

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



TRAVMATİK BEYİN HASARI GEÇİREN HASTALARDA AKUT VE KRONİK DÖNEMDE
PERİFERİK KANDAN mikroRNA PROFİLİNİN BELİRLENMESİ ve HİPOFİZ YETMEZLİĞİ
PATOGENEZİNDEKİ ROLÜ

TCD-2013-4604

Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
YRD. DOÇ. DR. SERPİL TAHERİ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacı:
DOÇ.DR. FATİH TANRIVERDİ
Tıp Fakültesi / Dahili Tıp Bilimleri / İç Hastalıkları

YRD.DOÇ.DR. ZÜLEYHA CİHAN ÖZDAMAR KARACA
Tıp Fakültesi / Dahili Tıp Bilimleri / İç Hastalıkları

PROF.DR. KÜRŞAD ÜNLÜHİZARCI
Tıp Fakültesi / Dahili Tıp Bilimleri / İç Hastalıkları

PROF. DR. FAHRETTİN KELEŞTİMUR
Tıp Fakültesi / Dahili Tıp Bilimleri / İç Hastalıkları

Haziran 2015

KAYSERİ

*Bu projenin yürütülmesinde Erciyes Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimine katkılarından dolayı teşekkür
ederiz.*

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1
ABSTRACT	1
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	2
2. GEREÇ VE YÖNTEM	6
3. BULGULAR	8
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	9
5. KAYNAKLAR	11
6. EKLER	13

ÖZET

Amaç: Son zamanlarda hipofiz disfonksiyonunun yaygın nedenlerinden biri olarak tanımlanan Travmatik Beyin Hasarı (TBH), dünya çapında büyük öneme sahip bir halk sağlığı sorunudur. Kafa travmasını takiben gelişen uzun dönem hipopitüarizm'den sorumlu mekanizmalar halen aydınlatılamamıştır. Serumda dolaşan mikroRNA'lar (miRNA'lar) pek çok patolojik durumda karakteristik değişimler gösterdikleri için belirli hastalıklar için de marker olarak kullanılmaktadır. Biz bu çalışmada TBH'ndan sonra gelişen hipopitüarizm'li hastalarda miRNA ekspresyon profilini belirlemeyi amaçladık.

Metod: Çalışmanın akut fazına TBH nedeniyle Nöroşirürji Yoğun Bakım Ünitesine başvuran otuz sekiz hasta (27 erkek, 11 kadın; ortalama yaş: 43 ± 18 yıl) dahil edildi. TBH'yı takiben akut anterior hipofiz fonksiyonuna ilişkin olarak 1.gün, 7.gün ve 28.gün hastalar glukokortikoid eksikliği açısından değerlendirildi. Çalışmanın kronik fazı için beş yıldan daha uzun süre önce TBH geçirmiş 25 hastanın (20 erkek, 5 kadın, ortalama yaş: 36 ± 11 yıl) serum örnekleri alındı. Bu 25 hastanın 8'inde (% 32) kafa travması sonrasındaki 5 yıllık süreçte TBH'ndan sonra hipopitüarizm geliştiği saptandı. Ayrıca 47 yaş-cinsiyet uyumlu sağlıklı kontrol (25 erkek, 22 kadın, ortalama yaş 41 ± 14 yıl) çalışmaya dahil edildi. TBH'dan sonra gelişen hipofiz yetmezliğinin gelişmesine katkıda bulunan potansiyel aday miRNA/miRNA'ları belirlemek amacıyla, TBH hastalarının serum örneklerinde yüksek verimli-gerçek zamanlı PCR yardımıyla 768 miRNA ekspresyon analizi yapıldı.

Bulgular: İstatistiksel analizler belli miRNA'ların (miR-126-3p ve miR-3610) 1., 7., 28. günlerde ve TBH takiben 5.yıldaki hipofiz yetmezliği gelişen hastaların serumlarında günlere göre dinamik değişim gösterdiği saptandı. Ek olarak miR-3907, 1., 7., 28. günlerde ve TBH takiben 5.yıldaki hastalarda günlere göre istatistiksel olarak anlamlı ve sürekli dinamik değişim gösterdiği saptandı.

Tartışma: Bulgularımız miR-126-3p ve miR-3610'un değişmiş ekspresyonunun TBH'dan sonra gelişen hipofiz yetmezliğinin mekanizmasında önemli bir rol oynayabileceğini desteklemektedir.

ABSTRACT

Objectives: Traumatic Brain Injury (TBI), a worldwide public health problem, has recently been recognized as a common cause of pituitary dysfunction. The mechanisms responsible for long term hypopituitarism following head trauma are still unclear. Circulating microRNAs (miRNAs) present in the sera are characteristically altered in many pathological conditions and have been used as

diagnostic markers for specific diseases. **It is with this goal that we planned to study miRNA expression in patients with TBI- induced hypopituitarism.**

Methods: Thirty-eight patients (27 male, 11 female; mean age: 43 ± 18 yr) who had been admitted to the Neurosurgery Intensive Care Unit due to TBI were included in the acute phase of the study. In regard to the acute anterior pituitary function, glucocorticoid deficiency was evaluated on days 1(n=38 patients), 7(n=30 patients), and 28(n=17 patients) following TBI. For the chronic phase, miRNA expression profile blood samples were drawn from 25 patients (20 male, 5 female, mean age: 36 ± 11 yr) who had suffered TBI five years prior. Eight of these 25 same patients (32%) had TBI-induced hypopituitarism at 5 years following head trauma. Forty-seven age-gender-similar healthy controls (25 male, 22 female, mean age: 41 ± 14 yr) were included in the study. In order to identify potential candidate miRNA/miRNAs whose levels had been altered in response to TBI-induced hypopituitarism, 768 miRNA expression analyses were performed in the sera of TBI patients by high throughput real time PCR.

Results: Statistical analyses showed that certain miRNAs (miR-126-3p and miR-3610) were detected in the sera of patients who developed hypopituitarism on the 1st, 7th, and 28th days, and in the 5th year following TBI, in addition miR-3907 showed statistically significant and constant dynamic changes on the 1st, 7th, and 28th days, and in the 5th year in the patients with TBI.

Discussion: Our results indicated that altered expression of miR-126-3p and miR-3610 may play an important role in the development of TBI-induced hypopituitarism.

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

TBH hastalarının hipofiz bezinde belirgin anatomik değişiklik saptanamazken travmadan sonra akut ve/veya kronik dönemlerde ağır hipofiz hormon eksiklikleri görülmektedir. TBH sonrası Hipofiz Yetmezliği(HY) gelişiminde nöroinflamasyona genetik yatkınlık ve otoimmüitenin rol alabileceği az sayıda çalışmada gösterilmekle birlikte hipofiz hasarının moleküler patogenezi ve potansiyel mekanizmaları halen bilinmemektedir. Önerdiğimiz projenin ana amacı TBH sonrası akut ve kronik dönemlerde periferik kandan miRNA'ların ekspresyon profillerinin saptanması ve gelişen HY ile miRNA ekspresyon değişiklikleri arasında ilişki olup olmadığının araştırılmasıdır. Çeşitli miRNA'lar ile HY arasında ilişki saptanırsa hem HY patogeneziinde rol alabilecek miRNA tarafından kontrol edilen aday genler tespit edilebilecek, hem de akut ve kronik dönemde HY gelişen hastaların miRNA

profilleri belirlenerek HY geliştirme potansiyeli olan hastaların erken tanısında çeşitli klinik belirteçler saptanabilecektir.

Genel Bilgiler

Hipofiz bezi salgıladığı hormonlar aracılığı ile vücutta çeşitli hedef organlara etki ederek önemli fizyolojik olaylara katkıda bulunan kompleks bir nöroendokrin organdır. Hipofiz bezi anterior ve posterior olmak üzere iki lobdan oluşur. Anterior lob bezin %80'ini oluşturur ve buradan beş temel hormon salgılanır. Bunlar adrenal bezleri uyaran adrenokortikotrof hormon (ACTH), tiroid bezini uyaran tiroid uyarıcı hormone (TSH), gonadları kontrol eden gonodotropinler (FSH, LH), laktasyonlan sorumlu prolaktin ve temelde büyümeden ve ayrıca erişkinde birçok metabolik olaydan sorumlu büyüme hormonu (GH)'dur (1, 2).

Travmatik Beyin Hasarı(TBH) fiziksel ve psikolojik fonksiyonlarda bozulma ve bilişsel fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanabilen kalıcı ya da geçici nörolojik bozulmaya yol açan çeşitli mekanik kuvvetlerden dolayı beyinin hasar gördüğü non-konjenital, non-dejeneratif bir durumdur. Dünyada ve ülkemizde artan trafik kazaları nedeniyle TBH sıklığı ve sonuçları açısından dünyadaki genç ve üretken nüfusu etkileyen en önemli halk sağlığı problemlerindendir (3). Son yıllara kadar TBH'nın nadiren hipofiz yetmezliğine (HY) neden olabileceği düşünülürken 2000 yılından sonra hem retrospektif hem de prospektif çalışmalarda TBH sonrası HY'nin bilindiğinden çok daha sık olduğu gösterilmiştir. Kliniğimizde yapılan 12 aylık ve literatürde şu an en uzun prospektif çalışma olan TBH'dan 3 yıl sonra hastaların değerlendirildiği çalışmalarda yaklaşık %25-30 oranının hipofiz hormon eksikliği saptadık ve en fazla görülen hipofiz hormon eksikliği ise izole GH eksikliği idi (4, 5). Yaklaşık 1000 hastanın incelendiği bir meta-analizde, hafif-orta ve ağır TBH sonrası kronik dönemde (travmadan en az 6 ay sonra) HY oranı %15-35 civarında bulunmuştur ve en sık hormon eksikliklerinin büyüme hormonu (GH) ve gonadotropik hormon (FSH/LH) olduğu bildirilmiştir (1). Hipofiz bezinden salgılanan büyüme hormonunun sadece büyüme ile ilgili olmadığı, erişkin yaşta da hem genel sağlığımızı hem de sporcu sağlığı ve performansını ilgilendiren birçok önemli metabolik fonksiyonunun olduğu son yıllarda anlaşılmıştır. Hipofiz hormon eksikliklerinin en önemli özelliği hekimin aklına gelmez ise sadece bulgulardan tanı konması zordur. Ancak tanı konduğunda eksilen hormonlar yerine konursa tamamen tedavi şansı mevcuttur. Ayrıca travmanın akut döneminde yoğun bakımda izlenen hastalarda literatürde ve kendi kliniğimizde %15-30 arasında ACTH eksikliği saptanmıştır. ACTH stress hormonu olan kortizolün salınımını kontrol etmektedir ve yoğun bakım

hastalarında kortizolün hayati önemi vardır. Yoğun bakımda hipotansiyon gelişen ve genel durumu bozulan hastalarda TBH'na bağlı ACTH eksikliği tanısı konulup steroid tedavisi verilmez ise hastanın mortalitesi belirgin olarak artacaktır (1, 4, 5). Son 10 yıllık literatürden elde edilen veriler ışığında gerek akut gerekse de kronik dönemde TBH'na bağlı HY'nin artık önemli bir klinik sorun olduğunu söylemek mümkündür.

TBH'nı takiben gelişen HY'nin patofizyolojisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Çeşitli otopsi çalışmaları ve az sayıda deneysel çalışmalar sonucu, patogeneze vasküler hasar, stalk kesisi, intrakranial basınç artışına bağlı doku hasarı gibi mekanizmaların neden olabileceği öne sürülmektedir (6). Bu mekanizmalar içinde vasküler hasar en muhtemel mekanizma olabilir ancak bu konuda klinik ve deneysel çalışma yetersizdir. Ayrıca akut vasküler hasar başlatıcı faktör olsada kronik dönemde oluşan hasarı açıklamakta bu hipotez yetersiz kalmaktadır. Az sayıda vakada travmanın direkt etkisi ile stalk kesisine bağlı HY tanımlansada vakaların çoğunda travma sonrası hipofiz bezinde belirgin anatomik değişim saptanmamıştır. Kliniğimizde yapılan TÜBİTAK destekli bir projede kronik tekrarlayan kafa travmasına maruz kalan boksörlerde HY gelişenlerin hipofiz volümlerinin daha küçük olduğunu saptadık ancak sadece volüm azalmasının HY'ni açıklaması mümkün değildir. Ayrıca bu alandaki diğer ilginç ve mekanizması aydınlatılamayan bir gözlem de prospektif çalışmalarda saptanmıştır. Şu an literatürde biri bize ait olmak üzere 6 adet TBH sonrası hipofiz fonksiyonlarının 12 ay izlendiği prospektif çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların dördünde 12 aylık dönemde başta eksik olan hipofiz hormonlarının büyük oranda zamanla düzeldiği ancak bazı hastalarda ise başta normal olan hipofiz hormonlarının zamanla bozulabildiği yani TBH sonrası hipofiz hormonlarında dinamik bir değişim gösterilmiştir. Özellikle hafif kafa travması geçiren hastalarda bu dinamik değişimin travmadan 3 yıl sonra devam ettiğini şu an literatürdeki en uzun süreli izlem çalışmamızda gösterdik. O halde patogeneze ışık tutabilecek ve mekanizmaları açıklanamayan klinik gözlemler şu şekilde sıralanabilir:

1. TBH sonrası yaşayan hastaların çoğunda görüntüleme çalışmaları sonrası hipofiz bezinde belirgin bir anatomik hasar saptanmamıştır;
2. Hafif TBH sonrası dahi kronik dönemde anlamlı oranda HY gelişebilmektedir;
3. Aynı ağırlıkta kafa travmasına maruz kalan bireylerin bir kısmında HY görülürken diğerlerinde HY gelişmemektedir;
4. Yayınladığımız 12 aylık ve 3 yıllık prospektif çalışmalarda hipofiz hormonlarında dinamik değişim görülmektedir. Bu klinik soruların cevaplanabilmesi ve mekanizmalarının açıklanması için dünyada bu konu ile ilgilenen birkaç merkezde çeşitli çalışmalar devam etmektedir(4, 5, 7) Kliniğimizde yürüttüğümüz bir çalışmada APO E3/E3 genotipine sahip bireylerde TBH sonrası HY gelişiminin istatistiksel anlamlı olarak diğer genotiplerden

daha az olduğu gösterilmiştir. APO-E proteini santral sinir sisteminde nöroinflamasyon ile ilgili proteinleri regüle etmektedir. Bu klinik çalışma yakın zamanda yayınlanan ve bu alandaki ilk hayvan modelinin kullanıldığı deneysel bir çalışmada kısmen doğrulanmıştır. Kasturi ve Stein'in 2009 yılında yaptıkları bu önemli deneysel çalışmada TBH sonrası GH seviyelerinde görülen kronik değişimlerin hipotalamusta ve anterior hipofizde gelişen nöroinflamatuvar değişikliklerin muhtemel sonucu olduğunu ortaya konmuştur. Aynı şiddette travmaya maruz kalan hastaların bazısında HY gelişimi nöroinflamasyona genetik yakınlıkla açıklanabilir ancak kronik dönemdeki dinamik hormonal değişimin ve özellikle bazı hastalarda HY'nin zamanla düzelmesini bu mekanizma ile açıklamak mümkün değildir (1). Kliniğimizde hipofiz bezi otoimmünitesi konusunda deneyimli İtalyan grup ile ortak yürüttüğümüz bir çalışmada, travmadan 3 yıl sonra antihipofizer antikor pozitif olan hastalarda HY oranının daha yüksek olduğunu saptadık (5). Ayrıca şu an yayın aşamasında olan diğer ortak çalışmamızda ise, TBH'ından 5 yıl sonra yüksek titrede antihipofizer ve antihipotalamik antikor gelişen hastalarda HY'nin kalıcı olduğunu veya başta normal iken zamanla hormonların bozulduğunu, ancak antikor titreleri düşük olan hastalarda ise HY'nin olmadığını veya düzeldiğini gözlemledik. O halde dinamik hormonal değişim hipofiz otoimmünitesi ile açıklanabilir ancak bu klinik gözlemlerin deneysel çalışmalar ile desteklemesi gereklidir. Ancak gerek nöroinflamatuvar cevabın gerekse de otoimmünitenin mekanik travma sonrası nasıl tetiklendiğinin moleküler mekanizmaları halen açık değildir (5, 8).

Nedeni tam olarak anlaşılamayan hastalıkların mekanizmasında epigenetik faktörlerin önemli rol oynadığı son yıllarda anlaşılmaya başlamıştır. Epigenetik faktörler posttranskripsiyonel aşamada genlerin ekspresyonlarının regölasyonunda görev alırlar. Özellikle son zamanlarda posttranskripsiyonel aşamada genlerin ekspresyonlarının regölasyonunda görev alan mikroRNA'lar (miRNA) ok dikkat çekmektedir. Birçok hastalık için ön tanıda belirleyici bir marker (belirteç) olarak kabul edilmektedirler. miRNA'lar posttranskripsiyonel aşamada mRNA'lara bağlanarak mRNA'nın ya inhibe olmasını ya da degrade olmasını sağlayarak oluşan mRNA'nın proteine dönüşmesini engellemektedirler. Genlerin %30'unu miRNA'ların kontrol ettiği ayrıca bazı miRNA'ların da aynı zamanda yüzlerce farklı mRNA'yı kontrol ettiği düşünölmektedir. miRNA'lar 1000 nt uzunluğundaki RNA bölgeleri olarak transkribe edilirler. Uzun olarak transkribe edilen miRNA'lar nükleer matürasyon aşamalarını takiben yaklaşık 70 nt olarak kesilir ve Exportin-5 adı verilen bir molekül aracılığı ile sitoplazmaya geçişleri sağlanır. Daha ileri ki aşamalarda miRNA'lar yaklaşık 20 bp'lik miRNA olarak kesilirler. Bu işlem Dicer adı verilen 200 kb'lik bir protein

tarafından gerçekleştirilir. Sirkülasyondaki miRNA'lar birçok patolojik durumda karakteristik olarak değişmektedirler ve bazı spesifik hastalıklar için diagnostik bir belirteç olarak kullanılabilirler. Örneğin miR-92a ve miR-638 akut löseminin plazmada belirlenmesi için duyarlı bir belirteçtir. miR-922'nin seviyeleri ise kolon kanserli hastalarda normal kontrollere göre belirgin bir şekilde artmaktadır. Yakın gelecekte doku spesifik miRNA'lar dokudaki hasardan sonra (örneğin kalp krizi, yada ilaca bağlı hasar gibi) sirkülasyona geçerek potansiyel olarak faydalı tanısal bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Son çalışmalara göre miRNA'ların gelişimin kontrolü, hematopoetik hücre farklılaşması, inflamasyon, apoptosis, hücre farklılaşması ve organ gelişimi gibi önemli olayların regülasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (9, 10).

Literatürde TBH hastalarında miRNA ekspresyonları ile ilgili sadece bir klinik çalışma mevcuttur. Redell ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada TBH geçiren hastalarda plazmada kontrollere göre miRNA seviyelerinin değişip değişmediğine mikroarray metodu ile bakılmıştır (5). Çalışma 47 hastada yapılmış ve 875 adet miRNA ekspresyonu analiz edilmiştir. Sonuçta, miR-16, miR-92 ve miR-765'in TBH'na bağlı beyin hasarı için klinik belirteç olabileceği gösterilmiştir. Fakat yapılan bu çalışmada TBH'dan sonra hipofiz fonksiyonları ve HY ile miRNA ilişkisi incelenmemiştir (6, 9, 10).

Önerilen projenin ana amacı TBH sonrası akut ve kronik dönemlerde periferik kandan miRNA'ların ekspresyon profillerinin saptanması ve gelişen HY ile miRNA ekspresyon değişiklikleri arasında ilişki olup olmadığının araştırılmasıdır. Çeşitli miRNA'lar ile HY arasında ilişki saptanırsa hem HY patogenezinde rol alabilecek miRNA tarafından kontrol edilen aday genler tespit edilebilecek, hem de akut ve kronik dönemde HY gelişen hastaların miRNA profilleri belirlenerek HY geliştirme potansiyeli olan hastaların erken tanısında çeşitli klinik belirteçler saptanabilecektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Daha önce yapılan Erciyes Üniversitesi araştırma projelerindeki hasta gruplarının serum örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca daha önceki bu projelerden dolayı hastalardan gönüllü onam formları alınmıştır.

Bu projede;

- 1- 38 TBH hastası 1.gün, 30 hasta 7.gün, 17 hasta 28.gün
- 2- 25 TBH hastası (Kronik Dönem 5 yıllık)

- 3- 47 kontrol hastasından elde edilen ve -80 derecede saklanan serumlar kullanılacaktır (Toplamda 157 serum örneğinin miRNA ekspresyon profilleri) belirlenmiştir.

TBH hastalarında 768 miRNA'nın ekspresyon profilinin belirlenmesinde High Throughput Microfluidic Real Time Quantitative PCR metodu kullanılmıştır. miRNA profili miRNA taqman propları kullanılarak BioMark Real-Time PCR Sisteminde çalışılmıştır. Bu metod miRNA ekspresyonlarının belirlenmesinde yüksek hassasiyete sahiptir. Microarray konfirmasyona ihtiyaç duyarken bu metod zaten Real Time PCR olduğu için konfirmasyona ihtiyacı yoktur.

- 1- Hastaların ve kontrollerin periferel kanlarından serumları ayrılmış ve -80°'de saklanmıştır.
- 2- Serum örneklerinden miRNA izolasyonu yapılmıştır.
- 3- İzole edilen miRNA'lar özel dizayn edilmiş özel loplu primerler ile cDNA'ya çevrilerek elde edilen cDNA'lar 5 kez dilüe edilerek preamplifiye edilmiştir.
- 4- Preamplifiye edilen ürünler DNA süspansiyon buffer ile 10 kez dilüe edilerek, daha sonra Dinamik Array 96X96 chipine kontrol sıvısı enjekte edilmiş ve chip IFC cihazına yerleştirilerek chip prime edilmiştir.
- 5- Sample master mix hazırlanarak 96'lık plate preamplifiye edilmiş cDNA örnek sayısı kadar kuyucuğa 3.85 µl sample master mix multi kanallı pipet ile pipetlenmiş ve üzerine 3.15 µl preamplifiye cDNA örnekleri pipetlenecek ve plate vortexlenip cDNA ve sample mastermix karışımından 5 µl Dinamik Array Chipine transfer edilmiştir. Chipin assay kısmına da miRNA taqman proplarından 4,5 µl multikanallı pipet ile pipetlenecek. Bu işlemler tamamlandıktan sonra hazırlanan Dinamik Array chipin kuyucuklarına ürünler yüklendi. Daha sonra PCR işlemi için Chip Biomark Reader'a yüklendi(bu işlem miRNA A ve B paneli için ayrı ayrı 2 kez yapılmıştır). Toplamda 768 miRNA'nın ekspresyonuna bakılmıştır.

İstatistik Analizler

Veriler Fluidigm Real-Time PCR Analiz Yazılımı yardımıyla doğrusal türev bazal düzeltme yöntemi ve küresel oto Cq eşik yöntemi kullanılarak toplanmıştır. Real time PCR'dan alınan 26'dan büyük Cq değerleri nonspesifik olarak değerlendirildi ve analizlerden çıkarıldı. Median LOD Cq değerleri eksik değerler için bütün değerler üzerinden hesaplandı.

Verilerin normalizasyonu için $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı. Farklı eksprese olan miRNA'ları belirlemek için RNA-Seq data (limma) metodu kullanıldı. Multipl test hesaplamalarının p değerlerini ayarlamak

için Benjamini-Hochberg hata saptama oranı düzeltme metodu kullanıldı. Farklı eksprese olan miRNA'lara göre sinyal yollarını sınıflamak amacıyla DIANA-mirPath yazılımı kullanıldı.

miRNA'yı ve etkileşim seviyelerine göre yolak kümelerini belirlemek amacıyla deneysel yollarla doğrulanmış potansiyel hedefler ve aglomeratif hiyerarşik kümeleme algoritmasını içeren TarBase hedefleri kullanıldı. Analizler için R 3.1.2 yazılımının Rcmdr (17) ve limma (18) paketleri (URL <http://www.R-project.org/>.) kullanıldı. p değerlerinin %5 ten küçük olması anlamlılık sınırı olarak belirlendi.

BULGULAR

TBH'dan sonra gelişen Hipofiz yetmezliğinde miRNA ekspresyon profilleri

TBH'dan sonra gelişen Hipofiz yetmezliğinin 1.günü tespit edilen miRNA'lar

TBH'nı takiben 1.gün HY gelişen hastalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında 99 miRNA ekspresyonu (96 up ve 3 down regüle) istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0.05$) (tablo 1, Figür 1A).

TBH'dan sonra gelişen Hipofiz yetmezliğinin 7.günü tespit edilen miRNA'lar

TBH'nı takiben 7.gün HY gelişen hastalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında 15 miRNA ekspresyonu (13 up ve 2 down regüle) istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0.05$) (tablo 1, Figür 1B).

TBH'dan sonra gelişen Hipofiz yetmezliğinin 28.gününde tespit edilen miRNA'lar

TBH'nı takiben 28.gün HY gelişen hastalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında 18 miRNA ekspresyonu (15 up ve 3 down regüle) istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0.05$) (tablo 1, Figür 1C).

TBH'dan sonra gelişen Hipofiz yetmezliğinin 5.yılında tespit edilen miRNA'lar

TBH'nı takiben 5.yıl HY gelişen hastalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında 11 miRNA ekspresyonu (up regüle) istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0.05$) (tablo 2, Figür 1D).

TBH'dan sonra gelişen Hipofiz yetmezliği hastalarının 1.gün, 7.gün, 28.gün ve 5.yılda dinamik değişim gösterdiği tespit edilen miRNA'lar

TBH takiben HY gelişen hastalarda potansiyel bir markır bulma hedefinden yola çıkarak 1.gün, 7.gün, 28.gün, 5.yılda anlamlı bulunan miRNA'lar incelendiğinde miR-3610 ve miR-126-3p'nin 1.gün, 7.gün, 28.gün, 5.yılda istatistiksel olarak anlamlı ve sürekli dinamik değişiklik gösterdiği tespit edildi($p<0.05$). (Figür 2)

TBH takiben HY gelişen hastalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında miR-3610 düzeyleri 1.günde 5 kat, 7.günde 8.5 kat, 28.günde 2.3 kat ve 5.yılda 10 kat artış gösterdi. Aynı şekilde miR-126.3 p düzeyleri kontrollerle karşılaştırıldığında 1.günde 11 kat, 28.günde 12 kat azalma gösterirken; 5.yılda 12 kat artış gösterdi. (Figür 2)

TBH takiben HY gelişen hastalarda 5.yılda yolakların analizleri sonucunda anlamlı bulunan miRNA'lar Figür 3'te verilmiştir.

'TBH'ndan sonra hastaların 1.gün, 7.gün, 28.gün, 5.yılında dinamik değişim gösteren miRNA'lar

TBH'dan sonra hastaların 1.gün, 7.gün, 28.gün, 5.yılda anlamlı bulunan miRNA'ları incelendiğinde miR-3907'nin 1.gün, 7.gün, 28.günde ve 5.yılda istatistiksel olarak anlamlı ve sürekli dinamik değişiklik gösterdiği tespit edildi($p<0.05$).

TBH takiben hastalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında miR-3907 düzeyleri 1.günde 2.74 kat, 7.günde 2.67 kat, 28.günde 2.5 kat ve 5.yılda 6.3 kat artış gösterdi. miR-3907 TBH hastalarının serum örneklerinde 5 yıl sonra bile up-regüle'ydi (Figür 4).

TARTIŞMA VE SONUÇ

TBH tüm dünyada görülen yaygın ve önemli bir halk sağlığı sorunudur. Günümüzde, TBH HY'nin yaygın nedenlerinden biri olarak bilinmektedir. TBH, kısmi veya tam HY'ne neden olabilir. Hafif TBH geçiren hastaların %20-50 sinde HY'i gösterilmiştir (6-10). Fakat HY'nin nedeni halen tam olarak bilinmemektedir. Güncel klinik çalışmalara göre, TBH geçiren bazı hastalarda HY geliştiği bazılarındaki ise gelişmediği gösterilmiştir (7, 8, 9, 11).

TBH'ı takiben ani veya bir süre sonra HY'nin gelişiminden koruyucu mekanizmaların tam olarak neler olduğu henüz tespit edilememiştir (1).

miRNA olarak adlandırılan küçük RNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Serumda dolaşan mikroRNA'lar (miRNA'lar) pek çok patolojik durumda karakteristik değişimler gösterdikleri için ve belirli hastalıklar için de marker olarak kullanılmaktadır (9, 12, 13, 14).

Bu çalışmada, TBH'mı takiben HY gelişen veya gelişmeyen hastaların TBH sonrası 1., 7., 28. Günde ve 5.yıldaki serum örneklerinden miRNA ekspresyon profilleri belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen önemli sonuçlar şu şekildedir,

- 1) TBH'dan sonra gelişen HY'ni takiben dolaşımdaki miR-126-3p ve miR-3610 düzeyleri 1., 7., 28. günlerde ve 5.yıldaki seviyelerinin dinamik değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir.
- 2) TBH'dan sonra dolaşımdaki miR-3907 düzeyleri 1., 7., 28. günlerde ve 5.yılda hastaların serum örneklerindeki seviyeleri bütün TBI hastalarında dinamik değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir.
- 3) miR-3907'nin TBH patofizyolojisiyle ilişkili olabileceği ve TBH ile miR-3907 arasında bir ilişkinin olabileceği düşünülmektedir.
- 4) En önemlisi, dolaşımdaki miR-126-3p ve miR-3610 seviyeleri TBH sonrası HY'ni etkili bir biçimde yansıtabilir. Bu miRNA'lar HY gelişmeyen hastalarda tespit edilmemiştir.

Bilgilerimize göre bu çalışma HY ile TBH sonrası miRNA'ların ilişkisinin incelendiği ilk çalışmadır. Fakat literatürde TBH ile miRNA ilişkisinin araştırıldığı bazı çalışmalar bulunmaktadır. Redell ve ark. TBH'nın Glaskow koma skoruna(GKS) göre; multitravmadan, hafif beyin travmasının ve ciddi beyin travmasından ayırımı şeklinde de bilinen, ayırt edilmesinde spesifik markır olarak miR-16 ve miR-92a'nın kullanılabileceğini öne sürmektedirler. Her iki belirteç de miR-16 down-regulasyonuna uygun olacak şekilde TBH grubunda ciddi beyin travmasına göre anlamlı şekilde azalmıştır. Yazarlar TBH'nın ciddiyetinin belirlenmesinde bu miRNA'ların yardımcı olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Fakat bu çalışma sadece TBH'ı takiben hastaların ilk 3 ve 24 saat içindeki serum örneklerindeki miRNA ekspresyon profilleri üzerine kurgulanmıştır ve bu çalışmada TBH'dan sonra gelişen HY ve TBH arasındaki ilişki araştırılmamıştır (9).

Bizim çalışmamızın bu çalışmadan farkı; yaptığımız çalışmada ilk hedef olarak; TBH ile ilişkili ve özellikle de TBH'dan sonra gelişen HY ile ilişkili miRNA'ları araştırdık

Ayrıca TBH geçiren bütün hastalarda 1., 7., 28.ve 5 yılda miR-3907 düzeyleri'nin dinamik değişiklik gösterdiğini tespit ettik. miR-3907 düzeyleri 1.günde 2.74 kat, 7.günde 2.67 kat, 28.günde 2.5 kat, 5.yılda 6.3 kat artmıştı ve bu sonuç TBH'ndan 5 yıl sonra bile hastaların serumlarında up-regüle olarak tespit edildi.

miR-3907'nin TBH'dan sonra kullanılabilecek bir biomarker olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmanın en önemli amacı TBH sonrası HY gelişiminde potansiyel bir biomarker tespit edebilmektir. miR-3610 ve miR-126-3p TBH sonrası HY gelişen hastaların serumlarında bulunmuştur. 5 yıl sonra bile yapılan bütün ölçümlerde sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında dinamik değişiklikler tespit edilmiştir. Tespit ettiğimiz miRNA'lar ve TBH sonrası ani gelişen HY arasında bir ilişki olduğunu ve miR-3610 ve miR-126-3p 'nin hastaların takip süreçlerinde marker olarak

kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Fakat bu çalışma mutlaka daha kapsamlı çalışmalarla desteklenmelidir. Eğer bulgularımız desteklenir ve TBH sonrası gelişen HY ile ilişkili mekanizmalar aydınlatılabilirse; yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlanabilir ve bu miRNA'lar TBH sonrası gelişen HY'nin erken tanısını öngörmeye bir belirteç olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Tanriverdi F, Schneider H, Aimaretti G, Masel BE, Casanueva FF, Kelestimur F. Pituitary dysfunction after traumatic brain injury: a clinical and pathophysiological approach. *Endocr Rev.* 2015 May 7;er20141065.
2. Aimaretti G, Ambrosio MR, Di Somma C, Gasperi M, Cannavo S, Scaroni C, Fusco A, Del Monte P, De Menis E, Faustini Fustini M, Grimaldi F, Logoluso F, Razzore P, Rovere S, Benvenga S, Uberti EC, De Marinis L, Lombardi G, Mantero F, Martino E, Giordano G, and Ghigo E. Residual pituitary function after brain injury-induced hypopituitarism: a prospective 12- month study. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2005; 90: 6085–6092.
3. Tanriverdi F, Ulutabanca H, Unluhizarci K, Selcuklu A, Casanueva FF, Kelestimur F. Pituitary functions in the acute phase of traumatic brain injury: are they related to severity of the injury or mortality? *Brain Inj* 2007 Apr;21(4):433-9.
4. Tanriverdi, F., Senyurek, H., Unluhizarci, K., Selcuklu, A., Casanueva, F.F., and Kelestimur, F. High risk of hypopituitarism after traumatic brain injury: a prospective investigation of anterior pituitary function in the acute phase and 12 months after trauma. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2006;91: 2105–2111.
5. Schneider HJ, Schneider M, Saller B, Petersenn S, Uhr M, Husemann B, von Rosen F, Stalla GK. Prevalence of anterior pituitary insufficiency 3 and 12 months after traumatic brain injury. *Eur J Endocrinol* 2006 Feb;154(2):259-65.
6. Schneider HJ, Kreitschmann-Andermahr I, Ghigo E, Stalla GK, Agha A. Hypothalamopituitary dysfunction following traumatic brain injury and aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *JAMA* 2007 Sep 26;298(12):1429-38.
7. Tanriverdi F, Ulutabanca H, Unluhizarci K, Selcuklu A, Casanueva FF, Kelestimur F. Three years prospective investigation of anterior pituitary function after traumatic brain injury: a pilot study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008 Apr;68(4):573-9.

8. Tanriverdi F, De Bellis A, Ulutabanca H, Bizzarro A, Sinisi AA, Bellastella G, Amoresano Paglionico V, Dalla Mora L, Selcuklu A, Unluhizarci K, Casanueva FF, Kelestimur F. A five year prospective investigation of anterior pituitary function after traumatic brain injury: is hypopituitarism long-term after head trauma associated with autoimmunity? *J Neurotrauma*. 2013 Aug 15; 30(16):1426-33.
9. Tanriverdi F, De Bellis A, Bizzarro A, Sinisi A, Bellastella G, Pane, E, Bellastella A, Unluhizarci K, Selcuklu A, Casanueva F, and Kelestimur F. Antipituitary antibodies after traumatic brain injury: is head trauma induced pituitary dysfunction associated with autoimmunity? *Eur. J. Endocrinol* 2008;159: 7–13.
10. Redell JB, Moore AN, Ward NH, Hergenroeder GW, Dash PK. Human traumatic brain injury alters plasma microRNA levels. *J Neurotrauma*. 2010 Dec; 27(12):2147-56.
11. Hannon MJ, Crowley RK, Behan LA, O'Sullivan EP, O'Brien MM, Sherlock M, Rawluk D, O'Dwyer R, Tormey W, Thompson CJ. Acute glucocorticoid deficiency and diabetes insipidus are common after acute traumatic brain injury and predict mortality. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 Aug; 98(8):3229-37
12. S. Vlachos, N. Kostoulas, T. Vergoulis, G. Georgakilas, M. Reczko, M. Maragkakis, M. D. Paraskevopoulou, K. Prionidis, T. Dalamagas, A. G. Hatzigeorgiou DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res* 2012 Jul; 40: 498-504.
13. Fox, J. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software* 2005; 14(9): 1-42.
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(−Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4):402–408.

EKLER

Tablo.1. TBH sonrası hipopitüarizm gelişen hastaların 1.gününde anlamlı bulunan miRNA'lar.

miRNAs	Fold change	MiRNAs	Fold change	miRNAs	Fold change
miR-34c-3p	1.265529588	miR-660-5p	2.061713748	miR-4274	2.154940186
miR-601	2.020775564	miR-1225-3p	2.701492778	miR-3911	2.152007563
miR-4291	5.864478274	miR-192-5p	2.519180832	miR-1587	2.077901495
miR-3610	5.100571152	miR-223-5p	2.389880502	miR-378a-3p	2.115596416
miR-424-5p	1.994285026	miR-27b-3p	1.136767821	miR-532-5p	2.106156484
miR-421	4.344628237	miR-185-5p	1.344633558	miR-22-5p	2.133834216
miR-27a-3p	1.267204938	miR-18a-3p	2.496820286	miR-340-5p	2.132802356
miR-484	2.418563616	miR-942	2.533909302	miR-3923	2.132802356
miR-140-3p	1.256765329	miR-17-5p	1.243046998	miR-590-5p	2.132802356
miR-365a-3p	3.763977266	miR-99b-5p	2.394475509	let-7g-3p	2.132802356
miR-125b-5p	0.576053388	miR-197-3p	3.461074207	miR-361-5p	2.132802356
miR-23a-3p	0.92870623	miR-146a-5p	0.599896795	miR-1291	2.132802356
miR-106b-5p	4.089836375	miR-25-3p	0.658953643	miR-363-3p	2.126839465
miR-92b-3p	1.253182784	miR-378g	1.34136865	miR-486-3p	2.125996293
miR-126-3p	-11.3094978	miR-1	2.32866653	miR-502-3p	2.11621185
miR-3907	5.387696191	miR-145-5p	0.826674914	miR-345-5p	1.694347464
miR-130b-3p	3.822184014	miR-342-3p	1.514421615	miR-1180-3p	2.11357863
Let-7d-5p	1.047224357	miR-671-3p	2.230416313	miR-422a	2.112164669
let.7d.3p	1.383924654	miR-148a-3p	1.995843405	miR-93-3p	2.112857303
miR-130a.3p	3.246220742	miR-625-3p	2.295655639	miR-139-5p	2.127251478
miR-4516	0.547564067	miR-4770	1.297138278	miR-324-3p	2.10920489
miR-4651	4.583125653	miR-93-5p	4.439709633	miR-3135b	1.456159175
miR-29c-3p	0.413952404	miR-126-5p	0.652180511	miR-4286	1.254783986
miR-29b-3p	3.701596858	miR-378i	2.238039101	miR-7-5p	2.085900883
miR-100-5p	0.532652214	miR-15b-3p	2.100176275	miR-151a-5p	2.106507248
miR-628-3p	3.25696558	miR-652-3p	2.248676674	miR-4732-3p	2.096923332
miR-223-3p	0.76509618	miR-486-5p	1.56082603	miR-4296	2.083419337
miR-423-3p	2.172041325	Let-7c-5p	2.209014488	miR-194-5p	2.285475853
miR-128-3p	1.549320177	miR-99a-5p	0.287563097	miR-374a-5p	2.09560608
miR-20b-5p	0.898655953	miR-199a-3p	0.562803277	miR-505-3p	1.871870201
miR-20a-5p	2.264330683	Let-7a-3p	2.154308998	miR-4301	2.111062037
miR-1208	832.3336125	miR-4422	2.204431767	miR-1280	3.072982552
miR-489-3p	3.637900999	miR-574-3p	1.569147302	miR-127-3p	2.076614655

Not: Ekspresyonu artan ve azalan miRNA'lar için $p < 0.05$ alındı.

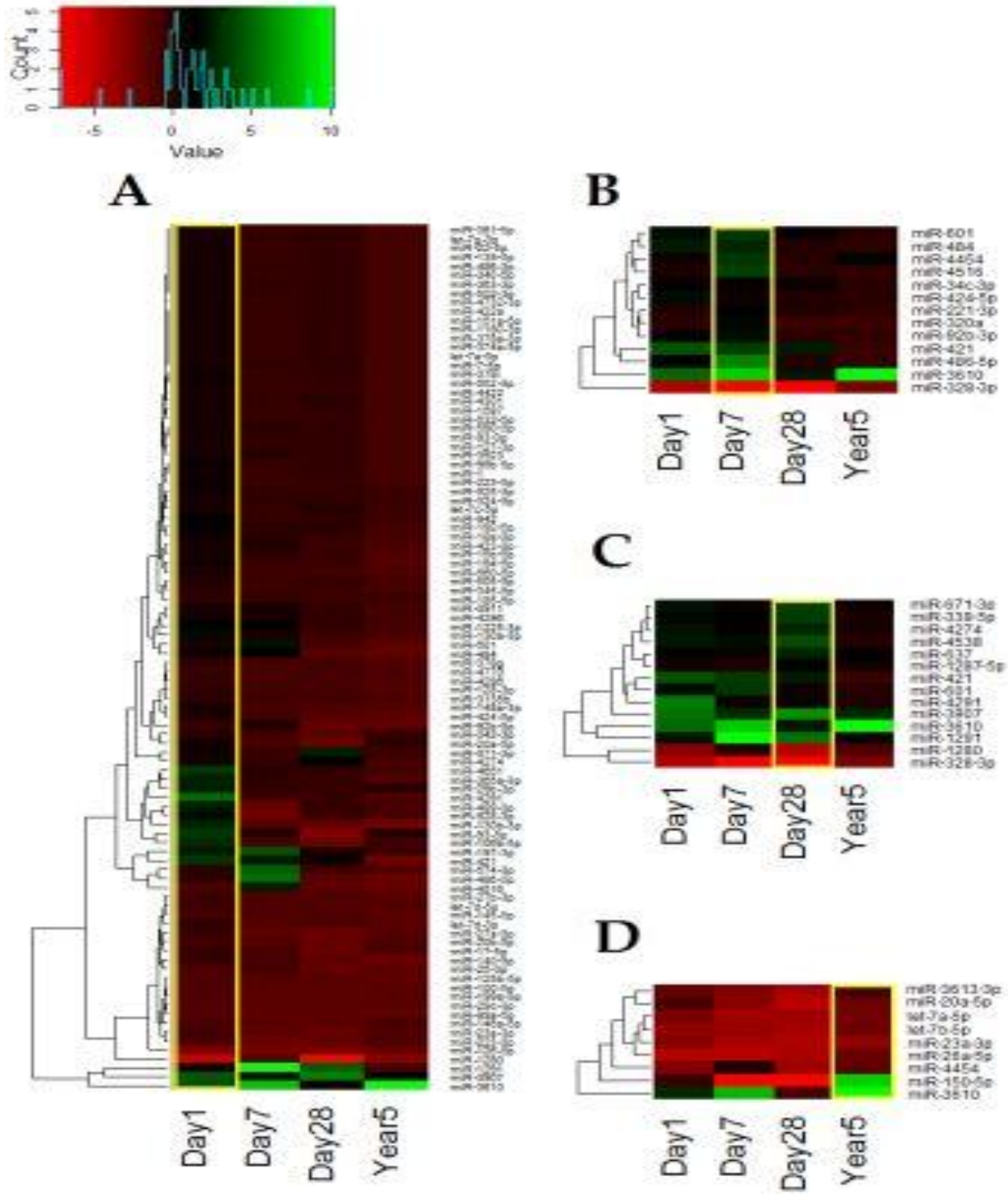
Tablo 2. TBH sonrası hipopitüarizm gelişen hastaların 7., 28.gününde ve 5.yılında anlamlı bulunan miRNA'lar.

Day 7 after TBI	
miRNAs	Fold Change
miR-34c-3p	1.19077
miR-3610	8.516845
miR-484	2.874088
miR-221-3p	1.344292
miR-4454	3.28122
miR-126-3p	-12.1314
miR-4516	3.657027
miR-486-5p	5.988561
miR-92b-3p	1.916939
miR-601	3.316576
miR-320a	1.692046
miR-424-5p	0.849787
miR-328-3p	-7.12766
miR-720-1	50.35636
miR-421	3.510035
miR-34c-3p	1.19077
miR-3610	8.516845

Day 28 after TBI	
miRNAs	Fold Change
miR-34c-3p	1.127833
miR-720-1	33.64745
miR-1291	5.495848
miR-671-3p	3.792837
miR-601	1.01789
miR-126-3p	-12.0508
miR-3907	6.595649
miR-1208	1099.51
miR-339-5p	3.538008
miR-1280	-4.63386
miR-4291	1.180267
miR-328-3p	-7.17419
miR-1287-5p	1.634597
miR-421	2.493539
miR-3610	2.384244
miR-4538	4.206466
miR-4274	2.914039
miR-637	2.71458

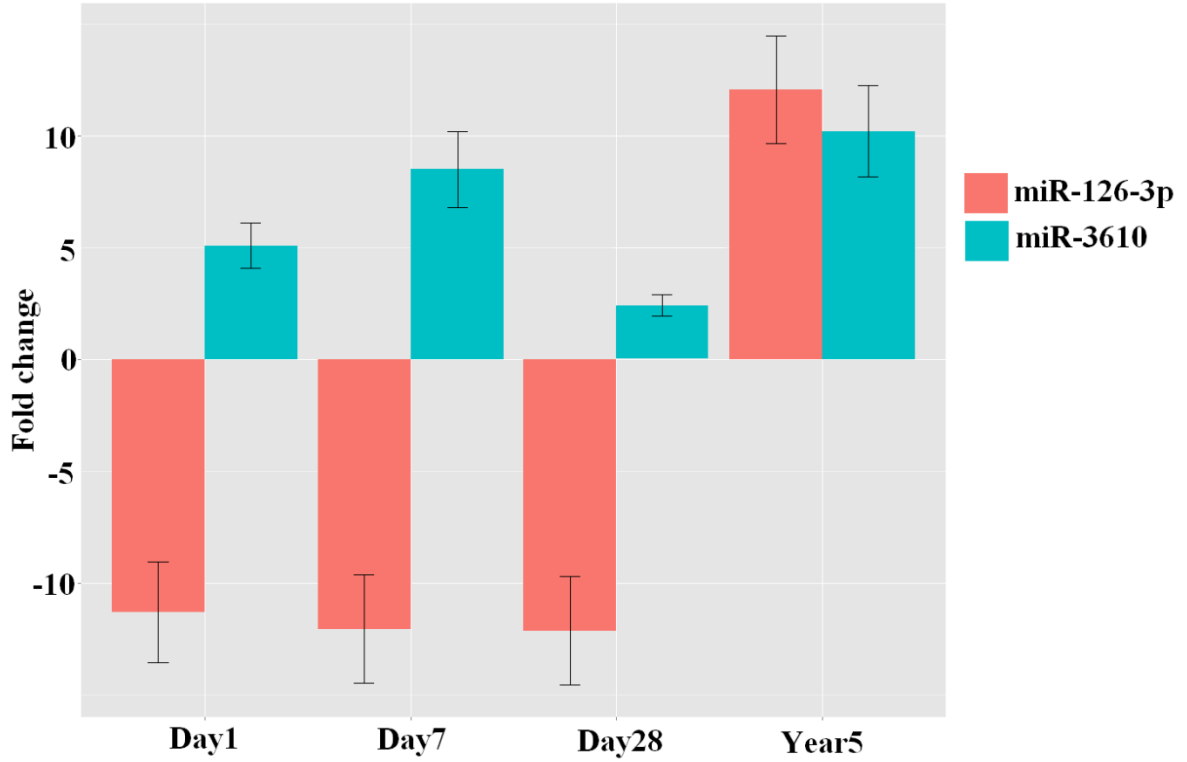
5 year after TBI	
miRNAs	Fold Change
let-7g-5p	5.329264
miR-150-5p	9.051574
let-7b-5p	1.390018
miR-126-3p	12.07636
miR-26a-5p	1.472708
miR-3610	10.20998
miR-4454	1.73747
miR-23a-3p	0.508538
miR-3613-3p	2.521892
let.7a.5p	1.250289
miR-20a-5p	1.377648

Not: Ekspresyonu artan ve azalan miRNA'lar için $p < 0.05$ alındı.

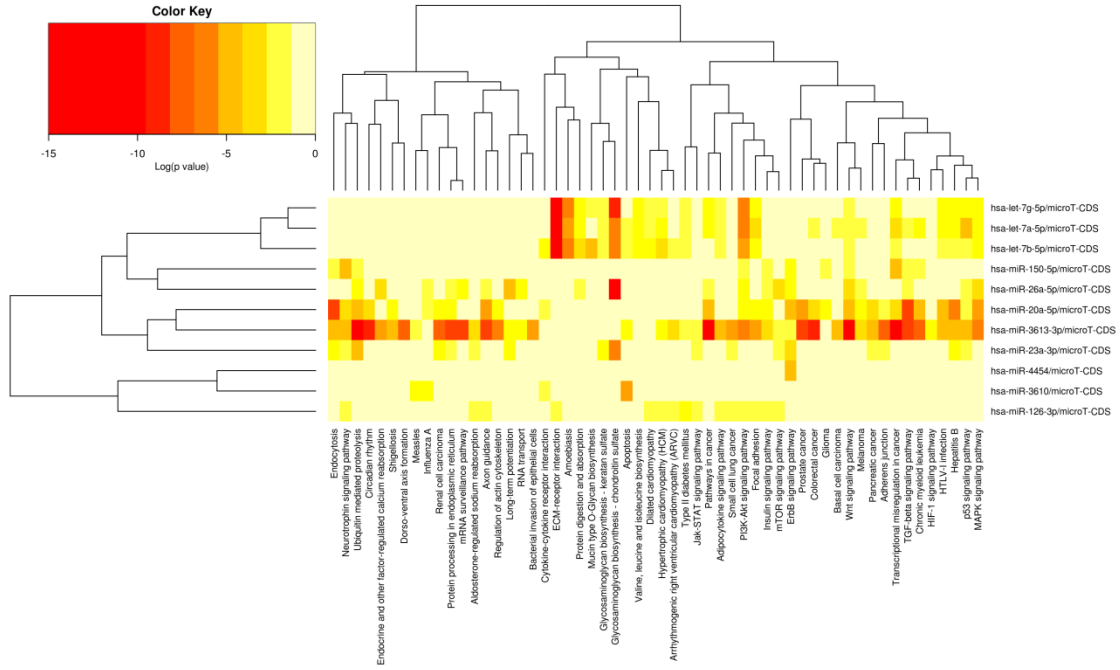


Figür 1. TBH sonrası 1., 7., 28. günde ve 5.yılda hipofiz yetmezliği ile ilişkili istatistiksel olarak anlamlı miRNA'ların ekspresyon değerlerinin Heatmap plot ile gösterilmesi. **A)** TBH sonrası hipofiz yetmezliği gelişen hastaların 1. gününde anlamlı bulunan miRNA'lar. **B)** TBH sonrası hipofiz yetmezliği gelişen hastaların 7. Gününde anlamlı bulunan miRNA'lar. **C)** TBH sonrası hipofiz yetmezliği gelişen

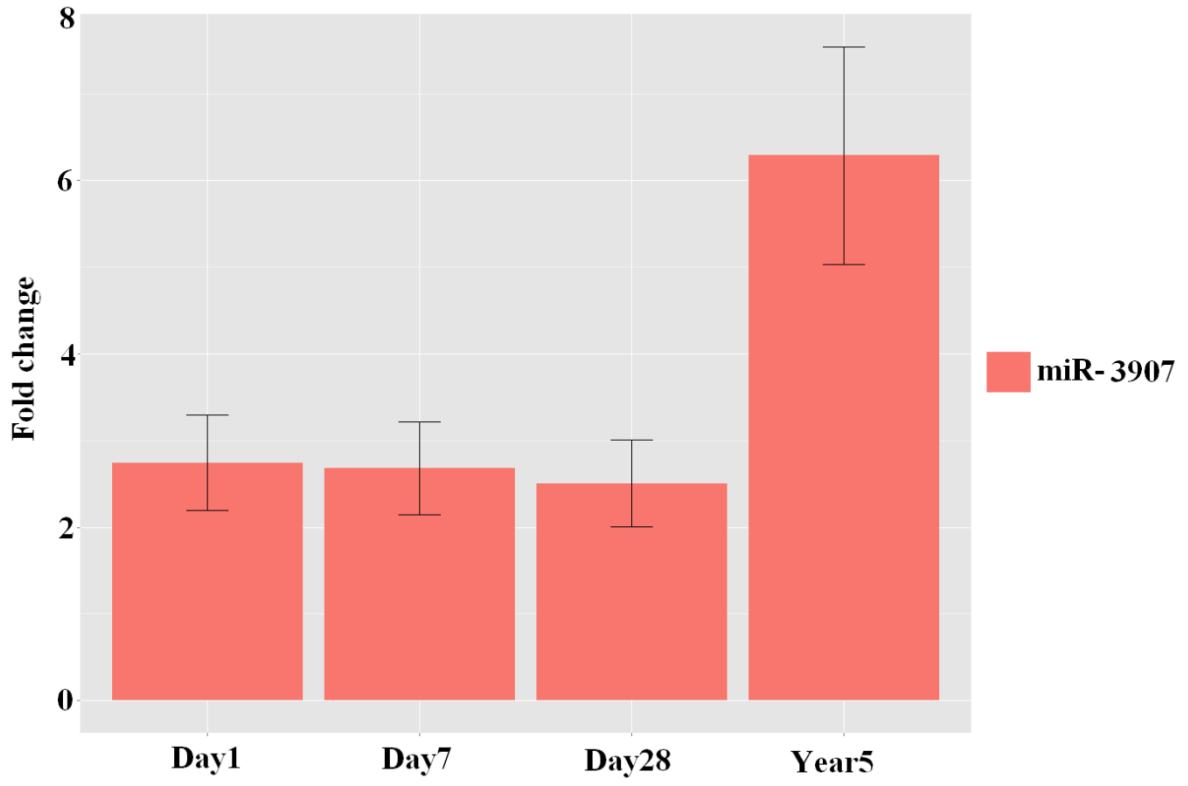
hastaların 28. gününde anlamlı bulunan miRNA'lar. **D)** TBH sonrası hipofiz yetmezliği gelişen hastaların 5.yılında anlamlı bulunan miRNA'lar. Figür üzerinde siyah, kırmızı ve yeşil ile gösterilen kolonlar sırasıyla ekspresyonu değişmeyen, ekspresyonu azalan ve ekspresyonu artan miRNA'ları ifade eder.



Figür 2. TBH sonrası hipofiz yetmezliği gelişen hastaların 1., 7., 28.gününde ve 5.yılında miR-3610 ve miR-126-3p ekspresyon düzeyleri ($p < 0.05$).



Figür 3. TBH sonrası hipofiz yetmezliği gelişen hastaların 5.yılında anlamlı bulunan miRNA'lar'ın yolak analizleri.



Figür 4. TBH sonrası hipofiz yetmezliği gelişen hastaların 1., 7., 28.gününde ve 5.yılında miR-3907 ekspresyon düzeyleri ($p<0.05$).