





T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ

**PROJE BAŞLIĞI**  
**IPF Hastalarında Plazma miR-21, miR-192, miR-215, miR-590 Seviyelerinin İncelenmesi**

**Proje No: TSA-2019-3349**

Proje Türü: N. Araştırma

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**

Adı Soyadı  
Birimi/Bölümü  
Hülya Dirol  
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı  
Birimi/Bölümü

Aslı Toylu, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı,  
Aliye Candan Öğüş, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı,  
Aykut Çilli, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı,  
Ömer Özbudak, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı,  
Özden Altıok Clark, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı,  
Tülay Özdemir, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

Aralık 2020

ANTALYA

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
tarafından TSA-2019-3349 proje numarası ile desteklenmiştir.**



**TEŞEKKÜR:** Akdeniz Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen çalışmamız için Akdeniz Üniversitesi Başhekimliğine, Göğüs Hastalıkları ve Tıbbi Genetik Anabilim dallarına ve Akdeniz Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz.

## İÇİNDEKİLER

Sayf  
a No

ÖZET

ABSTRACT

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM
2. GENEL BİLGİLER
3. GEREÇ VE YÖNTEM
4. BULGULAR
5. TARTIŞMA VE SONUÇ
6. KAYNAKLAR

## ÖZET

**Amaç:** MikroRNA'lar (miRNA'lar), fibrotik süreçlerde düzenleyici rollere sahiptirler. Bazı miRNA'ların idiyopatik pulmoner fibrozis (IPF) gelişiminde çok önemli bir rol oynadığı ortaya konuldu.

**Yöntemler:** Bu tek merkezli, kesitsel çalışmada, İPF (n=88) ve kontrol (n=20) grubunda miR-21, miR-590, miR-192 ve miR-215 plazma seviyelerini inceledik. Hastaları yaşa, karbon monoksit difüzyon kapasitesine (DLCO), Cinsiyet-Yaş-pulmoner Fizyoloji (GAP) skoruna ve bal peteği varlığına göre grupladık. Bu klinik alt gruplar arasında hedef miRNA'ların ekspresyon seviyelerini karşılaştırdık.

**Bulgular:** İPF'li hastalarda ortalama plazma miR-21 ve miR-590 seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti (sırasıyla  $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ ). İPF ve kontrol gruplarının miR-192 ve miR-215 seviyeleri arasında anlamlı fark yoktu. MiR-21 ve miR-590 yaşla pozitif korelasyon gösterirken (sırasıyla  $p=0.041$ ,  $p=0.007$ ) miR-192 ve miR-215 negatif korelasyon gösterdi (sırasıyla  $p=0.0002$ ,  $p<0.0001$ ). Bal peteği olan hastalarda MiR-192 düzeyi bal peteği olmayanlara göre anlamlı düşüktü ( $p=0.003$ ).

**Sonuç:** Sonuçlarımız, miR-21 ve miR-590'ın daha yüksek plazma seviyelerinin İPF varlığı ile ilişkili olduğunu

göstermektedir. MiR-21 ve miR-590, DLCO ile, miR-192 ve miR-215, GAP skoru ve bal peteği ile ilişkili bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: İdiyopatik Pulmoner Fibrozis, miR-21, miR-590, miR-192 ve miR-215

#### ABSTRACT

**Objective:** MicroRNAs (miRNAs) have regulatory roles in fibrotic processes. It has been revealed that some miRNAs play a very important role in the development of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF).

**Methods:** In this single-center, cross-sectional study, we examined the plasma levels of miR-21, miR-590, miR-192 and miR-215 in IPF (n=88) and control (n=20) groups. We grouped patients according to age, carbon monoxide diffusion capacity (DLCO), Gender-Age-pulmonary Physiology (GAP) score, and presence of honeycomb. We compared the expression levels of target miRNAs between these clinical subgroups.

**Results:** Mean plasma miR-21 and miR-590 levels in patients with IPF were significantly higher than in the control group ( $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ , respectively). There was no significant difference between the miR-192 and miR-215 levels of the IPF and control groups. MiR-21 and miR-590 were positively correlated with age ( $p=0.041$ ,  $p=0.007$ , respectively), while miR-192 and miR-215 were negatively correlated ( $p=0.0002$ ,  $p<0.0001$ , respectively). MiR-192 level was significantly lower

in patients with honeycomb than in patients without honeycomb (p=0.003).

Conclusion: Our results show that higher plasma levels of miR-21 and miR-590 are associated with the presence of IPF. MiR-21 and miR-590 were associated with DLCO, miR-192 and miR-215 were associated with GAP score and honeycomb.

Keywords: Idiopathic Pulmonary Fibrosis, miR-21, miR-590, miR-192 and miR-215

## 1. GİRİŞ

### AMAÇ VE KAPSAM

İdiyopatik pulmoner fibrozis (İPF), etiyolojisi bilinmeyen ilerleyici ölümcül bir fibrotik akciğer hastalığıdır. Aşırı hücre dışı matris üretimiyle ilişkili miyofibroblastlar, hastalığın patogenezinde merkezi bir rol oynuyor görülmektedir, patogenezin tam aydınlatılamamıştır [1].

MikroRNA (miRNA) molekülleri, mRNA'larının translasyonunu düzenleyen, küçük endojen RNA'lardır [2]. Pek çok hücresel işlevde modülatör bir role sahiptirler. Ayrıca, fibrotik süreçlerde de miRNA'ların rol aldığı düşünülmektedir [3].

Fibrotik sinyal yollarında merkezi bir role sahip olan bazı miRNA'lar da İPF gelişiminde rol oynamaktadır [4]. Çalışmalar, İPF'li hastaların akciğer dokusunda miR-21 ekspresyonunun arttığını ve miR-21 aşırı ekspresyonuyla akciğer fibroblastlarının aktivitesinin arttığını göstermiştir [5]. miR-21, İPF hastalarının



serumunda da bulundu [6]. Ayrıca miR-21, İPF'nin teşhisi, ilerlemesi ve şiddetiyle ilişkilendirilmiştir [7].

İlginç bir şekilde, başka bir miRNA molekülü olan miR-590, miR-21'e benzer bir nükleotid dizisine sahiptir [8]. Bu nedenle bu iki miRNA molekülünün hedef mRNA moleküllerini paylaşabileceği ve benzer hücresel yollarda yer alabileceği tahmin edilmektedir. miR-21'in hem pulmoner hem de kardiyak fibrozis süreçlerine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [9]. miR-590'ın kardiyak fibrozla ilişkili olduğu bildirilmiş olmasına rağmen, pulmoner fibrozdaki rolü henüz çalışılmamıştır [10].

MiR-192 molekülünün de fibroz gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir. Farelerin bleomisinle indüklenen fibrotik akciğerlerinde miR-192'nin arttığı gösterilmiştir ve İPF'li hastaların balgamında miR-192 bulunmuştur [11,12]. MiR-21 ve miR-590 arasında olduğu gibi miR-192 ve miR-215 molekülleri arasında da güçlü bir dizi benzerliği vardır. miR-215'in fibroblast fonksiyonunu düzenlediği bildirilmiş olsa da, akciğer fibrozundaki rolü hakkında veri yoktur [13].

## 2. Yöntemler:

### Çalışma Dizaynı ve Çalışma Grupları

Bu tek merkezli, kesitsel çalışma Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Haziran 2018-Ağustos 2020 tarihleri arasında yapıldı. İPF hastaları 2018 Amerikan Toraks Derneği / Avrupa Solunum Derneği Klinik Uygulama Kılavuzu kriterlerine göre belirlendi. Kalp hastalığı, kanser, böbrek yetmezliği veya karaciğer hastalığı olanlar çalışma dışı bırakıldı. Kontrol grubu, yaş ve cinsiyet açısından İPF grubuyla eşleşen sağlıklı bireylerden oluşturuldu.

### Klinik özellikler

Hastaların demografik özellikleri (yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, semptomlar, ilaç tedavisi, akciğer biyopsisi) elde edildi. Yüksek

özünürlüklü bilgisayarlı tomografi (YRBT)'de subplevral, bal peteği görünümündeki bazal dominant retiküasyon olağan interstisyel pnömoni (UIP) paterni olarak kabul edildi. Çalışmada Tıbbi Araştırma Konseyi (mMRC) Anketi, cinsiyet-yaş-pulmoner fizyoloji (GAP) skoru cinsiyet, yaş, zorlu vital kapasite (FVC) ve karbon monoksit difüzyon kapasitesi (DLCO) kullanıldı. İPF grubunda solunum fonksiyonlarını değerlendirmek için spirometri ve helyum difüzyon testleri uygulandı ve eř zamanlı olarak miRNA analizi için kan örnekleri alındı. Yaş, cinsiyet, sigara içme öyküsü ve komorbidite verileri sağlıklı kontrol deneklerinden elde edildi. Kontrol grubunda miRNA analizi için kan örnekleri alındı. Hedef miRNA moleküllerinin ekspresyon seviyeleri real-time PCR ile incelendi. Hedef miRNA genlerinin nispi kantifikasyon analizi, referans gen olarak miR-16 kullanılarak REST-MCS yazılımıyla yapıldı [14].

Tüm katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam alındı. Çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (17.01.2018 tarih ve 53 sayılı) onaylandı ve Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklendi (Proje No: TTU-2019-4793).

#### İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prizm 9 (GraphPad Software, ABD) programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler kategorik değişkenler için sayı (n) ve yüzde (%), sürekli değişkenler için ise ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) veya ortalama  $\pm$  standart ortalama hatası (SEM) değerleri verildi. İki bağımsız grup arasındaki ortalama farkları Mann-Whitney U testiyle, ikiden fazla bağımsız grup arasında ise Kruskal Wallis analiziyle incelendi. İki bağımsız kategorik değişkenin ilişkileri

Ki-Kare analizi veya Fisher's Exact Testiyle yorumlandı. Bağımsız sürekli değişkenlerin korelasyonu Spearman's rank korelasyon testiyle analiz edildi. Tüm analizlerde,  $p \leq 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. Bulgular

Demografik özellikler, solunum fonksiyonları ve radyolojik bulgular

Bu çalışmada İPF'li 88 hasta ve 20 sağlıklı kontrol değerlendirildi. İPF grubu 82 (%93,18) erkekten oluşmaktaydı ve ortalama yaş  $66,6 \pm 8,6$  yılı [Tablo 1]. İPF ile kontrol grubu arasında cinsiyet, yaş ve sigara içme miktarı açısından fark yoktu ancak İPF'de sigara içenlerin oranı kontrol grubuna göre daha yüksekti (%71'e karşı %45,  $p=0.038$ ). Hastaların çoğunda (%81.8) çeşitli derecelerde dispne vardı ve medyan mMRC skoru 2 idi. Ortalama FVC %71,3  $\pm 17,1$  ve DLCO %60,6  $\pm 17,8$ 'idi. Ortanca GAP skoru 3 idi ve hastaların %75'i antifibrotik ilaçlar kullanıyordu.

İPF ve kontrol grubundaki miRNA seviyeleri

İPF'deki ortalama plazma miR-21 ve miR-590 seviyeleri, kontrol grubundan en az iki kat daha yüksekti. Gruplar arasında ortalama plazma miR-192 ve miR-215 seviyelerinde anlamlı bir fark yoktu [Şekil 1]. Hem İPF hem de kontrol gruplarında miR-21 ve miR-590 seviyeleriyle miR-192 ve miR-215 seviyeleri arasında pozitif bir ilişki bulundu.

İPF'li hastalarda miRNA'ların solunum fonksiyon testleri, GAP skoru ve radyolojik bulgularla ilişkisi

FVC>%80 olan hastaların miR-21 düzeyi, FVC'si %66-80 olan hastalarinkinden daha yüksekti ( $1.6 \pm 0.9$ 'a karşı  $1.2 \pm 0.9$ ,  $p=0.012$ ). DLCO alt gruplarında miR-192 ve miR-215 seviyelerinde anlamlı bir fark yoktu. Plazma miR-21 ve miR-590 seviyeleri DLCO alt grupları arasında (Kruskal Wallis

testiyle) önemli ölçüde değişmese de, en yüksek DLCO seviyelerine sahip hastalar, en düşük DLCO değerlerine sahip hastalara kıyasla anlamlı derecede artmış miR-590 seviyeleri gösterdi ( $1.5 \pm 0.9$  vs.  $1.0 \pm 1.1$ ,  $p=0.022$  Mann-Whitney U testiyle). GAP puanlarıyla birlikte miR-192 ve miR-215 azaldı. Bal peteği olan hastalarda ortalama plazma miR-192 seviyesi, bal peteği olmayanlara göre anlamlı derecede düşüktü ( $p=0.003$ ).

#### 4. Tartışma:

Bu çalışmada İPF hastalarında plazma miR-21, miR-590, miR-192 ve miR-215 düzeylerini araştırdık. IPF grubunda plazma miR-21 ve miR-590 seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ancak miR-192 ve miR-215 seviyelerinde anlamlı bir fark yoktu. Ayrıca miR-21 ve miR-590 yaş ve DLCO ile ilişkilendirilirken miR-192 ve miR-215 yaş, GAP skoru ve bal peteğiyle ilişkilendirildi. Bu bulgular, miR-21 ve miR-590'ın IPF'nin gelişiminde rol oynayabileceğini, ayrıca miR-192 ve miR-215'in de IPF'nin ilerlemesiyle ilişkili olabileceğini düşündürdü.

MiRNA moleküllerinin akciğer fibrozunda yer aldığı bildirilmiştir. MiR-21'in ekspresyon seviyesinin bleomisinle tedavi edilen farelerin akciğer dokusunda ve IPF hastalarının akciğerlerinde arttığı bulundu [5,16]. Çalışmamızda, plazma miR-21 seviyeleri, IPF'de kontrole göre anlamlı derecede yüksekti. Önceki çalışmalarla birlikte, sonuçlarımız IPF'li hastaların plazmasında miR-21 seviyelerinin yükseldiğine dair daha fazla kanıt sağlamaktadır.

Bildiğimiz kadarıyla, IPF'deki miR-590, miR-192 ve miR-215'in plazma seviyeleri hakkında veri yoktur. Bu miRNA'ların her birinin çeşitli fibrotik hastalıklarda yer aldığı bildirilmiştir ancak sadece miR-192 akciğer fibrozuyla ilişkilendirilmiştir

[10,17,18]. Farelerin bleomisinle indüklenen fibrotik akciğerlerinde ve IPF hastalarının balgamında MiR-192 ekspresyonunun arttığı bulundu [11,12]. Ek olarak miR-192'nin astımlı hastalarda hava yolu yeniden şekillenmesinde bir modülatör olduğu gösterilmiştir [13]. Bu çalışmada, hem miR-192 hem de miR-215'in ekspresyon seviyeleri benzerken, plazma miR-590 seviyeleri IPF'de kontrolden önemli ölçüde daha yüksekti.

Sonuç olarak, plazma miR-590 ve miR-21 seviyeleri, IPF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Ayrıca miR-21 ve miR-590 düzeylerinin yaş ve DLCO ile ilişkili olduğu, miR-192 ve miR-215 düzeylerinin yaş, GAP skoru ve bal peteğiyle ilişkili olduğu bulundu. Bu nedenle, bu miRNA'lar IPF'nin gelişiminde ve ilerlemesinde düzenleyici bir rol alabilir ve tanısal veya prognostik bir araç olarak veya potansiyel olarak yeni bir terapötik hedef olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, plazma miRNA'larının IPF'deki rollerini daha iyi anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

#### Referanslar

1. Selman M, King TE, Pardo A. American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 2001;134(2):136-51.
2. He L, HaNNoN Gj. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5:522-531.
3. Bowen T, Jenkins RH, Fraser DJ. MicroRNAs, transforming growth factor beta-1, and tissue fibrosis. *J Pathol.* 2013;229(2):274-85.
4. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17074.

5. Liu G, Friggeri A, Yang Y, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med*. 2010;207(8):1589-97.
6. Tsitoura E, Wells AU, Karagiannis K, et al. MiR-185/AKT and miR-29a/collagen 1a pathways are activated in IPF BAL cells. *Oncotarget*. 2016;7(46):74569-74581.
7. Makiguchi T, Yamada M, Yoshioka Y, et al. Serum extracellular vesicular miR-21-5p is a predictor of the prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2016;17(1):110.
8. Stolzenburg LR, Harris A. The role of microRNAs in chronic respiratory disease: recent insights. *Biol Chem*. 2018;399(3):219-234.
9. Liu G, Friggeri A, Yang Y, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med*. 2010;207(8):1589-97.
10. Tsitoura E, Wells AU, Karagiannis K, et al. MiR-185/AKT and miR-29a/collagen 1a pathways are activated in IPF BAL cells. *Oncotarget*. 2016;7(46):74569-74581.
11. Makiguchi T, Yamada M, Yoshioka Y, et al. Serum extracellular vesicular miR-21-5p is a predictor of the prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2016;17(1):110.
12. Ren J, Zhang J, Xu N, et al. Signature of circulating microRNAs as potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease. *PLoS One*. 2013;8(12):e80738.
13. Yuan J, Chen H, Ge D, et al. Mir-21 Promotes Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction Via Targeting Smad7. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(6):2207-2219.
14. Yuan X, Pan J, Wen L, et al. MiR-590-3p regulates proliferation, migration and collagen synthesis of cardiac fibroblast by targeting ZEB1. *J Cell Mol Med*. 2020 ;24(1):227-237.

15. Liu Y, Wang F, Xu P. miR-590 accelerates lung adenocarcinoma migration and invasion through directly suppressing functional target OLFM4. *Biomed Pharmacother.* 2017;86:466-474.
16. Chung AC, Huang XR, Meng X, et al. miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(8):1317-25.
17. Cushing L, Kuang PP, Qian J, et al. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(2):287-94.
18. Njock MS, Guiot J, Henket MA, et al. Sputum exosomes: promising biomarkers for idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 2019;74(3):309-312.