



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
KAYSERİ EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
Acil Tıp Kliniği

**AKUT APANDİSİT HASTALIĞINDA MİKRO RNA
PROFİLİNİN VE BU PROFİLİN HASTALIĞIN TANISINDA
KULLANILABİLİRLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. Avni Uygur SEYHAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KAYSERİ-2016



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
KAYSERİ EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
Acil Tıp Kliniği

**AKUT APANDİSİT HASTALIĞINDA MİKRO RNA
PROFİLİNİN VE BU PROFİLİN HASTALIĞIN TANISINDA
KULLANILABİLİRLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. Avni Uygur SEYHAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Nurullah GÜNAY

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından

‘TTU-2016-6072’ proje koduyla desteklenmiştir.

KAYSERİ-2016

TEŞEKKÜR

Acil Tıp asistanı olarak göreve başladığım dönemde güler yüzünü ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini içtenlikle paylaşan, bu tez çalışmamda bilgi ve tecrübelerini aktaran, beni yönlendiren ve bana yardımcı olan başta değerli hocam ve aynı zamanda tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nurullah GÜNAY’a,

Acil Tıp Kliniğinde birlikte çalıştığımız tüm asistan ve uzman arkadaşlarıma ve diğer tüm klinik çalışanlarına,

Tez süresince bilimsel katkılarını esirgemeyen Erciyes Üniversitesi GENKÖK birimi öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Elif Funda ŞENER’e, tezimin labarotuvan kısmında fedakarlıklarını esirgemeyen Tuğba TOPALOĞLU, Reyhan Fidan TAHTASAKAL, Esra TUFAN’a

Rotasyonlarım süresince bilgi ve tecrübelerini bizimle paylaşan değerli hocalarıma, diğer asistan arkadaşlarıma ve özellikle eğitimimde önemli katkıları bulunan hastalarımıza teşekkür ederim.

Dr. Avni Uygur SEYHAN

KAYSERİ – 2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
TABLolar, GRAFİKLER VE ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Akut Apandisit	2
2.1.1. Tarihçe	2
2.1.2. Anatomi	3
2.1.3. Epidemiyoloji	4
2.1.4. Etyoloji	5
2.1.5. Patofizyoloji	5
2.1.6. Anamnez ve Fizik Muayene	7
2.1.7. Akut Apandisitte Klinik Semptomlar	8
2.1.8. Akut Apandisitte Laboratuar Bulguları	8
2.1.9. Tanıda Yardımcı Diğer Yöntemler.....	9
2.1.10. Prognoz.....	10
3. MİKRO RNA	11
3.1. MikroRNA Tanım	11
3.2.MikroRNA'ların Oluşumu	11
3.3. Serumda mikroRNA.....	12
3.4. MikroRNA'ların Fonksiyonu.....	13
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
4.1. Hastaların Çalışmaya Alınma, Dışlanma Kriterleri	15

4.2. Veri Toplanması.....	16
4.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....	16
4.4. Deneylerde Kullanılan Malzemeler	17
4.5. Serumdan miRNA Sentezi	17
5. BULGULAR.....	22
6. TARTIŞMA.....	30
7. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	34
KAYNAKLAR	35

ÖZET

Acil servise başvurularda sık rastlanan tablolarından biri olan akut karının en sık sebebi akut apandisit'tir. Müdahalede geç kalındığı zaman basit apandisit kliniği perforasyonla sonuçlanabilmekte ve teşhis konulamadığı zaman ölümcül olabilmektedir. Hastalığın erken ve doğru tanısı, hastalığın seyrinde ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Akut apandisit tanısı koymada hastanın verdiği hikaye ve fizik muayene bulguları önemlidir. Bunun yanında laboratuvar tetkikleri ve görüntüleme yöntemlerinin tanı doğruluğunu önemli derecede artırdığı bilinmektedir. Ancak halen %15-30 oranında negatif appendektomi oranını azaltabilmek için yardımcı tanı araçları ve farklı skorlama sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Akut apandisit birçok hastalığı taklit edebilmektedir. Ayırıcı tanıda akut kolesistit, üreter taşı koliki, pankreatit, divertikülit, üriner sistem enfeksiyonları, sistit, lenfadenopatiler, bağırsak iskemileri ve subakut bağırsak tıkanmaları ekarte edilmelidir (1). MikroRNA (miRNA) lar yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda küçük RNA molekülleridir (2). Farklı çalışmalarda, hücre ve dokuların inflamasyon yollarında mikroRNAlar gösterilmiştir (3). Akut apandisitte microRNA'ların hastalığın patofizyolojisindeki varlığını göstermek temel amacımızdır.

Kasım2015-Nisan 2016 tarihleri arasında Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Tıp Kliniğine başvuran ve akut apandisit tanısı konup opere edilen 24 hasta çalışmaya dahil edildi. Sağlıklı 24 birey ile kontrol grubu oluşturuldu. Toplam 41 adet miRNA'nın kandaki ekspresyonu incelendi. Plazmada bakılan mikroRNA'lardan 6 tanesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azaldığı saptandı ($p<0.05$). Hasta ile kontrol grubu arasında yapılan belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında; Çalışmamızda miR-29c-3p geninde anlamlı ekspresyon yüksekliği bulunmuştur.

Elde ettiğimiz sonuçlar, hastalığın patofizyolojisinde bu moleküllerin etkin olabileceğini gösterebilir. Aynı zamanda daha fazla hastanın katılımıyla yapılacak çok merkezli çalışmaların bu moleküller ile hastalık arasındaki ilişkiyi daha anlaşılır ve net bir şekilde ortaya koyabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Apandisit, mikroRNA, Acil Servis

ABSTRACT

Acute Appendicitis is the reason of the most of the acute stomachache complaints in emergencies. When the intervention is late, a simple appendicitis can conclude perforation and when it is not diagnosticated, it can be deadly. Early diagnosis and correct diagnosis have an important role for the process and the treatment of the disease. Besides, laboratory investigations and imaging methods are known as significantly important for the correctness of the diagnosis. But, to decrease 15-30% rate of the negative appendectomy, side diagnosis devices and different scoring systems are still needed. Acute appendicitis can imitate some different diseases. For definitive diagnosis, acute cholecystitis, ureterolith colic, pancreatitis, diverticulitis, urinary system infections, cystitis, lenfadenopaties, intestine ischemia and subacute intestine congestions have to be eliminated (1). microRNAs are the small RNA molecules which are approximately 18-24 nucleotide long, preserved in high level and encoded from DNA areas but can not substantiate of protein translation (2). On the process of cells and tissue inflammations microRNAs showed in different studies (3). Our main purpose is to show the existence of microRNAs in physiopathology of acute appendicitis.

Between the dates November 2015 and April 2016, 24 patients who came to the Kayseri Education and Research Hospital Emergency Service and were diagnosticated Acute Appendicitis were included into the research. A control group was created with 24 healthy individuals. 41 miRNA's blood expression was examined in total. When 6 of the microRNAs', checked in plasma were compared with the control group, it was determined that they statistically decreased ($p < 0.05$). In the comparison of expression levels of certain miRNAs between patient and the control group, the most of the patients are tracked in the emergency department 1–6 hours. We found significant expression highness in miR-29c-3p gene.

The results we have may show those molecules can be affective in the physiopathology of disease. We think that the relation between those molecules and the disease could be more apprehensible and clearer with the multicentric researches with the participation of more patients.

Key words: Appendicitis, microRNA, Emergency Service.

KISALTMALAR LİSTESİ

AA	: Akut Apandisit
B-hCG	: Beta HCG hormonu
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
cDNA	: Komplementer DNA
C-RP	: C-Reaktif Protein
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
miR	: MikroRNA
miRNA	: mikroRNA
mmHg	: Milimetre Civa
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MR	: Manyetik Rezonans
mRNA	: Messenger RNA
ORF	: Açık okuma çerçevesi
PACT	: PZR aktive eden protein
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAN-GTP	: GTP-Binding Nuclear Protein Ran
RISC	: RNA İndüklenmiş Baskılayıcı Kompleksi
RNA	: Ribo Nükleik asit
RNAaz	: Ribonükleaz
TAR RNA	: Trans-Activation Response RNA
TRBP	: TAR RNA bağlayan protein
USG	: Ultrasonografi
UTR	: Kodlanmayan Bölge

TABLolar, GRAFİKLER VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Tablo 1.	Ekspresyonları Artan Mikrorna'ların İstatistiksel Sonuçları	23
Grafik 1.	Hasta-Kontrol Grubu Sayı ve Cinsiyetleri (N=24)	22
Şekil 1.	Çalışılan Tüm Mirna'ların Hasta Ve Kontrol Gruplarında Heatmap Grafığı	24
Şekil 2.	Hasta ve Kontrollerde İlgili Mikrorna'ların Karşılaştırılması Sonucu Elde Edilen Scatter Plot Grafığı	25

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Acil servise başvurularda sık rastlanan tablolarından biri olan akut karının en sık sebebi akut apandisit'tir. Müdahalede geç kalındığı zaman basit apandisit kliniği perforasyonla sonuçlanabilmekte ve teşhis konulamadığı zaman ölümcül olabilmektedir. Hastalığın erken ve doğru tanısı, hastalığın seyrinde ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Akut apandisit tanısı koymada hastanın verdiği hikaye ve fizik muayene bulguları önemlidir. Bunun yanında laboratuvar tetkikleri ve görüntüleme yöntemlerinin tanı doğruluğunu önemli derecede artırdığı bilinmektedir. Ancak halen %15-30 oranında negatif appendektomi oranını azaltabilmek için yardımcı tanı araçları ve farklı skorlama sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Akut apandisit birçok hastalığı taklit edebilmektedir. Ayırıcı tanıda akut kolesistit, üreter taşı koliki, pankreatit, divertikülit, üriner sistem enfeksiyonları, sistit, lenfadenopatiler, bağırsak iskemileri ve subakut bağırsak tıkanımaları ekarte edilmelidir (1). MikroRNA (miRNA) lar yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda küçük RNA molekülleridir (2). Farklı çalışmalarda, hücre ve dokuların inflamasyon yollarında mikroRNAlar gösterilmiştir (3). Akut apandisitte microRNA'ların hastalığın patofizyolojisindeki varlığını göstermek temel amacımızdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Apandisit

2.1.1. Tarihçe

Apendiksin ilk tanımlanması doktor-anatomist Berengario DaCapri, tarafından 1521'de yapılmıştır (4). Apendiks tam anlamıyla 1543'te Andreas Vesalius tarafından yayımlanan *De Humani Corporis Febrica Liber V*'de tanımlanmıştır (5).

Apendisitın açıkça önemini ilk olarak 1711'de Lorenz Heister göstermiştir (6). Boerhave'nin öğrencisi olan Heister küçük abseli bir apendiks perforasyonunun gangrenöz apendikse dönüşümünü açıkladı. Akut inflamasyonun kaynağının apendiks olabileceğini tahmin etmiş ve bunu bir suçlu vücudunun otopsisinde açıklamıştır.

Fransız doktor Francois Melier otopsilerde altı apandisit vakası tanımlamış ve ilk olarak apendiksin çıkarılabileceğini 1827'de söylemiştir (6–8). İleriki yıllarda Bright ve Addison isimli London's Guy Hospital doktorları apandisitın semptomlarını tanımladılar ve bunun sağ alt kadrındaki birçok inflamatuvar yanıtı sebep olabileceğini ifade etmişler ve bu düşüncelerini 1839 yılında yayınlanan *Elements of Practical Medicine*'nın ilk baskısında ifade etmişlerdir (9).

Cladius Amyand bilinen ilk apendektomiyi 1735 yılında yaptı (10). Amyand'ın bu başarısına rağmen sonraki 150 yıl boyunca apandisitın cerrahi tedavisi için sınırlı bir düşünce hâkimdi. Sağ alt kadrın ağrısının sebebi olarak apandisit düşünölmeye başlansada, buna nasıl bir tedavi uygulanacağı açık değildi. Fitz ayrıca sağ alt kadranda inflamatuvar hastalıkların çoğuna sebep olarak apendiksi gösterdi. Apandisitın klinik içeriğini tanımladı ve önemli olarak apendiksin erken cerrahi olarak çıkarılmasını önerdi. Yüzyılın sonlarına doğru yayınlanan 2500'den fazla kitap veya makaleden sonra apendektominin önemi anlaşılıyordu. Lawson Trait isimli önde gelen abdominal cerrah 1880 yılında gangrenöz bir apendiksi çıkardı ve hastada tam iyileşme sağladı. Takip

eden yıllarda Zürihten Kronlein, New York'tan Hall, Ontario'dan Graves ve Philadelphia'dan Morton birçok apendektomi yaparak bütün cerrahları yüreklendirdiler. McBurney 1889 yılında apendiksle ilgili birçok önemli yayın yaptı (8). McBurney, erken cerrahi girişim yapılmasını önerdi ve bugünlerde kendi ismiyle anılan kesiyi buldu (11).

Akut apandisit (AA) en sık karşılaşılan acil cerrahi gerektiren durumlardan biridir. Abdominal cerrahi operasyonların % 1'ini oluşturur (12,13). Yaşam boyunca; erkeklerin %8,6, kadınların %6,9 apandisit olma olasılığı vardır (14). AA tanısı; anamnez, fizik muayene, laboratuvar bulguları ve görüntüleme yöntemleri ile konulmaya çalışılır (15,16). Tedavisiz kalmış apandisit, mortalite ve morbiditeye yol açabileceğinden dolayı apandisit tanısının olası olduğu durumlarda ameliyat kararı alınır (12). Günümüzde gelişmiş görüntüleme yöntemlerine karşın kesin olarak apandisit tanısı koymak zordur. AA'da klinik olarak doğru tanı % 85 iken üçte bir oranında olgularda atipik klinik seyir, semptom ve laboratuvar değerleri görülebilir (15). Apendektomilerin %14'ünde normal, %70'sinde inflame, % 16'sında perforate apandisit saptanır. Perforasyonun en önemli nedeni tedavinin geciktirilmesidir. Her ne kadar gözlem ve antibiyotik tedavisi ile AA'ların uygun şekilde tedavi edileceğini ileri sürenler varsa da perforasyon varlığında mortalite ve morbidite riski hep yüksektir (17). Tanı amaçlı yapılan girişimlerin dramatik şekilde negatif laparotomi oranını, apandisite bağlı komplikasyon gelişimini ve hastanede kalış süresini azalttığı bilinmektedir. Apandisit tanısı için kullanılan ilave yöntemler; skorlama sistemleri ile ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans (MR) gibi radyolojik yöntemler ve diagnostik laparoskopidir (12,15).

2.1.2. Anatomi

Embriyolojik olarak çekumun bir parçası olan apendiks, üç tenia kolinin birleştiği çekumun distal bölümde yer alır. Histolojik olarak çekuma benzeyen sirküler ve longitudinal kas tabakaları içerir. Apendiks submukozasında sayıları yaklaşık 200 adet olan çok sayıda lenf follikülleri içermektedir, lenf follikülleri maksimum sayıya 10-20 yaş arasında ulaşırken 30'lu yaşlardan sonra bu sayı düşer ve 60 yaşından sonra tamamen kaybolur. Apendiks ileoçekal valvin yaklaşık 2,5cm altında çekumdan köken

alır. Uzunluğu tamamen ageneziden 30cm'ye kadar farklılıklar gösterebilir, ama genelde 5-10cm ve çapı 0,5-1cm arasındadır. Apendiks farklı yerleşimlerine göre basitçe sınıflandırılmıştır; bunlar parakolik, retroçekal, preileal, postileal, promontorik, pelvik ve subçekal'dir (18–20) . Wakeley 10000 vakalık postmortem bir analizle apendiksin yerleşim sıklıklarını şöyle tanımlamıştır; retroçekal %65,3, pelvik %31, subçekal %2,3, preileal %1 ve sağ prekolikpostileal %0,4 (21). Apendiks birçok lokalizasyonda olabilir, hayali olarak merkezi çekum olacak şekilde herhangi bir saat yönünde yer alabilir (22). Klinisyen apendiksin anatomik yerinin semptom ve bulguların ortaya çıkmasındaki önemini mutlaka değerlendirmelidir. Apendiksin mezenteri terminal ileumun arkasından geçer, ince barsak mezenterinin alt dalının devamıdır. Apendiküler arter ileokolik arterin dalıdır ve mezoapendiks boyunca seyredir. Sağ kolik arterin posterior çekal dalından köken alan aksesuar apendiküler arterde görülebilmektedir. Apendiksin venleri süperior mezenterik vene boşalanileokolik vene dökülür. Çok sayıdaki lenf nodları da ileoçekal nodlara direne olur. Apendiks iki durumda sol alt kadrana uzanabilir (20). Hastanın çok uzun bir apendiksi varsa, yerleşim olarak normal sağ alt kadranda olsa bile abdominal kavitede sol alt kadrana uzanabilir. İkinci olarak hastada bütün abdominal organların transpoze olduğu situs inversus durumunda görülebilir. Her iki durumda da apandisit sol alt kadranda ağrı ve hassasiyet semptomlarıyla ortaya çıkabilmektedir.

2.1.3. Epidemiyoloji

Akut apandisit, cerrahi girişim gerektiren akut abdominal ağrının en yaygın nedenidir. Yaşam boyu apandisit geçirme riski %6-7 oranındadır (23,24). Apandisit primer olarak adolesan ve genç erişkinlerin hastalığı olup, özellikle yaşamın 2. ve 3. dekadlarında insidansı pik yapmaktadır (23). Bununla birlikte beş yaş altında ve 50 yaş üstünde çok beklenmeyen bir durumdur, risk bu dönemlerde erkeklerde 35'te 1'iken bayanlarda 50'de 1'dir. 70 yaşın üstünde bu risk 100'de 1'den azdır (19,25,26). Apandisit'in son birkaç dekattır insidansının düştüğü gözlenmekte, bu insidans düşüşünün sebepleri açık olmamakla birlikte, bu durumun endüstriyel ülkelerde dietlerde ki lif oranının artmasına bağlanabilir.

2.1.4. Etyoloji

Apandisitinin etyolojik faktörleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Epidemiyolojistler apandisitinin kentsel, endüstriyel toplumlarda daha sık görüldüğü ve daha az rafine ve yüksek lifli dietlerin uygulandığı gelişmekte olan ülkelerde rölatif olarak daha az görüldüğü konusunda hemfikirdir (27,28). Yüksek rafineli, düşük lifli dietin etyolojik etkisi tam açık olmamakla birlikte, coğrafi yayılım olarak apandisitinin görülme oranları bize diyetin etyolojik etkisi olduğunu göstermektedir. Tahminen endüstriyel ülkelerde ki diet sert dışkıya, artmış intrakolik basınca ve fekalit formasyonuna sebep olur ki bunlar apandiksin lümenini obstrükte edebilir. Apandisitinin ailesel yönü de dikkat çekilen ve tartışılan bir durumdur. Hastalığın genel popülasyondaki yaygın prevalansı genetik etyoloji durumunun kanıtlanmasında zorluğa yol açsa da, poligenik kalıtım paterni ve çevresel etkenler bir araya gelince bu durumu mümkün kılabilir (28,29). Bazı araştırmacılar enfeksiyöz ajanlara karşı değişen immüniteyi apandisitinin sebeplerinden biri olarak görmektedir. Bununla birlikte hastalığındaki aile bağlantısının basitçe aynı çevre ve benzer diet alışkanlıklarına bağlı olması da mümkün olabilir. Özet olarak; apandisit gelişmekte olan ülkelerde daha yaygın olarak görülmekte, etyolojisi için diet, genetik, enfeksiyöz ya da immünolojik tanımlamalar mevcuttur ama hastaya kendisinde bu duruma hangi faktörlerin sebep olduğu açıklanamamaktadır.

2.1.5. Patofizyoloji

Wangensteen ve Dennis akut apandisitinin gelişiminde lümen obstrüksiyonunun temel olduğunu ispat etmişlerdir (30). Apendiks boyuna oranla küçük bir çapa sahiptir. Geleneksel bilim bu durumun apandiksin kapalıağız obstrüksiyonuna ve subsekant inflamasyona predispoze olduğunu söylüyor. Spesifik olarak, herhangi bir sayıda faktör tarafından proksimal obstrüksiyon oluşması, apendiks mukozasında mukus sekresyonunun artmasına bu da kapalı lümen ve artmış intraluminal basınca sebep olur. Apendikte hızlı distansiyon olmasının sebebi küçük lümen kapasitesi ve intraluminal basıncın 50-65 mmHg'ya ulaşabilmesidir. Apendiksin distansiyonu, viseral ağrı liflerini stimüle eder, bu da bir dereceye kadar belirsiz ve diffüz abdominal ağrıya sebep olur (31). Apendiksin distansiyonu, genellikle refleks bulantı ve/veya kusmaya, ağrının şiddetinde progresif artmaya sebep olur. Luminal basınç arttıkça, venöz basınç

ta azalır ve bunun sonucunda iskemi gelişir. Luminal basınç 85 mmHg'ya ulaşırsa, apendiksin direne olduğu venüllerde tromboz gelişir ve devam eden arteriyel dolaşım ve vasküler konjesyon sonucu apendiks hiperemik hale gelir. Vasküler konjesyonla birlikte apendiks mukozası hipoksik ve ülser olmaya başlar. Bu da mukozal bariyerin zayıflamasına yol açarak apendiks duvarının intraluminal bakterilerce invaze edilmesine sebep olur (32). Apendisit erken dönemlerinde invaziv enfeksiyonla birlikte mukozal bozulma ve inflamasyon karakteristik bulgulardır. Bu inflamatuvar süreç apendiksin serozasına ilerler yanındaki pariyetal peritonuda tutar ve lokalize hassasiyetle birlikte, ağrının karakteristik olarak sağ alt kadrana doğru yer değiştirmesi gerçekleşir. Eğer müdahale edilmezse; artan luminal basınç venöz infarkta, tam kat nekroza, perforasyona ve ek olarak ta intraluminal içeriğin stazı, mukus içinde bakterilerin aşırı çoğalmasına sebep olur ve eğer bununla birlikte perforasyon da olursa bu durum peritonit veya abse formasyonu ile sonuçlanabilir. Akut apandisitte abse veya perforasyon gelişme süresi çok değişkendir. Bir çalışmada 46,2 saat süren karın ağrısı sonrasında gangren oluşumu, 70.9 saat sonucunda ise perforasyon geliştiği gösterilmiştir (33). Fekalit ve fekal staz apendiks obstrüksiyonunun en yaygın sebepleridir. Bunları lenfoid hiperplazi, sebze artıkları, meyve çekirdekleri, geçmiş radyolojik çalışmalarda kullanılmış baryum, intestinal parazitler (özellikle Askariasis) ve karsinoid tümör gibi bazı tümörler takip etmektedir (34). Apendiksin inflamasyonunun kendi kendine spontan olarak çözüldüğü de görülebilmekte ama bunun sıklığı bilinmemektedir. Tahminen artmış intraluminal basınç obstrüksiyon yapan materyali tekrar çekuma atar, böylece distansiyon sebebi ortadan kalkar ve inflamasyon çözülür. Bin hastalık bir seride, hastaların %9'u daha önceden de benzer şikayetler yaşadığını, %4'ü ise bunun birden daha fazla kez tekrar ettiğini belirtmiştir (35). Apendisit sebebinin apendiks lümeninin tıkanması olduğuna dair kanıtlar lümeni tıkayan fekalit veya lenfoid hiperplazi olduğunu gösteren çalışmalardan ileri gelmektedir (19,36). Perfore apandisitli vakalarda yapılan patolojik çalışmaların tümünde obstrüksiyon görülmüştür. Apendiks lümenini tıkayan etken intraluminal basıncın artması sonucu apendiksten dışarı atılmış olabilir ve bunun sonucunda apendektomi sırasında bulgu bulunamayabilir. Bu durum yoruma açıktır ve apendiks lümeninin tıkanmasından başka apandisit sebebi olabilecek nedenler de akılda bulundurulmalıdır. Lümen obstrüksiyonu, apandisit en sık sebebi olarak kabul edilirse sadece ikinci ve üçüncü dekalarda sınırlı olmayarak hastalığın, her yaşta ortalama aynı

oranda görülmesi gerekirdi. Genç erişkinlerde lenfoid folliküllerin büyük olmasının anlamlı olarak iyi tanımlanmış olması ve yaş ilerledikçe sayılarının azalmaları apandisit gelişiminde lenfoid dokunun patogeneizde rolü olduğunu güçlü bir şekilde düşündürmektedir. Bazı araştırmacılar enteropatojenlere karşı oluşan lenfoid doku reaksiyonunu takiben apandisit ortaya çıktığını ileri sürmektedirler. Bu hipotezi destekleyen kesin bir kanıt henüz yoktur. Birçok apandisit vakasında luminal tıkanmanın bulunduğunu söylemek doğru olmakla beraber hala belli sayıda vakada sebep belirsizdir.

2.1.6. Anamnez ve Fizik Muayene

Akut karın tablosunun değerlendirilmesinde anamnez ve fizik muayene en önemli bölümü oluşturur. Hastanın kan basıncı, nabız sayısı, solunumu ve vücut ısısı gibi vital bulguları değerlendirilmelidir. Karın ağrısı olan hasta bir bütün olarak değerlendirilmeli ve baş, boyun, göğüs, lomber bölge, karın ile ekstremiteler muayene edilmelidir. Karın muayene edilirken hastanın mümkün olduğunca rahat etmesi sağlanmalıdır. İnspeksiyonda; distansiyon, fıtıklar, karında pulsasyon, kitle ve karnın solunuma eşlik etmediği görülebilir. Hasta ağrısının yerini tam olarak tarif edemiyorsa ağrı visseral periton kaynaklıdır, paryetal periton henüz olaya katılmamıştır. Karın oskültasyonu barsak sesleri hakkında bilgi verir. Barsak seslerinin artması, azalması ve yokluğu özellikle intestinal obstrüksiyonlarda önemlidir. Tüm karın bölgeleri ve epigastrium muayene edilmelidir. Hastanın karın muayenesi esnasında muayene eden kişinin karnın ağrıyan noktasına basınçlı palpasyon uygulayarak elini birden çekmesi sonucunda şiddetli ağrı duyması rebound bulgusu olarak adlandırılır. Bu manevra sıklıkla hastayı rahatsız eden bir manevra olup nadiren nazikçe yapılan karın muayenesine ilave katkıda bulunur. Defans, palpasyon esnasında hissedilen adale spazmını ifade eder. Rijidite, karın duvarının gergin ve tahta sertliğinde olmasını ifade eder ve genellikle yaygın peritonit durumunda görülür. İleopsoas ve obturator testleri; alt retroperitoneal bölge ve pelvisin inflamasyonunu saptamak için kullanılan testlerdir. İleopsoas testi ileopsoas apsesi ve apendiks irritasyonunu gösterir. Obturator testi ise perfore apandisit, tubaovarian apse ve pelvik taban adalelerinin yaralanmalarını gösterir. Rektal muayene yapılmadan karın muayenesi tamamlanmış sayılmaz, rektal tuşede pelvik koleksiyon ve kitle saptanabilir.

2.1.7. Akut Apandisitte Klinik Semptomlar

Apandisit tanısında, yerleşim yeri farklılıkları, klinik ve laboratuvar bulgularının kesin olmaması nedeni ile zorluklar yaşanmaktadır (37–39). Farklı klinik bulgularla ortaya çıkabilmesi ve pek çok hastalıkla karışabilmesi nedeniyle akut apandisit önemli bir klinik sorundur (37). AA'nın temel semptomu karın ağrısıdır. Ağrı başlangıçta alt epigastrium veya göbek çevresinde iken 1-12 saat arasında değişebilen bir süre içinde sağ alt kadrana yerleşir. Apendiksin anatomik yerleşiminin farklılıklar göstermesinden dolayı ağrının somatik fazının görüldüğü yer de farklılıklar gösterir (17,20). Sol alt kadrana uzanan bir apandisit vakasında ağrı bu bölgede olurken; retroçekal apendikte kasık ya da sırtta; pelvik yerleşimde suprapubik alanda, retroileal bölgede ise kasık veya arka ağrısına yol açar. Retroileal yerleşimde ise üreteri ve spermatik arteri irrite etmesi nedeniyle testiküler ağrı ile kendini belli edebilir (6,10). İştahsızlık birçok apandisit vakasında görülmektedir. Hastaların % 75'inde kusma da görülür ancak bu bulgu çok belirleyici değildir (17,20,40). Semptomların ortaya çıkışındaki sıralama, ayırıcı tanıda önemlidir. AA'lı hastaların % 95'inde ilk semptom iştahsızlıktır. Bunu karın ağrısı ve ardından görülecekse kusma izler (17,20).

2.1.8. Akut Apandisitte Laboratuvar Bulguları

Akut apandisit tanısında laboratuvar bulguları çok yardımcı olabilir. Ancak klinik semptom ve bulguların daima ön planda değerlendirilmesi gerekmektedir. Laboratuvar bulguları ise kliniği desteklediği takdirde önem kazanmaktadır (41,42). Aksi durumda tedavi aşamasının planlanmasında anamnez, semptom ve fizik muayene bulguları yönlendirici olarak kabul edilmelidir. Hastaların büyük çoğunluğunda lökosit sayısının arttığı saptanır, ancak mm^3 ' de 14.000'i ender olarak aşar. Lökosit sayısı %10 kadar vakada özellikle yaşlılarda normal sınırlar içindedir. Lökosit formülünde %25 vakada nötrofil hakimiyeti görülür, formüldeki bu sola kayma lökositoz olmadan da bulunabilir. %1-4 hastada ise lökosit sayısı ve formül normaldir. Hematokrit değişmez. Eğer hastada klinik olarak akut apandisit semptom ve bulgularına ek olarak anemi de varsa çekum tümörü, kanseri akla gelmelidir. İdrar muayenesi bazı patolojik değişiklikler gösterir. Erkek hastaların %20 kadarında eser proteinüri ve püyuri bulunabilir, ancak gerek bu bulgular gerekse idrarda bakteri saptanması akut apandisit tanısından uzaklaştırmaz.

Mikroskopik hematüriye de rastlanabilir. Özellikle retroçekal ve pelvik apandisitte hematüri makroskopik karakter kazanır. Ancak idrar sedimentinde her alanda 30'dan fazla eritrosit ve 20'den fazla lökosit bulunması bir üriner sistem patolojisini ön planda düşündürmelidir. Apandisit tanısı, esas olarak hikaye ve klinik bulguların laboratuvar sonuçları ile (lökositoz) desteklenmesine dayanır. Tam kan sayımı, periferik yayma, idrar tetkiki ve son yıllarda C-reaktif protein (C-RP) akut apandisit tanısında rutin istenecek tetkiklerdir. Laboratuvar çalışmaları, özellikle akut apandisit erken tanınmasına yardımcı değildir, tanıyı destekleyebilir ama asla ekarte ettirmez. Tam kan sayımında %90 vakada lökositoz vardır ve perforasyon olmayan vakalarda lökosit sayısı 11.000-15.000/mm³ civarındadır (41,43). Perforasyon olmadan lökosit sayısı nadiren 18.000/mm³'ü geçer (43,44). Özellikle yaşlılarda daha sık olmak üzere, lökosit sayısı normal olabilir veya perfore apandisitte lökopeni gözlenebilir. Ayrıntılı periferik yaymada parçalı nötrofil hakimiyeti vardır. Nötrofil granülosit oranı yüksekliğinin, lökositoz ve C-RP'den daha spesifik olduğunu bildiren yayınlar vardır (45–48).

Komplike apandisit vakalarında, özellikle karın içi abse formasyonunda trombositoz ve hemoglobin düşüklüğü gözlemlendiği belirtilmektedir (49). İdrar tetkikinde, belirgin lökositüri ve hematüri idrar yolu enfeksiyonu ve renal taşlarda görülür. İdrar dansitesi; aseton, hidrasyon ve metabolik denge hakkında bilgi verir. İnflame apendiksin üreter ve mesaneye bitişik veya komşu olduğu vakalarda anormal idrar bulguları gözlenebilir. Genç kızlarda sedimentasyon yüksekliği kronik pelvik inflamatuvar hastalıklarında yüksek bulunur, ayrıca gebelik ayırıcı tanısı için B-hCG gerekli olabilir (50).

2.1.9. Tanıda Yardımcı Diğer Yöntemler

Akut apandisit tanısında önerilen yardımcı yöntemlerden biri USG'dir. USG'yi AA'da tanı amaçlı olarak ilk kez Deutsch ve Leopold kullanmıştır (51). USG'nin doğru tanı oranı %71-97, duyarlılığı %76-96, özgüllüğü %47-94'dür (51). Eğer apendiksin ön arka çapı 6 mm veya daha fazla ise ve basıyla çapta azalma olmuyorsa test pozitif kabul edilir. Ultrason muayenesinde bir apendikolit tespit edilmesi tanı koydurucudur (38,40,52–54). Sonuçların yapan kişiye bağlı olması, apendiksin çevresinde başka bir nedenle oluşan inflamasyona bağlı ortaya çıkmış periapandisit, apandisit sanılan geniş bir fallop tüpü, şişman hastalarda akut inflamasyondan değil kalın deri altı yağ

dokusundan dolayı apendiksin üzerine basılarak çapının azaltılamadığı vakalar USG için yalancı pozitiflik ortaya çıkartabilir. Lüminal tıkanıklığın distalde olması, inflamasyonlu apendiksin ince bağırsak kalınlığına ulaşacak derecede genişlemesi veya apendiksin perfore olmasından dolayı üzerine basıldığında sıkıştırılabiliyor olması gibi durumlarda yalancı negatif tanılar konulabilir (52,53). BT, baryumlu lavman grafisi ve radyoizotop ile işaretli lökosit sintigrafisi diğer yardımcı görüntüleme yöntemleridir (13,40,53,55). BT'nin tanı koymada bildirilen doğruluk oranları %90-99 arasındadır. BT'nin duyarlılığı %87-100 ve özgünlüğü %83-100 arasındadır (15). Ancak pahalı olması ve radyasyon gibi olumsuzlukları da vardır. BT esas olarak, USG ile incelemeye uygun olmayan obez, abdominal hassasiyeti belirgin, kooperasyon kurulamayan, klinik olarak karar verilemeyen, apseleşmeden kuşkuilanılan olgularda kullanılmalıdır (40,53).

2.1.10. Prognoz

Komplikasyonsuz akut apandisit mortalitesi 1930'lardan beri %0,1 kadardır. Gangrenli vakalarda bu oran %0,6'ya çıkar, perforasyon gösteren vakalarda ise ameliyat öncesi ve sonrası bakım, geliştirilen ameliyat yöntemleri ile % 5'e kadar düşürülebilmektedir (43,56). Ancak, herşeye rağmen gangrenle veya perforasyonla seyreden vakalarda yara süpürasyonu, diafragma altı abseleri ve karın içi diğer abseler gibi komplikasyonlar %30-50 oranında görülmektedir. Morbidite ve mortalite özellikle çocuklarda ve yaşlılarda yüksektir, bunun nedeni de bu grup hastalarda geciken tanı nedeniyle %70-75 oranında gangren ve perforasyonla karşılaşılmasıdır (43,56).

3. MİKRO RNA

3.1. MikroRNA Tanım

miRNA'lar, endojen küçük RNA'ların (small RNA) bir sınıfını oluşturan, protein kodlamayan RNA molekülleridir (57,58). Yaklaşık 20-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli miRNA'ların sayısı insanlarda bini geçmektedir (59,60). Bu moleküllerin çeşitli biyolojik olaylarda ve patolojik durumlarda önemli düzenleyici roller aldığı gösterilmiştir. miRNA'ların hücrel gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyede düzenlediği düşünülmektedir(61). mRNA'lara hedef genin düşük özgüllükte bağlanmasına, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabileceği için miRNAlar gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahiptir(62,63). MikroRNA' Keşfi Lee ve arkadaşları, 1993 yılında bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ın gen içeriğini incelediklerinde, protein kodlamayan lin-4 olarak isimlendirdikleri genin, 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini bildirmişlerdir. O sıralar bir nematodun yapısal özelliği sanılan ve yaşam döngüsünün zamanlaması ile ilerlemesini kontrol ettiği düşünülen lin-4 keşfedilen ilk miRNA'dır(64). Reinhart ve arkadaşları, 2000 yılında *C. elegans*'da, let-7 olarak isim verdikleri 22 nükleotid uzunluğunda, canlıda gelişim basamaklarını düzenleyen farklı bir miRNA daha keşfetmişlerdir. İnsanlar ve bazı türler arasında let-7'nin kaydadeğer bir biyolojik fonksiyona sahip olmasından dolayı korunduğu gösterilmiştir (65,66). Bu çalışmalar ışığında birçok miRNA en basit canlılardan insana kadar yüksek oranda korunurlar ve genom içerisinde miRNA'ları kodlayan birçok gen bölgesinin varlığı bilinmektedir. Bu durum bize miRNA'ların tüm canlılarda önemli görevleri olduğunu gösterir (58,64,66).

3.2.MikroRNA'ların Oluşumu

Hücre döngüsü ve büyüme üzerine düzenleyici etkileri olan küçük, protein kodlamayan RNA türü olan miRNA'lar, RNA polimeraz II (pol II) tarafından sentezlenmektedir. Yapılan son çalışmalar ile birçok farklı miRNA lokusunda RNA polimeraz III (pol III)

ile ilişkili tekrar dizilerinin gösterilmesi pol III'ün de miRNA transkripsiyonunda önemli yeri olduğunu göstermiştir(67–77). MikroRNA'ların sentezi DNA'dan RNA pol enzimi aracılığıyla öncü miRNA (pri- miRNA) sentezlenmesiyle başlar. Saç tokası şeklinde oluşan pri-miRNA nükleusta bulunan bir RNaz olan Drosha ve RNA bağlanma noktası bulunan bir protein DGCR8/Pahsa'dan oluşan mikroşlemci komplekse bağlanır ve 60 ile 70 nükleotidlik parçalar haline getirilerek pre-miRNA haline dönüştürülür (57,63,77–81). Bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN- GTP'ye bağımlı bir şekilde pre-miRNA molekülü sitoplazmaya taşınır (82). RNAaz III enzimi ailesinden bir endonükleaz olan Dicer, TAR RNA bağlayan protein (TRBP) veya Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) aktive eden protein (PACT) ile etkileşimde bulunarak sitoplazmada pre-miRNA'ı parçalayarak çift zincirli, 18-24 nükleotid uzunluğunda miRNA dubleksine dönüştürürler (83). Dicerin diğer fonksiyonu da RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA İndüklenmiş Baskılayıcı Kompleksi; RISC) oluşumunda kilit rolü olmasıdır (59). Pre-miRNA'nın saplı, ilmikli yapısı dicer tarafından kesildikten sonra miRNA dubleksinden sadece bir tanesi RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksine katılır. RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksinin ihtiva ettiği RNAaz olan Argonaute'un yardımı ile bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse katılır. Bu komplekse dahil olan yapı kılavuz iplik (guide iplik) olarak isimlendirilir. Diğer kılavuz olmayan ve yolcu iplik olarak adlandırılan iplik RISC kompleksi tarafından sindirilir. miRNA'lar aktif RISC kompleksine katıldıktan sonra, ya Argonaute proteinleri aracılığıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun engellenmesine neden olurlar (2).

3.3. Serumda mikroRNA

Memelilerin kan dolaşımında bulunan DNA parçacıklarına verilen önem, keşfedildiklerinden bu yana lupus eritematozus, β talasemi gibi hastalıklarda ve prenatal tanıda faydalı birer marker olarak kullanıldıklarından dolayı artmıştır (84–88). Son çalışmalarda dolaşımda kodlama yapan ve yapmayan plasental mikro RNA gibi RNA parçacıkları tespit edilmiştir (89). 2008 yılında Lawrie ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada mikro RNA'lar B hücreli bir lenfoma için yeni bir biyomarker olarak tanıtılmıştır. Chen ve arkadaşları küçük hücre dışı akciğer kanseri, kolorektal kanser ve tip 2 diyabetli hastaların serum mikro RNA profillerinin sağlıklı insanlarınkilerden

anlamalı farklılıklar gösterdiğini tespit etmiştir (90). Sepsis ile ilgili olarak Wang JF ve arkadaşları çalışmalarında inflamasyonla ilgili olduğu tespit edilen yedi miRNA'yı serumda çalışmışlardır ve miR-146a ve miR-223 düzeylerini sepsiste anlamalı olarak düşük tespit etmişlerdir (91). Mikro RNA'ların dolaşıma nasıl salındıkları bilinmemektedir. Bununla beraber fiziksel koşullara çok dayanıklı oldukları RNaz aktivitesinden etkilenmedikleri saptanmıştır (92,93). Bu özelliklerin nasıl sağlandığı yönündeki çalışmalar ise mikro RNA'ların dolaşıma mikroveziküller içinde veya ekzozomlar şeklinde salındığı yönünde fikirler vermiştir (94,95). Ayrıca dolaşımdaki mikro RNA'ların birer sitokin gibi taşınıp biyolojik fonksiyonları olabileceğine dair hipotezler de mevcuttur (96). Bununla birlikte yakın zamanda yapılan bir çalışmada dolaşımdaki mikroRNA'ların az bir kısmının veziküller içinde taşındığı büyük bir kısmının ise Argonaute 2'yle ilişkili olarak taşındığı bulunmuştur. Argonaute 2 ise RNA-induced silencing complex (RISC)'in etkin bileşeni olup miRNA'ları direkt olarak bağlar ve hücrelerde messenger RNA represyonunu gerçekleştirir (97).

3.4. MikroRNA'ların Fonksiyonu

Olgun miRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. miRNA'lar kendi nükleotid dizilerini tamamlayıcı hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. Kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahip miRNA'lar, RISC ile kompleks oluşturup baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlandıktan sonra protein translasyonunun inhibisyonuna ya da mRNA'nın yıkımına sebep olur (98). miRNA'ların herbirinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların herbirinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği saptanmıştır (2,98). MikroRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgesine (Untranslated Region-UTR) ya da hedef mRNA'nın ORF (Open Reading Frame- açık okuma çerçevesi) bölgesine bağlanır ve bağlanma pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Translasyona uğramayan bölgesine bağlandığında; kusurlu, eksik tamamlayıcılıkla ve translasyonun baskılanmasıyla sonuçlanır. ORF bölgesine bağlandığı takdirde bağlanma kusursuz, eksiksiz tamamlayıcılığı gösterir ve sonuçta Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı gerçekleşir (99,100).

MikroRNA'ların Klinik Önemi ve Hastalıklarla ilişkisi:

MiRNA'lar çoğunluğu hücre içinde yer alırken, birçok miRNA vücut sıvıları da dahil olmak üzere hücre dışında gözlenmiştir. Aktif olarak vücut sıvısındaki miRNA'ların iki tip hücre kökenli lipid vezikülleri olan mikrovezikül ve eksozomdan köken aldığı tanımlanmıştır. Mikroveziküller nispeten büyüktür (~ 100 nm 1 mikron) ve bu veziküller kabarcık oluşturarak hücreden salınırlar. Eksozomlar ise yaklaşık 30-100 nm büyüklüğünde küçük veziküller olup endozomlardan oluşan multiveziküler yapıların plazma membranıyla birleşmesi sonucunda oluşur. Eksozomlar, epitel hücreleri, T ve B hücreleri, dentrik hücreler ve kanser hücreleri gibi çeşitli hücrelerden salgılanmalarının yanı sıra plazma, serum, tükürük, anne sütü ve ürün gibi vücut sıvılarında da bulunurlar (98). MiRNA'lar farklı sıvı tipleri arasındaki RNA'ların aksine stabil ve belirgin şekilde ekspresyon profilleri gösterirler (99-101). Dolaşımdaki miRNA'lar hücre içermeyen (29) serum benzeri vücut sıvılarında RNAz'a, pH'ya ve sıcaklığın yüksek değişkenliğine karşı dayanıklıdır (102). Plazma, idrar veya anne sütü gibi insan vücut sıvılarında 200-500 arasında miRNA qPCR ile tespit edilmiştir. Yapılan son çalışmalar ile miRNA'lardaki mutasyonlar ve ekspresyon düzensizlikleri ile birçok hastalık arasında direk bir ilişki olduğu gösterilmiştir. MiRNA'lar organizmada birçok biyolojik süreçte görev aldığı için, miRNA genlerinde meydana gelen çeşitli mutasyonlar hastalıklara neden olabilmektedir. MiRNA'ların başta kanser olmak üzere, kardiyovasküler bozukluklar, inflamatuvar hastalıklar, infeksiyonlar, gelişimsel bozukluklar, kas bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkisi olduğu gösterilmiştir(104).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma ileriye dönük, gözlemsel ve tanımlayıcı bir çalışmadır. Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi acil tıp kliniğine 01.11.2015 ile 01.04.2016 tarihleri arasında 18 yaş ve üstü akut apandisit tanılı hastalar alınmıştır. Çalışmaya 24 adet akut apandisit tanısı almış hasta ve 24 adet sağlıklı kontrol grubu alınmıştır. Akut apandisit tanısı; fizik muayene, radyolojik olarak bilgisayarlı tomografik görüntüleme, genel cerrahi konsultasyonu ve ameliyat sonrası patoloji sonuçları ile doğrulanarak konmuştur. Çalışma boyunca, ileriye dönük olarak acil serviste muayenesinde akut apandisit tanılı hastalar, hastayı değerlendiren sorumlu araştırma görevlisi doktor tarafından çalışma formlarına kaydedilmiştir. Etik Kuruldan alınan onay tarihi ve sayısı: 02.10.2015 / 441’ dir.

Çalışmaya katılan hastalara Helsinki Bildirgesine göre hazırlanan ‘‘ Hasta Bilgilendirme Formu’’ ve ‘‘Hasta Onam Formu’’ okutulmuş ve imzalı onamları alınmıştır.

4.1.Hastaların Çalışmaya Alınma, Dışlanma Kriterleri

Çalışmaya alma kriterleri:

1. Çalışmaya acil servisimize başvuran 18 yaş ve üstü
2. Acil serviste onamları alınmış, muayenesinde akut apandisit tanısı konmuş hastalar dahil edilmiştir.

Çalışmadan dışlama kriterleri

1. 18 yaşından küçük
2. Travma öyküsü olan hastalar

3. Gebe hastalar
4. ek hastalığı olan hastalar
5. Onam vermeyen hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.
6. Appendektomililer

4.2. Veri Toplanması

Acil Servise başvuran ön tanısı apandisit olan 24 hastadan kan örneği alındı. Kontrol grubu olarak da yaş cinsiyet açısından benzer özelliklere sahip sağlıklı kişilerden kan örneği alındı. Özgeçmişinde bilinen ek hastalığı olanlar çalışma dışı bırakıldı.

Hastalardan ve kontrol grubundan “BD Vacutainer SST II Advance UK % 7,5 EDTA”lı tüplere alınan 5 ml’lik venöz kan örnekleri yavaşça altüst edilerek karıştırıldı ve soğuk zincir ile 2 saat içinde Erciyes Üniversitesi GENKÖK laboratuvarına ulaştırılarak serumları ayrıldı. Hasta ve sağlıklı gönüllülerden alınan kanlardan serum ve kit protokolüne uygun olarak total RNA izolasyonu yapıldı izole edilen DNA’lar çalışma yapılana kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı. Hastalardan acil servisin işleyişi ve yoğunluğu doğrultusunda acil servise gelişlerinden ortalama 1-4 saat arasındaki sürede kan alındı.

4.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- i. Qiagen Sensquest Labcycler PCR Cihazı
- ii. Heidolph Vorteks Cihazı
- iii. Gilson GmCLab Spin Cihazı
- iv. Qiagen Rotor Gene Q
- v. Sigma Soğutmalı Santrifüj
- vi. Sigma Santrifüj

- vii. Siemens +4 °C Buzdolabı
- viii. Siemens -20 °C Buzdolabı
- ix. Shimadzu Biotech Biospec-nanodrop Cihazı

4.4. Deneylerde Kullanılan Malzemeler

- i. Gilson Pipetörler
- ii. 10µl - 100µl - 200µl - 1000µl' lik Filtreli ve Filtresiz Pipet ucu
- iii. Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit
- iv. Qiagen Qiazol
- v. Kloroform
- vi. Etanol
- vii. RNase Free Water
- viii. 1,5ml' lik ependorf Tüp
- ix. 0,2ml 'lik PCR Tüpü
- x. PCR Strip Tüp
- xi. Qiagen miScript II RT Kit
- xii. Qiagen miScript SYBR Green PCR Kit
- xiii. +4°C ve -20°C Blok

4.5. Serumdan miRNA Sentezi

Serumdan miRNA eldesi için Qiagen marka miRNeasy Serum/Plasma Kit kullanılmıştır. Daha önce hasta kanlarından elde edilmiş olan serumlar çalışılmak üzere -20 dereceden oda sıcaklığına çıkarılmıştır. Erimesi beklenmiştir. Eriyen serumlardan 2ml' lik ependorf tüplere 400µl serum örneği konulmuştur. Üzerine hücre lizisi için

Qiagen marka 1000µl Qiazol eklenmiş ve vorteks yapılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında 5 dakika beklenilmiştir. Bu süre sonunda örneklerin üzerine 400µl kloroform eklenmiş ve 15sn çilekli süt rengi oluşana kadar vorteks yapılmıştır. Daha sonra 12000g' de +4 derecede 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan aköz faz yeni bir ependorfa alınmıştır ve alınan aköz fazın 1,5 katı kadar üzerine etanol konulmuştur. Örnekler pipetaj yapılarak Qiagen kitinden çıkan filtreli toplama tüplerine örnekler alınmıştır. Toplama tüplerine alınan örnekler 8000g' de 15sn santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda filtreli kolon yeni bir toplam tüpüne geçirilmiş ve kurumaya bırakılmıştır. Sonra her bir filtre üzerine 700µl RWT Buffer yıkama solüsyonu konulmuştur ve 8000g' de 15sn santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda bir önceki aşamada olduğu gibi aynı şekilde filtreli kolonlar yeni toplama tüplerine alınmış ve üzerine 500µl RPE buffer konulmuştur ve 8000g' de 15sn santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda filtreli kolon alınmıştır ve yeni toplama tüplerine konulmuştur. Üzerlerine 500µl %80' lik etanol konulmuştur ve 8000g' de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Sonra filtreli kolon yeni bir toplama tüpüne alınmıştır ve kurutmaya bırakılmıştır. Kuruma sonunda 13000g' de 5 dakika oda ısısında kapaklarının ağzı açık bir şekilde santrifüj edilmiştir. Bu aşama sonunda filtreli kolonların altındaki toplama tüpleri atılmıştır ve filtreli kolonlar yeni 1,5ml'lik ependorf tüplere alınmıştır. Sonra filtreli kolonlar üzerine 14µl RNAaz free water konulmuştur ve birkaç dakika oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra 13000g' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Nanodropta ölçüm yapılmıştır.

4.6. cDNA Eldesi

PCR tüplerine hasta isimleri yazılmıştır. Miks hazırlanmıştır. Miks içerisinde kullanılan ürünler Qiagen marka miScript II RT Kit kullanılmıştır.

Miksin hazırlanışı;

<i>5x miScript HiSpec Buffer</i>	<i>4 µl</i>
<i>10x miScript Nucleics Miks</i>	<i>2 µl</i>
<i>miScript Reverse Transcriptase Miks</i>	<i>2 µl</i>
<i>RNA</i>	<i>12 µl</i>
<i>Toplam hacim</i>	<i>20 µl</i>

Miks çok az vortekslenmiştir ve çok az bir süre spin yapılmıştır. Ardından PCR tüplerine 8'er µl miks dağıtılmıştır. Daha sonra 12 µl RNA eklenmiştir ve PCR cihazına konulmuştur.

PCR Programı;

<i>37 °C</i>	<i>60 dakika</i>
<i>95 °C</i>	<i>5 dakika</i>
<i>+4 °C</i>	<i>∞</i>

PCR sonunda elimizde 20µl cDNA ürünü oluşmuştur.

4.7. Kantitatif REAL-TIME PCR

Kantitatif Real Time PCR için Qiagen marka miScript SYBR Green PCR Kit kullanılmıştır. Liyofilize haldeki her bir miRNA primer assay'ler 550µl nükleaz free water ile sulandırılmıştır. Kısa bir vorteks ve spin yapılmıştır.

<i>2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix</i>	<i>10µl</i>
<i>10x miScript Universal Primer</i>	<i>2µl</i>
<i>10x miScript Primer Assay</i>	<i>2µl</i>
<i>RNase Free Water</i>	<i>1µl</i>
<i>cDNA</i>	<i>5µl</i>
<i>Toplam Hacim</i>	<i>20µl</i>

cDNA hariç diğer malzemeler bu miktarlarda 1,5ml' lik ependorf tüpe konulmuş ve miks hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan miks PCR Strip tüplerine 15µl konulmuştur. Daha sonra hasta ve kontrollere ait cDNA'lar etiketlenmiş PCR strip tüplerine eklenmiştir. Ardından 72 kuyucuklu Qiagen Rotor Gene cihazına konulmuştur.

Rotor Gene Programı

<i>Bekleme Sıcaklığı</i>	<i>95 °C</i>	<i>15 dk</i>
<i>PCR koşulları</i>	<i>94 °C</i>	<i>15 sn</i>
	<i>55 °C</i>	<i>30 sn</i>
	<i>70 °C</i>	<i>30 sn</i>
		<i>Yeşil Boyada Okuma</i>

40 döngü

4.8. Analiz

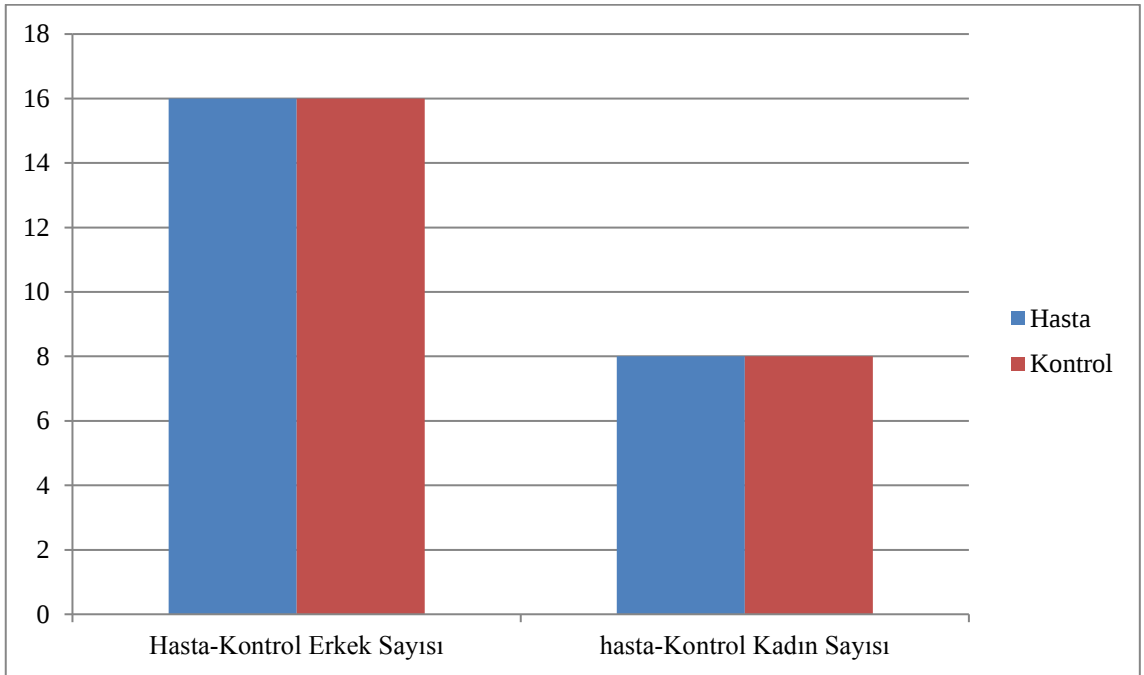
Kantitatif Real Time sonrası elde ettiğimiz veriler Qiagen Gene Globe Data Analysis Center (<https://www.qiagen.com/tr/shop-old/data-interpretation-systems/bioinformatics/geneglobe-data-analysis-center/>) analiz programına yüklenerek analiz edilmiştir.

4.9. İstatistiksel Analiz

miRNA'ların ekspresyonlarının ölçümünde SABiosciences yazılımı kullanıldı. p-değeri kontrol ve hasta gruplarında çalışılan her gen için Student's t-test of the replicate $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ kullanılarak analiz edildi. P-değeri 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi. Receiver operating-characteristic (ROC) eğrisi ve eğri (AUC) altında kalan alan serum miRNA'ların tanısal doğruluğunu değerlendirmek için kullanılmıştır. İlgili kliniko-patolojik özellikleri nicel veriler için tek yönlü ANOVA ve nitel veriler için X2 testi kullanıldı. tüm testler 2 taraflı ve p değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizlerin uygulanmasında IBM SPSS Statistics 21.0 programından (IBM Corp. Armonk, NY: USA, Released 2012) yararlanılmıştır. Grafikler Graph pad Prism 5.0 (Graph pad Software Inc, USA) ile oluşturuldu.

5. BULGULAR

Çalışmaya alınan 24 hasta grubunun yaş ortalaması $33,00 \pm 13,82$, kontrol grubuna ait 24 sağlıklı bireye ait yaş ortalaması ise $33,50 \pm 13,71$ olarak hesaplanmış ve bu aradaki yaş farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca çalışmaya alınan 16 adet erkek hastanın yaş ortalaması $36,62 \pm 13,00$, 8 adet kadın hastanın yaş ortalaması $31,12 \pm 15,56$ olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubundaki 16 erkeğin yaş ortalaması $37,31 \pm 12,76$ 8 kadının yaş ortalaması $30,37 \pm 15,17$ olarak hesaplanmıştır. Hasta grupları ile kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet farkı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.



Grafik 1. Hasta-Kontrol Grubu Sayı ve Cinsiyetleri (N=24)

Tablo 1. Ekspresyonları Artan Mikrorna'ların İstatistiksel Sonuçları

Gene Symbol	Fold Regulation	p-value
Hs_let-7b_1	2,015	0,085941
Hs_let-7i_1	2,0006	0,236203
Hs_miR-29c_1	2,3778	0,034991
Hs_miR-29b_1	2,3089	0,110923
Hs_miR-30a-5p_1	2,1094	0,070602
Hs_miR-23a_2	2,0006	0,099282

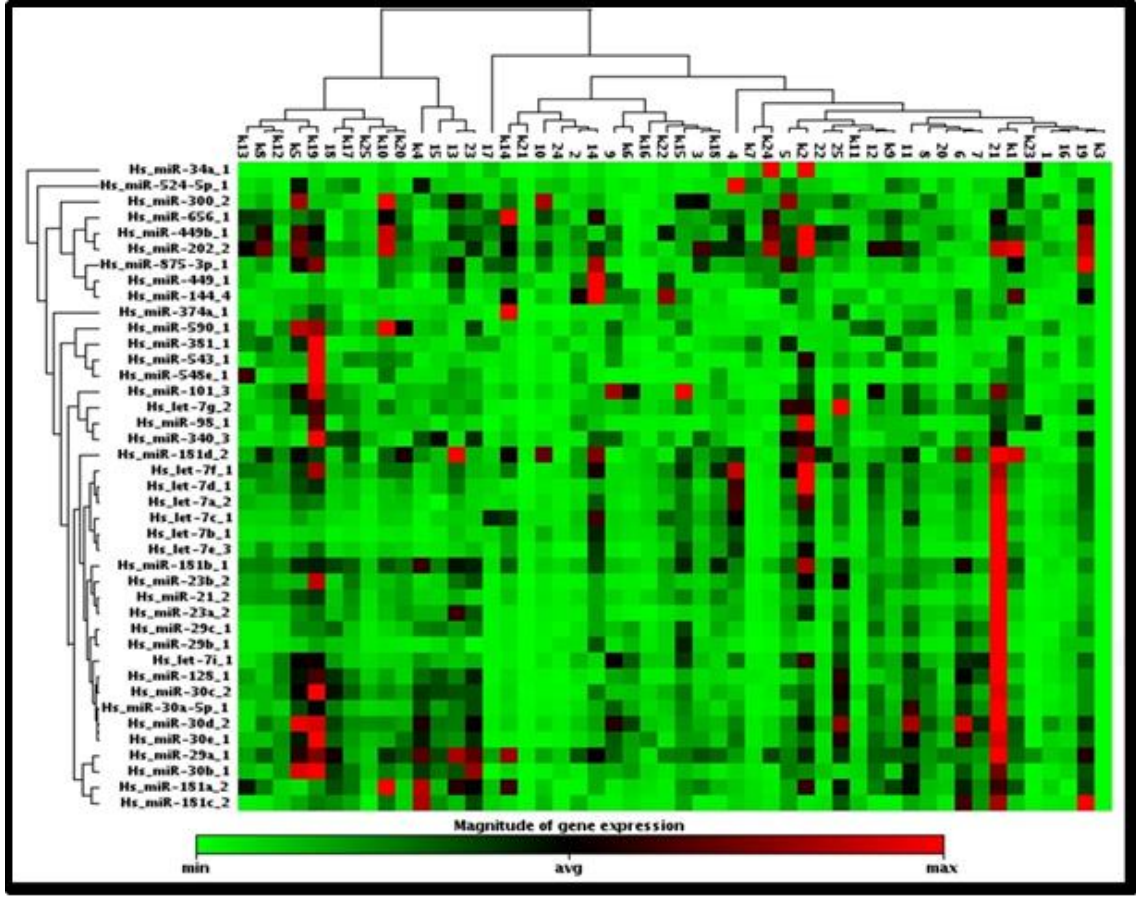
Fold-Değişim ($2^{(-\Delta Ct)}$) normalize gen ifadesi ($2^{(-\Delta Ct)}$) - Kontrol Numune Test numunesinde normalize gen ifadesi (ΔCt) $2^{(\Delta Ct)}$ bölünmüş.

Fold-Yönetmelik, fold-değiştirme sonuçları biyolojik anlamlı bir şekilde temsil etmektedir. Fold-değişim değeri 1(bir)in üzerindeki pozitif ya da yukarı-regülasyonunu ve fold-regülasyonun fold-değişime eşit olduğunu gösterir.

1(bir) den az olandan Fold-değişim değerleri negatif veya aşağı-regülasyonunu gösterir ve fold-regülasyon fold-değişimin negatif tersidir.

p değerleri Studentt-testine göre hesaplanır $2^{(-\Delta Ct)}$ değerleri her gen için kontrol ve hasta gruplarında bakılmış. p değerleri 0.05 ten az olanlar kırmızı renki ile işaretlendi.

Tablo: toplamda 6 adet mikro RNA da ekspresyon artışı tespit edildi (Hs_let-7b_1 ,Hs_let-7i_1 ,Hs_miR-29c_1,Hs_miR-29b_1, Hs_miR-30a-5p_1,Hs_miR-23a_2). Bu mikroRNA'lardan 1 tanesinin (Hs_miR-29c_1) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). Panelde yer alan diğer miRNA ekspresyon seviyeleri ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$)

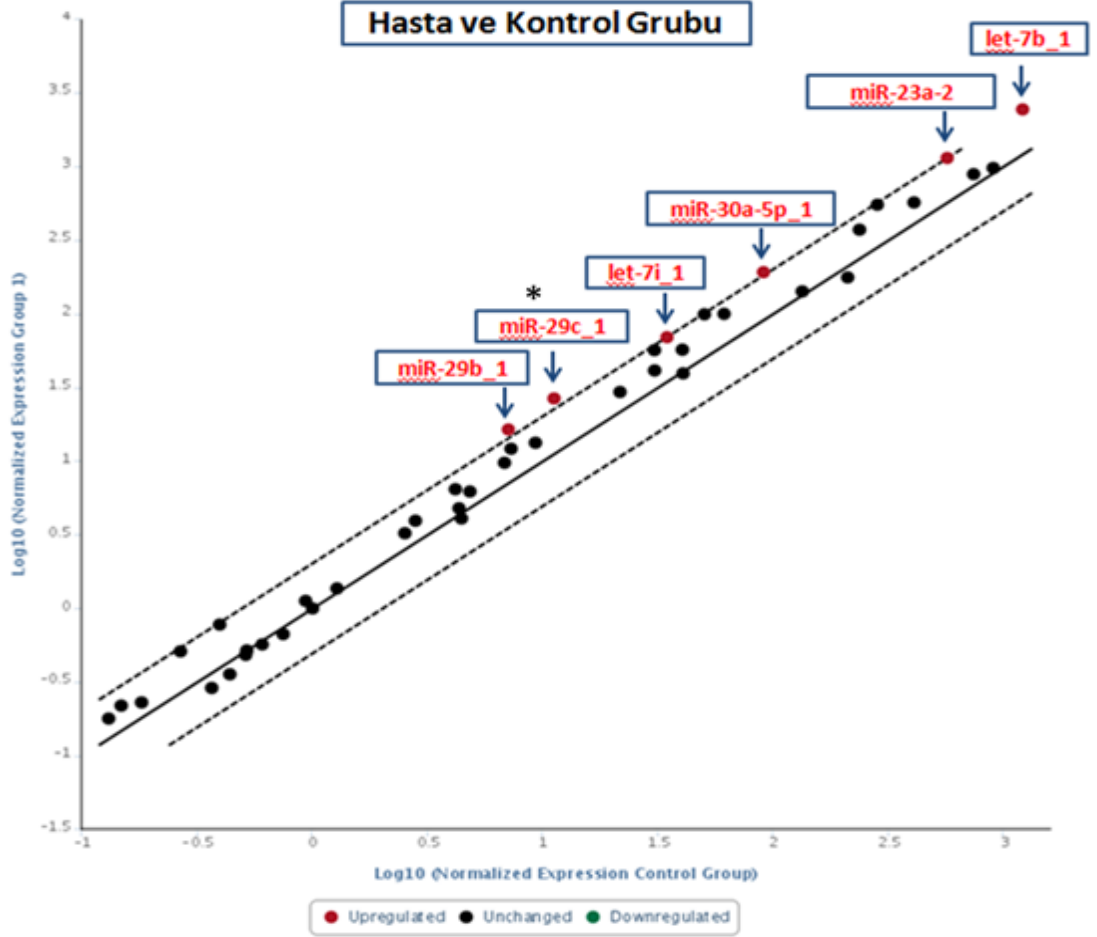


Şekil 1. Çalışılan Tüm Mirna'ların Hasta Ve Kontrol Gruplarında Heatmap Grafiği.

Heat map (ısı haritaları) örneklerin prezentasyon şiddetinin renk ile ifade edilmiş şeklidir. Kırmızı renkli işaretlemeler karşısında denk gelen mikroRNA gen düzeylerinde ekspresyon artışını, siyah renkli bölümler ekspresyon düzeyinin averaj değerlerde, yeşil renkli bölümler az oranda gen ekspresyonunu göstermektedir.

Hasta ve kontrol gruplarından alınan periferik kan örneğinden toplam 41 miRNA analizi yapıldı. Bunlardan 6 tanesinin artan eksprese olduğu, ancak 1 tanesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). Panelde yer alan diğer miRNA ekspresyon seviyeleri ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p > 0.05$)

Karşılaştırılan Grupların miRNA Ekspresyonlarının Scatter Plot Grafiğinden Dağılımı:



Şekil 2. Hasta ve Kontrollerde İlgili Mikrorna'ların Karşılaştırılması Sonucu Elde Edilen Scatter Plot Grafiği

Scatter Plot Graflerinin Yorumlanması

Scatter plot, iki mikroarrayin yoğunluk değerini karşılaştırmak için kullanılan değerli bir yöntemdir. Bu grafler X eksenindeki ve Y eksenindeki her bir array'in yoğunluğunu ifade eder. Bu graflerde optimal istenen durum, tüm noktaların orta çizginin her bir yanında sıralanmasıdır. Veri yoğunluğunun orta açısı ve yakınında izlemesi iki veri arasında yüksek korelasyon olduğunu ve istatistiki değerlendirme için uygun veriler olduğunu gösterir.

Araştırılan MikroRNA'lar ve Alt Grupları:

Araştırılan MikroRNA	Alt Grupları
let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c, let-7d-5p, let-7e-5p, let-7f-5p, let-7g-5p, let-7i-5p, miR-98	ACVR2A, CCL7, CCR7, FASLG, GDF6, IL10, IL13, LY75, OSMR, POU2F2, TGFBR1
miR-101-3p	ACVR2B, ERBB2IP, FOS, GFRA1, PROK2, PTGS2, SOCS2, SPRED1, TGFBR1
miR-128	ACVR2A, BMPR2, CSF1, F3, GREM1, HDAC5, IRF4, ITCH, KITLG, MAPK14, TGFBR1
miR-144-3p	ACVR2B, BCL6, CXCL12, EDA, FN1, KITLG, LIFR, TNFSF11, TTN
miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-181c-5p, miR-181d	ACVR2A, ACVR2B, BMP3, IL1A, KITLG, LIF, TGFBR1, TNFRSF11B
miR-202-3p	ACVR2A, ACVR2B, GDF6, GHR, IL10, LY75, POU2F2, TGFBR1
miR-23a-3p, miR-23b-3p	ATRN, CCL7, CXCL12, IL12B, IL6R, KITLG, M6PR, PROK2, TGFBR2, TPST1
miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-29c-3p	CD276, HDAC4, IL1RAP, LIF, PTX3, TNFRSF1A, VEGFA
miR-21-5p, miR-590-5p	BMPR2, CCL1, FASLG, IL12A, LIFR, OLR1
miR-300, miR-381	ACVR2B, ATRN, BMPR2, F3, GFRA1, IL15RA, ITCH, NR3C1, YY1
miR-30a-5p, miR-30b-5p, miR-30c-5p, miR-30d-5p, miR-30e-5p	ACVR1, ATRN, IL1A, LEPR, LIFR, NR4A2
miR-340-5p	CAST, CYP26B1, IL12A, ITCH, LIFR, NFKB1, NR3C1
miR-34a-5p, miR-34c-5p, miR-449a, miR-449b-5p	ACVR2B, ASB1, BCL2, BMP3, CSF1R, GREM2, IL6R, KITLG, LDHA, NR4A2
miR-374a-5p	ACVR2B, BMP2, CCL2, CEBPB, CYP26B1, IL10

miR-513b	ACVR2A, CXCL5, FIGF, HDAC4, LIFR, PTGS2, TGFBR1, TNFSF4
miR-524-5p	ACVR2B, ERBB2IP, IL1A, NR4A2, TGFB3, TNFSF11, YY1, ZFP91
miR-543	ACVR2A, ACVR2B, CYP26B1, FGF12, FOS, GDF6, IL10, IL1A
miR-545-3p	ACVR2B, BMPR2, CYP26B1, IL1A, PDGFB, TGFBR1
miR-548e	ACVR2B, IL12B, IL1R1, INHBB, SPRED1, TGFBR1, VEGFA
miR-607	ACVR2B, BCL2, BMP3, BMPR2, CD28, CXCL14, IL12A, NAMPT, ZFP91
miR-656	ACVR1B, BMP3, CYP26B1, F3, IFNG, NR4A2, TNFSF4
miR-875-3p	CAST, CD53, EDA, ITCH, NFAM1, NR4A2, STAT3

let-7b-5p, let-7i-5p, miR-23a-3p, miR-29b-3p, miR-30a-5p, bu miRNA'lar hastalarda kontrol grubuna göre ekspresyonları yüksek bulundu ancak anlamlı değildi.

miR-29c-3p u miRNA hastalarda, kontrol grubuna göre ekspresyonu yüksek bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı idi.

			Fold Change (comparing to control group)		Up-Down Regulation (comparing to control group)		
Position		Fold Change	95% CI	Comments	Fold Regulation	Comments	p value
P1	Hs_let-7b_1	2,015	(0.85, 3.18)		2,015		0,085941
P2	Hs_let-7c_1	1,9378	(0.75, 3.12)		1,9378		0,088596
P3	Hs_let-7d_1	1,5679	(0.55, 2.58)		1,5679		0,607812
P4	Hs_let-7i_1	2,0006	(0.54, 3.47)		2,0006		0,236203
P5	Hs_miR-29a_1	1,3611	(0.70, 2.03)		1,3611		0,446707
P6	Hs_miR-29c_1	2,3778	(0.39, 4.36)		2,3778		0,034991
P7	Hs_miR-30b_1	1,6651	(0.24, 3.09)		1,6651		0,63284
P8	Hs_miR-34a_1	0,8978	(0.00001, 1.82)	A	-1,1139	A	0,100553
P10	Hs_miR-98_1	0,9212	(0.17, 1.68)		-1,0855		0,217807
P11	Hs_miR-381_1	0,9416	(0.22, 1.66)	B	-1,062	B	0,146365
P12	Hs_miR-449_1	1,2913	(0.39, 2.19)		1,2913		0,365081
P13	Hs_miR-449b_1	1,0006	(0.39, 1.61)	B	1,0006	B	0,328614
P14	Hs_miR-590_1	0,817	(0.28, 1.36)	B	-1,224	B	0,133396
P16	Hs_miR-656_1	0,9678	(0.34, 1.59)		-1,0333		0,526461
P17	Hs_let-7f_1	1,3917	(0.49, 2.29)		1,3917		0,844679
P18	Hs_miR-29b_1	2,3089	(0.28, 4.33)		2,3089		0,110923
P19	Hs_miR-181b_1	1,4344	(0.42, 2.45)		1,4344		0,96102
P20	Hs_miR-30a-5p_1	2,1094	(0.61, 3.61)		2,1094		0,070602
P21	Hs_let-7g_2	1,8547	(0.42, 3.29)		1,8547		0,299682
P22	Hs_miR-101_3	1,4072	(0.28, 2.53)		1,4072		0,823112
P23	Hs_miR-128_1	1,5446	(0.31, 2.78)		1,5446		0,207159
P24	Hs_miR-181a_2	1,2055	(0.33, 2.08)		1,2055		0,871202
P25	Hs_miR-181c_2	1,9632	(0.60, 3.32)	A	1,9632	A	0,131309
P26	Hs_miR-202_2	1,104	(0.45, 1.76)		1,104		0,404976
P27	Hs_miR-21_2	1,0792	(0.35, 1.81)		1,0792		0,888819
P28	Hs_miR-30c_2	1,3469	(0.35, 2.35)		1,3469		0,593172
P29	Hs_miR-30d_2	1,9736	(0.61, 3.33)		1,9736		0,185646
P30	Hs_miR-30e_1	1,629	(0.43, 2.83)		1,629		0,317072
P31	Hs_miR-374a_1	1,4272	(0.22, 2.63)		1,4272		0,53125
P33	Hs_miR-543_1	0,944	(0.29, 1.60)	B	-1,0594	B	0,202147
P35	Hs_miR-875-3p_1	1,3721	(0.48, 2.27)	B	1,3721	B	0,420139
P36	Hs_miR-548e_1	0,79	(0.16, 1.42)	B	-1,2658	B	0,121492
P37	Hs_miR-144_4	1,2866	(0.17, 2.41)		1,2866		0,752737
P38	Hs_let-7a_2	1,1932	(0.00001, 2.44)		1,1932		0,242308

			Fold Change (comparing to control group)		Up-Down Regulation (comparing to control group)		
Position		Fold Change	95% CI	Comments	Fold Regulation	Comments	p value
P39	Hs_let-7e_3	1,0614	(0.36, 1.77)		1,0614		0,699652
P40	Hs_miR-181d_2	1,07	(0.33, 1.81)		1,07		0,618545
P41	Hs_miR-23a_2	2,0006	(0.64, 3.36)		2,0006		0,099282
P42	Hs_miR-23b_2	1,4126	(0.42, 2.41)		1,4126		0,652943
P43	Hs_miR-300_2	1,4808	(0.47, 2.49)	B	1,4808	B	0,658737
P44	Hs_miR-340_3	1,9148	(0.54, 3.29)	B	1,9148	B	0,306449
P45	Hs_miR-524-5p_1	1,2707	(0.46, 2.08)	B	1,2707	B	0,915642
P46	SNORD61	1	(1.00, 1.00)		1		0
P48	miRTC	0,8374	(0.12, 1.56)		-1,1942		0,238464

Hasta grubunda serumda ekspresyon artışı gösteren miRNA'ların fold regulation değerlerinin tablo ifadesi. Bunlardan istatistiksel olarak eksprese olanlar kırmızı renklegösterilmiştir. Anlamlı seviyede eksprese olan koyu kırmızı renkte yazılmıştır. Diğer mikro RNA ların ekspresyonlarında bir artış saptanmadı.

6. TARTIŞMA

MikroRNAlar (miRNAlar), endojen küçük RNAların (small RNA) bir sınıfını oluşturan, protein kodlamayan RNA molekülleridir (101,102). Yaklaşık 20- 23 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli miRNAların sayısı insanlarda bini geçmektedir. Bu moleküllerin çeşitli biyolojik olaylarda ve patolojik durumlarda önemli düzenleyici roller aldığı gösterilmiştir. miRNAların keşiflerinden bu yana biyogenezi ve moleküler etki mekanizması ile ilgili oldukça fazla bilgi edinilmiştir. Son yıllarda başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın gelişiminde miRNAların düzenlenmesindeki bozuklukların yer aldığı gösterilmiş, ifade profillerinin tanı ve tedavide faydalı kriterler sağlayacağı öngörülmüştür.

Daha önce çalışılmayan akut apandisit hastalığının da mikroRNA profillerinin incelenmesini içeren tez çalışmamızda maddi kaynakların elverdiği ölçüde 24 adet hasta ve 24 adet kontrol grubu olmak üzere 48 adet kişide toplamda 41 adet mikroRNA'nın ekspresyonları araştırılmıştır.

24 adet hasta grubunda 16 adet erkek 8 adet kadın hasta bulunmaktadır. Erkek hasta sayısının yüksek olması sebebi çalışma dönemimizde tanısı konan apandisit hastalarının çoğunluğunun erkek cinsiyette olması idi. Akut apandisit erkeklerde daha yüksek oranlarda görüldüğü belirtilmektedir (103). Erkek/kadın oranı ise 1,4:1 olarak bildirilmektedir. Görmüş (104) tarafından yapılan tez çalışmasında hastaların %66,2'sinin erkek olduğu tespit edilmiş, erkek/kadın oranı benzer şekilde 2:1 olarak bulunmuştur. Yavuz tarafından yapılan (105) başka bir çalışmada erkek/kadın oranı 2.4:1, Aren ve ark. (106) tarafından ise bu oran 1.6:1 olarak bildirilmiştir (107). Çalışmamızda erkek/kadın oranı 2:1 ile literatürle uyumlu idi. Ancak cinsiyetin akut apandisit için tanı değerinin olmadığını saptadık

Yaş dağılımı ise 18 yaş üstü vakalardan rastgele alınmıştır. Çalışmaya alınan hastaların özgeçmişlerinde ek patolojileri olmamasına özen gösterilerek alınmıştır. Çalışmaya alınan en düşük yaştaki hasta 18, en yüksek yaştaki hasta 62 yaşında idi. Kontrol

grupları da bu yaş gruplarına benzer şekilde alındılar. Her yaş grubunda saptanabilen akut apandisit sıklıkla birinci ve üçüncü dekatlar arasında görüldüğü belirtilmektedir (108). Literatürde yaş arttıkça akut apandisit sıklığının azaldığı bildirilmiştir (109). Özkan ve ark. (110) yaş ortalamasını 36 ± 17.78 , Sarıbay ve ark. (111) $36,7 \pm 1.12$, Karaaslan ve ark. (112) $3, \pm 14.7$ olarak bildirmişlerdir.

Çalışmamızda toplamda 48 kişinin mikroRNA profili incelenmiştir. 48 örneğin sayısal olarak daha fazla olabilmesi için daha fazla maddi imkanlara ihtiyaç duyulması dezavantaj olmuştur.

Literatür incelendiğinde Li Dr ve arkadaşları kolorektal kanserli olgularda miR-1260b düzeylerinde yüksek ekspresyonun hastalarda kötü prognostik bir bio marker olduğunu bulmuşlar (113).

Nedaeinia R ve arkadaşları kolon kanserinde mikro RNA 21'in ekspresyonunu hedef alan inhibitör ajanların hastalığın tedavisinde faydalı olabileceğini yazmışlar (114).

Xi XP ve arkadaşları yine kolon hastalıklarında miR-17 nin epitelyal mezankimikal kanser kök hücrelerindeki artışa bağlı ekspresyonunun yükseldiğini söylemişler.

Cartig O ve arkadaşları miR-103a-3p, miR-143-5p ve miR-215 düzeylerinin üçünün beraber değerlendirilmesinin evre 2 kolon kanseri hastalarında cerrahi sonrası adjuvan kemoterapinin faydası hakkında bilgi verebileceğini belirtmişler (115).

Chen Z ve arkadaşları kolorektal kanser hastalarında miR-21 düzeylerinin prognostik önemine dikkat çekmişler (116).

Hudcova K ve arkadaşları miR-29c-3p, miR-200b-5ve miR-375-3p genlerindeki ekspresyon azalmalarının baş-boyun kanserlerinde kötü prognozu işaret ettiğini söylemişler (117). Bu çalışmalar kolona yönelik hastalıklarda mikroRNA'lardan tanı, prognoz, açısından yararlanmanın faydalı olacağını göstermişlerdir.

Ağız içi kanserli hastaların serumlarından yapılan çalışmalarda mir-16 ve let-7b seviyelerinin sağlıklı kontrollerden alınan serumlara göre ekspresyon seviyelerinde artış olduğu; mir-338-3p, mir-223 ve mir-29a seviyelerinin ise azaldığı gözlenmiştir (118).

Sun ve ark.'larının Rac1 downregulasyonu yoluyla prostat kanserinde mir-146a'nın baskılayıcı bir rol oynadığını göstermişlerdir (119).

Literatürde üçlü-negatif meme kanseri örneklerinde, bir tümör supresör gen olan BRCA1 ve miR-146a ekspresyonu arasında güçlü bir pozitif korelasyon gösterilmiştir (120). Ayrıca miR-146a downregülasyonunun lenf nodu pozitifliği ile bağlantısı ve hastaların genel olarak azalmış sağkalımı ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir.

Liu ve arkadaşları Adenoid Kistik Karsinom (Adenoid Cystic CarcinomaACC)'da miR-155 in aşırı ekspresyonunu, Mir-155' in inhibisyonunun ACC-2 hücrelerinin (ACC için model olarak kullanılmıştır) invazyon kapasitesini belirgin bir şekilde azalttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada mir-155 inhibisyonunun ayrıca EGFR ve RelA (NF-κB) ekspresyonlarında azalmaya yol açtığı saptanmıştır (121) Mitani ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre miR-17 ve miR-20a aşırı ekspresyonunun ACC' de kötü survive sonuçları ile bağlantılı olduğu görülmüştür (122). Başka bir çalışmada ACC ile ilgili yapılan fonksiyonel analiz MiR-181a' nın tükürük bezi adenoid kistik kanserinde hücre göçünü, yayılmasını ve çoğalmasını inhibe ettiğini in vitro olarak; tümör gelişimi ile akciğer metastazını baskıladığını da in vivo olarak göstermiştir. MiR181a mimiğinin ACC hücrelerinde MAPK-Snai2 yolağını hedefleyerek adenoid kistik karsinom metastazını suprese ettiği saptanmıştır (123).

Çeşitli araştırma grupları tarafından yapılan çalışmalarda kalpte gelişen birçok patolojilerde de miRNA'ların rolleri gösterilmiştir (124).

Kalp yetersizliği ve miRNA ilişkisini araştıran literatürde az sayıda klinik çalışma bulunmaktadır. Tijssen ve ark.'nın 30 sağlıklı gönüllü ve 50 dispne ile başvuran hasta (30 kalp yetersizliği tanılı, 20 kalp yetersizliği ile ilişkisiz hasta) üzerinde yaptığı çalışmada plazma miR-423-5p seviyesi sadece kalp yetersizliğine bağlı dispne gelişen hastalarda anlamlı yüksek saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada yapılan korelasyon analizi sonucunda miR-423-5p seviyesi NT-proBNP ve NYHA sınıfıyla ilikili bulunmuştur (125).

Kendi çalışmamızda ise miR-29c-3p geninde hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ekspresyon yüksekliği bulunulmuştur. Yani miR-29c-3p akut apandisitte tanısız

bir biomarker olabilir mi sorumuza, bizi umutlandıran bir yanıt vermiştir. Yaptığımız çalışmadan yola çıkarak daha fazla hastanın katılımı ve kontrollü doku çalışmalarıyla sonuçların güvenilirliğinin test edilmesi uygun olacaktır. Elde ettiğimiz sonuçlarla, hasta sayısının daha fazla olduğu çok merkezli çalışmalar ile akut apandisit düşünülen hastalarda eksprese olan, ekspresyonu azalan ya da artan miRNA düzeylerinin belirlenmesi ile yeni tanı ve tedavi yaklaşımları geliştirilebileceğini, bu çalışmanın bir öncü çalışma niteliğinde olduğunu düşünmekteyiz.

Bu çalışmanın en büyük kısıtlılığı mikroRNA kitlerinin çalışılmasındaki yüksek maliyetler olmuştur.

7. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Hasta ile kontrol grubu arasında yapılan belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında; kontrol grubuna göre hastalarda şu sonuçlara ulaşılmıştır:

Serumda bakılan mikroRNA'lardan let-7b-5p, let-7i-5p, miR-23a-3p, miR-29b-3p, miR-30a-5p, bu miRNA'lar hastalarda kontrol grubuna göre ekspresyonları yüksek bulundu ancak anlamlı değildi.

miR-29c-3p u miRNA hastalarda, kontrol grubuna göre ekspresyonu yüksek bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı idi.

Çalışmamız, akut apandisit hastalığında mikroRNA analizleri üstüne yapılmış prospektif tarzda yapılan ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Daha önce çalışılmayan akut apandisit hastalığın da mikroRNA profillerinin incelenmesini içeren tez çalışmamızda miR-29c-3p geninde anlamlı ekspresyon yüksekliği bulunuldu. Yaptığımız çalışmadan yola çıkarak daha fazla hastanın katılımı ve kontrollü doku çalışmalarıyla sonuçların güvenilirliğinin test edilmesi uygun olacaktır. Elde ettiğimiz sonuçlarla, hasta sayısının daha fazla olduğu çok merkezli çalışmalar ile apandisit düşünülen hastalarda eksprese olan, ekspresyonu azalan ya da artan miRNA düzeylerinin belirlenmesi ile yeni tanı ve tedavi yaklaşımları geliştirilebileceğini, bu çalışmanın bir öncü çalışma niteliğinde olduğunu düşünmekteyiz.

Bu çalışmanın en büyük kısıtlılığı mikroRNA kitlerinin çalışılmasındaki yüksek maliyetler olmuştur.

KAYNAKLAR

1. Dubb S, Arnold A, Banavali S, Arnold J. Acute Appendagitis Presenting with Features of Appendicitis: Value of Abdominal CT Evaluation. *Case Rep Gastroenterol*. 2008;2(2):191-195. doi:10.1159/000133827.
2. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(3-4):369-378. doi:10.1007/s10555-009-9188-5.
3. Bostjancic E, Glavac D. Importance of microRNAs in skin morphogenesis and diseases. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, Adriat*. 2008;17(3):95-102.
4. Deaver Jg Appendicitis. 3rd ed. Philadelphia: P Blakiston's Son & Co; 2015.
5. Vesalius A. *De Humani Corporis Fabrica Liber V*. Basel: Iohannis Oporini; 1543.
6. RH. M. *Classic Descriptions of Disease*. Springfield: IL: Charles C. Thomas; 1945.
7. De Moulin D. Historical notes on appendicitis. *Arch Chir Neerl*. 1975;27(2):97.
8. Meade RH. The evolution of surgery for appendicitis. *Surgery*. 1964;55(5):741-752.
9. Bright R AT. *Elements of the Practice of Medicine*. London: Longmans, Green & Co, Inc; 1839.
10. Shepherd J. ACUTE APPENDICITIS:'. A HISTORICAL SURVEY. *Lancet*. 1954;264(6833):299-302.
11. McBURNEY C. IV. The incision made in the abdominal wall in cases of appendicitis, with a description of a new method of operating. *Ann Surg*. 1894;20(1):38.
12. Douglas CD, Macpherson NE, Davidson PM, Gani JS. Randomised controlled trial of ultrasonography in diagnosis of acute appendicitis, incorporating the Alvarado score. *BMJ*. 2000;321:919-922. doi:10.1016/S1479-666X(03)80007-0.

13. Ş.O. Klinik Olarak şüpheli Akut Apandisitlerin Değerlendirilmesinde Tc-99m HMPAO işaretli Lökosit Sintigrafisinin Yeri. Uzmanlık Tezi. 2001.
14. Zinner J AW. Ince Bağırsak ve Kolon- Apendisit ve Apendektomi Ed: Andincan A, Maingot Abdominal Operasyonlar. 1st ed. (Andincan A M, ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2008.
15. Yıldırım E, Karagülle E, Kirbas I, Türk E, Hasdogan B, Teksam M. Alvarado scores and pain onset in relation to multislice CT findings in acute appendicitis. Diagn Interv Radiol. 2008;14:14-18.
16. Denizbasi A, Unluer EE. The role of the emergency medicine resident using the Al-varado score in the diagnosis of acute appendicitis compared with the general surgery resident. Eur J Emerg Med. 2003;10(4):296-301.
17. Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, Daly JM, Fisher JE, Galloway AC. Cerrahinin ilkeleri. Geçim İE, Çeviri Ed. 1999;7:1865-1866.
18. Schumpelick V, Dreuw B, Ophoff K, Prescher A. Appendix and cecum: embryology, anatomy, and surgical applications. Surg Clin North Am. 2000;80(1):295-318.
19. Sinanan M. Acute abdomen and appendix. Surg Sci Princ Pract Philadelphia JB Lippincott. 1993:1120-1142.
20. Ellis H, Maingot R, Zinner MJ, Schwartz SI. Maingot's Abdominal Operations. Appleton & Lange; 1997.
21. Wakeley CPG. The position of the vermiform appendix as ascertained by an analysis of 10,000 cases. J Anat. 1933;67(Pt 2):277.
22. Orringer MB, Sabiston CCJ. The biological basis of modern surgical practice. Biol basis Mod Surg Pract. 1999.
23. Addiss DG, Shaffer N, Fowler BS, Tauxe R V. The epidemiology of appendicitis and appendectomy in the United States. Am J Epidemiol. 1990;132(5):910-925.
24. Blewett CJ, Krummel TM. Perforated appendicitis: past and future controversies. In: Seminars in Pediatric Surgery. Vol 4. ; 1995:234-238.

25. Primatesta P, Goldacre MJ. Appendicectomy for acute appendicitis and for other conditions: an epidemiological study. *Int J Epidemiol.* 1994;23(1):155-160.
26. Peltokallio P, Tykkä H. Evolution of the age distribution and mortality of acute appendicitis. *Arch Surg.* 1981;116(2):153-156.
27. Walker AR, Walker BF. Appendectomy in South African inter-ethnic school pupils. *Am J Gastroenterol.* 1987;82(3):219-222.
28. Basta M, Morton NE, Mulvihill JJ, Radovanović Z, Radojčić C, Marinković D. Inheritance of acute appendicitis: familial aggregation and evidence of polygenic transmission. *Am J Hum Genet.* 1990;46(2):377.
29. Brender JD, Marcuse EK, Weiss NS, Koepsell TD. Is childhood appendicitis familial? *Am J Dis Child.* 1985;139(4):338-340.
30. Wangenstein OH, Dennis C. Experimental proof of the obstructive origin of appendicitis in man. *Ann Surg.* 1939;110(4):629.
31. Cohn Jr I, Atik M. Strangulation obstruction—closed loop studies. *Ann Surg.* 1961;153(1):94.
32. Boley SJ, Agrawal GP, Warren AR, et al. Pathophysiologic effects of bowel distention on intestinal blood flow. *Am J Surg.* 1969;117(2):228-234.
33. Bennion RS, Wilson SE, Serota AI, Williams RA. The role of gastrointestinal microflora in the pathogenesis of complications of mesenteric ischemia. *Rev Infect Dis.* 1984;6(Supplement 1):S132-S138.
34. Bennion RS, Thompson JE, Baron EJ, Finegold SM. Gangrenous and perforated appendicitis with peritonitis: treatment and bacteriology. *Clin Ther.* 1989;12:31-44.
35. Dayal Y, DeLellis RA. The gastrointestinal tract. *Robbins Pathol basis Dis Saunders, Philadelphia.* 1989:902-904.
36. Lewis FR, Holcroft JW, Boey J, Dunphy JE. Appendicitis: a critical review of diagnosis and treatment in 1,000 cases. *Arch Surg.* 1975;110(5):677-684.
37. Yazısı Ara. Normal apendiksin kontrastsız düflük doz helikal BT ile değerlendirilmesi. *Diagn Interv Radiol.* 2005;11:45-50.

38. Yıldız M. Akut Apendisit Düşünülen Hastalarda 5-Hidroksi İndol Asetik Asit ve Sensitif C-Reaktif Proteinin Tanı Değeri.
39. Güven A, Atabek C, Gündoğdu G, et al. Çocukluk Çağı Apandisit Olguları Ve Apendikolitin Şüpheli Karın Ağrılarındaki Yeri. Türkiye Çocuk Hast Derg. 2007;1(2).
40. Behzatoğlu B, Hatipoğlu E, Bayramoğlu S, Yılmaz G, Yirik G, Cimilli T. Telif Hakkı Devir Formu Yazarlara Bilgi.
41. Başaklar AC. Çocuklarda Travma ve Akut Karın. Palme Yayıncılık; 1994.
42. Marc IR, O'Neill JA, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW CA, ed. Essentials of Pediatric Surgery Appendicitis. Missouri: Mosby; 1995.
43. Cev M, Bozfakioğlu Y DÜ. No Title. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 1989.
44. Tehrani HY, Petros JG, Kumar RR, Chu Q. Markers of severe appendicitis. Am Surg. 1999;65(5):453.
45. Türkyılmaz Z, Sönmez K, Demiroğulları B. Apandisit düşünülen olgularda labora-tuvar testlerinin tanısal değeri. Prospektif çalışma. Pediatr Cerrahi Derg. 2000;14:107-110.
46. Akman H, Ege G, Kuzucu MK BM. Çocuklarda akut apandisit tanısında ultrasonog-rafi ile spiral bilgisayarlı tomografi incelemelerinin karşılaştırılması. Pediatr Cer-rahi Derg. 2000;14:107-110.
47. Lemieur TP, Rodriguez JL, Jabobs DM, Bennett ME, West MA. Wound management in perforated appendicitis. Am Surg. 1999;65(5):439.
48. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. Immunol Today. 1994;15(2):74-80.
49. Gofrit ON, Abu-Dalu K. Perforated appendicitis in the child: contemporary experience. IMAJ-RAMAT GAN-. 2001;3(4):262-265.
50. Spencer S FDG. Apendix Principles of Surgery 7. Edition.
51. Menteş Ö, Eryılmaz M, Yiğit T, et al. 60 Yaş üstü apandektomili olgularımızın retro-spektif analizi. 2008.

52. Sivit CJ. Imaging the child with right lower quadrant pain and suspected appendicitis: current concepts. *Pediatr Radiol*. 2004;34(6):447-453.
53. Ergün E, Bilaloğlu P, Koşar U, Ünlübay D, Temel S. Akut apandisit tanısında opak-sız spiral BT incelemenin yeri, US ve cerrahi sonuçları ile korelasyonu. *Tanısal ve Girişimsel Radyoloji*. 2002;8:231-236.
54. Morrow SE, Newman KD. Current management of appendicitis. In: *Seminars in Pediatric Surgery*. Vol 16. Elsevier; 2007:34-40.
55. Hernandez JA, Swischuk LE, Angel CA, Chung D, Chandler R, Lee S. Imaging of acute appendicitis: US as the primary imaging modality. *Pediatr Radiol*. 2005;35(4):392-395.
56. Pledger G, Stringer MD. Childhood deaths from acute appendicitis in England and Wales 1963-97: observational population based study. *BMJ*. 2001;323(7310):430-431.
57. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Mol Oncol*. 2010; 4(3):230-241.
58. Zhang L, Huang J, Yang N, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(24):9136-9141.
59. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005;123(4):631-640.
60. Djuranovic S, Nahvi A, Green R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science* (80-). 2011;331(6017):550-553.
61. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression. *Sci Stke*. 2007;367(re1).
62. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431(7006):350-355.
63. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.

64. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
65. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-89.
66. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-906.
67. Goodfellow SJ, White RJ. Regulation of RNA polymerase III transcription during mammalian cell growth. *Cell Cycle*. 2007;6(19):2323-2326.
68. Felton-Edkins ZA, Kenneth NS, Brown TRP, et al. Direct regulation of RNA polymerase III transcription by RB, p53 and c-Myc. *Cell Cycle*. 2003;2(3):180-183.
69. Scott PH, Cairns CA, Sutcliffe JE, et al. Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry. *J Biol Chem*. 2001;276(2):1005-1014.
70. White RJ, Gottlieb TM, Downes CS, Jackson SP. Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol*. 1995;15(12):6653-6662.
71. Costanzo G, Camier S, Carlucci P, Burderi L, Negri R. RNA polymerase III transcription complexes on chromosomal 5S rRNA genes in vivo: TFIIIB occupancy and promoter opening. *Mol Cell Biol*. 2001;21(9):3166-3178.
72. Young LS, Rivier DH, Sprague KU. Sequences far downstream from the classical tRNA promoter elements bind RNA polymerase III transcription factors. *Mol Cell Biol*. 1991;11(3):1382-1392.
73. Besser D, Götz F, Schulze-Forster K, Wagner H, Kröger H, Simon D. DNA methylation inhibits transcription by RNA polymerase III of a tRNA gene, but not of a 5S rRNA gene. *FEBS Lett*. 1990;269(2):358-362.
74. Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* (80-). 2004;303(5654):83-86.

75. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human mi-croRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(12):1097-1101.
76. Hess J, Perez-Stable C, Wu GJ, Weir B, Tinoco I, Shen C-K. End-to-end transcrip-tion of an Alu family repeat: A new type of polymerase-III-dependent terminator and its evolutionary implication. *J Mol Biol.* 1985;184(1):7-21.
77. Gu TJ, Yi X, Zhao XW, Zhao Y, Yin JQ. Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. *BMC Genomics.* 2009;10(1):563.
78. Bohnsack MT, Czaplinski K, GÖRLICH D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna.* 2004;10(2):185-191.
79. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of mi-croRNA precursors. *Science (80-).* 2004;303(5654):95-98.
80. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003;17(24):3011-3016.
81. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA pro-cessing. *Nature.* 2003;425(6956):415-419.
82. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):259-269.
83. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J.* 2002;21(21):5875-5885.
84. Mandel P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l’homme. *CR Acad Sci Paris.* 1948;142:241-243.
85. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other dis-eases. *J Clin Invest.* 1973;52(1):198.
86. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibod-ies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1966;45(11):1732.

87. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*. 1998;339(24):1734-1738.
88. Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chow KCK, Chui DHK, Lo YMD. Prenatal exclusion of β thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet*. 2002;360(9338):998-1000.
89. Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008;54(3):482-490.
90. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997-1006.
91. Wang J, Yu M, Yu G, et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(1):184-188.
92. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(30):10513-10518.
93. Biomarkers SMAPN, Gilad S, Meiri E, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. 2008.
94. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008;10(12):1470-1476.
95. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 2008;3(11):e3694.
96. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2(100):ra81-ra81.
97. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC GD. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:5003-5008.

98. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *Rna*. 2005;11(12):1753-1761.
99. Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. *Gene Ther*. 2011;18(12):1104-1110.
100. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*. 2006;12(12):580-587.
101. Ramachandran S. & Palanisamy V. Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 286-293, doi:10.1002/wrna.115 (2012).
102. Weber JA. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56, 1733-1741, doi:clinchem.2010.147405 [pii]10.1373/clinchem.2010.147405 (2010).
103. Çitgez B, Yetkin G, Akgün İ, Uludağ M, Velidedeoğlu M, Akçakaya A. Kadın Hastalarda Negatif Apendektomi İle Jinekolojik Patolojiler Arasındaki İlişki. *Maltepe Tıp Derg*. 2011;3 (3):10-2.
104. Görmüş C. Akut Apendisit Teşhisinde Alvarado Skoru ile Ultrasonografinin Negatif Laparotomi Oranlarını Düşürmede Etkisi ve Alvarado Skorlama Sistemine Modifikasyon Gerekliliğinin Sorgulanması [Tez]. İstanbul: Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi; 2007.
105. Yavuz S. Opere Olmuş Akut Apendisitli Hastalarda Alvarado Skoru ve Ultrasonografi Sonuçlarının Retrospektif Değerlendirilmesi [Tez]. İstanbul: Göztepe Eğitim Araştırma Hastanesi; 2009.
106. Aren A, Gökçe AH, Gökçe FS, Özakay K, Aksoy Ş, Karagöz B, et al. Akut Apendisit Yaş, Cinsiyet, Lökosit Değerleri İle İlişkisi. *İstanbul Tıp Derg*. 200; 3:126-9.
107. Humes DJ, Simpson J. Acute appendicitis. *BMJ*. 2006;333(7567):530-4.
108. Liang MK, Andersson RE, Jaffe BM, Berger DH. The Appendix. In: Brunicaardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, et al., editors. *Schwartz's Principles of Surgery*. 10 ed. New York: McGraw-Hill Education; 2014. p. 1241-62.

109. Sulu B. Demographic and Epidemiologic Features of Acute Appendicitis. 2012. In: Appendicitis - A Collection of Essays from Around the World [Internet]. InTech; [170-8].
110. Ozkan S, Duman A, Durukan P, Yildirim A, Ozbakan O. The Accuracy Rate of Alvarado Score, Ultrasonography, and Computerized Tomography Scan in The Diagnosis of Acute Appendicitis in Our Center. Niger J Clin Pract. 2014;17(4):413-8.
111. Sarıbay R. Yardımcı Tanı Yöntemlerinin Tek ve Birlikte Kullanımının Akut Apandisit Tanısındaki Etkinliği [Tez]. Mersin: Mersin Üniversitesi; 2014.
112. Karaaslan U. Lökosit sayısı, yüzde nötrofil oranı ve C-Reaktif Protein Konsantrasyonlarının "Kesim Değeri" Düzeylerinde Apandisit Tanısındaki Değerleri [Tez]. Mersin: Mersin Üniversitesi; 2011
113. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D. & Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. Nucleic Acids Res 38, 7248-7259, doi:gkq601 [pii]10.1093/nar/gkq601 (2010).
114. Liu, Deng-Rui, et al. miR-1260b is a Potential Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer. Medical Science Monitor, 2016, 22: 2417-2423.
115. Nedaeinia, R., et al. Locked nucleic acid anti-miR-21 inhibits cell growth and invasive behaviors of a colorectal adenocarcinoma cell line: LNA-anti-miR as a novel approach. Cancer Gene Therapy, 2016.
116. Xi, Xiang-Peng, et al. MicroRNA-17 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with the cancer stem cell phenotype by regulating CYP7B1 expression in colon cancer. International Journal of Molecular Medicine, 2016.
117. Caritg, Oriol, et al. Identifying High-Risk Stage II Colon Cancer Patients: A Three-MicroRNA-Based Score as a Prognostic Biomarker. Clinical colorectal cancer, 2016.
118. Chen, Zexin, et al. Tissue microrna-21 expression predicted recurrence and poor survival in patients with colorectal cancer—a meta-analysis. OncoTargets and therapy, 2016, 9: 2615.

119. Hudcova K, Expression profiles of miR-29c, miR-200b and miR-375 in tumour and tumour-adjacent tissues of head and neck cancers. *Tumour Biol.* 2016 Jul 20.
120. Maclellan SA. et al. Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. *Cancer Med* 1, 268-274, doi:10.1002/cam4.17 (2012).
121. Sun Q, Zhao X, Liu X, Wang Y, Huang J, Jiang B, Chen Q, Yu J. miR-146a functions as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting Rac1. *Prostate* 2014 Dec;74(16):1613-21
122. Kumaraswamy E, Wendt KL, Augustine LA, Stecklein SR, Sibala EC, Li D, Gunewardena S, Jensen RA. BRCA1 regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human breast cancer cells involves microRNA-146a and is critical for its tumor suppressor function. *Oncogene.* 2014 Nov 24. doi: 10.1038/onc.2014.363.
123. Liu L1, Hu Y, Fu J, Yang X, Zhang Z. MicroRNA155 in the growth and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2013 Feb;42(2):140-7
124. Cheng ve ark., 2007; Sayed ve ark., 2007; Tatsuguchi ve ark., 2007; Chen ve ark., 2008; Care ve ark., 2007; Van Rooij ve ark., 2008
125. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM (2010) MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 106:1035–1039