacının yaptığı başka bir çalışmada, tuberin gen defekti sonucunda DNA onarım enzimi olan OGG1'in yapımının azaldığı ve oksidatif DNA hasarının arttığı gösterilmiştir (224). Çalışmamızda da literatüre benzer şekilde, hasta grubunun DNA hasarı (COMMET Assay) oranı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek idi.

Hücrelerde oksidatif stres ve buna bağlı DNA hasarının yüksek olmasının miRNA'ların dağılımlarını etkilediğini düşünmekteyiz.

let-7 ailesinin üyeleri (let-7b, let-7c, let-7d, let-7f ve let-7g) tümör supresör özellik gösteren miRNA'lardır (180,181).

Let-7 insan kanserlerinde genelde delesyona uğramış kromozom bölgesinde yer alırlar. Özellikle akciğer kanserinin patogenezinde önemli rol oynar (181, 229).

Bir endoribonükleaz olan DICER1 (Ribonükleaz Tip 3 geni), matür miRNA oluşumunda kritik role sahip bir genidir. Bu genin mutasyonlarında plöropulmoner blastomun da dahil olduğu çok sayıda kanser gelişmektedir. Yapılan çalışmada, DICER1 mutasyonlu

plöropulmoner blastomlarda let-7f-2-3p'nin çok yüksek oranda olduğu belirlenmiştir (229). Çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre hsa-let-7d-3p, hsa-let-7f-1-3p, hsa-let-7f-2-3p düzeyleri yüksek idi. Bu da oksidatif stres ve buna bağlı DNA hasarının yüksek saptandığı hasta grubunda, let-7 gen ailesine ait miRNA'ların dağılımında bir up-regülasyona neden olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda özellikle hsa-let-7f-2-3p düzeyleri, hasta grubunda kontrol grubuna göre 20.31ct yüksek saptanmış olup, oksidatif strese bağlı DNA hasarıyla ilişkili olduğu fikrine yönlendirmektedir. 'hsa-let-7f-2-3p' ile yapılan çalışmalara bakıldığında, Vasanthan ve arkadaşları (228) diş pulpa kök hücrelerinin proliferasyonları ve diferansiyasyon kapasitelerini incelemiştir. Kemik iliği mezenkimal stem hücreleri ile diş pulpası stem hücreleri karşılaştırıldığında özellikle 19 farklı miRNA'nın yükseldiği, 29 farklı miRNA'nın azaldığını bildirmişlerdir. Yükselen miRNA'ların içerisinde let-7f-2-3p bulunmaktadır ve bu miRNA'nın genetik hastalıklar, kas iskelet hastalıkları ve gelişimsel bozukluklarla ilgili olduğu gösterilmiştir (228). Buna karşın let-7 ailesinin tümör supresör özelliğini gösteren ve kanser hücrelerinde düşük seviyelerde bulunduğunu belirleyen çalışmalar da mevcuttur (193, 230).

miR-125a'yı ve let-7 ailesini (230) içeren küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde miRNA'lar düşük çıkmaktadır. Bu düşük ekspresyon aynı zamanda prognozun da kötü olmasıyla ilgilidir. Bu da let-7 ailesinin tümör supresör özelliğini göstermiş olmaktadır (230).

Bu çalışmalarda özellikle let-7 değerlendirilmiş olduğu için, bizim çalışmamızda yüksek bulunan let-7f-2-3p'nin oksidatif stresle dağılımının indüklenerek let-7 ailesi içinde tümör supresör özellik göstermeyen bir istisna oluşturduğunu düşünmekteyiz. Bunu destekleyen farklı bir çalışma da, Collares ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada, Tip 1 Diabetes Mellitus (DM), Tip 2 DM ve Gestasyonel DM'li hastaların kan periferik mononükleer hücreleri incelenmiş, tip 1 DM'li hastalarda Tip 2 DM'ye göre bizim çalışmamızda da yüksek gelen let-7f'in yüksek geldiği görülmüştür (232). Aynı gene ait bir başka çalışmada let-7 ailesinin üyelerinin tümör supresör rolde olduğu (233) fakat lin28/let-7 yolunun farklı organlarda glukoz metabolizmasını regüle ettiği ve anti-let7 tedavinin Tip 2 DM'li hastalarda potansiyel tedavi olabileceği belirtilmiştir (234). Burada let-7f'in let-7 ailesi içinde istisnai olarak başka bir yolda görev alması, bizim çalışmamızda let-7f-2-3p'nin diğer aile üyelerine göre istisnai özellikte olduğunu kanıtlamaktadır.

miR 17-92 genleri onkogenik işlev gören bir gen ailesidir. miR-17-92 gen kümesi ilk olarak tanımlanan tümör destekleyici ve 13q31 kromozomunda yer alan polisistronik bir miRNA'dır. Bu gen ailesi çalışmamızda da baktığımız miR-18a, miR-19b ile beraber miR-17,

miR-19a, miR20a, miR-92-1 olmak üzere altı miRNA kodlar. miR 17-92 ekspresyonu, normal dokulara göre küçük hücreli akciğer kanseri ve insan B hücre lenfomasında artış göstermiştir. Hematolojik malignitelerde, meme, kolon, akciğer, pankreas, prostat, mide ve lenfoma gibi kanser türlerinde yüksek seviyede ekspresyonu gerçekleşmektedir (235). Ekspresyon sonucu oluşan miRNA'lar, proliferasyonu artırarak, apoptoz inhibisyonunu sağlayarak ve tümör anjiyogenezi tetikleyerek kanser oluşumuna neden olmaktadır. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) ve Retinoblastoma-like protein 2 (RB2) gibi tümör baskılayıcı genleri hedefleyerek bu genlerin inaktive olmasını sağlarlar (236, 237).

Çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre miR-18a düzeyi düşük idi. Oksidatif stres ve buna bağlı DNA hasarının bu miRNA yapımını down regüle ettiğini düşünmekteyiz. Bu konuda yapılmış Hummel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kemoterapi dirençli özefageal kanser hücrelerinde miRNA düzeylerine bakılmıştır. In-vitro kemoterapi dirençli adenokarsinom ve skuamoz hücreli karsinom hücreleri kemoterapi duyarlı kontrol grubuyla karşılaştırılmış, bizim çalışmamızda da olduğu gibi miR-18a düşük bulunmuştur (238). Oksidatif stres indeksinin yüksek olduğu bu kanser grubunda miR-18a'nın bizim çalışmamızda da olduğu gibi düşük gelmesi fikrimizi desteklemektedir.

miR-33a ve miR-33b sterol regülasyon element-bağlayıcı proteinleri (SREBPs)'nin intronlarında yer almaktadır. SREBP2 miR-33a regülasyonu ile eksprese olurken SREBP1 ekspresyonu miR-33b'den etkilenmektedir. Bu konak genler, kolesterol biyosentezinde anahtar işlev gören transkripsiyonel regülatörlerdir. Çeşitli çalışmalar miR-33a/b'nin, "high density lipoprotein" (HDL) sentezinde ve zıt kolesterol transportunun önemli regülatörlerinden olan "ATP-binding cassette transporter A1" (ABCA1) proteinini hedeflediğini göstermiştir. Farelerde LNA (A locked nucleic acid) -modifiye anti-miR-33 ile miR-33'ün inhibisyonunun ABCA1 ekspresyonunu ve kolesterol akışını arttırdığını, kan HDL seviyelerini yükselttiği gösterilmiştir. Bu veriler, miR-33 inhibisyonunun aterom plak oluşumunu engelleyerek terapötik tasarıma uygun olduğunu vurgulamaktadır (239).

Çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre miR-33b düzeyi yüksek idi. Çalışmamızda hastaların lipid profilleri değerlendirilemediği için aterosklerozla ilişkili bir yorum yapılamamıştır.

miR-324 akciğer, over ve lenfoma gibi çeşitli kanserlerde hücre proliferasyonunda, apoptozisinde ve invazyonunda ilişkili olduğu düşünülmektedir (241). SMAD7 (Sma and Mad Related Family Gene 7) genini hedefleyerek hücre büyümesi ve apoptozisinden sorumlu olduğu bulunmuştur (242).

Çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre miR-324-3p düzeyi düşük idi. Oksidatif stres ve buna bağlı DNA hasarının bu geni down regüle ettiğini ve böylece apoptozis ve hücre büyümesinin engellendiğini düşünmekteyiz. Yapılan bir diğer çalışmada miR-324-3p ve miR-185-3p nazofarengeal kanser hücrelerinde radyoterapiye direnç gelişiminden sorumlu olduğu görülmüştür (243). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde hasta grubunda miR324-3p'nin baskılı olduğunu tespit ettik. Bu durum, TSK'de de apoptozisin engellenmiş olduğunu ve anormal hücre çoğalmasının artmış olduğu fikrini desteklemektedir.

Çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre hsa-miR-193a-3p düzeyi 0.01ct oranında yüksek idi. Pu ve arkadaşlarının yaptığı hücre kültürü çalışmasında; miR-193a'nın osteosarkom metastaz hücrelerinde miR-193a'ya ait 2 allelin yüksek bulunduğu tespit edilmiştir (244). Çalışmamızda da benzer şekilde hasta grubunda kontrol grubuna göre hsa-miR-193a-3p düzeyi yüksek idi.

miRNA-326 çeşitli organlarda antikanser etkisine sahip olduğu yeni bulunmuştur. Apoptoziste anahtar protein kaspaz-3'ü artırarak ve anti-apoptoz proteini Bcl2 düzeylerini azaltarak apoptozisi indükler. Ayrıca, matrix metalloproteinase (MMP)-7 ve MMP-9 inhibisyonuyla hücre migrasyonunu ve invazyonunu engellemektedir (245). miRNA-326 iyi bilinen bir tümör supresor miRNA'dır. Pulmoner fibrozis (246), multipl sklerozis (247) gibi birçok hastalığı ve kolorektal kanser (248), meme kanseri (249), glioma(250, 251, 252), glioblastoma (253) ve beyin tümörleri (254)'ni de içeren birçok kanser türünü baskılamaktadır. Ayrıca miR-326 akciğer kanserinin kemik metastazında kemik turnover'ının bir göstergesi olarak biyokimyasal parametre olarak da kullanılmaktadır (255). Çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre miR-326 düzeyi yüksek idi. Oksidatif stres ve kanser arasındaki doğru orantılı ilişkiden dolayı, anti-kanser özelliği bulunan bu genin oksidatif stresle yapımının down regüle olmasını beklerken, çalışmamızda ters orantılı olarak up-regüle olmuştur.

miR-431 geninin fonksiyon ve özelliğine yönelik çok net bilgiler bulunmamaktadır. Çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre miR-431-3p düzeyi düşük idi. Oksidatif stresle down regüle olan bu gene ait yapılan farklı çalışmalar bulunmaktadır. Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, meme bezi gelişiminde miRNA ekspresyon profilleri ve fonksiyonları bakılmıştır. Bu çalışmada; fareler gebelik sürecinde ve laktasyona geçiş sürecinde izlenmiş, her gelişim sürecinde miRNA ekspresyon paternleri farklı bulunmuştur. Gebe fareler kontrol grubuyla kıyaslandığında gebe farelerde miR-431 ve beraberinde miR-138 düşük saptanmıştır (256). Gebelikte de oksidatif stresin yüksek olduğunu düşünürsek, bu

çalışmada da bizim çalışmamıza benzer şekilde bu genin down regüle olduğunu göstermektedir.

Liu ve arkadaşlarının Graves hastalarında yaptığı bir çalışmada (257); otoimmün hastalıkların gelişiminde ve immün fonksiyonlarda miRNA'ların önemli role sahip olduğu düşünülerek Graves hastalarında ve sağlıklı gönüllülerin kan mononükleer hücrelerinde miRNA'lar ve T3 tedavisine yanıtı izlenmiştir. Hastaların 41'i yeni tanı Graves, 13'ü remisyonda ve 35 sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. Sağlıklı kontrol ve yeni tanı Graves hastalarının kan mononükleer hücrelerinde miRNA ekspresyonları incelenmiştir. Ayrıca sağlıklı kontrollerin kan mononükleer hücreleri T3 eklenerek ve eklenmeden kültüre ekilmiş, T3 tedavisinin etkisine yönelik spesifik miRNA'lar incelenmiştir. Yeni tanı hastalarda 16 miRNA tespit edilmiş, bunlardan bizim çalışmamızda düşük tespit edilen miR-431'in de olduğu üç miRNA miR-154, miR-376b ve miR-431 düşük tespit edilmiştir. Otoimmün hastalıkların patogenezinde de artmış oksidatif stresin olması nedeniyle bu genin down regüle olması şaşırtıcı değildir. Aynı çalışmada remisyondaki Graves hastalarında yeni tanılara göre miR-431 daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, T3 tedavisinin sağlıklı kontrollerde kültüre edilen mononükleer hücrelerde miRNA ekspresyonlarını direkt olarak inhibe ettiği görülmüştür. Bu çalışmada, Graves hastalığı ve T3 maruziyetinin farklı miRNA ekspresyonları ile ilişkili oldukları görülmüş, tedaviye yönelik ise yol gösterici yeni bir biyomarker olabileceği belirtilmiştir (257).

Bo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, erkek reproduksiyonunda ısı stresinin zararlı etkileri araştırılmıştır. Isı tedavisi sonrası sertoli hücreleri analiz edilmiş; inflamatuvar sitokin (IL-1 α , IL-1 β , IL-6) seviyelerini arttıran mRNA'ların arttığı ve miR-431'in azaldığı görülmüştür (258). Isı etkisiyle artan oksidatif stresin bu geni down regüle ettiğini, çalışmamıza benzer şekilde bu çalışmada da görmekteyiz.

miR-129, tumor supresor özellik gösteren miRNA'lardandır. miRNA'ların gastrik kanserin oluşumu ve gelişiminde önemli role sahip olması nedeniyle, spesifik biyomarker tespitine yönelik kan hücrelerinde çeşitli miRNA'lar tespit edilmiştir. Ancak bulunan çoğu miRNA, çeşitli tip kanserlerin hepsinde ortak yüksek bulunmuştur ve bundan dolayı gastrik kanserlerde anormal yüksek ekspresyonu olan miR-129 araştırılmıştır (259).

Çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre miR-129 düzeyi yüksek idi.. Tümör supresör özellikte olan bu gen, bizim çalışmamızda oksidatif strese bağlı olarak up-regüle olduğunu göstermektedir.

Yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; gastrik kanser, ülser, atrofik gastrit, minimal gastriti olan hastalar ve normal mukoza bulguları olan örnekler gastroskopi ile toplanarak

mide suyunda miR-129-1/2 seviyeleri bakılmıştır. Çalışma sonucunda, gastrik kanserli hastaların mide suyunda benign hastalıklı dokulara göre yüksek miR-129-1-3p saptanmıştır. Mide suyu miR-129-1-3p ve miR-129-2-3p gastrik kanseri göstermede ve kanser taramasında potansiyel biyomarker olarak belirlenmiştir (259).

Buna zıt olarak Yu ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada; tüm miR-129 aile üyelerinin (129-1-3p, miR-129-2-3p ve miR-129-5p) gastrik kanserde azalmış ekspresyonlarını göstermiştir. Özellikle bu genlerin büyümeyi ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve bu şekilde tümör supresör etki gösterdiği görülmüştür (260).

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; miR-129-1-3p'nin gastrik kanserde hücre migrasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. miR-129 ailesi üyelerinin (miR-129-5p, miR-129-1-3p ve miR-129-2-3p) gastrik kanser ve kanser olmayan cerrahi örneklerde yapılan çalışmada, miR-129-1-3p'nin normal gastrik dokuya göre bizim çalışmamızdan farklı olarak hasta grubunda önemli derecede düşük saptandığı görülmüştür. miR-129-1-3p bu etkisini, metastazla büyük oranda ilgili olan bradikinin reseptör B2 (BDKRB2)'yi inhibe ederek yaptığı belirlenmiştir (261).

Konaç ve arkadaşlarının mesane kanserli hastalarda yaptığı çalışmada; miR-129, miR-133b'nin prognostik potansiyeli olabileceği düşünülmüştür. miR-129 geni mesane kanser hücre serilerine (T24, SW780) aktarıldığında hedef genlerinin ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. miR-129 ile hedef genleri GALNT1 (Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 1) ve SOX4 (Sex Determining Region Box 4) arasındaki doğrusal bağlantı gösterilmiştir. miRNA ifadesinin klinik parametrelerle ilişkisini ve mesane kanserindeki sonuçları ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır (262).

Şimdiye kadar nörokütanöz hastalıklarla ilgili bu miRNA'lar çalışılmamış olup, bildiğimiz kadarıyla bu çalışma tuberosklerozda ilk defa çalışılmıştır. Diğer kanser türlerinde (akciğer, meme vs) artış/azalışları bildirilmiş olup bizde de artmış/azalmış idi. Diğer solid tümörler için bir belirteç olarak bildirilmiş olan bu markırlar TSC için de bir markır olabileceğini gösterdi.

SONUÇLAR

1. TSK tanıli hastalar ve kontrol gruplarında bakılan let-7d-3p, let-7f-1-3p, let-7f-2-3p düzeyleri arasındaki fark sırasıyla 4.52ct, 1.22ct ve 20.31ct olarak saptanmıştır ve her üç let-7 ailesi üyesinde up-regülasyon görülmüştür.

2. TSK tanıli hastalarda bakılan miR-17-92 gen ailesinden miR-18a bakılmıştır. Hasta ve kontrol grubu arasında düzey farkı miR-18a geninde -1.70ct olarak saptanmıştır. Hasta grubunda kontrol grubuna göre down regüle bulunmuştur.

3. TSK tanıli hasta grubu ile ve kontrol grupları arasında miR-33b düzey farkı bakılmıştır ve hasta grubunda kontrol grubuna göre miR-33b düzeylerinde 1.05ct up-regülasyon görülmüştür.

4. TSK tanıli hasta grubu ile ve kontrol grupları arasında miR-324-3p düzey farkı bakılmıştır. Hasta grubunda kontrol grubuna göre -1.24ct oranında down regülasyon görülmüştür. Bakılan miR-193 ise hasta grubunda kontrol grubuna göre 0.01ct oranında up-regüle bulunmuştur.

5. TSK tanıli hasta grubu ile ve kontrol grupları arasında miR-326 düzey farkı bakılmıştır. Hasta grubunda kontrol grubuna göre 0.31ct oranında up-regülasyon görülmüştür.

6. TSK tanıli hasta grubu ile ve kontrol grupları arasında miR-431-3p düzey farkı bakılmıştır. Hasta grubunda kontrol grubuna göre -19.67ct oranında down regülasyon görülmüştür.

7. TSK tanıli hasta grubu ile ve kontrol grupları arasında miR-129 düzey farkı bakılmıştır. Hasta grubunda kontrol grubuna göre 5.98ct oranında up-regülasyon görülmüştür.

8. TSK tanıli hasta grubu ile ve kontrol grupları arasında TAS, TOS ve OSİ ölçümleri değerlendirilmiştir. Hasta grubunun TAS ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük ($p<0,01$), TOS ölçümleri ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,01$).

9. TSK tanıli hasta grubu ile ve kontrol grupları arasında DNA hasarı COMET (%TALE) karşılaştırıldığında, hasta grubundaki COMET ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek idi ($p=0,001$; $p<0,01$).

Pek çok miRNA'lar normal dokulara kıyasla belirli kanser dokularında farklı şekilde eksprese olmaktadır. Yapılan çalışmalar miRNA'ların biyomarker olarak kullanılabileceğini ve kanserlerin saptanmasında güçlü bir tanısal araç olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.

Günümüzde hastalık durumları ile ilişkili miRNA'lar belirlenmekte ve bu miRNA'ları hedefleyen spesifik anti-mir ilaçlar geliştirilmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır. miRNA tedavi yönteminin uygulanabilmesi için bazı sorular cevaplanmayı beklemektedir ve bu tedavi yönteminin başarılı şekilde uygulanabilmesi için yeni araştırma bulgularına ihtiyaç vardır.

MikroRNA'ların özellikle kanserin erken tanı, tedavi ve prognozunun belirlenmesinde, kanserli dokulardaki varlığı, ekspresyon paternindeki değişiklikleri ve hedefledikleri mRNA'ların saptanması ile önemli sonuçlar sağlayacağı gerçeğini ortaya çıkarmıştır. Bu konuda yapılan çok sayıda çalışma ile bazı miRNA'ların doku ve hastalık türü için spesifik sayılabilecek özellikte olduğunu göstermiştir. Bu genetik hızlı gelişim sürecinde gen tedavisi başta olmak üzere yeni tedaviler önemli değişiklikleri beraberinde getirecektir. Normal ve patolojik dokular arasında farklı seviyede ifade edilen miRNA'lar tespit edilerek, hastalıklarda tanı, tedavi ve prognozun belirlenebilmesinde de yararlı olacağı kesindir.

KAYNAKLAR

- 1: Fryer AE, Osborne JP. Tuberosus sclerosis acinical appraisal. Paediatric reviews and communications. 1987; 1: 239-55.
- 2: Osborne JP, Fryer A, Webb D. Epidemiology of tuberous sclerosis. Ann N Y Acad Sci 1991; 615: 125-7.
- 3: Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. N Engl J Med 2006; 355(13): 1345-56.
- 4: Schwartz RA, Fernández G, Kotulska K, Jóźwiak S. Tuberous sclerosis complex: advances in diagnosis, genetics, and management. J Am Acad Dermatol 2007; 57: 189-202.
- 5: Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. Lancet 2008; 372: 657-68.
- 6: Narla LD, Slovis TL, Watts FB, Nigro M. The renal lesions of tuberous sclerosis (cyst and angiomyolipoma) – screening with sonography and computerized tomography. Pediatr Radiol 1998; 18: 205-209.
- 7: Halpenny D, Snow A, McNeill G, Torreggiani WC. The radiological-diagnosis and treatment of renal angiomyolipoma-current status. Clin Radiol 2010; 65:99-108.
- 8: Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med 1991; 91(3C):14S-22S.
- 9: Stocker R ve Keaney JF Jr. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. Physiol Rev 2004; 84: 1381–1478.
- 10: Williams GM, Jeffrey AM (2000). Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. Regul Toxicol Pharmacol, 32 (3): 283-92.
- 11: Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI. MicroRNAs and cancer. Br J Surg 2007; 94: 23–30.
- 12: Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? Cancer Metastasis Rev. 2009; 28: 369–378.
- 13: Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. Nat Rev 2006; 5: 671-8.
- 14: Seghal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization. J Antibiot 1975; 28: 727-2.

- 15: Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18: 1926-5.
- 16: Knudson AG Jr, Hethcote HW, Brown BW. Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 5116.
- 17: Hanno R, Beck R. Tuberous Sclerosis. *Neurologic Clinics* 1987; 5: 351-359.
- 18: Jozwiak J, Galus R. Molecular implications of skin lesions in tuberous sclerosis. *Am J Dermatopathol* 2008; 30: 256-61.
- 19: Sharma S, Cruess AF: Tuberous sclerosis and the eye. In Ryan SJ. *Retina The CV Mosby Co. St. Louis* 2001, Vol 1: 588-595.
- 20: Augsburger JJ, Bolling JP: Phakomatoses syndromes. In Yanoff M, Duker JS. *Ophthalmology The CV Mosby Co. St. Louis* 1999; 9-15.
- 21: Tekin NF, Hızlı T, Saatçi AO ve ark. : Tuberosklerozda retina bulguları. *Ret-vit* 1999; 7: 73-76.
- 22: Bourneville DM. Tuberous sclerosis of cerebral convolutions: idiocy and hemiplegic epilepsy. *Arch Neurol* 1880; 1: 81-91.
- 23: Gomez MR. Diagnostic criteria. In: Gomez MR, ed. *Tuberous sclerosis*. 2nd ed. New York, NY: Raven, 1985; 9-20.
- 24: Suer DG, Erbil H. Familial tuberoskleroz. *Ret-Vit*:1996; 661-4
- 25: Gomez MR. Neurocutaneous Disease. In: Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Marsden CD (Eds.) *Neurology in Clinical Practice*. 2nd Edition, Volume II, Butterworth Heinemann 1996; 1566-1571.
- 26: O'Callaghan FJ, Shiell AW, Osborne JP, Martyn CN. Prevalence of tuberous sclerosis estimated by capture-recapture analysis. *Lancet*1998; 351(9114): 1490.
- 27: Sampson J, Scahill S, Stephenson J, Mann L, Connor J. Genetic aspects of tuberous sclerosis in the west of Scotland. *J Med Genet*1989; 26(1): 28e31.
- 28: Webb D, Clarke A, Fryer A, Osborne J. The cutaneous features of tuberous sclerosis: a population study. *Br J Dermatol* 1996; 135(1): 1e5.
- 29: Gomez MR. *Tuberous Sclerosis*. Eds (Manuel Rodriguez Gomez). Raven Press New York 1988; 9-19

- 30: Yılmaz E, Özdemir K, Başaran C, Gözmen Ş, Erturgut P, Serdaroğlu E. Tüberoskleroz kompleksinde renal tutulum. *Dicle Medical Journal*: 2015; 42 (1): 6671
- 31: İncecik F, Hergüner Ö, Özcan K, Altunbaşak A. Tüberosklerozlu 19 olgunun geriye dönük olarak değerlendirilmesi. *Türk Pediatri Arşivi* 2006; 41: 156- 60
- 32: Adıgüzel U, Öz Ö, Yıldırım Ö, Yazıcı A, Koca A. Tüberosklerozlu Bir Olguda Göz Bulguları ve Tanı Kriterleri. *Ret-Vit* 2004; 12: 203-206
- 33: European chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene 16. *Cell* 1993; 75: 1305-15.
- 34: Green A, Johnson P, Yates J. The tuberous sclerosis gene on chromosome 9q34 acts as a growth suppressor. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1833-1834
- 35: Henske EP, Scheithauer BW, Short MP, Wollmann R, Nahmias J, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Welsh CT, Kwiatkowski DJ. Allelic loss is frequent in tuberous sclerosis kidney lesions but rare in brain lesions. *Am J Hum Genet.* 1996 Aug; 59(2): 400–406.
- 36: Uzun H, Yavuz T, Şenses D, Arslanoğlu İ, Alagöz D, Kocabay K. Supraventriküler Taşikardi ile Kendini Gösteren Üç Aylık Tüberoskleroz Olgusu. *Bakırköy Tıp Dergisi* 2009; 5: 75-77
- 37: Kozłowski P, Roberts P, Dabora S, Franz D, Bissler J, Northrup H, Au KS, Lazarus R, Domanska-Pakiela D, Kotulska K, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ: Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA and genotype-phenotype correlations. *Hum Genet* 121: 389-400, 2007
- 38: Sampson JR, Maheshwar MM, Aspinwall R, Thompson P, Cheadle JP, Ravine D, Roy S, Haan E, Bernstein J, Harris PC: Renal cystic disease in tuberous sclerosis: Role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am J Hum Genet* 61: 843-851, 1997
- 39: Harris PC, Sampson JR: The GAP-related domain of tuberin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 6: 1991-1996, 1997
- 40: Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D: Tsc tumour suppressor proteins antagonize aminoacid-TOR signalling. *Nat Cell Biol* 4: 699-704, 2002
- 41: Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL: TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4: 648-657, 2002

- 42: Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J: Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13571-13576, 2002
- 43: Astrinidis A, Henske EP: Tuberous sclerosis complex: Linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene* 24: 7475-7481, 2005
- 44: Kwiatkowski DJ, Manning BD: Tuberous sclerosis: A GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2: R251-258, 2005
- 45: Marcotte L, Crino PB: The neurobiology of the tuberous sclerosis complex. *Neuromolecular Med* 8: 531-546, 2006
- 46: Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG, Jr: Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 18: 2893-2904, 2004
- 47: Ellisen LW: Growth control under stress: mTOR regulation through the REDD1-TSC pathway. *Cell Cycle* 4: 1500-1502, 2005
- 48: Hallett L, Foster T, Liu Z, Blieden M, Valentim J. Burden of disease and unmet needs in tuberous sclerosis complex with neurological manifestations: systematic review. *Curr Med Res Opin* 2011; 27: 1571-83.
- 49: Schwartz RA, Fernández G, Kotulska K, Jóźwiak S. Tuberous sclerosis complex: advances in diagnosis, genetics, and management. *J Am Acad Dermatol* 2007; 57: 189-202.
- 50: Carbonara C, Longa L, Grosso E, Mazzucco G, Borrone C, Garre ML, Brisigotti M, Filippi G, Scabar A, Giannotti A, Falzoni P, Monga G, Garini G, Gabrielli M, Riegler P, Danesino C, Ruggieri M, Magro G, Migone N: Apparent preferential loss of heterozygosity at TSC2 over TSC1 chromosomal region in tuberous sclerosis hamartomas. *Genes Chromosomes Cancer* 15: 18-25, 1996
- 51: Krueger DA, Northrup H, on behalf of the International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group. Tuberous Sclerosis Complex Surveillance and Management: Recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatr Neurol* 2013; 49: 255-265.
- 52: Kingsley DPE, Kendall BE, Fitz CR. Tuberous Sclerosis: A clinicoradiologic evaluation of 110 cases with particular reference to atypical presentation. *Neuroradiology* 1986; 28: 38-46.

53: Northrup H, Wheless JW, Bertin TK, Lewis RA. Variability of expression in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 1993; 30: 41.

54: Lyczkowski DA, Conant KD, Pulsifer MB, Jarrett DY, Grant PE, Kwiatkowski DJ, Thiele EA. Intrafamilial phenotypic variability in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2007; 22: 1348.

55: Curatolo P, Moavero R, de Vries PJ. Neurological and neuropsychiatric aspects of tuberous sclerosis complex. *Lancet Neurol* 2015; 14:733.

56: Krueger DA, Northrup H, International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group. Tuberous sclerosis complex surveillance and management: recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatr Neurol* 2013; 49: 255

57: Webb DW, Clarke A, Fryer A, Osborne JP. The cutaneous features of tuberous sclerosis: a population study. *Br J Dermatol* 1996; 135:1.

58: Yates JR, Maclean C, Higgins JN, Humphrey A, le Maréchal K, Clifford M, Carcani-Rathwell I, Sampson JR, Bolton PF. The Tuberous Sclerosis 2000 Study: presentation, initial assessments and implications for diagnosis and management. *Arch Dis Child* 2011; 96: 1020.

59: Aldrich CS, Hong CH, Groves L, Olsen C, Moss J, Darling TN. Acral lesions in tuberous sclerosis complex: insights into pathogenesis. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63: 244.

60: Jozwiak S, Schwartz RA, Janniger CK, Michalowicz R, Chmielik J. Skin lesions in children with tuberous sclerosis complex: their prevalence, natural course, and diagnostic significance. *Int J Dermatol* 1998; 37: 911.

61: Mizuguchi M, Takashima S. Neuropathology of tuberous sclerosis. *Brain Dev* 2001; 23: 508-15.

62: Goh S, Butler W, Thiele EA. Subependymal giant cell tumors in tuberous sclerosis complex. *Neurology* 2004; 63: 1457-61.

63: Mizuguchi M, Takashima S. Neuropathology of tuberous sclerosis. *Brain Dev* 2001; 23(7): 508-15

64: Baron Y, Barkovich J. MR Imaging of tuberous sclerosis in neonates and young infants. *Am J Neuroradiol* 1999; 20: 907-16.

65: Braffman BH, Bilaniuk LT, Naidich TP, Altman NR, Post MJ, Quencer RM. MR imaging of tuberous sclerosis: pathogenesis of this phakomatosis, use of gadopentetate dimeglumine, and literature review. *Radiology* 1992; 183:227-38.

66: Ridler K, Suckling J, Higgins N, Bolton P, Bullmore E. Standardized whole brain mapping of tubers and subependymal nodules in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2004; 19 (9): 658-65.

67: Józwiak S, Schwartz RA, Janniger CK, Bielicka-Cymerman J. Usefulness of diagnostic criteria of tuberous sclerosis complex in pediatric patients. *J Child Neurol* 2000 15(10): 652-9.

68: Altman NR, Purser RK, Post MJ. Tuberous sclerosis: characteristics at CT and MR imaging. *Radiology* 1988; 167: 527-32.

69: Kingsley DP, Kendall BE, Fitz CR. Tuberous sclerosis: a clinicoradiological evaluation of 110 cases with particular reference to atypical presentation. *Neuroradiology* 1986; 28: 38-46.

70: Goodman M, Lamm SH, Engel A, Shepherd CW, Houser OW, Gomez MR. Cortical tuber count: a biomarker indicating neurologic severity of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 1997; 12: 85-90.

71: Yates JR, Maclean C, Higgins JN, Humphrey A, le Maréchal K, Clifford M, Carcani-Rathwell I, Sampson JR, Bolton PF. The Tuberous Sclerosis 2000 Study: presentation, initial assessments and implications for diagnosis and management. *Arch Dis Child* 2011; 96: 1020-5.

72: Jansen FE, Vincken KL, Algra A, Anbeek P, Braams O, Nellist M, Zonnenberg BA, Jennekens-Schinkel A, Ouweland A, Halley D, Huffelen A, Nieuwenhuizen O. Cognitive impairment in tuberous sclerosis complex is a multifactorial condition. *Neurology* 2008; 70: 916-23.

73: Roach ES, Williams DP, Laster DW. Magnetic resonance imaging in tuberous sclerosis. *Arch Neurol* 1987; 44:301.

74: Nishio S, Morioka T, Suzuki S, Kira R, Mihara F, Fukui M. Subependymal giant cell astrocytoma: clinical and neuroimaging features of four cases. *J Clin Neurosci* 2001; 8:31.

75: Torres OA, Roach ES, Delgado MR, Sparagana SP, Sheffield E, Swift D, Bruce D. Early diagnosis of subependymal giant cell astrocytoma in patients with tuberous sclerosis. *J Child Neurol* 1998; 13:173.

76: Crino PB, Henske EP. New developments in the neurobiology of the tuberous sclerosis complex. *Neurology* 1999; 53: 1384.

77: Hallett L, Foster T, Liu Z, Blieden M, Valentim J. Burden of disease and unmet needs in tuberous sclerosis complex with neurological manifestations: systematic review. *Curr Med Res Opin* 2011; 27:1571.

78: Shepherd CW, Gomez MR, Lie JT, Crowson CS. Causes of death in patients with tuberous sclerosis. *Mayo Clin Proc* 1991; 66: 792.

79: Nabbout R, Santos M, Rolland Y, Delalande O, Dulac O, Chiron C. Early diagnosis of subependymal giant cell astrocytoma in children with tuberous sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 66: 370.

80: Webb DW, Fryer AE, Osborne JP. Morbidity associated with tuberous sclerosis: a population study. *Dev Med Child Neurol* 1996; 38:146.

81: Shepherd CW, Scheithauer BW, Gomez MR, Altermatt HJ, Katzmann JA. Subependymal giant cell astrocytoma: a clinical, pathological, and flow cytometric study. *Neurosurgery* 1991; 28:864.

82: Menor F, Marti-Bonmati L, Mulas F, Poyatos C, Cortina H. Neuroimaging in tuberous sclerosis: a clinicoradiological evaluation in pediatric patients. *Pediatr Radiol* 1992; 22: 485-9.

83: Holmes GL, Stafstrom CE; Tuberous Sclerosis Study Group. Tuberous sclerosis complex and epilepsy: recent developments and future challenges. *Epilepsia* 2007; 48 (4): 617-30.

84: Goh S, Butler W, Thiele EA. Subependymal giant cell tumors in tuberous sclerosis complex. *Neurology* 2004; 63 (8): 1457-61.

85: Griffiths PD, Bolton P, Verity C. White matter abnormalities in tuberous sclerosis complex. *Acta Radiol* 1998; 39: 482.

86: Iwasaki S, Nakagawa H, Kichikawa K, Fukusumi A, Watabe Y, Kitamura K, Otsuji H, Ohishi H, Uchida H. MR and CT of tuberous sclerosis: linear abnormalities in the cerebral white matter. *AJNR Am J Neuroradiol* 1990; 11:1029-1034.

87: Garaci FG, Floris R, Bozzao A, Manenti G, Simonetti A, Lupattelli T, Curatolo P, Simonetti G. Increased brain apparent diffusion coefficient in tuberous sclerosis. *Radiology* 2004; 232:461–465.

88: Boronat S, Caruso P, Auladell M, Van Eeghen A, Thiele EA. Arachnoid cysts in tuberous sclerosis complex. *Brain Dev* 2014; 36: 801.

89: Samir H, Ghaffar HA, Nasr M. Seizures and intellectual outcome: clinico radiological study of 30 Egyptian cases of tuberous sclerosis complex. *Eur J Paediatr Neurol* 2011; 15 (2): 131-7.

90: Kassiri J, Snyder TJ, Bhargava R, Wheatley BM, Sinclair DB. Cortical tubers cognition and epilepsy in tuberous sclerosis. *Pediatr Neurol* 2011; 44 (5): 328-32.

91: Jansen FE, Vincken KL, Algra A, Anbeek P, Braams O, Nellist M, Zonnenberg BA, Jennekens-Schinkel A, van den Ouweland A, Halley D, van Huffelen AC, van Nieuwenhuizen O. Cognitive impairment in tuberous sclerosis complex is a multifactorial condition. *Neurology* 2008; 70 (12): 916-23.

92: Joinson C, O'Callaghan FJ, Osborne JP, Martyn C, Harris T, Bolton PF. Learning disability and epilepsy in an epidemiological sample of individuals with tuberous sclerosis complex. *Psychol Med* 2003; 33: 335.

93: Webb DW, Fryer AE, Osborne JP. On the incidence of fits and mental retardation in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 1991; 28: 395.

94: Chu-Shore CJ, Major P, Camposano S, Muzykewicz D, Thiele EA. The natural history of epilepsy in tuberous sclerosis complex. *Epilepsia* 2010; 51: 1236.

95: Riikonen R, Simell O. Tuberous sclerosis and infantile spasms. *Dev Med Child Neurol* 1990; 32: 203.

96: Westmoreland BF. The electroencephalogram in tuberous sclerosis. In: *Tuberous Sclerosis Complex: Developmental Perspectives in Psychiatry*, 3rd edition, Gomez MR, Sampson JR, Whittemore VH (Eds), Oxford University Press, New York 1999. p.63.

97: White R, Hua Y, Scheithauer B, Lynch DR, Henske EP, Crino PB. Selective alterations in glutamate and GABA receptor subunit mRNA expression in dysplastic neurons and giant cells of cortical tubers. *Ann Neurol* 2001; 49 (1): 67-78.

98: Wong M, Ess KC, Uhlmann EJ, Jansen LA, Li W, Crino PB, Mennerick S, Yamada KA, Gutmann DH. Impaired glial glutamate transport in a mouse tuberous sclerosis epilepsy model. *Ann Neurol* 2003; 54(2): 251-6.

99: Goodman M, Lamm SH, Engel A, Shepherd CW, Houser OW, Gomez MR. Cortical tuber count: a biomarker indicating neurologic severity of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 1997; 12 (2): 85-90.

100: Doherty C, Goh S, Young PT, Erdag N, Thiele EA. Prognostic significance of tuber count and location in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2005; 20 (10): 837-41.

101: Jozwiak S, Goodman M, Lamm SH. Poor mental development in patients with tuberous sclerosis complex: clinical risk factors. *Arch Neurol* 1998; 55: 379.

102: Humphrey A, MacLean C, Ploubidis GB, Granader Y, Clifford M, Haslop M, Neville BG, Yates JR, Bolton PF. Intellectual development before and after the onset of infantile spasms: a controlled prospective longitudinal study in tuberous sclerosis. *Epilepsia* 2014; 55:108.

103: Muzykewicz DA, Costello DJ, Halpern EF, Thiele EA. Infantile spasms in tuberous sclerosis complex: prognostic utility of EEG. *Epilepsia* 2009; 50: 290.

104: Winterkorn EB, Pulsifer MB, Thiele EA. Cognitive prognosis of patients with tuberous sclerosis complex. *Neurology* 2007; 68: 62.

105: O'Callaghan FJ, Harris T, Joinson C, Bolton P, Noakes M, Presdee D, Renowden S, Shiell A, Martyn C, Osborne J. The relation of infantile spasms, tubers, and intelligence in tuberous sclerosis complex. *Arch Dis Child* 2004; 89: 530.

106: Kassiri J, Snyder TJ, Bhargava R, Wheatley BM, Sinclair DB. Cortical tubers, cognition, and epilepsy in tuberous sclerosis. *Pediatr Neurol* 2011; 44: 328.

107: Hunt A, Dennis J. Psychiatric disorder among children with tuberous sclerosis. *Dev Med Child Neurol* 1987; 29: 190.

108: Kopp CM, Muzykewicz DA, Staley BA, Thiele EA, Pulsifer MB. Behavior problems in children with tuberous sclerosis complex and parental stress. *Epilepsy Behav* 2008; 13: 505.

109: Bolton PF, Park RJ, Higgins JN, Griffiths PD, Pickles A. Neuro-epileptic determinants of autism spectrum disorders in tuberous sclerosis complex. *Brain* 2002; 125: 1247.

110: Walz NC, Byars AW, Egelhoff JC, Franz DN. Supratentorial tuber location and autism in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2002; 17: 830.

111: Harding CO, Pagon RA. Incidence of tuberous sclerosis in patients with cardiac rhabdomyoma. *Am J Med Genet* 1990; 37: 443-6.

112: Bader RS, Chitayat D, Kelly E, Ryan G, Smallhorn JF, Toi A, Hornberger LK. Fetal rhabdomyoma: Prenatal diagnosis, clinical outcome, and incidence of associated tuberous sclerosis complex. *J Pediatr* 2003; 143: 620-24.

113: De Vore GR, Hakim S, Kleinman CS, Hobbins JC. The in utero diagnosis of an interventricular septal cardiac rhabdomyoma by means of real-time-directed, M-mode echocardiography. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 143: 867-969.

114: Wortmann SB, Reimer A, Creemers JW, Mullaart RA. Prenatal diagnosis of cerebral lesions in Tuberous sclerosis complex (TSC). Case report and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol* 2008; 12: 123-26.

115: Dass BB, Scharma J. Cardiac rhabdomyoma and tuberous sclerosis: Prenatal diagnosis and follow-up. *Indian J Pediatr* 2003; 70: 87-9.

116: Roach ES, Gomez MR, Northrup H. Tuberous sclerosis complex consensus conference: Revised clinical diagnostic criteria. *J Child Neurol* 1998; 13: 624-28.

117: Lima-Rogel V, Torres-Montes A, Hernandez-Sierra F, de los Santos-Lopez F, Falcon-Escobedo R. Neonatal cardiac rhabdomyoma: A case report and clinico-epidemiologic. *Arch Inst Cardiol Mex* 1998; 68: 421-5.

118: Butany J, Nair V, Naseemuddin A, Nair GM, Catton C, Yau T. Cardiac tumors: Diagnosis and management. *Lancet Oncol* 2005; 6: 219-28.

119: Tworetzky W, McElhinney DB, Margossian R, Moon-Grady AJ, Salle D, Goldmuntz E, van der Velde ME, Silverman NH, Allan LD. Association between cardiac tumours and tuberous sclerosis in the fetus and neonate. *Am J Cardiol* 2003; 92: 487-89.

120: Chao AS, Chao A, Wang TH, Chang YC, Chang YL, Hsieh CC, Lien R, Su WJ. Outcome of antenatally diagnosed cardiac rhabdomyoma: case series and a meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 289-295.

121: Atalay S, Aypar E, Uçar T, Altuğ N, Deda G, Teber S, Tutar E. Fetal and neonatal cardiac rhabdomyomas: Clinical presentation, outcome and association with tuberous sclerosis complex. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2010; 52: 481-87.

122: Józwiak S, Domańska-Pakiela D, Kwiatkowski DJ, Kotulska K. Multiple cardiac rhabdomyomas as a sole symptom of tuberous sclerosis complex: case report with molecular confirmation. *J Child Neurol* 2005; 20: 988.

123: Roach ES, DiMario FJ, Kandt RS, Northrup H. Tuberous Sclerosis Consensus Conference: recommendations for diagnostic evaluation. National Tuberous Sclerosis Association. *J Child Neurol* 1999; 14: 401.

124: Webb DW, Thomas RD, Osborne JP. Cardiac rhabdomyomas and their association with tuberous sclerosis. *Arch Dis Child* 1993; 68: 367.

125: Mas C, Penny DJ, Menahem S. Pre excitation syndrome secondary to cardiac rhabdomyomas in tuberous sclerosis. *J Paediatr Child Health* 2000; 36: 84-6.

126: Jozwiak S, Kawalek W, Diuzewska J, Daszkowska J, Mirkiewicz-Malek W, Mizhalowicz R. Cardiac tumors in tuberous sclerosis: their incidence and course. *Eur J Pediatr* 1994; 153: 155-57.

127: Jost CJ, Gloviczki P, Edwards WD, Stanson AW, Joyce JW, Pairolero PC. Aortic aneurysms in children and young adults with tuberous sclerosis: report of two cases and review of the literature. *J Vasc Surg* 2001; 33: 639.

128: Bernstein J. Renal cystic disease in the tuberous sclerosis complex. *Pediatr Nephrol* 1993; 7: 490-495.

129: Rakowski SK, Winterkorn EB, Paul E, Steele DJ, Halpern EF, Thiele EA. Renal manifestations of tuberous sclerosis complex: Incidence, prognosis, and predictive factors. *Kidney Int* 2006; 70: 1777-1782.

130: Stillwell TJ, Gomez MR, Kelasis P. Renal lesions in tuberous sclerosis. *J Urol* 1987; 138: 477-481.

131: Critchley M, Earl CJ. Tuberous sclerosis and allied conditions. *Brain* 1932; 55: 311-46.

132: Robertson DM. Ophthalmic manifestations of tuberous sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1991; 615: 17-25.

133: Aubry MC, Myers JL, Ryu JH, Henske EP, Logginidou H, Jalal SM, Tazelaar HD. Pulmonary lymphangiomyomatosis in a man. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 749-752.

134: Franz DN, Brody A, Meyer C, Leonard J, Chuck G, Dabora S, Sethuraman G, Colby TV, Kwiatkowski DJ, McCormack FX. Mutational and radiographic analysis of pulmonary disease consistent with lymphangiomyomatosis and micronodular pneumocyte hyperplasia in women with tuberous sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 661-668.

135: Moss J, Avila NA, Barnes PM, Litzenberger RA, Bechtle J, Brooks PG, Hedin CJ, Hunsberger S, Kristof AS. Prevalence and clinical characteristics of lymphangiomyomatosis (LAM) in patients with tuberous sclerosis complex. *Am J Respir CritCare Med* 2001; 164: 669–671.

136: Costello LC, Hartman TE, Ryu JH. High frequency of pulmonary lymphangiomyomatosis in women with tuberous sclerosis complex. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 591–594.

137: Hancock E, Tomkins S, Sampson J, Osborne J. Lymphangiomyomatosis and tuberous sclerosis. *Respir Med* 2002; 96: 7–13.

138: Castro M, Shepherd CW, Gomez MR, Lie JT, Ryu JH. Pulmonary tuberous sclerosis. *Chest* 1995; 107: 189–195.

139: Mc Cormack F, Brody A, Meyer C, Leonard J, Chuck G, Dabora S, Sethuraman G, Colby TV, Kwiatkowski DJ, Franz DN. Pulmonary cysts consistent with lymphangiomyomatosis are common in women with tuberous sclerosis: genetic and radiographic analysis. *Chest* 2002; 121: Suppl. 3, 61S.

140: Eagle RC, Shields JA, Shields CL, Wood MG: Hamartomas of the iris and ciliary epithelium in tuberous sclerosis complex. *ArchOphthalmol* 2000; 118: 711-715.

141: Weiner DM, Ewalt DH, Roach ES, Hensle TW. The tuberous sclerosis complex: A comprehensive review. *J Am Coll Surg* 1998; 187: 548-561.

142: Gündüz K, Eagle RC, Shields CL, Shields JA, Augsburger JJ. Invasive giant cell astrocytoma of the retina in a patient with tuberous sclerosis. *Ophthalmology* 1999; 106: 639-642.

143: Kiratli H, Bilgic S: Spontaneous regression of retinal astrocytic hamartoma in a patient with tuberous sclerosis. *Am J Ophthalmol* 2002; 133: 715-716.

144: Rowley SA, O'Callaghan FJ, Osborne JP. Ophthalmic manifestations of tuberous sclerosis: a population based study. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 420-3.

145: Rosser T, Panigrahy A, McClintock W. The diverse clinical manifestations of tuberous sclerosis complex: a review. *Semin Pediatr Neurol.* 2006; 13: 27-36.

146: Gulhan M, Erturk A, Kurt B, Capan N. Tuberoskleroz ve mikronodüler akciğer tutulumu. *Solunum hastalıkları.* 2000; 11: 112-5.

147: Roach ES, Gomez MR, Northrup H. Tuberous sclerosis complex consensus conference: Revised clinical diagnostic criteria. *J Child Neurol.* 1998; 13: 624–8.

148: Purkait R, Samanta T, Thakur S, Dhar S. Neurocutaneous syndrome: a prospective study. *Indian J Dermatol.* 2011 Jul; 56 (4): 375-9.

149: Northrup H, Krueger DA, International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group. Tuberous sclerosis complex diagnostic criteria update: recommendations of the 2012 international tuberous sclerosis complex consensus conference. *Pediatr Neurol* 2013; 49: 243-54.

150: Padalino MA, Basso C, Milanesi O, Vida VL, Moreolo GS, Thiene G, Stellin G. Surgically treated primary cardiac tumors in early infancy and childhood. *J Thoracic and Cardiovasc Surg* 2005; 129: 1358-63.

151: Naito Y, Lee MC, Kato Y, Nagai R, Yonei Y. Oxidative stress markers. *Anti-Aging Medicine* 2010; 7 (5): 36-44.

152: Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. baskı. Konya: Mimoza yayınları, 1995.

153: Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp dergisi* 2002; 33: 2, 110-8.

154: Rao GM, Rao AV, Raja A, Rao S, Rao A. Lipid peroxidation in brain tumours. *Clinica Chimica Acta* 2000; 302: 205-11.

155: McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry* 1993; 26: 351-7.

156: Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 181-8.

157: Hung JH. Oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *J Chin Med Assoc* 2007; 70 (10): 4302.

158: Scandalios JG. The rise of ROS. *TRENDS in Biochemical Sciences* 2002; 27: 483-6.

159: Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *TIBS* 2000; 25: 5027.

160: Gathwala G, Sharma S. Oxidative stress, phototherapy and the neonate. *Indian Pediatr* 2000; 67 (11): 805-8.

161: Kulaksız G, Sancar A (2007). Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Turk J Biochem*, 32 (3): 104-111.

162: Dizdaroglu M (1998). Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Free Radic Res*, 29 (6): 551-63.

163: Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. *YYU Veteriner Fakultesi Dergisi*, 2009, 20 (2), 79 – 83.

164: Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286 (3): R431-44.

165: Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29 (11): 1106-14.

166: Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 2001; 54 (5): 356-61.

167: Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 1994; 234: 279-93.

168: Kampa M, Nistikaki A, Tsaousis V, Maliaraki N, Notas G, Castanas E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clin Pathol* 2002; 2 (1):3-18.

169: Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62 (3): 2316.

170: Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26 (9-10): 1231-7.

171: Laight DW, Gunnarsson PT, Kaw AV, Anggård EE, Carrier MJ. Physiological microassay of plasma total antioxidant status in a model of endothelial dysfunction in the rat following experimental oxidant stress in vivo. *Environ Toxicol Pharmacol* 1999; 7 (1): 27-31.

172: Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37 (4): 277-85.

173: Nakamura K, Endo H, Kashiwazaki S. Serum oxidation activities and rheumatoid arthritis. *Int J Tissue React* 1987; 9 (4): 307-16.

174: Ceylan E, Gulsun A, Gencer M, Aksoy N. A new parameter in the detection of tuberculosis activity: reactive oxygen metabolites. *Respiration* 2005; 72 (2):156-9.

175: Lindschinger M, Nadlinger K, Adewöhler N, Holweg K, Wögerbauer M, Birkmayer J. Oxidative stress: potential of distinct peroxide determination systems. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42 (8): 907-14.

176: Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38 (12): 1103-11.

177: Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol* 2005; 100 (1): 61-4.

178: Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol* 2010; 220: 126–139.

179: Hrdlickova B, de Almeida RC, Borek Z, Withoff S. Genetic variation in the non coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar 22. pii: S0925-4439(14)00071-4.

180: Hwang HW, Mendell JT: MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2006; 1-5.

181: Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2006; 289: 3–16.

182: Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12: 580–587.

183: Lee Y: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051–4060.

184: Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S. microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng* 2010; 12: 1-27.

185: Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 2005; 11: 1753–1761.

186: Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; (99): 15524-15529.

187: Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently

located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2999–3004.

188: Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882–891.

189: Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Molecular Oncology* 2010; 4: 230-241.

190: Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 167–169.

191: Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6029–6033.

192: He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 19075–19080.

193: Sevli S, Uzumcu A, Solak M, Ittmann M, Ozen M. The function microRNAs, small potent molecules in human prostate cancer. *Prostate Cancer P D* 2010; 13: 208-217.

194: Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 9628–9632.

195: Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006; 25: 2537–2545.

196: Hammond SM: MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 4–9.

197: Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408: 86–89.

198: Wiemer AC: The role of microRNAs in cancer: No small matter. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1529–1544.

199: Abelson JF, Kwan KY, O’Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM, Mathews CA, Pauls DL, Rasin MR, Gunel M, Davis NR, Ercan-Sencicek AG, Guez DH, Spertus JA, Leckman JF, Dure LS 4th, Kurlan R, Singer HS, Gilbert DL, Farhi A, Louvi A, Lifton RP, Sestan N, State MW. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette’s syndrome. *Science*. 2005; 310 (5746) :317-320.

200: Beetz C, Schüle R, Deconinck T, Tran-Viet KN, Zhu H, Kremer BP, Frints SG, van Zelst-Stams WA, Byrne P, Otto S, Nygren AO, Baets J, Smets K, Ceulemans B, Dan B, Nagan N, Kassubek J, Klimpe S, Klopstock T, Stolze H, Smeets HJ, Schrandt-Stumpel CT, Hutchinson M, van de Warrenburg BP, Braastad C, Deufel T, Pericak-Vance M, Schöls L, de Jonghe P, Züchner S. REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31. *Brain* 2008; 131 (Pt 4): 1078-1086.

201: Wang G, van der Walt JM, Mayhew G, Li YJ, Züchner S, Scott WK, Martin ER, Vance JM. Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am J Hum Genet*. 2008; 82 (2): 283-289.

202: Boissonneault V, Plante I, Rivest S, Provost P. MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1. *J Biol Chem*. 2009; 284 (4): 1971-1981.

203: Hébert SS, Horré K, Nicolaï L, Bergmans B, Papadopoulou AS, Delacourte A, De Strooper B. MicroRNA regulation of Alzheimer’s Amyloid precursor protein expression. *Neurobiol Dis*. 2009; 33 (3): 422-428.

204: Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997; 272: 20313-20316.

205: Navarro A, Boveris A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: 1244-1249.

206: Ozcan U, Ozcan L, Yilmaz E, Düvel K, Sahin M, Manning BD, Hotamisligil GS. Loss of the Tuberous Sclerosis Complex Tumor Suppressors Triggers the Unfolded Protein Response to Regulate Insulin Signaling and Apoptosis. *Mol Cell*. 2008 March 14; 29 (5): 541–551.

207: Di Nardo A, Kramvis L, Cho N, Abbey Sadowski, Meikle L, Kwiatkowski DJ, Sahin M. Tuberous Sclerosis Complex Activity is Required to Control Neuronal Stress Responses in an mTOR-Dependent Manner. *J Neurosci*. 2009 May 6; 29(18): 5926–5937.

208: Singh PN, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988 175:184–191.

209: Pampiglione G, Moynihan EJ. The tuberous sclerosis syndrome: clinical and EEG studies in 100 children. *JNeurol Neurosurg Psychiatr* 1976; 39: 666.

210: Fitzpatrick TB. History and significance of white macules, earliest visible sign of tuberous sclerosis. *AnnNY AcadSci* 1991; 615: 26.

211: Bernstein J. Renal cystic disease in the tuberous sclerosis complex. *Pediatr Nephrol* 1993; 7: 490-5.

212: Stillwell TJ, Gomez MR, Kelalis P. Renal lesions in tuberous sclerosis. *J Urol* 1987; 138: 477- 81.

213: Quek SC, Yip W, Quek ST, Chang SK, Wong ML, Low PS. Cardiac manifestation in tuberous sclerosis: a 10-year review. *J Pediatr Child Health* 1998; 34: 283-7.

214: Distefano G, Sciacca P, Mattia C, Tornambere G. Cardiac involvement in tuberous sclerosis in the first months of life: physiopathologic and clinical aspects of cardiac rhabdomyoma. *Pediatr Med Chir* 1998; 20: 29-32.

215: Shepherd CW, Houser OW, Gomez MR. MR findings in tuberous sclerosis complex and correlation with seizure development and mental impairment. *Am J Neuroradiol* 1995; 16: 149-55.

216: Kohrman MH. Emerging treatments in the management of tuberous sclerosis complex. *Pediatr Neurol* 2012; 46: 267-75.

217: Wiegand G, May TW, Ostertag P, Boor R, Stephani U, Franz DN. Everolimus in tuberous sclerosis patients with intractable epilepsy: a treatment option? *Eur J Paediatr Neurol* 2013; 17: 631-8.

218: Cardamone M, Flanagan D, Mowat D, Kennedy SE, Chopra M, Lawson JA. Mammalian target of rapamycin inhibitors for intractable epilepsy and subependymal giant cell astrocytomas in tuberous sclerosis complex. *J Pediatr* 2014; 164: 1195-200.

219: Canpolat M, Per H, Gumus H, Yikilmaz A, Unal E, Patiroglu T, Cinar L, Kurtsoy A, Kumandas S. Rapamycin has a beneficial effect on controlling epilepsy in children with tuberous sclerosis complex: results of 7 children from a cohort of 86. *Childs Nerv Syst* 2014; 30: 227-40

220: Caramori G, Papi A. Oxidants and asthma. *Thorax* 2004; 59: 170-173.

221: Ozcan O, Erdal H, Cakirca G, Yonden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 2015; 6 (3): 331-336.

222: Reiling JH, Sabatini DM. Increased Mtorc1 Signaling Upregulates Stress. *Molecular Cell Previews*. 2008. 02. 011.

223: Habib SL, Abboud HE. Tuberin regulates reactive oxygen species in renal proximal cells, kidney from rodents, and kidney from patients with tuberous sclerosis complex. *Cancer Sci* 107 (2016) 1092–1100.

224: Habib SL, Liang S. Hyperactivation of Akt/mTOR and deficiency in tuberin increased the oxidative DNA damage in kidney cancer patients with diabetes. *Oncotarget*, Vol. 5, No. 9

225: Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843–854.

226: Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;403, 901–906.

227: Lagos Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853–858.

228: Vasanthan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by *Lin 28*. *Science*. 2008; 320: 97–100.

229: MJ Murray, S Bailey, KL Raby, HK Saini, L de Kock, GAA Burke, WD Foulkes, AJ Enright, N Coleman and M Tischkowitz. Serum levels of mature microRNAs in *DICER1*-mutated pleuropulmonary blastoma. Citation: *Oncogenesis* (2014) 3, e87.

230: Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomimida S, Oshida H, Endoh H et al. Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64 (11): 3753-6.

231: Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. *let-7* regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007; 131: 1109-23.

232: Collares C, Evangelista A, Xavier D, Rassi D, Arns T, Foss-Freitas M, Foss M, Puthier D, Sakamoto-Hojo E, Passos G, Donadi E. Identifying common and specific

microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients. Collareset al. BMC Research Notes 2013, 6: 491.

233: Lee Y, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 2007, 21: 1025–1030.

234: Frost RJ, Olson EN. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108: 21075–21080.

235: O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435: 839-43.

236: Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. 2006;103:9136-41.

237: He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435:828–833.

238: Hummel R, Sie C, Watson D, Wang T, Ansar A, Michael MZ, Hoek MV, Haier J, Hussey DJ. MicroRNA signatures in chemotherapy resistant esophageal cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2014 October 28; 20 (40): 14904-14912.

239: Rooij EV, Purcell AL, Levin AA. Developing MicroRNA Therapeutics. *Circulation Research* 2012; 110: 496-507.

240: Selek S, Aslan M, Horoz M, Celik H, Cosar N, Gunak F, Kocyigit A. Peripheral DNA Damage in Active Pulmonary Tuberculosis. *Inc. Environ Toxicol* 27: 380–384, 2012.

241: Xu HS, Zong HL, Shang M, Ming X, Zhao JP, Ma C, Cao L. MiR-324-5p inhibits proliferation of glioma by target regulation of GLI1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2014; 18: 828-832

242: Xu J, Ai Q, Cao H, Liu Q. MiR-185-3p and miR-324-3p Predict Radiosensitivity of Nasopharyngeal Carcinoma and Modulate Cancer Cell Growth and Apoptosis by Targeting SMAD7. *Med Sci Monit*, 2015; 21: 2828-2836.

243: Xu J, Ai Q, Cao H, Liu Q. MiR-185-3p and miR-324-3p Predict Radiosensitivity of Nasopharyngeal Carcinoma and Modulate Cancer Cell Growth and Apoptosis by Targeting SMAD7. *Med Sci Monit*, 2015; 21: 2828-2836.

244: Pu Y, Zhao F, Cai W, Meng X, Li Y, Cai S. MiR-193a-3p and miR-193a-5p suppress the metastasis of human osteosarcoma cells by down-regulating Rab27B and SRR, respectively. *Clin Exp Metastasis* (2016) 33: 359–372.

245: Sun C, Huang C, Li S, Yang C, Xi Y, Wang L, Zhang F, Fu Y, Li D. Hsa-miR-326 targets CCND1 and inhibits non-small cell lung cancer development. *Oncotarget*, Vol. 7, No. 7.

246: Das S, Kumar M, Negi V, Pattnaik B, Prakash YS, Agrawal A, Ghosh B. MicroRNA-326 regulates profibrotic functions of transforming growth factor-beta in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014; 50: 882–892.

247: Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, Li Z, Wu Z, Pei G. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 2009; 10: 1252–1259.

248: Wu L, Hui H, Wang LJ, Wang H, Liu QF, Han SX. MicroRNA-326 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting the nin one binding protein. *Oncol Rep*. 2015; 33: 2309–2318.

249: Liang Z, Wu H, Xia J, Li Y, Zhang Y, Huang K, Wagar N, Yoon Y, Cho HT, Scala S, Shim H. Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1. *Biochem Pharmacol*. 2010; 79: 817–824.

250: Du W, Liu X, Chen L, Dou Z, Lei X, Chang L, Cai J, Cui Y, Yang D, Sun Y, Li Y, Jiang C. Targeting the SMO oncogene by miR-326 inhibits glioma biological behaviors and stemness. *Neuro Oncol*. 2015; 17: 243–253.

251: Zhou J, Xu T, Yan Y, Qin R, Wang H, Zhang X, Huang Y, Wang Y, Lu Y, Fu D, Chen J. MicroRNA-326 functions as a tumor suppressor in glioma by targeting the Nin one binding protein (NOB1). *PLoS One*. 2013; 8:e68469.

252: Wang S, Lu S, Geng S, Ma S, Liang Z, Jiao B. Expression and clinical significance of microRNA-326 in human glioma miR-326 expression in glioma. *Med Oncol*. 2013; 30:373.

253: Qiu S, Lin S, Hu D, Feng Y, Tan Y, Peng Y. Interactions of miR-323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. *J Transl Med*. 2013; 11:10.

254: : Kefas B, Comeau L, Floyd DH, Seleverstov O, Godlewski J, Schmittgen T, Jiang J, DiPierro CG, Li Y, Chiocca EA, Lee J, Fine H, Abounader R, Lawler S, Purow B. The neuronal microRNA miR-326 acts in a feedback loop with notch and has therapeutic potential against brain tumors. *J Neurosci*. 2009; 29: 15161–15168.

255: Valencia K, Martin-Fernandez M, Zanduetta C, Ormazabal C, Martinez-Canarias S, Bandres E, de la Piedra C, Lecanda F. miR-326 associates with biochemical markers of bone turnover in lung cancer bone metastasis. *Bone*. 2013; 52: 532–539.

256: Wang C, Li Q. Identification of Differentially Expressed MicroRNAs During the Development of Chinese Murine Mammary Gland. *J Genet Genomics* 2007. Nov; 34 (11): 966-73.

257: : Liu R, Ma X, Xu L, Wang D, Jiang X, Zhu W, Cui B, Ning G, Lin D, Wang S. Differential microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from Graves' disease patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012. Jun; 97 (6): E968-72.

258: Xu B, Chen M, Ji X, Yao M, Mao Z, Zhou K, Xia Y, Han X, Tang W. Metabolomic profiles reveal key metabolic changes in heat stress-treated mouse Sertoli cells. *Toxicol In Vitro*, 2015 Oct; 29 (7): 1745-52.

259: Yu X, Luo L, Wu Y, Yu X, Liu Y, Yu X, Zhao X, Zhang X, Cui L, Ye G, Le Y, Guo J. Gastric juice miR-129 as a potential biomarker for screening gastric cancer. *Med. Oncol*. 2013- 03- 01.

260: Yu X, Song H, Xia T, Han S, Xiao B, Luo L, Xi Y, Guo J. Growth inhibitory effects of three miR-129 family members on gastric cancer. *Gene* 2013. Dec 10; 532 (1): 87-93.

261: Wang D, Luo L, Guo J. miR-129-1-3p inhibits cell migration by targeting BDKRB2 in gastric cancer. *Med Oncol*. 2014. Aug; 31 (8): 98.

262: Dyrskjot L, Ostefeld MS, Bramsen JB, Silahtaroglu AN, Lamy P, Ramanathan R, Frstrup N, Jensen JL, Andersen CL, Zieger K, Kauppinen S, Ulhoi BP, Kjems J, Borre M, Orntoft TF. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res* 2009; 69 (11): 4851-60.

