

**T.C.**  
**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ**  
**MERAM TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ GENETİK ANA BİLİM DALI**

**İDİYOPATİK PULMONER FİBROZİSLİ HASTALARDA MİKRORNA, CCN2 VE**  
**TGF- $\beta$  EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN**  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

**DR. KÜBRA METLİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**KONYA, 2021**



**T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANA BİLİM DALI**

**İDİYOPATİK PULMONER FİBROZİSLİ HASTALARDA MİKRORNA, CCN2 VE**

**TGF- $\beta$  EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**DR. KÜBRA METLİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: PROF. DR. MAHMUT SELMAN YILDIRIM**

**DOÇ. DR. AYŞE GÜL ZAMANI**

**KONYA, 2021**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini bizimle paylaşan, tez dönemimde destek ve tavsiyeleri ile yol gösteren değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Mahmut Selman YILDIRIM ve Doç. Dr. Ayşe Gül Zamani'ye;

Tezime klinik bilgileriyle katkılarından dolayı Prof. Dr. Adil Zamani'ye;

İstatistik analizlerimde yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Őakir Gıca'ya;

Huzur, keyif ve işbirliği içerisinde çalıştığımız asistan arkadaşlarım ve laboratuvar çalışanlarına;

Maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan, varlıkları ile onur veren kıymetli annem ve babama, canım kardeşlerim Fatma METLİ, Durmuş Ali Metli ve Őule Nur Metli'ye; destek ve anlayışları için sevgili Behiye Aksanyar, Ayşe Ela Aksanyar ve Ali Yağız Aksanyar'a;

Sonsuz teşekkür ederim.

Nisan, 2021

Kübra METLİ

Bu Proje Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: 191518011

## ÖZET

### İDİYOPATİK PULMONER FİBROZİSLİ HASTALARDA MİKRORNA, CCN2 VE TGF- $\beta$ EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

DR. KÜBRA METLİ, UZMANLIK TEZİ, KONYA, 2021

**Amaç:** MiRNA'lar biyolojik süreçlerde ve İPF gibi fibrotik hastalıklarda rol alan küçük RNA molekülleridir. Son yıllarda yapılan çalışmalar; vücut sıvılarında tespit edilebileceğini, hastalıkların tanı ve takiplerinde belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu projede amaç; İPF hastalarında fibrotik süreçten sorumlu olabilecek CCN2 ve TGF- $\beta$  genlerinin ve 21 miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin periferik kanda qPCR yöntemiyle değerlendirilmesidir.

**Yöntem:** Göğüs hastalıkları ana bilim dalı multidisipliner interstisyel akciğer hastalıkları konseyinde değerlendirilmiş ve İPF tanısı almış 20 kişilik hasta grubu ile 20 sağlıklı gönüllüden alınan periferik kan örneklerinde qPCR ile CCN2, TGF- $\beta$  ve miRNA ekspresyon analizleri yapıldı.

**Bulgular:** CCN2, TGF- $\beta$  genlerinin ve miR'lerin ekspresyon düzeyleri belirlenerek hasta ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel yöntemler ile incelendi. TGF- $\beta$ , miR-29a/29b/29c-3p, miR-19a, miR-130a-3p, miR-140-5p, miR-320a, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-205-5p ekspresyonları hasta grubunda downregüle bulundu, miR-143-3p ekspresyonu ise upregüle bulundu. CCN2, miR-145, miR-30a/30b/30d/30e-5p, miR-26a-5p, miR-32-5p, miR-19b-1, miR-133 ve let-7d gruplar arasında ekspresyon farkı göstermedi. Hastalarda miR-29a-3p ve miR-140-5p'nin sigara kullanımı ile; miR-155-5p, miR-140-5p ve miR-320a'nın cinsiyete göre ekspresyon farkı sergilediği saptandı. miR-29a ve miR-143 ile lojistik regresyon modeli oluşturuldu, ROC analizi ile miR-29a ve miR-143'ün hasta ve kontrol grubunu ayırt etme gücü istatistiksel olarak yüksek bulundu.

**Sonuç:** Çalışmamızda, gen ve miRNA disregülasyonunun İPF hasta serumlarında RT-qPCR gibi kolay ve rutin bir yöntemle tespit edilebileceği gösterilmiş; tanı, takip ve ilaç yanıtı değerlendirmede kullanımının mümkün olabileceği tartışılmıştır. Literatüre katkı sağlayacak yeni bulgular tespit edilmiş olup, bu bulgular ışığında yapılacak yeni çalışmalara yön verecektir.

**Anahtar Kelimeler:** İPF, mikroRNA, CCN2, TGF- $\beta$ , RT-qPCR, serum

N.E.Ü. BAP Proje No: 191518011

## ABSTRACT

### EVALUATION OF MICRORNA, CCN2 AND TGF- $\beta$ EXPRESSION LEVELS IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS

KÜBRA METLİ, MD, DISSERTATION, KONYA, 2021

**Background/Aim:** MiRNA's are small RNA molecules that participate many biological processes and fibrotic diseases like IPF. Studies carried out in recent years; shows that it can be detected in body fluids and can be used as a marker in the diagnosis and follow-up of diseases. Aim in this project is evaluation of expression levels of CCN2 and TGF- $\beta$  genes and 21 miRNA's that can be responsible for the fibrotic process of IPF, using RT-qPCR in peripheral blood samples.

**Methods:** CCN2, TGF- $\beta$  and miRNA expression levels were analyzed using qPCR in peripheral blood samples of 20 patients and 20 healthy volunteers. All of the patients were diagnosed of IPF in the multidisciplinary interstitial pulmonary diseases council of the chest diseases department.

**Result:** Any alteration of the expression levels of CCN2, TGF- $\beta$  genes and miRNA's were statistically analyzed. It is revealed that; TGF- $\beta$ , miR-29a/b/c-3p, miR-19a, miR-130a-3p, miR-140-5p, miR-320a, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-205-5p expression levels were downregulated in the patients; in contrast to miR-143-3p expression, which was upregulated. CCN2, miR-145, miR-30a/b/d/e-5p, miR-26a-5p, miR-32-5p, miR-19b-1, miR-133 and let-7d showed no statistically significant difference between patient and control groups. It was demonstrated; miR-29a and miR-140 expressions were altered due to whether the patient was a smoker, while miR-155, miR-140 and miR-320a expressions showed gender differences. Logistical regression model with miR-29a and miR-143 expression profiles were created. It was demonstrated that; strength of differentiating case and control groups were statistically higher in miR-29a and miR-143, with ROC analysis.

**Conclusion:** In this study; we demonstrated that, gene and miRNA dysregulations in blood samples of IPF patients could easily be detected by routinely used RT-qPCR method. The potentiality of them being used in diagnosis, follow-up and drug responsiveness was discussed. Our project will contribute to the literature with new findings and guide the other investigators in this field.

**Keywords:** IPF; microRNA; CCN2; TGF- $\beta$ ; RT-qPCR; serum

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	iii
ÖZET .....	iv
TABLolar.....	xi
ŞEKİLLER .....	xiii
KISALTMALAR VE SİMGELER .....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis .....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	4
2.3. Etiyoloji .....	5
2.3.1. Sigara .....	5
2.3.2. Genetik.....	6
2.3.3. Epigenetik .....	7
2.3.4. Yaşlanma .....	8
2.3.5. Cinsiyet .....	9
2.3.6. Çevresel ve Mesleki Maruziyet .....	9
2.3.7. Gastroözefageal Reflü Hastalığı .....	9
2.3.8. Viral Etkenler.....	10
2.4. Patogenez .....	10
2.5. İPF Klinik Özellikleri .....	14
2.6. Tanı .....	15
2.6.1. Solunum Fonksiyon Testleri .....	16
2.6.2. Radyoloji.....	16
2.6.3. Histopatoloji.....	18
2.6.4. Bronkoalveoler Lavaj .....	21

2.6.5. Egzersiz Testleri .....	21
2.7. Ayırıcı Tanı .....	21
2.7.1. İdiyopatik Nonspesifik İnterstisyel Pnömoni .....	22
2.7.2. Deskuamatif İnterstisyel Pnömoni .....	22
2.7.3. Respiratuvar Bronşiyolit İlişkili İnterstisyel Akciğer Hastalığı .....	23
2.7.4. İlaç İlişkili Pulmoner fibrozis .....	23
2.7.5. Kriptojenik Organize Pnömoni .....	23
2.7.6. Akut İnterstisyel Pnömoni .....	23
2.7.7. Kronik Hipersensitivite Pnömonisi .....	24
2.8. Komorbiditeler .....	24
2.8.1. Pulmoner Hipertansiyon .....	25
2.8.2. Kombine Pulmoner Fibroz ve Amfizem .....	25
2.8.3. Akciğer Kanseri .....	25
2.8.4. Kardiyovasküler Hastalıklar .....	26
2.8.5. Gastroözefageal Reflü Hastalığı .....	26
2.8.6. Uyku Apnesi .....	27
2.9. Prognoz .....	27
2.10. İzlem .....	29
2.11. İdiyopatik Pulmoner Fibroziste Akut Alevlenme .....	29
2.12. Tedavi .....	31
2.12.1. Pirfenidon .....	31
2.12.2. Nintedanib .....	32
2.12.3. Destek Tedavileri .....	33
2.12.4. Akciğer Transplantasyonu .....	33
2.13. MikroRNA .....	34
2.13.1. Kodlamayan RNA'lar .....	34

2.13.2. MikroRNA Tanımı .....	34
2.13.3. MikroRNA Terminolojisi .....	35
2.13.4. MikroRNA Sentezi .....	35
2.13.5. MikroRNA Aracılı Gen Düzenleme .....	38
2.13.6. MiRNA'ların Tanı ve Tedavideki Yeri .....	39
2.14.1. miR-143-3p.....	40
2.14.2. miR-140-5p.....	40
2.14.3. miR-32-5p.....	40
2.14.4. miR-320a .....	41
2.14.5. Let-7d.....	41
2.14.6. miR-19a ve miR-19b-1 .....	41
2.14.7. miR-130a-3p .....	42
2.14.8. miR-30a-5p, miR-30b-5p, miR-30d-5p ve miR-30e-5p.....	42
2.14.9. miR-133 .....	43
2.14.10. miR-21-5p.....	43
2.14.11. miR-205-5p.....	44
2.14.12. miR-155-5p.....	44
2.14.13. miR-26a-5p.....	45
2.14.14. miR-145 .....	45
2.14.15. miR-29a-3p, miR-29b-3p ve miR-29c-3p .....	45
2.15. TGF- $\beta$ .....	46
2.15.1. TGF- $\beta$ sentezi .....	47
2.15.2. TGF- $\beta$ 'nin fibrotik süreçlerde rolü .....	48
2.16. CCN2 .....	50
2.16.1. CCN2'nin Moleküler Yapısı ve Fibrozis Gelişiminde Rolü .....	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	55

3.1. Araştırmanın Tipi.....	55
3.2. Araştırma Bölgesi ve Zamanı .....	55
3.3. Araştırma Evreni ve Yeri.....	55
3.4. Örneklem Seçme Kriterleri .....	55
3.5. Çalışma Gruplarının Randomizasyonu .....	56
3.6. Araştırma Öncesi Bilgilendirme .....	59
3.7. Araştırmanın İzni ve Etik Durum .....	59
3.8. Ekspresyon Analizlerinde Kullanılan Yöntemler .....	59
3.8.1. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR, RT-qPCR) .....	59
3.8.2. Yeni Nesil Dizileme.....	60
3.8.3. Mikroarray Analizleri .....	60
3.9. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	60
3.10. MikroRNA ve Gen Ekspresyon Çalışmaları .....	63
3.10.1. MikroRNA Ekspresyon Analizi Çalışma Basamakları .....	63
3.10.2. Gen Ekspresyon Analizi Çalışma Basamakları .....	66
3.11. İstatistiksel Analiz.....	71
4. BULGULAR .....	72
4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Klinik ve Demografik Özellikleri.....	72
4.2 MikroRNA ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	75
4.3. MikroRNA ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin Korelasyon analizi.....	84
4.4. Lojistik Regresyon Analizi .....	93
4.5. ROC Eğrisi Analizi .....	94
5. TARTIŞMA.....	97
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	117
6.1. SONUÇLAR.....	117
6.2. ÖNERİLER.....	118



## TABLULAR

Tablo 2. 1: İPF tanısında histopatolojik ve HRCT bulgularının birlikte değerlendirilmesi	20
Tablo 2. 2: İPF’de mortalite riskini artıran özellikler.....	28
Tablo 3. 1: Hasta grubu özellikleri.....	57
Tablo 3. 2: Kontrol grubu özellikleri.....	58
Tablo 3. 3: mikroRNA çalışması için RNA izolasyon kiti içeriği.....	62
Tablo 3. 4: cDNA sentez kiti içeriği.....	62
Tablo 3. 5: Poli(A) kit içeriği.....	65
Tablo 3. 6: cDNA miks 1 içeriği.....	65
Tablo 3. 7: cDNA miks 2 içeriği.....	65
Tablo 3. 8: PCR miks içeriği.....	66
Tablo 3. 9: PCR protokolü.....	66
Tablo 3. 10: cDNA miksi.....	69
Tablo 3. 11: cDNA sentezi için termal döngü protokolü.....	69
Tablo 3. 12: PCR master miks.....	70
Tablo 3. 13: PCR protokolü.....	70
Tablo 4. 1: Çalışma grubu demografik özellikleri.....	72
Tablo 4. 2: Hasta Grubunun yaşa göre dağılım frekansı.....	73
Tablo 4. 3: İPF hastalarının klinik özellikleri.....	75
Tablo 4. 4: Hasta ve kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	80
Tablo 4. 5: Hasta ve kontrol grubu gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	81
Tablo 4. 6: Hasta grubunda cinsiyete göre ekspresyonu anlamlı fark gösteren miRNA’ların karşılaştırılması.....	82
Tablo 4. 7: Hasta grubunda sigara kullanma durumuna göre anlamlı fark olan miRNA’ların karşılaştırılması.....	84
Tablo 4. 8: TGF- $\beta$ ile miR ve miR-miR arasında korelasyon katsayıları.....	92

Tablo 4. 9: İPF tanısında miR-29a-3p ve mir-143-3p'nin lojistik regresyon modeli.....	93
Tablo 4. 10: miR-29a ve miR-143'ün kombine veya tek markır olarak kullanımda tanısal duyarlılığı .....	94
Tablo 5. 1: Bulgularımızın literatür verileri ile karşılaştırılması.....	111



## ŞEKİLLER

Şekil 2. 1: İnterstisyel akciğer hastalıklarının sınıflandırılması .....	4
Şekil 2. 2: Fibrozis patogeneğinde alveolar epitel hasarının rolü.....	11
Şekil 2. 3: Tipik UİP paterni gösteren HRCT kesiti.....	18
Şekil 2. 4: Tipik UİP örneği gösteren bir akciğer biyopsisi.. ..	19
Şekil 2. 5: miRNA biyogenezi ve miRNA aracılı mRNA regülasyonu .....	37
Şekil 2. 6: TGF- $\beta$ sentez süreci ve reseptör ilişkisi. ....	48
Şekil 2. 7: TGF- $\beta$ fonksiyonlarını çeşitli aşamalarda düzenleyen miRNA'lar ve TGF- $\beta$ 'nın miRNA ekspresyonu üzerine etkisi. ....	50
Şekil 2. 8: CCN domainleri ve ilişkili oldukları moleküler yollar.....	53
Şekil 3. 1: RNA içeren şeffaf tabaka .....	67
Şekil 3. 2: Filtreden geçen RNA içermeyen solüsyon.....	68
Şekil 4. 1: Hasta ve gönüllü gruplarında yaş dağılım grafiği .....	72
Şekil 4. 2: Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubunun cinsiyet dağılımı.....	73
Şekil 4. 3: Hasta ve kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri grafiği I .....	77
Şekil 4. 4: Hasta ve kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri grafiği II .....	78
Şekil 4. 5: Hasta ve kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri grafiği III.....	79
Şekil 4. 6: Hasta ve kontrol grubu gen ekspresyon düzeyleri grafiği.....	81
Şekil 4. 7: Hasta grubunda cinsiyete göre ekspresyonu anlamlı fark gösteren miRNA'lar	83
Şekil 4. 8: Hasta grubunda sigara kullanma durumunda fark gözlenen miRNA'lar .....	84
Şekil 4. 9: miR-29b-3p ile hasta grubunun yaşı arasındaki korelasyon grafiği.....	85
Şekil 4. 10: TGF- $\beta$ ile miR-205-5p arasındaki korelasyon grafiği.....	86
Şekil 4. 11: miR-19a ile miR-140-5p arasındaki korelasyon grafiği.....	88
Şekil 4. 12: miR-155-5p ile miR-320a arasındaki korelasyon grafiği.....	90
Şekil 4. 13: miR-29a ROC eğrisi.....	95
Şekil 4. 14: miR-143 ROC eğrisi .....	95

Şekil 4. 15: miR-29a ve miR-143 kombine ROC eğrisi..... 96



## **KISALTMALAR VE SİMGELER:**

<b>AA</b>	: Akut alevlenme
<b>AEC</b>	: Alveolar epitelyal hücre
<b>AGO</b>	: Argonaute
<b>ANA</b>	: Antinükleer antikor
<b>Anti-CCP</b>	: Anti Sitrüline Protein Antikoru
<b>AUC</b>	: Area under the ROC Curve, eğri altında kalan alan
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	: Alpha smooth muscle actin- düz kas aktini $\alpha$
<b>6DYM</b>	: 6 dakika yürüme mesafesi
<b>AT1R</b>	: Type I Angiotensin II receptor- Tip 1 anjiotensin II reseptör
<b>BAL</b>	: Bronkoalveoler lavaj
<b>CCN2/ CTGF</b>	: Connective tissue growth factor- Bağ dokusu büyüme faktörü
<b>CXCL</b>	: Chemokine CXC motif ligand
<b>CXCR</b>	: Chemokine CXC motif receptor
<b>DGCR8</b>	: DiGeorge Critical Region 8
<b>DİP</b>	: Deskuamatif interstisyel pnömoni
<b>DKC1</b>	: Dyskerin
<b>DLCO</b>	: Karbonmonoksit difüzyon kapasitesi
<b>DSP</b>	: Desmoplakin
<b>ECM</b>	: Ekstraselüler matriks
<b>EKG</b>	: Elektrokardiyografi
<b>EKO</b>	: Ekokardiyografi
<b>EMT</b>	: Epitelyal-mezenkimal dönüşüm
<b>ER</b>	: Endoplazmik Retikulum
<b>FEV1</b>	: Ekspirasyonun birinci saniyesinde atılan hacim
<b>FGF</b>	: Fibroblast büyüme faktörü

<b>FVC</b>	: Zorlu vital kapasite
<b>GÖRH</b>	: Gastroözefageal reflü hastalığı
<b>HIF</b>	: Hypoxia inducible factor- Hipoksi ile indüklenebilen faktör
<b>HRCT</b>	: High resolution computed tomography- Yüksek rezolusyonlu bilgisayarlı tomografi
<b>IGF-1</b>	: Insulin like growth factor 1-İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
<b>İAH</b>	: İnterstisyel akciğer hastalığı
<b>İİP</b>	: İdiyopatik interstisyel pnömoni
<b>İPF</b>	: İdiyopatik pulmoner fibrozis
<b>KLF4</b>	: Krüppel-like Factor 4
<b>KOAH</b>	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
<b>KVH</b>	: Kardiyovasküler hastalık
<b>LXR- <math>\alpha</math></b>	: Liver X receptor alpha
<b>m<sup>7</sup>G</b>	: 7-methylguanosine
<b>MCP</b>	: Monocyte chemoattractant protein-1
<b>MiRNA, miR</b>	: MicroRNA- MikroRNA
<b>MMP</b>	: Matrix metalloproteinase
<b>MRE</b>	: MiRNA response elements- miRNA yanıt elemanları
<b>NSİP</b>	: Nonspesifik İnterstisyel Pnomoni
<b>Nt</b>	: Nükleotit
<b>OUA</b>	: Obstrüktif uyku apnesi
<b>p</b>	: İstatistiksel anlamlılık
<b>PABPC</b>	: Poli (A) bağlayıcı protein C
<b>PAH</b>	: Pulmoner arteriyel hipertansiyon
<b>PARN</b>	: Polyadenylate-specific ribonuclease
<b>PDGF</b>	: Platelet derived growth factor- Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

<b>pre-miRNA</b>	: Prekürsör miRNA
<b>pri-miRNA</b>	: Primer miRNA
<b>r</b>	: Spearman korelasyon katsayısı
<b>RHOA</b>	: Ras homolog gene family, member A
<b>ROC</b>	: Receiver Operating Characteristic- Alıcı işlem karakteristikleri
<b>RTEL1</b>	: Regulator of telomere elongation helicase 1
<b>RT-qPCR/qPCR</b>	: Quantitative real time polymerase chain reaction Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SaO<sub>2</sub></b>	: Oksijen saturasyonu
<b>SFT</b>	: Solunum fonksiyon testi
<b>SFTPA</b>	: Surfactant pulmonary-associated protein A
<b>SFTPC</b>	: Surfactant pulmonary-associated protein C
<b>shRNA</b>	: Short hairpin RNA
<b>SLA</b>	: Scr-like-adaptor
<b>SNP</b>	: Tek nükleotit polimorfizm
<b>TERC</b>	: Telomerase RNA component
<b>TERT</b>	: Telomerase reverse transcriptase
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming growth faktör $\beta$ - transforme edici büyüme faktörü
<b>TOLLIP</b>	: Toll-interacting protein
<b>Treg</b>	: Regülatuar T lenfosit
<b>TTD</b>	: Türk Toraks Derneği
<b>UIP</b>	: Usual interstitial pneumonia - Olağan interstisyel pnömoni
<b>UTR</b>	: Untranslated region
<b>VEGF</b>	: Vascular endothelial growth factor- Vasküler endotelial büyüme faktörü
<b>VKİ</b>	: Vücut kitle indeksi

**XBP1** : X-box-binding protein

**XPO** : Exportin



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İdiyopatik pulmoner fibrozis (İPF), progresif fibrozisle seyreden, kronik interstisyel akciğer hastalığıdır. Prognozu birçok kanser türünden daha kötüdür. Ortalama sağkalım tanıdan sonra yaklaşık 4 yıldır. Dispne ve öksürük yaşam kalitesini olumsuz etkilemektedir. Kür şansı bulunan tek tedavi seçeneği, oldukça sınırlı uygulanabilen akciğer transplantasyonudur. Erken tanı ve tedavi sağkalım için önemlidir. Teşhiste, prognoz tahminlerinde, progresyonu belirlemede kullanılacak ve en önemlisi fibrozisi geri çevirebilecek, hedeflenebilir noninvazif biomarkırların keşfi; hastalara erken tanı ve tedavi şansı verecek; hedefe yönelik tedaviler ile sağkalım ve yaşam kalitesi artacak ve hatta kür sağlanabilecektir.

MikroRNA'lar (miRNA, miR) protein kodlamayan, gen ekspresyonunu düzenleyen küçük RNA molekülleridir. Hücre döngüsü, proliferasyon, apoptoz, metabolizma gibi önemli süreçlerde regülatör görevi üstlenirler. miRNA'ların biyolojik fonksiyonlardaki rolü aydınlatıldıkça, hastalık patogenezinde de rol alabileceği düşünülmüş ve başta kanser olmak üzere pek çok hastalık patogenezi ile miRNA disregülasyonu arasında bağlantı kurulmuştur. Artan sayıda literatür verisi miRNA-hastalık, miRNA-gen, miRNA-çevre ve miRNA-miRNA etkileşimlerini ortaya koymuştur. Hedefe yönelik, kişiselleştirilmiş tıbbın önem kazandığı günümüzde; miRNA'lar da hedeflenebilir tedavi seçeneği olarak dikkat çekmiştir, yürütülmekte olan miRNA hedefli klinik çalışmalar mevcuttur. miRNA'ların vücut sıvılarında ve periferik kanda tespit edilebilirliği noninvazif biomarkır olarak kullanımını mümkün kılmaktadır.

Gelişen, yaygınlaşan ve ucuzlayan genetik teknikler ile çok sayıda genetik markırı aynı anda, küçük örneklerde, kısa sürede, yüksek duyarlılık ve özgüllükte analiz etmek mümkündür. Gen-miRNA, miRNA-hastalık, gen-hastalık araştırmalarına dayanarak oluşturulacak kanıt değeri bulunan genetik panellerin; tanı, prognoz tayini ve ilaç yanıtını belirlemede kullanımını mümkün olacaktır.

İPF'de miRNA ekspresyon analizinin noninvazif biomarkır olarak klinik kullanıma girmesi fayda sağlayacaktır; ancak yapılan araştırmaların çoğu doku ekspresyon çalışmaları, hayvan modelleri ve hücre kültürü çalışmalarıdır. Üstelik kullanılan tekniklerin çoğu pahalı ve rutinde yapılması zor yöntemlerdir. Çalışmamızda; periferik kan örnekleri kullanarak,

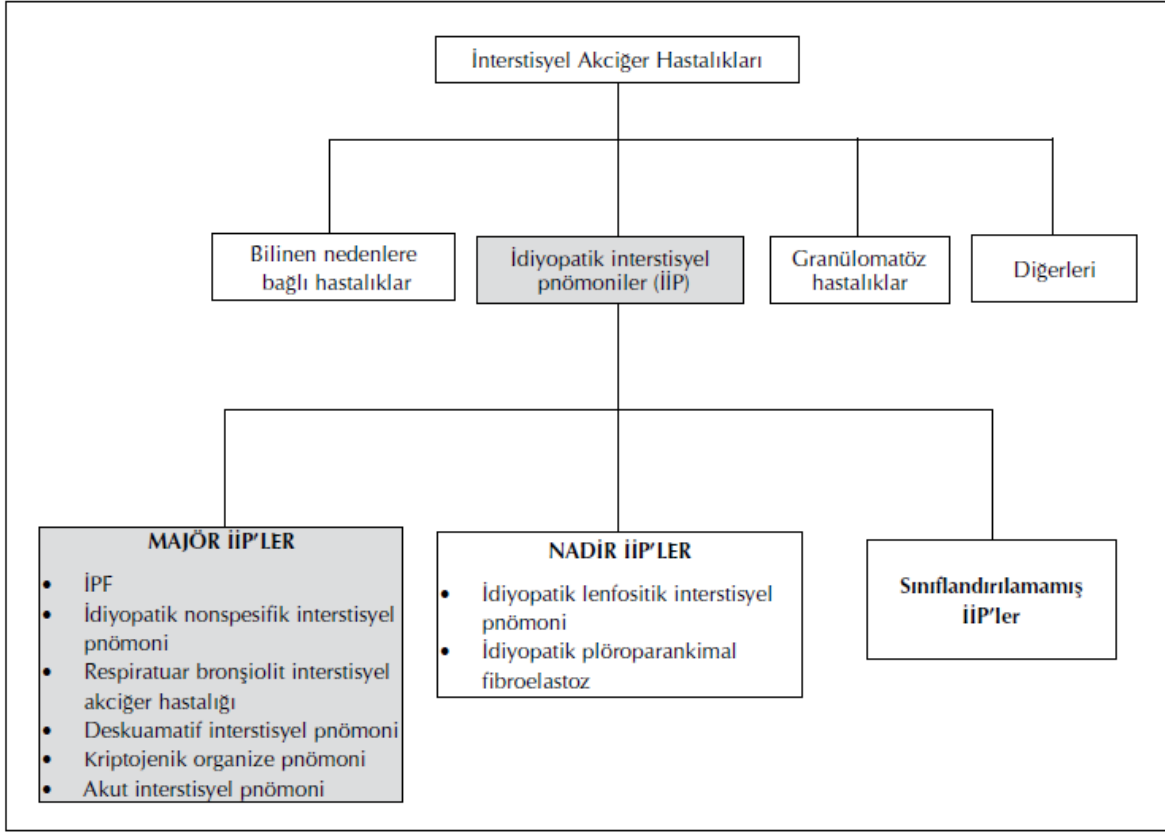
ucuz ve rutin laboratuvarlarda uygulanabilecek bir yöntem olan kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative real time- polymerase chain reaction, RT-qPCR) ile İPF patogenezinde etkili olabileceği literatür taramaları ile belirlenmiş 21 miRNA'dan oluşan miRNA paneli, transforme edici büyüme faktörü (Transforming growth faktör  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) ve bağ dokusu büyüme faktörü (Connective tissue growth factor-CCN2) geni ekspresyon düzeyleri incelenecektir. İPF'li hastalar ile benzer demografik özelliklere sahip sağlıklı vericilerin miRNA ekspresyon analizleri karşılaştırılacaktır. Ayrıca miRNA-TGF- $\beta$ , miRNA-CCN2 ve miRNA-miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı tespit edilecektir. Lojistik regresyon analizi ile İPF tanısını yordayan uygun modeller araştırılacak, bu veriler ile ROC eğrileri belirlenecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis

İPF sinsi başlangıçlı, ilerleyici seyirli, akciğerlerde heterojen fibrozis odakları ile karakterize kronik interstisyel bir akciğer hastalığıdır. Etiyolojisi tam olarak bilinmese de kronik sigara içiciliği, ileri yaş, çevresel ve mesleki faktörler, bazı enfeksiyonlar ve genetik yatkınlık risk faktörleri arasındadır (Richeldi, Colard ve Jones, 2017). Kronik epitel hasarı süreci başlatır, hasara yanıt olarak açığa çıkan sitokin, büyüme faktörleri ve kemokinler; fibroblastların myofibroblastlara farklılaşmasına, epitelyal-mezenkimal dönüşüme (EMT), kollajen ağırlıklı ekstraselüler matriks (ECM) artışına, dokunun yeniden şekillenmesine sonuç olarak da organ veya dokuda fonksiyon kaybına neden olur. Genel insidansı 100,000'de 0,48-11,7 iken, ülkemizdeki indisansı 100,000'de 5'tir (Okumuş ve Bingöl, 2018). İPF'nin prognozu çoğu kanser türünden daha kötüdür (Vancheri, 2015). Ortalama sağkalım 3-5 yıldır. İlerleyen dispne ve kronik öksürük hastaların yaşam kalitesini bozmaktadır. Tanı koymanın güçlüğü, tam iyileşmeyi sağlayacak tedavinin olmaması ve akciğer kanseri, pulmoner hipertansiyon gibi ciddi komorbid hastalıkların sıklıkla eşlik etmesi mortalite oranlarını artırmaktadır (Caminati vd., 2019).

İnterstisyumu tutan akciğer hastalıkları (İAH) solunum yolu hastalıklarının %15'ini oluşturmaktadır. İAH'ları; idiyopatik interstisyel pnömoniler (İİP), granülomatöz hastalıklara bağlı İAH, bağ dokusu hastalıkları veya ilaçlar gibi bilinen nedenlere bağlı İAH ve diğerleri olarak 4 gruba ayrılabilir (Şekil 2.1.) (Bartczak vd., 2020; Okumuş ve Bingöl, 2018). İPF, İİP'lerin en sık görülen ve en ciddi formudur (Nalysnyk vd., 2012).



Şekil 2. 1: İnterstisyel akciğer hastalıklarının sınıflandırılması (Okumuş ve Bingöl, 2018).

## 2.2. Epidemiyoloji

İPF sinsi başlangıçlı, kronik akciğer hastalıklarına benzer semptomları olan, diğer interstisyel pnömoni nedenlerinin dışlanmasıyla tespit edilen bir hastalıktır. Tanı kriterlerinin ancak son yıllarda net olarak tanımlanması, kayıtlarda farklı tanı kodlarının kullanılması, tanı koyma aşamasındaki güçlükler hastaların farklı tanı almasına, İPF teşhisi konulmasında gecikmelere neden olabileceği için insidans ve prevalans verileri tam bilinmemektedir (Nalysnyk vd., 2012). Son dönem araştırmalarda; İPF insidans ve prevalansının dünya genelinde artmakta olduğunu bu artışın vaka sayılarından kaynaklanan bir artışın yanı sıra, yüksek çözünürlüklü görüntüleme tekniklerinin geliştirilmesi ve tanı kriterlerindeki yeni gelişmelerin neden olabileceği bildirilmektedir (Trethewey ve Walters, 2018).

İPF, kronik fibrotik interstisyel pnömoninin en sık görülen türüdür. İPF epidemiyolojisini belirlemek amacıyla yapılan sistematik bir araştırmada, İPF genel

insidansının yılda 2,8–9,3/100,000 bulunduğu, Avrupa ve Kuzey Amerika’da insidans oranları yüksek iken Asya ve Güney Amerika’da daha düşük olduğu belirtilmiştir. (Hutchinson vd., 2015). Türk Toraks Derneği (TTD) Klinik Sorunlar Çalışma Grubu’nun, diffüz parankimal akciğer hastalıkları tanısı almış 2245 hasta ile yaptığı bir çalışmada sarkoidozdan sonra İPF 2. sıklıkta görülmektedir (Musellim vd., 2014).

İPF ileri yaş hastalığıdır, vakaların büyük çoğunluğu 50 yaş üzerindedir. Ortalama tanı yaşı 66’dır, 75 yaşından sonra prevalans hızla artar (Raghu vd., 2006; Nho, 2015). Familial idiyopatik pulmoner fibrozis olgularında başlangıç yaşı daha erken olabilmektedir (Krauss vd., 2019). Erkek cinsiyet İPF için risk faktörüdür. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda vakaların erkek/kadın oranı yüksek bulunmuştur (Nalysnyk vd., 2012). TTD’nin çalışmasında da ülkemizde erkek hasta oranı %83,7 ile yüksek olup, erkek/kadın oranı 5,14 olarak saptanmıştır (Musellim vd., 2014).

### **2.3. Etiyoloji**

İPF etyopatogenezi net olarak bilinmemekle birlikte kronik epitel hasarına neden olabilecek; kronik sigara kullanımı, ileri yaş, çevresel ve mesleki maruziyetler, bazı viral-bakteriyel enfeksiyonlar ile erkek cinsiyet ve genetik yatkınlık risk faktörleri arasındadır.

#### **2.3.1. Sigara**

Sigara kullanımı İPF riskini artıran en önemli faktörlerden biridir. İPF tanısı alan hastaların çoğunda halen sigara kullanımı veya geçmişte sigara kullanma öyküsü bulunmaktadır (Oh vd., 2012). Sigara; İPF gelişimi için risk oluşturmakla birlikte hastalık prognozunu da etkilemekte, hiç sigara kullanmayanlarla kıyaslandığında sigara kullananlarda prognoz daha kötü seyredebilmektedir (Antoniou vd., 2008). Uzun süreli sigara kullanımı alveol epitel hasarına, inflamatuvar reaksiyonların tetiklenmesine ve fibroblast aktivasyonuna yol açmaktadır (Jensen vd., 2012). Sigara dumanında bulunan partiküller, reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi kimyasal maddeler akciğerdeki oksidan-antioksidan dengesini ve proteaz-antiproteaz dengesini bozar, apoptoz ve nekrozu aktive ederek apoptotik cisimcikleri artırır ve inflamasyonu şiddetlendirir (Oh vd., 2012). Nikotinin  $\alpha 7$ -nAChR reseptörüne bağlanması

proliferasyon, anjiyogenez, büyüme faktörlerinin salınmasına ve mikroçevreyi değiştirecek sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır (Jensen vd., 2012). Sigara dumanına maruziyet, epigenetik değişiklikler ile de İPF geliştirebilmektedir. WNT7A gibi İPF patogenezinin sorumlu genlerinin metilasyon durumunun değiştirilmesi, içeriğinde bulunan akrolein ile histon modifikasyonlarına sebep olması ve profibrotik-antifibrotik miRNA dengesini değiştirmesi, sigaranın İPF gelişiminde etkili epigenetik değişiklikleri olarak değerlendirilebilir (Yang ve Schwartz, 2015).

### **2.3.2. Genetik**

İPF'nin bazı ailelerde kümelenme göstermesi üzerine risk oluşturan genlerin tespitine yönelik araştırmalar yapılmıştır (Talbert ve Schwartz, 2005). Familial İPF daha erken yaşlarda gözlenebilmektedir. Kaur ve arkadaşları, İPF'ye yatkınlık riski oluşturan genleri patogenezdaki rollerine göre dört gruba ayırmıştır: Sürfaktan proteinleri gibi alveolar epitel stabilitesini düzenleyen genler, Surfactant pulmonary-associated protein C (SFTPC), Surfactant pulmonary-associated protein A (SFTPA1), SFTPA2; telomeraz aktivitesi ile hücre yaşlanmasını regüle eden genler, Telomerase reverse transcriptase (TERT), Telomerase RNA component (TERC), Dyskerin (DKC1), Polyadenylate-specific ribonuclease (PARN), Regulator of telomere elongation helicase 1 (RTEL1); konakçı savunmasında görevli solunum yolu mucus üretimini regüle eden Mucin 5 subtype B tracheobronchial (MUC5B) ve inflamatuvar yanıtları düzenleyen Toll-interacting protein (TOLLIP); epitel bariyerinin stabilitesini sağlayan desmozomal protein geni Desmoplakin (DSP) (Kaur vd., 2017). Ayrıca bazı hastalarda TGF- $\beta$  reseptör geninde patojenik varyantlar tespit edilmiştir (Özlu vd., 2010). Sporadik İPF hastalarında bu genlerdeki mutasyonlara daha az sıklıkta rastlanmaktadır. Rutinde her İPF hastasına genetik tarama önerilmemektedir.

Familial İPF'li hastalarda yapılan genom çapında bağlantı analizleri sonucunda 11p15 kromozom bölgesinde bulunan 3,4 Mb'lık bölge ile hastalık arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Bu bölgede yer alan mucus sentezinde görevli MUC5B geni promoter bölgesindeki tek nükleotid polimorfizminin (SNP)(rs35705950) İPF ve familial interstisyel pnömoni grubunda anlamlı oranda sık görüldüğü bildirilmiştir (Seibold vd., 2011). Fonksiyon kazandırıcı etkisi olan bu varyant, MUC5B ekspresyonunu artırarak mukosilier klirensi

bozmakta, toksik çevresel etkenlerin etkisini artırmakta, endoplazmik retikulum (ER) stresine ve rejenerasyon mekanizmalarının bozulmasına neden olmaktadır (Schwartz, 2018).

Kromozomların uç bölgelerinde yer alan, ardışık tekrarlayan DNA dizilerinden oluşan telomerler, kromozomların stabilitesini sağlar, onları yeniden düzenlenmeye karşı korurlar. DNA replikasyonu sırasında bu bölgeler, katalitik fonksiyon gören ve RNA kalıbı olan TERC bileşenlerinden oluşan telomeraz enzimi ile replike edilir. TERT, TERC, DKC1, PARN, RTEL1 genlerinde oluşan patojenik varyantların neden olduğu Diskeratozis konjenita sendromu hastalarında pulmoner fibrozis gözlenmesi İPF ve telomer uzunluğu arasında güçlü bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Stuart vd., 2015).

Alveolar epitelyal hücre (AEC) tip 2 tarafından sentezlenen sürfaktan, inspiyumda yüzey gerilimini azaltan ve ekspiyumda kollapsı önleyen fosfolipid ağırlıklı bir lipoprotein komplekstir (Agudelo vd., 2020). Sürfaktan metabolizmasında görevli SFTPC, SFTPA2 ve ABCA3 genlerinin mutasyonları ER stresini uyarır, bunun sonucunda da apoptozis ve EMT indüklenir. Familial İPF olgularında daha fazla sıklıkla olmak üzere sporadik İPF olgularında da SFTPC, SFTPA2 ve ABCA3 genlerinde patojenik varyantlar tespit edilmiştir (Kaur vd., 2017).

### **2.3.3. Epigenetik**

Bir insanın bütün hücrelerinde DNA kodu aynı olmasına rağmen hücreler veya dokular arasında gen ekspresyon farklılığı epigenetik düzenlemeler ile sağlanır. DNA dizisinde değişiklik olmadan dizinin ifade edilme düzeyi değiştirilir. Epigenetik mekanizmalar dinamikdir; yaşlanma, beslenme, çevresel maruziyetler ve hastalıklar ile epigenetik değişiklikler oluşabilir (Yang ve schwartz, 2015). Epigenetik düzenlemeler fizyolojik şartlarda, hücrenel veya çevresel şartlara hücrenin adaptasyonunu sağlar. Gelişim, farklılaşma gibi fizyolojik süreçlerden ve kanser, İPF gibi patolojik süreçlerden sorumludur (Bartczak vd., 2020). DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar ile gen ekspresyonunun regülasyonu epigenetik düzenlemede temel mekanizmalardır (Coward vd., 2010; O'Brien vd., 2018).

İPF, kanser patogenezinin; hücreler arası etkileşim kaybı, apoptoz dengesinin bozulması, sinyal yollarının anormal aktivasyonu, genetik veya epigenetik değişiklikler ile normal dokudan farklı ekspresyon olan genler, miRNA ekspresyonlarının disregülasyonu gibi patogenetik süreçlerde benzerlik gösterir (Vancheri, 2015). İPF'li hastalardan alınan akciğer biyopsileri, hayvan modelleri ve hücre kültürü çalışmalarında yapılan DNA metilasyon analizlerinde kontrol grubundan farklı metilasyon paternleri saptanmış; Chemokine CXC motif receptor 4 (CXCR4), trombin, Wnt/ $\beta$ -katenin, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), Matrix metalloproteinase 7 (MMP7), COL3A1, düz kas aktini  $\alpha$  (Alpha smooth muscle actin- $\alpha$ -SMA) gibi fibrotik genlerin ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (Bartczak vd., 2020). İPF hastalarından ve sağlıklı donörlerden alınan akciğer biyopsilerinde yapılan histon modifikasyonu çalışmalarında antifibrotik etkili olan Chemokine CXC motif ligand 10 (CXCL10) ve siklooksijenaz-2 gen ekspresyonlarının baskılandığı saptanmıştır (Coward vd., 2010).

MiRNA'lar gen ekspresyonunu postranskripsiyonel aşamada, mRNA'yı parçalayarak veya translasyonu inhibe ederek düzenler (O'Brien vd., 2018). İPF'de fibrotik moleküller tarafından aktive edilen transkripsiyon faktörleri ve epigenetik değişiklikler, antifibrotik miRNA'ları downregüle ederken; profibrotik miRNA'ların upregülasyonunu sağlar (Gregory vd., 2011; Kim, Sheppard ve Chapman, 2018; Yang ve Schwartz, 2015). Antifibrotik miRNA'lar TGF- $\beta$ 'yi, CCN2'yi, ECM proteinlerini ve enzimlerini, EMT'yi, myofibroblast apoptozisini regüle eden genleri hedeflerken; profibrotik miRNA'lar bu yolları inhibe eden gen veya miRNA'ları hedefleyebilir (Vettori, Gay ve Distler, 2012).

#### **2.3.4. Yaşlanma**

Epidemiyolojik çalışmalar, ileri yaşla birlikte İPF insidansının ve prevalansının arttığını göstermiştir. İPF patogenezinde hem organizma hem de hücresele seviyelerde yaşlanma önemlidir. Telomer boylarının kısalması, mikrotravmaların kümülasyonu, genetik-epigenetik değişimlerin birikimi ve doku rejenerasyon kabiliyetinde azalma fibrozis gelişim riskini artırmaktadır (Zaman ve Lee, 2018).

### **2.3.5. Cinsiyet**

Erkek cinsiyet İPF için risk faktörüdür, yapılan çalışmalarda tanı alan erkek sayısının kadınlara oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu duruma, sigara kullanım oranı ve mesleki maruziyet riskinin erkeklerde daha yüksek olması neden olabilmektedir (Ekström vd., 2014). Cinsiyet hormonlarının etkisini araştıran bleomisinle indüklenmiş akciğer fibrozu oluşturulan fare modeli çalışmasında, erkek farelerde daha şiddetli fibroz gelişmesinde cinsiyet hormonlarının etkili olabileceği öne sürülmüştür (Voltz vd., 2008).

### **2.3.6. Çevresel ve Mesleki Maruziyet**

İPF'nin çevresel ve mesleki maruziyetler ile ilişkisi iyi tanımlanmıştır. İPF tanısı alan vakaların %16'lık kısmının anamnezinde çevresel ve mesleki maruziyet bulunmaktadır. Bu maruziyetler ile direkt ilişki kurulmuş interstisyel akciğer hastalıklarının tanıda dışlanması gereklidir. Tarım ve hayvancılıkla uğraşı, metal, ahşap, silika gibi organik tozlara, solventlere maruziyet İPF gelişiminde risk oluşturmaktadır ve bu risk maruziyet süresi ve miktarı ile artmaktadır (Walters, 2020). Lee ve ark.'ları mesleki maruziyet sonucu gelişen İPF'nin daha erken başlangıç ve daha kötü prognozla ilişkili olabileceğini bildirmiştir (Lee vd., 2015). Çevre kirliliği ve solunan havada çapı 10 nm'den küçük partiküllerin bulunması İPF gelişimi için risk oluşturmakta, mortaliteyi de artırmaktadır (Sese vd., 2018).

### **2.3.7. Gastroözefageal Reflü Hastalığı**

Gastroözefageal reflü hastalığına (GÖRH) bağlı mide asit içeriğinin kronik aspirasyonu İPF'ye neden olabilmektedir. İPF hasta grubu ve kontrol grubu arasında yapılan araştırmada İPF hastalarında daha yüksek oranda GÖRH saptanmıştır. İPF hastalarının GÖRH tedavisinde kullanılan proton pompa inhibitörleri ve özellikle laparoskopik reflü cerrahisinden fayda gördükleri, akut alevlenme oranının azaldığı ve hastalık progresyonunun yavaşladığı bildirilmiştir (Allaix vd., 2017).

### 2.3.8. Viral Etkenler

Epstein-Barr virüsü (EBV), sitomegalovirüs (CMV), insan herpesvirüs-7 (HHV-7) ve insan herpesvirüs-8 (HHV-8) gibi kronik viral enfeksiyonların, tekrarlayan epitel hasarı ve kronik antijenik uyarı ile profibrotik molekülleri artırarak İPF gelişimine neden olabilecekleri düşünülmektedir. İPF hastaları ve kontrol grubu arasında akciğer dokusundan yapılan çalışmalarda, İPF hastalarında viral etkenler daha sık tespit edilmiştir (Tang vd., 2003).

### 2.4. Patogenez

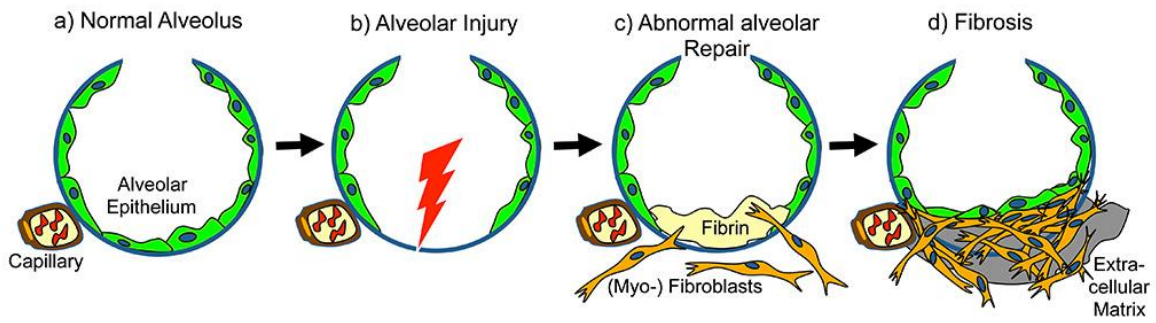
İPF, olağan interstisyel pnömoni (Usual interstitial pneumonia, UIP) histolojisi sergileyen, progresif fibrozis ile seyreden bir interstisyel akciğer hastalığıdır. ECM proteinlerinin, aktif fibroblastlar ve myofibroblastlar tarafından aşırı birikimi ile karakterizedir. Bu birikimle yeniden şekillenmiş sert, fibrotik akciğer parankimi ortaya çıkar ve sonuçta akciğer kompliyansında azalma, gaz değişimi ve pulmoner fonksiyonlarda bozulma meydana gelir (Chanda vd., 2019). İPF patogenezini halen anlayamamış, süreci tetikleyen etkenlerin ne olduğu ve fibrotik süreçte kontrol mekanizmalarının nasıl devreden çıktığı tam bilinmemektedir. İnflamasyon ve kronik epitel hasarı öne sürülen hipotezlerdir (Özlü vd., 2010).

İnflamatuvar varsayımda; inflamasyonu tetikleyen kronik uyaranlar sonucunda, dokuda artan inflamatuvar hücrelerden kontrolsüz salınan profibrotik moleküller fibrozise neden olmaktadır. Antiinflamatuvar tedavilerden beklenen yanıtın alınamaması bu varsayımdan uzaklaştırmaktadır. İnflamatuvar cevabın fibrozis etkeni olmaktan ziyade fibrozise yanıt sonucunda oluştuğu düşünülmektedir (Özlü vd., 2010).

Kronik epitel hasarı ile tekrarlayan hasar-onarım sürecinin kontrolden çıkması, apoptotik dengenin bozulması, artmış profibrotik sitokinler, fibroblast proliferasyonu, myofibroblast diferansiasyonu, EMT, artmış kollajen ve hücre dışı matriks bileşenleri ile akciğer dokusunun yeniden şekillenmesi günümüzde daha çok kabul görmüş varsayımdır (Funke ve Geiser, 2015)(Şekil 2.2). Fibrotik süreç belli bir seviyeye ulaştığında yeniden şekillenmiş ekstraselüler matriks, pozitif geri besleme ile yine fibrotik süreci teşvik edecek

profibrotik moleküller salgılamakta, progresif ve geri dönüşümsüz pulmoner fibrozis meydana gelmektedir (Spagnolo vd., 2020).

Fibroblastlarda apoptozisin azalması, proliferasyonun artması ve  $\alpha$ -SMA, kollajen gibi daha fazla ECM bileşenleri üretebilen myofibroblastlara dönüşmesi fibrotik süreçte kritik noktalardan biridir. Fibrozisin en etkili hücrelerden biri myofibroblastlardır, bunlar  $\alpha$ -SMA içeren ve düz kas hücrelerine benzer kasılma fonksiyonu bulunan farklılaşmış fibroblastlardır (Todd vd., 2012).



Şekil 2. 2: Fibrozis patogenezinde alveolar epitel hasarının rolü (Funke ve Geiser, 2015).

AEC tip 2 hücreleri, yetişkin akciğerinde epitelial kök hücre olarak işlev görür, hasarlı alveol epitelinin rejenerasyonu ve onarımı için anahtar bir role sahiptir. Normal akciğer epitel hasar onarım sürecinde; AEC tip 2'lerin proliferasyonu ve farklılaşmasına olanak sağlamak amacıyla, stromal fibroblast ve myofibroblastlar fibriller kollajen ve fibronektinden oluşan ECM biriktirirler (Thannickal vd., 2004). Kronik hasar ve yaşlanma gibi şartlar ise epitel yenilenme olanaklarını tüketerek mezenkimal birikimi artırır (Chanda vd., 2019). Telomerlerin kısalması, mitokondriyal disfonksiyon ve artan ER stresi, İPF'de AEC tip 2 hücrelerinin disfonksiyonuna neden olabilmektedir. İPF alveolünde tip 1 epitelin yerini tip-2 AEC ve bronşiyolar küboidal hücreler alır (Spagnolo vd., 2020).

Fizyolojik şartlarda düşük oranda bulunan, fibrosit olarak adlandırılan, kemik iliği kaynaklı CD45 ve CD34 pozitif hücrelerin doku hasarı durumunda üretimleri artar. Yaralanma bölgesine yerleşirler ve myofibroblastlara dönüşüp ECM üretimine katkıda

bulunurlar. CXCL12, CCL2, CCL3 ve IL-10 gibi sitokinler hasarlı dokudan salınarak fibrositlerin bölgeye göçü ve farklılaşmasını aktive eder (Todd vd., 2012).

EMT, alveolar epitel hücrelerin apikal-bazal polaritesini ve hücreler arası bağlantılarını kaybederek, mezenkimal moleküler ve fonksiyonel özellikler edinmesidir. TGF- $\beta$ , SMAD yoluyla aracılığı ile EMT'yi aktive eder (Zhu vd., 2017).

Makrofaj fonksiyonunun da İPF'de önemli olduğu bilinmektedir. Klasik yolla aktive edilmiş M1 makrofajlar TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 gibi sitokinler üretir, enfektif ajanlar ve kanser hücrelerine karşı savunmada görev alır. Alternatif yolla aktive edilmiş M2 makrofajlar ise doku onarımı ve debrislerin ortadan kaldırılmasında görevlidir, IL-10 ve TGF- $\beta$  üretirler. M2 makrofajların pulmoner fibrozis patogeneğinde rolü olduğu düşünülmektedir (Zhu vd., 2017).

Wnt sinyali yara iyileşmesi sırasında progenitör hücre işlevlerini düzenleyerek homeostazı sürdürür. Fonksiyonel çalışmalar, epitelyal hücre proliferasyonunda, EMT'de, myofibroblast farklılaşmasında ve kollajen sentezinde Wnt sinyal yolağının rol aldığını göstermektedir. Wnt sinyalindeki kanonik olmayan artışın hücre yaşlanmayı indüklediği gösterilmiştir. İPF'de Wnt sinyal yolağının anormal aktivasyonu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Chanda vd., 2019). Normal akciğerlerde B-katenin ekspresyonu endotelyal ve epitelyal hücreler ile sınırlıdır; fakat İPF akciğerlerinde, proliferatif lezyonlarda ve fibroblastik odaklarda nükleer katenin birikimi saptanmıştır (Chilosi vd., 2003). İPF'de Wnt/ $\beta$ -katenin sinyali, akciğer fibroblastlarında antiapoptotik ve profibrotik fonksiyonları aktive eder, fibroblast proliferasyonunu ve myofibroblast farklılaşmasını indükler. Wnt, TGF- $\beta$ 'nın profibrotik etkilerine de aracılık eder. TGF- $\beta$ 'nın epitelyal-mezenkimal geçişi indüklemek için Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu ile sinerji oluşturduğu gösterilmiştir (Chanda vd., 2019).

Fibrotik akciğer hastalıklarında T lenfositler ana inflamatuvar hücrelerden biridir. Regülatuar T lenfositler (Treg) profibrotik etkilidir ve bu etkilerini TGF- $\beta$  ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) aracılığıyla gösterirler (Todd vd., 2012). İPF'li hastaların akciğer dokusu ve bronkoalveoler lavaj (BAL) örneklerinde T lenfosit artışı tespit edilmiş ve bu artışın fibrozis nedeniyle olduğu düşünülmüştür. Akciğer dokusu veya BAL örneklerinde CD4+/CD8+ lenfosit oranının prognoz göstergesi olabileceği, yüksek CD8+ lenfosit oranının kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Daniil vd., 2005).

İPF patogeneğinde profibrotik veya antifibrotik etkili sitokinler, büyüme faktörleri ve kemokinler akciğerdeki epitelyal, mezenkimal veya inflamatuvar hücrelerden salgılanırlar, fibrotik sürecin aktivasyonuna ve progresyonuna neden olurlar. Kompleks düzenleyici mekanizmalar aracılığı ile birbirlerinin üretimlerini, fonksiyonlarını aktive veya inhibe edebilirler. IL-4, fibroblast proliferasyonunu ve ECM üretimini, makrofajların alternatif aktivasyonunu indükler (Todd vd., 2012). IL-1 $\beta$ , yara iyileşmesinde etkili, hayvan deneylerinde profibrotik etkisi gösterilmiş bir sitokindir. PDGF ve TGF- $\beta$  gibi büyüme faktörlerini artırır, fibroblastların myofibroblastlara farklılaşması ve ECM birikimine aracılık eder (Kolb vd., 2001). IFN- $\gamma$ , in vitro deneylerde, fibroblast proliferasyonunu ve ECM üretimini inhibe eden ve fibroblast apoptozunu artıran proinflamatuvar ve antifibrotik etkili sitokindir. Fibrotik akciğer doku analizlerinde IFN- $\gamma$  seviyelerinin düşük olduğu saptanmıştır (Tsoutsou vd., 2006).

TGF- $\beta$ ; hücre proliferasyonu, apoptoz, farklılaşma, immün yanıt ve yara iyileşmesi fonksiyonlarına sahip, fibrotik hastalıkların patogeneğinde yer alan en önemli büyüme faktörüdür. Fibroblast göçünü uyarır, fibroblastların myofibroblastlara farklılaşmasına aracılık eder, myofibroblastlar tarafından ECM üretimini indükler ve matriks metaloproteinazlar tarafından ECM degradasyonunu inhibe ederek fibrozisin aktivasyonu ve progresyonunda rol alır. Profibrotik etkili sitokinleri, büyüme faktörleri ve kemokinleri artırarak fibrozisi şiddetlendirir (Meng vd., 2016).

CCN2; kollajen üretimi, ECM birikimi, myofibroblast farklılaşması ve proliferasyon gibi fibrotik süreçlerde görev yapan profibrotik etkili büyüme faktörüdür. İPF'li hastaların örneklerinde CCN2 ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir. TGF- $\beta$  ile benzer fonksiyonlara sahiptir, TGF- $\beta$ 'nın etkilerine aracılık ederek fibrotik yanıtı şiddetlendirebilir (Chen vd., 2020).

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) hücre göçü ve farklılaşmasında işlev gören, antiapoptotik etkiyle reepitelizasyona katkı yapan büyüme faktörüdür. Kollajen ve fibronektin üretimini artırarak ECM birikimine katkı sağladığı in vitro çalışmalarda gösterilmiş, İPF hastalarının akciğer dokularında arttığı bildirilmiştir. İPF'de akciğer dokusunda arttığı gösterilen IGF bağlayıcı proteinler IGFBP-3 ve IGFBP-5'in, IGF-1'i ve IGF-1'in fibrotik etkilerini arttırdığı düşünülmektedir (Kottmann vd., 2009).

PDGF, fibroblast proliferasyonu, hücre göçü ve diferansiyasyonu ile myofibroblastların sayısını artırır. Akciğerlerde, alveolar makrofajlar ve epitel hücreleri tarafından üretilir. İPF'li hastaların akciğerlerindeki alveolar makrofajların daha fazla PDGF ürettiği bildirilmiştir (Wollin vd., 2015).

VEGF ailesinden VEGF-A, endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve anjiogenezisi uyaran büyüme faktörüdür. VEGF-A'nın PDGFR aktivasyonu yolu ile mezenkimal hücre göçünü ve proliferasyonunu düzenleyerek fibrozise katkı sağladığı düşünülmektedir. İPF'de yüksek VEGF plazma seviyelerinin prognozla ilişkili olabileceği, 5 yıllık sağkalımın başlangıçta bakılan VEGF plazma seviyesi düşük olanlarda daha iyi olduğu gösterilmiştir (Simler vd., 2004; Ando vd., 2010).

Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesinin FGF-1 ve FGF-2 en önemlileri olmak üzere 22 üyesi ve tirozin kinaz özelliği olan 4 tip FGF reseptörü (FGFR) bulunmaktadır. FGF ailesi hücre proliferasyonu, farklılaşması, göç ve hayatta kalma gibi önemli hücre fonksiyonları düzenler. FGF-2 güçlü profibrotik etkilidir; fibroblastlar, solunum yolu düz kas hücreleri ve tip II alveolar epitel hücrelerine mitojenik etkili; fibroblastlarda ve myofibroblastlarda kollajen sentezini aktive edici özelliktedir (Wollin vd., 2015). FGF-1 ve FGF-10; fibroblast proliferasyonunu baskılama, apoptoz aktivasyonu ve myofibroblast farklılaşmasının inhibisyonu gibi anti-fibrotik etkilere sahiptir. Hayvan deneylerinde FGF-10'un aşırı ekspresyonunun bleomisin ile indüklenen pulmoner fibrozu zayıflattığı gösterilmiştir (Gupte vd., 2009).

Prostaglandin E2, fibroblast proliferasyonunu baskılayan ve apoptozisi regüle eden antifibrotik etkilidir (Bartczak vd., 2020).

CXCL12, Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, CCL2) ve CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), fibrositlerin akciğer dokusuna göçünü ve yerleşerek myofibroblastlara dönüşümünü aktive eden profibrotik etkili kemokinlerdir (Todd vd., 2012).

## **2.5. İPF Klinik Özellikleri**

İPF, progresif interstisyel fibrozisin akciğer kompliyansında azalmaya ve gaz değişiminde bozulmaya neden olduğu kronik bir hastalıktır. Semptomlar hastalık başlangıcında net

değildir; kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA), astım, kalp hastalıklarına benzeyen nonspesifik semptomlarının olması hastaların yanlış tanı almasına ve tanının gecikmesine neden olur. İPF tanısı; göğüs hastalıkları, radyoloji, patoloji, romatoloji ve göğüs cerrahisi uzmanlarından oluşan multidisipliner bir ekip tarafından konur (Tomassetti vd., 2015).

Hastalarda efor dispnesi önemli bir semptomdur. Dispne zaman içinde kötüleşir, modifiye Tıbbi Araştırma Konseyi (Medical Research Council, mMRC) gibi dispne ölçeklerinin kullanımı dispne derecesindeki değişikliklerin izlenmesi için önemlidir. Pulmoner hipertansiyon, kalp yetmezliği gibi komorbiditeler de dispneye neden olabilirler (Kishaba, 2019). İnatçı, kuru öksürük en sık rastlanan İPF semptomlarından biridir (Pleasant ve Tighe, 2019). Halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık gibi nonspesifik semptomlar da gözlenebilir.

Elli yaş üzerinde dispne, kronik öksürük şikayetiyle başvuran hastaların İPF risk faktörleri açısından değerlendirilmesi önemlidir. Anamnezde aile öyküsü, sigara kullanımı, kronik hastalıklar, ilaç kullanımı, mesleki ve çevresel maruziyetler dikkatle sorgulanmalıdır, edinilen bilgiler tanı veya ayırıcı tanıda yararlı bilgiler sunabilir (Raghu vd., 2018).

Fizik muayenede çomak parmak saptanabilir. TTD UIP Kayıt Çalışması'nda çomak parmak İPF'de %36,4 oranında, İPF dışı UIP hastalarında ise %15,4 oranında saptanmıştır (Okumuş ve Bingöl, 2018). Akciğer oskültasyonunda bilateral bazallerde inspiryum sonunda velkro raller duyulur (Kishaba, 2019). Hastalığın erken dönemlerinde de ral duyulabilir ancak İPF'ye spesifik bir bulgu değildir. TTD UIP Çalışması'nda velkro raller İPF hastalarının %92,2'sinde saptanmıştır, kesin veya olası UIP paternine sahip fakat İPF'den farklı tanı konmuş hastalarda da bulunan oran %92,3'tür (Okumuş ve Bingöl, 2018).

Hastalığın ileri dönemlerinde, artmış dispneye bağlı solunum kaslarında hipertrofi görülebilir. Solunum zorluğu, iştahsızlık nedeniyle hastalarda kilo kaybı olabilir, vücut kitle indeksi (VKİ) takibi yapılması gerekir.

## **2.6. Tanı**

İPF tanısı için güncel uluslararası kılavuz Amerikan Toraks Derneği (ATS), Avrupa Solunum Derneği (ERS), Japonya Solunum Derneği (JRS) ve Latin Amerika Toraks Derneği (ALAT) işbirliği ile oluşturulmuştur (Raghu vd., 2018). İPF tanısı, nedeni bilinen diğer interstisyel

akciğer hastalıklarının ekarte edilmesi ile birlikte spesifik radyografik ve/veya histopatolojik bulgularla konulur (Sharif, 2017). Anamnezde risk faktörlerine maruziyet durumu, ilaç kullanım öyküsü sorgulanmalıdır. İPF tanısı için spesifik laboratuvar testi bulunmamaktadır; ancak hemogram, böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri (KCFT), sedimentasyon, C-Reaktif Protein (CRP), romatoid faktör (RF), antinükleer antikor (ANA) ve Anti Sitrüline Protein Antikoru (anti-CCP) ayırıcı tanıda kullanılabilecek rutin yapılması gereken testlerdir (Wakwaya ve Brown, 2019). Sjögren sendromu, sistemik lupus eritematozis, skleroderma, idiyopatik inflamatuvar miyopati veya vaskülit şüphesi olması durumunda ileri serolojik testler yapılmalıdır (Raghu vd., 2018).

### **2.6.1. Solunum Fonksiyon Testleri**

Akciğerde interstisyel alandaki fibrotik, sert dokunun etkisiyle akciğer kompliyansında azalma ve restriktif tipte solunum fonksiyon bozukluğu meydana gelir. Tanı ve pulmoner fonksiyonların takibinde solunum fonksiyon testleri (SFT)'den yararlanır. Restriktif akciğer hastalıklarında beklendiği gibi total akciğer kapasitesi, rezidüel volüm, fonksiyonel rezidüel kapasite azalır. Amfizemin eşlik ettiği İPF olgularında obstrüktif paternde SFT bulguları gözlenebilir (Sharif, 2017). Ekspirasyonun birinci saniyesinde atılan hacim (FEV1) ve zorlu vital kapasite (FVC) azalır. FEV1/FVC değişmez veya artar. FEV1/FVC oranındaki artışın hastalık progresyonu ile doğru orantılı arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Cortes-Telles vd., 2014). Alveolokapiller ilişkinin bozulması difüzyon kapasitesinde azalmaya neden olur. Karbonmonoksit difüzyon kapasitesi (DLCO) gaz değişimindeki bozulmanın göstergesi olarak İPF'li hastalarda azalmıştır (Coşkun, 2017).

### **2.6.2. Radyoloji**

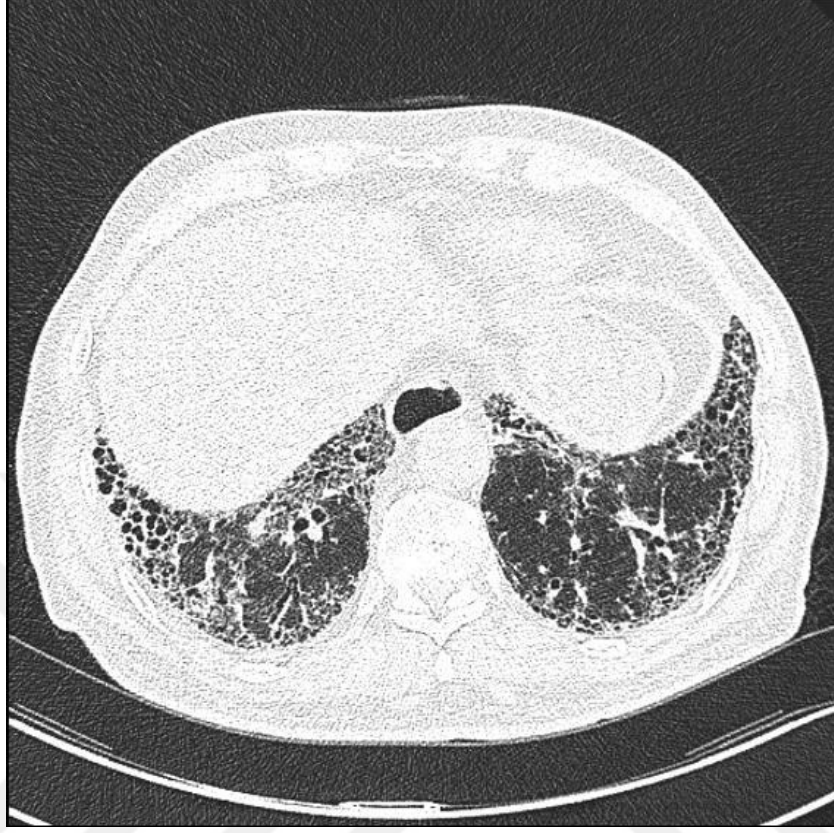
Posterior-anterior akciğer grafisinde bazallerde ve periferde retiküler dansiteler, bal peteği görünümü ve akciğer hacminde azalma tespit edilebilir (Demirkazık, 2017). İleri dönemlerde gelişebilecek pulmoner hipertansiyon, kalp yetmezliği gibi komorbidite durumlarında kardiyotorasik oranda değişiklik, belirgin bilateral hiler gölgeler, plevral efüzyon gözlenebilir (Kishaba, 2019).

İPF tanısında yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi (HRCT)'nin yeri çok önemlidir. UIP, İPF'nin HRCT bulgusudur. Klinik bulguları İPF ile uyumlu olgularda HRCT'de UIP paterni görülmesi akciğer biyopsisine ihtiyaç duyulmadan İPF tanısı koydurabilir (Sharif, 2017).

UIP paterni; subplevral ve bazallerde baskın, genellikle heterojen dağılım gösteren, traksiyon bronşektazisi ile birlikte olabilen bal peteği görünümüdür (Şekil 2.3)(Raghu vd., 2018). Bal peteği görünümü, benzer boyutlarda kümelenmiş, kalın duvarlı, genellikle 3–5 mm arasında kistik boşluklar olarak tanımlanır, bazen boyutu 25 mm'ye kadar çıkabilir (Lynch vd., 2018). Tutulumun orta ve üst zonlarda baskın olması, peribronkovasküler tutulum, buzlu cam görüntüsünün yaygın gözlenmesi, yaygın mikronodüller, multiple ve bilateral kistik lezyonlar, konsolidasyon, bronkopnomoni ve yaygın hava hapsi gözlenmesi ise UIP ile uyumsuz bulgulardır ve 'alternatif tanı' olarak sınıflandırılır (Kishaba, 2019). UIP, İPF'ye spesifik değildir kollajen doku hastalıklarında, asbestozisde, kronik hipersensitivite pnömonisi ve fibrozisle seyreden kronik interstisyel akciğer hastalıklarında UIP paterni görülebilir (Demirkazık, 2017).

Bal peteği görüntüsü haricinde UIP paterni özelliklerinin gözlendiği durumlar 'olası UIP' olarak tanımlanır, olası UIP varlığında histopatolojik inceleme ve multidisipliner değerlendirme ile İPF tanısı konur. Yapılan çalışmalarda, HRCT'de UIP saptanan hastalar histopatolojik olarak da incelendiğinde, HRCT'de saptanan UIP'in İPF için pozitif prediktif değerinin %90 ilâ %100 arasında olduğu; fakat histopatolojik UIP saptanan hastaların bir kısmında HRCT'de UIP paterni gözlenmediği tespit edilmiştir (Raghu vd., 2018).

Subplevral ve bazallerde hafif buzlu cam manzarası veya distorsiyonların gözlenebildiği ince retiküler paternler ile birlikte başka tanıyı düşündürmeyen HRCT bulguları 'belirsiz UIP' olarak sınıflandırılmaktadır (Raghu vd., 2018).



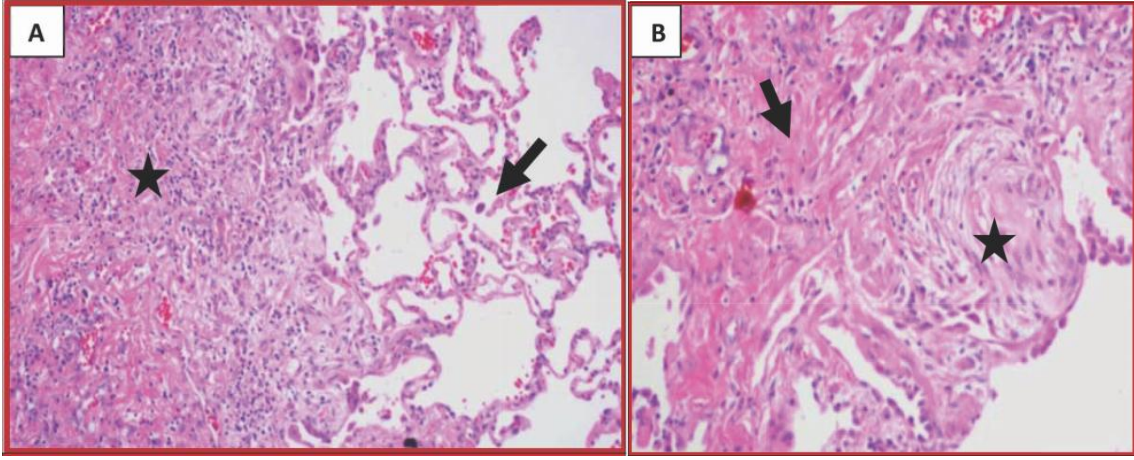
Şekil 2. 3: Tipik UİP paterni gösteren HRCT kesiti; her iki akciğer parankiminde periferik subplevral alanlarda interstisyel fibrozis ile uyumlu retikülasyonlar, traksiyon bronşektazileri ve alt loblarda yaygın bal peteği kist formasyonları izleniyor. (N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı arşivi).

### **2.6.3. Histopatoloji**

İPF için tipik klinik kriterlerin sağlandığı, HRCT’de olası UIP, belirsiz UIP veya alternatif tanı olarak sınıflandırılan olguların tanısı için histopatolojik incelemeye ihtiyaç duyulmaktadır. Açık cerrahi biyopsi ile 2-3 lobdan, farklı bölgelerden ve farklı aşama lezyonlardan alınan doku örneklerinin incelenmesi tanısal önem taşır, fakat komplikasyon gelişme oranı yüksektir. Video yardımlı torakoskopik cerrahi, açık akciğer biyopsisini tolere edemeyen hastalarda ve açık cerrahinin komplikasyonlar nedeniyle yapılamadığı durumlarda tercih edilebilir (Okumuş ve Bingöl, 2018).

UIP olarak sınıflandırılması için gereken 3 temel histopatolojik inceleme bulgusu şunlardır:

- Akciğer mimarisinin yeniden şekillenmesi,
- Mikroskopik bal peteği görüntüsü,
- Fibrotik doku ve sağlam dokunun birlikte gözlenmesi, yama tarzı fibrozis, mekansal (spatial) heterojenite gözlenmesi (Şekil 2.4)



Şekil 2. 4: Tipik UIP örneği gösteren bir akciğer biyopsisi. Akciğerde heterojen fibroz.

**A)** Yama tarzında fibrotik alanlar (yıldız) ile birlikte normal akciğer dokusu (ok) görülmekte (spatial heterojenite); **B)** Eski fibroz alanları ile birlikte (ok) fibroblastik odaklar (yıldız) (temporal heterojenite) görülmektedir (Türk Toraks Derneği İdiyopatik Pulmoner Fibrozis Tanı ve Tedavi Uzlaşısı Raporu, 2018).

Bu kriterlerin yanında, baskın tutulum subplevral ve paraseptal parankimde olmalıdır (Pleasant ve Tighe, 2019). Lenfositlerin ve plazma hücrelerinin interstisyel infiltrasyonundan oluşan hafif enflamasyon gözlenebilir. Fibrotik bölgeler, proliferatif fibroblast ve myofibroblastlardan oluşan ‘fibroblastik odak’ ve yoğun kollajenden oluşur. Bronşiyolar epitel ile kaplı ve mukus içerebilen kistik fibrotik hava boşlukları mikroskopik bal peteği olarak tanımlanır. Fibrozis ve bal peteği paterni gözlenen interstisyumda düz kas metaplazisi görülebilir. Bu koşulları sağlayan histopatolojik değerlendirme bal peteği paterninin olmadığı durumlarda da UIP tanısı koydurur (Raghu vd., 2018). Yaygın alveolar hasar, organize

pnömoni, hiyalin membranlar, aşırı duyarlılık pnömonisi, hava yolu merkezli değişiklikler ve granümatöz inflamasyon gibi farklı tanıları düşündürecek spesifik bulgular gözlenmemelidir. Ancak İPF akut alevlenmesinde UIP paternine ek olarak yaygın alveolar hasar ve organize pnömoninin eşlik ettiği hiyalen membranlar izlenebilir (Lynch vd., 2018). Hipersensitivite pnömonisi, langerhans hücreli histiositozis, sarkoidozis gibi diğer interstiyel hastalıkları düşündüren histopatolojik bulguların varlığı ‘alternatif tanı’ olarak tanımlanır (Demirağ, 2019). UIP kriterlerinin bir kısmına sahip fakat tam olarak UIP tanısını karşılamayan ve alternatif tanıları düşündürecek bulguların olmadığı veya bal peteği görüntüsünün olması durumunda histopatolojik olarak ‘olası UIP’ tanımlaması kullanılır. Akciğer mimarisinde hasara neden olan veya olmayan fibrozis varlığında ‘belirsiz UIP’ tanımı kullanılmaktadır. Hem UIP bulgularından bir kısmı, hem de alternatif tanı bulguları gözlenebilir. HRCT ve histopatolojik bulgular birlikte değerlendirilerek İPF tanısı konur (Tablo 2.1) (Raghu vd., 2018).

Tablo 2. 1: İPF tanısında histopatolojik ve HRCT bulgularının birlikte değerlendirilmesi\*

İPF şüphesi		Histopatolojik bulgular			
		UIP	Olası UIP	Belirsiz UIP	Alternatif tanı
HRCT bulguları	UIP	İPF	İPF	İPF	İPF değil
	Olası UIP	İPF	İPF	Olası İPF	İPF değil
	Belirsiz UIP	İPF	Olası İPF	Belirsiz İPF	İPF değil
	Alternatif tanı	İPF değil / olası İPF	İPF değil	İPF değil	İPF değil

\*Not: Raghu vd., 2018 yayımından modifiye edilerek hazırlanmıştır.

#### **2.6.4. Bronkoalveoler Lavaj**

BAL bulgularının İPF için tanı değeri yoktur. ATS/ERS/JRS/ALAT kılavuzu, HRCT'de UIP tespit edilmiş hastalara yapılmamasını; olası UIP, belirsiz UIP veya alternatif tanı durumlarında ayırıcı tanıları ekarte etmek için yapılmasını önermektedir (Raghu vd., 2018).

#### **2.6.5. Egzersiz Testleri**

Egzersiz testleri gaz değişimindeki problemleri, pulmoner, kardiyovasküler sistem ve kas iskelet sisteminin egzersiz kapasitesini değerlendirmek için kullanılabilir. İPF'de azalmış akciğer volümleri, artmış ölü boşluklar, kompliyansın bozulması, alveolar ve kapiller destrüksiyon egzersiz intoleransına neden olur (Coşkun, 2012).

##### **2.6.5.1. Kardiyopulmer Egzersiz Testi**

Kardiyopulmoner egzersiz testinde, bisiklet ergometresi ve koşu bandı cihazları kullanılabilir (Şen, 2017). İPF'de oksijen difüzyonundaki bozukluktan dolayı arteriyel oksijen basıncı ve oksijen saturasyonu (SaO<sub>2</sub>) düşer, alveol arteriyel oksijen gradiyenti artar. Maksimum oksijen tüketiminde azalma, ölü boşlukta, solunum frekansı ve dakika ventilasyonda artma gözlenir (Özlu vd., 2010).

##### **2.6.5.2. 6 Dakika Yürüme Mesafesi**

Hastaların 6 dakikada yürüyebilecekleri mesafe (6DYM) değerlendirilir. Egzersiz kapasitesini değerlendiren ucuz, kolay uygulanabilir, tekrarlanabilir bir testtir (Coşkun, 2017). İPF'de pulmoner fonksiyonların takibinde ve oksijen tedavisine karar vermede kullanılabilir (Özlu vd., 2010).

#### **2.7. Ayırıcı Tanı**

İPF tanısında, UIP paterninin varlığı tanı koydurucu olmasına karşın, UIP'e neden olabilecek diğer İAH'ların ekarte edilmesi gereklidir. UIP'le seyreden İAH'larının prognozu ve tedavisi

farklıdır (Bartczak vd., 2020). İPF'yi diğer interstisyel akciğer hastalıklarından ayırmak için; anamnezde ilaç, mesleki ve çevresel maruziyet, aile öyküsü, bağ dokusu hastalıkları gibi kronik hastalıkların varlığı, semptomların süresi ve şiddeti dikkatli sorgulanmalı; bağ doku hastalıklarını düşündüren cilt, eklem ve sistemik muayene bulguları aranmalı; laboratuvar testleri, radyolojik ve histopatolojik bulgular değerlendirilmelidir (Wakwaya ve Brown, 2019). Multidisipliner ekiple gerekli tüm tetkikler yapıldığında bile herhangi bir tanıya uymayan durumlar 'sınıflandırılmayan İİP' olarak tanımlanır (Oliveira vd., 2018).

### **2.7.1. İdiyopatik Nonspesifik İnterstisyel Pnömoni**

İPF ayırıcı tanısında ilk akla gelmesi gereken hastalıktır. Nonspesifik interstisyel pnömoni (NSİP) idiyopatik olabilir, ancak en sık başta skleroderma olmak üzere bağ dokusu hastalıkları, hipersensitivite pnömonisi, ilaç reaksiyonları veya yaygın alveolar hasar ile birlikte saptanabilir (Okumuş ve Bingöl, 2018). Klinik bulguları İPF'ye benzer fakat daha hafiftir, 40-50 yaşlarında başlar. Kadınlarda biraz daha sıktır. Altta yatan hastalığın tedavisi ve kortikosteroidler ile tedavi mümkündür (Oliveira vd., 2018). HRCT'de diffüz buzlu cam görüntüsü, retiküler opasite ve traksiyon bronşiektazileri gözlenir. Bal peteği paterni eşlik edebilir. Tanı için genellikle histopatolojik inceleme gerekir (King vd., 2021).

### **2.7.2. Deskuamatif İnterstisyel Pnömoni**

Deskuamatif interstisyel pnömoni (DİP), pigmente makropların alveol epitelini infiltre ederek alveol epitel deskumasyonuna neden olduğu nadir bir İİP'dir (Hellemons vd., 2020). Tütün dumanı, çevresel ajanlar, otoimmünite ile ilişkili bulunmuştur. Erkeklerde ve 30-50 yaş aralığında sık görülür. Alveolar septanın homojen kalınlaşması ve pigmente makrofajların intraalveolar birikimi gibi histopatolojik bulgular ile İPF'den ayrılabilir. Sigara bırakma ve kortikosteroid tedavisine yanıt verir (Chakraborty R.K. vd., 2020).

### **2.7.3. Respiratuvar Bronşiyolit İlişkili İnterstisyel Akciğer Hastalığı**

Respiratuvar bronşiyolit ve interstisyel akciğer hastalığının birlikte izlendiği İİP'tir. Sigara ilişkisi, 30-50 yaşlarında görülmesi, erkeklerde daha sık rastlanması ve tedavisi DİP'e benzer (Oliveira vd., 2018). HRCT'de buzlu cam görüntüsü ile birlikte sentriasiner nodüllerin varlığı tipiktir (Okumuş ve Bingöl, 2018).

### **2.7.4. İlaç İlişkili Pulmoner fibrozis**

İlaç ve radyasyona bağlı UIP; siklofosamid, bleomisin, nitrozüreler, metotreksat, nitrofurantoin gibi ilaçların kullanımı ve radyasyon maruziyeti ile ilişkilidir. Etken ilacın kesilmesi ile düzelir (King vd., 2019).

### **2.7.5. Kriptojenik Organize Pnömoni**

Kriptojenik organize pnömoni etiyolojisi bilinmeyen İİP'dir. Histolojisinde; distal bronşioelleri ve alveolar boşlukları tutan granülasyon dokusu ile karakterizedir. Radyolojik görüntülemelerde; çoklu alveolar, soliter veya infiltratif opasiteler gibi farklı paternler gözlenebilir (Shen L. vd., 2019). Her iki cinsiyeti eşit etkiler. Kortikosteroid tedavisine iyi yanıt verir (Oliveira vd., 2018).

### **2.7.6. Akut İnterstisyel Pnömoni**

Akut interstisyel pnömoni hızlı ilerleyen, şiddetli bir interstisyel akciğer hastalığıdır. Klinik, radyolojik ve histolojik bulgular akut solunum sıkıntısı sendromuna benzer (Oliveira vd., 2018). İdiyopattır, ortalama görülme yaşı 55'tir, cinsiyet farklılığı gözlenmez. Toplum kökenli pnömoniye benzer ancak tedaviye cevap alınmaz. Alınan kültürlerde üreme beklenmez (Bulut, 2013). Histopatolojik değerlendirmesi difüz alveolar hasar paterni ile karakterizedir. Erken evrede eksudatif faz gözlenir, interstisyum ve alveolar ödem ile karakterizedir. Geç evre organizasyon fazıdır, fibroblastik proliferasyon ve tip 2 hücre

hiperplazisi gözlenir. HRCT’de diffüz veya yamalı buzlu cam opasiteleri ve konsolidasyon alanları, geç fazda traksiyon bronşiektazisi saptanır (Mrad ve Huda, 2020).

### **2.7.7. Kronik Hipersensitivite Pnömonisi**

Kronik hipersensitivite pnömonisi, duyarlı allerjenin tekrarlanan inhalasyonuna akciğer parankiminin verdiği immün reaksiyon sonucu gelişen İAH’dır. Çiftçilik, kuş bakımı, mantar işçileri gibi mesleki ve çevresel tekrarlayan organik ajan teması etiyojiden sorumludur (Chandra ve Cherian, 2020). HRCT’de üst ve orta lobda baskın bal peteği paterni, hava hapsi alanları ve nodüler opasiteler; ileri dönemlerde retikülasyon artışı, traksiyon bronşiektazisi ve parankimde distorsiyon saptanır (Chandra ve Cherian, 2020). Lenfosit oranının BAL’da %20’den fazla olması, biyopside lenfositik bronşiyolit, genellikle üst loblarda bulunan peribronşioler veya köprüleşme fibrozisi ve non-kazeifiye granülomlar kronik hipersensitivite pnömonisini düşündürür (Demirağ, 2019; Okumuş ve Bingöl, 2018).

### **2.8. Komorbiditeler**

İPF’nin ileri yaş hastalığı olması, risk faktörlerinin başka hastalıklara da neden olması, akciğerde oluşan kronik ve ilerleyici vasıfta yapısal bozulma sonucunda komorbiditeler İPF’de sıktır (Sgalla vd., 2018). Pulmoner hipertansiyon, kombine pulmoner fibrozis ve amfizem, akciğer kanseri ve obstrüktif uyku apnesi gibi solunum sistemi ilişkili komorbiditeler görülebileceği gibi, iskemik kalp hastalığı, kalp yetmezliği, gastroözefageal reflü, depresyon ve anksiyete gibi solunum sistemi dışında diğer sistemleri etkileyen komorbiditeler de eşlik edebilir (Ryerson ve Ley, 2021; Okumuş ve Bingöl, 2018). Komorbiditeler İPF’nin prognozunu kötü etkileyebilir, akut alevlenmeleri tetikleyebilir ve akciğer fonksiyon kaybını hızlandırarak mortaliteyi artırabilir (Sharif, 2017). Komorbiditelerin erken tanı ve tedavisinin yaşam kalitesi ve sağkalımı iyileştirebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Raghu vd., 2015).

### **2.8.1. Pulmoner Hipertansiyon**

Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) pulmoner arter basıncının 25 mmHg veya üzerinde olması olarak tanımlanır (Sgalla vd., 2018). İPF’de hipoksi, parankimal fibrozis, restriksiyon, pulmoner mikrovasküler oklüzyon ve artmış tromboemboli riski gibi kompleks faktörler PAH nedenlerinden sayılabilir (Erbay ve Özsu, 2017). İPF’de PAH prevalansı yeni tanı dönemlerinde %8-15 iken, ileri hastalıkta %30-50 ve son dönem hastalıkta %60’tan fazla oranda saptanmıştır. İPF’li hastalarda ekokardiyografi ile PAH tarama zamanı ile ilgili fikir birliği yoktur. Parankimal akciğer hastalığının ciddiyeti ile açıklanamayan egzersiz dispnesi veya hipoksi; SFT veya radyoloji ile orantısız düşük DLCO; eforla oksijen basıncında hızlı düşüşler; egzersizle atipik göğüs ağrısı, senkop oluşması; Elektrokardiyografi (EKG)’de sağ aks sapması; Ekokardiyografi (EKO)’da sağ atriyum genişlemesi ve sağ ventrikül hipertrofisi; HRCT’de pulmoner arter çapının 29 mm’den fazla olması durumunda PAH düşünülmelidir (Ryerson ve Ley, 2021). İPF nedenli PAH’a spesifik ilaç tedavisi etkili bulunmamıştır. FVC’si %70’in üzerinde ve sağ kalp kateterizasyonu ile pulmoner arter basıncı 35 mmHg’nın üzerinde olan olgular PAH merkezine yönlendirilmelidir (Okumuş ve Bingöl, 2018).

### **2.8.2. Kombine Pulmoner Fibroz ve Amfizem**

Kombine pulmoner fibroz ve amfizem, üst zonlarda amfizem alt zonlarda fibrozun eşzamanlı birlikte bulunmasıdır (Nathan vd., 2019). Pulmoner fonksiyon testlerinde, amfizemin hiperinflasyonu ve fibrozun neden olduğu azalmış kompliyansın kümülatif etkisi ile normal akciğer hacimleri saptanır. Her iki durumunun da etkisiyle DLCO belirgin azalır (Sgalla vd., 2018). PAH ve akciğer kanseri insidası yüksektir, PAH veya akciğer kanseri gelişmesi durumunda sağkalım önemli ölçüde azalmaktadır (Ryerson ve Ley, 2021).

### **2.8.3. Akciğer Kanseri**

İPF’li hastalarda akciğer kanseri gelişme riski yaklaşık 5 kat artmaktadır (Ryerson ve Ley, 2021). Mevcut semptomlara hemoptizi ve hızlı kilo kaybı eklenmesi durumunda akciğer kanseri düşünülmelidir (Okumuş ve Bingöl, 2018). İleri yaş, sigara kullanımı gibi İPF risk

faktörleri kanser gelişme riskini artırdığı gibi; alveolar epitelin kronik hasarı, anormal doku onarımı, epigenetik ve genetik değişiklikler, miRNA'ların anormal ifadesi ve spesifik sinyal yollarının aktivasyonu İPF'de ve kanser gelişiminde paylaşılan ortak patojenik süreçlerdir (Vancheri, 2013). Prognozu kötü etkiler, sağkalımı yaklaşık 2 yıl kısaltmaktadır (Sgalla vd., 2018). İPF hastaları sınırlı akciğer fonksiyonları ve akut alevlenme riskini artırmaları nedeniyle cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapiyi tolere edememektedir (Ryerson ve Ley, 2021).

#### **2.8.4. Kardiyovasküler Hastalıklar**

Kardiyovasküler hastalık (KVH) riski ileri yaş, sigara kullanımı gibi faktörlerle artmaktadır. İPF, KVH'lar için bağımsız bir risk faktörü olup, diğer interstisyel akciğer hastalıklarından daha yüksek KVH prevalansına sahiptir (Torrise vd., 2018). Sistemik hipertansiyon, aritmiler, kalp yetmezliği, iskemik kalp hastalığı, serebral iskemik olaylar İPF'ye eşlik edebilecek kardiyovasküler komorbiditelerdir (Caminati vd., 2019). İPF ve KVH arasındaki ilişki net bilinmemektedir. İPF patogenezinin sorumlu tekrarlayan hasar-onarım süreçlerinin koagülasyon dengesini tromboz lehine bozması, egzersiz intoleransı nedeniyle artmış immobilizasyon ve hipoksinin etkili olabileceği düşünülmüştür (Okumuş ve Bingöl, 2018; Torrise vd., 2018). Klinik çalışmalardan elde edilen farklı sonuçlar nedeniyle antikoagulan tedavinin İPF hastalarında etkinliği tartışmalıdır (Kubo vd., 2005; Noth vd., 2012). İPF şiddeti ile açıklanamayan dispne varlığında EKG, miyokard perfüzyon sintigrafisi veya stres EKO ile KVH taraması önerilir (Ryerson ve Ley, 2021).

#### **2.8.5. Gastroözefageal Reflü Hastalığı**

İPF'li hastalarda semptomatik veya asemptomatik GÖRH sık görülmekte ve İPF ve akut alevlenme patogenezinde mikroaspirasyonların rol alabileceği düşünülmektedir (Jo vd., 2019). İPF ve GÖRH'ün birlikte görülme oranı %60 iken, özefageal pH ölçümü ile bu oran %80'in üzerine çıkmaktadır (Caminati vd., 2019). İPF'de standart tedavide GÖRH tedavisinin etkili

olmadığı, semptomatik GÖRH hastalarına proton pompa inhibitörü ile tedavi ve diyet düzenlemesi önerilmektedir (Okumuş ve Bingöl, 2018).

### **2.8.6. Uyku Apnesi**

İPF’de obstrüktif uyku apnesi (OUA) %50-90 prevalans ile genel popülasyondan yüksek bulunmuştur. Hastaların çoğunda apne-hipopne indeksi saatte 15’in üzerinde olacak şekilde, orta veya ciddi seviyede OUA mevcuttur (Schiza vd., 2020). Azalmış akciğer hacimlerinin üst solunum yolları instabilitesine yol açabilmesi, gece hipoksemi atakları, gece öksürüğü OUA’ya neden olabilir (Caminati vd., 2019). OUA uyku kalitesini bozarak yorgunluk, halsizlik, gündüz uyku hali ile yaşam kalitesini bozmakta ve tekrarlayan desatürasyonlar mortaliteyi kötü etkilemektedir (Torrise vd., 2018). Klinik OUA şüphesi varlığında gece boyu sürekli pulsoksimetre ölçümleri veya polisomnografi yapılabilir. Tedavide sürekli pozitif havayolu basıncı (CPAP) önerilmektedir (Sgalla vd., 2018).

### **2.9. Prognoz**

İPF ilerleyici akciğer fonksiyon kaybı ve komorbiditeler nedeniyle tanıdan itibaren yaklaşık 4 yıllık sağkalım ile kötü prognozlu bir hastalıktır. Sağkalım hastalar arasında progresyon farkı, komorbiditeler ve akut alevlenmeler gibi faktörlerden etkilenir. (Ryerson ve Ley, 2021). En sık ölüm nedeni solunum yetmezliğidir; iskemik kalp hastalıkları, kalp yetmezliği, pulmoner enfeksiyonlar ve akciğer kanseri diğer nedenlerdir (Özlu vd., 2010). Tanıda ve uzun süreli izlemlerde mortaliteyi belirleyen bazı faktörler belirlenmiştir (Tablo 2.9.)(Raghu vd., 2011). İleri yaş, erkek cinsiyet, düşük FVC yüzdesi ve DLCO, oksijen tedavisi ihtiyacı, şiddetli dispne, kısa 6DYM kapasitesi, HRCT’de yaygın fibrozis ve bal peteği görünümü tanıda mortaliteyi belirleyen faktörlerdir (Raghu vd., 2011; Sharif, 2017).

Tablo 2. 2: İPF’de mortalite riskini artıran özellikler\*

<b>Tanımda etkili faktörler</b>	<b>İzlemdede etkili faktörler</b>
Dispne seviyesi	Dispne şiddetinde artış
DLCO < %40	FVC değerlerinde $\geq$ %10 azalma
6DYM sırasında SaO <sub>2</sub> < %88	DLCO değerinde $\geq$ %15 azalma
HRCT’de bal peteği yaygınlığı	HRCT’de fibrozisin kötüleşmesi
Pulmoner hipertansiyon	

\*Not: Raghu vd., 2011 yayınından modifiye edilerek hazırlanmıştır

Mortaliteyi riskini belirlemeye yönelik bazı modeller önerilmiştir. GAP; cinsiyet, yaş, FVC ve DLCO ölçümlerini içeren pulmoner fizyoloji parametreleri kullanılarak çevrimiçi hesaplanabilen evreleme modelidir ([www.acponline.org/journals/annals/extras/gap](http://www.acponline.org/journals/annals/extras/gap)). Elde edilen parametrelerin puanlanması ile I., II. ve III. evre belirlenmekte ve 3 yıllık sağkalım oranları hesaplanmaktadır (Kolb ve Collard, 2014).

FVC’de yıllık %10’dan fazla azalma, artmış 5 yıllık mortalite riski ile ilişkili bulunmuştur (Balestro vd., 2019). Dispne ve öksürük şikayetlerinin artması, pulmoner hipertansiyon, akut alevlenme veya solunum problemleri nedenleriyle hastaneye yatış mortaliteyi artırmaktadır (Okumuş ve Bingöl, 2018).

İPF’de bazı moleküler biyomarkırlar prognozu belirlemeye katkı sağlayabilmektedir. MUC5B promotör polimorfizminin mortaliteyi azalttığına dair güçlü prognostik markır değeri vardır (Peljto vd., 2013). MMP7 yüksekliği kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilmiştir (Hambly, Shimbori ve Kolb, 2015). Periferik kanda artmış fibrositler, azalmış telomer uzunluğu, periferik kan mononükleer hücrelerin gen ekspresyon profilleri, TOLLIP varyantı, artmış kollajen yıkım ürünleri ve yüksek sürfaktan protein seviyelerinin kötü prognostik biyomarkır olarak kullanımı önerilmiştir (Hambly vd., 2015). İPF patogenezinde önemli rolü

olan miRNA'ların da prognostik belirteç olarak kullanımı önerilmiştir (Miao vd., 2018; Sgalla vd., 2018). Hızlı progresyon gösteren İPF hastaları ile yavaş progrese olan İPF hastalarından alınan akciğer biyopsilerinde miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmış; miR-302c, miR-376c, miR-210, miR-423 ve miR-185 ekspresyonlarının hızlı progresyon gösteren grupta yüksek olduğu saptanmıştır (Yang ve Schwartz, 2015). İPF'de noninvazif biomarkırlar, klinik kullanımda önemli fayda sağlayacaktır fakat etkinliklerini kanıtlamak için daha fazla araştırma gerekmektedir.

## **2.10. İzlem**

İPF fatal bir kronik akciğer hastalığıdır, tanı almış veya İPF şüphesi olan hastalar İPF konusunda deneyimli uzman hekimlerden oluşan merkezlere yönlendirilmeli, takip ve tedavileri düzenli olarak bu merkezler tarafından yapılmalıdır. İPF'nin izlem sıklığı, hangi testlerin ne zaman yapılacağına dair fikir birliği olmamakla birlikte, klinik deneyim ve uzman görüşlerine dayalı öneriler mevcuttur (Ryerson ve Ley, 2021). Klinik süreç kişiler arasında farklılık gösterdiği için hasta bazında izlem programları yapılmalıdır. İzlemede amaç hastalık progresyonunu ve komorbidite gelişimini değerlendirmek, antifibrotik tedaviye başlamak, tedavinin yan etkilerini belirlemek ve gerektiğinde değiştirmek, akciğer transplantasyonu veya palyatif tedaviye karar vermektir (Raghu vd., 2011).

Mevcut semptomlarda kötüleşme durumu veya yeni eklenen semptomlar her ziyarette sorgulanmalı, hastalık progresyonu ve komorbid hastalıkların varlığı araştırılmalıdır. Hastanın fonksiyonel durumu, egzersiz kapasitesi, SFT ile akciğer kapasitesi ve karaciğer fonksiyon testleri ile ilaç yan etkileri değerlendirilmelidir (Okumuş ve Bingöl, 2018).

## **2.11. İdiyopatik Pulmoner Fibroziste Akut Alevlenme**

İPF klinik seyri hastalar arasında değişkenlik göstermekte, bazı hastalarda progresyon yavaş seyrederken bazı hastalar solunum fonksiyonlarının kısa sürede bozulmasıyla giden akut alevleme (AA) ile görülebilmektedir. AA, semptomlarda akut gelişen kötüleşme ve akciğer fonksiyonlarında hızlı bozulma kliniğidir. Her yıl İPF'li hastaların %5-10'u AA atağı

geçirmektedir. Hastaneye yatış ve/veya mekanik ventilasyon gerektirmekte, ortalama 3-4 aylık sağkalım ile mortaliteyi önemli oranda artırmaktadır (Quinn, Wisse ve Manns, 2019).

AA etiyojisi hakkında bilgiler sınırlıdır. Ekstrinsik veya intrinsik uyarılara akciğerler kontrolsüz yanıt vermektedir. FVC düşüklüğü AA için kabul edilmiş en önemli risk faktörüdür. Kısa 6DYM, düşük DLCO değeri, pulmoner hipertansiyon, düşük bazal oksijen değerleri ve artmış dispne riski artıran diğer faktörlerdir. AA hastalarında solunum yolu viral ajanlarının tespiti, kış ve bahar aylarında AA sıklığında artış, immünsüprese hastalarda AA sıklığının anlamlı oranda yüksek olması nedeniyle enfeksiyonların riski artırdığı düşünülmektedir (Collard vd., 2016). GÖR ile asit mide içeriğinin mikroaspirasyonları AA'yı tetikleyebilmektedir. Cerrahi akciğer biyopsisi, akciğer rezeksiyonu, bronkoskopi gibi girişimsel işlemler ve yüksek konsantrasyon oksijen ile mekanik ventilasyon gibi travmatik işlemler AA gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Kaya ve Erdoğan, 2017).

AA, akut respiratuar distres sendromuna benzer klinik özelliklere sahiptir. Artmış oksijen ihtiyacı, HRCT'de buzlu cam görüntüsü ve konsolidasyon alanları, histopatolojisinde yaygın alveolar hasar ile karakterizedir (Whelan ve Schnapp, 2021).

AA tanısı koyabilmek için bazı kriterlerin sağlanması gerekir, bunlar: İPF tanısı bilinen bir hastada pulmoner emboli, kalp yetmezliği, pnömotoraks gibi solunum fonksiyonlarında bozulmaya neden olabilecek İPF dışı etkenlerin ekarte edilmesi; dispne semptomlarında kötüleşmenin 1 aydan kısa sürede ortaya çıkması; HRCT'de UIP zemininde yeni eklenmiş buzlu cam görüntüsü veya konsolidasyon alanları saptanmasıdır (Kaya ve Erdoğan, 2017).

İPF-AA için kanıtlanmış tedavi seçeneği yoktur. Destek tedavi ve kortikosteroid tedavisi önerilmektedir. Kortikosteroid tedavisine ek olarak takrolimus, siklosporin A, azatioprin, siklofosamid veya sivelestat içeren immünsüpresif tedaviler denenmiş, bazı çalışmalarda faydalı sonuçlar elde edilmiş, ancak kanıt düzeyinde veri elde edilememiştir (Kaya ve Erdoğan, 2017). Antikoagülanların AA tedavisinde etkili olabileceği düşüncesiyle yapılan varfarin çalışmasında, mortalitenin artması nedeniyle çalışma durdurulmuştur. Rekombinant insan trombomodülin, siklosporin A ve kortikosteroid kombinasyonunun mortalite oranlarını düşürdüğü saptanmıştır (Okumuş ve Bingöl, 2018). Antifibrotik etkili pirfenidon ve nintedanibin akut alevlenmeleri önleyebileceği, AA tedavisi için de kullanılabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Collard vd., 2016). Rituksimab, terapötik

plazmaferez ve intravenöz immunglobulin kombinasyonu ile tedavi edilen 11 İPF-AA hastasının sonuçları, daha önce standart glukokortikoid tedavisi almış 20 İPF-AA hastasının sonuçları ile karşılaştırılmış ve 1 yıllık sağkalım tedavi grubunda %46 iken kontrol grubunda %0 saptanmıştır (Donahoe vd., 2015).

AA'nın prognozu kötü, mortalitesi yüksek ve tedavisi zordur. Tetikleyebilecek faktörlerden mümkün olduğunca kaçınılmalı, pnömokok ve influenza aşılı yapılmalı, komorbiditeler yakın takip edilmeli, girişimsel işlemler veya mekanik ventilatör gerektiğinde risk azaltıcı önlemler alınmalıdır.

## **2.12. Tedavi**

Günümüzde mevcut gelişmelere rağmen İPF'de kür sağlayacak medikal tedavi seçeneği bulunmamaktadır. Sağkalım üzerine belirgin faydası olduğu kanıtlanan pirfenidon ve nintedanib, fibrozu yavaşlatmakta fakat tam iyileşmeyi sağlayamamakta üstelik ileri evre hastalarda istenen fayda elde edilememektedir (Balestro vd., 2019). Akciğer transplantasyonu tam iyileşmeyi sağlayacak seçenek olmasına karşın, hastaların ileri yaşta olması ve komorbid hastalıkların eşlik etmesi nedeniyle sınırlı sayıda uygulanabilmektedir.

Hastaların erken evrelerde tanı alması medikal tedavilerden azami fayda görmesini sağlayabilmekte; komplikasyonların ve komorbiditelerin erken tanı ve tedavisi, yaşam kalitesini ve sağkalımı artırabilmektedir (Raghu ve Richeldi, 2017).

### **2.12.1. Pirfenidon**

Pirfenidon İPF'de, oksidatif stres belirteçlerini azaltır; TGF- $\beta$ , FGF, PDGF gibi büyüme faktörlerinin üretimini baskılar; fibroblast proliferasyonu ve myofibroblast farklılaşmasını inhibe eder;  $\alpha$ -SMA ve tip I kollajen üretimini azaltır; TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 ve IL-10 gibi sitokinlerin üretimini baskılar (Homma vd., 2018). Antioksidan, antifibrotik, antiinflamatuvar etkili bir ilaçtır (Kolb, Bonella ve Wollin, 2017). İPF'de pirfenidon kullanımının etkinliği ve güvenilirliğini araştıran CAPACITY ve ASCEND faz III çalışmalarında, pirfenidon grubunda, plasebo grubuna kıyasla FVC'deki düşüşün, progresyonun ve İPF'ye bağlı mortalitenin daha

az olduğu saptanmıştır (Martin, Chung ve Kanne, 2016). FVC değeri %50 ve üzeri, DLCO değeri %30 ve üzeri olan hafif veya orta şiddetli İPF hastalarının tedavisinde pirfenidon kullanılabilir (Okumuş ve Bingöl, 2018). En sık görülen yan etkiler fotosensitivite, bulantı, iştahsızlık, ishal gibi gastrointestinal şikayetler ve halsizliktir. Karaciğer toksisitesi gözlenebilir, karaciğer enzimleri tedavinin ilk 6 ayı boyunca her ay, daha sonra 3 aylık periodlarla KCFT ile değerlendirilmelidir (Moğulkoç, 2017).

### **2.12.2. Nintedanib**

Nintedanib, İPF patogeneğinde etkili profibrotik moleküller olan FGF, PDGF ve VEGF reseptörlerini hedefleyen çoklu tirozin kinaz reseptör inhibitörüdür. Kanser tedavisinde anti-anjiyogenik fonksiyonu için kullanılmaktadır (Wollin vd., 2015). Nintedanib'in insan akciğer fibroblastlarında; fibroblast proliferasyonunu, fibroblast motilitesini, TGF- $\beta$  ile uyarılan myofibroblast farklılaşmasını ve kollajen birikimini azalttığı gösterilmiştir. Hayvan modellerinde de akciğerde kollajen içeriğini, morfolometrik fibroz skorlarını, TGF- $\beta$  ve prokollajen ekspresyonunu azalttığı; BAL'da lenfosit, nötrofil ve inflamatuvar sitokinleri azalttığı gösterilmiş, İPF tedavisinde antiinflamatuvar ve antifibrotik etkileri olduğu saptanmıştır (Kolb vd, 2017).

Nintedanib ve plaseboyu karşılaştıran TOMORROW ve IMPULSIS I-II faz III çalışmalarından elde edilen verilerde, nintedanib kullananlarda plaseboya kıyasla FVC'deki yıllık düşüşte ve mortalitede azalma olduğu, ilk alevlenme atağının geciktiği saptanmıştır (Raghu ve Richeldi, 2017).

Nintedanib kullanımında en sık görülen yan etki diyaredir. Diyare varlığında hidrasyon ve antidiyareikler ile tedavi, dozun azaltılması, gerektiğinde ilacın kesilmesi önerilmiştir (Moğulkoç, 2017). Bulantı, kusma, karın ağrısı ve karaciğer toksisitesi diğer yan etkileridir. Tedavi öncesinde; tedavinin ilk altı ayı boyunca 2. ve 4. haftalarda, sonrasında aylık; tedavi boyunca da 3-6 aylık periyotlarda KCFT yapılmalıdır (Okumuş ve Bingöl, 2018). Nintedanib tromboemboli riskini bir miktar artırabildiğinden, koroner arter hastalığı gibi kardiyovasküler hastalığı olan kişilerde dikkatli kullanılmalıdır.

### 2.12.3. Destek Tedavileri

İPF’de hastalığın progresyonunu antifibrotik tedaviler ile yavaşlatmak mümkün iken; tam iyileşme sağlanamamakta, mevcut semptomlar devam etmektedir. Öksürük, dispne, halsizlik gibi semptomların tedavisi yaşam kalitesini yükseltir, fakat İPF’de bu semptomların tedavisi için kanıtlanmış tedavi seçeneği yoktur (Pleasant ve Tighe, 2019). Komorbiditelerin erken tanı ve tedavisi sağkalımı iyileştirebilmektedir. Pnömoni ve influenza aşuları solunum yolu enfeksiyonlarından koruyarak hastaneye yatışı önleyebilir.

İstirahatte hipoksemisi olan İPF hastalarına uzun süreli oksijen tedavisi önerilmektedir. Oksijen tedavisi, günlük aktivitelerin sürdürülebilmesi ve pulmoner hipertansiyon gelişiminin önlenmesini sağlayabilir (Moğulkoç, 2017).

Pulmoner rehabilitasyon hastalık ve süreç ile ilgili eğitim, çeşitli egzersiz teknikleri, psikososyal destek ve beslenme önerilerinden oluşur. Egzersiz kapasitesini, dispne ve yaşam kalitesini iyileştirmeye katkı sağlayabileceği için İPF hastalarında önerilmektedir (Quinn vd., 2019).

### 2.12.4. Akciğer Transplantasyonu

Akciğer transplantasyonu geliştirilen farmakolojik tedavilere rağmen, seçilmiş hastalarda sağkalımı artırdığı kanıtlanan tek tedavi seçeneğidir. İPF progresif ve kür şansı olmayan bir hastalık olduğundan orta ve ağır hastalara akciğer transplantasyonu önerilmelidir. Transplantasyon adaylarının yakın izlenmesi ve en uygun zamanda sevk edilmeleri önerilmektedir. Nakil sonrası beklenen ömür nakil yapılmadığı durumda beklenen ömür süresini geçtiğinde transplantasyon yapılmalıdır (Balestro vd., 2019).

Transplantasyon endikasyonları: 6 aydan uzun süren FVC’de %10 ve üzerinde düşüş ya da DLCO %15 ve üzerinde azalma olması; SaO<sub>2</sub>’nin %88’in altına düşmesi; 250 m’den kısa 6DYM; 6 aydan daha uzun bir sürede yürüme mesafesinin 50 m’den fazla kısılması; pulmoner hipertansiyon gelişmesi; hastaneye yatış gerektiren akut alevlenme, pnömotoraks veya fonksiyonel kapasitede kötüleşmedir (Okumuş ve Bingöl, 2018).

## 2.13. MikroRNA

### 2.13.1. Kodlamayan RNA'lar

İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla DNA'da bulunan 3 milyar baz çiftinin yaklaşık %1'inin protein kodladığı saptandı. Genomda yer alan dizilerin fonksiyonlarını araştırmak amacıyla tasarlanmış bir proje olan ENCODE (*encyclopedia of DNA elements*) genomun yaklaşık %75'inin RNA'ya transkribe olduğu ve bu transkriptlerin; yaklaşık 20,000 protein kodlayan gen, yaklaşık 9,000 miRNA'nın içinde bulunduğu kısa kodlamayan RNA, yaklaşık 10,000 uzun kodlamayan RNA (lncRNA)'lardan oluştuğunu gösterildi (ENCODE Project Consortium, 2012).

### 2.13.2. MikroRNA Tanımı

mikroRNA'lar protein kodlamayan fakat gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alan, 18-22 nükleotit (nt) uzunluğunda küçük RNA molekülleridir (Zamani, 2013). *Caenorhabditis elegans*'da 1993 yılında lin-4'ün protein kodlamayıp, LIN-14 geninin ekspresyonunu düzenlemesinin keşfedilmesiyle mikroRNA'ların sentezi, biyolojik süreçlerdeki rolü ve hastalıkların patogeneziindeki yeri araştırılmıştır (Lee, Feinbaum ve Ambros, 1993). Günümüzde, insanlarda tanımlanmış 2000'nin üzerinde miRNA bulunmaktadır. Protein kodlayan genlerin %60'tan fazlası miRNA'lar tarafından regüle edilebilmektedir, 45.000'den fazla miRNA-hedef bölgesi tanımlanmıştır (Souma vd., 2018). Bir miRNA birden fazla genin ekspresyonunu düzenleyebilir, aynı zamanda bir genin ekspresyonu birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir (Miao vd, 2018). Bu nedenle miRNA'lar; biyolojik süreçlerde, çoklu yollar üzerinden etki gösterebilen kompleks fonksiyona sahip moleküllerdir. mikroRNA'lar gelişim, hücre döngüsü, farklılaşma, proliferasyon, hücre göçü ve apoptozis gibi işlevleri regüle etmektedir (Huleihel vd., 2014). Kanser, nörolojik hastalıklar, fibrotik hastalıklar ve inflamatuvar hastalıklar gibi birçok hastalık patogeneziinde veya progresyonunda fonksiyon göstermektedir (Souma vd., 2018). Klinik uygulamada tarama, tanı, prognoz göstergesi ve tedavi hedefi olarak kullanımı mümkün olabilir (Hammond, 2015).

### 2.13.3. MikroRNA Terminolojisi

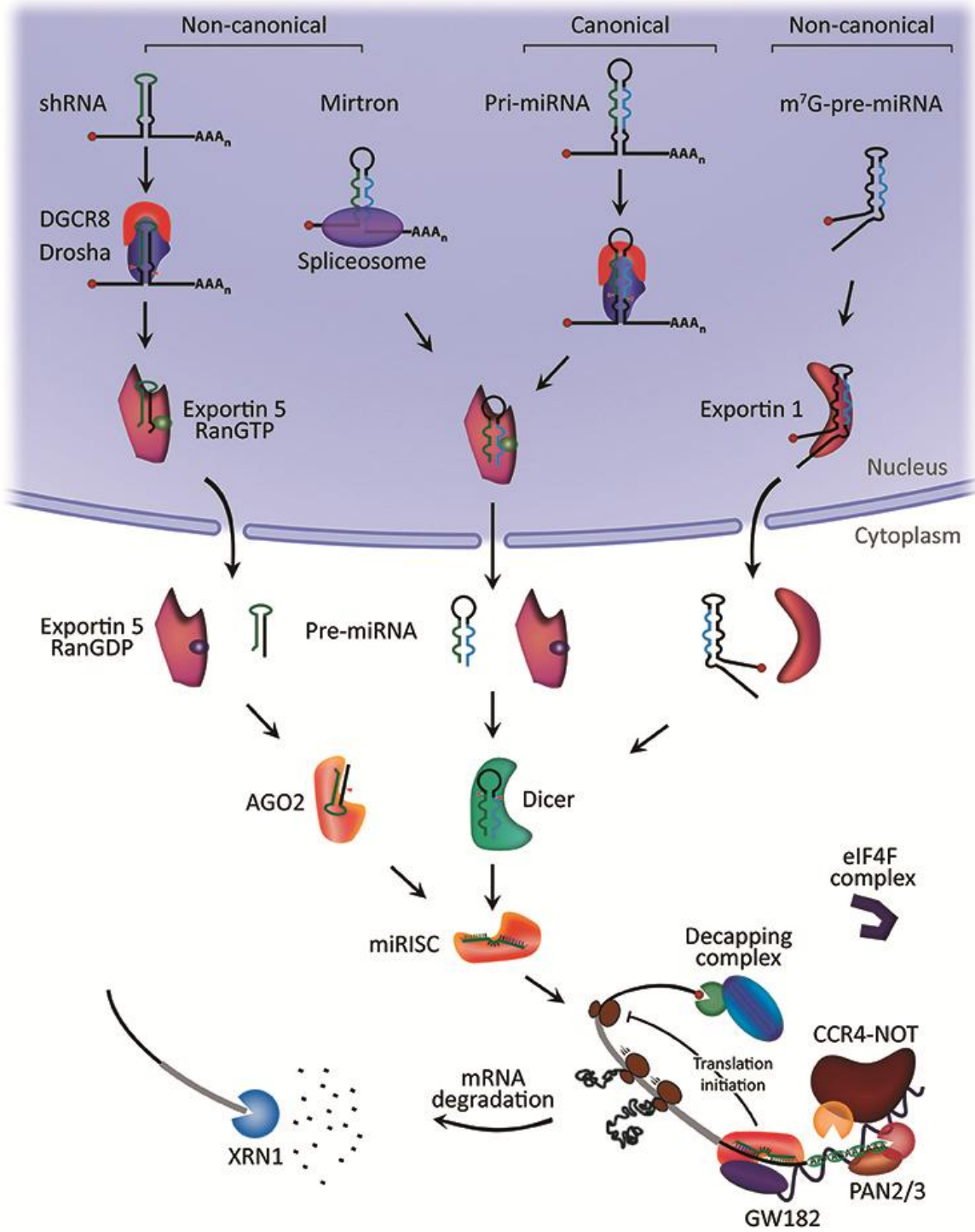
MiRNA olduğu tespit edilen molekülün başına ‘*mir*’ takısı getirilmektedir ve numaralandırılması miRNA’nın tespit edilip yayınlanma sırasına göre yapılmaktadır. Yeni tanımlanmış bir miRNA kendinden önceki sayının devamı olarak numaralandırılır, tanımlanan organizmayı belirtmek için de *mir*’den önce organizmayı ifade eden 3 harfli kısaltma kullanılır. Örn: *homo sapiens*, hsa-mir-121. miR, olgun miRNA’yı tanımlar iken; *mir*, primer miRNA transkriptini tanımlar. Bir miRNA farklı DNA dizilerinden sentezlenebiliyor ise hsa-mir-121-1 ve hsa-mir-121-2 şeklinde isimlendirilir. Olgun dizisi birbirine çok benzeyen miRNA’lar sonlarına sırayla harf eklenerek belirtilir. Örn: hsa-miR-21a, hsa-miR-21b. Prekürsör miRNA’dan sentezlenme yönünü belirtmek için -5p veya -3p eki eklenir. Bu isimlendirme kurallarına uymayan *let-7* ve *lin-4* gibi istisnalar mevcuttur (MiRBase).

### 2.13.4. MikroRNA Sentezi

miRNA genleri genomda yaygın olarak bulunur. Birçok miRNA, sadece miRNA’ya transkribe olabilen kodlamayan intergenik dizilerden sentezlenir (Hammond, 2015). Protein kodlayan genlerin intronik dizileri veya UTR bölgelerinden de sentezlenebilmektedir. İlk olarak RNA polimeraz II tarafından primer miRNA (pri-miRNA) sentezlenir. pri-miRNA, kodlayan RNA’ların özelliklerine benzer şekilde şapka yapısı eklenmesi, poliadenilasyon ve splicing modifikasyonlarına sahiptir (Hammond, 2015). Daha sonra işlenerek prekürsör miRNA (pre-miRNA)’ya ve matür miRNA’ya dönüştürülür (Ha ve Kim, 2014). *Let-7* ailesi gibi bazı miRNA’lar aynı çekirdek dizisine sahip uzun transkriptler şeklinde sentezlenir ve aile olarak isimlendirilir (Tanzer ve Stadler, 2004).

MikroRNA sentezinde 3 farklı yolak tanımlanmıştır (Şekil 2.5) (O’Brien vd., 2018). Kanonik yolak, miRNA sentezinde baskın olan yoldur. RNA Pol II aracılığıyla pri-miRNA sentezlenir. Pri-miRNA, RNA bağlayan protein olan DiGeorge kritik bölgesi 8 (DGCR8) ve ribonükleaz III enzimi Drosha’nın oluşturduğu microprocessor complex ile işlenerek pre-miRNA’ya dönüştürülür (Denli vd., 2004). DGCR8, pri-miRNA içerisindeki N6-

metiladenile GGAC motiflerini tanır, Drosha ise pri-miRNA dubleksini karakteristik saç tokası yapısına ayırarak 3' ucunda 2 nt çıkıntı bulunan pre-miRNA'ya dönüştürür. Sentezlenen pre-miRNA Exportin 5 (XPO5)/RanGTP kompleksi ile sitoplazmaya taşınır, bir RNAaz III endonükleaz olan Dicer aracılığıyla terminal ilmek çıkarılır ve çift zincirli matür miRNA'ya dönüştürülür (Alarcon vd., 2015). MiRNA dizisinin yönü matür miRNA'nın adını belirler. Pre-miRNA'nın 5' ucundaki saç tokasından sentezlenen miRNA 5p zincirini, 3' ucundan sentezlenen de 3p zincirini oluşturur. Bu iplikçikler ATP'ye bağlı halde Argonaute (AGO) protein ailesine yüklenir. Bu iki zincirden hangisinin AGO proteinine yükleneceği miRNA zincirinin 5' ucunun termodinamik stabilitesine veya 5' uçta U pozisyonuna bağlıdır. Daha düşük 5' stabilitesi veya 5'U olan zincir AGO'ya yüklenir ve kılavuz zincir olarak tanımlanır, diğer zincir ise yolcu zincir olarak adlandırılır ve AGO2 tarafından ayrılarak çeşitli hücrel mekanizmalar ile yıkılır. Kanonik olmayan diğer yollar; Drosha / DGCR8'den bağımsız üretilen miRNA'lardır. Splicing sırasında mRNA intronlarından üretilen mirtronlar Drosha / DGCR8'den bağımsız yolda sentezlenmektedir (Ruby, Jan ve Bartel, 2007).



Şekil 2. 5: miRNA biyogenezi ve miRNA aracılı mRNA regülasyonu (O'Brien vd., 2018).

7-metilguanozin (m<sup>7</sup>G) şapkasıyla sentezlenen pre-miRNA'lar, sentezden hemen sonra drosha ile bölünmeye ihtiyaç duymadan exportin-1 ile sitoplazmaya taşınırlar (Xie vd., 2013).

Dicer'dan bağımsız olarak sentezlenen miRNA'lar, endojen kısa saç tokası (short hairpin) RNA (shRNA) transkriptlerinden Drosha tarafından işlenerek sentezlenir. Bu yolakta oluşan pre-miRNA'lar sitoplazmada maturasyonlarını tamamlamalarını sağlayan AGO2 proteinlerine ihtiyaç duymaktadır (Yang vd., 2010).

### **2.13.5. MikroRNA Aracılı Gen Düzenleme**

MiRNA'lar hedef mRNA'nın çoğunlukla 3'UTR bölgelerine, daha az oranda da 5'UTR, promotör bölgelerde ve kodlayan bölgelerde bulunan spesifik dizilere bağlanarak translasyonun baskılanması, mRNA'nın deadenilasyonu ve şapka yapısının uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Huntzinger ve Izaurralde, 2011). miRNA'nın 5'UTR ve kodlayan bölgelere bağlanması gen ekspresyonu üzerinde susturucu etki gösterirken; promotör bölgelere bağlanmasının transkripsiyonu artırdığı bildirilmiştir (Dharap vd., 2013).

Kılavuz zincir, AGO-2 proteini ile birleşerek miRNA ile indüklenmiş susturma kompleksini (miRNA-induced silencing complex, miRISC) oluşturur (Kawamata vd, 2010). miRNA'nın 2-7 nt dizisi çekirdek dizisi olarak adlandırılır ve hedef mRNA'yı tanımada önemlidir. miRISC'in spesifitesini, hedef mRNA'daki miRNA yanıt elemanlarının (MRE, miRNA response elements) ve miRNA'daki çekirdek dizinin eşleşmesi belirler (Yan vd., 2018). MRE eşleşmesinin derecesine bağlı olarak AGO-2 bağımlı mRNA parçalanması veya miRISC aracılı translasyon inhibisyonu ve hedef mRNA yıkımı gerçekleşir (Şekil 2.13.1) (Jo vd., 2015).

Susturucu miRISC kompleksinin oluşumu, GW182 protein ailesinin miRISC ile birleşmesi ile başlar. GW182; miRNA-hedef mRNA etkileşimi sonrasında poli(A)-deadenilaz kompleksi PAN2-PAN3 ve CCR4-NOT proteinlerinin bağlanması için gerekli iskeleti oluşturur (O'Brien vd., 2018). Hedef mRNA'nın poli (A)-deadenilasyonu PAN2/3 tarafından başlatılır ve CCR4-NOT kompleksi tarafından tamamlanır. GW182'nin triptofan (W)-tekrarları ile poli(A)-bağlayıcı protein C (PABPC) arasındaki etkileşim, verimli

deadenilasyonu sağlar (Jonas vd., 2015). Sonrasında decapping protein 2 (DCP2) ve diğer ilişkili proteinler ile şapka yapısı uzaklaştırılır, ardından exoribonuclease 1 (XRN1) aracılığıyla 5'-3' yönde degradasyon sağlanır (Braun vd., 2012).

### **2.13.6. MiRNA'ların Tanı ve Tedavideki Yeri**

MiRNA'lar dokuya özgü tespit edilebildiği gibi idrar, tükürük, plevral sıvı gibi vücut sıvılarından ve periferik kandan izole edilebilmektedir. Hücreler arası iletişim amacıyla hüce dışına salgılanabilmektedir. miRNA'lar mRNA'lardan daha kararlıdır. Plazmada proteinlere, HDL'ye bağlı halde veya ekzozomlar içinde taşınarak RNAaz'ların degradasyonundan korunmaktadır. Formalinle fikse edilmiş parafin dokulardan (FFPE) ve RNA kalitesinin düşük olabileceği örneklerden izole edilebilir (Hammond, 2015). Geliştirilen miRNA imzaları; hastalıkların tanısında, primeri bilinmeyen kanserleri tanımlamada, progresyonu belirlemede, tedaviye yanıt veya ilaç direncini öngörmede kullanılabilir (Hanna, Hossain ve Kocerha, 2019). Hasta kişilerde yapılacak araştırmalar, hayvan modelleri ve hücre kültürü çalışmalarından elde edilen veriler ile hastalığa özgü yüksek duyarlılık ve özgüllükte miRNA panellerinin geliştirilmesi mümkün görünmektedir.

MiRNA'ların hedeflenebilir tedavi olarak kullanımı mümkündür. Upregülasyonu hastalıkla ilişkili miRNA'lar için antisens oligonükleotid inhibitör kullanmak, downregülasyonu hastalık patogenezinin sorumlu miRNA'lar için ise miRNA mimikleri ile yerine koyma tedavisi uygulanabilir. Farklı tür kanserlerin tedavisi için, faz I aşamasında olan miR-34 mimiği MRX34; kutanöz T hücreli lenfoma tedavisi için faz I aşamasında, miR-155 inhibitörü Cobomarsen (MRG-106); idiyopatik pulmoner fibrozis için faz I aşamasında miR-29 mimiği Remlarsen (MRG-2019); hepatit C enfeksiyonu için faz II aşamasında miR-122 inhibitörü Miravirsen (SPC3649), yürütülen miRNA hedefli tedavi çalışmalarıdır (Chakraborty C. vd., 2020).

## **2.14. Çalışmamızda yer alan miRNA'lar**

### **2.14.1. miR-143-3p**

Kromozom 5q32 bölgesinde bulunan miR-143'ün promoter bölgesinde p53 bağlanma bölgeleri bulunur, bu nedenle p53'e bağlı ekspresyon gözlenir. Tümör süpresör etkilidir ve çoğu kanserde downregülasyonu gösterilmiştir (Sanada vd., 2019). İPF'de downregülasyonu tespit edilmiş, hipertrofik skarda CCN2'yi baskıladığı, ECM sentezini azalttığı gösterilmiş, fibrotik patogeneizde rol alan antifibrotik etkili miRNA olduğu saptanmıştır (Mizuno vd., 2017; Mu vd., 2016). Buna rağmen, insan akciğer fibroblastlarının TGF- $\beta$  ile uyarılması sonucunda fibroblast farklılaşmasını aktive ettiği, profibrotik rol oynadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Wei vd., 2019).

### **2.14.2. miR-140-5p**

miR-140-5p, 21 nt uzunluğunda ve 16q22.1'de lokalizedir (Lagos-Quintana vd., 2002; Mizuno vd., 2017). Tümör süpresör etkilidir, downregülasyonu kanser gelişiminde olduğu kadar progresyonunda da rol alır. Over kanserinde PDGFR-A inhibisyonu ile tümör büyümesini, meme kanserinde ve küçük hücre dışı akciğer kanserinde VEGF-A inhibisyonu ile invazyon, migrasyon ve anjiogenezi inhibe etmektedir (Yang vd., 2018). Ekspresyon kaybının radyasyonun indüklediği pulmoner fibrozis için risk oluşturduğu, TGF- $\beta$ /SMAD3 yolağını inhibe ederek pulmoner fibrozisi azalttığı, antifibrotik etkili olduğu saptanmıştır (Wang vd., 2019).

### **2.14.3. miR-32-5p**

miR-32, 21 nt uzunluğundadır (Lagos-Quintana vd., 2001). İPF'de downregülasyonu saptanmıştır (Mizuno vd., 2017). Kardiyak fibroblastlar ile yapılan bir kültür çalışmasında yüksek glikoz düzeyi ile ekspresyonunun arttığı ve kardiyak fibrozise; TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA, kollajen I ve III ekspresyonunu inhibe eden DUSP1'i baskılayarak yol açabileceği gözlenmiştir (Shen vd., 2019). Transplante böbreklerde allogreft disfonksiyonuna yol açan

interstisyel fibroziste yüksek oranda eksprese edildiği tespit edilmiştir (Wang, H. J vd., 2020). Dokular arasında farklı fibrotik özellik sergileyebilmektedir. Farklı kanserlerde tümör supresör veya onkogenik aktivite gösterebilmektedir (Liang vd., 2019; Liu vd., 2019; Wang vd., 2018).

#### **2.14.4. miR-320a**

miR-320a, 8p21.3 kromozom bölgesinde lokalize, 22 nt'lik miRNA'dır (Sepramaniam vd., 2010). Farklı kanser türlerinde disregülasyonu gösterilmiştir. İnvazyon ve metastazı önleyen tümör süpresör etkisi bulunur (Wang, Y. vd., 2020). İnsan akciğer fibroblast kültüründe TGF- $\beta$  yolağında TGFBR2'yi düzenleyerek kollajen tip 1 ekspresyonunu regüle ettiği gösterilmiştir. Sistemik skleroza bağlı İAH bulunan hastaların periferik kanında sağlıklı kontrollere kıyasla azalmış ekspresyonu saptanmıştır (Li vd., 2021).

#### **2.14.5. Let-7d**

Let-7 ailesi genomda farklı lokasyonlardan transkribe edilebilen, ilk tanımlanmış miRNA ailesidir (Lagos-Quintana vd., 2001). Let-7 ekspresyonu gelişim aşamalarında kademeli olarak artar ve çeşitli hücre yolaklarında rol alır (Lee vd., 2016). Tümör süpresör etkili olduğu çeşitli kanserlerde saptanmıştır. Kanser ve fibrotik hastalıklarda EMT'yi baskıladığı gösterilmiştir (Huleihel vd., 2014).

İPF'li hastaların akciğerlerinde let-7d'nin downregülasyonu saptanmıştır. TGF- $\beta$  ve SMAD3, let-7d ekspresyonunu baskılamaktadır (Pandit vd., 2010). Let-7d inhibisyonunun; epitelial gen ekspresyonlarını downregüle ettiği, mezenkimal gen ekspresyonlarını upregüle ettiği ve EMT aktivasyonu ile İPF patogenezine katkı sağlayabileceği gösterilmiştir (Huleihel vd., 2014).

#### **2.14.6. miR-19a ve miR-19b-1**

miR-19a ve miR-19b-1, miR-17/92 ailesinin üyeleridir. 13q31.3 kromozom bölgesinde yer alan MIR17HG (miR-17/92 cluster host gene) (diğer ismi C13orf25) geninden transkribe edilir. miR-17/92 ailesi, hücre döngüsü, proliferasyon, apoptoz ve diğer önemli süreçlerin

regülasyonunu sağlar. Normal gelişim, immün sistem hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve yaşlanmada fonksiyonu gösterilmiştir. Hematolojik ve solid doku kanserlerinde sıkça disregülasyonu tespit edilmiş miR ailesidir, bu nedenle oncomiR-1 olarak da isimlendirilmektedir (Mogilyansky ve Rigoutsos, 2013). Akciğerlerin gelişim sürecinde ve alveolar epitel dengesinin korunmasında önemlidir. Fibrotik süreçten sorumlu bazı genleri ve DNMT-1 gibi epigenetik düzenleyicileri regüle etmektedir; ayrıca DNMT-1 tarafından ekspresyonu baskılanabilir (Dakhlallah vd., 2013).

İPF hastalarının akciğer biyopsi örneklerinin ekspresyon çalışmalarında miR-19a ve miR-19b'nin downregülasyonu saptanmıştır. Pulmoner fibroz hayvan modellerlerinden elde edilen fibroblastlarda yapılan miRNA ekspresyon çalışmalarında, miR-19a ve miR-19b'nin TGF- $\beta$  ekspresyonunu düzenlediği, overekspresyonunun fibroblast aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Akciğer fibroblast hücre çalışmalarında miR-19a ve miR-19b'nin overekspresyonlarının CCN2 ve TSP1 ekspresyonunu baskıladığı bildirilmiş, antifibrotik etki gösterdiği saptanmıştır (Mogilyansky ve Rigoutsos, 2013; Souma vd., 2018).

#### **2.14.7. miR-130a-3p**

Kanser, inflamasyon, fibrotik ve kardiyovasküler hastalıklarda disregülasyonu saptanmıştır (Tian vd., 2019). Hepatik fibrozda ve pulmoner fibrozda downregülasyonu saptanmıştır, makrofajların fibrotik gen ekspresyonlarını düzenlemektedir (Su vd., 2015). İPF'de downregülasyonu sonucunda fibroblast ve EMT aktivasyonu tespit edilmiştir (Miao vd., 2018).

#### **2.14.8. miR-30a-5p, miR-30b-5p, miR-30d-5p ve miR-30e-5p**

miR-30 ailesi; miR-30a, -30b, -30c-1, -30c-2, -30d, -30e olmak üzere 6 üyeden oluşur. 3'UTR bölgesinde birkaç nükleotit farkı gösterirler fakat çekirdek dizisi benzerdir. Farklı 3'UTR dizisi miR-30 üyelerinin farklı yollarda farklı gen ekspresyonlarını düzenlemesine olanak tanır (Yang vd., 2017). Doku ve organ gelişimde ve kanser, kardiyovasküler hastalıklar, fibrozis gibi bazı hastalıkların patogeneğinde rol alırlar. miR-30 ailesi X-box-binding protein

(XBP1), TGF- $\beta$ 1, CCN2 ekspresyonlarını regüle ederek otofaji, apoptoz, oksidatif stres ve inflamasyonu düzenler (Zhang X. vd., 2019).

İPF gelişimi sırasında AEC'lerde miR-30a ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. miR-30a'nın downregülasyonu, AEC apoptozunu artırmakta, ekspresyonunu düzenlediği TET1 geni üzerindeki supresyon ortadan kalkmakta ve epigenetik değişikliklere neden olmaktadır (Miao vd., 2018). İPF patogenezinde etkili olan WNT1 ile indüklenen sinyal yolağı proteini 1 (WISP1)'in ekspresyonunu düzenleyen miRNA'ları araştıran bir çalışmada, miR-30 ailesinin WISP1 ekspresyonunu baskıladığı, İPF'de miR-30 ekspresyonu düşük iken WISP1 ekspresyonunun yüksek olduğu saptanmıştır (Berschneider vd., 2014).

#### **2.14.9. miR-133**

miR-133; 22 nt uzunluğunda, 18q11.2 de lokalize olan MIB1 geninin 12. intronundan miR-1-2 ile birlikte transkribe edilen bir miRNA'dır (Rao vd., 2006). Kas dokusunda yüksek oranda eksprese olmaktadır. Fibroziste rol alan büyüme faktörü CCN2'nin ekspresyonunu düzenler (Mizuno vd., 2017).

#### **2.14.10. miR-21-5p**

miR-21-5p; 22 nt'lik, 17q23.1'de TMEM49 geninin intronik bölgesinde lokalize miRNA'dır (Lagos-Quintana vd., 2001). Kendi promotörü tarafından TMEM49 geninden bağımsız olarak transkribe edilir. Gelişim, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, inflamasyon, kardiyak ve pulmoner fibrozis gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol alır (Kumarswamy, Volkman ve Thum, 2011). Akciğer, tiroid, pankreas ve kanda yüksek olmak üzere pek çok dokuda eksprese olmaktadır. Onkogenik etkili olduğu kanıtlanmış bu nedenle oncomiR olarak sınıflandırılmış, disregülasyonu çeşitli kanser tiplerinde gösterilmiştir (Hill ve Tran, 2021).

Bleomisinle İPF modeli oluşturulmuş farelerde yapılan çalışmada TGF- $\beta$ 'nin miR-21 ekspresyonunu aktive ettiği, miR-21'in de TGF- $\beta$ 'nin profibrotik etkilerini güçlendirdiği gösterilmiştir (Yang ve Schwartz, 2015). Periferik kandan yapılan İPF ve sağlıklı grupların miR-21 ekspresyonu karşılaştırmasında, İPF'li hastaların miR-21 ekspresyonu yüksek

bulunmuş, İPF’de miR-21 ekspresyon ölçümlerinin noninvaziv biobelirteç olarak kullanımının mümkün olabileceğini göstermiştir (Miao vd., 2018).

#### **2.14.11. miR-205-5p**

miR-205; 22 nt uzunluğunda, 1q32.2 kromozom bölgesinde lokalize; gelişim, farklılaşma ve hücrel stres cevabını düzenleyen miRNA’dır. Çeşitli kanserlerde disregülasyonu gösterilmiş, onkogenik etki ile apoptozis, EMT, proliferasyon ve metastazda rol aldığı bildirilmiştir (Yu vd., 2008). Küçük hücre dışı akciğer kanseri ve İPF’de de upregülasyonu hastalık patogenezi ile ilişkili bulunmuştur (Mizuno vd., 2017). Yapılan diğer kanser çalışmalarında VEGF’yi hedefleyerek hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu azalttığı, tümör progresyonunu inhibe ettiği, tümör süpresör etki gösterdiği bildirilmiştir (Oltra vd., 2020).

#### **2.14.12. miR-155-5p**

miR-155, 21q21.3 kromozom bölgesinde yer alan BIC (B-cell Integration Cluster) ekzonundan işlenen 22 nt’lik bir miRNA’dır. Lenfoid organlarda yüksek oranda eksprese edilir. Hematopoietik farklılaşma, immünite, inflamasyon, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol alan çok fonksiyonlu miRNA’dır. Tip 1 anjiotensin II reseptör (Type 1 angiotensin II receptor, AT1R), hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (Hypoxia inducible factor 1, HIF-1), SMAD5, Scr-like-adaptor (SLA) ve Ras homolog gene family member A (RHOA) miR-155’in ekspresyonunu regüle ettiği genlerden bazılarıdır (Faraoni vd., 2009). miR-155 -/- farelerle yapılan bleomisinle indüklenen akciğer fibrozisi çalışmasında, miR-155 -/- farelerde aşırı fibrozis, TGF- $\beta$  sekresyonunda ve kollajen birikiminde artış saptanmıştır. miR-155’in bu etkileri, akciğer fibroblast ve makrofajlarında Liver X reseptör  $\alpha$  (LXR- $\alpha$ ) gen ekspresyonunun deregülasyonu ile yaptığı gösterilmiştir (Kurowska-Stolarska vd., 2017). İPF’li hastaların akciğer dokusu ile kontrol grubu akciğer dokusunda miRNA ekspresyon düzeylerini karşılaştıran bir çalışmada miR-155 ekspresyonunun İPF’de upregüle olduğu tespit edilmiştir (Yang ve Schwartz, 2015). miR-155’in fibrozisteki rolünü aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

#### **2.14.13. miR-26a-5p**

miR-26a; 22 nt uzunluğunda, 3p22.2 kromozom bölgesine lokalizedir (Lagos-Quintana vd., 2001). Antifibrotik etkilidir, pulmoner fibrozis modelli hayvan ve hücre kültürü çalışmalarında miR-26a ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. miR-26a ekspresyonundaki azalmanın; CCN2 düzeylerini, kollajen üretimini ve EMT'yi artırdığı saptanmıştır. Bleomisin ile indüklenmiş fare pulmoner fibrozis modellerinde, intratrakeal miR-26a mimik tedavisinin kollajen birikimini, CCN2 ekspresyonunu ve fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (Liang vd., 2014).

#### **2.14.14. miR-145**

miR-145, 5q32 kromozom bölgesinde lokalizedir. İlk olarak fare kalp dokusundan ardından kolorektal kanser ve diğer dokulardan izole edilmiştir (Ye vd., 2019). Profibrotik etkilidir, sağlıklı akciğer dokusu ile karşılaştırıldığında pulmoner fibrozisli hastaların akciğer dokusunda ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. miR-145'in fibrozisteki rolünü incelemek amacıyla yapılan TGF- $\beta$  ile indüklenen yabancı tip ve miR-145-/- fare akciğer fibroblast çalışmalarında, TGF- $\beta$  ile uyarılan fibrozisin; miR-145-/- farelerde yabancı tip farelere göre daha hafif olduğu,  $\alpha$ -SMA ekspresyonunun düşük düzeyde kaldığı, miR-145'in TGF- $\beta$  aracılı myofibroblast farklılaşmasında önemli rolü olduğu saptanmıştır. miR-145'in kontraktilite üzerine etkisini değerlendiren insan akciğer fibroblast hücre kültürü çalışmalarında, miR-145 mimikleri ile muamele edilen fibroblastlarda kontrole göre kontraktilitede artış gözlenmiştir (Yang S. vd., 2013).

#### **2.14.15. miR-29a-3p, miR-29b-3p ve miR-29c-3p**

miR-29; miR-29a, miR-29b ve miR-29c üyelerinden oluşur, 3'UTR'de birkaç nt fark olması dışında yüksek oranda homoloji gösterirler. miR-29 ailesi, ECM proteinlerinin güçlü bir düzenleyicisidir. Fibrotik hastalıkların patogenezinde antifibrotik etkili olduğu kanıtlanmış, bu nedenle fibromiRNA olarak da adlandırılmıştır. Kalp, renal, hepatik, akciğer fibrozisi ve skleroderma gibi çeşitli fibrotik hastalıklarda ekspresyonunun azaldığı, miR-29 mimiklerinin

bu hastalıkların tedavisinde etkili olduğu deneysel modellerle gösterilmiştir (Montgomery vd., 2014).

TGF- $\beta$ , miR-29 üyelerinin ekspresyonunu baskılayarak hücre dışı matriks sentezini ve fibroblastların proliferasyonunu artırmaktadır. İnsan akciğer fibroblast hücre hattının TGF- $\beta$  ile uyarılması sonucu miR-29a/b/c ekspresyonlarının azaldığı, TGF- $\beta$ 'nın hücre proliferasyonu ve COL1A1 ekspresyonunu upregüle ettiği saptanmıştır. miR-29a/b/c ile transfeksiyon sonrası, TGF- $\beta$ 'nın neden olduğu fibrotik değişikliklerin PI3K-AKT yolağı aracılığıyla düzeldiği gösterilmiştir (Yang T. vd, 2013).

İnsan fetal akciğer fibroblastlarında miR-29'un hedef genleri araştırılmış, fibrotik süreçten sorumlu TGF- $\beta$ , laminin ve integrin genlerinin ekspresyonlarını regüle ettiği saptanmıştır (Yang ve Schwartz, 2015).

Mir-29c'nin alveolar epitelyal hücre yenilenmesi ve apoptozisi üzerinde etkili olduğu, İPF'li hastaların akciğer dokularında mir-29c düzeylerinin sağlıklı kişilerden daha düşük düzeyde eksprese edildiği bildirilmiştir. TGF- $\beta$ , SMAD3 yolağı üzerinden miR-29c ekspresyonunu baskılamaktadır. Bleomisin ile akciğer fibrozisi oluşturulan hayvan modellerinde mir-29c düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük düzeyde eksprese edildiği ve deneysel olarak oluşturulan yüksek mir-29c ekspresyonlu fare modellerine bleomisin verildiğinde oluşan akciğer fibrozunun kontrol grubundan daha hafif olduğu, mir-29c'nin fibrozise karşı koruyucu olduğu saptanmıştır (Xie vd., 2017).

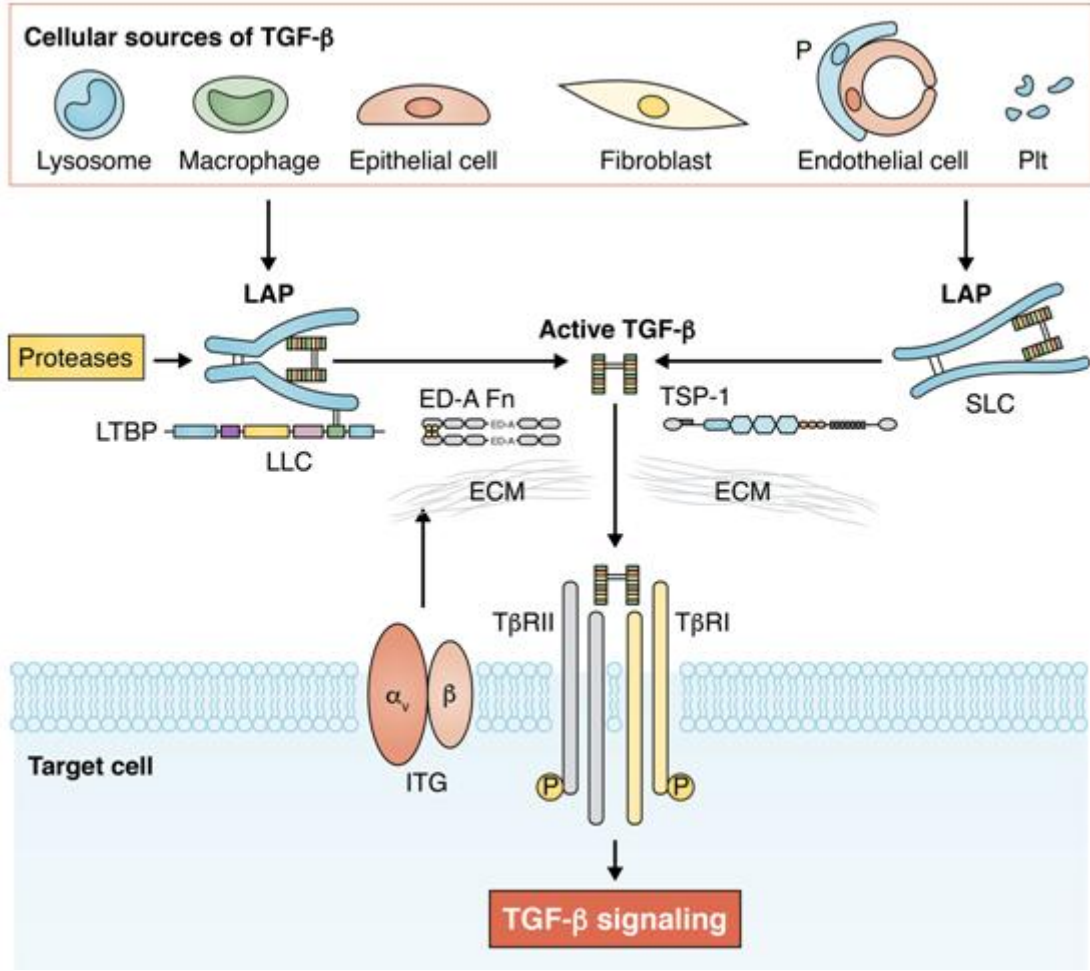
## **2.15. TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  (TGF-Beta; TGFB; TGFB1); hücre proliferasyonu, apoptoz, farklılaşma, otofaji, immün yanıt ve yara iyileşmesi gibi biyolojik yanıtları düzenlemesinin yanı sıra fibrotik hastalıkların patogenezinde yer alan en önemli sitokindir (Meng vd., 2016). Embriyonik dönemde organogenez ve gelişim için olduğu kadar postnatal dönemde hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, motilite ve adezyonu için esansiyeldir (Saito vd., 2018).

### 2.15.1. TGF- $\beta$ sentezi

TGF- $\beta$ 'nın yaklaşık %80 aminoasit benzerliği gösteren 3 izoformu bulunur: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3. Makrofajlar, lenfositler, epitel hücreleri, fibroblastlar, perisitler, endotel hücreleri ve trombositler gibi birçok farklı hücre tipi, hasar veya inflamasyon durumunda TGF- $\beta$  izoformları üretebilmektedir (Frangogiannis, 2020). Yaralanma tipine ve etkilenen organa bağlı olarak sentez kaynağı değişebilmektedir. Pulmoner fibrozdaki başlıca hücrelerel TGF- $\beta$  kaynaklarının alveolar makrofajlar ve metaplastik tip II alveolar epitel hücreleri olduğu gösterilmiştir (Coker vd., 2001). TGF- $\beta$  yaralanma nedeninden bağımsız olarak artar ve bu artış de novo sentez ve salgılanmanın yanında ECM'de proteoglikan, kollajen veya fibronektine bağlı halde bulunan latent TGF- $\beta$ 'nin aktive edilmesinden kaynaklanır (Frangogiannis, 2020). Oksidatif stres, Toll benzeri reseptör sinyalleri ve proinflamatuvar sitokinler (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 vb.) TGF- $\beta$  ekspresyonunu uyarabilir (Frangogiannis, 2020).

TGF- $\beta$  geni 19q13.2 kromozom bölgesinde yer alır, 7 ekzonludur. 25 kda'luk matür TGF- $\beta$  sentez aşamalarında öncelikle; sinyal peptidi (SP), gecikme ile ilişkili peptid (latency associated peptide, LAP) ve matür peptit (mTGF- $\beta$ ) parçaları bulunan pre-pro-TGF- $\beta$  sentezlenir (Gauthy vd., 2013). SP'in ayrılmasıyla pro-TGF- $\beta$ 'ya dönüşür (Castro-Sánchez ve Martín-Villa, 2013). LAP ile nonkovalent bağlı TGF- $\beta$  ve LTBP (latent TGF- $\beta$  bağlayan protein) büyük latent kompleksini oluşturur (LLC). İnaktif halde ekstraselüler alanda depolanan latent TGF- $\beta$ 'yı TSP-1 (trombospondin-1), integrin  $\alpha\beta$ 6, reaktif oksijen türleri (ROS) ve düşük pH aktive edebilir (Annes vd., 2003). Aktivasyon sonrası LAP'dan ayrılarak homodimer halinde serin/treonin kinaz reptörü olan TGF $\beta$ R1 ve 2 reseptörlerine bağlanır, SMAD2 ve SMAD3 fosforile edilir, ardından fosforile olarak nükleusa geçen SMAD4 çeşitli transkripsiyon faktörlerini etkileyerek gen ekspresyonunu düzenler (Şekil 2.6) (Saito vd., 2018; Frangogiannis, 2020). TGF- $\beta$  ayrıca hücreye özgü ERK (extracellular signal-regulated kinase), MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) ve JNK (c-Jun-N-terminal kinase) sinyal kaskadlarının aktivasyonunu sağlayabilir. MAPK aracılı yolda Smad'dan bağımsız TGF- $\beta$  yanıtları düzenlenebilir. TGF- $\beta$  ile indüklenen ERK aktivasyonu, Smad sinyallemesini güçlendirebilir. TGF- $\beta$ 'nin PI3/Akt, Rho GTPaz yollarını aktive ettiği ve Wnt, Notch sinyal yollarını etkilediği gösterilmiştir (Pardali vd., 2017).



Şekil 2. 6: TGF- $\beta$  sentez süreci ve reseptör ilişkisi (Frangogiannis, 2020).

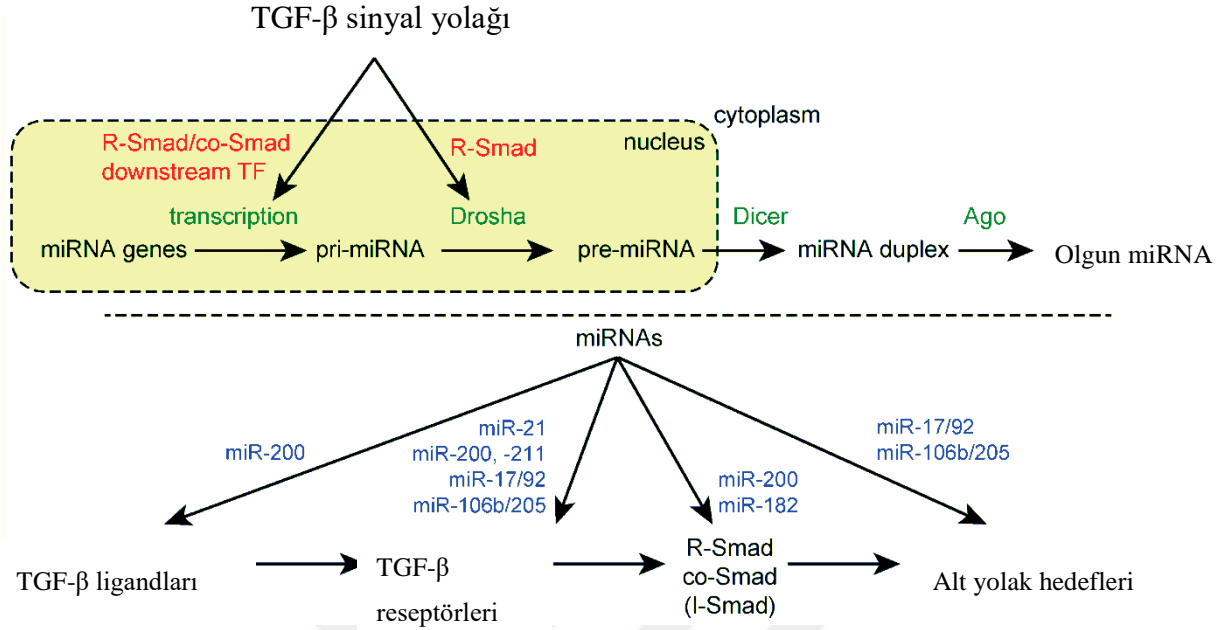
### 2.15.2. TGF- $\beta$ 'nın fibrotik süreçlerde rolü

TGF- $\beta$ 'nın pulmoner, hepatik, renal ve kardiyak fibrozis patogenezinde etkinliği doku ekspresyon çalışmaları, hayvan deneyleri ve hücre kültürü çalışmaları ile tespit edilmiştir (Bowen vd., 2013). TGF- $\beta$ , doku hasarı bölgesine fibroblast göçünü uyarır, fibroblastların myofibroblastlara farklılaşmasına aracılık eder, myofibroblastlar tarafından ECM üretimini indükler ve matris metaloproteinazlar tarafından ECM degradasyonunu inhibe eder ve PDGF, ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA) ile MCP-1 bu fonksiyonlarını regüle eder (Chanda vd., 2019). TGF- $\beta$  ayrıca alveol epitel hücreleri üzerinde proapoptotik etkilidir (Özlü vd., 2010).

TGF- $\beta$  fibrotik etkilerinden en önemlisini fibroblastların myofibroblastlara dönüşümünü uyararak sağlar. Myofibroblastlar fibroblastlara kıyasla daha fazla  $\alpha$ -SMA, kollajen, sitokin ve büyüme faktörleri sentezleyebilir (Klingberg vd., 2013). Endotelial mezenkimal transizyon (EndMT) ile endotelial hücrelerin, kemik iliği kökenli CD34+ ve CD45+ progenitör hücrelerin, perisit ve makrofajların fibrotik dokuya göç ederek myofibroblastlara farklılaştıkları bildirilmiştir (Pardali vd., 2017).

Yara iyileşmesi, gelişim gibi fizyolojik süreçler ve fibrozis, kanser gibi patolojik süreçlerde gözlenen EMT ve EndMT için TGF- $\beta$  temel sitokinlerden biridir. Bu süreçte gerekli SNAIL1, SNAIL2, ZEB1, ZEB2, FOXC2, FOXA1, FOXA2 ve HMGA2 vb. transkripsiyon faktörlerini regüle eder (Lamouille vd., 2014).

TGF- $\beta$ , doku hasarı sonrası yara iyileşmesi döneminde ECM bileşenleri ve EMT aktivasyonu için gerekli transkripsiyon faktörlerinin gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu fonksiyonlarını, profibrotik veya antifibrotik miRNA'ları regüle ederek yerine getirebilir. miRNA'lar da TGF- $\beta$ , reseptörleri veya aşağı yolak moleküllerinin ekspresyonlarını düzenleyerek fibrotik süreci etkiler (Şekil 2.7) (Suzuki, 2018). miR-21, miR-181, miR-155 ve miR-10b gibi profibrotik miRNA'lar TGF- $\beta$  ekspresyonunu düzenleyen miR'lerden bazılarıdır (Suzuki, 2018). TGF- $\beta$  tarafından indüklenen ZEB1 ve ZEB2 transkripsiyon faktörleri, miRNA-200 ailesini ve miR-205'i baskılar, bu miRNA'lar da ZEB1 ve ZEB2'yi ekspresyonunu baskılar. TGF- $\beta$  ekspresyonunun artışı miR-200 ailesi ve miR-205'i downregüle ederek EMT'yi teşvik eder (Gregory vd., 2011).



Şekil 2. 7: TGF- $\beta$  fonksiyonlarını çeşitli aşamalarda düzenleyen miRNA'lar ve TGF- $\beta$ 'nın miRNA ekspresyonu üzerine etkisi (Suzuki, 2018).

TGF- $\beta$ , direkt kollajen gen ekspresyonunu upregüle ederek veya indirekt etki ile kollajen sentezi üzerine baskılayıcı etkileri olan miRNA ekspresyonunu downregüle ederek kollajen birikimini düzenler. ECM'de kollajen birikimi için gerekli olan ısı şok proteini-47 (HSP47) ve lizil oksidaz benzeri-2 (LOXL2) genlerinin ekspresyonunu baskılayan miR-29'un ekspresyonunu baskılayarak kollajen üretimini artırabilir. Benzer şekilde kollajen üretimini baskılayan miR-96 ve miR-130b TGF- $\beta$  tarafından downregüle edilirler (Kim vd., 2018).

## 2.16. CCN2

CTGF (Connective Tissue Growth Factor) olarak da bilinen CCN2 geni 6q23.2 kromozom bandında yer alır, 5 ekzondan oluşur ve 349 aa'dan oluşan sisteinden zengin bir protein kodlar (Bradham vd., 1991). CCN ailesinin bir üyesidir ve adlandırmaları ilk keşfedilen üç üyenin baş harflerinden oluşur: Cyr61 (cysteine-rich protein 61), CTGF (Connective tissue growth factor) ve NOV (Nephroblastoma overexpressed gene) (Holbourn, Acharya ve Perbal, 2008). Lenf düğümleri, akciğer, karaciğer, gastrointestinal sistem, endometriyum ve ciltte daha yüksek seviyelerde olmak üzere birçok dokuda CCN2 ekspresyonu bulunmaktadır (Krupska

vd., 2015). CCN2 gen ekspresyonu transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel aşamada bazı moleküllerle düzenlenir. Büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar, TGF- $\beta$ , BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2), anjiyotensin II, glukokortikoidler, MCP-1, Ets1 (ETS protoonkogen 1), IFN- $\gamma$  ve HIF1 $\alpha$  transkripsiyonel evrede CCN2 gen ekspresyonunu artırır. GAPDH (gliseraldehid-3-dehidrogenaz), NPM (nucleophosmin) ve miRNA'lar posttranskripsiyonel aşamada CCN2 gen ekspresyonunu düzenler (Kubota ve Takigawa, 2015).

CCN2 geni, embriyonik ve postnatal gelişim süreçlerinde hücre adezyonu, proliferasyon, sağkalım, migrasyon ve ECM üretimi gibi biyolojik fonksiyonlarda görev alır. Ayrıca yara iyileşmesi, inflamatuvar durumlar, karsinogenez süreci ve en önemlisi fibrozis ile seyreden hastalıkların patogenezinde rol aldığı bilinmektedir (Hall-Glenn ve Lyons, 2011).

### **2.16.1. CCN2'nin Moleküler Yapısı ve Fibrozis Gelişiminde Rolü**

Pulmoner fibrozis etiyojisi net olarak anlaşılmassa da, profibrotik ve antifibrotik moleküller arasındaki dengesizliğin fibrozis lehine olması temel faktörlerden biridir. Kronik inflamasyon veya doku hasarı sonrası üretimi artan CCN2'nin çeşitli fibrotik organ tutulumlarında etkinliği kanıtlanmıştır. Artmış kollajen üretimi, ECM birikimi, myofibroblast farklılaşması ve proliferasyon gibi fibrotik patogenezin sorumludur. İPF'li hastaların fibroblast kültürlerinde, BAL hücrelerinde, plazma ve akciğer dokusunda CCN2 ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir (Ramazani vd., 2018).

CCN2 gen promotor bölgesinde tespit edilen bir polimorfik varyantın (rs6918698), birçok organda fibrozis ile seyreden bir hastalık olan sistemik skleroz hastalarında daha yaygın bulunması, bu genin fibrotik hastalıkların patogenezinde önemli rolü olduğunu göstermiştir (Fonseca vd., 2007)

CCN2 proteini 4 domainden oluşmaktadır; IGFBP (insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein), VWC (von Willebrand faktör tip C tekrarı), TSP1 veya TSR (trombospondin tip-1 tekrarı) ve CT (Sistein düğümü içeren alan). CCN2 ile etkileşime giren pek çok molekül bildirilmiştir. Bu moleküllerden en önemlileri: Sitokinler, IGF1, BMP4, BMP7, TGF- $\beta$  ve VEGF gibi büyüme faktörleri; TrkA, LRP1, LRP6 ve bazı integrinler; fibronektin, heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG) gibi matris proteinleridir ve CCN2'nin

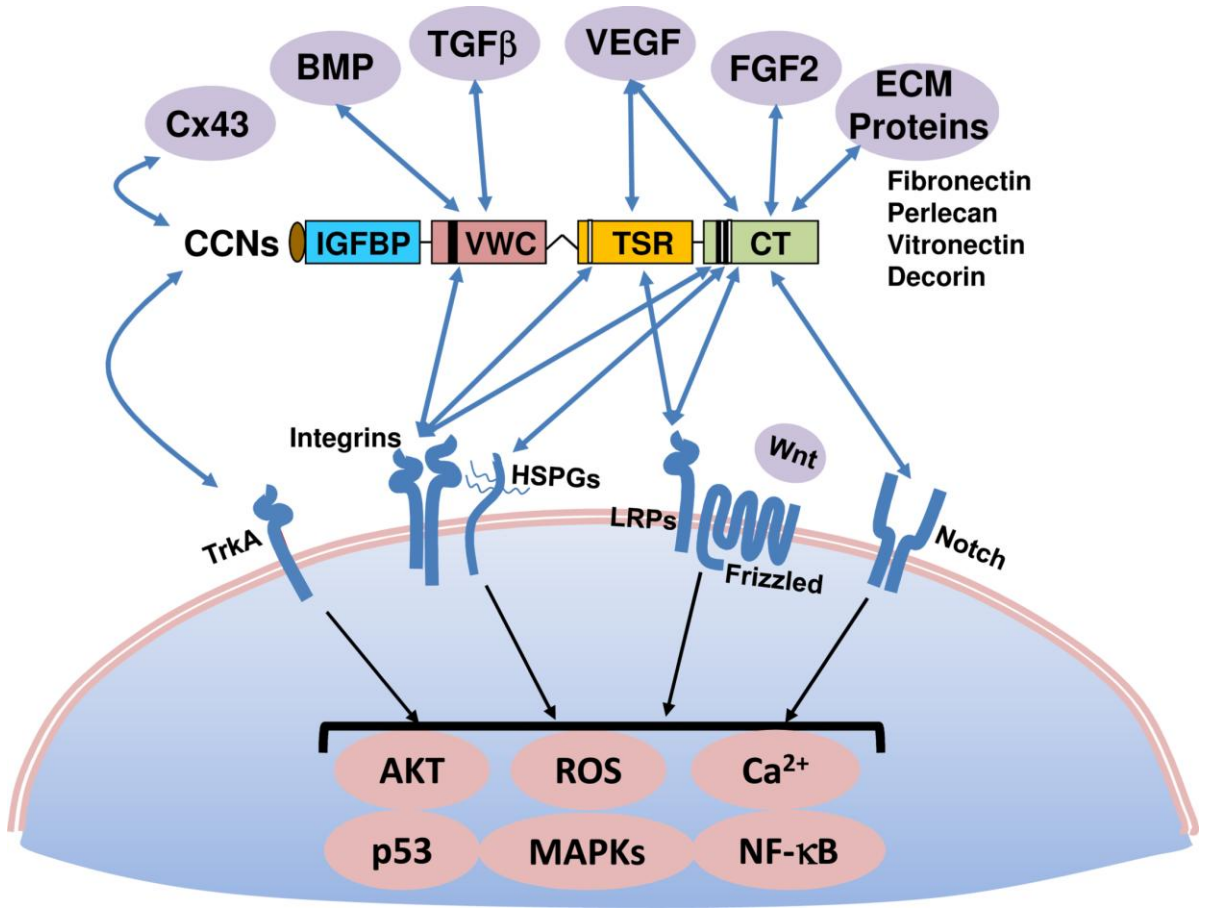
farklı domainlerine bağlanarak etki oluşturlar (Şekil 2.8) (Jun ve Lau, 2011; Lipson vd., 2012).

IGFBP domainine insülin benzeri büyüme faktörleri bağlanarak matriks birikimine ve kollajen üretimine katkı sağlar (Lam vd., 2003)

TGF- $\beta$  profibrotik etkinliği kanıtlanmış bir sitokindir. CCN2 tek başına fibrotik etki gösterebilse de TGF-B ile birlikte daha güçlü fibrotik yanıt oluşturabilir. TGF- $\beta$ , CCN2 'nin VWC domaini ile bağlanarak profibrotik fonksiyonlarını, özellikle fibroblastların proliferasyonunu ve fibroblastların ECM proteinleri salgılamasını güçlendirebilir. TGF- $\beta$ , pozitif geribildirim ile CCN2'nin ekspresyonunu indükler (Chen vd., 2020). CCN2 knockdown fare fibroblast modellerinde TGF- $\beta$ 'nın indüklediği matriks adezyonu, tip I kollajen ve  $\alpha$ -SMA ekspresyonu için CCN2'nin gerekli olduğu saptanmıştır (Shi-wen vd., 2006)

TSP1 domaininin integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 ile etkileşimi sonucunda kollajen birikimi artar (Heng, 2006).

CCN2, CT domaini ile fibronektine bağlanarak hücre adezyonunu ve göçünü destekler. İntegrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, CT domaininin fibronektin ile etkileşerek ECM biriktirmesine katkıda bulunur (Chen vd., 2020). LRP6 da CT domainine bağlanarak, myofibroblast farklılaşmasını ve matriks birikimini artırır (Ren vd., 2013).



Şekil 2. 8: CCN domainleri ve ilişkili oldukları moleküler yolaklar (Jun ve Lau, 2011).

SARS-CoV-2'nin neden olduğu COVID-19 pandemisi; 2019 yılında başlayan, 85 milyondan fazla kişinin enfekte olduğu, 2 milyona yakın kişinin hayatını kaybettiği küresel bir salgındır. Akut akciğer hasarı ve pulmoner fibrozis gelişme oranının yüksek olması üzerine, virüsün ACE2 reseptörüne bağlandıktan sonra etkilenen gen ekspresyonlarını değerlendiren hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. (SARS)-CoV-2 enfeksiyonunun fibrozisin temel faktörlerinden TGF-β, CCN2 ve fibronectin ekspresyonlarını artırdığı saptanmıştır. Hastalık sonrası ortaya çıkan fibrotik akciğer hastalıklarının altında yatan moleküler mekanizma bu profibrotik etkili moleküller olabilir (Xu vd., 2020). İlerleyen dönemlerde toplanan veriler bu bağlantıyı daha net açıklayacaktır.

MiRNA'lar CCN2 ekspresyonunu posttranskripsiyonel aşamada düzenlemektedir. miR-133 ve miR-30, CCN2 geni 3'UTR'si ile direkt bağlanarak gen ekspresyonunu ve buna bağlı kollajen birikimini azaltır (Duisters, 2009). miR-133a ayrıca TGF- $\beta$  aracılığıyla da CCN2 ekspresyonunu azaltabilmektedir (Wei vd., 2019).

MiRNA-19a, miRNA-19b ve miRNA-26b; CCN2 geni 3'UTR'ye direk bağlanarak veya ET-1 (Endotelin-1) ve trombinin aracılık ettiği CCN2 ekspresyonunu azaltarak antifibrotik etki gösterirler (Chen vd., 2016)

miRNA-15a/b, miRNA-18a, miRNA-18b, miRNA-26a, miRNA-29, miRNA-145, miRNA-205, miRNA-214, miRNA-375 CCN2 ekspresyonunu etkilediği bilinen diğer mikroRNA'lardır (Ramazani vd., 2018).

CCN2'nin fibrozis oluşumunda temel faktörlerden biri olması nedeniyle tedavi hedefi olarak belirlenmiş ve geliştirilmekte olan bazı ilaç çalışmaları bulunmaktadır. CCN2'ye karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikor olan Pamrevlumab (FG 3019) faz II çalışmalarında İPF'li hastalarda, plasebo grubuna kıyasla FVC'deki düşüşün daha az olduğu, progresyon gösteren hasta oranının anlamlı ölçüde daha düşük olduğu, HRCT ile tespit edilen retiküler fibrozun belli oranda düzeldiği saptanmış ve faz III çalışmalarına geçilmiştir (Sgalla vd, 2020). Ayrıca miRNA'ların işlevlerine benzer şekilde posttranskripsiyonel gen ekspresyonu düzenleme fonksiyonları olan siRNA (Susturucu RNA, Small interfering RNA) ile CCN2'nin ekspresyonunu azaltmayı hedefleyen prelinik aşamadaki OLX201 çalışması mevcuttur (Nikam ve Gore, 2018).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Araştırmanın Tipi**

Araştırmanın tipi prospektif vaka-kontrol klinik çalışmadır.

#### **3.2. Araştırma Bölgesi ve Zamanı**

Hasta grubu 2019-2020 yıllarında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi (NEÜMTF) Göğüs Hastalıkları kliniğine başvuran, İPF tanısı konmuş hastalardan; kontrol grubu ise aynı dönemde Göğüs Hastalıkları kliniğine başvuran sağlıklı kişilerden oluşmaktadır.

#### **3.3. Araştırma Evreni ve Yeri**

Bu araştırmada NEÜMTF Göğüs Hastalıkları kliniğine başvuran; Radyoloji, Romatoloji, Patoloji ve Göğüs Cerrahisi Ana Bilim Dallarının katılımıyla, Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalı multidisipliner interstisyel akciğer hastalıkları konseyinde değerlendirilmiş ve İPF tanısı almış hastalar araştırma evrenini oluşturmaktadır. Araştırmada yer alan uygulamalar NEÜMTF Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi Moleküler laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### **3.4. Örneklem Seçme Kriterleri**

Hasta grubunda;

- Klinik bulgular, radyolojik görüntülemeler ve/veya patolojik inceleme sonrası İPF tanısı almış olmak,
- Kanser gibi bulguları etkileyebilecek ek hastalık tanısı almamış olmak,
- Araştırmaya katılmaya gönüllü olmak.

Kontrol grubunda;

- Kanser, otoimmün hastalık, fibrotik hastalık ve herhangi bir akciğer hastalığı tanısı almamış olmak,
- Sigara kullanmamak,
- Hasta grubuna benzer yaş ve cinsiyette olmak.
- Araştırmaya katılmaya gönüllü olmak.

### **3.5. Çalışma Gruplarının Randomizasyonu**

Örneklem seçme kriterlerine uygun belirlenen 20 İPF hastasından (Tablo 3.1) ve 20 sağlıklı gönüllüden (Tablo 3.2) elde edilen periferik kan örnekleri araştırma kapsamına alınmıştır. Hastalar Radyoloji, Romatoloji, Patoloji ve Göğüs Cerrahisi Ana Bilim Dallarının katılımıyla, Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalı multidisipliner interstisyel akciğer hastalıkları konseyinde klinik bulgular, radyolojik görüntüleme ve/veya patolojik inceleme ile değerlendirilmiş ve İPF dışı interstisyel akciğer hastalığı tanısı alan olgular çalışmaya dahil edilmemiştir. Proje aşamasında 40 İPF hastasının çalışmaya dahil edilmesi planlanmış, fakat hasta örneklerinin toplanmaya başlandığı dönemde COVID19 pandemisi başladığı için poliklinikler COVID19 için yapılandırılmıştır. Tanı amaçlı uygulanan testler yapılamamış, İPF tanı konseyi toplanamamış dolayısıyla planlanan hasta sayısına ulaşamamıştır. Pandeminin ne kadar süreceği öngörülemediği için mevcut hasta grubu ile çalışmaya devam edilmiştir. Araştırmaya ilk katılan kişiler ile uygulama aşamaları başlatılmış ve dahil olan kişiler ile devam ettirilmiştir.

Tablo 3. 1: Hasta grubu özellikleri

Hasta Grubu	Yaş	Cinsiyet	Antifibrotik tedavi	Tedavi başlama
H-1	58	E	Pirfenidone	17.04.2019
H-2	65	E	Pirfenidone	12.06.2018
H-3	72	E	Nintedanib	12.06.2018
H-4	66	K	Nintedanib	06.01.2020
H-5	69	K	Pirfenidone	05.06.2018
H-6	77	E	Pirfenidone	01.12.2017
H-7	85	K	Nintedanib	23.11.2017
H-8	72	E	Nintedanib	22.03.2017
H-9	69	E	Pirfenidone	29.06.2018
H-10	83	E	Nintedanib	03.10.2018
H-11	66	E	Pirfenidone	04.01.2019
H-12	62	E	Pirfenidone	07.12.2018
H-13	66	K	Pirfenidone	11.02.2019
H-14	59	E	Pirfenidone	16.12.2019
H-15	74	E	Pirfenidone	25.10.2017
H-16	60	E	Pirfenidone	30.10.2019
H-17	77	E	Pirfenidone	09.07.2019
H-18	70	E	Pirfenidone	23.12.2019
H-19	75	E	Pirfenidone	09.07.2018
H-20	78	E	Pirfenidone	12.08.2018

Tablo 3. 2: Kontrol grubu özellikleri

<b>Kontrol Grubu</b>	<b>Doğum Yılı</b>	<b>Cinsiyet</b>
K-1	65	E
K-2	63	K
K-3	67	E
K-4	74	E
K-5	70	E
K-6	67	E
K-7	68	K
K-8	62	E
K-9	63	E
K-10	67	E
K-11	70	E
K-12	60	E
K-13	62	E
K-14	83	E
K-15	64	K
K-16	72	E
K-17	90	E
K-18	70	E
K-19	83	K
K-20	60	E

### **3.6. Araştırma Öncesi Bilgilendirme**

Hasta ve kontrol gruplarına araştırma ile ilgili genel bilgiler verilmiş, araştırmaya dahil edilme koşulları belirtilmiştir. Araştırma şartlarına uygun kişilere 3-4 ml periferik kan örneği alınacağı, bu örneklere miRNA ve gen ekspresyon araştırmalarının tez çalışması için yapılacağı anlatılmıştır. Çalışmaya katılımın gönüllülük esasıyla sağlandığı ve istedikleri aşamada çalışmadan ayrılabilirler bildirilmiştir. Bilgilendirme sonrası uygun kriterleri sağlayan ve çalışmaya katılmaya istekli olan kişilere bilgilendirilmiş gönüllü onam formu okutulup, onayladıklarına dair imzaları alınmıştır.

### **3.7. Araştırmanın İzni ve Etik Durum**

Araştırma öncesinde NEÜMTF etik kurul komisyonuna araştırma bilgilerini içeren ayrıntılı protokol belgeleri sunulmuş, 20.09.2019 tarihli 2019/2071 karar sayılı etik kurul onayı alınmıştır.

### **3.8. Ekspresyon Analizlerinde Kullanılan Yöntemler**

#### **3.8.1. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR, RT-qPCR)**

PCR, replikasyon temellerini taklit ederek DNA bölgelerinin primerler aracılığıyla sentezlenmesi tekniğidir. PCR tekniği çift zincirli DNA'nın denatürasyonu, bölgeye spesifik primerlerin bağlanması 'annealing' ve zincir uzaması aşamalarında oluşur. Tekrarlanan bu aşamalar boyunca DNA dizileri logaritmik olarak çoğaltılır. RNA dizilerinin cDNA'ya çevrilerek eş zamanlı miktarını ölçmeye yarayan kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemleri, RNA moleküllerinin ekspresyonunu belirlemeye imkan sağlamaktadır. Primer tasarımına bağlı olarak farklı çalışma şekilleri bulunmaktadır (Chen vd., 2011). Hızlı, duyarlı ve kolay uygulanabilir olması sebebiyle ekspresyon analizlerinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Floresans sinyal ile amplifiye olan PCR ürünlerinin eşik değeri (Threshold cycle, Ct) belirlenir. Normalize edilmiş bir değere göre rölatif kantitasyon hesaplanır.

### 3.8.2. Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme (Next-generation sequencing, NGS) tekniklerinin geliştirilmesi ile aynı anda birden fazla RNA molekülü kısa sürede, yüksek hassasiyetle, spesifik olarak analiz edilebilmektedir. Kısa RNA moleküllerinin izolasyonu, 3' ve 5' uçlara RT primer görevi gören adaptör dizi eklenmesi, cDNA sentezi ile kütüphane oluşturulması, NGS cihazında amplifikasyon ve okuma aşamalarından oluşmaktadır. Dizi bilgisi gerektirmeden her tür küçük RNA okunmakta, referans genomla karşılaştırılmaktadır. Tekniğin bu özelliği yeni RNA'ların keşfine olanak tanımaktadır. NGS ile derin sekanslama yapılabilmekte, RNA dizilerindeki SNP'ler belirlenebilmektedir. Sekans bilgilerinin yanı sıra miktar ölçümü yapabilmekte, ekspresyon analizlerinde kullanılmaktadır (Zhang N. vd., 2019).

### 3.8.3. Mikroarray Analizleri

Mikroarray tekniği hibridizasyon temeline dayanmaktadır. Kullanılan probun türüne bağlı olarak DNA, RNA veya proteinlerin ekspresyon düzeyleri, mutasyon analizi ve kromozom analizlerinin yapılabilmektedir. Propların bağlı olduğu mikroçip yüzey, görüntüleme tekniği ve uygun analiz programları gerekmektedir. RNA ekspresyon analizleri için cDNA sentezi yapılmakta, floresans işaretleme sonrası normal olduğu bilinen örnek ile hibridizasyonu sağlanmaktadır. Mikroarray analizi sonra bulgular qPCR ile valide edilmelidir (Thomson vd., 2007).

Biz çalışmamızda; hızlı ve spesifik sonuçlar sağlması, aynı anda birden fazla gen veya miRNA'nın analizine imkan vermesi, pratik ve kolay uygulanabilen çalışma basamakları gerektirmesi, maliyet etkin ve en önemlisi rutin klinik laboratuvarlarda yaygın kullanılan bir yöntem olması nedeniyle RT-qPCR analizi ile ekspresyon analizini tercih ettik.

## 3.9. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

### Kullanılan Cihazlar:

- PCR cihazı (Roche, [LightCycler®96](#))

- Termal döngü cihazı (Bio-Rad<sup>®</sup>)
- Santrifüj cihazı (Hettich)
- Mikrosantrifüj (Biosan)
- 4°C buzdolabı (Beko)
- -20°C soğutucu (Regal<sup>®</sup>)
- -80°C soğutucu (New Brunswick U570)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific Nano-Drop 2000)
- Otomatik mikropipetler
- Vorteks karıştırıcı
- Kuru ısı bloğu

#### **Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler:**

- RNA izolasyon kiti (Tablo 3.3)
- cDNA sentez kiti (miRNA OneScript<sup>®</sup>, abm<sup>®</sup>)(Tablo 3.4)
- miRNA primerleri (abm<sup>®</sup>)
- U6 referans primeri (abm<sup>®</sup>)
- 96-100% Etanol
- Steril, filtreli pipet uçları
- Spin Kolonlar
- Toplama Tüpleri
- Eppendorf tüpleri
- 96 kuyucuklu PCR plate (Roche, [LightCycler<sup>®</sup>96](#))
- miRNA qPCR mastermix (abm<sup>®</sup>)
- Polly (A) kiti (abm<sup>®</sup>)
- ddH<sub>2</sub>O, nükleaz içermeyen saf, steril su
- 15 ml'lik falkon tüpleri
- RBC lizis tamponu
- mRNA primerleri
- GAPDH referans gen primeri
- mRNA qPCR mastermix

- miRNAExtractor (Bio Basic<sup>®</sup>)
- Kloroform
- RPE Solüsyonu (Bio Basic<sup>®</sup>)
- cDNA izolasyon kiti
- mRNA qPCR master miks

Tablo 3. 3: mikroRNA çalışması için RNA izolasyon kiti içeriği

<b>Kit İçeriği</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>
Yıkama tamponu	500 µl
Proteinaz K	20 µl
DNase I	10 µl
Bağlama tamponu	350 µl
DNase I çalışma tamponu	20 µl
Lizis tamponu	350 µl
Elüsyon tamponu	40 µl

Tablo 3. 4: cDNA sentez kiti içeriği

<b>Kit içeriği</b>	<b>Miktar</b>
Reverse transkriptaz enzimi OneScript, 200 U/µl	25 µl
Rnase off ribonuclease inhibitör 40 U/ µl	15 µl
dNTPs 10mM	40 µl
5X RT tamponu	150 µl
miRNA Oligo (dT) adaptör 10 µM	60 µl
RNA enzimleri içermeyen su	1 ml

### 3.10. MikroRNA ve Gen Ekspresyon Çalışmaları

MiRNA ve gen ekspresyon çalışmaları için farklı 2 EDTA'lı tüpe toplamda 4 ml periferik kan örnekleri alındı. Örnekler bekletilmeden aynı gün içinde çalışıldı. Kontaminasyonu engellemek için kabin ve steril gereçler kullanıldı. Mümkün olduğunca numune dondurma-çözdürme tekrarlarından kaçınıldı. Çalışma basamaklarında kullanılan kitler üretici firmanın protokolü doğrultusunda hazırlandı.

#### 3.10.1. MikroRNA Ekspresyon Analizi Çalışma Basamakları

MiRNA izolasyonu öncesi serum eldesi:

- EDTA'lı tüplere yaklaşık 2 ml periferik kan örnekleri alındı.
- Aynı gün içerisinde bekletilmeden çalışıldı.
- Örnekler 30 dk boyunca sarsılmadan, dik bir şekilde oda sıcaklığında bekletildi.
- Tüpler 500 g'de 10 dk boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası dipteki çökeltiye yaklaşımadan, yaklaşık 1 ml'lik süpernatant kısım steril eppendorf tüplere aktarıldı.
- Eppendorfa ayrılan serum 2000 g'de 5dk oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Dipteki çökeltiye yaklaşımadan serum kısmı steril eppendorfa aktarıldı.
- Hazırlanan serum -80 °C'de saklandı.

MiRNA izolasyonu:

- -80 °C'de saklanan örneklerden yaklaşık 200 µl'lik steril eppendorf tüplere aktarıldı.
- 350 µl lizis tamponu ve 20 µl proteinaz K çözeltisi, 200 µl örnek üzerine eklendi, hafifçe pipetaj yapıldı, 30 dakika boyunca 60 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- DNA kontaminasyonunu önlemek için 20 µl DNase I çalışma (Working) tamponu ve 10 µl DNase I ilave edildi ve pipetaj yapıldı, 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Üzerine bağlama tamponundan 350 µl eklendi, pipetaj yapıldı.
- Lizat, 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş miRNA Spin kolona aktarıldı, 1 dakika boyunca 11,000 g'de santrifüj edildi.
- Toplama tüpü değiştirildi, spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

- Spin kolon filtre üzerine 500 µl yıkama tamponu konuldu, 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpü değiştirme işlemi tekrarlanarak spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Etanolü uzaklaştırmak amacıyla 11,000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı, miRNA Spin Kolonu 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 65 °C'de ısıtılmış, 40 µl elüsyon tamponu eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında 8,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- miRNA içeren sıvı santrifüj tüpünde toplandı, -20 °C'de saklandı.

#### MiRNA'dan cDNA eldesi:

- İzole edilen miRNA'lara poli (A) kuyruğu eklemek amacıyla tablo 3.5'de içeriği belirtilen poli (A) kiti, üretici firmanın önerdiği protokole uygun oranlarda hazırlanarak miRNA'ların üzerine eklendi, kısa süreli santrifüj edildi.
- Daha sonra termal döngü cihazında 37 °C 20 dk, 65 °C 20 dk ısı protokolü uygulandı.
- cDNA miksi 1 tablo 3.6'da belirtilen oranlarda hazırlandı.
- Oligo adaptörlerin, poli (A) kuyruğu eklenmiş RNA kalıbına bağlanması için 65°C 5 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası hızla soğutulan karışım kısa süreli santrifüj edildi.
- Tablo 3.7'de içeriği belirtilen cDNA miks 2 eklenerek vortekslendi ve kısa süreli santrifüj edildi.
- Termal döngü cihazında 42 °C'de 15 dk, ardından 70 °C'de 10 dk ısı protokolü uygulandı.
- Reaksiyon biter bitmez buzda soğutuldu.
- RT-PCR'da ekspresyon analizi için uygun cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3. 5: Poli(A) kit içeriği

Kit içeriği	15,25 µl RNA için Kullanılan Miktar
ATP 10 mM	1,25 µl
Poly(A) polymeraz, yeast (1 U/uL)	1 µl
5x Poly(A) polymeraz, yeast reaction buffer	5 µl
25 mM MnCl <sub>2</sub>	2,5 µl

Tablo 3. 6: cDNA miks 1 içeriği

İçerik	Miktar
Poli A kuyruğu eklenmiş RNA kalıbı	10 µl
miRNA oligo (dT) adaptör (10 uM)	2 µl

Tablo 3. 7: cDNA miks 2 içeriği

İçerik	Miktar
dNTPs 10mM	1 µl
5X RT tamponu	4 µl
Rnase off ribonucleaz inhibitör 40 U/ µl	0,5 µl
Rtase 200 U/µl (OneScript)	1 µl
RNA enzimleri içermeyen su	1,5 µl

RT-PCR analizi:

- PCR öncesi cDNA konsantrasyonu nanodrop ile ölçüldü.
- Örnek cDNA konsantrasyonu 250 ng/µl olacak şekilde PCR grade water ile seyreltildi.
- cDNA'lar için ve cDNA'ların amplifikasyonunu karşılaştırmak amacıyla kullanılacak U6 referans geni için PCR primer master miks'leri hazırlandı (Tablo 3.8).

Tablo 3. 8: PCR miks içeriği

Miks içeriği	Miktar
Forward primer 300 nM	1 µl
Reverse primer 300 nM	1 µl
cDNA 250 ng	2 µl
H <sub>2</sub> O	6 µl
BrightGreen Master mix	10 µl

- Hazırlanan mikserler LightCycler®96 kuyucuklara yerleştirildi.
- LightCycler®96 real time PCR protokolü tablo 3.9'da belirtildiği şekilde uygulandı.

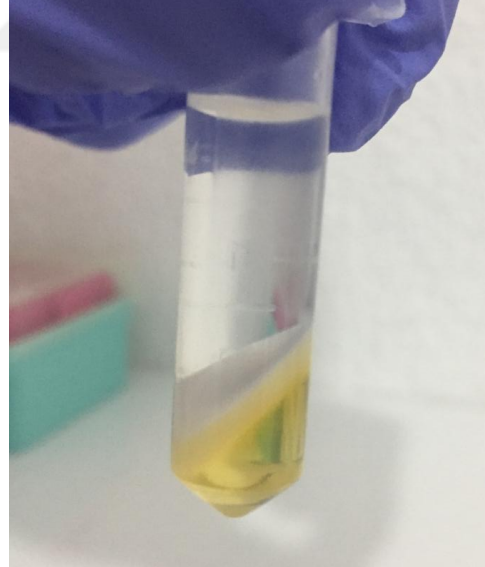
Tablo 3. 9: PCR protokolü

İşlem	Sıcaklık °C	Süre	Döngü sayısı	Analiz modu
Denatürasyon	95	10 dk	1	Polimeraz aktivasyonu
Amplifikasyon	95 60 72	10 sn 15 sn 30 sn	40	Denatürasyon Bağlanma Uzama
Erime Eğrisi	95 50 90	30 sn 1 dk Sürekli okuma	1	Özgüllük kontrolü
Soğutma	40	1 dk	1	

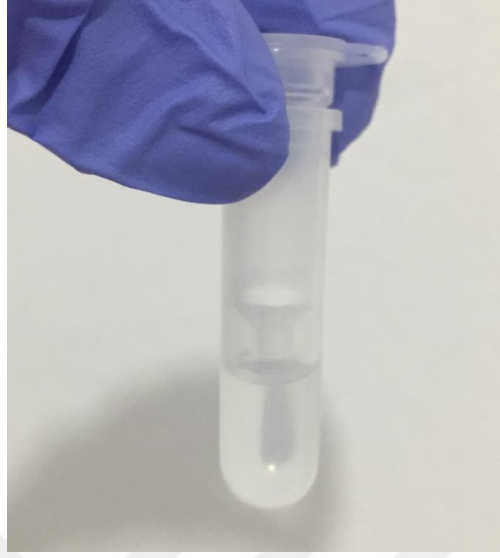
### 3.10.2. Gen Ekspresyon Analizi Çalışma Basamakları

- 2 ml periferik kan örneği falkon tüpüne aktarıldı.
- Üzerine yaklaşık 10 ml RBC lizis tamponu eklendi.
- Karışım homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı, 5-10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Daha sonra 600 g'de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
- Dipteki çökeltiye 1 ml RBC lizis tamponu eklendi pipetaj yaparak karıştırıldı ve bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi.
- Mikrosantrifüj tüpündeki karışım 3000 g'de 2 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant kısım uzaklaştırıldı.
- Total RNA izolasyonu için miRNAExtractor kiti eklenerek oda sıcaklığında 5-10 dk inkübe edildi.
- 0.2 ml kloroform eklendi, 30 saniye boyunca vorteks ile karıştırıldı.
- 4 ° C'de 12,000 g'de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası en üstte kalan şeffaf tabaka RNA içermektedir, bu tabakadan yaklaşık 500 µl'lik kısım 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1: RNA içeren şeffaf tabaka



Şekil 3. 2: Filtreden geçen RNA içermeyen solüsyon

- Üzerine yaklaşık 800 µl (numunenin 1,5 katı) %100 etanol konuldu, pipetaj ile homojenize edildi.
- Karışım spin kolona aktarıldı, 12,000 g'de 2 dk santrifüj edildi.
- Filtreden geçen sıvı atıldı (Şekil 3.2).
- Spin kolona etanol ile seyreltilmiş 0,5 ml RPE tamponu eklendi.
- 12,000 g'de 30 saniye santrifüj edildi, alttaki sıvı atıldı.
- Tekrar etanol ile seyreltilmiş 0,5 ml RPE tamponu eklenerek 12,000 g'de 30 sn santrifüj edildi, alttaki sıvı atıldı.
- Etanolü uzaklaştırmak için 12,000 g'de 30 sn santrifüj edildi.
- Spin kolon steril 1,5 ml santrifüj tüpüne aktarıldı, 40 µl RNase enzimleri içermeyen su eklenerek 2 dk beklendi, 12,000 g'de 30 sn santrifüj edildi.
- RNA izolasyonu sağlandı, -80 °C'de muhafaza edildi.

#### mRNA'lardan cDNA sentezi

- İzole edilen mRNA'lar ve tablo 3.10'da belirtilen oranlarda cDNA sentez kiti (Roche®) ile cDNA miksi hazırlandı.

Tablo 3. 10: cDNA miksi

İçerik	Miktar
RNA 100 ng/ $\mu$ l	10 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O, nükleaz içermeyen saf, steril su	20 $\mu$ l'ye tamamlandı
cDNA master tamponu	4 $\mu$ l
Revers transkriptaz enzimi	1 $\mu$ l
Toplam hacim	20 $\mu$ l

- Karışım PCR plakalarına aktarıldı.
- Termal döngü cihazında ısı protokolü tablo 3.11'de belirtildiği şekilde uygulandı.

Tablo 3. 11: cDNA sentezi için termal döngü protokolü

Sıcaklık	Süre
37 °C	5 dk
46 °C	20 dk
95 °C	1 dk
4 °C	$\infty$

- Protokol sonrası sentezlenen cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edildi.

#### RT-PCR analizi

- Ekspresyon analizi yapılacak genlerin ve endojen kontrol amacıyla GAPDH geninin amplifikasyonlarını sağlamak amacıyla PCR master miksi hazırlandı (Tablo 3.12).

Tablo 3. 12: PCR master miks

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Sybrgreen Master miks	10 µl
Forward primer 500 nM	1 µl
Reverse primer 500 nM	1 µl
cDNA	5 µl
ddH <sub>2</sub> O	3 µl

- Hazırlanan karışımlar 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı.
- Tablo 3.13'deki PCR protokolü uygulanarak kantitatif RT-PCR analizi yapıldı.

Tablo 3. 13: PCR protokolü

<b>İşlem</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü sayısı</b>	<b>Analiz modu</b>
Denatürasyon	95	10 dk	1	Polimeraz aktivasyonu
Amplifikasyon	95	20 sn	40	Denatürasyon
	60	20 sn		Bağlanma
	72	20 sn		Uzama
Erime Eğrisi	95	30 sn	1	Özgüllük kontrolü
	50	1 dk		
	90	Sürekli okuma		
Soğutma	40	1 dk	1	

MikroRNA'lar ve gen ekspresyon analizi için eşik değeri geçen floresan sinyaller ile Ct değerleri belirlendi. Tespit edilen hedeflerin Ct değerleri ve referans gen Ct değerleri ile  $\Delta CT$ ,  $\Delta\Delta CT$  ve  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleri hesaplandı. İstatistiksel analiz için  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleri kullanıldı.

### 3.11. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 25.0 paket programı kullanıldı. Demografik bulgular betimsel analiz yöntemleri ile incelendi, frekans (n) ve yüzde (%) değerleri verildi. Sayısal verilerin normal dağılımı; Shapiro-Wilk testi, çarpıklık ve basıklık katsayıları ve histogram ile incelendi. Veriler normal dağılım göstermediği için hasta ve kontrol grupları arasında ekspresyon düzeyleri farkı Mann Whitney U testi ile analiz edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olan genler ile miRNA'lar arasındaki ilişki ve miRNA'ların kendi arasındaki ilişki Spearman's rho korelasyon analizi kullanılarak test edildi. Spearman korelasyon katsayısı (r) değerleri; 0-0,10 çok zayıf, 0,10-0,39 zayıf, 0,40-0,69 orta, 0,70-0,89 yüksek ve 0,90-1 çok yüksek korelasyon göstergesi olarak yorumlandı (Schober, Boer ve Schwarte, 2018). İlgili miRNA'ların hastalık tanısında etkisini yordamak için lojistik regresyon modeli oluşturuldu. Anlamlı parametrelerin tanı duyarlılığı ve özgüllüğü Receiver Operating Characteristic Curve (ROC) eğrisi ile belirlendi. İstatistiksel anlamlılık (p) değeri için 0,05'den küçük veriler istatistiksel anlamlılık, 0,01'den küçük veriler yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık, 0,001'den küçük veriler çok yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık olarak yorumlandı.

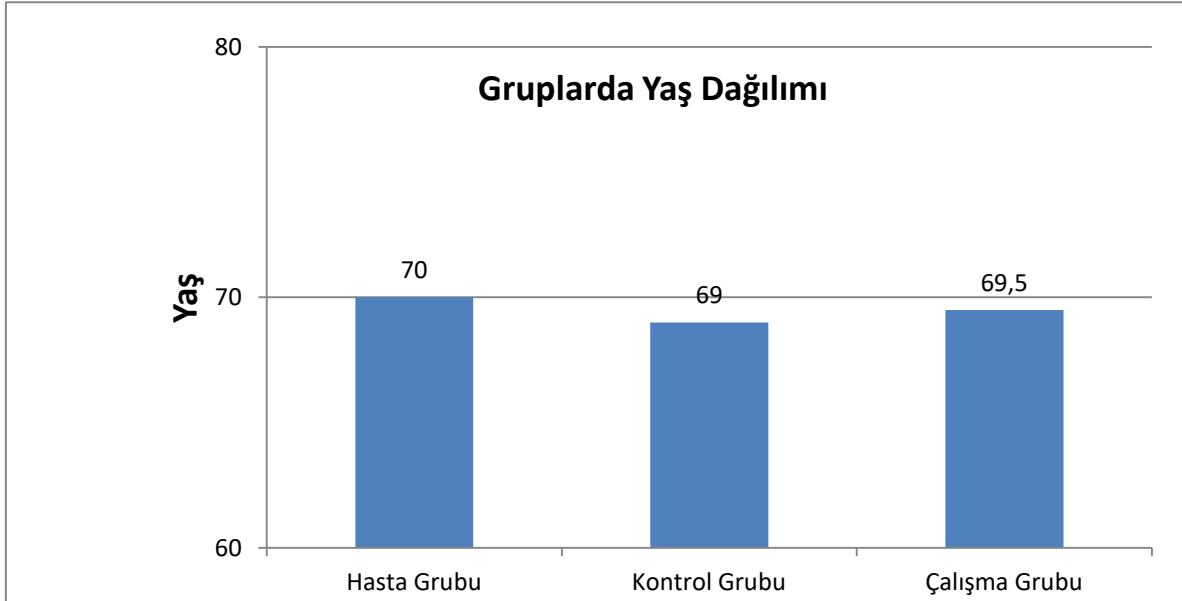
## 4. BULGULAR

### 4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Klinik ve Demografik Özellikleri

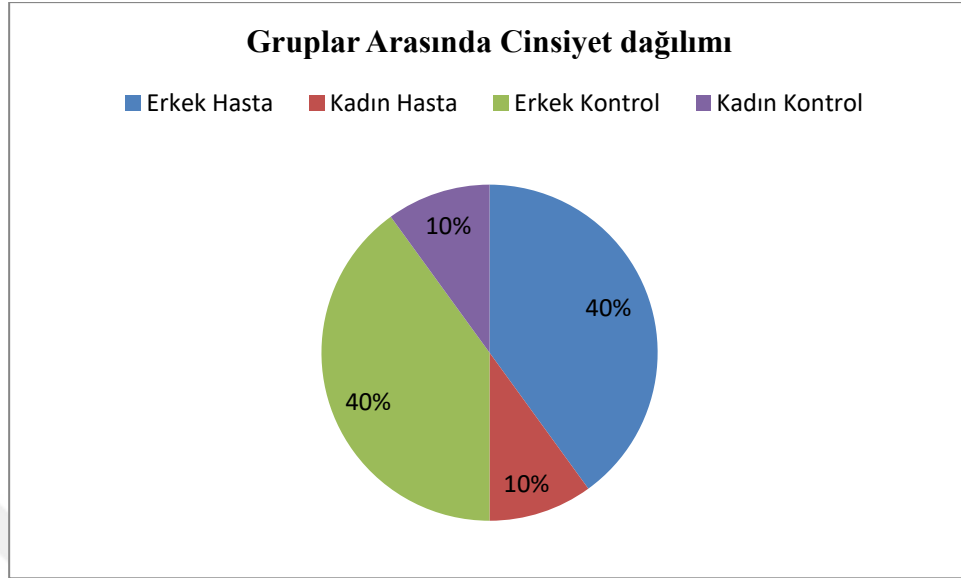
Çalışma, hasta grubu ve kontrol grubu olarak sınıflandırıldı. Hasta grubu 20, kontrol grubu 20 kişiden oluşan katılımcıların yaşları 58 ile 90 arasında olup, yaş ortalaması  $69,58 \pm 7,8$  idi (Şekil 4.1). Çalışma grubunun cinsiyet dağılımı %80 (n=32) erkek, %20 (n=8) kadından oluşmaktaydı (Şekil 4.2) (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1: Çalışma grubu demografik özellikleri

Yaş (Yıl)	ort $\pm$ SS (min-maks)	69,58 $\pm$ 7,80 (58 - 90)
Cinsiyet n (%)	Erkek	32 % 80
	Kadın	8 % 20
		n=40



Şekil 4. 1: Hasta ve gönüllü gruplarında yaş dağılım grafiği



Şekil 4. 2: Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubunun cinsiyet dağılımı

Hasta Grubunda yaş dağılımı 58-85 arasında olup, ortalama 70,15 ( $\pm$  7,63) olarak tespit edildi. Hastalar 65-69 yaş aralığında %30 oran ile daha yüksek frekansta bulundu, hasta grubunun % 80'inin 65 yaş üzerinde olduğu saptandı (Tablo 4.2). Erkek hasta sayısı 16 (% 80), kadın hasta sayısı 4 (% 20 ) kişiden oluşmaktaydı (Şekil 4.2).

Tablo 4. 2: Hasta Grubunun yaşa göre dağılım frekansı

Hasta Grubu Yaş Aralığı	Hasta Sayısı	Oran %
55-59	2	% 10
60-64	2	% 10
65-69	6	% 30
70-74	4	% 20
75-79	4	% 20
80 ve üzeri	2	% 10

Tanıda alınan boy ve kilo ölçüleriyle hesaplanan VKİ'ye göre hasta grubunda ortalama VKİ 29,9 idi, hastaların %65'i (n=13) obez, %25'i (n=5) fazla kilolu ve %10'u normal kiloda saptandı. Sigara kullanma öyküsü sorgulandığında, hastaların %70'i (n=14) daha önce sigara kullanmış, %30'u (n=6) sigara kullanmamıştı. Sigara kullananlarda ortalama süre 31,5 paket-yıl olarak hesaplandı. İPF için risk oluşturabilecek mesleki ve çevresel maruziyet araştırıldığında, hastaların %50'sinde (n=10) mesleki maruziyet, % 70'inde (n=17) ise çevresel maruziyet öyküsü vardır. Hastaların %65'i asbest maruziyeti tanımlamıştır. Tek başına asbest maruziyeti %30 (n=6) oranında iken, %35'i (n=7) asbeste ek olarak diğer çevresel maruziyetler tanımlamıştır. Bir hastada (%5) çevresel risk faktörü olarak uzun süreli insektisit maruziyeti öyküsü alınmıştır. Sigara ve/veya çevresel risk faktörü ve/veya mesleki maruziyetler hasta grubunun tamamında (%100) bulundu.

Tanı aşamasında değerlendirilen kriterler incelendiğinde hastaların %90'ında (n=18) klinik bulgular ile birlikte HRCT bulguları tanı için yeterli olurken, %10'unda (n=2) klinik ve HRCT bulgularına ek olarak akciğer biyopsisi ihtiyacı olmuştur. Hasta grubunun tümü antifibrotik tedavi almakta olup, %75'i (n=15) pirfenidon kullanmakta iken, %25'i (n=5) nintedanib kullanmaktadır. Hasta grubunun klinik ve demografik bulguları özeti tablo 4.3'de verildi.

Tablo 4. 3: İPF hastalarının klinik özellikleri

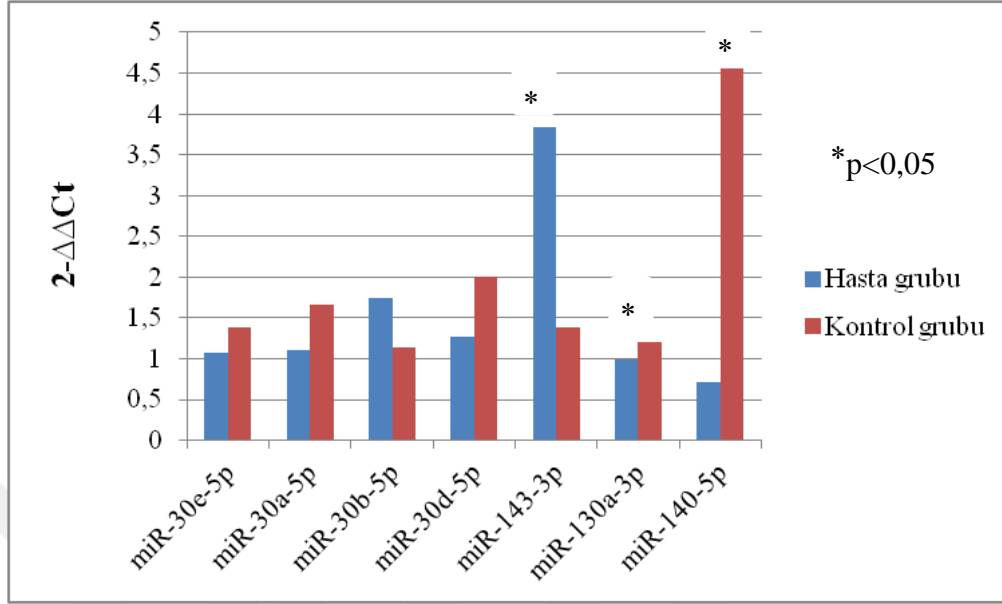
Yaş, ort± SS (Min-maks)	70,15 ± 7,63 (58-85)
Cinsiyet n (%)	
Erkek	16 (%80)
Kadın	4 (%20)
VKİ kg/m <sup>2</sup> n (%)	
Ort± SS	29,96 ± 3,42
Normal	2 (%10)
Fazla kilolu	5 (%25)
Obez	13 (%65)
Sigara kullanma öyküsü n (%)	
Eski kullanıcı	14 (%70)
Hiç kullanmamış	6 (%30)
Mesleki maruziyet öyküsü n (%)	
Var	10 (%50)
Yok	10 (%50)
Çevresel maruziyet öyküsü n (%)	
Var	17 (%70)
Yok	6 (%30)
Tanımda kullanılan parametreler (n,%)	
Klinik ve HRCT bulguları	18 (%90)
Klinik HRCT ve biyopsi bulguları	2 (%10)
Klinik bulgular n (%)	
Öksürük	16 (%80)
Nefes darlığı	16 (%80)
Çomak parmak varlığı	14 (%70)
Velcro ral varlığı	18 (%90)
Antifibrotik tedavi n (%)	
Pirfenidon	15 (%75)
Nintedanib	5 (%25)

#### 4.2 MikroRNA ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen örneklerde miR-30a-5p, miR-30b-5p, miR-30d-5p, miR-30e-5p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-29c-3p, miR-143-3p, miR-26a-5p, miR-140-5p,

miR-32-5p, miR-320a, let-7d, miR-19a, miR-130a-3p, miR-19b-1, miR-133, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-145, miR-205-5p, TGF- $\beta$  ve CCN2 ekspresyon düzeyleri incelendi.

1. miR-30a-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $1,11 \pm 1,02$ , kontrol grubunda  $1,66 \pm 1,87$  idi; p değeri 0,414 saptanmış olup hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.4; Şekil 4.3).
2. miR-30b-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $1,74 \pm 1,27$ , kontrol grubunda  $1,12 \pm 0,61$  idi; p değeri 0,265 saptanmış olup hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.4; Şekil 4.3).
3. miR-30d-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $1,27 \pm 1,85$ ; kontrol grubunda  $2 \pm 2,23$  idi, p değeri 0,157 saptanmış olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.4; Şekil 4.3).
4. miR-30e-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $1,06 \pm 1,03$ ; kontrol grubunda  $1,37 \pm 1,03$  idi; p değeri 0,183 saptanmış olup hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.4; Şekil 4.3).
5. miR-140-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $0,72 \pm 1,35$ , kontrol grubunda  $4,54 \pm 8,87$  idi; p değeri **0,030** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.3).
6. miR-130a-3p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $0,98 \pm 1,39$ , kontrol grubunda  $1,21 \pm 0,57$  idi; p değeri **0,020** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.3).
7. miR-143-3p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $3,84 \pm 3,19$  kontrol grubunda  $1,39 \pm 1,05$  idi, p değeri **0,003** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.3).

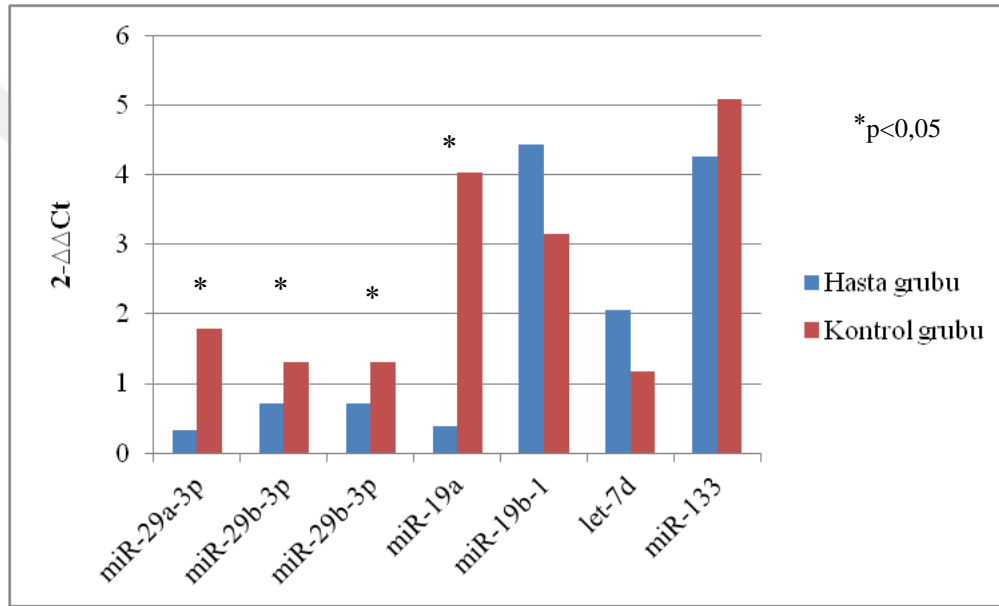


Şekil 4. 3: Hasta ve kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri grafiği I

8. miR-29a-3p  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değeri hasta grubunda  $0,32 \pm 0,42$  kontrol grubunda  $1,79 \pm 1,73$  idi; p değeri **<0,001** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.4).
9. miR-29b-3p  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değeri hasta grubunda  $0,71 \pm 0,43$ , kontrol grubunda  $1,31 \pm 0,94$  idi; p değeri **0,046** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.3).
10. miR-29c-3p  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değeri hasta grubunda  $0,90 \pm 1,46$ , kontrol grubunda  $1,32 \pm 1,13$  idi; p değeri **0,012** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.3).
11. miR-19a  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değeri hasta grubunda  $0,37 \pm 0,46$ , kontrol grubunda  $4,02 \pm 7,93$  idi; p değeri **0,002** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.4).
12. miR-19b-1  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değeri hasta grubunda  $4,44 \pm 5,13$  kontrol grubunda  $3,15 \pm 3,47$  idi; p değeri  $0,529$  saptanmış olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.4; Şekil 4.4).

13. miR-133  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $4,26 \pm 8,42$  kontrol grubunda  $5,09 \pm 8,58$  idi; p değeri 0,547 saptanmış olup hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.4; Şekil 4.4).

14. miR-7d  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $6,48 \pm 8,42$ , kontrol grubunda  $1,98 \pm 2,64$  idi; p değeri 0,081 saptanmış olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.4; Şekil 4.4).



Şekil 4. 4: Hasta ve kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri grafiği II

15. miR-320a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $0,83 \pm 0,82$ , kontrol grubunda  $1,50 \pm 1,24$  idi; p değeri **0,030** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.5).

16. miR-32-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $2,80 \pm 3,16$ , kontrol grubunda  $1,43 \pm 1,04$  idi; p değeri 0,242 saptanmış olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.4; Şekil 4.5).

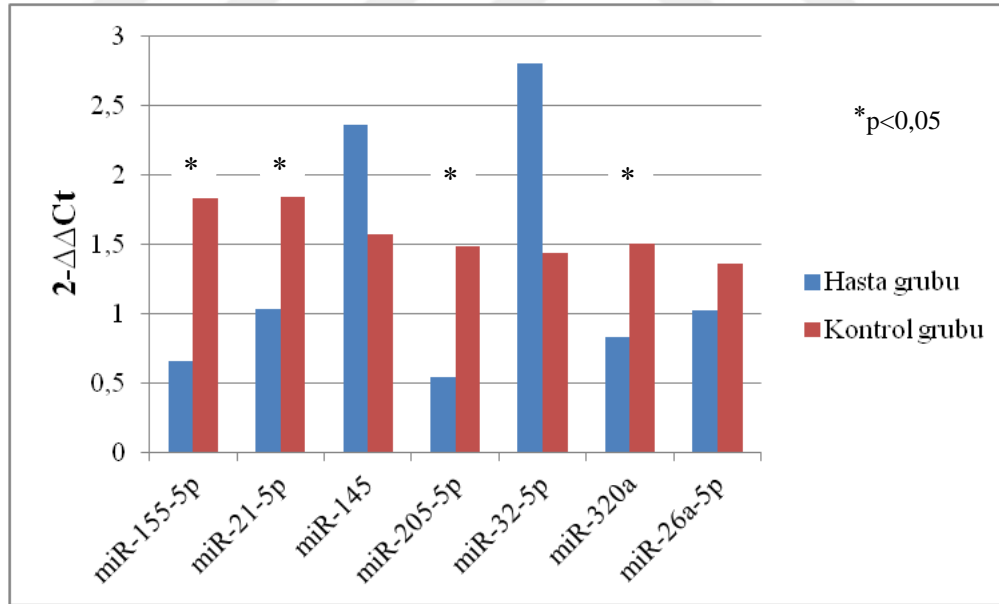
17. miR-155-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $0,65 \pm 1,15$ , kontrol grubunda  $1,83 \pm 1,66$  idi; p değeri **0,001** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.5).

18. miR-21-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $1,03 \pm 1,73$ , kontrol grubunda  $1,83 \pm 1,96$  idi; p değeri **0,035** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.5).

19. miR-145  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $2,36 \pm 5,92$ , kontrol grubunda  $1,56 \pm 1,62$  idi; p değeri 0,157 saptanmış olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.4; Şekil 4.5).

20. miR-205-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $0,53 \pm 0,49$ , kontrol grubunda  $1,48 \pm 1,24$  idi; p değeri **0,003** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.4; Şekil 4.5).

21. miR-26a-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $1,01 \pm 0,81$ , kontrol grubunda  $1,36 \pm 1,01$  idi; p değeri 0,265 saptanmış olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.4; Şekil 4.5).



Şekil 4. 5: Hasta ve kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri grafiği III

Tablo 4. 4: Hasta ve kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması  
ort $\pm$ ss (Median)

MikroRNA'lar	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		P değeri
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	
miR-30d	1,27 $\pm$ 1,85 (0,47)	2 $\pm$ 2,23 (1,17)	0,157
miR-30b	1,74 $\pm$ 1,27 (1,42)	1,12 $\pm$ 0,61 (0,95)	0,265
miR-30e	1,06 $\pm$ 1,03 (0,73)	1,37 $\pm$ 1,03 (1,18)	0,183
miR-30a	1,11 $\pm$ 1,02 (0,86)	1,66 $\pm$ 1,87 (0,96)	0,414
<b>miR-29c</b>	<b>0,90 <math>\pm</math> 1,46 (0,25)</b>	<b>1,32 <math>\pm</math> 1,13 (0,91)</b>	<b>0,012*</b>
<b>miR-29b</b>	<b>0,71 <math>\pm</math> 0,43 (0,57)</b>	<b>1,31 <math>\pm</math> 0,94 (1,02)</b>	<b>0,046*</b>
<b>miR-29a</b>	<b>0,32 <math>\pm</math> 0,42 (0,08)</b>	<b>1,79 <math>\pm</math> 1,73 (1,28)</b>	<b>&lt;0,001***</b>
<b>miR-19a</b>	<b>0,37 <math>\pm</math> 0,46 (0,13)</b>	<b>4,02 <math>\pm</math> 7,93 (0,84)</b>	<b>0,002**</b>
miR-19b	4,44 $\pm$ 5,13 (2,70)	3,15 $\pm$ 3,47 (2,19)	0,529
miR-133	4,26 $\pm$ 8,42 (0,71)	5,09 $\pm$ 8,58 (1,23)	0,547
<b>miR-320a</b>	<b>0,83 <math>\pm</math> 0,82 (0,65)</b>	<b>1,50 <math>\pm</math> 1,24 (0,95)</b>	<b>0,030*</b>
miR-32	17,42 $\pm$ 36,95 (2,08)	1,50 $\pm$ 1,24 (2,03)	0,242
let-7d	6,48 $\pm$ 8,42 (2,95)	1,98 $\pm$ 2,64 (0,82)	0,081
<b>miR-140</b>	<b>0,72 <math>\pm</math> 1,35 (0,17)</b>	<b>4,54 <math>\pm</math> 8,87 (1,21)</b>	<b>0,028*</b>
miR-26a	1,01 $\pm$ 0,81 (0,85)	1,36 $\pm$ 1,01 (1,13)	0,265
<b>miR-143</b>	<b>3,84 <math>\pm</math> 3,19 (2,94)</b>	<b>1,39 <math>\pm</math> 1,05 (1,29)</b>	<b>&lt;0,001***</b>
<b>miR-130a</b>	<b>0,98 <math>\pm</math> 1,39 (0,67)</b>	<b>1,21 <math>\pm</math> 0,57 (1,27)</b>	<b>0,020*</b>
<b>miR-155</b>	<b>0,65 <math>\pm</math> 1,15 (0,20)</b>	<b>1,83 <math>\pm</math> 1,66 (1,42)</b>	<b>0,001**</b>
miR-145	2,36 $\pm$ 5,92 (0,64)	1,56 $\pm$ 1,62 (1,35)	0,157
<b>miR-205</b>	<b>0,53 <math>\pm</math> 0,49 (0,31)</b>	<b>1,48 <math>\pm</math> 1,24 (0,84)</b>	<b>0,003**</b>
<b>miR-21</b>	<b>1,03 <math>\pm</math> 1,73 (0,37)</b>	<b>1,83 <math>\pm</math> 1,96 (1,19)</b>	<b>0,035*</b>

Mann Whitney U analizi, \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05

TGF- $\beta$   $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $0,72 \pm 0,64$ , kontrol grubunda  $1,58 \pm 1,53$  idi, p değeri **0,046** saptanmış olup, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.5; Şekil 4.6).

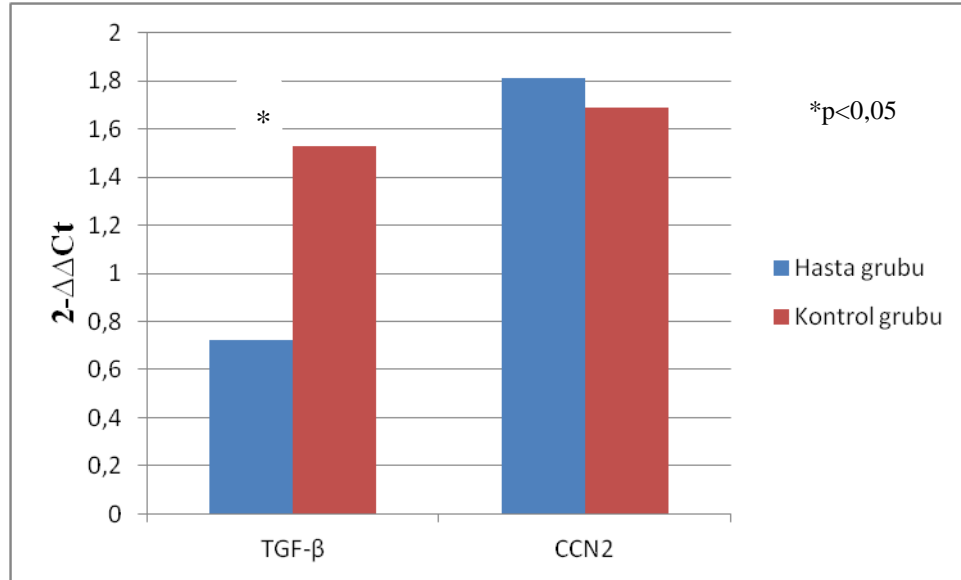
CCN2  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda  $1,81 \pm 2,39$ , kontrol grubunda  $1,68 \pm 1,68$  idi; p değeri 0,968 saptanmış olup hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.5; Şekil 4.6).

Tablo 4. 5: Hasta ve kontrol grubu gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

Ort $\pm$ SS (Median)

Genler	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		P değeri
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>0,72 <math>\pm</math> 0,64 (0,53)</b>	<b>1,58 <math>\pm</math> 1,53 (0,84)</b>	<b>0,046*</b>
CCN2	1,81 $\pm$ 2,39 (0,73)	1,68 $\pm$ 1,68 (0,94)	0,968

Mann Whitney U analizi, \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05



Şekil 4. 6: Hasta ve kontrol grubu gen ekspresyon düzeyleri grafiği

Hasta grubunda cinsiyetler arasında ekspresyon düzeyleri farkı Mann Whitney U analizi ile test edildi.

miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-29c-3p, miR-143-3p, miR-19a, miR-130a-3p, miR-21-5p, miR-205-5p ve TGF- $\beta$  ile cinsiyet grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark bulunmadı.

A. miR-155-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri erkek hasta grubunda  $0,80 \pm 1,24$ , kadın hasta grubunda  $0,06 \pm 0,07$  idi; p değeri **0,016** saptanmış olup, kadın hasta grubunda erkek hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.6; Şekil 4.7).

B. miR-140-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri erkek hasta grubunda  $0,87 \pm 1,48$ , kadın hasta grubunda  $0,09 \pm 0,03$  idi; p değeri **0,016** saptanmış olup, kadın hasta grubunda erkek hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo4.6; Şekil 4.7).

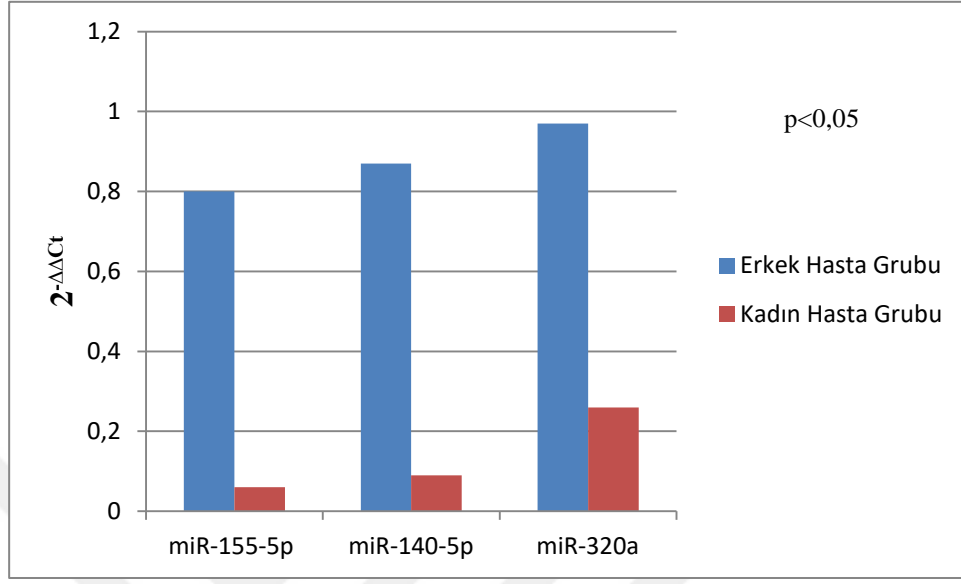
C. miR-320a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri erkek hasta grubunda  $0,97 \pm 0,87$ , kadın hasta grubunda  $0,26 \pm 0,10$  idi; p değeri **0,029** saptanmış olup, kadın hasta grubunda erkek hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 4.6; Şekil 4.7).

Tablo 4. 6: Hasta grubunda cinsiyete göre ekspresyonu anlamlı fark gösteren miRNA'ların karşılaştırılması

Ort $\pm$ ss (Median)

miRNA'lar	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		P değeri
	Erkek Hasta Grubu	Kadın Hasta Grubu	
miR-155-5p	0,80 $\pm$ 1,24 (0,25)	0,06 $\pm$ 0,07 (0,02)	0,016*
miR-140-5p	0,87 $\pm$ 1,48 (0,19)	0,09 $\pm$ 0,03 (0,09)	0,016*
miR-320a	0,97 $\pm$ 0,87 (0,75)	0,26 $\pm$ 0,10 (0,25)	0,029*

Mann Whitney U analizi, \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05



Şekil 4. 7: Hasta grubunda cinsiyete göre ekspresyonu anlamlı fark gösteren miRNA'lar

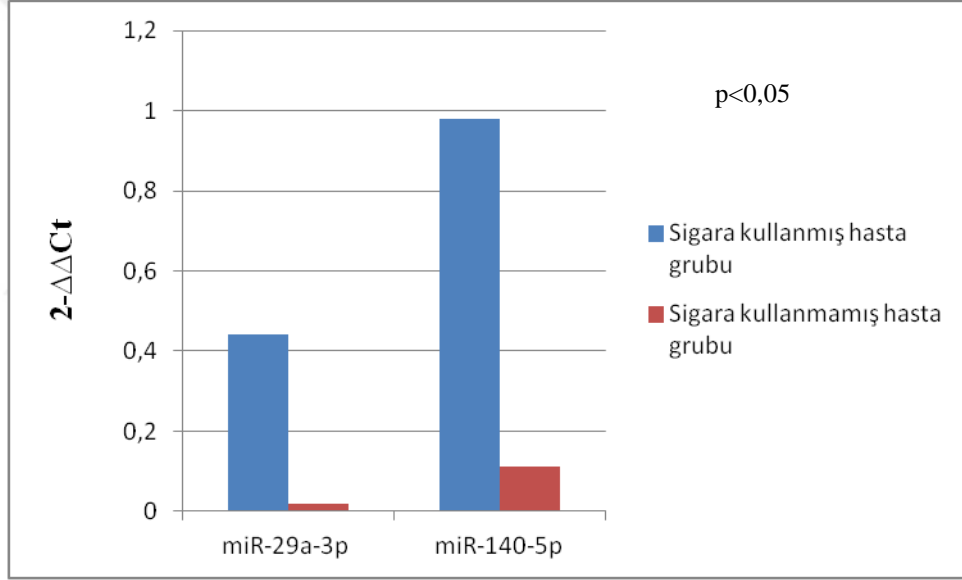
Sigara kullanma öyküsü olan ve hiç sigara kullanmamış hastalar arasında ekspresyon düzeyleri farkı Mann Whitney U analizi ile test edildi.

- I. miR-29a-3p  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değeri sigara kullanma öyküsü olan hasta grubunda  $0,44 \pm 0,44$ ; hiç sigara kullanmamış hasta grubunda  $0,02 \pm 0,02$  bulundu, p değeri **0,012** saptanmış olup sigara kullanma öyküsü olanlarda hiç sigara kullanmamış hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Tablo 4.7; Şekil 4.8).
- II. miR-140-5p  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değeri sigara kullanma öyküsü olan hasta grubunda  $0,98 \pm 1,56$  hiç sigara kullanmamış hasta grubunda  $0,11 \pm 0,04$  bulundu; p değeri **0,020** saptanmış olup sigara kullanma öyküsü olanlarda hiç sigara kullanmamış hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Tablo 4.7; Şekil 4.8).

Tablo 4. 7: Hasta grubunda sigara kullanma durumuna göre anlamlı fark olan miRNA'ların karşılaştırılması, Ort±ss (Median).

miRNA'lar	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		P değeri
	Sigara kullanmış hasta grubu	Sigara kullanmamış hasta grubu	
<b>miR-29a-3p</b>	<b>0,44 ± 0,44 (0,32)</b>	<b>0,02 ± 0,02 (0,02)</b>	<b>0,012*</b>
<b>miR-140-5p</b>	<b>0,98 ± 1,56 (0,21)</b>	<b>0,11 ± 0,04 (0,12)</b>	<b>0,020*</b>

Mann Whitney U analizi, \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05

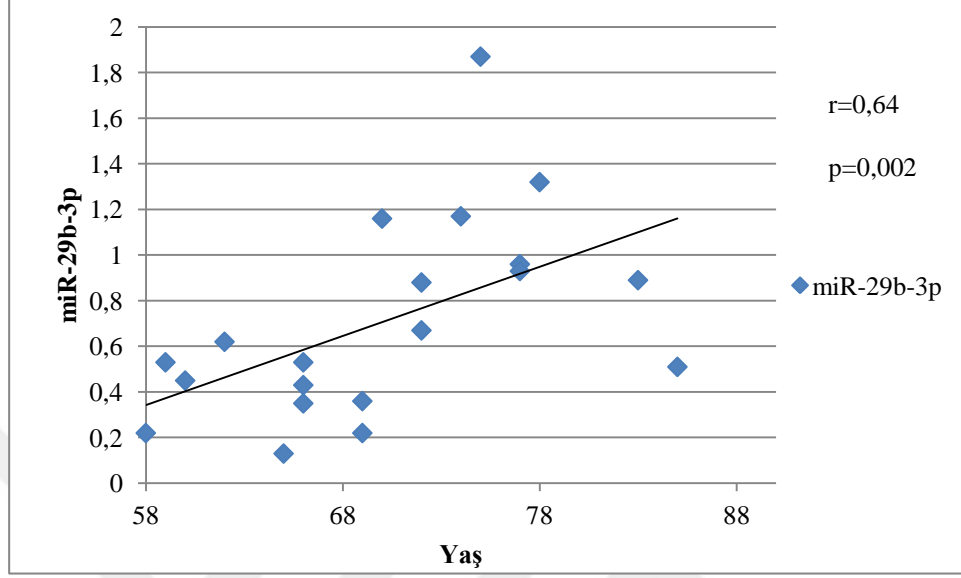


Şekil 4. 8: Hasta grubunda sigara kullanma durumunda fark gözlenen miRNA'lar

### 4.3. MikroRNA ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin Korelasyon analizi

miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-143-3p, miR-140-5p, miR-320a, miR-19a, miR-130a-3p, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-205-5p ve TGF- $\beta$  ekspresyonları ile hastaların yaşı arasındaki ilişki korelasyon analiziyle test edildi ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı ( $p > 0,05$ ).

miR-29b-3p ile yaş arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,64$ ,  $p=0,002$ ) (Şekil 4.9).

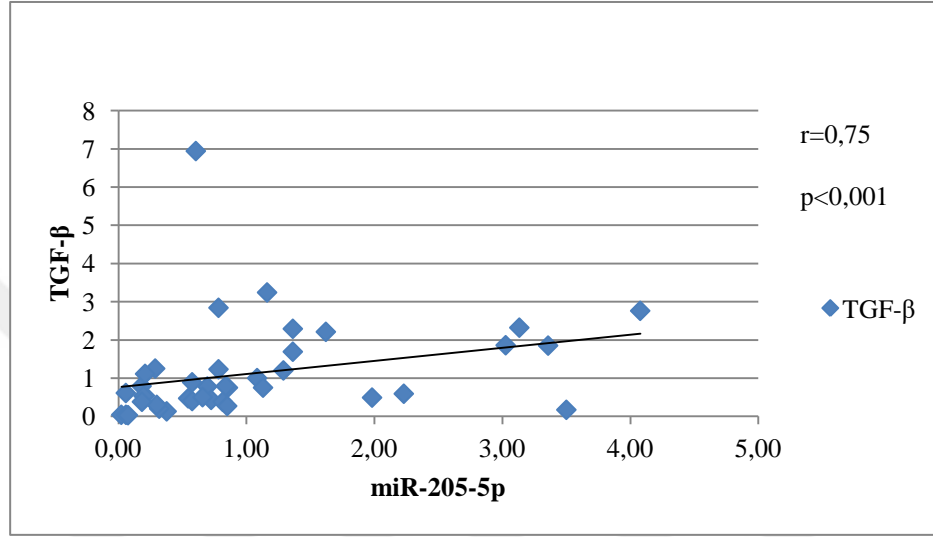


Şekil 4. 9: miR-29b-3p ile hasta grubunun yaşı arasındaki korelasyon grafiği

TGF- $\beta$  ile miRNA'lar ve miRNA'ların diğer miRNA'lar ile ilişkisi Spearman korelasyon analizi ile incelendi.

1. TGF- $\beta$  ile miR-143-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p ve miR-29c-3p ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel düzeyde anlamlı korelasyon saptanmadı ( $p>0,05$ )(Tablo 4.8).
2. TGF- $\beta$  ile miR-140-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,43$ ,  $p=0,006$ ) (Tablo 4.8).
3. TGF- $\beta$  ile miR-130a-3p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,44$ ,  $p=0,005$ ) (Tablo 4.8).
4. TGF- $\beta$  ile miR-155-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,47$ ,  $p=0,002$ ) (Tablo 4.8).
5. TGF- $\beta$  ile miR-21-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,58$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).

6. TGF- $\beta$  ile miR-205-5p arasında pozitif yönde yüksek düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,75$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8, Şekil 4.10).



Şekil 4. 10: TGF- $\beta$  ile miR-205-5p arasındaki korelasyon grafiği

7. TGF- $\beta$  ile miR-320a arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,48$ ,  $p=0,002$ ) (Tablo 4.8).

8. TGF- $\beta$  ile miR-19a arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,45$ ,  $p=0,004$ ) (Tablo 4.8).

9. miR-29b-3p ile miR-29a-3p, miR-19a, miR-320, miR-140, miR-143 ve miR-21 arasında istatistiksel düzeyde anlamlı korelasyon saptanmadı ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.8).

10. miR-29b-3p ve miR-29c-3p arasında pozitif yönde zayıf düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,35$ ,  $p=0,025$ ) (Tablo 4.8).

11. miR-29b-3p ve miR-130a-3p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,50$ ,  $p=0,001$ ) (Tablo 4.8).

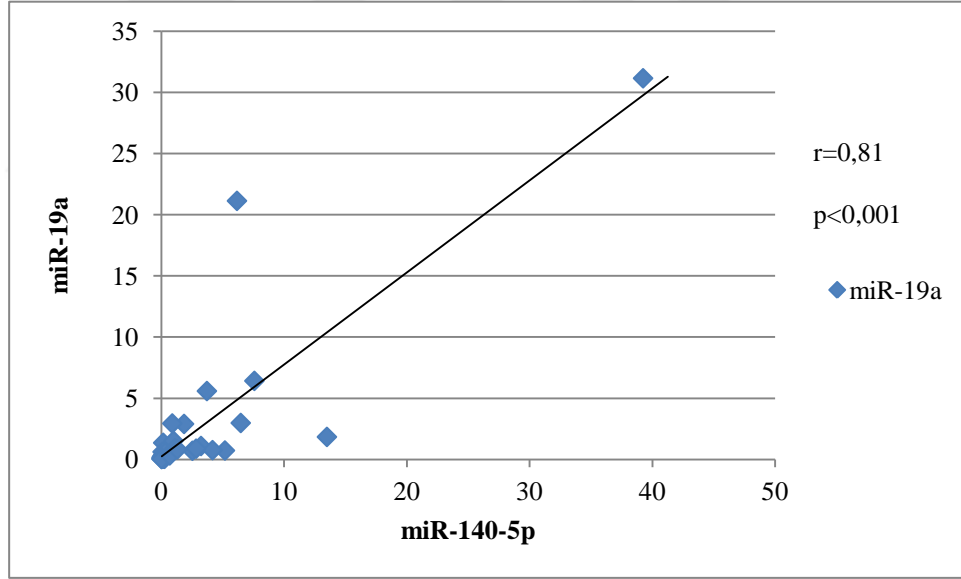
12. miR-29b-3p ve miR-155-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,45$ ,  $p=0,004$ ) (Tablo 4.8).
13. miR-29b-3p ile miR-205-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,42$ ,  $p=0,007$ ) (Tablo 4.8).
14. miR-29c-3p ile miR-29a-3p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,43$ ,  $p=0,005$ ) (Tablo 4.8).
15. miR-29c-3p ile miR-140, miR-143, miR-21, miR-19a, miR-155 ve miR-205 arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.8).
16. miR-29c-3p ile miR-320a arasında pozitif yönde zayıf düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,36$ ,  $p=0,024$ ) (Tablo 4.8).
17. miR-29c-3p ile miR-130a-3p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,44$ ,  $p=0,004$ ) (Tablo 4.8).
18. miR-29a-3p ile miR-143 ve miR-21 arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.8).
19. miR-29a-3p ile miR-19a arasında pozitif yönde zayıf düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,31$ ,  $p=0,049$ ) (Tablo 4.8).
20. miR-29a-3p ile miR-320a arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,52$ ,  $p=0,001$ ) (Tablo 4.8).
21. miR-29a-3p ile miR-130a-3p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,46$ ,  $p=0,003$ ) (Tablo 4.8).

22. miR-29a-3p ile miR-155-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,56$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).

23. miR-29a-3p ile miR-205-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,46$ ,  $p=0,003$ ) (Tablo 4.8).

24. miR-19a ile miR-320a arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,56$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).

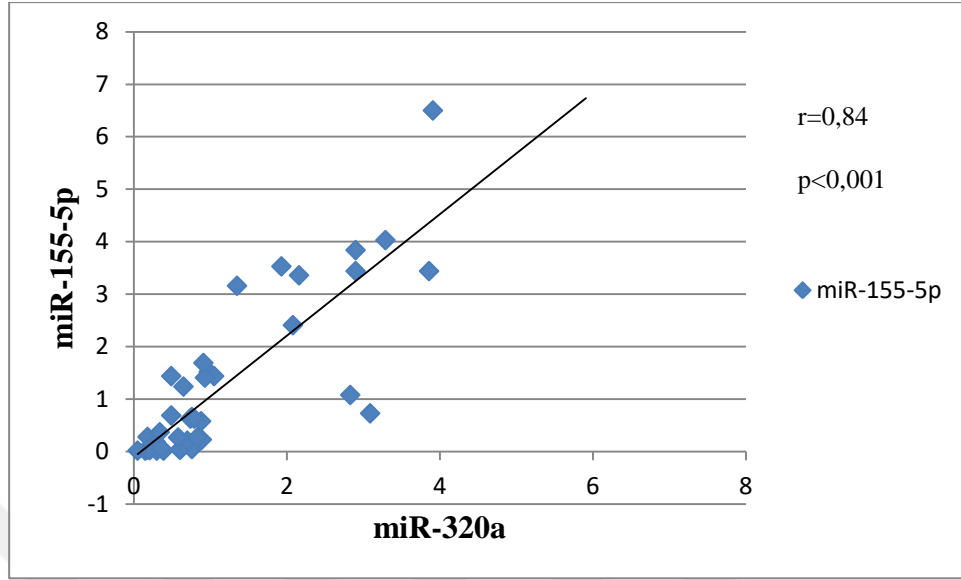
25. miR-19a ile miR-140-5p arasında pozitif yönde yüksek düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,81$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8; Şekil 4.11).



Şekil 4. 11: miR-19a ile miR-140-5p arasındaki korelasyon grafiği

26. miR-19a ile miR-130a-3p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,55$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).

27. miR-19a ile miR-143 arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.8).
28. miR-19a ile miR-155-5p arasında pozitif yönde yüksek düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,70$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).
29. miR-19a ile miR-205-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,63$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).
30. miR-19a ile miR-21-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,58$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).
31. miR-320a ile miR-140-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,63$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).
32. miR-320a ile miR-130a-3p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,57$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).
33. miR-320a ile miR-143 arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.8).
34. miR-320a ile miR-155-5p arasında pozitif yönde yüksek düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,84$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8, Şekil 4.12).



Şekil 4. 12: miR-155-5p ile miR-320a arasındaki korelasyon grafiği

35. miR-320a ile miR-205-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,64$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).

36. miR-320a ile miR-21-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,67$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).

37. miR-140-5p ile miR-130a-3p arasında pozitif yönde zayıf düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,33$ ,  $p=0,039$ ) (Tablo 4.8).

38. miR-140-5p ile miR-155-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,68$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).

39. miR-140-5p ile miR-205-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,49$ ,  $p=0,001$ ) (Tablo 4.8).

40. miR-140-5p ile miR-143 arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.8).

41. miR-140-5p ile miR-21-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,67$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).
42. miR-143 ile miR-130a-3p, miR-205-5p, miR-21-5p ve miR-155-5p arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.8).
43. miR-130a-3p ile miR-155-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,55$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).
44. miR-130a-3p ile miR-205-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,61$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).
45. miR-130a-3p ile miR-21-5p arasında pozitif yönde zayıf düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,38$ ,  $p=0,014$ ) (Tablo 4.8).
46. miR-155-5p ile miR-205-5p arasında pozitif yönde yüksek düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,77$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).
47. miR-155-5p ile miR-21-5p arasında pozitif yönde yüksek düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,70$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).
48. miR-205-5p ile miR-21-5p arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,61$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 4.8).

Tablo 4. 8: TGF- $\beta$  ile miR ve miR-miR arasında korelasyon katsayıları (r)

	TGF- $\beta$	miR-29a	miR-29b	miR-29c	miR-19a	miR-20a	miR-140	miR-143	miR-30a	miR-155	miR-205	miR-21
miR-29a	0,28											
miR-29b	0,21	0,27										
miR-29c	-0,05	0,43**	0,35*									
miR-19a	0,45**	0,31*	0,29	0,12								
miR-320a	0,48**	0,52*	0,31	0,36*	0,56***							
miR-140	0,43**	0,27	0,14	-0,05	0,81***	0,63***						
miR-143	-0,12	-0,14	-0,08	-0,04	-0,24	0,05	-0,21					
miR-130a	0,44**	0,46*	0,50**	0,44**	0,55***	0,57***	0,33*	0,11				
miR-155	0,47**	0,56**	0,45**	0,30	0,70***	0,84***	0,68***	-0,16	0,55***			
miR-205	0,75***	0,46**	0,42**	0,13	0,63***	0,64***	0,49**	-0,11	0,61***	0,77***		
miR-21	0,58***	0,28	0,11	0,10	0,58***	0,67***	0,67***	-0,24	0,38*	0,70***	0,61***	

Spearman (rho) korelasyon analizi, \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05

#### 4.4. Lojistik Regresyon Analizi

Ekspresyonu anlamlı çıkan miRNA'ların hasta ve kontrol grubunu yordama gücü lojistik regresyon analizi ile test edildi. miR-29-3p ve miR-143-3p ile oluşturulan modelin verileri gruplara en doğru atayan model olduğu bulundu. miR-29-3p ve miR-143-3p ikili lojistik regresyon analizi ile standart (enter) model kullanılarak denekleri hasta grubunda %95 (H/K, 19/1) ve kontrol grubunda %100 (H/K, 20/0), toplamda %97,5 doğruluk yüzdesi ile atadığı tespit edildi. miR-29-3p'un ve miR-143-3p'nin modele katkısının anlamlı idi ( $p=0,011$ ,  $p=0,016$ ). Hosmer-Lemeshow uyum iyiliği, Cox&Snell square değerleri Nagelkerke R square değerleri ile modelde bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkeni iyi açıkladığı gösterildi. Odds oranı (ExpB) miR-143-3p için 15,402; miR-29a-3p için 0,012; %95 güven aralığı miR-29a-3p için 0,000-0,369; miR-143-3p için 1,663-142,636 bulundu. Regresyon analizi modeli, miR-143-3p'de 1 birimlik artış İPF olma ihtimalini 15,402 kat artırmakta, miR-29a-3p'deki 1 birimlik artış hasta olma olasılığını 83 kat azaltmaktadır şeklinde yorumlandı (Tablo 4.9).

Tablo 4. 9: İPF tanısında miR-29a-3p ve mir-143-3p'nin lojistik regresyon modeli

Bağımsız Değişkenler	İPF Tanısı				Exp(B) %95 Güven aralığı		
	B (SH)	Wald	p değeri	sd	Exp(B)	Alt sınır	Üst sınır
Sabit (Constant)	-2,457 (1,484)	2,742	0,098	1	0,086		
miR-29a-3p	-4,396 (1,734)	6,427	0,011	1	0,012	0,000	0,369
miR-143	2,734 (1,136)	5,798	0,016	1	15,402	1,663	142,636

Hosmer-Lemeshow testi:  $p=0,369$ , Hosmer-Lemeshow Chi-square 38,741  $p=0,000$ , Nagelkerke R square: 0,827 Cox&Snell square: 0,620

#### 4.5. ROC Eğrisi Analizi

miR-29a-3p ve miR-143-3p ROC eğrisi ile analiz edilerek hasta ve kontrol grubunu ayırt etme gücü incelendi.

miR-29a-3p'nin hasta ve kontrol grubunu ayırt etme gücünün istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ( $p<001$ ). Eğri altında kalan alan (EAKA, AUC) %84 bulundu. Kesim noktası 0,335 değeri belirlendi ve bu değerde duyarlılık %70, özgüllük %90 idi (Tablo 4.10, Şekil 4.13).

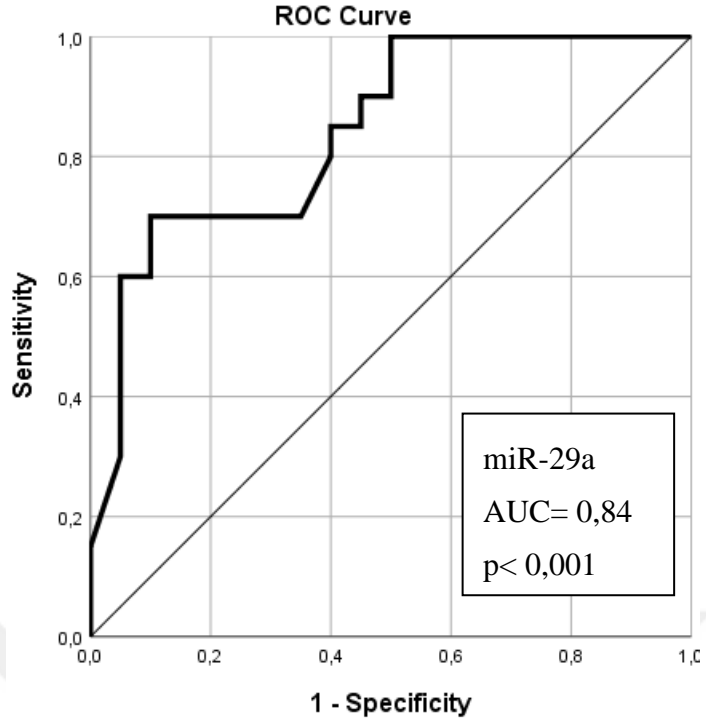
miR-143-3p'nin hasta ve kontrol grubunu ayırt etme gücünün istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ( $p<001$ ). AUC %85 bulundu. Kesim noktası 1,865 değeri belirlendi ve bu değerde duyarlılık %80, özgüllük %80 olduğu görüldü (Tablo 4.10, Şekil 4.14).

miR-29a-3p ve miR-143-3p markırları birlikte değerlendirildiğinde AUC %97 saptandı (Tablo 4.10, Şekil 4.15).

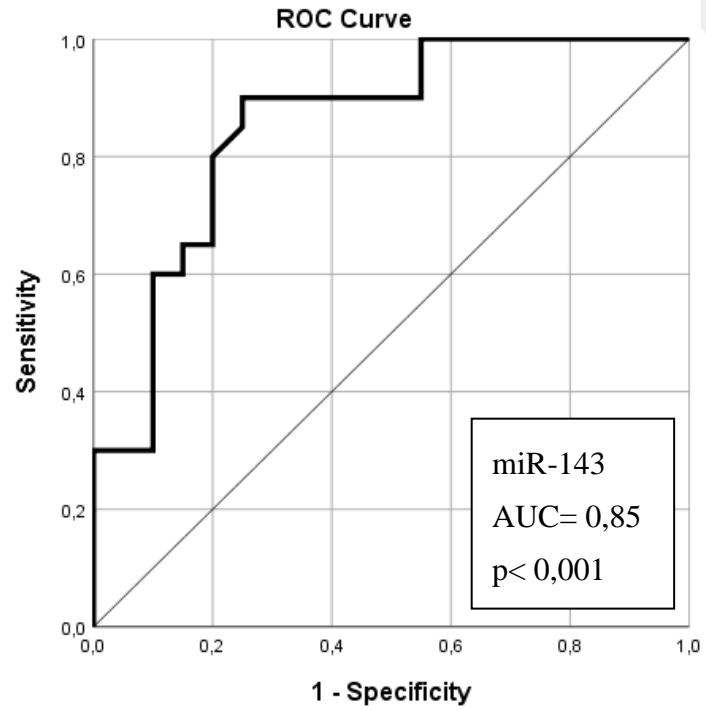
Tablo 4. 10: miR-29a ve miR-143'ün kombine veya tek markır olarak kullanımda tanısal duyarlılığı

miRNA	AUC	%95 CI	p değeri	%90 spesifitede duyarlılık
miR-29a	0,841	0,72-0,96	<0,001 ***	% 70
miR-143	0,854	0,73-0,97	<0,001 ***	% 60
miR-29a+ miR-143	0,970			

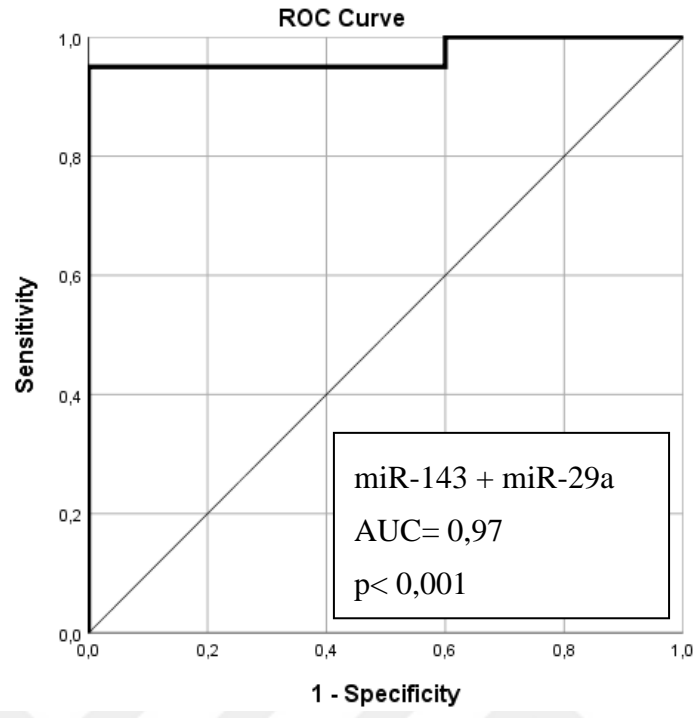
AUC: eğri altında kalan alan, CI: Güven aralığı, \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$ , \* $p<0,05$



Şekil 4. 13: miR-29a ROC eğrisi



Şekil 4. 14: miR-143 ROC eğrisi



Şekil 4. 15: miR-29a ve miR-143 kombine ROC eğrisi

## 5. TARTIŞMA

İPF progresif seyir gösteren, kötü prognozlu kronik interstisyel bir akciğer hastalığıdır. Kronik fibrotik interstisyel pnömoninin en sık görülen türüdür. Genel insidansı 100,000'de 0,48-11,7; ülkemizdeki insidansını 5/100,000'dir (Okumuş ve Bingöl, 2018). Mortalitesi çok yüksek, ortalama sağkalım 3-5 yıldır. Kür sağlayan tedavinin olmaması ve komorbiditelerin eşlik etmesi mortalite oranlarını artırmaktadır (Caminati vd., 2019). İPF etyopatogenezi net olarak bilinmemekle birlikte sigara kullanımı, ileri yaş, çevresel ve mesleki maruziyetler, bazı viral-bakteriyel enfeksiyonlar ile erkek cinsiyet risk faktörleri arasındadır (Richeldi vd., 2017).

İPF ileri yaş hastalığıdır, vakaların büyük çoğunluğu 50 yaş üzerindedir. Ortalama tanı yaşı 66'dır, 75 yaşından sonra prevalans hızla artar (Raghu vd., 2006; Nho, 2015). Çalışmamızda hasta grubunun % 80'i 65 yaş üzerinde, yaş ortalaması  $70,15 \pm 7,63$  idi. TTD'nin ülke genelinde yaptığı bir çalışmada yaş ortalaması  $65,6 \pm 8,3$  olarak bildirilmiştir (Musellim vd., 2021). Uluslararası bir çalışmada da İPF hastalarının tanı anındaki ortalama yaşı 67,6 bulunmuştur (Tran vd., 2020). Çalışmamızda hasta grubu yaş ortalaması literatür ile uyumluydu. Kontrol grubu yaş ortalaması ise hasta grubuna benzer idi.

Erkek cinsiyet İPF için risk faktörüdür. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda vakaların erkek/kadın oranı yüksek bulunmuştur (Nalysnyk vd., 2012). Literatürde 1620 hastayla yapılan bir çalışmada erkek hasta oranı %71'dir (Tran vd., 2020). TTD'nin çalışmasında İPF hastalarının %88'inin erkek hastalardan oluştuğu bildirilmiştir (Musellim vd., 2021). Çalışmamızda erkek hasta sayısı 16, kadın hasta sayısı 4 kişiden oluşmaktadır ve % 80 erkek hasta oranı literatür ile uyumludur. Hasta grubunun cinsiyet dağılımı göz önüne alınarak kontrol grubu oluşturuldu.

Literatürde bulunan İPF çalışmalarında hastaların ortalama VKİ'nin 27,5 ve 28,4 olduğu bildirilmiştir (Tran vd., 2020; Musellim vd., 2021). Çalışmamızda İPF hastalarının ortalama VKİ 29,9 olarak bulundu.

Sigara kullanımı İPF riskini artıran en önemli faktörlerden biridir. İPF tanısı alan hastaların çoğunda halen sigara kullanımı veya geçmişte sigara kullanma öyküsü bulunmaktadır (Oh vd., 2012). TTD'nin çalışmasında sigara öyküsü %84, 7; ortalama miktar

36.0±24.2 paket-yıl'dır (Musellim vd., 2021). Bin altı yüz yirmi hastayla yapılan bir başka çalışmada sigara öyküsü olan hasta oranı %62,9'dur (Tran vd., 2020). Hasta grubumuzda sigara kullanma öyküsü sorgulandığında, %70'inin (n=14) daha önce sigara kullanmış olduğu, %30'unun (n=6) hiç sigara kullanmadığı ve halen aktif kullanıcı olmadığı tespit edildi. Sigara kullananlarda ortalama süre 31,5 paket-yıl olarak saptandı. Hasta grubunda sigara kullanma oranı ve miktarı literatür verileriyle uyum göstermekteydi.

İPF'nin çevresel ve mesleki maruziyetler ile ilişkisi tanımlanmıştır. TTD'nin çalışmasında İPF hastalarında çevresel ve mesleki maruziyet oranı %30 olarak bildirilmiştir (Musellim vd., 2021). Bir diğer çalışmada İPF için risk oluşturacak mesleki maruziyet oranı %68 olarak bildirilmiştir (Ekström vd., 2014). Hastalarımızın %50'sinde (n=10) mesleki maruziyet, %70'inde (n=17) ise çevresel maruziyet öyküsü vardı. Hastaların %65'i asbest maruziyeti tanımladı. Tek başına asbest maruziyeti %30 (n=6) oranında iken, %35'i (n=7) asbeste ek olarak diğer çevresel maruziyetler de tanımlandı. Çevresel risk faktörü ve/veya mesleki maruziyetler hasta grubunun %90'unda bulundu. Bu oran literatür verilerinden yüksek idi.

Hastalarda efor dispnesi ve kronik öksürük sık görülen semptomlardır. TTD'nin çalışmasında İPF'li hastaların %85,3'ünde dispne, %80'inde öksürük semptomları bulunmaktadır (Musellim vd., 2021). Bizim hasta grubumuzda da %80 öksürük, %80 dispne semptomları bulunmaktaydı. Hasta grubu semptomlar açısından incelendiğinde ülke çapında ve semptom oranı %79,4 saptanan uluslararası epidemiyolojik çalışmalara benzerlik göstermekteydi (Tran vd., 2020).

İPF'nin en önemli fizik muayene bulguları çomak parmak ve akciğer oskültasyonunda velkro rallerin varlığıdır. Çalışmaya dahil edilen hastalarımızın %90'ında velkro ral, %70'inde çomak parmak saptanmıştır. TTD'nin çalışmasında İPF'li hastaların %92'sinde velkro ral bildirilmiş olup bizim verilerimiz ile uyumludur ancak, çomak parmak varlığı %38,7'sinde bildirilmiştir (Musellim vd., 2021) ve bizim hasta grubumuzda çomak parmak varlığı daha yüksek oranda bulunmaktaydı.

Klinik bulguları İPF ile uyumlu olgularda HRCT'de UIP paterni görülmesi İPF tanısı koymak için yeterlidir. HRCT'nin tanı için yeterli olmadığı durumlarda akciğer biyopsisi ve histopatolojik inceleme gereklidir. Literatür verileri İPF tanısı için akciğer biyopsisine %20-30 oranında ihtiyaç duyulduğunu bildirmektedir (Guenther vd., 2018). Hasta grubumuzun

%90'ında tanı için klinik bulgular ve HRCT yeterli bulunmuş, fakat % 10'u histopatolojik inceleme sonrası tanı almıştır.

İPF tedavisinde etkinlikleri gösterilmiş olan pirfenidon ve nintedanib, antifibrotik etkili ilaçlardır. Hasta grubumuzun %75'i (n=15) pirfenidon, %25'i (n=5) nintedanib tedavisi almakta idi. Her iki ilaç da birden fazla moleküler yolağı hedeflemektedir, fakat etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (Margaritopoulos vd., 2016). Bu ilaçların miRNA ekspresyonlarını, TGF- $\beta$  sentezini ve fibrotik belirteçleri değiştirdiğine dair kültür çalışmaları bulunmaktadır (Rønnow vd., 2020). Nintedanib ile tedavi edilen İPF fibroblastlarında bazı gen ve miRNA ekspresyonlarının değiştiği saptanmıştır (Sheu vd., 2019). Escutia-Gutiérrez ve ark.'larının nonalkolik hepatosteatoz hayvan modeline pirfenidon uygulamasının; miR-21a-5p, miR-34a-5p ve miR-103-3p ekspresyon düzeylerini downregüle ettiği gözlenmiştir (Escutia-Gutiérrez vd., 2020). İPF'de bu ilaçların miRNA ekspresyonu üzerine etkisini araştıran klinik çalışma bulunmamaktadır.

Pirfenidon inflamatuvar hücreleri, fibrojenik büyüme faktörlerini, sitokinleri baskılayarak fibroblast proliferasyonunu, myofibroblast dönüşümünü, kollajen ve ECM sentezini azaltan antiinflamatuvar ve antifibrotik etkili bir ilaçtır (Ruwana, Thomas ve Bardin, 2020). Pirfenidonun TGF- $\beta$  ekspresyon düzeylerini baskıladığını gösteren çeşitli hücre kültürü çalışmaları bulunmaktadır (Pourgholamhossein vd., 2018; Guo vd., 2019; Tao vd., 2020).

Nintedanib, İPF patogenezinde etkili profibrotik moleküller olan FGF, PDGF ve VEGF reseptörlerini hedefleyen çoklu tirozin kinaz reseptör inhibitörüdür (Wollin vd., 2015). Nintedanib'in insan akciğer fibroblastlarında; fibroblast proliferasyonunu, fibroblast motilitesini, TGF- $\beta$  ile uyarılan myofibroblast farklılaşmasını ve kollajen birikimini azalttığı gösterilmiştir. Hayvan modellerinde de akciğerde kollajen içeriğini, morfometrik fibroz skorlarını, TGF- $\beta$  ve prokollajen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiş, İPF tedavisinde antiinflamatuvar ve antifibrotik etkileri olduğu saptanmıştır (Kolb vd, 2017).

TGF- $\beta$  hücre proliferasyonu, apoptoz, farklılaşma, otofaji, immün yanıt ve yara iyileşmesi gibi biyolojik yanıtları düzenleyen, fibrotik hastalıkların patogenezinde yer alan en önemli sitokindir (Meng vd., 2016). TGF- $\beta$ 'nın pulmoner, hepatik, renal ve kardiyak fibrozis patogenezinde etkinliği doku ekspresyon çalışmaları, hayvan deneyleri ve hücre kültürü çalışmaları ile tespit edilmiştir (Bowen vd., 2013). TGF- $\beta$ , doku hasarı sonrası yara iyileşmesi döneminde ECM bileşenleri ve EMT aktivasyonu için gerekli transkripsiyon

faktörlerinin gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu fonksiyonlarını, profibrotik veya antifibrotik miRNA'ları regüle ederek yerine getirebilmekte; miRNA'lar da TGF- $\beta$ , reseptörleri veya aşağı yolak moleküllerinin ekspresyonlarını düzenleyerek fibrotik süreci etkilemektedir (Suzuki, 2018). İPF hastaları ve kontrol grubu plazma örneklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada hasta grubunda TGF- $\beta$  protein düzeyleri daha yüksek bulunmuştur, fakat hastaların tedavileri pirfenidon ve nintedanib gibi güncel antifibrotik ilaçları içermemektedir (Molina-Molina vd., 2006). Çalışmamızda TGF- $\beta$  ekspresyon düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı downregüle bulundu ( $p=0,046$ ). Hastalarımızın tümü antifibrotik tedavi almakta olup, hasta grubumuzda saptanan downregülasyon beklenen bir durumdur. Ekspresyon düzeyi grup ortalamasından yaklaşık 8 kat yüksek çıkan iki numaralı hasta kontrol SFT, HRCT ile klinik yönden değerlendirildiğinde progresyon gözlemlendi. Bu durum tek hasta verisi olmasına rağmen, TGF- $\beta$ 'nın progresyon takibi veya antifibrotik ilaç yanıtının izlenmesi için kullanılabilir bir serum biyomarkırı olabileceğini; bu konuda ileri çalışmaların yapılabileceğini göstermiştir.

CCN2; hücre adezyonu, proliferasyon, sağkalım, migrasyon ve ECM üretimi gibi biyolojik fonksiyonlarda görev alır. Ayrıca yara iyileşmesi, inflamatuvar durumlar, karsinogenez süreci ve en önemlisi fibrozis ile seyreden hastalıkların patogenezinde rol aldığı bilinmektedir (Hall-Glenn ve Lyons, 2011). Kronik inflamasyon veya doku hasarı sonrası ekspresyonu artmakta; artmış kollajen üretimi, ECM birikimi, myofibroblast farklılaşması ve proliferasyon gibi fibrotik patogenezinde rol almaktadır. İPF'li hastaların fibroblast kültürlerinde, BAL hücrelerinde, plazma ve akciğer dokusunda CCN2 ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir (Ramazani vd., 2018). Başta TGF- $\beta$  olmak üzere bazı sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar CCN2 ekspresyonunu düzenlemektedir. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasındaki CCN2 ekspresyon düzeylerini incelediğimizde iki grup arasında anlamlı fark gözlemlenmedi. CCN2 ekspresyon çalışmaları daha büyük örneklerde, antifibrotik tedavi öncesi ve sonrası ekspresyon analizlerinin yapıldığı bir çalışma daha anlamlı sonuçlar verebilir.

miRNA'lar protein kodlamayan fakat gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alan, 18-22 nt uzunluğunda küçük RNA molekülleridir (Zamani, 2013). Protein kodlayan genlerin %60'tan fazlası miRNA'lar tarafından regüle edilmektedir (Souma vd., 2018). Bir miRNA birden fazla genin ekspresyonunu düzenleyebilir, bir genin ekspresyonu birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir (Miao vd, 2018). Bu nedenle miRNA'lar; biyolojik süreçlerde, çoklu yolaklar üzerinden etki gösterebilen kompleks fonksiyona sahip moleküllerdir.

mikroRNA'lar gelişim, hücre döngüsü, farklılaşma, proliferasyon, hücre göçü ve apoptozis gibi işlevleri regüle etmektedir (Huleihel vd., 2014). Kanser, nörolojik hastalıklar, fibrotik hastalıklar ve inflamatuvar hastalıklar gibi birçok hastalık patogenezinde veya progresyonunda fonksiyon göstermektedir (Souma vd., 2018).

miRNA'lar dokuya özgü tespit edilebildiği gibi idrar, tükürük, plevral sıvı, balgam gibi vücut sıvılarına ve dolaşım sistemine salınabilmekte; vücut sıvılarından ve periferik kandan izole edilebilmektedir. Hasta kişilerde yapılan araştırmalar, hayvan modelleri ve hücre kültürü çalışmaları ile hastalığa özgü miRNA ekspresyon değişiklikleri, miRNA'ların hedeflediği genler, miRNA'ların ekspresyonunu etkileyebilecek genetik ve çevresel faktörler tespit edilebilmektedir. miRNA ekspresyon değişiklikleri hastalıkların tanısını, progresyonunu, tedaviye yanıt veya ilaç direncini belirlemede kullanılabilir (Hanna, Hossain ve Kocerha, 2019).

miR-29 ailesi, ECM proteinlerinin güçlü bir düzenleyicisidir (Tsitoura vd., 2016). Fibrotik hastalıkların patogenezinde antifibrotik etkili olduğu kanıtlanmış, bu nedenle fibromiRNA olarak da adlandırılmıştır. Kalp, renal, hepatik, akciğer fibrozisi ve skleroderma gibi çeşitli fibrotik hastalıklarda ekspresyonunun azaldığı, miR-29 mimiklerinin bu hastalıkların tedavisinde etkili olduğu deneysel modellerle gösterilmiştir (Montgomery vd., 2014). Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda miR-29a, miR-29b ve miR-29c ekspresyon düzeyleri incelendi ve hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde downregüle olduğu saptandı (sırasıyla;  $p < 0,001$ ,  $p = 0,046$ ,  $p = 0,012$ ). Oak ve ark. İPF hastalarının akciğer biyopsilerinde yaptıkları miRNA ekspresyon analizinde miR-29a, miR-29b ve miR-29c ekspresyonlarının downregüle olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca progresyon açısından da değerlendirdiklerinde hızlı progrese ve yavaş progrese hastalarda fark olmadığını bildirmişlerdir (Oak vd., 2011) (Tablo 5.1). Yang T. ve ark. insan akciğer fibroblast hücre hattında yaptıkları çalışmada TGF- $\beta$  uyarımının miR-29a/b/c ekspresyonlarını azalttığını, TGF- $\beta$ 'nin miR-29 aile üyelerinin ekspresyonunu baskılayarak hücre dışı matriks sentezini ve fibroblastların proliferasyonunu artırdığını bildirmişlerdir (Yang T. vd., 2013). TGF- $\beta$  ve miR-29a/29b/29c-3p ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile incelendi, fakat anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bu durum hastaların antifibrotik tedavi alması nedeniyle TGF- $\beta$  ekspresyon düzeylerinin downregüle olmasından kaynaklanıyor olabilir. miR-29 ailesinin ekspresyonunu TGF- $\beta$  dışında etkileyen diğer faktörlerin miR-29 ekspresyonunu baskılamaya devam ettiğini düşündürmektedir. Ayrıca hücre kültürü ve hayvan modeli çalışmaları kısa süreli çalışmalardır, İPF hastalarımız ise

uzun süreli fibrotik sürece maruz kalmış, yerleşmiş fibrotik odakları olan hastalardır. Antifibrotik tedavi kullanmamış daha büyük örnek gruplarında miR-29 ve TGF- $\beta$  ilişkisini değerlendirmek daha anlamlı sonuçlar verebilir.

miR-30 ailesi doku ve organ gelişimde ve kanser, kardiyovasküler hastalıklar, fibrozis gibi bazı hastalıkların patogenezinde rol alır. miR-30 ailesi XBP1, TGF- $\beta$ 1, CCN2 ekspresyonlarını regüle ederek otofaji, apoptoz, oksidatif stres ve inflamasyonu düzenler (Zhang X. vd., 2019). İPF’de miR-30 ailesinin downregüle olduğunu gösteren biyopsi çalışmaları mevcuttur (Berschneider vd., 2014; Liang vd., 2014; Oak vd., 2011; Pandit vd., 2010). Çalışmamızda miR-30a-5p, miR-30b-5p, miR-30d-5p, miR-30e-5p ekspresyon düzeyleri, hasta ve kontrol grubu periferik kan örneklerinde karşılaştırıldı, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (sırasıyla; p=0,414, p=0,265, p=0,157, p=0,183). Literatür taramalarında serum/plazmada miR-30 ailesinin disregülasyonunu gösteren çalışma bulunmamaktadır. Eş zamanlı doku ve plazma örneklerinde miR-30 ekspresyonu değerlendirilerek, İPF hastalarında serum biyomarkırı olarak kullanılabileceğinin araştırılması gerekir. miR-30’un, CCN2 geni 3’UTR bölgesi ile direkt bağlanarak genin ekspresyonunu ve buna bağlı kollajen birikimini azalttığı bildirilmiştir (Duisters vd., 2009), çalışmamızda miR-30 üyeleri ve CCN2 ekspresyonu gruplar arasında anlamlı fark göstermediği için korelasyon analizi yapılmadı.

miR-145,  $\alpha$ -SMA ekspresyonunun negatif regülatörü olan Krüppel-like Factor 4 (KLF4) transkripsiyon faktörünü baskılayan profibrotik etkili bir miRNA’dır. Normal fibroblastlar ve İPF fibroblastlarında gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında; normale kıyasla İPF fibroblastlarında ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Yang S. vd., 2013). İPF’li hastaların balgamlarında yapılan bir ekzozom çalışmasında miR-145 ekspresyonunun hasta grubunda kontrol grubuna göre upregüle olduğu bildirilmiştir (Njock vd., 2019). Biz çalışmamızda hasta ve sağlıklı gönüllülerden aldığımız periferik kan örneklerinde mir-145 ekspresyon düzeylerini karşılaştırdık. miR-145 için, hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadı. Upregülasyon bildiren literatür çalışmaları hücre kültürü ve az sayıda hasta ile yapılan çalışmalardı, büyük hasta grupları ile serumda bakılmış miR-145 ekspresyon çalışması bulunmamaktaydı. Çalışmamızın örneklem boyutunun küçük olması, hastaların antifibrotik tedavi etkisinde olması veya serum miR-145 seviyelerinin akciğer dokusundaki ekspresyon profilini iyi yansıtamaması gibi olasılıklar sonuçlarımızı etkilemiş olabilir. miR-145 ayrıca çeşitli kanserlerde tümör supresör etkili miRNA’dır (Liu vd., 2018; Yanaihara vd., 2006). P53 geni miR-145’in promotör bölgesine

direkt bağlanarak ekspresyonunu artırabilmekte; miR-145 de c-MYC, EGFR, Ras gibi onkogenik etkili genlerin ekspresyonlarını baskılamaktadır. Akciğer adenokarsinomlarında biyopsi ile elde edilen kanser dokuları ile non-kanseröz dokular arasında ekspresyonu incelendiğinde, kanser dokusunda downregüle olduğu ve downregülasyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiş; downregülasyonu ayrıca kemorezistans ve beyin metastazı ile ilişkili bulunmuştur (Mizuno vd., 2017; Yanaihara vd., 2006). Hasta ve kontrol grubu arasında miR-145 ekspresyonları için anlamlı fark olmamasına rağmen 12 nolu hastanın miR-145 düzeyleri yaklaşık 10 kat daha yüksekti. Hastanın rutin kontrolleri sırasında çekilen HRCT'sinde pulmoner nodüle rastlandı. Hastanın genel durumu bozuk olduğu için transtorasik iğne biyopsisi ile patolojik değerlendirme yapılamadı, fakat İPF hastalarda akciğer kanseri insidansı yüksek olması nedeniyle (Kato vd., 2018), klinik değerlendirme ve görüntüleme bulguları ile lezyonun ağırlıklı olarak malign natürde olabileceği düşünüldü. Hastanın takip sürecinde prognozu ve sağkalımı gözlenecek, miR-145'in akciğer kanseri tanı ve progresyonunu belirlemede kullanılabileceğine dair fikir sunacaktır. Özellikle İPF gibi kanser predispozisyonu oluşturan, komplikasyonları nedeniyle biyopsi yapılamayan durumlarda bu tür serum markırları tanı ve takipte kullanılabilir. Bu konuda akciğer kanserlerinde yapılacak geniş ölçekli çalışmalar daha anlamlı sonuçlar verebilir. Yine ilgi çekici bir şekilde, 15 nolu hastada, miR-145 ekspresyonu hasta grubunun ortalamasından yaklaşık 30 kat yüksek bulundu ve hasta bir ay içerisinde hayatını kaybetti. Ölüm nedeni bilinmemekle birlikte miR-145'in upregülasyonunun prognostik markır ve mortalite göstergesi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Daha büyük hasta gruplarında, hasta takip sürecinde ardışık bakılan ekspresyon değerlendirmeleri miR-145'in prognostik değerini belirlememizi sağlayabilir.

miR-155 hematopoietik farklılaşma, immünite, inflamasyon, kanser, fibrozis ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol alan çok fonksiyonlu miRNA'dır. AT1R, HIF-1, SMAD5, SLA ve RHOA; miR-155-5p'in ekspresyonunu regüle ettiği genlerden bazılarıdır (Faraoni vd., 2009). miR-155 -/- farelerle yapılan bleomisinle indüklenen akciğer fibrozisi çalışmasında, miR-155 -/- farelerde aşırı fibrozis, TGF- $\beta$  sekresyonunda ve kollajen birikiminde artış saptanmıştır. miR-155'in bu etkileri, akciğer fibroblast ve makrofajlarında LXR- $\alpha$  gen ekspresyonunun deregülasyonu ile yaptığı gösterilmiş, downregülasyonunun fibrozisle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Kurowska-Stolarska vd., 2017). Mullenbrock ve ark. İPF fibroblast kültüründe yaptığı ekspresyon çalışmasında miR-155 düzeylerinin kontrol grubuna göre downregüle olduğunu

saptamıştır (Mullenbrock vd., 2018) (Tablo 5.1). Fakat, İPF'li hastaların akciğer biyopsi dokusu ile kontrol grubunun karşılaştırıldığı çeşitli miRNA ekspresyon çalışmalarında, miR-155 ekspresyonu İPF'li hastalarda upregüle tespit edilmiştir (Oak vd., 2011; Pandit vd., 2010; Yang ve Schwartz, 2015)(Tablo 5.1). Li ve ark.'ları İPF'li hastalar ve kontrol grubu serum örnekleri ile yaptığı ekspresyon çalışmalarında miR-155'in upregülasyonunu saptamıştır (Li vd., 2013). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre hasta ve kontrol grubu arasında miR-155-5p ekspresyon farkı istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı bulundu ( $p=0,001$ ). Li ve ark.'larının verilerinin aksine hasta grubumuzun serumunda miR-155 düzeyi downregüle idi. Escutia-Gutiérrez ve ark.'larının nonalkolik hepatosteatoz hayvan modelinde pirfenidon tedavisinin, incelenen miRNA ekspresyon düzeylerini downregüle ettiği gözlenmiştir (Escutia-Gutiérrez vd., 2020). Her ne kadar farklı bir hastalık modeli kullanılmış ve ekspresyonu araştırılan miRNA'lar arasında miR-155 bulunmasa da, bu çalışma pirfenidonun miRNA'ların ekspresyonunu değiştirebilceğinin gösterdi; hasta grubumuzda saptadığımız downregülasyonun sebebi antifibrotik tedavinin sonucu olabilir. İPF'li hastalarda antifibrotik tedavinin miR-155 üzerine etkisini araştıran literatür verisi bulunmamaktadır. Antifibrotik tedavi öncesinde ve tedavi sonrasında yapılacak klinik çalışmalar hem miR-155'in fibrozisteki rolünü açıklayacak hem de antifibrotik ajanlar ile tedavinin miR-155 ekspresyonu üzerindeki etkisini anlamamıza yardımcı olacaktır.

Let-7, çeşitli hücrel yolakları regüle eden, ilk tanımlanmış miRNA ailesidir (Lagos-Quintana vd., 2001). Tümör süpresör etkili olduğu çeşitli kanserlerde saptanmıştır. Kanser ve fibrotik hastalıklarda EMT'yi baskıladığı gösterilmiştir (Huleihel vd., 2014). TGF- $\beta$  ve SMAD3, let-7d ekspresyonunu baskılamaktadır (Pandit vd., 2010). İPF'li hastaların akciğer biyopsilerinde ve balgam ekzozom çalışmasında let-7d'nin kontrollere kıyasla downregüle olduğu bulunmuştur (Berschneider vd., 2014; Njock vd., 2019; Oak vd., 2011; Pandit vd., 2010)(Tablo 5.1). Let-7d inhibisyonunun; epitelyal gen ekspresyonlarını downregüle ettiği, mezenkimal hücrelerde gen ekspresyonlarını upregüle ettiği ve EMT aktivasyonu ile İPF patogeneze katkı sağlayabileceği gösterilmiştir (Huleihel vd., 2014). Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında let-7d ekspresyon farkını inceledik. İki grup arasında anlamlı istatistiksel fark olmasa da istatistiksel farka yakın değerde ( $p= 0,08$ ), hasta grubunda let-7d ekspresyon ortalaması daha yüksek saptandı. Bu durum hastalarda antifibrotik tedavinin sonucunda azalmış TGF- $\beta$  seviyesinin, let-7d üzerindeki inhibisyonunun azalmasına bağlı olabilir. Fakat miRNA regülasyonunu tek yolak üzerinden

değerlendirmenin doğru olmadığı bilinmektedir. Daha büyük örneklerde yapılacak iyi planlanmış araştırmalar daha anlamlı sonuçlar verecektir.

miR-26a, İPF patogeneğinde etkili COL3A1, COL1A2, OGN, COL15A1, ASPN ve MXRA5 genlerini düzenleyen, downregülasyonu CCN2 ve EMT artışına neden olan antifibrotik etkili miRNA'lardan biridir (Yu vd., 2020). Bleomisin ile indüklenmiş fare pulmoner fibrozis modellerinde, intratrakeal miR-26a mimik tedavisinin kollajen birikimini, CCN2 ekspresyonunu ve fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (Liang vd., 2014). Pandit ve ark.'ları İPF'li hastaların akciğer dokusunda yaptığı ekspresyon analizinde miR-26a'yı downregüle bulunmuştur (Pandit vd., 2010)(Tablo 5.1). Çalışmamızda miR-26a-5p ekspresyonu hasta ve kontrol grubunda karşılaştırıldı, istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon farkı saptanmadı. Çalışma grubumuz uzun süredir antifibrotik tedavi alan hastalardan oluştuğu için bu durumun miR-26a-5p ekspresyonunu etkilemiş olabileceği düşünüldü. Njock ve ark.'ları balgamda ekzozom elde ederek miR-26a downregülasyonunu tespit etmişlerdir fakat literatür taramalarında İPF'li hastaların serumunda miR-26a ekspresyonunu tespit etmiş veya spesifik olarak serumda miR-26a'yı araştırmış çalışma bulunmamaktadır. Daha büyük örnek gruplarında, tedavi öncesi ve sonrası yapılacak ekspresyon çalışmaları ile anlamlı veriler elde edilebilir.

miR-143, İPF'de downregülasyonu tespit edilmiş, hipertrofik skarda CCN2'yi baskıladığı, ECM sentezini azalttığı gösterilmiş antifibrotik etkili olduğu düşünülen miRNA'dır (Mizuno vd., 2017; Mu vd., 2016). Oak ve ark.'larının İPF hastaları akciğer biyopsilerinde yaptığı ekspresyon çalışmasında downregülasyonu gösterilmiş, hızlı progresyon ve yavaş progresyon gösteren hastalar arasında fark olmadığını bildirilmiştir. (Oak vd., 2011) (Tablo 5.1). Buna rağmen, insan akciğer fibroblastlarının TGF- $\beta$  ile uyarılması sonucunda fibroblast farklılaşmasını aktive ettiği, profibrotik rol oynadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Wei vd., 2019; Yang, S. vd., 2013) (Tablo 5.1). Milosevic ve ark.'larının akciğer biyopsisinde yaptığı ekspresyon analizlerinde, İPF'li hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde upregülasyon saptanmıştır (Milosevic vd., 2012) (Tablo 5.1). Hasta ve kontrol grubu serum örneklerinde miR-143-3p ekspresyon düzeylerinin karşılaştırıldığı çalışmamızda, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde anlamlı bulunmuş ( $p < 0,001$ ), hasta grubunda miR-143-3p upregülasyonu tespit edilmiştir. Literatür araştırmalarımıza göre serumda miR-143-3p disregülasyonu bildiren İPF çalışması bulunmamaktadır. Bulgularımız, miR-143'ün upregülasyonunu gösteren çalışmalar ile uyumlu bir şekilde miR-143 upregülasyonunun İPF patogeneğinde

etkili olduğunu, serum örneklerinde de tespit edilebileceğini göstermektedir; ancak hastalarımız antifibrotik tedavi almakta olup antifibrotik ilaçlar, İPF patogenezinde downregülasyonu ile etki gösteren miR-143'ün ekspresyonunu artırarak etki gösteriyor da olabilir. Yang, S. ve ark.'ları hücre kültürü çalışmasında TGF- $\beta$  uyarımının miR-143 upregülasyonuna yol açtığını bildirmişlerdir (Yang S. vd., 2013). Bu sonuçlara göre TGF- $\beta$  ile miR-143 arasında pozitif korelasyon beklenmektedir. TGF- $\beta$  ile miR-143 arasındaki ilişkiyi incelediğimizde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmamıştır ( $p= 0,471$ ;  $r=-0,12$ ). Hücre kültürü çalışmaları hastalık modelini tam olarak yansıtamamaktadır. miR-143'ün İPF'de disregülasyonunun yönünü tanımlamak ve TGF- $\beta$  ile ilişkisini araştırmak için daha geniş ölçekli, antifibrotik tedavi öncesi ve sonrası ekspresyon analizlerini içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

miR-21 gelişim, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, inflamasyon, kardiyak ve pulmoner fibrozis gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol alır (Kumarswamy, Volkman ve Thum, 2011). Onkogenik etkili olduğu kanıtlanmış bu nedenle oncomiR olarak sınıflandırılmış, disregülasyonu çeşitli kanser tiplerinde gösterilmiştir (Hill ve Tran, 2021). İPF'de profibrotik etkili olduğu ve İPF'li hastaların doku ve serum örneklerinde upregüle olduğunu gösteren çeşitli literatür verileri bulunmaktadır (Oak vd., 2011; Li vd., 2013). İPF patogenezinde en etkin rolü üstlenen TGF- $\beta$  ile aralarında pozitif korelasyon bildirilmiştir. Bleomisinle İPF modeli oluşturulmuş farelerde yapılan çalışmada TGF- $\beta$ 'nın miR-21 ekspresyonunu aktive ettiği, miR-21'in de TGF- $\beta$ 'nın profibrotik etkilerini güçlendirdiği gösterilmiştir (Yang ve Schwartz, 2015). Hasta ve kontrol grubu arasında miR-21-5p ekspresyon farkını araştırdığımız çalışmamızda, miR-21-5p düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı düşük bulundu. Escutia-Gutiérrez ve ark.'larının nonalkolik hepatosteatoz hayvan modelinde pirfenidon tedavisinin miR-21 ekspresyon düzeylerini downregüle ettiği gözlenmiştir (Escutia-Gutiérrez vd., 2020). Her ne kadar farklı bir hastalık modeli kullanılmış olsa da, bu çalışma pirfenidonun miR-21 ekspresyonunu değiştirebilceğinin göstergesidir; hasta grubumuzda saptadığımız downregülasyonun sebebi antifibrotik tedavinin sonucu olabilir. TGF- $\beta$  ile miR-21-5p arasında ilişkiyi incelediğimizde, pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,58$ ,  $p<0,001$ ). Bu korelasyon literatür çalışmaları ile uyumlu idi. miR-21-5p downregülasyonu, direkt antifibrotik tedavinin etkisi ile olabileceği gibi antifibrotik tedavinin TGF- $\beta$  üzerindeki inhibisyonunun dolaylı etkisi de olabilir. İPF'li hastalarda antifibrotik tedavinin miR-21 üzerine etkisini araştıran literatür verisi bulunmamaktadır.

Antifibrotik tedavi öncesinde ve tedavi sonrasında yapılacak klinik çalışmalar antifibrotik ajanlar ile tedavinin miR-21 ekspresyonu üzerindeki etkisini anlamamıza yardımcı olacaktır. Profibrotik etkinliği kanıtlanmış miR-21 ekspresyon düzeylerini kullanarak antifibrotik ilaç etkinliği test edilebilecektir.

miR-133, CCN2 3'UTR'si ile direkt bağlanarak bu genin ekspresyonunu posttranskripsiyonel aşamada düzenlemekte, buna bağlı kollajen birikimini azaltmaktadır (Duisters, 2009). Özellikle kardiyak fibrozis patogeneğinde etkinliği gösterilmiştir. miR-133 ekspresyonunun downregülasyonu miyokardiyum düz kas genlerinin ektopik ekspresyonuna, anormal kardiyomiyosit proliferasyonuna neden olmakta; upregülasyonu serin/treonin kinaz Akt'ı inhibe ederek kardiyak fibrozisi önemli ölçüde azaltmaktadır (Li, Zhou ve Tang, 2018). Hasta ve kontrol grupları arasında miR-133 ekspresyon düzeylerini karşılaştırdığımızda istatistiksel düzeyde anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,547$ ). miR-133'ün literatürde hepatik ve kardiyak fibrozis ile ilişkisi bildirilmiş olmasına rağmen İPF hastaları veya İPF modeli oluşturulan hayvan ve doku çalışmalarında miR-133 disregülasyonu bildirilmemiştir. Bu durum, miR-133 disregülasyonunun fibrozisin kaynaklandığı organa spesifik olabileceğini düşündürmüştür.

miR-130'un kanser, inflamasyon, fibrotik ve kardiyovasküler hastalıklarda disregülasyonu saptanmıştır. Kanser ve fibrotik hastalıklarda benzer mekanizmalar göstermekte, SMAD4'ü baskılayarak aynı zamanda TGF- $\beta$ 'nın migrasyon, invazyon ve EMT aktivitesini de baskılamaktadır (Tian vd., 2019). Hepatik fibrozis ve pulmoner fibrozisde downregülasyonu saptanmıştır, makrofajların fibrotik gen ekspresyonlarını düzenlemektedir (Su vd., 2015). İPF'de downregülasyonu sonucunda fibroblast ve EMT aktivasyonu artmaktadır (Miao vd., 2018). İPF'li hastaların akciğer dokularında yapılan ekspresyon çalışmalarında downregülasyonu tespit edilmiştir (Oak vd., 2011; Liang vd., 2014) (Tablo 5.1). Çalışmamızda miR-130-3p ekspresyon düzeyi, hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı düşük saptandı ( $p=0,020$ ). Hasta grubunda gözlenen downregülasyon, literatürde bildirilen yayımlar ile uyumlu idi. Literatürde serum veya plazma gibi noninvaziv girişimler ile elde edilmiş örneklerde miR-130 downregülasyonu gösteren çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız, miR-130-3p'nin İPF'de noninvaziv biyomarkör olarak kullanımının mümkün olabileceğini gösteren tek çalışma olabilir.

miR-205 gelişim, farklılaşma ve hücrel stres cevabını düzenleyen miRNA'dır. Çeşitli kanserlerde disregülasyonu gösterilmiş, onkogenik etki ile apoptozis, EMT,

proliferasyon ve metastazda rol aldığı bildirilmiştir (Yu vd., 2008). Epigenetik değişimler, hipoksi ve inflamatuvar sitokinler miR-205 ekspresyonunu değiştiren faktörlerdir (Ferrari ve Gandellini, 2020). Küçük hücre dışı akciğer kanseri ve İPF’de de upregülasyonu hastalık patogenezi ile ilişkili bulunmuştur (Mizuno vd., 2017). İPF ile kontrol grubu akciğer biyopsilerinde karşılaştırılan miR-205 ekspresyonu, İPF’li hastalarda upregüle bulunmuştur (Pandit vd., 2010; Liang vd., 2014) (Tablo 5.1). Fakat çeşitli kanserlerde downregüle bulunmuş, TGF- $\beta$  ile aralarında negatif ilişki olduğu bildirilmiştir (Gregory vd., 2011; Suzuki, 2018). miR-205-5p ekspresyonunu İPF hastaları ve kontrol grubu arasında karşılaştırdığımızda, miR-205-5p’nin hasta grubunda istatistiksel düzeyde anlamlı downregüle olduğu saptandı ( $p=0,003$ ). TGF- $\beta$  ile miR-205-5p arasındaki ilişki incelendiğinde pozitif yönde yüksek düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,75$ ,  $p<0,001$ ). İPF hastalarında upregüle beklediğimiz miR-205-5p’nin downregüle saptanmasının sebebi antifibrotik ilaçlar veya antifibrotik ilaçlar ile ekspresyonu azalmış TGF- $\beta$ ’nin etkisi olabilir. miRNA’lar hastalık ve doku bazında farklı fonksiyonlar göstermektedir, literatürde bulunan pulmoner fibrozis verileriyle bulgularımız uyumludur.

miR-32, dokular arasında farklı fibrotik özellik sergileyebilmekte; farklı kanserlerde tümör supresör veya onkogenik aktivite gösterebilmektedir (Liang vd., 2019; Liu vd., 2019; Wang vd., 2018). Kardiyak fibroblastlar ile yapılan bir kültür çalışmasında TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA, kollajen I ve III ekspresyonunu inhibe eden DUSP1’i baskılayarak fibrozise yol açabileceği gözlenmiştir (Shen vd., 2019). Transplante böbreklerde allogreft disfonksiyonuna yol açan interstisyel fibroziste ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Wang, H. J. vd., 2020). Oak ve ark.’larının İPF ve kontrol grubunun akciğer biyopsilerini karşılaştırdığı çalışmada miR-32 ekspresyonu düşük bulunmuştur (Oak vd., 2011). Çalışmamızda iki grup arasında miR-32-5p ekspresyonu için anlamlı fark yoktu. Fakat üç hastanın miR-32-5p düzeyleri ortalamadan oldukça yüksekti. Sigara öyküsü, erkek cinsiyet ve düşük FEV1 düzeyleri bu 3 hastada bulunan ortak özellikler olmakla birlikte hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadığı için bu özellikler ile korelasyon analizi yapılamadı. Örneklem sayısını artırarak yapılacak İPF ile kontrol grubu miR-32-5p ekspresyon düzeyi karşılaştırma çalışmaları; İPF’li hastaların tanı aşamasında ve takiplerinde bakılacak miR-32-5p ekspresyon düzeyleri ile sigara, cinsiyet ve FEV1 arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar; miR-32-5p’nin İPF’deki fonksiyonunu aydınlatmamıza olanak sağlayabilir.

miR-140-5p, antifibrotik ve tümör süpresör etkilidir, downregülasyonu kanser gelişiminde olduğu kadar progresyonunda da rol alır. İPF patogenezinde de sorumlu olan

sitokinler üzerine etkisi çeşitli kanserlerde gösterilmiştir. Over kanserinde PDGFR-A inhibisyonu ile tümör büyümesini, meme kanserinde ve küçük hücre dışı akciğer kanserinde VEGF-A inhibisyonu ile invazyon, migrasyon ve anjiogenezi inhibe etmektedir (Yang vd., 2018). Ekspresyon kaybının radyasyonun indüklediği pulmoner fibrozis için risk oluşturduğu, TGF- $\beta$ /SMAD3 yolağını inhibe ederek pulmoner fibrozisi azalttığı saptanmıştır (Wang vd., 2019). Renal fibrozis modeli oluşturulan bir fare çalışmasında miR-140-5p inhibitörleri ile tedavi sonrasında TGF- $\beta$  ve SMAD yolağı üzerinden kollajen ve  $\alpha$ -SMA ekspresyonunun arttığı; TGF- $\beta$  uygulaması sonrasında miR-140-5p düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (Liao vd., 2020). İPF akciğer biyopsilerinde de kontrol grubunun akciğerlerine göre downregüle olduğu gözlenmiştir (Oak vd., 2011) (Tablo 5.1). Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde downregülasyon saptandı ( $p=0,028$ ). TGF- $\beta$  ile miR-140-5p arasındaki ilişki incelendiğinde pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon vardı ( $r=0,43$ ,  $p=0,006$ ). Bu durum literatür ile uyumlu değildi. Antifibrotik ilaçların TGF- $\beta$  düzeyini azaltması sonucunda miR-140-5p üzerindeki inhibisyonun azalması ve aralarındaki negatif korelasyon nedeniyle miR-140 ekspresyonunun upregülasyonu beklenmekte idi. TGF- $\beta$  inhibisyonu azalsa da bunun dışında miR-140-5p ekspresyonunu etkileyen diğer faktörlerin inhibisyonu devam etmektedir. Ayrıca literatürde mevcut olan TGF- $\beta$  ile miR-140-5p ilişkisini gösteren hücre kültürü ve hayvan modeli çalışmaları kısa süreli çalışmalardır; uzun süreli, yerleşmiş fibrotik odakları olan İPF hastalarının patogenetik mekanizmalarını tam olarak yansıtamamaktadır. Antifibrotik tedavi kullanmamış daha büyük örnek gruplarında miR-140-5p ve TGF- $\beta$  ilişkisini değerlendirmek daha anlamlı sonuçlar verebilir.

miR-19a ve miR-19b-1, miR-17/92 ailesinin üyeleridir. miR-17/92 ailesi hücre döngüsü, proliferasyon, apoptoz gibi önemli süreçlerin regülasyonunu sağlar. Normal gelişim, immün sistem hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve yaşlanmada fonksiyonu gösterilmiştir. Hematolojik ve solid doku kanserlerinde sıkça disregülasyonu tespit edilmiş miR ailesidir, bu nedenle oncomiR-1 olarak da isimlendirilmektedir (Mogilyansky ve Rigoutsos, 2013). Akciğerlerin gelişim sürecinde ve alveolar epitel dengesinin korunmasında önemlidir. Fibrotik süreçten sorumlu CCN2 gibi önemli genleri ve DNMT-1 gibi epigenetik düzenleyicileri regüle etmektedir; ayrıca DNMT-1 tarafından ekspresyonu baskılanabilir (Oak vd., 2011; Dakhllallah vd., 2013). İPF hastalarının akciğer biyopsi örneklerinin ekspresyon çalışmalarında miR-19a ve miR-19b'nin downregülasyonu saptanmıştır (Oak vd., 2011; Liang vd., 2014)(Tablo 5.1).

Pulmoner fibroz hayvan modellerlerinden elde edilen fibroblastlarda yapılan miRNA ekspresyon çalışmalarında, miR-19a ve miR-19b'nin TGF- $\beta$  ekspresyonunu düzenlediği, overekspresyonunun fibroblast aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Akciğer fibroblast hücre çalışmalarında miR-19a ve miR-19b'nin overekspresyonlarının CCN2 ve TSP1 ekspresyonunu baskıladığı bildirilmiş, antifibrotik etki gösterdiği saptanmıştır (Mogilyansky ve Rigoutsos, 2013; Souma vd., 2018). İPF hastaları ve kontrol grubu arasında miR-19a ekspresyon düzeylerini karşılaştırdığımızda, hasta grubunda istatistiksel düzeyde anlamlı downregülasyon saptandı ( $p=0,002$ ). miR-19b-1 ekspresyonu için iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,529$ ). TGF- $\beta$  ile miR-19a arasındaki ilişkiyi incelediğimizde pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon bulundu ( $r=0,45$ ,  $p=0,004$ ). Pozitif korelasyonun nedeni antifibrotik tedavi ile TGF- $\beta$  inhibisyonu olarak yorumlandı. CCN2 ekspresyonu iki grup arasında farklı bulunmadığı için miR-19a ve miR-19b-1 korelasyonu incelenemedi.

miR-320a, insan akciğer fibroblast kültüründe TGF- $\beta$  yolağında TGFBR2'yi düzenleyerek kollajen tip 1 ekspresyonunu regüle etmektedir. Sistemik skleroza bağlı İAH bulunan hastaların periferik kanında sağlıklı kontrollere kıyasla azalmış ekspresyonu saptanmıştır (Li vd., 2021). Pandit ve ark.'ları İPF'li hastaların akciğer biyopsilerinde upregüle tespit etmiş, bunun aksine Liang ve ark.'ları İPF akciğer biyopsilerinde downregüle tespit etmiştir (Pandit vd., 2010; Liang vd., 2014) (Tablo 5.1). Çalışmamızda İPF hastalarının serum örneklerinde istatistiksel düzeyde anlamlı downregüle bulundu ( $p=0,030$ ). miR-320a'nın İPF'de disregülasyon yönünü belirlemek için daha fazla araştırtırma gerekmektedir.

Tablo 5. 1: Bulgularımızın literatür verileri ile karşılaştırılması

miR'ler	Sonuç- larımız	Oak vd. Akciğer biyopsi	Pandit vd. Akciğer biyopsisi	Mullen- brock vd. İPF fibroblast kültürü	Bersch- neider vd. Akciğer biyopsisi	Njock vd. Balgam ekzozom	Liang vd. Akciğer biyopsisi	Yang S. vd. fibroblast kültürü	Milosevic vd. Akciğer biyopsisi
miR-30d	-		↓		↓		↓		↓
miR-30b	-	↓	↓		↓		↓		↓
miR-30e	-	↓					↓		
miR-30a	-	↓	↓		↓	↓	↓		↓
miR-29c	↓	↓	↓				↓		
miR-29b	↓	↓				↓	↓		
miR-29a	↓	↓				↓	↓		
miR-19a	↓	↓					↓		
miR-19b	-	↓					↓		
miR-133	-								
miR320a	↓		↑				↓		
miR-32	-	↓							
let-7d	-	↓	↓		↓	↓			↓
miR-140	↓	↓							
miR-26a	-		↓		↓	↓	↓		
miR-143	↑	↓						↑	↑
miR130a	↓	↓					↓		
miR-155	↓	↑	↑	↓					
miR-145	-					↑		↑	
miR-205	↓		↑				↑		
miR-21	↓	↑							

↑:upregüle ↓:downregüle

İPF insidansının ve prevalansının yaş ile arttığı bilinmektedir. Telomer boylarının kısalması, mikrotravmaların kümülasyonu, genetik-epigenetik değişimlerin birikimi ve doku rejenerasyon kabiliyetinde azalma ileri yaşlarda artan fibrozis gelişimi için risk oluşturan faktörlerdir (Zaman ve Lee, 2018). IGF-1 yolağını regüle eden miR-1, miR-206, miR-21, miR-122, miR-375 ve Sirtuin1 genini regüle eden miR-34a, miR-449, miR-181a/b, miR-9, miR-195, miR-22, miR-200a yaşlanma ile ilişkili genleri regüle eden, yaşa bağlı ekspresyon farklılığı gözlenebilecek miRNA'lardır (Nho, 2015). Bu doğrultuda yaş ile miR ekspresyonları arasındaki ilişki incelendi. İPF patogeneğinde downregüle beklenen miR'lerde yaşla birlikte negatif korelasyon, upregüle beklenen miR'lerde pozitif korelasyon varlığı beklenmekte idi. Sadece miR-29b-3p ile yaş arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı ( $r=0,64$ ,  $p=0,002$ ). Fizyolojik koşullarda miR-29 ailesi upregülasyonunun yaş ile birlikte artan oksidatif stres, DNA hasarı gibi fibrotik sebeplere karşı geliştirilen koruyucu bir mekanizma olabileceği bildirilmiştir (Heid vd., 2017). Profibrotik faktörlerin miR-29b üzerindeki inhibisyonuna rağmen bu savunma mekanizması yetersiz de olsa fonksiyon görüyor olabilir. Yaş ile miR-29b-3p ilişkisini daha iyi tanımlamak için hem sağlıklı gruplarda hem de İPF hastalarında longitudinal çalışmalar gerekmektedir.

Sigara kullanımı İPF riskini artıran en önemli faktörlerden biridir. İPF tanısı alan hastaların çoğunda halen sigara kullanımı veya geçmişte sigara kullanma öyküsü bulunmaktadır (Oh vd., 2012). Uzun süreli sigara kullanımı alveol epitel hasarına, inflamatuvar reaksiyonların tetiklenmesine ve fibroblast aktivasyonuna yol açmaktadır (Jensen vd., 2012). Sigara dumanına maruziyet epigenetik değişiklikler ile de İPF'ye neden olabilmektedir. WNT7A gibi İPF patogeneğinden sorumlu genlerin metilasyon durumunu değiştirmesi, içeriğinde bulunan akrolein ile histon modifikasyonlarına neden olması ve profibrotik-antifibrotik miRNA dengesini değiştirmesi, sigaranın İPF gelişimine neden olabilen epigenetik değişikliklerdir (Yang ve Schwartz, 2015). Bu nedenle çalışmamızda hasta grubunda sigara kullanma öyküsüne göre miR ekspresyonları incelendi. miR-29a-3p ve miR-140-5p sigara kullanma öyküsü olanlarda hiç sigara kullanmamış hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p=0,012$ ;  $p=0,020$ ). Sigara içen ve içmeyen sağlıklı gönüllülerle yapılan plazma miRNA ekspresyon çalışmasında miR-29a düzeyleri sigara içen grupta yüksek saptanmıştır (Takahashi vd., 2013). Bulgularımız miR-29a-3p için bu literatür verileriyle uyumlu olsa da İPF'de sigara ile ilişkili miRNA disregülasyonunu tanımlamaya yönelik yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Cinsiyet bazı hastalıklarda risk ve prognozu belirleyen etkenlerden biridir. Erkek cinsiyet İPF için risk faktörüdür, yapılan çalışmalarda tanı alan erkek sayısının kadınlara oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu duruma, sigara kullanım oranı ve mesleki maruziyet riskinin erkeklerde daha yüksek olması neden olabilmektedir (Ekström vd., 2014). Hormonal etkilerin yanı sıra X kromozomu üzerinde bulunan, miRNA ekspresyonlarını regüle eden genlerin cinsiyetler arasında farklı miRNA ekspresyon paternine neden olabileceği bildirilmiştir (Sharma ve Eghbali, 2014). Çeşitli hastalıklarda cinsiyetler arasında miR ekspresyon farklılığı gösterilmiş olsa da İPF’de cinsiyete bağlı miR çalışması bulunmamaktadır. Çalışmamızda hasta grubunda cinsiyetler arasında miR ekspresyon farklılığı incelendi. miR-155-5p, miR-140-5p ve miR-320a ekspresyon düzeyleri kadın hasta grubunda erkek hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p=0,016$ ;  $p=0,016$ ;  $p=0,029$ ). miR-140-5p’deki downregülasyonun nedeni sigara öyküsünün kadın hasta grubunda bulunmaması olarak yorumlandı. Kadın hasta sayısının grup içinde düşük olması nedeniyle daha büyük hasta gruplarında bu sonuçların araştırılması ve cinsiyete bağlı miR ekspresyon farklılığının İPF üzerine etkisinin incelenmesi gerekmektedir.

MiRNA’lar arasındaki çapraz ilişkinin miRNA ekspresyonunu etkilediği bilinmekte, bir miRNA’nın regüle ettiği hedef gen farklı miRNA’ların ekspresyonunu düzenleyebilmektedir (Miao vd., 2018). miRNA ve miRNA’nın karşılıklı etkileşimini incelemek amacıyla, iki grup arasında anlamlı fark bulunan miRNA’lar arası korelasyonu inceledik (Tablo 4.8). miR-29 ailesi kendi içinde orta düzeyde pozitif korelasyon göstermekle birlikte; miR-320a, miR-130a, miR-155, miR-205, miR-21 ve miR19a çalışılan miR’lerin çoğunluğu ile pozitif korelasyon gösterdi. miR-143-3p ile mevcut miR’lerden hiçbiri arasında istatistiksel düzeyde anlamlı korelasyon saptanmadı. Literatürde miR-miR ilişkisini inceleyen çalışmalar oldukça azdır. Ekspresyon dataları kullanılarak yapılmış korelasyon çalışmasında benzer biyolojik fonksiyon gösteren miR’lerin korelasyonu saptanmıştır. Ayrıca diğer miR’ler ile korelasyon göstermeyen miR’lerin belirli hastalıklarda biyomarkır olarak kullanımının daha anlamlı olduğu belirtilmiştir (Chaulk vd., 2016). miR-miR ilişkilerini aydınlatmak, hastalık bazında yapılacak miR panellerini oluşturmaya ve sonuçları yorumlamaya katkı sağlayacaktır. Çalışmamız İPF’de miRNA çapraz etkileşimlerini inceleyen tek klinik çalışma olabilir.

Ekspresyonu anlamlı çıkan miRNA’ların İPF tanısını yordama gücü lojistik regresyon analizi ile test edildi. miR-29-3p ve miR-143-3p ile oluşturulan modelin verileri

gruplara en doğru atayan model olduğu bulundu. Bu modelin İPF tanısında hasta grubunu % 95, kontrol grubunu % 100, toplamda % 97,5 doğruluk yüzdesi ile atadığı tespit edildi. Odds oranı miR-143-3p için 15,402; miR-29a-3p için 0,012 idi. % 95 güven aralığı miR-29a-3p için 0,000-0,369; miR-143-3p için 1,663-142,636 bulundu, güven aralığı 1' içermediği için anlamlı bulundu. miR-29-3p ve miR-143-3p ile oluşturulan model; miR-143-3p'de 1 birimlik artış İPF olma ihtimalini 15,402 kat artırmakta, miR-29a-3p'deki 1 birimlik artış hasta olma olasılığını 83 kat azaltmaktadır şeklinde yorumlandı.

miR-29a-3p ve miR-143-3p ROC eğrisi ile analiz edilerek hasta ve kontrol grubunu ayırt etme gücü incelendi. miR-29a-3p'nin hasta ve kontrol grubunu ayırt etme gücünün istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ( $p<001$ ). AUC % 84 bulundu, kesim noktası 0,335 değeri belirlendi ve bu değerde duyarlılık %70, özgüllük % 90 bulundu. miR-143-3p'nin hasta ve kontrol grubunu ayırt etme gücünün istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ( $p<001$ ). AUC % 85 bulundu, Kesim noktası 1,865 değeri belirlendi ve bu değerde duyarlılık %80, özgüllük % 80 bulundu. miR-29a-3p ve miR-143-3p'nin kombine tanı duyarlılığı için ikili lojistik regresyon analizi verileri kullanıldı, AUC % 97 bulundu. Literatür taramalarında İPF tanısında miR-29a-3p ve miR-143-3p'yi benzer şekilde inceleyen çalışmaya rastlanmadı.

Örneklem boyutunun küçük olması çalışmamızdaki kısıtlamalardan biridir. Her ne kadar İPF en sık görülen İİP olsa da; insidansının düşük olması, yaşam süresinin kısalığı ve tanı aşamasındaki güçlükler nedeniyle yüksek sayıda hasta grubu oluşturmak zordur. Ayrıca COVID19 pandemisi nedeniyle poliklinik hizmetleri pandemi için düzenlenmiş, Göğüs hastalıkları ana bilim dalı multidisipliner interstisyel akciğer hastalıkları konseyi toplanamamış, yeni tanı alan İPF hastaları çalışmaya dahil edilememiştir. Bu durum hasta sayımızı etkilemiş, antifibrotik tedavi öncesinde miRNA ve gen ekspresyonlarının analizine ve tedaviyle ilişkisini araştırmamıza imkan sağlamamıştır.

Çalışmamızda incelediğimiz miRNA'lar literatür verileri kullanılarak belirlenmiştir. İnsanlarda tanımlanmış 2000'nin üzerinde miRNA bulunmaktadır ve bu miRNA'lar biyolojik süreçlerde, çoklu yollar üzerinden etki gösterebilen kompleks fonksiyona sahip moleküllerdir (Souma vd., 2018). İPF hastaları ile sağlıklı donörlerin akciğer biyopsilerinin miRNA profilleri karşılaştırılmış, miRNA'ların yaklaşık % 10'unun disregüle olduğu saptanmıştır (Yang ve Schwartz, 2015). Bu nedenle analiz ettiğimiz 21 miRNA İPF'de mevcut miRNA disregülasyonunu tam olarak yansıtamamaktadır. miRNA ekspresyon profili

yapılarak seçilen miRNA'ların qPCR ile incelenmesi daha anlamlı sonuçlar verebilir fakat sınırlı bütçe nedeniyle bu yöntem kullanılamamıştır.

Hasta grubunun, TGF- $\beta$  ekspresyonlarını baskılayan antifibrotik tedavi altında olması nedeniyle TGF- $\beta$  ile miRNA korelasyon incelemelerimizi literatür ile birlikte yorumlamak güç olmuştur. Ayrıca literatürde İPF için yapılmış pirfenidon veya nintedanib ile miRNA araştırması bulunmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır.

Genetik-epigenetik değişiklikler, çevresel etkenler gibi birçok faktör miRNA ekspresyonunu etkileyebilir (Yanaihara vd., 2006). Cinsiyet, yaş, sigara kullanımının miRNA ekspresyonu üzerine etkilerini incelemiş olsak da tüm genom analizleri, gen ekspresyon profilleri, ayrıntılı tanımlanmış çevresel faktörler ile miRNA ilişkisini bilmek sonuçların yorumlanmasında güvenilirliği artıracaktır.

Çeşitli çalışmalar, hastalıklar için hücre dışı miRNA imzaları bildirmiştir fakat bu imzaların klinik tanıda kabul edilebilir doğruluk ve duyarlılığa ulaşması için daha çok araştırmaya ve standardize edilmiş protokollere ihtiyaç vardır.

Upregülasyonu hastalıkla ilişkili miRNA'lar için antisens oligonükleotid inhibitörler, downregülasyonu hastalık patogenezinin sorumlu miRNA'lar için ise miRNA mimikleri ile yerine koyma tedavisi güncel araştırma konularında biridir. miRNA'ların hedeflenebilir tedavi olarak kullanımı mümkündür. Artan hasta verisi ve miRNA çalışmaları ile hangi miR'ların hangi hastalıkta majör rol oynadığı ve hedeflenebilir tedavi geliştirme aşamalarında hangi miR'lere öncelik verilmesi gerektiği belirlenebilir.

Çalışmamızda mevcut kısıtlamalara rağmen hasta ve kontrol grubu arasında miRNA ekspresyon düzeyleri farklılığı gösterilmiş, daha önce araştırılmamış olan miRNA ve TGF- $\beta$  ile antifibrotik ilaç ilişkisi yorumlanmıştır. Ayrıca literatürde çalışmamızdaki miRNA'ları serum/plazmada birlikte araştırmış yayın bulunmamaktadır. Akciğer biyopsilerinde, kültür çalışmalarında ve hayvan modeli çalışmaları ile pulmoner fibroziste disregülasyonu saptanmış miRNA'ların, noninvaziv bir yöntemle elde edilmiş örneklerde gösterilmiş olması, çalışmamızı kolay numune eldesi ve basit çalışma yöntemiyle daha üstün kılmaktadır. Bulgularımız bu özellikleri ile literatüre katkı sağlayacak, yeni araştırmalara fikir verecek niteliktedir.

Optimize edilmiş protokoller kullanılarak elde edilmiş miRNA ekspresyon profilleri, fibrozis patogenezinde etkili gen ekspresyon analizleri, kilo, yaş, çevresel ve mesleki risk etkenleri, sigara kullanımı, cinsiyet, beslenme, eşlik eden hastalık bilgileri gibi verilere skor

vererek oluşturulacak algoritma programları; İPF için risk hesaplaması yapabilir, tarama programları ile riskli bireyler belirlenebilir ve ileri araştırmaya yönlendirebilir, erken tanı ve erken tedavi ile tedaviden maksimum yarar sağlanmasına ve yaşam beklentisinin uzamasına katkı sağlayabilir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. SONUÇLAR

- miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-29c-3p, miR-19a, miR-130a-3p, miR-140-5p, miR-320a, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-205-5p ekspresyonları hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı düşük bulundu.
- miR-143-3p ekspresyonu hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı upregüle bulundu.
- miR-145, miR-30a-5p, miR-30b-5p, miR-30d-5p, miR-30e-5p, miR-26a-5p, miR-32-5p, miR-19b-1, miR-133 ve let-7d ekspresyon düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel düzeyde anlamlı fark bulunmadı.
- TGF- $\beta$  ekspresyonu hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı düşük bulundu.
- CCN2 ekspresyonu gruplar arasında istatistiksel düzeyde farklı bulunmadı.
- Yaş ve miRNA ekspresyon ilişkisi araştırıldı, miR-29b-3p ile yaş arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon saptandı.
- Hasta grubunda sigara içme durumuna göre ekspresyon farklılığı gösteren miR'ler incelendi, miR-29a-3p ve miR-140-5p ekspresyonları anlamlı düzeyde farklı bulundu.
- Hasta grubunda cinsiyetler arasında ekspresyon düzeyleri incelendi, miR-155-5p, miR-140-5p ve miR-320a ekspresyonları farkı anlamlı bulundu.
- TGF- $\beta$  ile miR-19a, miR-320a, miR-140, miR-130a, miR-155 ve miR-21 arasında pozitif yönde orta düzeyde korelasyon saptandı.
- TGF- $\beta$  ile miR-205 arasında pozitif yönde yüksek düzeyde korelasyon saptandı.
- TGF- $\beta$  ile miR-143-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p ve miR-29c-3p ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel düzeyde anlamlı korelasyon saptanmadı.
- miR-29 ailesi kendi içinde orta düzeyde pozitif korelasyon gösterdi.
- İncelenen miRNA'ların geneli ile miR-320a, miR-130a, miR-155, miR-205, miR-21 ve miR-19a arasında pozitif korelasyon bulundu.
- miR-143-3p ile mevcut miR'lerden hiçbiri arasında istatistiksel düzeyde anlamlı korelasyon saptanmadı.
- Lojistik regresyon analizi ile incelenen miR-29-3p ve miR-143-3p modelinin İPF tanısını yordama gücü yüksek bulundu.

- miR-29a-3p ve miR-143-3p ROC eğrisi ile analiz edilerek hasta ve kontrol grubunu ayırt etme gücü incelendi, AUC miR-29a-3p için % 84, miR-143-3p için % 85, miR-29a-3p ve miR-143-3p kombinasyonunda % 97 bulundu.

## 6.2. ÖNERİLER

- Çalışmamızda gruplar arasında anlamlı ekspresyon farkı saptanan miRNA'lar daha büyük İPF örneklemelerinde çalışılarak miRNA disregülasyonunun tekrarlanabilirlik araştırmaları yapılabilir.

- İPF akciğer biyopsilerinde total miRNA-mRNA ekspresyon profili çalışılarak İPF patogenezinde etkili miRNA disregülasyonu ve gen ekspresyon ilişkisi kurulabilir. Eş zamanlı yapılacak periferik kan, balgam, plevral sıvı gibi vücut sıvılarında bakılan ekspresyon çalışmaları ile İPF akciğerindeki disregülasyonun vücut sıvılarındaki yansımaları tespit edilebilir.

- İPF tedavisinde kullanılan antifibrotik etkili pirfenidon ve nintedanibin miRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Tedavi öncesi ve sonrası belli periotlarda bakılacak miRNA ekspresyonları, bu ajanların miRNA ekspresyonu üzerine etkisini açıklayabilir.

- İnsan fibroblast kültürlerinde miRNA mimikleri veya antagonistleri kullanılarak disregülasyon yönü belirlenemeyen miRNA'lar incelenebilir, tedavide hangi miRNA'ların hedeflenmesi gerektiği belirlenebilir.

- İPF hastalarının rutin takipleri ile eş zamanlı bakılacak miRNA serum ekspresyon düzeyleri ile SFT, HRCT, semptomatik bulgular gibi klinik belirteçler korele edilerek progresyon, alevlenme gibi durumlarda ekspresyon farklılığı gösteren miRNA'lar saptanabilir, komorbiditeler ile ilişkili miRNA'lar tanımlanabilir ve takip belirteci olarak kullanılabilir.

- miR-29a-3p ve miR-143-3p ekspresyon analizleri daha büyük örneklerde analiz edilmeli, optimize koşullar sağlanarak tanı duyarlılığındaki güvenilirlikleri test edilmeli, diyagnostik biyomarkır niteliği incelenmelidir.

## KAYNAKLAR

- Agudelo, C. W., Samaha, G., & Garcia-Arcos, I. (2020). Alveolar lipids in pulmonary disease. A review. *Lipids in health and disease*, 19(1), 122.
- Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2015). N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 519(7544), 482–485. <https://doi.org/10.1038/nature14281>
- Allaix, M. E., Rebecchi, F., Morino, M., Schlottmann, F., & Patti, M. G. (2017). Gastroesophageal Reflux and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *World journal of surgery*, 41(7), 1691–1697. <https://doi.org/10.1007/s00268-017-3956-0>
- Ando, M., Miyazaki, E., Ito, T., Hiroshige, S., Nureki, S. I., Ueno, T., ... Kumamoto, T. (2010). Significance of serum vascular endothelial growth factor level in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung*, 188(3), 247–252.
- Annes, J. P., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of cell science*, 116(Pt 2), 217–224.
- Antoniou, K. M., Hansell, D. M., Rubens, M. B., Marten, K., Desai, S. R., Siafakas, ... Wells, A. U. (2008). Idiopathic pulmonary fibrosis: outcome in relation to smoking status. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177(2), 190–194. <https://doi.org/10.1164/rccm.200612-1759OC>
- Balestro, E., Coconcelli, E., Tinè, M., Biondini, D., Faccioli, E., Saetta, M., & Rea, F. (2019). Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Transplantation: When it is Feasible. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(10), 702.
- Bartczak, K., Białas, A. J., Kotecki, M. J., Górski, P., & Piotrowski, W. J. (2020). More than a Genetic Code: Epigenetics of Lung Fibrosis. *Molecular diagnosis & therapy*, 24(6), 665–681. <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00490-7>
- Berschneider, B., Ellwanger, D. C., Baarsma, H. A., Thiel, C., Shimbori, C., White, E. S., ... Königshoff, M. (2014). miR-92a regulates TGF-β1-induced WISP1 expression in pulmonary fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 53, 432–441. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.06.011>
- Bowen, T., Jenkins, R. H., & Fraser, D. J. (2013). MicroRNAs, transforming growth factor beta-1, and tissue fibrosis. *The Journal of pathology*, 229(2), 274–285.
- Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L., & Grotendorst, G. R. (1991). Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *The Journal of cell biology*, 114(6), 1285–1294.
- Braun, J. E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C. T., Haas, G., ... Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature structural & molecular biology*, 19(12), 1324–1331. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2413>
- Bulut, S., S., D. (2013). İnterstisyel Akciğer Hastalıkları. *Toraks Cerrahisi Bülteni* . Sep2013, Vol. 4 Issue 3, p171-177. 7p
- Caminati, A., Lonati, C., Cassandro, R., Elia, D., Pelosi, G., Torre, O.,... Harari, S. (2019). Comorbidities in idiopathic pulmonary fibrosis: an underestimated issue. *European*

*respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 28(153), 190044. <https://doi.org/10.1183/16000617.0044-2019>

- Castro-Sánchez, P., & Martín-Villa, J. M. (2013). Gut immune system and oral tolerance. *The British journal of nutrition*, 109 Suppl 2, S3–S11.
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., & Lee, S. S. (2020). Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. *Journal of advanced research*, 28, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.012>
- Chakraborty, R. K., Basit, H., Sharma, S. (2020). Desquamative Interstitial Pneumonia. [Updated 2020 Aug 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526079/>
- Chanda, D., Otoupalova, E., Smith, S. R., Volckaert, T., De Langhe, S. P., & Thannickal, V. J. (2019). Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis. *Molecular aspects of medicine*, 65, 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.08.004>
- Chandra, D., Cherian, SV. (2020) Hypersensitivity Pneumonitis. [Updated 2020 Jul 15]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499918/>
- Chaulk, S. G., Ebhardt, H. A., & Fahlman, R. P. (2016). Correlations of microRNA: microRNA expression patterns reveal insights into microRNA clusters and global microRNA expression patterns. *Molecular bioSystems*, 12(1), 110–119. <https://doi.org/10.1039/c5mb00415b>
- Chaulk, S. G., Ebhardt, H. A., & Fahlman, R. P. (2016). Correlations of microRNA: microRNA expression patterns reveal insights into microRNA clusters and global microRNA expression patterns. *Molecular bioSystems*, 12(1), 110–119.
- Chen, C., Tan, R., Wong, L., Fekete, R., & Halsey, J. (2011). Quantitation of microRNAs by real-time RT-qPCR. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 687, 113–134.
- Chen, Y. C., Chen, B. C., Yu, C. C., Lin, S. H., & Lin, C. H. (2016). miR-19a, -19b, and -26b Mediate CTGF Expression and Pulmonary Fibroblast Differentiation. *Journal of cellular physiology*, 231(10), 2236–2248. <https://doi.org/10.1002/jcp.25341>
- Chen, Z., Zhang, N., Chu, H. Y., Yu, Y., Zhang, Z. K., Zhang, G., & Zhang, B. T. (2020). Connective Tissue Growth Factor: From Molecular Understandings to Drug Discovery. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 593269.
- Chilosi, M., Poletti, V., Zamò, A., Lestani, M., Montagna, L., Piccoli, P., ... Doglioni, C. (2003). Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*, 162(5), 1495–1502.
- Coker, R. K., Laurent, G. J., Jeffery, P. K., du Bois, R. M., Black, C. M., & McAnulty, R. J. (2001). Localisation of transforming growth factor beta1 and beta3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax*, 56(7), 549–556.
- Collard, H. R., Ryerson, C. J., Corte, T. J., Jenkins, G., Kondoh, Y., Lederer, D. J., ... Martinez, F. J. (2016). Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An International Working Group Report. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 194(3), 265–275. <https://doi.org/10.1164/rccm.201604-0801CI>

- Cortes-Telles, A., Forkert, L., O'Donnell, D. E., & Moran-Mendoza, O. (2014). Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights on functional characteristics at diagnosis. *Canadian respiratory journal*, 21(3), e55–e60.
- Coşkun, F. (2012). Solunum Hastalıklarında Egzersizde Gelişen Patofizyolojik Değişimler. *Solunum Dergisi*; 14:21–24
- Coşkun, F. (2017). İdiyopatik Pulmoner Fibroziste Solunum Fonksiyon Testleri. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*; 5 (2): 17-20
- Coward, W. R., Watts, K., Feghali-Bostwick, C. A., Jenkins, G., & Pang, L. (2010). Repression of IP-10 by interactions between histone deacetylation and hypermethylation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Molecular and cellular biology*, 30(12), 2874–2886. <https://doi.org/10.1128/MCB.01527-09>
- Dakhlallah, D., Batte, K., Wang, Y., Cantemir-Stone, C. Z., Yan, P., Nuovo, G., ... Marsh, C. B. (2013). Epigenetic regulation of miR-17~92 contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 187(4), 397–405. <https://doi.org/10.1164/rccm.201205-0888OC>
- Daniil, Z., Kitsanta, P., Kapotsis, G., Mathioudaki, M., Kollintza, A., Karatza, M., ... Papiris, S. A. (2005). CD8+ T lymphocytes in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory research*, 6(1), 81.
- Demirağ, F. (2019). İnterstisyel Akciğer Hastalıklarında Güncel Gelişmeler. *Güncel Patoloji Dergisi*; Cilt 3, Sayı 3; Sayfa 117-128
- Demirkazık, F. B. (2017). İdiyopatik Pulmoner Fibrozis Tanısında Radyolojik İpuçları. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*; 5 (2): 21-24
- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235.
- Dharap, A., Pokrzywa, C., Murali, S., Pandi, G., & Vemuganti, R. (2013). MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PloS one*, 8(11), e79467.
- Donahoe, M., Valentine, V. G., Chien, N., Gibson, K. F., Raval, J. S., Saul, M., ... Duncan, S. R. (2015). Autoantibody-Targeted Treatments for Acute Exacerbations of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PloS one*, 10(6), e0127771.
- Duisters, R. F., Tijssen, A. J., Schroen, B., Leenders, J. J., Lentink, V., van der Made, I., ... Creemers, E. E. (2009). miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circulation research*, 104(2), 170–178.
- Ekström, M., Gustafson, T., Boman, K., Nilsson, K., Tornling, G., Murgia, N., & Torén, K. (2014). Effects of smoking, gender and occupational exposure on the risk of severe pulmonary fibrosis: a population-based case-control study. *BMJ open*, 4(1), e004018. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-004018>
- ENCODE Project Consortium (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- Erbay, M.; Özsu, S. S. (2017). İdiyopatik pulmoner fibrozis ve pulmoner hipertansiyon. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi* 2017; 5 (2): 39-43

- Escutia-Gutiérrez, R., Rodríguez-Sanabria, J.S., Monraz-Méndez, C.A., Santos-García, A., Armendáriz-Borunda, J., Sandoval-Rodríguez, A. (2020) Prolonged-release pirfenidone decreases hepatic miRNAs expression in a NAFLD/NASH experimental model [Abstract]. *Annals of Hepatology*. Volume 19, Supplement 1, 2020, Pages 5-6, ISSN 1665-2681, <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2020.08.012>.
- Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J., & Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(6), 497–505.
- Ferrari, E., & Gandellini, P. (2020). Unveiling the ups and downs of miR-205 in physiology and cancer: transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Cell death & disease*, 11(11), 980.
- Ferrari, E., & Gandellini, P. (2020). Unveiling the ups and downs of miR-205 in physiology and cancer: transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Cell death & disease*, 11(11), 980.
- Fonseca, C., Lindahl, G. E., Ponticos, M., Sestini, P., Renzoni, E. A., Holmes, A. M., ... Abraham, D. J. (2007). A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *The New England journal of medicine*, 357(12), 1210–1220.
- Frangogiannis N. (2020). Transforming growth factor- $\beta$  in tissue fibrosis. *The Journal of experimental medicine*, 217(3), e20190103.
- Funke, M., & Geiser, T. (2015). Idiopathic pulmonary fibrosis: the turning point is now!. *Swiss medical weekly*, 145, w14139.
- Gauthy, E., Cuende, J., Stockis, J., Huygens, C., Lethé, B., Collet, J. F., ... Lucas, S. (2013). GARP is regulated by miRNAs and controls latent TGF- $\beta$ 1 production by human regulatory T cells. *PloS one*, 8(9), e76186.
- Gregory, P. A., Bracken, C. P., Smith, E., Bert, A. G., Wright, J. A., Roslan, S., ... Goodall, G. J. (2011). An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Molecular biology of the cell*, 22(10), 1686–1698.
- Guenther, A., Krauss, E., Tello, S., Wagner, J., Paul, B., Kuhn, S., ... Crestani, B. (2018). The European IPF registry (eurIPFreg): baseline characteristics and survival of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory research*, 19(1), 141.
- Guo, J., Yang, Z., Jia, Q., Bo, C., Shao, H., & Zhang, Z. (2019). Pirfenidone inhibits epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis in the rat silicosis model. *Toxicology letters*, 300, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.10.019>
- Guo, J., Yang, Z., Jia, Q., Bo, C., Shao, H., & Zhang, Z. (2019). Pirfenidone inhibits epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis in the rat silicosis model. *Toxicology letters*, 300, 59–66.
- Gupte, V. V., Ramasamy, S. K., Reddy, R., Lee, J., Weinreb, P. H., Violette, S. M., ... Belluscio, S. (2009). Overexpression of fibroblast growth factor-10 during both inflammatory and fibrotic phases attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 180(5), 424–436.
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(8), 509–524.

- Hall-Glenn, F., & Lyons, K. M. (2011). Roles for CCN2 in normal physiological processes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(19), 3209–3217.
- Hambly, N., Shimbori, C., & Kolb, M. (2015). Molecular classification of idiopathic pulmonary fibrosis: personalized medicine, genetics and biomarkers. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 20(7), 1010–1022.
- Hammond S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*, 87, 3–14.
- Hanna, J., Hossain, G. S., & Kocerha, J. (2019). The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Frontiers in genetics*, 10, 478.
- Heid, J., Cencioni, C., Ripa, R., Baumgart, M., Atlante, S., Milano, G., ... Spallotta, F. (2017). Age-dependent increase of oxidative stress regulates microRNA-29 family preserving cardiac health. *Scientific reports*, 7(1), 16839.
- Hellemons, M. E., Moor, C. C., von der Thüsen, J., Rossius, M., Odink, A., Thorgersen, L. H., ... Bendstrup, E. (2020). Desquamative interstitial pneumonia: a systematic review of its features and outcomes. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 29(156), 190181.
- Heng, E. C., Huang, Y., Black, S. A., Jr, & Trackman, P. C. (2006). CCN2, connective tissue growth factor, stimulates collagen deposition by gingival fibroblasts via module 3 and alpha6- and beta1 integrins. *Journal of cellular biochemistry*, 98(2), 409–420.
- Hill, M., & Tran, N. (2021). Global miRNA to miRNA Interactions: Impacts for miR-21. *Trends in cell biology*, 31(1), 3–5. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.10.005>
- Holbourn, K. P., Acharya, K. R., & Perbal, B. (2008). The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends in biochemical sciences*, 33(10), 461–473.
- Homma, S., Bando, M., Azuma, A., Sakamoto, S., Sugino, K., Ishii, Y., ... Ministry of Health, Labour and Welfare, the Study Group on Diffuse Pulmonary Disorders, Scientific Research/Research on Intractable Diseases, and Japanese Respiratory Society (2018). Japanese guideline for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory investigation*, 56(4), 268–291.
- Huleihel, L., Ben-Yehudah, A., Milosevic, J., Yu, G., Pandit, K., Sakamoto, K., Yousef, H., ... Kaminski, N. (2014). Let-7d microRNA affects mesenchymal phenotypic properties of lung fibroblasts. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 306(6), L534–L542.
- Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.* (2011) 12:99–110. doi: 10.1038/nrg2936
- Hutchinson, J., Fogarty, A., Hubbard, R., & McKeever, T. (2015). Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *The European respiratory journal*, 46(3), 795–806.
- Jensen, K., Nizamutdinov, D., Guerrier, M., Afroze, S., Dostal, D., & Glaser, S. (2012). General mechanisms of nicotine-induced fibrogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(12), 4778–4787. <https://doi.org/10.1096/fj.12-206458>

- Jo, H. E., Corte, T. J., Glaspole, I., Grainge, C., Hopkins, P., Moodley, Y., ... Goh, N. S. (2019). Gastroesophageal reflux and antacid therapy in İPF: analysis from the Australia İPF Registry. *BMC pulmonary medicine*, *19*(1), 84.
- Jo, M. H., Shin, S., Jung, S. R., Kim, E., Song, J. J., & Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Molecular cell*, *59*(1), 117–124.
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature reviews. Genetics*, *16*(7), 421–433.
- Jun, J. I., & Lau, L. F. (2011). Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nature reviews. Drug discovery*, *10*(12), 945–963.
- Kato, E., Takayanagi, N., Takaku, Y., Kagiya, N., Kanauchi, T., Ishiguro, T., & Sugita, Y. (2018). Incidence and predictive factors of lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *ERJ open research*, *4*(1), 00111-2016.
- Kaur, A., Mathai, S. K., & Schwartz, D. A. (2017). Genetics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis, Prognosis, and Treatment. *Frontiers in medicine*, *4*, 154.
- Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in biochemical sciences*, *35*(7), 368–376.
- Kaya, A.G.; Erdoğan, Y. (2017). İdiyopatik Pulmoner Fibrozisde Akut Atak ve Tedavisi. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*; *5* (2): 44-55
- Kim, K. K., Sheppard, D., & Chapman, H. A. (2018). TGF-β1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *10*(4), a022293.
- King, T. E. (2021). Clinical manifestations and diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. In H. Hollingsworth, (Ed), *UpToDate*. Retrieved January 30, 2021, Last updated: Dec 17, 2019, from <https://www.uptodate.com>
- Kishaba, T. (2019). Evaluation and management of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respiratory investigation*, *57*(4),300–311.
- Klingberg, F., Hinz, B., & White, E. S. (2013). The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of pathology*, *229*(2), 298–309.
- Kolb, M., & Collard, H. R. (2014). Staging of idiopathic pulmonary fibrosis: past, present and future. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, *23*(132), 220–224.
- Kolb, M., Bonella, F., & Wollin, L. (2017). Therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory medicine*, *131*, 49–57.
- Kolb, M., Margetts, P. J., Anthony, D. C., Pitossi, F., & Gauldie, J. (2001). Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, *107*(12), 1529–1536.
- Kottmann, R. M., Hogan, C. M., Phipps, R. P., & Sime, P. J. (2009). Determinants of initiation and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology (Carlton, Vic.)*, *14*(7), 917–933. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2009.01624.x>
- Krauss, E., Gehrken, G., Drakopanagiotakis, F., Tello, S., Dartsch, R. C., Maurer, O., ... Guenther, A. (2019). Clinical characteristics of patients with familial idiopathic pulmonary fibrosis (f-İPF). *BMC pulmonary medicine*, *19*(1), 130.

- Krupska, I., Bruford, E. A., & Chaqour, B. (2015). Eyeing the Cyr61/CTGF/NOV (CCN) group of genes in development and diseases: highlights of their structural likenesses and functional dissimilarities. *Human genomics*, 9, 24.
- Kubo, H., Nakayama, K., Yanai, M., Suzuki, T., Yamaya, M., Watanabe, M., & Sasaki, H. (2005). Anticoagulant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 128(3), 1475–1482. <https://doi.org/10.1378/chest.128.3.1475>
- Kubota, S., & Takigawa, M. (2015). Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical science (London, England : 1979)*, 128(3), 181–196. <https://doi.org/10.1042/CS20140264>
- Kumarswamy, R., Volkmann, I., & Thum, T. (2011). Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA biology*, 8(5), 706–713.
- Kurowska-Stolarska, M., Hasoo, M. K., Welsh, D. J., Stewart, L., McIntyre, D., Morton, B. E., ... McSharry, C. (2017). The role of microRNA-155/liver X receptor pathway in experimental and idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 139(6), 1946–1956. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.021>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB*, 12(9), 735–739. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00809-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00809-6)
- Lam, S., van der Geest, R. N., Verhagen, N. A., van Nieuwenhoven, F. A., Blom, I. E., Aten, J., ... van Kooten, C. (2003). Connective tissue growth factor and igf-I are produced by human renal fibroblasts and cooperate in the induction of collagen production by high glucose. *Diabetes*, 52(12), 2975–2983.
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(3), 178–196.
- Lee, H., Han, S., Kwon, C. S., & Lee, D. (2016). Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein & cell*, 7(2), 100–113.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854.
- Lee, S. H., Kim, D. S., Kim, Y. W., Chung, M. P., Uh, S. T., Park, C. S., ... Park, M. S. (2015). Association between occupational dust exposure and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis: a Korean national survey. *Chest*, 147(2), 465–474.
- Li, N., Zhou, H., & Tang, Q. (2018). miR-133: A Suppressor of Cardiac Remodeling?. *Frontiers in pharmacology*, 9, 903.
- Li, N., Zhou, H., & Tang, Q. (2018). miR-133: A Suppressor of Cardiac Remodeling?. *Frontiers in pharmacology*, 9, 903.
- Li, P., Zhao, G. Q., Chen, T. F., Chang, J. X., Wang, H. Q., Chen, S. S., & Zhang, G. J. (2013). Serum miR-21 and miR-155 expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma*, 50(9), 960–964. <https://doi.org/10.3109/02770903.2013.822080>

- Li, Y., Huang, J., Hu, C., Zhou, J., Xu, D., Hou, Y., ... Zhao, Y. (2021). MicroRNA-320a: an important regulator in the fibrotic process in interstitial lung disease of systemic sclerosis. *Arthritis research & therapy*, 23(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-02411-9>
- Liang, H., Gu, Y., Li, T., Zhang, Y., Huangfu, L., Hu, M., ... Shan, H. (2014). Integrated analyses identify the involvement of microRNA-26a in epithelial-mesenchymal transition during idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell death & disease*, 5(5), e1238.
- Liang, H., Tang, Y., Zhang, H., & Zhang, C. (2019). MiR-32-5p Regulates Radiosensitization, Migration And Invasion Of Colorectal Cancer Cells By Targeting TOB1 Gene. *OncoTargets and therapy*, 12, 9651–9661.
- Liao, W., Liang, P., Liu, B., Xu, Z., Zhang, L., Feng, M., ... Xu, A. (2020). MicroRNA-140-5p Mediates Renal Fibrosis Through TGF- $\beta$ 1/Smad Signaling Pathway by Directly Targeting TGFBR1. *Frontiers in physiology*, 11, 1093.
- Liao, W., Liang, P., Liu, B., Xu, Z., Zhang, L., Feng, M., Tang, Y., & Xu, A. (2020). MicroRNA-140-5p Mediates Renal Fibrosis Through TGF- $\beta$ 1/Smad Signaling Pathway by Directly Targeting TGFBR1. *Frontiers in physiology*, 11, 1093.
- Lipson, K. E., Wong, C., Teng, Y., & Spong, S. (2012). CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair*, 5(Suppl 1), S24.
- Liu, Q., Chen, J., Wang, B., Zheng, Y., Wan, Y., Wang, Y., Zhou, L., Liu, S., Li, G., & Yan, Y. (2018). miR-145 modulates epithelial-mesenchymal transition and invasion by targeting ZEB2 in non-small cell lung cancer cell lines. *Journal of cellular biochemistry*, 10.1002/jcb.28126. Advance online publication.
- Liu, Y. J., Zhou, H. G., Chen, L. H., Qu, D. C., Wang, C. J., Xia, Z. Y., & Zheng, J. H. (2019). MiR-32-5p regulates the proliferation and metastasis of cervical cancer cells by targeting HOXB8. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(1), 87–95.
- Lynch, D. A., Sverzellati, N., Travis, W. D., Brown, K. K., Colby, T. V., Galvin, J. R., ... Wells, A. U. (2018). Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper. *The Lancet. Respiratory medicine*, 6(2), 138–153.
- Margaritopoulos, G. A., Vasarmidi, E., & Antoniou, K. M. (2016). Pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: an evidence-based review of its place in therapy. *Core evidence*, 11, 11–22. <https://doi.org/10.2147/CE.S76549>
- Martin, M. D., Chung, J. H., & Kanne, J. P. (2016). Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of thoracic imaging*, 31(3), 127–139.
- Meng, X. M., Nikolic-Paterson, D. J., & Lan, H. Y. (2016). TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nature reviews. Nephrology*, 12(6), 325–338.
- Miao, C., Xiong, Y., Zhang, G., & Chang, J. (2018). MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis, new research progress and their pathophysiological implication. *Experimental lung research*, 44(3), 178–190.
- Milosevic, J., Pandit, K., Magister, M., Rabinovich, E., Ellwanger, D. C., Yu, G., ... Kaminski, N. (2012). Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 47(6), 879–887.
- MiRBase: <http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml>

- Mizuno, K., Mataka, H., Seki, N., Kumamoto, T., Kamikawaji, K., & Inoue, H. (2017). MicroRNAs in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of human genetics*, 62(1), 57–65. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.98>
- Mogilyansky, E., & Rigoutsos, I. (2013). The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell death and differentiation*, 20(12), 1603–1614. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.125>
- Moğulkoç, N. (2017). İdiyopatik Pulmoner Fibroziste Güncel Tedavi Yaklaşımı ve Yeni İlaçların Yeri. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi 2017*; 5 (2): 56-65
- Molina-Molina, M., Lario, S., Luburich, P., Ramírez, J., Carrión, M. T., & Xaubet, A. (2006). Determinación en plasma del factor transformador del crecimiento beta1 en la fibrosis pulmonar idiopática [Quantifying plasma levels of transforming growth factor beta1 in idiopathic pulmonary fibrosis]. *Archivos de bronconeumologia*, 42(8), 380–383. [https://doi.org/10.1016/s1579-2129\(06\)60550-8](https://doi.org/10.1016/s1579-2129(06)60550-8)
- Molina-Molina, M., Lario, S., Luburich, P., Ramírez, J., Carrión, M. T., & Xaubet, A. (2006). Determinación en plasma del factor transformador del crecimiento beta1 en la fibrosis pulmonar idiopática [Quantifying plasma levels of transforming growth factor beta1 in idiopathic pulmonary fibrosis]. *Archivos de bronconeumologia*, 42(8), 380–383. [https://doi.org/10.1016/s1579-2129\(06\)60550-8](https://doi.org/10.1016/s1579-2129(06)60550-8)
- Montgomery, R. L., Yu, G., Latimer, P. A., Stack, C., Robinson, K., Dalby, C. M., ... van Rooij, E. (2014). MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis. *EMBO molecular medicine*, 6(10), 1347–1356. <https://doi.org/10.15252/emmm.201303604>
- Mrad, A.; Huda, N. (2020). Acute Interstitial Pneumonia. [Updated 2020 Aug 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554429/>
- Mu, S., Kang, B., Zeng, W., Sun, Y., & Yang, F. (2016). MicroRNA-143-3p inhibits hyperplastic scar formation by targeting connective tissue growth factor CTGF/CCN2 via the Akt/mTOR pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, 416(1-2), 99–108. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2699-9>
- Mullenbrock, S., Liu, F., Szak, S., Hronowski, X., Gao, B., Juhasz, P., ...Zheng, T. S. (2018). Systems Analysis of Transcriptomic and Proteomic Profiles Identifies Novel Regulation of Fibrotic Programs by miRNAs in Pulmonary Fibrosis Fibroblasts. *Genes*, 9(12), 588. <https://doi.org/10.3390/genes9120588>
- Musellim, B., Mogulkoc, N., Uzun, O., Tokgoz, F.A., Turktas, H., Ozdemir, O. K., ... Arslan, D. A. (2021). Evaluation of Patients with Fibrotic Interstitial Lung Disease: Preliminary results from the Turk-UIP Study. *Turkish thoracic journal*, 22(2), 102–109. <https://doi.org/10.5152/TurkThoracJ.2021.20028>
- Musellim, B., Okumus, G., Uzaslan, E., Akgün, M., Cetinkaya, E., Turan, O., ... Turkish Interstitial Lung Diseases Group (2014). Epidemiology and distribution of interstitial lung diseases in Turkey. *The clinical respiratory journal*, 8(1), 55–62. <https://doi.org/10.1111/crj.12035>
- Nalysnyk, L., Cid-Ruzafa, J., Rotella, P., & Esser, D. (2012). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *European respiratory review*

- : *an official journal of the European Respiratory Society*, 21(126), 355–361. <https://doi.org/10.1183/09059180.00002512>
- Nathan, S. D., Barbera, J. A., Gaine, S. P., Harari, S., Martinez, F. J., Olschewski, H., ... Seeger, W. (2019). Pulmonary hypertension in chronic lung disease and hypoxia. *The European respiratory journal*, 53(1), 1801914. <https://doi.org/10.1183/13993003.01914-2018>
- Nho, R. S. (2015). Alteration of Aging-Dependent MicroRNAs in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Drug development research*, 76(7), 343–353. <https://doi.org/10.1002/ddr.21272>
- Nikam, R. R., & Gore, K. R. (2018). Journey of siRNA: Clinical Developments and Targeted Delivery. *Nucleic acid therapeutics*, 28(4), 209–224. <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0715>
- Njock, M. S., Guiot, J., Henket, M. A., Nivelles, O., Thiry, M., Dequiedt, F., ... Struman, I. (2019). Sputum exosomes: promising biomarkers for idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, 74(3), 309–312. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-211897>
- Noth, I., Anstrom, K. J., Calvert, S. B., de Andrade, J., Flaherty, K. R., Glazer, C., ... Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network (IPFnet) (2012). A placebo-controlled randomized trial of warfarin in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 186(1), 88–95. <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0314OC>
- Oak, S. R., Murray, L., Herath, A., Sleeman, M., Anderson, I., Joshi, A. D., ... Hogaboam, C. M. (2011). A micro RNA processing defect in rapidly progressing idiopathic pulmonary fibrosis. *PloS one*, 6(6), e21253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021253>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402.
- Oh, C. K., Murray, L. A., & Molfino, N. A. (2012). Smoking and idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonary medicine*, 2012, 808260. <https://doi.org/10.1155/2012/808260>
- Okumuş, N., G.; Bingöl Z. (2018). Türk Toraks Derneği İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) Tanı ve Tedavi Uzlaşı Raporu. *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara.
- Oliveira, D. S., Araújo Filho, J. A., Paiva, A., Ikari, E. S., Chate, R. C., & Nomura, C. H. (2018). Idiopathic interstitial pneumonias: review of the latest American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Radiologia brasileira*, 51(5), 321–327. <https://doi.org/10.1590/0100-3984.2016.0134>
- Oltra, M., Vidal-Gil, L., Maisto, R., Sancho-Pelluz, J., & Barcia, J. M. (2020). Oxidative stress-induced angiogenesis is mediated by miR-205-5p. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(2), 1428–1436. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14822>
- Özlü, T., Metintaş, M., Karadağ, M., Kaya, A. (Ed.). (2010). *Solunum sistemi ve hastalıkları*. İstanbul: İstanbul medikal yayıncılık.
- Pandit, K. V., Corcoran, D., Yousef, H., Yarlagadda, M., Tzouvelekis, A., Gibson, K. F., ... Kaminski, N. (2010). Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(2), 220–229. <https://doi.org/10.1164/rccm.200911-1698OC>

- Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M. C., & Ten Dijke, P. (2017). TGF- $\beta$ -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *International journal of molecular sciences*, *18*(10), 2157. <https://doi.org/10.3390/ijms18102157>
- Peljto, A. L., Zhang, Y., Fingerlin, T. E., Ma, S. F., Garcia, J. G., Richards, T. J., ... Schwartz, D. A. (2013). Association between the MUC5B promoter polymorphism and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *JAMA*, *309*(21), 2232–2239. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.5827>
- Pleasant, R., & Tighe, R. M. (2019). Management of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The Annals of pharmacotherapy*, *53*(12), 1238–1248. Quinn, C., Wisse, A., & Manns, S. T. (2019). Clinical course and management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Multidisciplinary respiratory medicine*, *14*, 35. <https://doi.org/10.1186/s40248-019-0197-0>
- Pourgholamhossein, F., Rasooli, R., Pournamdari, M., Pourgholi, L., Samareh-Fekri, M., Ghazi-Khansari, M., Iranpour, M., Poursalehi, H. R., Heidari, M. R., & Mandegary, A. (2018). Pirfenidone protects against paraquat-induced lung injury and fibrosis in mice by modulation of inflammation, oxidative stress, and gene expression. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *112*, 39–46.
- Pourgholamhossein, F., Rasooli, R., Pournamdari, M., Pourgholi, L., Samareh-Fekri, M., Ghazi-Khansari, M., ... Mandegary, A. (2018). Pirfenidone protects against paraquat-induced lung injury and fibrosis in mice by modulation of inflammation, oxidative stress, and gene expression. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *112*, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.034>
- Raghu, G., & Richeldi, L. (2017). Current approaches to the management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory medicine*, *129*, 24–30.
- Raghu, G., Amatto, V. C., Behr, J., & Stowasser, S. (2015). Comorbidities in idiopathic pulmonary fibrosis patients: a systematic literature review. *The European respiratory journal*, *46*(4), 1113–1130. <https://doi.org/10.1183/13993003.02316-2014>
- Raghu, G., Collard, H. R., Egan, J. J., Martinez, F. J., Behr, J., Brown, K. K., ... ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *183*(6), 788–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>
- Raghu, G., Remy-Jardin, M., Myers, J. L., Richeldi, L., Ryerson, C. J., Lederer, D. J., ... American Thoracic Society, European Respiratory Society, Japanese Respiratory Society, and Latin American Thoracic Society (2018). Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *198*(5), e44–e68.
- Raghu, G., Weycker, D., Edelsberg, J., Bradford, W. Z., & Oster, G. (2006). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *174*(7), 810–816. <https://doi.org/10.1164/rccm.200602-163OC>

- Ramazani, Y., Knops, N., Elmonem, M. A., Nguyen, T. Q., Arcolino, F. O., van den Heuvel, L., ... Goldschmeding, R. (2018). Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 68-69, 44–66. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.007>
- Rao, P. K., Kumar, R. M., Farkhondeh, M., Baskerville, S., & Lodish, H. F. (2006). Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), 8721–8726. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602831103>
- Ren, S., Johnson, B. G., Kida, Y., Ip, C., Davidson, K. C., Lin, S. L., Kobayashi, A., ... Duffield, J. S. (2013). LRP-6 is a coreceptor for multiple fibrogenic signaling pathways in pericytes and myofibroblasts that are inhibited by DKK-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), 1440–1445. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211179110>
- Richeldi, L., Collard, H. R., & Jones, M. G. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet (London, England)*, 389(10082), 1941–1952.
- Rønnow, S. R., Dabbagh, R. Q., Genovese, F., Nanthakumar, C. B., Barrett, V. J., Good, R. B., ... Sand, J. (2020). Prolonged Scar-in-a-Jar: an in vitro screening tool for anti-fibrotic therapies using biomarkers of extracellular matrix synthesis. *Respiratory research*, 21(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01369-1>
- Ruwanpura, S. M., Thomas, B. J., & Bardin, P. G. (2020). Pirfenidone: Molecular Mechanisms and Potential Clinical Applications in Lung Disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 62(4), 413–422. Ruby, J. G., Jan, C. H., & Bartel, D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149), 83–86. <https://doi.org/10.1038/nature05983>
- Ryerson, C., Ley, B. (2021). Prognosis and monitoring of idiopathic pulmonary fibrosis. In H. Hollingsworth, (Ed), *UpToDate*. Retrieved January 30, 2021, last updated: Aug 04, 2020, from <https://www.uptodate.com>
- Saito, A., Horie, M., & Nagase, T. (2018). TGF- $\beta$  Signaling in Lung Health and Disease. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2460. <https://doi.org/10.3390/ijms19082460>
- Sanada, H., Seki, N., Mizuno, K., Misono, S., Uchida, A., Yamada, Y., ... Inoue, H. (2019). Involvement of Dual Strands of *miR-143* (*miR-143-5p* and *miR-143-3p*) and Their Target Oncogenes in the Molecular Pathogenesis of Lung Adenocarcinoma. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4482.
- Schiza, S. E., Bouloukaki, I., Bolaki, M., & Antoniou, K. M. (2020). Obstructive sleep apnea in pulmonary fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine*, 26(5), 443–448. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000697>
- Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L. A. (2018). Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesiaandanalgesia*, 126(5), 1763–1768. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>
- Schwartz D. A. (2018). Idiopathic Pulmonary Fibrosis Is a Genetic Disease Involving Mucus and the Peripheral Airways. *Annals of the American Thoracic Society*, 15(Suppl 3), S192–S197. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201802-144AW>

- Seibold, M. A., Wise, A. L., Speer, M. C., Steele, M. P., Brown, K. K., Loyd, J. E., ... Schwartz, D. A. (2011). A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*, *364*(16), 1503–1512.
- Sesé, L., Nunes, H., Cottin, V., Sanyal, S., Didier, M., Carton, Z., ... Annesi-Maesano, I. (2018). Role of atmospheric pollution on the natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, *73*(2), 145–150. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-209967>
- Sgalla, G., Flore, M., Siciliano, M., & Richeldi, L. (2020). Antibody-based therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert opinion on biological therapy*, *20*(7), 779–786. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1735346>
- Sgalla, G., Iovene, B., Calvello, M., Ori, M., Varone, F., & Richeldi, L. (2018). Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respiratory research*, *19*(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0730-2>
- Sharif, R. (2017). Overview of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and evidence-based guidelines. *The American journal of managed care*, *23*(11 Suppl), S176–S182.
- Sharma, S., & Eghbali, M. (2014). Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. *Biology of sex differences*, *5*(1), 3.
- Shen, J., Xing, W., Liu, R., Zhang, Y., Xie, C., & Gong, F. (2019). MiR-32-5p influences high glucose-induced cardiac fibroblast proliferation and phenotypic alteration by inhibiting DUSP1. *BMC molecular biology*, *20*(1), 21.
- Shen, L., Liu, J., Huang, L., Zhang, Y., Xiao, X., & Yu, H. (2019). Cryptogenic Organizing Pneumonia Presenting as a Solitary Mass: Clinical, Imaging, and Pathologic Features. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, *25*, 466–474. <https://doi.org/10.12659/MSM.911655>
- Sheu, C. C., Chang, W. A., Tsai, M. J., Liao, S. H., Chong, I. W., & Kuo, P. L. (2019). Gene Expression Changes Associated with Nintedanib Treatment in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Fibroblasts: A Next-Generation Sequencing and Bioinformatics Study. *Journal of clinical medicine*, *8*(3), 308. <https://doi.org/10.3390/jcm8030308>
- Shi-wen, X., Stanton, L. A., Kennedy, L., Pala, D., Chen, Y., Howat, S. L., ... Leask, A. (2006). CCN2 is necessary for adhesive responses to transforming growth factor-beta1 in embryonic fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, *281*(16), 10715–10726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511343200>
- Simler, N. R., Brenchley, P. E., Horrocks, A. W., Greaves, S. M., Hasleton, P. S., & Egan, J. J. (2004). Angiogenic cytokines in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Thorax*, *59*(7), 581–585. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.009860>
- Souma, K., Shichino, S., Hashimoto, S., Ueha, S., Tsukui, T., Nakajima, T., ... Matsushima, K. (2018). Lung fibroblasts express a miR-19a-19b-20a sub-cluster to suppress TGF- $\beta$ -associated fibroblast activation in murine pulmonary fibrosis. *Scientific reports*, *8*(1), 16642. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34839-0>
- Spagnolo, P., Kropski, J. A., Jones, M. G., Lee, J. S., Rossi, G., Karampitsakos, T., ... Ryerson, C. J. (2020). Idiopathic pulmonary fibrosis: Disease mechanisms and drug development. *Pharmacology & therapeutics*, *222*, 107798. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107798>

- Stuart, B. D., Choi, J., Zaidi, S., Xing, C., Holohan, B., Chen, R., ... Garcia, C. K. (2015). Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nature genetics*, 47(5), 512–517.
- Su, S., Zhao, Q., He, C., Huang, D., Liu, J., Chen, F., ... Song, E. (2015). miR-142-5p and miR-130a-3p are regulated by IL-4 and IL-13 and control profibrogenic macrophage program. *Nature communications*, 6, 8523.
- Suzuki, H. I. (2018). MicroRNA Control of TGF- $\beta$  Signaling. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1901. <https://doi.org/10.3390/ijms19071901>
- Şen E. (2017). Egzersiz fizyolojisi ve egzersiz testleri. *Toraks Cerrahisi Bülteni*; 10: 29-36
- Takahashi, K., Yokota, S., Tatsumi, N., Fukami, T., Yokoi, T., & Nakajima, M. (2013). Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicology and applied pharmacology*, 272(1), 154–160.
- Talbert, J. L.; Schwartz, D. A. (2005). Pulmonary Fibrosis, Familial. Jan 21 [Updated 2015 Mar 19]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1230/>
- Tang, Y. W., Johnson, J. E., Browning, P. J., Cruz-Gervis, R. A., Davis, A., Graham, B. S., ... Stecenko, A. A. (2003). Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of clinical microbiology*, 41(6), 2633–2640. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2633-2640.2003>
- Tanzer, A., & Stadler, P. F. (2004). Molecular evolution of a microRNA cluster. *Journal of molecular biology*, 339(2), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.065>
- Tao, Y., Chen, Q., Zhao, C., Yang, X., Cun, Q., Yang, W., ... Zhong, H. (2020). The *in vitro* anti-fibrotic effect of Pirfenidone on human pterygium fibroblasts is associated with down-regulation of autocrine TGF- $\beta$  and MMP-1. *International journal of medical sciences*, 17(6), 734–744. <https://doi.org/10.7150/ijms.43238>
- Tao, Y., Chen, Q., Zhao, C., Yang, X., Cun, Q., Yang, W., Zhang, Y., Zhu, Y., & Zhong, H. (2020). The *in vitro* anti-fibrotic effect of Pirfenidone on human pterygium fibroblasts is associated with down-regulation of autocrine TGF- $\beta$  and MMP-1. *International journal of medical sciences*, 17(6), 734–744.
- Thannickal, V. J., Toews, G. B., White, E. S., Lynch, J. P., 3rd, & Martinez, F. J. (2004). Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annual review of medicine*, 55, 395–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.55.091902.103810>
- Thomson, J. M., Parker, J. S., & Hammond, S. M. (2007). Microarray analysis of miRNA gene expression. *Methods in enzymology*, 427, 107–122. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)27006-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)27006-5)
- Tian, X., Fei, Q., Du, M., Zhu, H., Ye, J., Qian, L., ... Yin, L. (2019). miR-130a-3p regulated TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition depends on SMAD4 in EC-1 cells. *Cancer medicine*, 8(3), 1197–1208. <https://doi.org/10.1002/cam4.1981>
- Todd, N. W., Luzina, I. G., & Atamas, S. P. (2012). Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-11>

- Tomassetti, S., Piciucchi, S., Tantalocco, P., Dubini, A., & Poletti, V. (2015). The multidisciplinary approach in the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis: a patient case-based review. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 24(135), 69–77.
- Torrisi, S. E., Vancheri, A., Pavone, M., Sambataro, G., Palmucci, S., & Vancheri, C. (2018). Comorbidities of IPF: How do they impact on prognosis. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 53, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2018.09.003>
- Tran, T., Šterclová, M., Mogulkoc, N., Lewandowska, K., Müller, V., Hájková, M., ... EMPIRE registry (2020). The European MultiPartner IPF registry (EMPIRE): validating long-term prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory research*, 21(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1271-z>
- Trethewey, S. P., & Walters, G. I. (2018). The Role of Occupational and Environmental Exposures in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Narrative Literature Review. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 54(6), 108.
- Tsitoura, E., Wells, A. U., Karagiannis, K., Lasithiotaki, I., Vasarmidi, E., Bibaki, E., Koutoulaki, C., Sato, H., Spandidos, D. A., Siafakas, N. M., Sourvinos, G., & Antoniou, K. M. (2016). MiR-185/AKT and miR-29a/collagen 1a pathways are activated in IPF BAL cells. *Oncotarget*, 7(46), 74569–74581. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12740>
- Tsitoura, E., Wells, A. U., Karagiannis, K., Lasithiotaki, I., Vasarmidi, E., Bibaki, E., ... Antoniou, K. M. (2016). MiR-185/AKT and miR-29a/collagen 1a pathways are activated in IPF BAL cells. *Oncotarget*, 7(46), 74569–74581.
- Tsoutsou, P. G., Gourgoulisanis, K. I., Petinaki, E., Germenis, A., Tsoutsou, A. G., Mpaka, M., ... Molyvdas, P. A. (2006). Cytokine levels in the sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory medicine*, 100(5), 938–945.
- Vancheri, C. (2013). Common pathways in idiopathic pulmonary fibrosis and cancer. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 22(129), 265–272. <https://doi.org/10.1183/09059180.00003613>
- Vancheri, C. (2015). Idiopathic pulmonary fibrosis and cancer: do they really look similar?. *BMC medicine*, 13, 220. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0478-1>
- Vettori, S., Gay, S., & Distler, O. (2012). Role of MicroRNAs in Fibrosis. *The open rheumatology journal*, 6, 130–139. <https://doi.org/10.2174/1874312901206010130>
- Voltz, J. W., Card, J. W., Carey, M. A., Degraff, L. M., Ferguson, C. D., Flake, G. P., ... Zeldin, D. C. (2008). Male sex hormones exacerbate lung function impairment after bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 39(1), 45–52. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0340OC>
- Wakwaya, Y., & Brown, K. K. (2019). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epidemiology, Diagnosis and Outcomes. *The American journal of the medical sciences*, 357(5), 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2019.02.013>
- Walters, G. I. (2020). Occupational exposures and idiopathic pulmonary fibrosis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 20(2), 103–111.
- Wang, H. J., Liu, H., Lin, Y. H., & Zhang, S. J. (2020). MiR-32-5p knockdown inhibits epithelial to mesenchymal transition and renal fibrosis by targeting SMAD7 in

- diabetic nephropathy. *Human & experimental toxicology*, 960327120952157. Advance online publication. <https://doi.org/10.1177/0960327120952157>
- Wang, M., Sun, Y., Xu, J., Lu, J., Wang, K., Yang, D. R., ... Chang, C. (2018). Preclinical studies using miR-32-5p to suppress clear cell renal cell carcinoma metastasis via altering the miR-32-5p/TR4/HGF/Met signaling. *International journal of cancer*, 143(1), 100–112. <https://doi.org/10.1002/ijc.31289>
- Wang, X., Cheng, Z., Dai, L., Jiang, T., Jia, L., Jing, X., ... Liu, M. (2019). Knockdown of Long Noncoding RNA H19 Represses the Progress of Pulmonary Fibrosis through the Transforming Growth Factor  $\beta$ /Smad3 Pathway by Regulating MicroRNA 140. *Molecular and cellular biology*, 39(12), e00143-19.
- Wang, Y., Yang, J., Chen, P., Song, Y., An, W., Zhang, H., ... Yan, J. (2020). MicroRNA-320a inhibits invasion and metastasis in osteosarcoma by targeting cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1. *Cancer medicine*, 9(8), 2833–2845.
- Wei, P., Xie, Y., Abel, P. W., Huang, Y., Ma, Q., Li, L., ... Tu, Y. (2019). Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-induced miR-133a inhibits myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis. *Cell death & disease*, 10(9), 670.
- Whelan, T. & Schnapp, L.M. (2021). Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. In H. Hollingsworth, (Ed), *UpToDate*. Retrieved February 2, 2021, Last updated: Jan 14, 2021, from <https://www.uptodate.com>
- Wollin, L., Wex, E., Pautsch, A., Schnapp, G., Hostettler, K. E., Stowasser, S., & Kolb, M. (2015). Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal*, 45(5), 1434–1445.
- Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M. D., Yartseva, V., ... Steitz, J. A. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*, 155(7), 1568–1580. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.027>
- Xie, T., Liang, J., Geng, Y., Liu, N., Kurkciyan, A., Kulur, V., ... Jiang, D. (2017). MicroRNA-29c Prevents Pulmonary Fibrosis by Regulating Epithelial Cell Renewal and Apoptosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 57(6), 721–732. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0133OC>
- Xu, J., Xu, X., Jiang, L., Dua, K., Hansbro, P. M., & Liu, G. (2020). SARS-CoV-2 induces transcriptional signatures in human lung epithelial cells that promote lung fibrosis. *Respiratory research*, 21(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01445-6>
- Yan, Y., Acevedo, M., Mignacca, L., Desjardins, P., Scott, N., Imane, R., ... Major, F. (2018). The sequence features that define efficient and specific hAGO2-dependent miRNA silencing guides. *Nucleic acids research*, 46(16), 8181–8196.
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., ... Harris, C. C. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell*, 9(3), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.01.025>
- Yang, I. V., & Schwartz, D. A. (2015). Epigenetics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 165(1), 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.03.011>
- Yang, J. S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R., ... Lai, E. C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-

- independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 15163–15168.
- Yang, P., Xiong, J., Zuo, L., Liu, K., & Zhang, H. (2018). miR-140-5p regulates cell migration and invasion of non-small cell lung cancer cells through targeting VEGFA. *Molecular medicine reports*, 18(3), 2866–2872.
- Yang, S. J., Yang, S. Y., Wang, D. D., Chen, X., Shen, H. Y., Zhang, X. H., ... Zhao, J. H. (2017). The miR-30 family: Versatile players in breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(3), 1010428317692204. <https://doi.org/10.1177/1010428317692204>
- Yang, S., Cui, H., Xie, N., Icyuz, M., Banerjee, S., Antony, V. B., ... Liu, G. (2013). miR-145 regulates myofibroblast differentiation and lung fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(6), 2382–2391. <https://doi.org/10.1096/fj.12-219493>
- Yang, T., Liang, Y., Lin, Q., Liu, J., Luo, F., Li, X., ... Zhang, H. (2013). miR-29 mediates TGF $\beta$ 1-induced extracellular matrix synthesis through activation of PI3K-AKT pathway in human lung fibroblasts. *Journal of cellular biochemistry*, 114(6), 1336–1342. <https://doi.org/10.1002/jcb.24474>
- Ye, D., Shen, Z., & Zhou, S. (2019). Function of microRNA-145 and mechanisms underlying its role in malignant tumor diagnosis and treatment. *Cancer management and research*, 11, 969–979. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S191696>
- Yu, D. H., Ruan, X. L., Huang, J. Y., Liu, X. P., Ma, H. L., Chen, C., ... Li, S. (2020). Analysis of the Interaction Network of Hub miRNAs-Hub Genes, Being Involved in Idiopathic Pulmonary Fibers and Its Emerging Role in Non-small Cell Lung Cancer. *Frontiers in genetics*, 11, 302. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00302>
- Yu, J., Ryan, D. G., Getsios, S., Oliveira-Fernandes, M., Fatima, A., & Lavker, R. M. (2008). MicroRNA-184 antagonizes microRNA-205 to maintain SHIP2 levels in epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19300–19305. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803992105>
- Zaman, T., & Lee, J. S. (2018). Risk factors for the development of idiopathic pulmonary fibrosis: A review. *Current pulmonology reports*, 7(4), 118–125.
- Zamani, A. G., & Zamani, A. (2013). MikroRNA'lar ve akciğer kanseri [MicroRNAs and lung cancer]. *Tuberkuloz ve toraks*, 61(1), 57–62. <https://doi.org/10.5578/tt.4874>
- Zhang, N., Hu, G., Myers, T. G., & Williamson, P. R. (2019). Protocols for the Analysis of microRNA Expression, Biogenesis, and Function in Immune Cells. *Current protocols in immunology*, 126(1), e78. <https://doi.org/10.1002/cpim.78>
- Zhang, X., Dong, S., Jia, Q., Zhang, A., Li, Y., Zhu, Y., ... Zhang, J. (2019). The microRNA in ventricular remodeling: the miR-30 family. *Bioscience reports*, 39(8), BSR20190788. <https://doi.org/10.1042/BSR20190788>
- Zhu, L., Fu, X., Chen, X., Han, X., & Dong, P. (2017). M2 macrophages induce EMT through the TGF- $\beta$ /Smad2 signaling pathway. *Cell biology international*, 41(9), 960–968. <https://doi.org/10.1002/cbin.10788>