T.C.
ISTANBUL ÜNIVERSITESI-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KORONER ARTER HASTALARINDA DNA HASAR TAMİR SÜRECİNDE ROL OYNAYAN MOLEKÜLLERİN VE İLİŞKİLİ MİKRO RNA'LARIN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

NARMİNA MALİKOVA

DANIŞMAN
PROF.DR.MEHMET GÜVEN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2020

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

KORONER ARTER HASTALARINDA DNA HASAR TAMİR SÜRECİNDE ROL OYNAYAN MOLEKÜLLERİN VE İLİŞKİLİ MİKRO RNA'LARIN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

NARMİNA MALİKOVA

DANIŞMAN
PROF.DR.MEHMET GÜVEN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

Bu çalışma 20.10.2020 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Mehmet GÜVEN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Fakülte

Prof. Dr. İlhan ONARAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Fakülte

Doç.Dr. Selçuk DAŞDEMİR
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Fakülte

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

NARMİNA MALİKOVA

İTHAF

Sevgili aileme, özellikle beni her zaman destekleyen babama anneme ve canım oğluma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman ve her koşulda desteğini yanımda hissettiğim, değerli bilgi birikimlerini ve deneyimlerini benimle paylaşan tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Mehmet GÜVEN'e,

Eğitimimde ve tezimde bana her türlü konuda yardım eden Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e ve Anabilim Dalı'mızın tüm değerli Öğretim Üyelerine,

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için gerekli örneklerin temininde emeği geçen Kardiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Prof. Bilgehan KARADAĞ, Doç.Dr. Eser DURMAZ ve ekibine,

Tez çalışmalarım boyunca bana destek veren ve tecrübelerini benimle paylaşan Doç.Dr.Burcu B BAYOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman yanımda olan arkadaşlarım MSc. Bülent TEKİN'e, MSc.Hülya ARKAN'a, MSc.Selin ÜNAL'a, Gizem ERDOĞAN'a, MSc. Asuman ÇELEBİ'ye, MSc.Ceren ORHAN'a ve Günay GALAMİYEVA'ya,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve beni her konuda destekleyen canım aileme teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-31550

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI……İİ
BEYAN……...İİİ
İTHAF……İV
TEŞEKKÜR……V
İÇİNDEKİLER……Vİ
TABLOLAR LİSTESİ……..Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... ……İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ……Xİ
ÖZET ……Xİİ
ABSTRACT…….....Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ……1
2. GENEL BİLGİLER ……..3
2.1. ATEROSKLEROZ.....3
2.2. KAH……....3
2.2.1. KAH PATOGENEZİ.....4
2.2.1.1. LEZYONUN BAŞLANĞICI…….……....6
2.2.1.2. İNFLAMASYON…….....7
2.2.1.3. KÖPÜK HÜCRE OLUŞUMU.....8
2.2.1.4. FİBRÖZ PLAKLARIN GELİŞMESİ……..……..……..9
2.2.1.5. İLERLEMİŞ LEZYON……...……...…….....10
2.2.1.6. KORONER ARTER HASTALIĞI IÇIN RISK FAKTÖRLERI…….....11
2.3. ATEROSKLEROZDA DNA HASARININ ROLÜ……12
2.4. OKSIDATIF STRESS VE DNA HASARI…….……....14
2.5. DNA MUTASYONU VE DNA ONARIM MEKANİZMASI……15
2.5.1. DIREKT TAMIR MEKANIZMASI…….....16
2.5.1.1. BASIT TEK ZINCIR KIRIKLARIN LIGASYONU……16
2.5.1.2. FOTOREAKTIVASYON ……...…….17

2.5.1.3.O6-METILGUANIN TAMIRI …….……17

2.5.2. KESIP ÇIKARMA TAMIRLERI-EKZISYON……..……..18

2.5.2.1. BAZ EKZISYON TAMIRI BER…….……..19

2.5.2.2. NÜKLEOTID EKZISYON TAMIRI NER……...……20

2.5.2.3. MISTMACH TAMIR MEKANIZMASI(DNA YANLIŞ EŞLEŞME EKZISYON ONARIMI…….……..23

2.5.3. DNA ÇIFT ÇIFT ZINCIR KIRIKLARININ ONARIMI……..24

2.5.3.1. HOMOLOG REKOMBINASYONU HR…….……25

2.5.3.2. HOMOLOG OLMAYAN UÇ BIRLEŞTIRME NHEJ…….....25

2.5.4. SOS TAMIRI……26

2.5.5. TRANSLESİON SENTEZİ TLS (DNA HASAR TOLERANSI)……26

2.6. PARP1 GENI VE PROTEINI……..28

2.7. BRCA1 GENI VE PROTEINI…….29

2.8.RNA INIFLANDIRILMASI…….30

2.8.1. KODLAYAN MIRNA……..30

2.8.2. KODLAMAYAN RNA…….30

2.8.2.1. SIRNA……31

2.8.2.2. PIRNA…….....31

2.8.2.3. MIRNA……...31

2.8.2.3.1. MİR21-5P……33

2.8.2.3.2. MİR193B-3P……...34

2.8.2.3.3. MİR484……...…….....35

3. GEREÇ VE YÖNTEM……36

4. BULGULAR...……45

5. TARTIŞMA…….53

KAYNAKLAR……58

FORMLAR……..67

ETİK KURUL KARARI……72

PATENT HAKKI İZNİ ……...**HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI……..73

ÖZGEÇMİŞ……74

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 0-1:cDNA sentezi için gerekli olan karışımın içeriği buz üzerinde hazırlandı (1 reaksiyon için)……...37

Tablo 0-2:Reaksiyon döngüleri……...….38

Tablo 0-3:ACTB prob ve primerlerinin özellikleri……..38

Tablo 0-4:BRCA1 prob ve primerlerinin özellikleri……....39

Tablo 0-5:PARP1 prob ve primerlerinin özellikleri…….39

Tablo 0-6:qPCR'ın sıcaklık döngüsü……...39

Tablo 0-7:cDNA sentezi için gerekli olan karışımın içeriği buz üzeinde hazırlandı (1 reaksiyon için)……..42

Tablo 0-8:Reaksiyon döngüleri……....42

Tablo 0-9:miRNA primerlerin özellikleri……...….43

Tablo 0-10:Hasta ve kontrol grunbunun verileri……..45

Tablo 0-11: Hasta ve kontrol grubunun gen ifadeleri…….46

Tablo 0-12:BRCA1 geninin hasta ve kontroldeki ifade değerleri……47

Tablo 0-13:PARP1 geninin hasta ve kontroldeki ifade değerleri……47

Tablo 0-14:miR-21-5p geninin hasta ve kontroldeki ifade değerleri……47

Tablo 0-15:miR-193b-3p geninin hasta ve kontroldeki ifade değerleri……47

Tablo 0-16:miR-484 geninin hasta ve kontroldeki ifade değerleri……48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 0-1:Normal arterin yapısı (Doc. PharmDr. Petr Nachtigal et al., 2012)……...5

Şekil 0-2:Endotel tabakadan monositlerin subendotele geçiş (Cell 2001; 104:503-16)…….…7

Şekil 0-3:Makrofajların köpük hücreye dönüşümü (Glass CK. Cell 2001)……..…8

Şekil 0-4:Damar duvarında lezyon birikimi (Dr. Jürgen Bausch et al., 2016)……...9

Şekil 0-5:Damar duvarında stabil olmayan ve stabil plak görünümü (Y. Wang, Michael T. et al., 2018)……..……11

Şekil 0-6:DNA hasarı Apoptoz aktivasyonu (John Mercer et al., 2011)..…….....13

Şekil 0-7:Çentiğin DNA ligaz enzimi tarafından tamir edilmesi (Brown,2002)…….16

Şekil 0-8:Fotoliyaz timin dimerleri arasındakı bağları kırıyor (Prof.Dr.Şevket Ruacan, 2016)

……..…….17

Şekil 0-9:O-6 metilguanin onarımı (Glenn N. Major et al., 1998)……..18

Şekil 0-10:Nukleotid tamir mekanizması (Jeppesen, 2011)...……..…….....19

Şekil 0-11:BER mekanizması Urasil DNA glikozilaz, AP endonukleaz, DNA pol ve ligaz yardımı ile yapılan baz kesip-çıkarma. Urasil komplementer olmayan baz olarak bilinir, kesilerek yerine komplementer olan C getirilir (Aline Baldwin, 2016).....…….....20

Şekil 0-12:NER onarım mekanizması (Aline Baldwin, 2016)...……21

Şekil 0-13:GG-NER (Genomik-NER) ve TC-NER (Transkripsiyon ilişkili-NER) onarımı (Jeppesen, 2011)……..……...……...23

Şekil 0-14:Homolog rekombinasyon (Balikesir Saglik Bil Derg Cilt:4 Sayı:3 Aralık 2015).....25

Şekil 0-15:PARP1 protein yapisi (https://www.genecards.org/ web sayfasından modifiye edilmiştir)…….……..…...……27

Şekil 0-16:BRCA1 gen lokalizasyonu (https://www.genecards.org/ web sayfasından modifiye edilmiştir)……..……27

Şekil 0-17:BRCA1 proteini (https://en.wikipedia.org/wiki/BRCA1 web sayfasından modifiye edilmiştir).....…….…….....28

Şekil 0-18:RNA klassifikasyonu (https://www.researchgate.net web sayfasından modifiye edilmiştir)…….……...29

Şekil 0-19:miRNA biyogenezi (S.Wist, 2017)….……..……..31

Şekil 0-20: Hasta BRCA1 ve miR-484 gen ifade düzeyi karşılaştırılması……49

Şekil 0-21: Hasta PARP1 ve miR-21-5p genifade düzeyi karşılaştırılması…….49

Şekil 0-22: Hasta PARP1 ve miR-193b-3p gen ifade düzeyi karşılaştırılması……....50

Şekil 0-23: Kontrol BRCA1 ve miR-484 gen ifade düzeyi karşılaştırılması……51
Şekil 0-24: Kontrol PARP1 ve miR-21-5p gen ifade düzeyi karşılaştırılması…….....51
Şekil 0-25: Kontrol PARP1 ve miR-193b-3p gen ifade düzeyi karşılaştırılması…….52

.

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KAH	Koroner arter hastalığı
ROS	Reaktif oksijen türleri
AP	Apürinik/apirimidinik
APE1	AP endonükleaz 1
NO	Nitrik oksid
EH	Endotel hücre
ADKH	Arteryal düz kas hücreleri
BER	Baz kesip çıkarma tamiri
NER	Nükleotid kesip çıkarma tamiri
HNEJ	Homolog olmayan uç birleştirme
PARP1	Poly (ADP-riboz) polimeraz 1
BRCA1	Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini
LDL	Düşük dansiteli lipoproteinler
CRP	C-reaktif protein
PBS	Fosfat tuz tamponu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PCR	Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
OS	Oksidatif stres

ÖZET

Malikova, M. (2020). Koroner Arter Hastalarında DNA Hasar Tamir Sürecinde Rol Oynayan Moleküllerin ve İlişkin Mikro RNA'ların Ekspresyonlarının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Aterosklerozun kalbi besleyen damarlarda görülmesi duruma, koroner arter hastalığı (KAH) denir; kalbi besleyen damarların duvarında kolesterol birikimi ile gelişen ve oluşan plağın kan akışını engellediği patolojik bir durumdur. Multifaktoriyel bir hastalık olup, etyolojisinde hem genetik hem çevresel faktörler rol oynamaktadır. Genetik faktörler, DNA hasarın büyüklüğünü belirlenmesinde rol oynayan faktörler arasında yer almaktadır, dolayısı ile KAH'lığının patogenezinde belirleyici faktörlerden biri olabilir. Mikro RNA'lar küçük, kodlanmayan, genlerin ifadesini post-transkripsiyonel düzeyde değişebilen RNA'lar olup, birçok patolojik süreçte rol oynadıkları gösterilmiştir. PARP1 ve BRCA1, DNA tamirinde rol oynayan önemli proteinlerdir. PARP1'in ifadesi miR-21-5p ve miR-193b-3p ve BRCA1'in ifadesi ise miR-484 ile düzenlenebilmektedir. Çalışmamızda, bu moleküllerin gen ifade durumları ve birbiri ile olan ilişkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda çalışmamız, anjiografi ile KAH tanısı alan 50 hasta ve 50 sağlıklı kontrolde gerçekleştirildi.

Çalışmamızda, PARP1, BRCA1, miR-21-5p, miR-193b-3p ve miR-484 genlerinin ifade düzeyleri açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Hasta grubunda, BRCA1 ile miR-484 (r=0,56; p=0,000023), PARP1 ile miR-21-5p (r=0,66;p=0,0001), PARP1 ile miR-193b-3p (r=0,66; p=0,0001), kontrol grubunda ise PARP1 ile miR-21-5p (r=0,47109; p=0,00055) ve PARP1 ile miR-193b-3p (r=0,403; p=0,00371) arasında gen ifade düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptandı.

Çalışmamızın sonuçlarının bu alanda yapılacak çalışmalara temel oluşturacağını umut etmekteyiz.

Anahtar Kelimeler : KAH, DNA hasarı, miRNA, BRCA1,PARP1.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-31550

ABSTRACT

Narmina, M. (2020). Investigation of Expression of Molecules and Related Micro RNAs Playing a Role in DNA Damage Repair Process in Coronary Artery Patients. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology. Master Thesis. İstanbul.

When atherosclerosis is seen in the vessels feeding the heart, it is called coronary artery disease (CAD); It is a pathological condition that develops with the accumulation of cholesterol in the wall of the vessels that feed the heart and prevents the blood flow. It is a multifactorial disease and both genetic and environmental factors play a role in its etiology. Genetic factors are among the factors that play a role in determining the magnitude of DNA damage, so it may be one of the determining factors in the pathogenesis of CAD. Micro RNAs are small, non-coding RNAs that can change the expression of genes at post transcriptional level, and they have been shown to play a role in many pathological processes. PARP1 and BRCA1 are important proteins involved in DNA repair. Expression of PARP1 can be regulated by miR-21-5p and miR-193b-3p and BRCA1 by miR-484. In our study, it is aimed to examine the gene expression states of these molecules and their relationships with each other. Accordingly, our study was carried out in 50 patients diagnosed with CAD by angiography and 50 healthy controls.

In our study, no statistically significant difference was found between the patient and control groups in terms of expression levels of the PARP1, BRCA1, miR-21-5p, miR-193b-3p and miR-484 genes. In the patient group, BRCA1 with miR-484 ($r = 0.56$; $p = 0.000023$), PARP1 with miR 21-5p ($r = 0.66$; $p = 0.0001$, PARP1 with miR-193b-3p ($r = 0$). , 66; $p = 0.0001$), in the control group PARP1 with miR-21-5p ($r = 0.47109$; $p = 0.00055$) and PARP1 with miR-193b-3p ($r = 0.403$; $p = 0.00371$) in terms of gene expression levels of a statistically significant positive correlation was found.

We hope that the results of our study will form the basis for further studies in this area.

Key words: CAD, DNA damage, miRNA, BRCA1,PARP1.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: TYL-2018-31550

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner arter hastalığı (KAH) koroner arterlerin ateroskleroz nedeniyle daralması veya tıkanması sonucunda gelişin hastalıktır. KAH, üzerinde en çok çalışılan ve tedavisindeki gelişmelere rağmen dünyada halen en ölümcül hastalıklar grubuna girmektedir. Hastalığın patogenezinde DNA hasarlarının rol oynadığı bilinmektedir. Genellikle bu hasarlar tek baz mutasyonları, zincir kırıkları baz eksilmeleri veya baz modifikasyonları şeklindedir. KAH'nda DNA hasarları, kandaki bazı hücrelerde görülmektedir (Mahmoudi M ve ark.).

Ultraviyole (UV), iyonize radyasyon, endojen metabolizma sonucu oluşan reaktif oksijen türleri (ROT) gibi içsel ve dışsal ajanlara maruz kalan DNA'da oluşan hasarlar, DNA tamir mekanizmaları ile tamir edilir (V. Schreiber, F., Hall J, Marcel V. Ve ark.). Genomik bütünlüğün sürdürülmesinde DNA tamir mekanizmalarının rolu çok önemlidir. Memeli hücrelerinde, farklı DNA hasarlarının (çift zincir kırıkları, depürinasyon, aprimidinik bölgeler ve oksidatif hasarlar) tamiri için farklı DNA tamir mekanizmaları mevcuttur. DNA hasar tamir mekanizmaları; çift zincir kırık tamiri, baz kesip çıkarma tamiri (BER), nükleotid kesip çıkarma tamiri (NER) ve yanlış eşleşme tamiri gibi DNA tamir mekanizmaları mevcuttur (Bartek J. ve ark.).

Çift zincir DNA kırıkları yapısal değişikliklere ve genetik bütünlüğün bozulmasına sebep olan kromozomal kırıklardır. Bu nedenle DNA çift zincir kırıklarının tamiri önemlidir (Jeppesen DK., Slupphaug G. Ve ark.). DNA çift zincir kırıklarının tamir mekanizmalardan biri homolog rekombinasyon tamir mekanizmasıdır. Homolog rekombinasyon tamir sisteminin hata oranı çok düşüktür. Tamir mekanizmasında rol oynayan proteinlerin birbiri ile iletişime geçmesi çok önemlidir. RAD52, RAD51 proteinleri homolog kormozomu kullanarak DNA sentezini yaparlar. RAD51 proteini tamir süreci içinde, BRCA1 ve PARP1 gibi proteinler ile kompleks oluşturur. (Pierce AJ. Ve ark.). PARP1 geni insan kromozomunda 1q42'de haritalanmıştır. PARP1 nükleer bir enzimdir ve DNA hasarına cevap olarak hedef proteinlerinden biri olan BRCA1'in poly ADP-ribozilasyonunu katalize etmektedir (Herceg Z. ve ark.).

BRCA1 geni, 17. kromozomun 17q21 bölgesinde lokalizedir (Niwa, Y. ve ark.). DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrolü, protein ubikitinasyonu ve kromatin

oluşumunda görev alan multifonksiyonel bir proteini kodlar (Matros, E. ve ark.). Birçok fonksiyonla ilişkili olan BRCA1 geni tarafından kodlanan proteinlerden biri, çift iplikli DNA hasarının homolog rekombinasyon ile tamiri ve kromatinin yeniden şekillenmesinde rol oynayan E3 Ubiquitin ligazıdır.

Yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan kısa RNA dizileri olan mikroRNA (miRNA)'lar, çoğalma, farklılaşma, hücre döngüsü ve apoptoz gibi pek çok önemli hücresel olayda görev almaktadırlar (Mahn R. ve ark.). Özgül hedefleri olan mesajcı RNA'lara (mRNA) bağlanıp, mRNA'ların okunmalarını engelleyerek, gen ifadesinin transkripsiyon sonrasında kontrol edilmesini sağlamaktadırlar (. Bartel DP. Ve ark.).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda; KAH teşhisi konulmuş hastaların kan örneklerinde ve sağlıklı kontrollerde, DNA hasar onarım mekanizmasında görev alan moleküller olan BRCA1 ve PARP1 moleküllerinin ve bu moleküllerin gen ifadelerinin düzenlenmesinde rol oynayan mikro RNA'ların (miR-21-5p, miR-193b-3p ve miR-484) gen ifade düzeyini incelemeyi amaçlamaktayız. Türk popülasyonunda KAH, DNA onarım molekülleri ve bu molekülleri ile ilişkili mikro RNA'ları inceleyen bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda KAH'lığının patogenezinde, DNA onarım yolağı ile ilişkili sürece ışık tutmayı amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz bir damar hastalığıdır; arter damar duvarının kalınlaşması ve elastikiyetini kaybettiği hastalık olarak tanımlamaktadır. Yavaş ve gizli ilerleyen, organizmada atardamar olan her yerde, büyük ve orta çaplı damarlarda oluşan kronik bir hastalıktır. Kan dolaşımı fazla olan organlarda daha sık görülmektedir. Aterosklerozaki değişiklikler, temelde endotel hücre fonksiyon kaybı, vasküler düz kas hücre deformasyonu, modifiye olmuş lipoproteinler, monosit ve T lenfositlerin de devreye girmesi sonucu damar duvarında köpük hücre denilen komplekslerin oluşmasıdır. Epidemiyolojik çalışmalar aterosklerozun, genetik ve çevresel faktörler, cinsiyet, yaş, dislipidemi, hipertansiyon, diyabet, obezite, sigara, alkol, aile hikayesi ile ilişkisi olan multifaktoryel hastalık olduğunu ispatlamıştır. Hastalığın karmaşık etyolojisi hastalığın hücresel ve moleküler etkileşimlerinin tanımlanmasındaki en büyük engeldir. Bununla birlikte, genetiği değiştirilmiş fare modelleri ile yapılan çalışmalar, kolesterol metobalizma değişimine yada damarlarda plak oluşumuna neden olan moleküler mekanizmaların daha net anlaşılmasını sağlamıştır. Aterosklerozun, aslında yaşlanma sürecinde gelişen dejeneratif bir hastalık olmadığı, daha ziyade tromboz ve plak rüptürü ile inflamatuvar durumun sonucu ortaya çıktığı açıktır.

Ateroskleroz beyin, böbrek, kalp gibi kan dolaşımı fazla olan organlarda daha sık görülür ve bulguları daha şiddetli ortaya çıkar. Beyni besleyen serebral dolaşımda aterosklerozun görülmesi beyinde geçici iskemik ataklara, yada daha ağır beyin infaktüsü ve felç gibi kalıcı hasarlara sebep olur.

Aterosklerozun kalbi besleyen damarlarda görülmesi ise KAH olarak bilinir. Aterosklerotik plaklar nedeniyle, kalp damarlarının tıkanması sonucu akut miyokart infarktus (MI), aritmi, kronik miyokart iskemisi gibi durumlar ortaya çıkar.

2.2. Koroner Arter Hastalığı

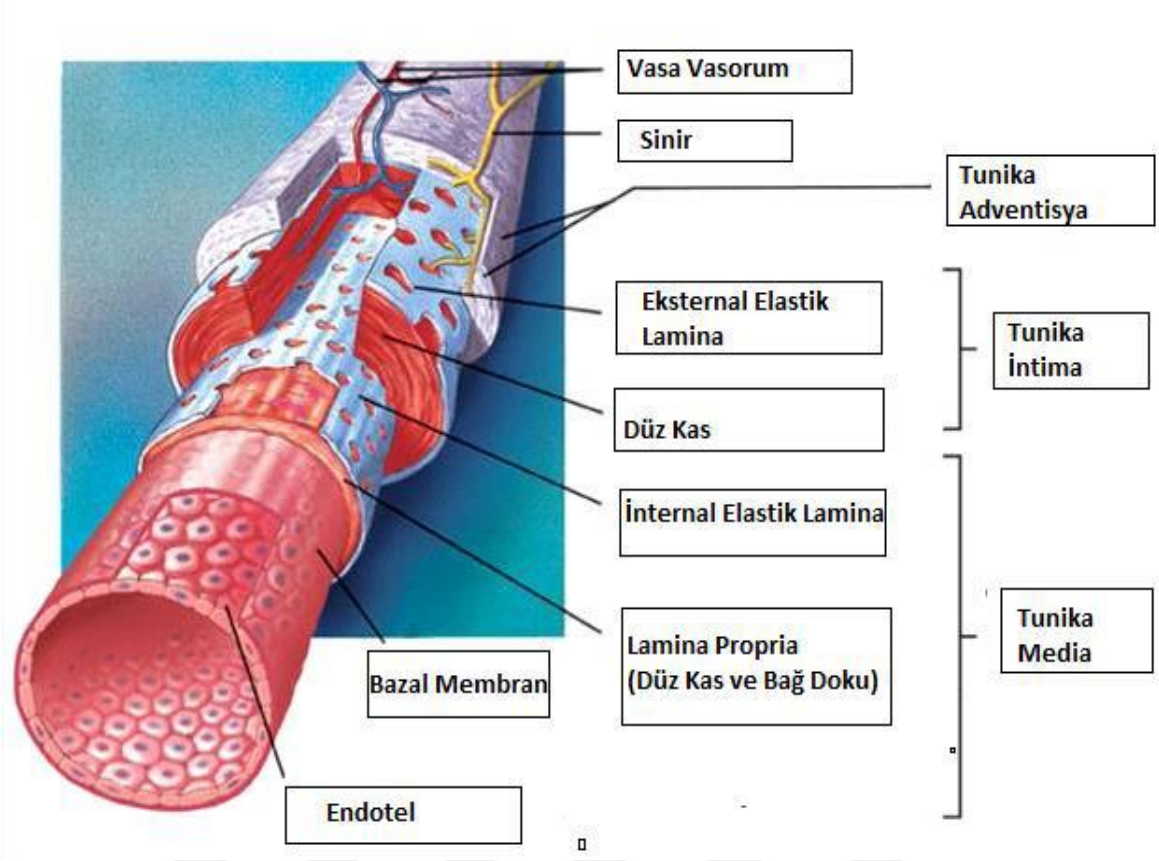
KAH gelişmiş ülkelerine en yaygın sağlık sorunlarından biridir. 2015 yılı verilerine göre 17 milyon insanın KAH'dan hayatını kaybettiği ve 3 milyonu 60 yaş altı kişilerdir. Türkiye'de 2015 yılı için beş milyondan fazla KAH olduğu rapor edilmiştir. KAH, kalbi oksijen ile besleyen kalp damarlarının deformasyonu ve

daralmasına sebep olan, kalp infarktüsüne kadar götüren kompleks kronik enflamatuvar bir hastalıktır. Kalp devamlı olarak tüm vücuda kan pompalar. Bu işlevini yerine getirmek için kendisinin de oksijenle zengin kana ihtiyacı vardır. Kalbi besleyen damarlar aorttan çıkan dallar olup, koroner arter ismini almaktadır. Sağ ve sol dallara ayrılarak bütün kalbi beslemektedir. Farklı nedenlerden dolayı koroner arterlerin duvarında plak oluşması, dokulara yeteri kadar oksijen taşınamamasına sebep olur. Kalbin sağ ve sol kalp arterlerinde genel olarak ateroskerozun neden olduğu bu patolojik durum KAH ortaya çıkar.

2.2.1. KAH Patogenezi

Ateroskleroz gelişimi, lökositler, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinin önemli rol aldığı karmaşık bir süreçtir (Enar, 2006). Aterosklerozun patogenezini anlamak için ilk olarak normal arterin yapısını özellikle ateroskleroz patogenezde yer alan ve etkilenen hücre tiplerinin yapısının bilinmesi gerekir. Arterler üç katmandan oluşur; Tunika Adventisya, Tunika Media ve Tunika intima

Tunika Adventisiya, tunika intima ile kıyaslamada daha gevşek kollajen içeren katmandır. Adventisiya tabakası yoğun fibroelastik dokusuyla damarın dış bütünlüğünü sağlar. Adventisyadaki hücreler daha aralıklıdır. Serpiştirilmiş fibroblast ve düz kas hücreleri ile bağ dokusundan oluşmuştur (Libby, 2015). Tunika Media, damarın dışından içine doğru giderken, ikici katmandır. Arter ve venlerin kaslı orta tabakasıdır. Katmanın kas içeriği, arterlerin besledikleri dokuların ve organların ihtiyaç duyduğu kan hacmini ayarlamak için daralmasını ve genişlemesini sağlar. Tunika media katmanındaki düz kas hücreleri uyarıldığı zaman, arter duvarlarının kasılmasını sağlar ve damar daralır. Kas duvarının kasılması sonucu daralmasına vazokonstriksiyon denir. Arterler daraldığında kan akışı azalır ve damar içi basınç artar. Vazokonstriksiyon, vücudunuzun vücut ısısı ve kan basıncı gibi vücuttaki önemli işlevleri düzenlemek için kullandığı bir mekanizmadır. Tunica intima arterlerin ve damarların en iç tabakasıdır. Tunica intima, ince bir endotel hücre katmanından oluşur. Tüm arterlerin, venlerin, kapilerlerin iç yüzeyini kaplar ve aterosklerozun başladığı yerdir. Kılcal damarlar tek kat hücrelerden yani sadece endotelyal hücre katmanından oluşur. Kapilerler damarlar, arter ve venlerden farklı olarak sadece bir tunika intima tabakasına sahiptir.



Şekil 2-1:Normal arterin yapisi. (Doc. PharmDr. Petr Nachtigal et al., 2012)

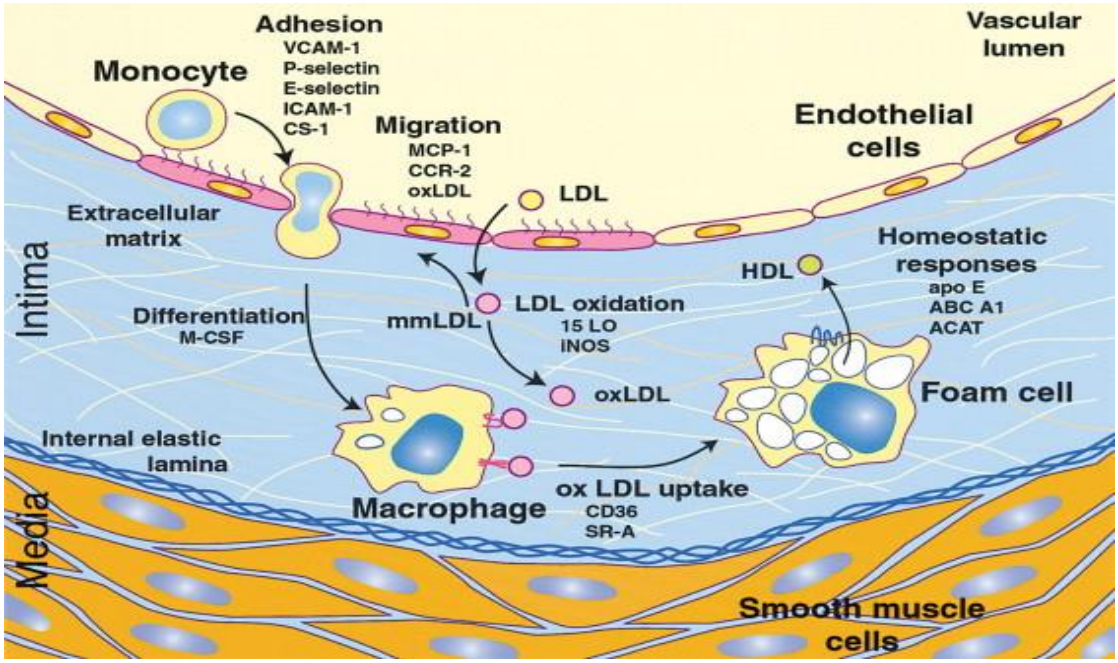
Endotel hücreler (EH), damar kasılmasını ve gevşemesini sağlayan maddelerle vasküler tonusu korur. Vasküler düz kas hücrelerin gevşeme ve kasılmasından sorumlu olduğu bilinse de, endotel hücreler tarafından salgılanan nitrik oksidin (NO), vasküler tonusun dengede tutulmasına yardımcı olduğu bilinmektedir. Ayrıca platelet aktive edici faktör (PAF) ve endotelin (ET) salgılayarakta, kan akımı ve kan basıncını kontrolde tutar. EH'lerin yüzeyindeki glikozaminoglikanlar ve glikoproteinler EH'sine negatif yük kazandırdığından sürekli hücresel ve hormonal moleküllerle etkileşim halindedir. Bu sebepten çok sayıda reseptör taşır. Endotel hücrelerinin en önemli fonksiyonu bariyer görevidir. Damar geçirgenliği, damar tipine ve yerine göre değişmektedir. Molekül ağırlığı düşük olan hidrofilik ve lipofilik moleküller kan ve doku arasında engelsiz haraket ederken, makromoleküller için seçici geçirgenlik söz konusudur. Aynı zamanda endotel tabaka kendi yüzeyine proteinler salgılayarak, koagulasyon aktivasyonunun ve trombosit agregasyonunun inhibisyonunu ve fibrinolizis fonksiyonlarını

sağlayarak, pıhtılaşmayı önleyici yüzey oluşturur ve sorunsuz kan akımı sağlanır. Bu da EH ikinci önemli fonksiyonudur. Hiperglisemi, tansiyon, sigara, obezite gibi risk faktörleri EH fonksiyon bozukluğuna sebep olur ki, bu durum aterosklerozun önde gelen sebebidir (Verma ve Anderson, 2002; Yaylalı ve Küçükaslan, 2011).

Arteryal düz kas hücreleri (ADKH)'nin kasılması ve gevşemesi sonucu damarlarda kan akışı sağlanır. Aterosklerozun ileri safhalarında etkilenen ADKH'lerinin fonsksiyon bozukluğu anormal kasılmalara sebep olduğundan kan akışı bozulur.

2.2.1.1. Lezyonun başlangıcı

Endotel normalde kaygan parlak tabaka halindeyken, deformasyon geliştiğinde bütünlüğü bozulur ve yapışkan hale gelir. Endotel hücreleri fonksiyon bozukluğunda NO salgılayamaz. NO vasküler hasar, infamasyon ve trombozise karşı koruyucu özelliğe sahiptir. Endotel hücrelerinin bütünlüğünün bozulması için ilk etapda endotel tabakayı irrite eden faktörler olmalıdır. Bunlar arasında ilk başta gelen faktörlerden biri kan dolaşımın dakı fazla yağ, kolesterol, trigliserittir. Bu faktörlere, genetic ve epigenetik faktörlerde eklendiğinde endotel fonksiyonu bozulur ve aterosklerozun gelişimi başlar. Hasar bölgesine gelen T hücreleri, monositler ve LDL kolesterol, bariyer yeteneğini kaybetmiş endotelden damar duvarına girer. Damar duvarına geçen kolesterol, lokal ROS ve enzimlerle okside olmaya başlar. oxLDL toksik etkilidir ve enflamatuar süreci başlatır. Enflamatuar süreç başlaması ile kanda C-reaktif protein (CRP) yükselir.



Şekil 2-2:Endotel tabakadan monositlerin subendotele geçişi. (Cell 2001; 104:503-16)

2.2.1.2. İnflamasyon

Enflamatuar süreç, subendotele geçmiş minimal oxLDL'nin fosfolipit salarak endoteli aktive etmesi ile başlar. Aktive olan endotel hücreleri, sitokinler (M-CSF, GM-CSF), büyüme faktörleri (PDGF, βFGF, TGF-β, IL-1, TNF α) ve adezyon molekülleri (VCAM-1, ICAM) salar. oxLDL'ye tepki olarak, kan dolaşımındakı monositler ve T hücreleri intimaya göç eder. Endotele bağlanan monositler özel kemoatraktan proteine (MCP-1) bağlanır. MCP-1 genlerinin susturulmasının, apoE -/- veya apoB aşırı eksprese eden farelerde ateroskleroz gelişimini önemli ölçüde azaltığı bildirilmiştir (Boring et al. 1998, Gu et al. 1998, Gosling et al. 1999). T hücreleri ise G-IP-10, MIG gibi moleküllerin yardımı ile 'diapedez' denilen mekanizma ile subendotelyala geçerek, orada birikir. Burada, T hücreleri sitokin ve kemokin salgılayarak enflamatuar yanıtı düzenler. Makrofajların ve endotel hücrelerin salgıladığı büyüme faktörleri ve diger enflamatuar moleküller ile birlikte arter duvarındaki hasar giderek artar.

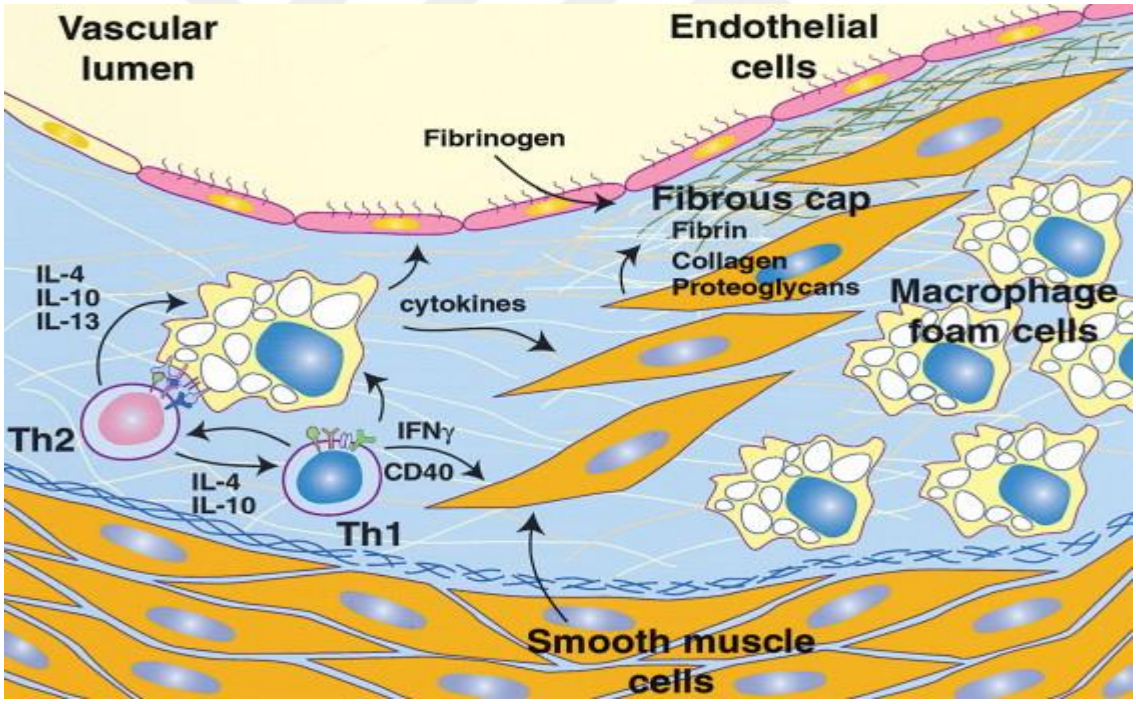
2.2.1.3. Köpük Hücre Oluşumu

Subendotelyal bölgeye toplanan monositler, makrofajlara dönüşerek scavenger (çöpçü) reseptörlerini eksprese etmeye başlar (Yamada et al., 1998).

Tümör nekroz faktör-α (TNF-α) ve interferon-γ (IFN-γ) gibi sitokinler bu reseptörlerin eskpresyonunu uyarır (Tontonoz ve ark.,1998). Scavenger reseptörler sayesinde oxLDL'yi tanıyan makrofajlar, lipoproteinleri yutmaya başlar ve "köpük hücrelere" dönüşürler. Bununla birlikte minimal oxLDL'nin (minimal modofication/mmLDL) reseptörler tarafından tanınması için LDL'nin yeteri kadar oksitlenmiş olması gerekir. İntimaya göç eden T hücreleri köpük hücreler tarafından yutulur. Bu köpük hücreler yağlı çizgilenmeyi oluştururlar. yağlı çizgilenme aterosklerotik hasarın ilk gözle görülen bulgusudur.

Patologlar, plakların morfolojisini; yağlı çizgilenme, fibröz plaklar ve komplike plaklar olarak tanımlamaktadırlar. Arter duvarındaki yağlı çizgilenme kan akımını engellemez ve lümene dogru çıkıntı yapmaz.

Köpük hücreler lipitleri yutmaya devam ederken, aynı zamanda büyüme faktörlerini ve enflamatuvar bileşenleri (interlökin-1 ve TNF-α'yı) salgılarlar.

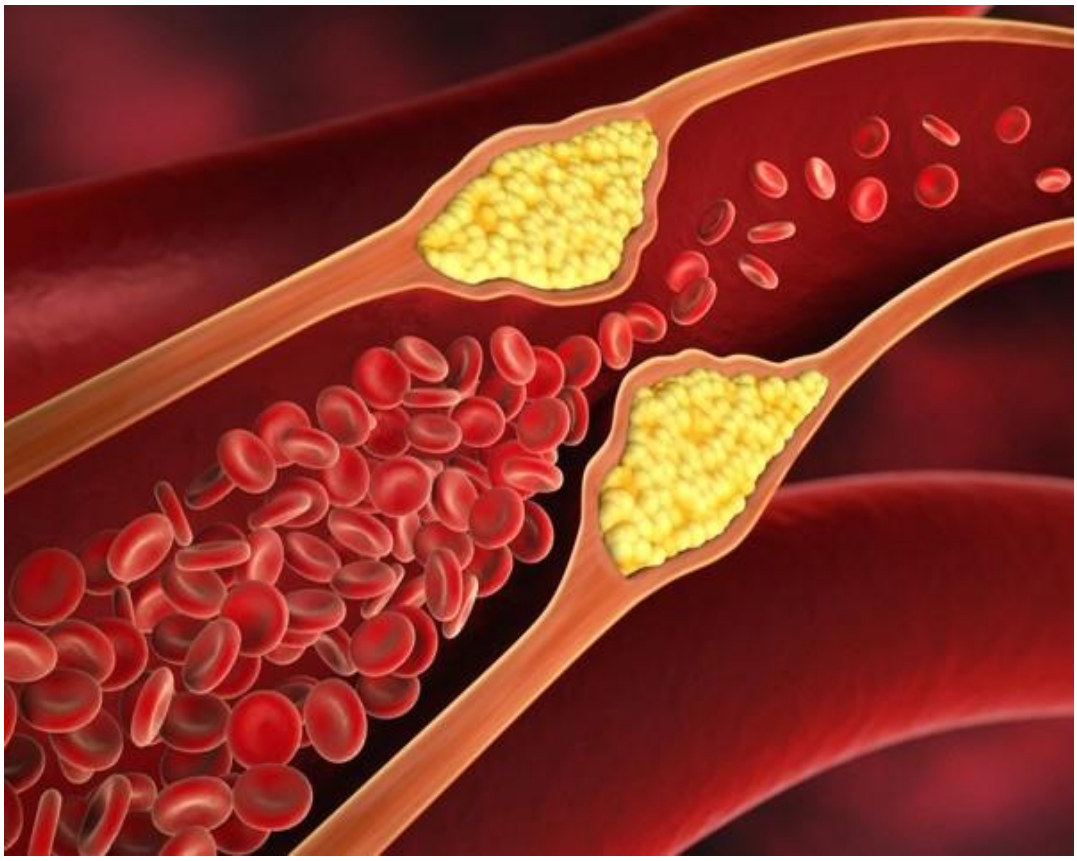


Şekil 2-3:Makrofajların köpük hücreye dönüşümü. (Glass CK. Cell 2001)

2.2.1.4. Fibröz Plakların gelişmesi

Kan dolaşımındaki trombositler hasarlı bölgeye geçer. Köpük hücrelerin, endotelyal hücrelerin ve trombositlerin salgıladığı büyüme faktörleri, düz kas hücrelerin mediadan intimaya göç etmesine sebep olur. Ortamda bulunan kolesterol

esterler miktarına göre, köpük hücreleri patlamaya ve lipit havuzu oluşturmaya eğilimlidir. Bu lipit havuzu ‘’aterom’’ olarak isimlendirilir. DKH, kollajen üreterek ateromu lümenden ayıran fibröz bir kapsül ile kaplar. (Ross 1999, Steinberg and Witztum 1999, Paulsson et al. 2000). Fibröz plak yada kapsüldeki lipitler hem serbest olarak ekstraselüler matrikste hem de köpük hücreleri içerisinde bulunur. Lümene doğru taşmaktadırlar. Fibroz kapsül, trombotik lezyonlar içerir ve yırtılma tehlikesi vardır. Koroner aterosklerotik morbidite ve mortalite bu lezyonlara bağlıdır. Makrofajlar ve endotel hücreleri tarafından salınan büyüme faktörlerinin etkisiyle, DKH fibröz kapsülün giderek kalınlaşmasına sebep olur (Libby ve Theroux, 2005).



Şekil 2-4:Damar duvarında lezyon birikimi. (Dr. Jürgen Bausch et al., 2016)

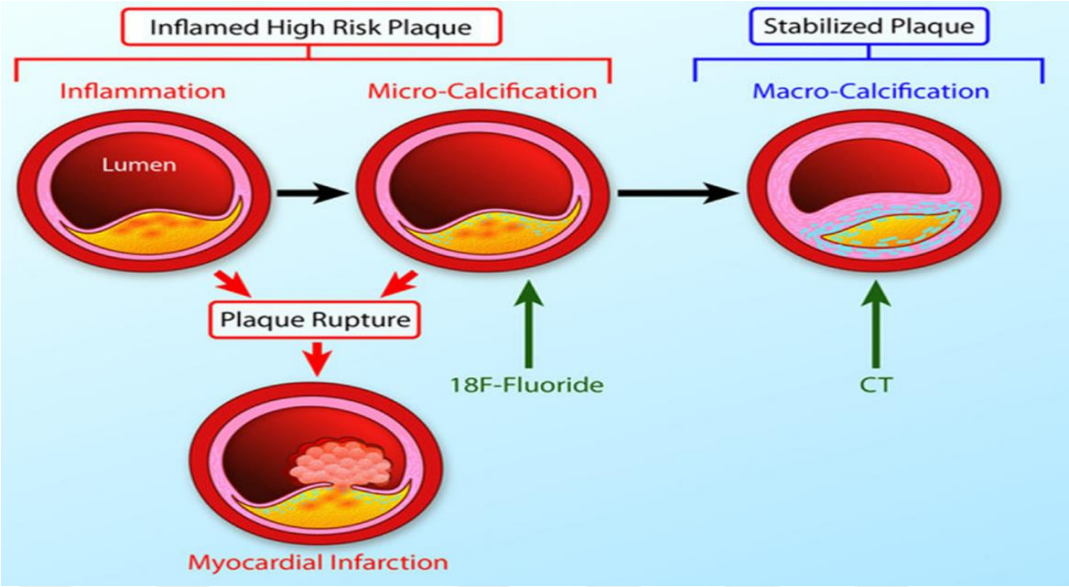
2.2.1.5. İlerlemiş Lezyonlar

LDL ile zenginleşen ve stabil olmayan veya kararsız plak hilal şeklindedir. Aterom büyüdükçe fibröz kapsül incelir ve rüptüre eğilimli hale gelir. Stabil plak ise yuvarlak olup kapsülü kalındır. Kararsız veya stabil olmayan plağın periferinde toplanan makrofajlar, enzimler ve toksik lipit oksidayson ürünleri ile fibroz kapsülün aşınmasına sebep olur ki, bu da rüptür riskini artirir. Mekanik veya

hemodinamik stresler, arterin ani spazmınasebep olur ki, bu da plak rüptürü oluşturabilir. Sonuç, stabil olmayan anjina, miyokart enfarktüsüdür.

Plakta rüptür oluşumunun iki sonucu vardır. İlkinde ateromdaki LDL'ler, lümene doğru taşar ve kan elementleri ile karışarak pıhtı oluşturur. Pıhtının oluşmasında koagülasyon ajanı olan fibrin, trombüs oluşturur ve arter lümeninin bir kısmını tıkar. Kontrolsuz kalan trombüse fibrin, trombosit ve eritrositler yapışır. Bu tip trombüs, kan akımını ciddi şekilde engellediğinden kalbe oksijen taşınması durur. Sonuç, anstabil anjinadır. Bu süreç 15 dakikadan fazla sürerse nekroz doku oluşumu ile sonuçlanır. İkinci sonuç ise, rüptüre uğramış plakdaki trombüs lezyona katılır ve üzeri EH'ler ile kaplanır. Bu tür plaklar kan akışını kısmen engellemektedir.

Bazı durumlarda aterom lümene doğru çıkıntı yapsada, kapsülünün ve çekirdeğinin fibroz hücreleri fazla miktarda bulunur. Bu tip hastalarda klinik semptomlar görülmez. Diğer yandan, lümene doğru büyüyerek rüptür olmayan plaklar ise kalbe giden oksijeni engelleyerek stabil anjinaya neden olur. Bu durum, dinlenince geçen gögüs ağrısına sebep olur. Stabil aterosklerotik plaklar uzun süre mevcudiyetini korursa, kalsifikasyon oluşur. İntimal kalsifikasyon, perisit benzeri hücrelerin matriks yapısı salgıladığı ve daha sonra kireç haline dönüştüğü aktif bir işlemdir ve kemik oluşumuna benzer. Bu işlem oksisteroller ve sitokinler tarafından düzenlenir (Moultan ve Folkman, 1999). Kalsifikasyon sonucu damar duvarı tamamen bloke olur.



Şekil 2-5:Damar duvarında stabil olmayan ve stabil plak görünümü. (Y. Wang, Michael T. et al., 2018)

Son yıllarda yapılan çalışmalar, KAH'lığının genetik ve epigenetik faktörlerin etkisi ile ortaya çıkan multifaktöryel bir hastalık olduğunu ortaya koymaktadır. Hastalığın patogenezi ile ilgili bazı hipotezler ileri sürülmüştür. "Hasara yanıt " hipotezi bu hipotezlerden biridir. Kronik ve tekrarlanan endotel hasarının mevcudiyeti, bu hipotezi desteklemektedir. Sigara, beslenme, stress, diyabet gibi farklı etkenler tarafından dolaşıma salınan endotoksinler ve ROS, DNA'da hasar oluşturmaktadır.

2.2.1.6. Ateroskleroz için risk faktörleri

Düzeltilebilir risk faktörleri; Sigara kullanımı, hipertansiyon, yüksek kolesterol düzeyleri, fiziksel aktivite azlığı, alkol tüketimi ve stres;

Düzeltilemeyen risk faktörleri; İleri yaş, erkek cinsiyeti, diyabet ve ailede 55 yaşından önce KAH öyküsünün olmasıdır.

Sigara kullanımı

Sigara kullanımı, ateroskleroz gibi kalp haslalıkları riskini artırır. Sigara kullanımının, artmış vasküler inflamasyon ve NADPH oksidaz ekspresyonu ile aterosklerozu tetiklediği bildirilmektedir. Son çalışmalar, KAH ile ilişkileri tespit

edilmiş miRNA seviyelerinide etkilediğini göstermiştir. Bununla beraber, sigara içenlerde miRNA ifade seviyesi üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır.

Yaş

KAH, genellikle 40 yaş sonrası ortaya çıkmaktadır. Aile hikayesi olan bireylerde daha erken yaşlarda da görülebilmektedir. KAH tanısı sıklıkla erkeklerde 50-60 yaşları arasında, kadınlarda ise 60-70 yaşları arasında konulmaktadır. KAH aynı yaş grubuna rağmen kadınlara nazaran erkeklerde daha sık görülmektedir. Erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 3-6 kat daha sık görülür.

Cinsiyet

Kadınlarda östrojen hormonunun koruyucu etki gösterdiği ifade edilmektedir. Genç yaşta görülen KAH'da cinsiyet farkı daha çok belirgindir. Bu nedenle, menopoz dönemine giren kadınlarda KAH riski artmaktadır.

Aile öyküsü

Ailesinde kalp hastalığı öyküsü, KAH riski ile ilişkilidir. 55 yaşından önce baba veya bir erkek kardeşte kalp hastalığı teşhisi konmuşsa veya anne veya kız kardeşte 65 yaşından önce hastalık ortaya çıkmışsa, risk en yüksek seviyededir.

Yüksek tansiyon

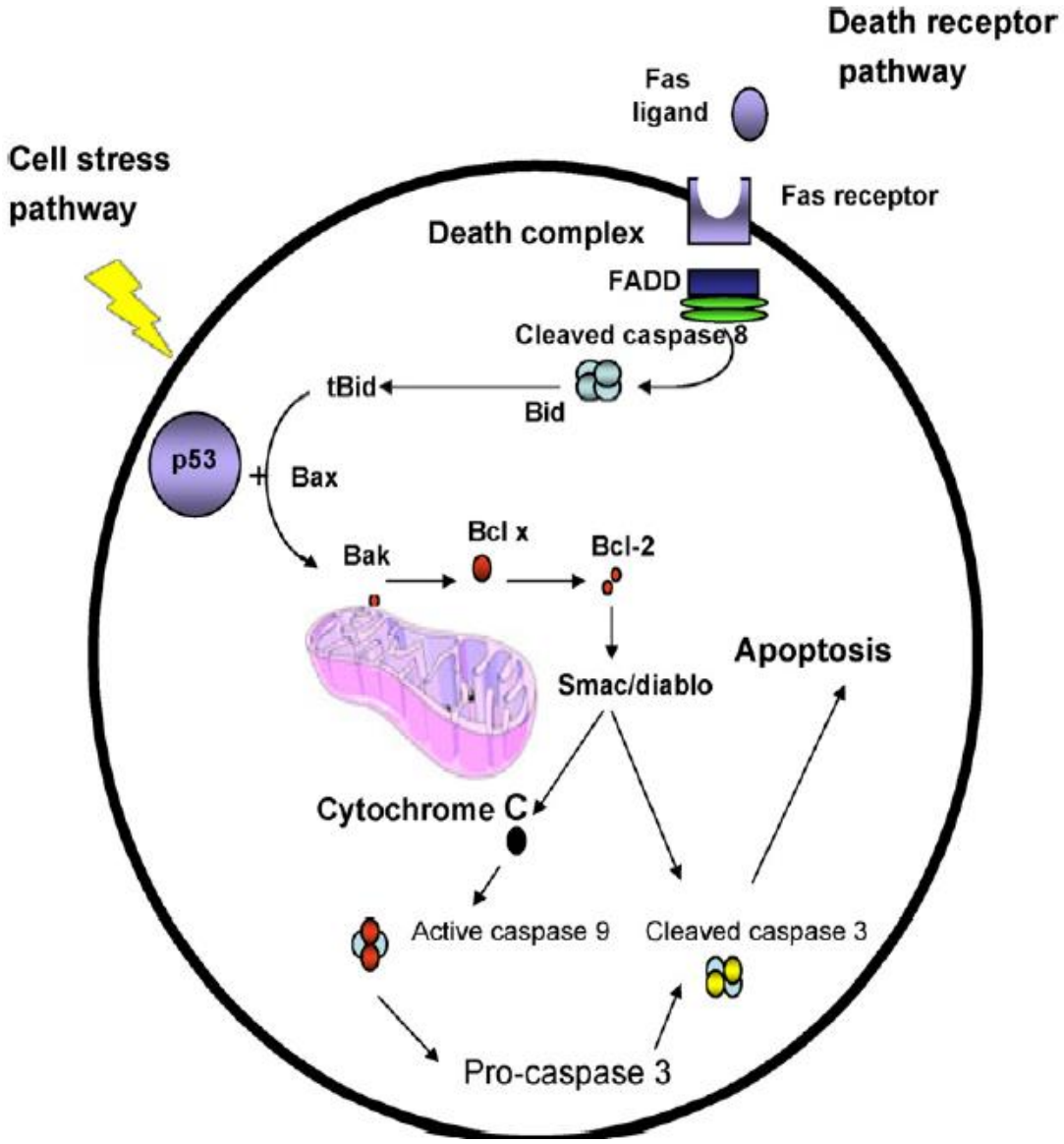
Kronik hipertansiyon, damar duvar hipertofisine ve aterosklerotik plak birikimine yol açtığı bilinmektedir. Klinik hipertansiyon vakalarının sadece %52'sinde tansiyon kontrol altına alınmaktadır.

Hiperkolesterolemi

Hiperkolesterolemi, dünya genelinde en fazla mortalite ve morbidite ile sonuçlanan ve kardiyovasküler hastalıklar için güçlü bir risk faktörüdür. Yüksek kolesterol düzeyleri KAH gelişimine direkt etkisi olduğundan, kan kolesterol düzeyleri diyetle ya da ilaç tedavisiyle normal düzeylere çekilmelidir.

2.3. Aterosklerozda DNA Hasarının Rolü

Epigenetik ve genetik faktörler DNA hasarın büyüklüğünü belirleyebilir ve ateroskleroz gelişiminde rol oynayan EH, DKH, makrofaj ve diğer hücrelerdeki DNA hasarlarının büyüklüğünü de bu faktörler belirler . ROS, vasküler hastalıklarda DNA hasarlarına yol açan birincil uyarandır. Süperoksit anyonu (O2−), peroksinitrit, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve lipit peroksitler bu süreçte rol oynar. ROS, mitokondrial metabolizma ve inflamasyon gibi süreçte hücre içinde oluşmaktadır . ROS, DNA'da tek ve çift zincir kırıkları ile baz modifikasyonları oluşturur. Hücre içinde oluşan süperoksit $\bullet O_2^-$ ve hidrojen peroksit H_2O_2 DNA için reaktif olmasa da, bu moleküllerin bir biri ile reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil grubu OH^- ($\bullet O_2^- + H_2O_2 \rightarrow \bullet OH + OH^- + O_2$/Haber–Weiss reaction), DNA için son derece tehlikelidir. Hidroksil radikali ise hem nüklear DNA hemde mitokondrial DNA'ya hasar verir. Hidroksil radikalleri DNA'da yanlış eşleşmeye, transkripsiyonel aksamalara neden olur. DNA hasarları, hasar sensör molekül kompleksleri olan MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) ve RAD9-Rad1-Hus1 (9-1-1) ile tanınarak, ATM/ATR protein ve DNA-protein kinaz (DNA-PK) aktive edilir. Aktive olan bu moleküller, hasar yanıt süreci içinde chk1, chk2 ve p53 gibi diğer molekülleri aktive eder. Bu proteinler, DNA hasar yanıtında major proteinlerdir. Bu proteinlerin aktivasyonu ile hücre döngüsü durdurularak, tamir mekanizmasının gerçekleşmesi için zaman kazandırır. Tamir gerçekleşmez veya istenilen netice alınamaz ise zaman hücre apopitoza girer. İlk lezyonlarda apopitoz az görülse de, ilerlemiş nekrotik çekirdekte ve fibröz plakda daha çok saptanmıştır. Fibröz kapağın stabilitesi aterosklerozda çok önemlidir . Fakat fibröz plağı oluşturan hücrelerde apoptozun oluşması sonucu, plak tamlığının bozulması kritik sonuçlar gösterebiliyor. Fibroz kapağı oluşturan hücre yüzeyindeki ölüm reseptörü (TNF ailesinden FAS CD95) lenfosit üzerindeki aynı isimli liganda bağlanır. Reseptörün sitoplazmik kısmı FADD adaptöre bağlanır. Bu da kaspaz 8 ve 10'u aktive eder. Kaspaz aktivasyonu, mitokondri membran permabilitesinin bozulmasına ve membranda yer alan pro-apoptotik (Bax/Bak) ve antiapoptotik (Bcl-x/Bcl-2) proteinlerin salınmasına neden olur. P53 tarafından durdurulan hücre siklüs sürecinde, hücre anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin dengesine göre ya kendini tamir edecek yada programlı hücre ölümüne yani apopitoza girecektir. Apopitoza giden hücre, makrofajlar tarafında fagositoza uğrar.



Şekil 2-6:DNA hasarı Apoptoz aktivasyonu. (John Mercer et al., 2011)

2.4. Oksidatif Stress ve DNA Hasarı

Oksidatif stress (OS), oksidan üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Yapılan çalışmalarda artan oksidatif stresin, diyabet, hiperkolesterolemi, böbrek yetmezliği, yaşlanma, hipertansiyon ve ateroskleroz patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir.

Bir çok çalışma, KAH'da ROS ürünlerinin yükseldiği rapor edilmiştir. Hücre membranında meydana gelen doymamış yağların oksidasyonu, aterosklerozun patogenezinde rol oynayan sinyal yolaklarını değiştirebilir; ROS

Pro-inflamatuvar yolakların aktivasyonu, hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonu, endotel disfoksiyonu, vasküler düz kas hüclerinin proliferasyonu veya lipit peroksidasyonuna neden olur. Oksidatif stresin DNA'da oluşturduğu hasarlar, DNA tamir mekanizmaları ile onarılır. Onarılamayacak kadar ağır DNA hasarlarında, hücre apoptotik ölüm yolunu seçer. Genetik materyalin bütünlüğünün korunması için DNA tamir mekanizması önemli rol oynar (Demokan ve ark.,2006).

2.5. DNA Mutasyonları ve DNA Onarım Mekanizmaları

Organizmada doğal metabolik yollarla ROS oluşur. Normalde antioksidanlarla ortadan kaldırılan ROS'lar, antioksidan yetersizliği durumunda OS oluşturur. OS DNA'da ve diğe biyolojik moleküllerde hasarlara sebep olmaktadır (Williams ve Jeffrey, 2000; Cooke, 2003).

-DNA'da meydana gelen hasarlar, genetik ve fenotipik farklılığa, kansere, kardiyovasküler hastalıklara, hücre ölümüne, kalıtsal ve genetik hastalıklara sebep olabilir. Mutasyon, DNA dizisindeki değişiklik olarak tanımlanabilir. DNA mutasyonları, spontan olarak veya dış uyaranlar tarafından oluşabilir. Mutasyonlar, nokta mutasyonları gibi küçük boyutlarda olabileceği gibi delesyon, insersiyon gibi büyük boyutlarda da gerçekleşebilir.

Normal metabolizma sonucu veya dış etkenlerin etkisi ile gün içinde 1 milyona yakın DNA hasarı oluşmakta ve bu hasarlar, DNA tamir mekanizmaları ile tamir edilmektedir (Kuper ve ark., 2013). DNA tamir mekanizmalarını başlıca beş gruba ayırabiliriz;

1)*Direkt onarımı*

- Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu
- O6-Metilguanin onarımı
- Fotoreaktivasyon

2)*Nükleotitlerin kesilip çıkarılma onarımı ()*

-Baz kesilip çıkarılması onarımı (BER=base excision repair)

-Nükleotid kesilip çıkarılması onarımı (NER=nucleotide excision repair)

-DNA yanlış eşleşme tamiri (Mismatch tamir mekanizması)

3)*DNA çift zincir kırıklarının onarımı*

-Serbest uçların homolog olmayan bağlanması NHEJ

-Serbest uçların homolog rekombinasyon

4)*SOS tamir mekanizması*

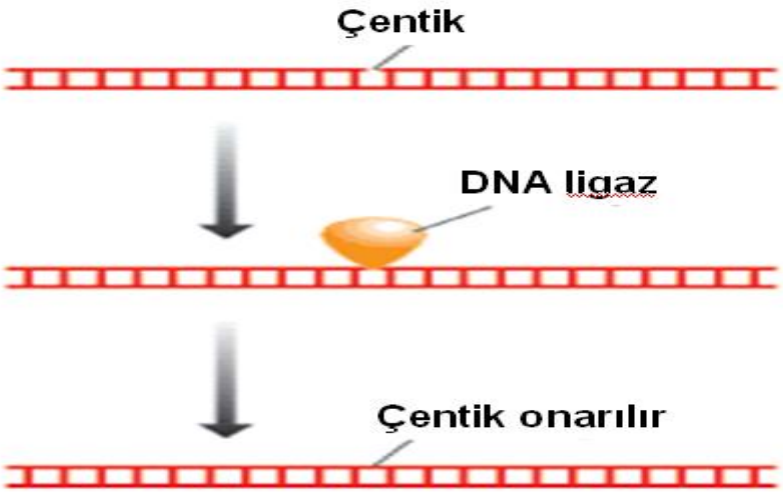
5)*DNA hasar toleransı*

2.5.1. Direkt Onarım

DNA'da oluşmuş hasarların bazıları, nükleotid veya baz kesip çıkarılması yapılmadan onarılır. Direk onarım ile ilgili üç tamir mekanizması vardır.

2.5.1.1. Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyon

Peroksitler ya da X-ışını gibi ajanlar DNA zincirinde basit kırıklar oluşturabilmektedir. DNA ligaz enzimi ile zincirde olan basit kırıklar hemen tamir edilmektedir. DNA ligaz, enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5' fosfat grubu ile 3'OH grubu arasındaki fosfodiester bağını oluşturarak, hasarı tamir eder.

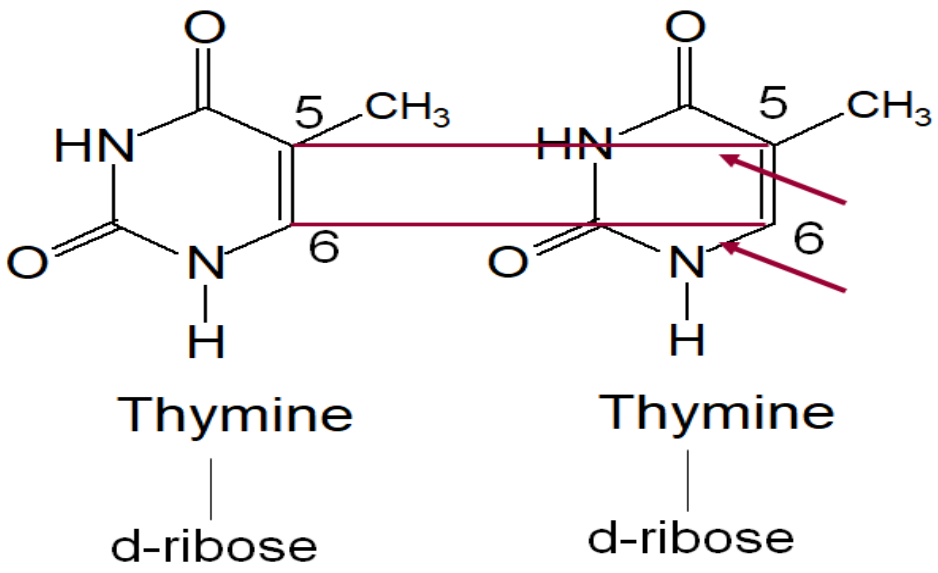


Şekil 2-7:Çentiğin DNA ligaz enzimi tarafından tamir edilmesi (Brown, 2002).

2.5.1.2. Fotoreaktivasyon

Fotoreaktivasyon tamir mekanizma ile güneş ışınlarının UV (dalga boyu boyu 260 nm) etkisi ile DNA'da oluşan hasarlar tamir edilir. UV etkisi ile DNA'da pirimidin dimerleri (daha çok timim-timin, daha az sitozin-sitozin ve ve sitozin-timin) oluşur. Bu hasarlar, DNA fotoliyaz enzimıı ile tamir edilir. Işıkta Işıkta aktive olan enzim dimerler arasındaki kovalent bağı koparır ve böylece böylece onarımgerçekleştirir (Kondoh ve ark., 2011, Vass ve ark., 2012). Bu onarım mekanizması fajlarda, mantarlarda, çoğu bitkilerde ve bakterilerde

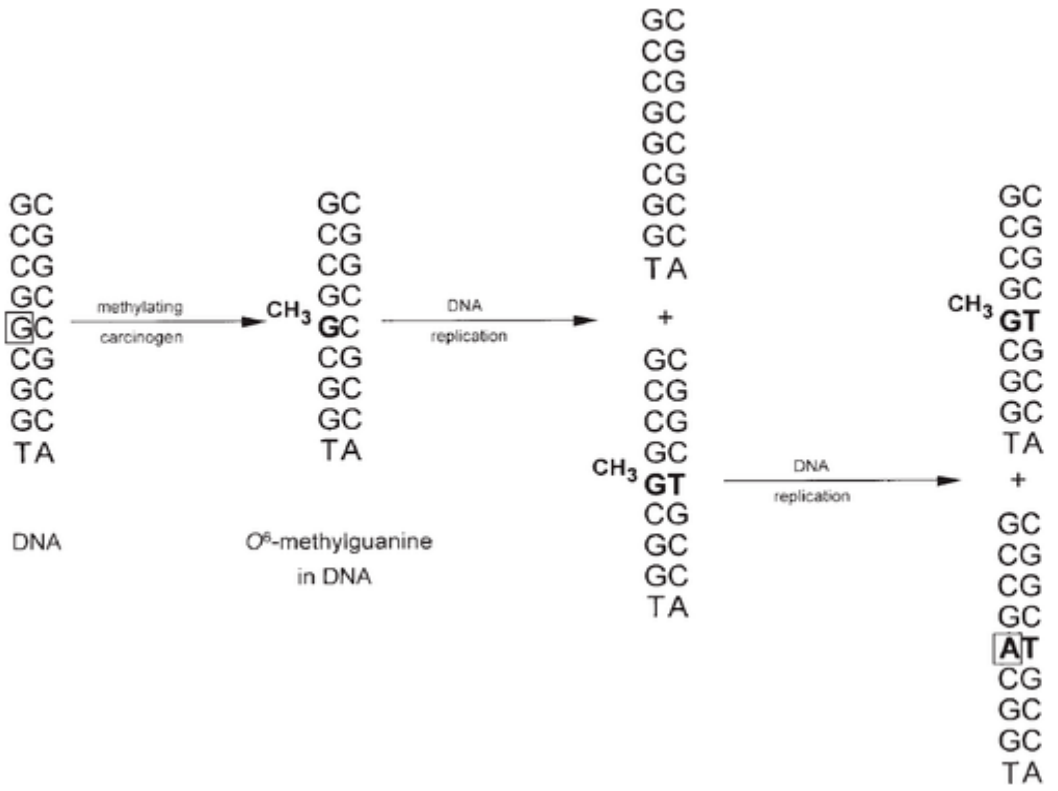
görülmüştür. İnsanda ve yüksek ökaryotlarda yoktur. İnsanlarda bu tip nükleotid kesip-çıkarma mekanizması ile onarılmaktadır.



Şekil 2-8:Fotoliyaz timin dimerleri arasındakı bağları kırıyor. (Prof.Dr.Şevket Ruacan, 2016)

2.5.1.3. O-6 metilguanin onarimi

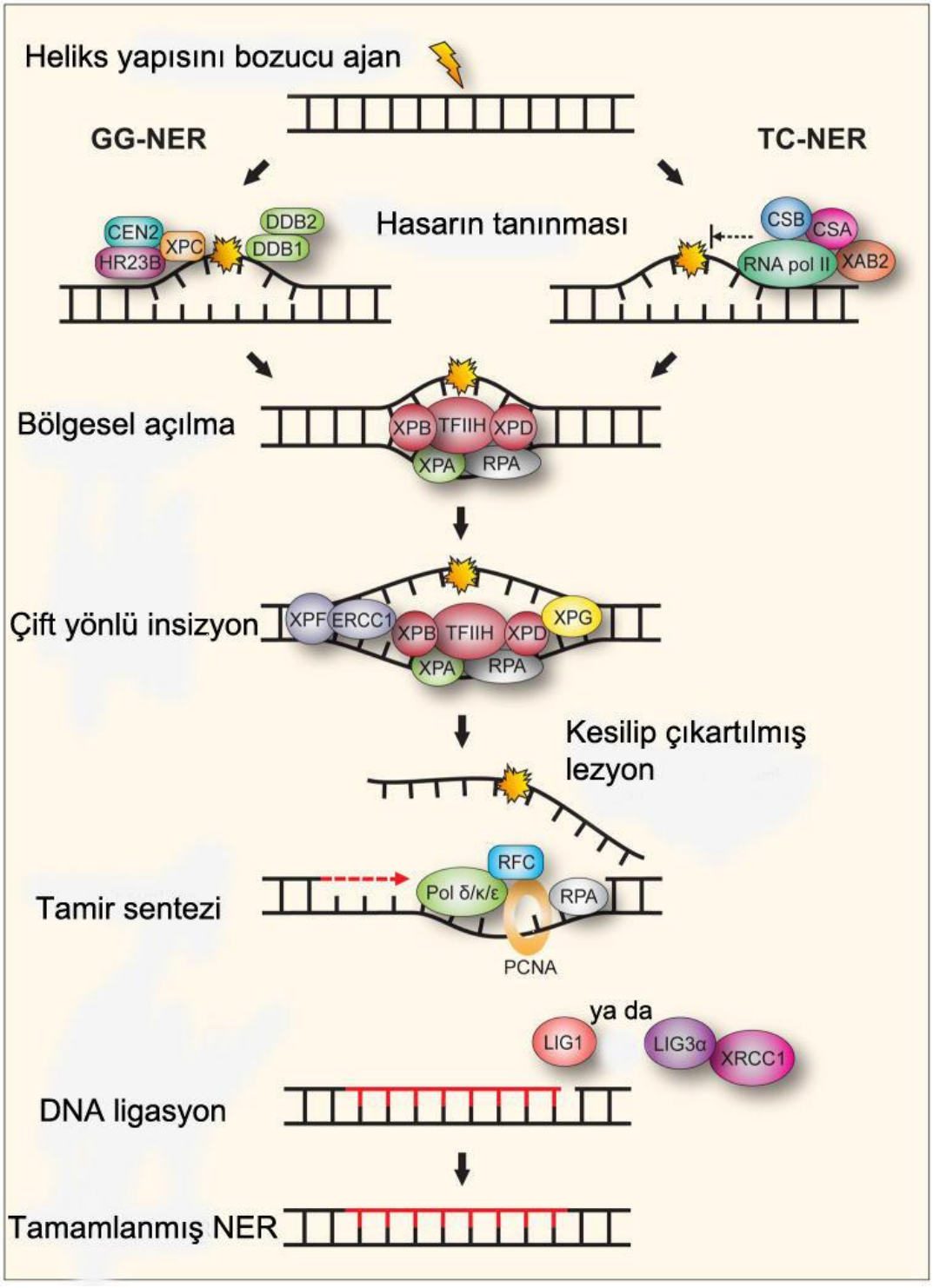
Alkilasyon ajanların neden olduğu bu tip hasarlarda O-6 metilguanin oluşur. O-6-metilguanin, yüksek oranda mutajeniktir. DNA yapısındaki O-6 metilguanin, sitozin yerine timin ile baz eşleşmesi yaparak mutasyona dönüşür. Bu tip hasarlar O-6-metilguanin tamir mekanizma ile onarılır. O-6 metilguanin metiltransferaz enzimi (MGMT), O-6 metilguanindeki metil grubunu tanıyarak, metil grubunu kendi merkezindeki sisteine transfer eder. Böylece alkilasyonun mutajenik etkisi ortadan kaldırılmış olur. Bunu yaparken enzim de inaktif hale geçer ve proteozomlar tarafından parçalanır. Geri dönüşümsüz şekilde inaktif olduğundan 'intihar enzimi' olarak bilinir. E.coli'de, bu tip hasarlar 'Ada enzimi' ile tamir edilir.



Şekil 2-9:O-6 metilguanin onarimi. (Glenn N. Major et al., 1998)

2.5.2. Kesilip çıkarma onarımı-ekzisyon

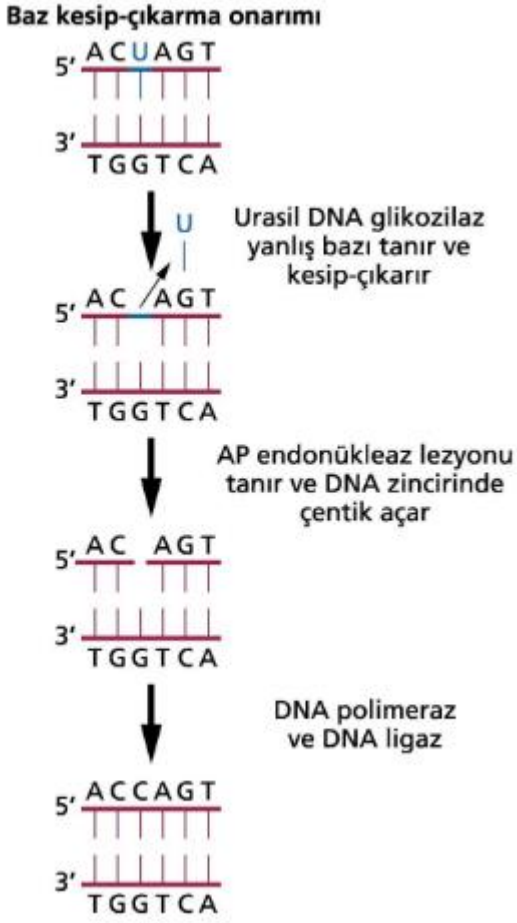
DNA'daki hasarlı bölge kesilip çıkartılır ve boş kalan bölge sağlıklı zincir kalıp alınarak replikasyon ile doldurulur (Cooper ve ark., 2006).. Prokaryot ve ökaryotlarda görülür. Bu tip hasar onarımı ile ilgili üç mekanizma vardır.



Şekil 2-10: GG-NER (Genomik-NER) ve TC-NER (Transkripsiyon ilişkili-NER) onarımı (Jeppesen, 2011).

2.5.2.1. Bazlarin kesilip çikarilmasi (BER) onarimi

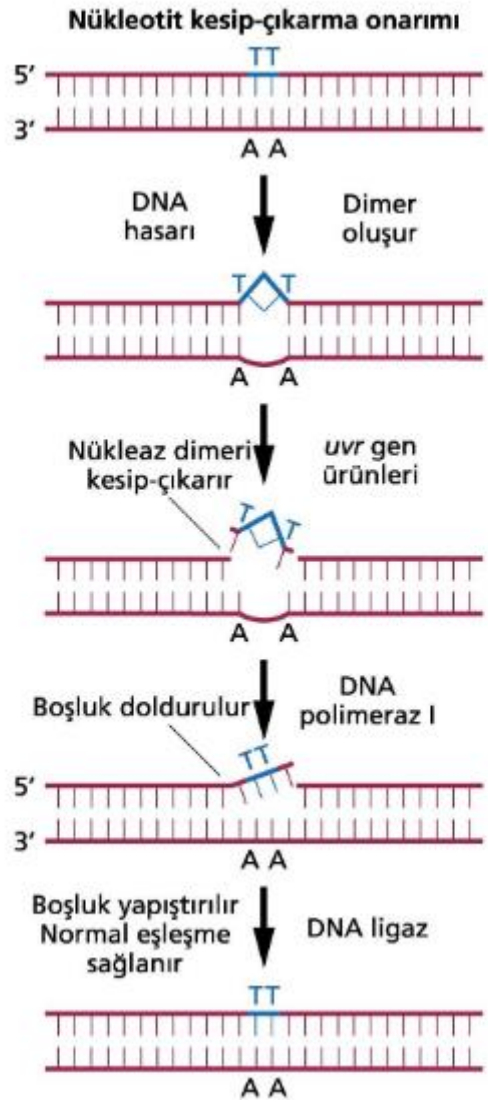
Deaminasyonun, alkilleyici ajanların, iyonize veya oksidasyon radyasyonun neden olduğu 1-5 bazlık hasarların tamiri BER mekanizması ile gerçekleştirilir (Zhang ve ark., 2010). BER tamir mekanizmasında, hatalı baz DNA glikozilaz enzimi tarafından tanınarak, nukleotidin şeker komponenti ile baz arasındakı N-glikozidik bağ kırılır. Baz, çift sarmaldan uzaklaştırılır. Bu bölge, apürinik /apirimidinik (AP) bölge olarak adlandırılır. AP bölgesi, APE1 (APE1 endonukleaz) ve PARP1 tarafından tanınır. APE1, lezyon bölgesindeki deoksiriboz fosfat omurgasını çıkarır ve DNA'da çentik oluşur. Bu da, PARP1'in ADP ribozilasyon (PAR) aktivitesini önemli derecede artırır. BER mekanizmasında görev alan moleküller tamir bölgesine toplanırken, yüksek miktarda üretilen PAR, DNA yapısını açık tutar. Onarım sürecine katılan diğer proteinler; XRCC1 (X-ışını Onarıcı Çapraz Tamamlayıcı Protein 1), PNK (Polinükleotid kinaz), DNA polimeraz β ve DNA ligaz III. PARP inhibitörleri, BER'yi bozar ve hücre hasarına ve ölüme neden olur.



Şekil 2-11:BER mekanizması Urasil DNA glikozilaz, AP endonukleaz, DNA pol ve ligaz yardımı ile yapılan baz kesip-çıkarma. Urasil komplementer olmayan baz olarak bilinir, kesilerek yerine komplementer olan C getirilir. (Aline Baldwin, 2016)

Nükleotidlerin kesilip çikarilmasi onarimi

NER sisteminin BER'e göre daha özelleşmiş onarım sistemi olduğu bilinir. DNA daha geniş (30 nükleotide kadar) hasarların tamirinden sorumludur. UV'in neden olduğu pirimidin dimerlerinin, çapraz bağların tamiri, büyük kimyasal grupların bağlandığı bazların tamiri, siklobütil dimerlerinin tamiri, NER mekanizması ile tamir edilir (Gilljam ve ark., 2012). Hasar onarım mekanizması hasarın tespit edilmesi ile başlar. Hasarlı bölgeye onarımda görev alan protein komleksi bağlanır. Zincir üzerindeki hatalı bölge her iki taraftan kesilip uzaklaştırılır. Boşluk DNA pol ile dolrurularak ligaz eenzimi ile yapıştırılır. İnsanda NER tamir mekanizmasında 30'dan fazla protein görev alır.



Şekil 2-12:NER onarım mekanizması. (Aline Baldwin, 2016)

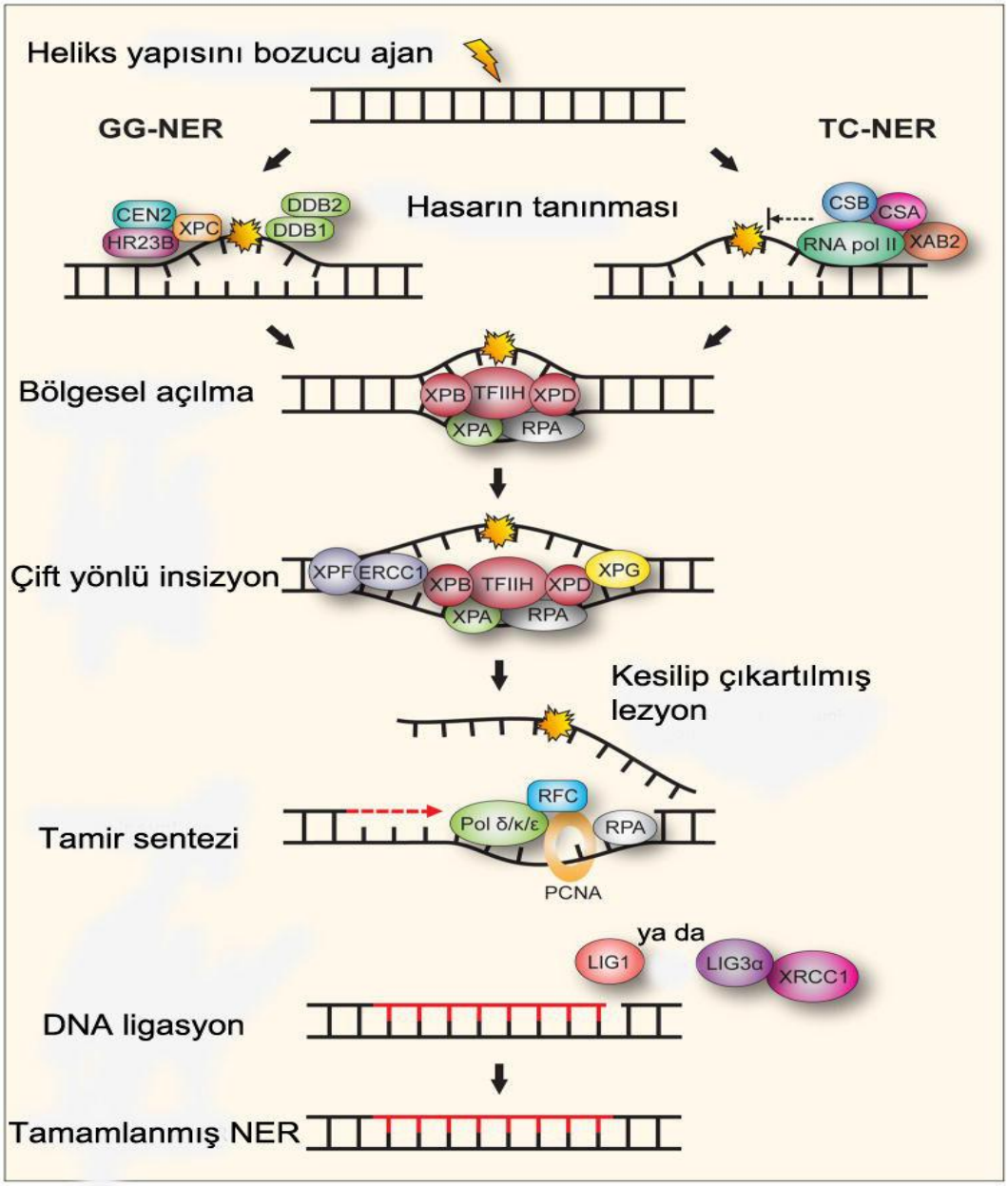
E.coli NER Sistemi

E.coli' deki 12 nükleotid uzunluğundaki hasarlı dizilerin onarımı 'kısa yama' sistemi ile onarılır. Bu onarım UvrA, UvrB ve UvrC proteinlerince gerçekleştirilir. UvrA proteini hasarlı bölgeyi tanır, UvrB hasarlı bölgeyi 3’ yönünden UvrC ise 5’ yönünden keserek 12-13 bazlık bir bölgeyi çıkartı ve daha sonra UvrC proteini ayrılır. UvrB ise hasarlı bölgede bağlı kalır, oluşan boşluk DNA polimeraz I tarafından doldurulur, fosfodiester köprüleride DNA ligaz tarafından yapılır (Bichara ve ark., 2011). Birde ‘uzun yama’ tamir mekanizması vardır. Bu mekanizmada 2000 nükleotidlik bölge kesilip çıkartılır. Ökaryotik NER sistemi daha çok ‘uzun yama’ tamir mekanizmasına benzer.

Ökaryotlarda NER Sistemi

Ökaryotik NER sistemi, E.coli 'deki sistemden daha komplekstir ve ökaryotlarda yaygın olarak kullanılır.Ökaryotlarda NER sistemi ile ‘long patch’ tamir sistemi olarak bilinir. Bu tamir mekanizması ile 24-29 nükleotitden oluşan hasarlar onarılır. XPD ve XPB DNA çift sarmalın açılmasını sağlar. Hasarın tanınmasında XPC, XPA ve XPE proteinleri rol oynar. Transkripsiyon faktör II H'nin alt birmlerinden olan XPB ve XPD'nin helikaz aktiviteleri ile DNA çift sarmal yapısı açılır. XPG hasarlı bölgeyi 3' ucundan, ERCC1-XPF 5' ucundan keser. Oluşan boşluğun doldurulmasında ise Replikasyon protein A, replikasyon faktör C, proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) ve DNA polimeraz delta ve epsilon rol oynar. DNA ligaz ile fosfodiester bağının oluşumu katalizlenerek onarım tamamlanır.

Ökaryotlarda ‘short patch’ tamir sistemi yoktur.



Şekil 2-13:GG-NER (Genomik-NER) ve TC-NER (Transkripsiyon ilişkili-NER) onarımı (Jeppesen, 2011).

2.5.2.2. Mistmach tamir mekanizması (DNA yanlış eşleşme ekzisyon onarımı)

DNA polimeraz tarafından yapılan hatalı baz eklenmesi sonucu oluşan eşleşmeme (mismatch) hataları bu tamir mekanizması tarafından tamir edilir.

***E.coli*'de yanlış eşleşme onarım sistemi**

Onarım için hangi zincirin kalıp olarak kullanılacağı önemli bir konudur. E.Coli'de bu sorun metilasyon modifikasyonu ile çözülmüştür. Yeni sentez edilen ve hatayı taşıyan zincir metillenmemiştir. Hata düzeltildikten sonar metillenir. Onarım sürecinde bir sıra enzim görev alır. MutS yanlış eşleşmeyi bulup, bağlanan enzimdir. MutL ise aynı yere bağlanında durum kararlılık kazanır, MutS ve MutL kompleks oluşturu, DNA'da loop yapısı oluşturur. Bu kompleks MutH uyarır. MutH, metile olmamış 5'-GATC polindrom dizisine bağlanarak, DNA zincirini bu noktada keser. Boşluk DNA pol ile doldururlur ve DNA ligaz ile yapıştırılır (Polosina ve ark., 2009).

Ökaryotik sistemde yanlış eşleşme onarım sistemi

Ökaryotik sistemde, E.coli MutS ve MutL genlerinin homologları vardır. Sadece MutH'ın homoloğu yoktur. Bu da hatalı baz taşıyan zinciri tanımada farklı bir mekanizmanın gorev aldığını gösterir. Yanlış eşleşme onarım mekanızmada görev alan genlerdeki mutasyonlar kalıtsal hastalıklardan biri olan HNPCC' ye (kalıtımsal polipsiz kolorektal kanser veya kolon kanseri) yol açmaktadır (Laulier ve ark., 2012).

2.5.3. DNA çift zincir kırıklarının onarımı

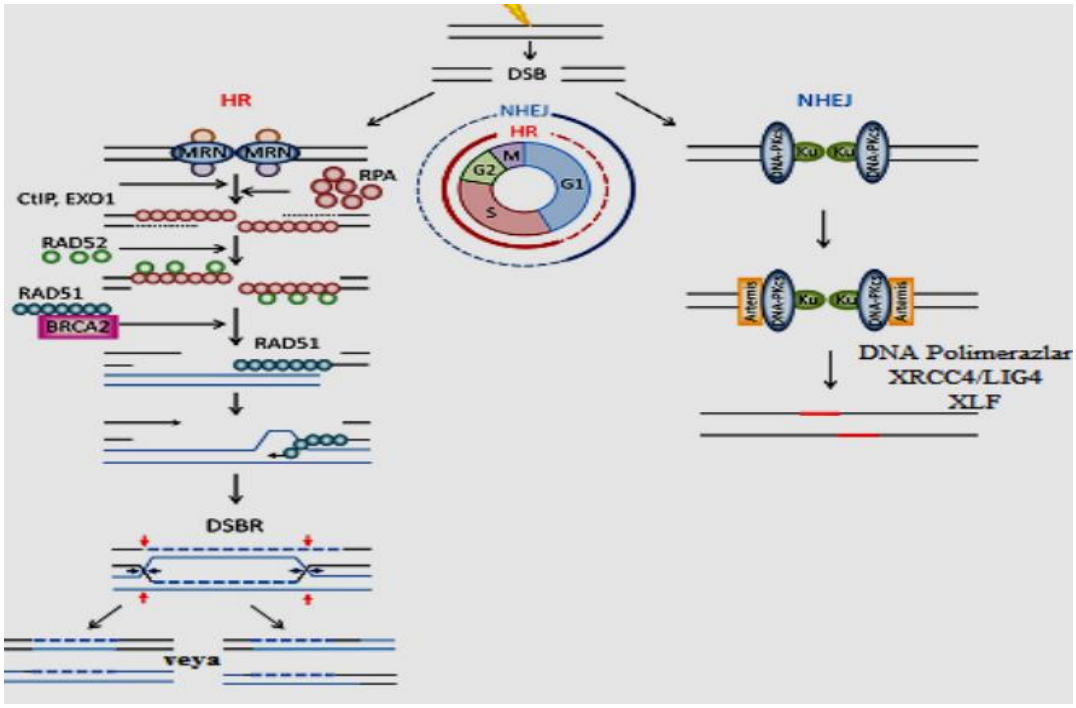
Çift zincir kırıkları, genetik tamlığın kaybıyla yol açabilen kromozomal kırıklardır. İyonize radyasyon ve genotoksik bileşenler (ekzojen faktörler) çift zincir kırığı oluşturduğu gibi metabolik ROT gibi endojen faktörlerde bu etkiyi gösterebilir. Tamir edilmeyen çift zincir kırıkları ciddi durumlara yol açabileceğinden, çift zincir kırıklarının tamiri çok önemlidir. İki esas mekanizma görülür:

- Homolog rekombinasyon (HR)
- Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)

Bu iki mekanizma bir birinden farklıdır. Onarımda farklı protenler görev alır. HR'da kardeş kromatid iplikçiğini kalıp olarak kullanır. Bu da, çift zincir kırığının hatasız olarak tamir edilmesi ile sonuçlanır.

2.5.3.1. Homolog Rekombinasyon HR

DNA çift zincir kırıkları, DNA replikasyonunun durmasına yol açabilir ve bu durum HR tamir mekanizmasını uyarır. Kırık bölgenin tamirinde, kromozomun sağlıklı zinciri kalıp olarak kullanılır. Tamir süreci, MRE11 / RAD50 / NBS1 kompleksin nükleaz aktivitesi ile başlar. Enzim kırık uçların yıkıma uğratır. 3' kırık uca RAD52 proteini bağlanır. RAD 51- BRCA 2 kompleksi ise rekombinasyon oluşturmak için kardeş kromatid zincirinin hasar bölgesine gelmesini sağlar. DNA replikasyonu ile tamir süreci tamamlanır.



Şekil 2-14:Homolog rekombinasyon. (Balikesir Saglik Bil Derg Cilt:4 Sayı:3 Aralık 2015)

2.5.3.2. Homolog Olmayan Uç Birleştirme(NHEJ)

Hasarlanmamış DNA'nın, kalıbına ihtiyaç duyulmaksızın tamir edildiği onarım mekanizmasıdır. Bu tamir mekanizmasında, çift zincir kırık uçları modifiye ederek birbirine bağlanır. Birkaç nükleotid kaybı ile DNA onarımı gerçekleşir. Ku70 ve Ku80 heterodimerik protein kompleksi, iki çift zincir kırıklı DNA bölgesine doğrudan bağlanarak onu yıkılmaktan korur. Kompleks aynı zamanda DNA-bağımlı protein kinaz katalitik alt birimi (DNA-PKcs) ile birleşir. Multiprotein kompleksi, DNA uçlarını stabil hale getirir. XRCC4/ligaz 4 kompleksi ligasyon yaparak tamir sonuçlanır.

2.5.4. SOS tamir mekanizması

E. Coli'de DNA'da hasarının çok fazla olduğu ve diğer tamir mekanizmalarının yeterli olmadığı durumlarda devreye giren tamir mekanizmasıdır. SOS tamir mekanizmasında, DNA polimeraz replikasyona devam eder. Hasarlı zincirin karşısındaki zincir rastgele doldurulur. Bu yüzden acil cevap sistemi olmasına rağmen hataya meyilli tamir sistemidir. Tamirde görev alan proteinleri kodlayan operonun represörü Lex A proteinidir. DNA hasara maruz kaldığı zaman RecA proteinin tek zincire bağlanır. RecA-ssDNA kompleksi oluşur ve Lex A'nın proteinin otoproteolitik yıkımı aktivleşir. Rec A DNA polimeraza bağlanır, hatalı bölgeyide geçerek eplikasyonu devam ettirir.

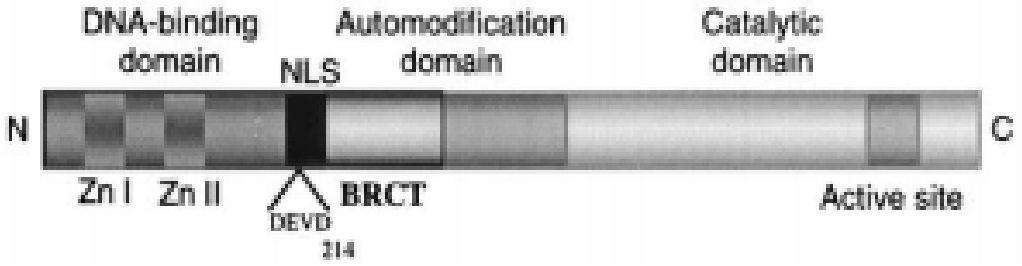
2.5.5. Translesion sentezi TLS (DNA hasar toleransı)

Replikasyon öncesi tamir edilmeyen mutasyonlu DNA bölgesinin replikasyonu gerçekleştiği zaman, polimeraz mutasyonlu bölge kalır, ilerleyemez. Bu durumda farklı polimerazlar devreye girerek hasarlı bölgenin karşısındaki zincirin replikasyonunu gerçekleştirir. Bu polimerazlar; Rev1, Pol ζ, Pol κ, Pol η, Pol ι. Rasgele nükleotid eklenerek yapılan sentez olduğu için, hataya eğilimli replikasyon durumudur.

2.6. PARP1 Geni ve Proteini

PARP-1, 1014 amino asitten oluşan, 113-kDa ağırlığına bir proteinidir. PARP1 proteinini kodlayan gen, 1 numaralı kromozomun q41-q42 pozisyonunda lokalizedir. Poli-ADP-ribosiltransferaz aktivitesi ile DNA onarımında anahtar rol oynar; kromatin yapısının düzenlenmesi, transkripsiyon ve genomik bütünlüğün korunması gibi. PARP-1 enzimi, DNA kırıklarının oluştuğu bölgede tamir sürecinde görev alan proteinlerin kompleks oluşması için bazı proteinlere ADP-riboz (poli ADP ribosilasyon grubunu) ekler. PARP1 enzimi üç bölgeden oluşur; 42 kDa N-terminal bölgesi (DNA' ya bağlanma bölgesi), 16 kDa merkez bölgesi (otomodifikasyon bölgesi) ve 55 kDa C terminal bölgesi (katalitik bölge) vardır. N- terminal bölgede, iki çinko parmak motifi vardır. Birinci çinko parmak motifi, hem tek hem de çift iplikteki kırığa bağlanırken, ikinci çinko parmak motifi yalnızca tek iplik kırıklarına bağlanır. PARP-1, transkripsiyon faktörlerini aktive

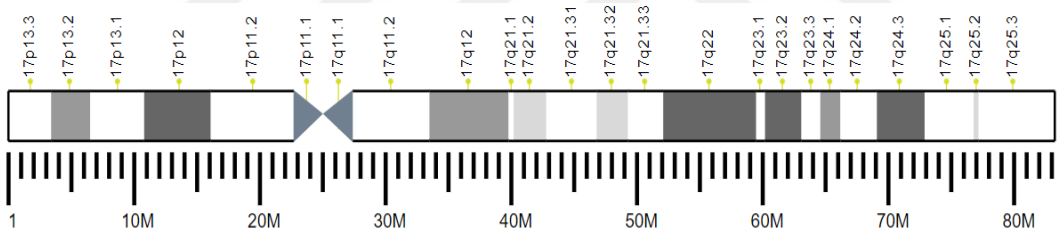
ederek pro-enflamatuar gen ifade düzeyini arttırır. Bu nedenle PARP-1, miyokard infarktüsü, diyabet ve bir birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynar.



Şekil 2-15:PARP1 protein yapisi. (https://www.genecards.org/ web sayfasından modifiye edilmiştir)

2.7. BRCA1 geni ve proteini.

BRCA1 geni 17q21 kromozomu üzerinde haritalanmıştır.1863 amino asitlik protein kodlayan 24 ekzondan oluşuyor.



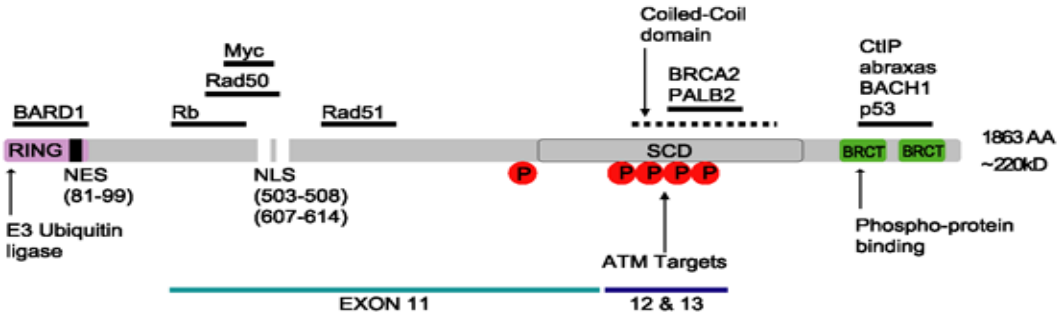
Şekil 2-16:BRCA1 gen lokalizasyonu. (https://www.genecards.org/ web sayfasından modifiye edilmiştir)

BRCA1 proteini DNA onarım mekanizmasında rol aldığı bilinmektedir. DNA hasarına yol açan ilaçla tedavi olan hastalarda BRCA1 proteinin yüksek miktarda eksprese olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. BRCA1 proteini, bütün hücrelerde sentezlenir. BRCA1 DNA çift zincir kırıklarının onarımında rol oynar. RAD50 ve RAD51 proteini ile etkileşerek çift zincir kırık onarım mekanizmasında fonksiyonel olur. BRCA1 proteini ayrıca, yanlış eşleşme onarımında da (mismatch repair) rol oynar. BRCA1 proteini, tümör baskılayıcı protein sınıfına da ait edilir. Bu sebepten oldukça önemli fonksiyonlara sahiptir. BRCA1 mutasyonlarının, meme tümörlerinde arttığı bilinmektedir. Kadınlarda

meme kanseri ile beraber, BRCA1 mutasyonu yumurtalık kanser riskini de artırmaktadır. Erkeklerde ise prostat ve meme kanseri riskini büyük ölçüde artırır.

BRCA1 proteini, RING (N-terminal) ve BRCT (C-terminal) alanı içerir. BRCT BRCA2 ve RAD51 gibi tumor süpresör elementler, RNA helikaz A gibi transkripsiyon faktörler ile etkileşime geçen alandır (Anderson SF ve ark,1998). BRCT alanine kırpılması hücre apoptoz tetiklemesine sebep olur (Thangaraju M ve ark. 2000). RING

alani veya çinko parmak alani ubikitin E3 ligaz aktivitesinden sorumludur. RING BRCA1 proteinin başka proteinlerle etkileşime geçmesinde rol oynayan alandır.

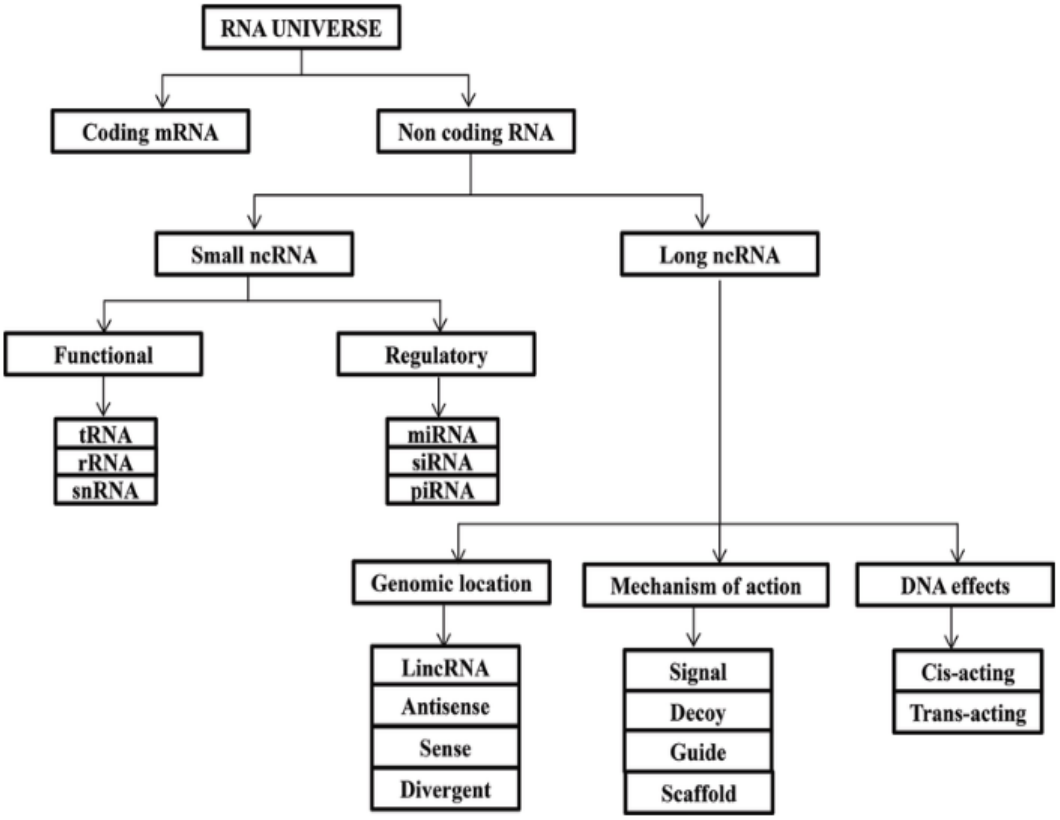


Şekil 2-17:BRCA1 proteini. (https://en.wikipedia.org/wiki/BRCA1 web sayfasından modifiye edilmiştir)

2.8. RNA Sınıflandırması

Ribo Nükleik asit veya RNA, nükleitlerden oluşan bir polimerdir. RNA moleküllerinin, çok önemli rolleri vardır. DNA'dakı genetik bilginin proteine çevrilmesinde rol oynarlar; mRNA DNA'dakı bilgiyi protein sentez yeri olan ribozomlara taşır, tRNA protein yapısına katılacak olan aminoasitleri taşır, rRNA ise ribozomun karalitik fonksiyonunu sağlar.

Bu RNA'ların dışında farklı fonksiyonlara sahip RNA molekülleri de vardır. Bu moleküller arasında mRNA'nın ifadesinin engellenmesi (RNA interferans) ile ilgili üç RNA molekülü vardır: miRNA, siRNA ve piRNA.



Şekil 2-18:RNA klassifikasyonu. (https://www.researchgate.net web sayfasından modifiye edilmiştir)

2.8.1. siRNA

siRNA (small interfering), virüs genomu ve transpozon gibi genomu tehdit eden yabancı dizilere karşı savunma molekülüdür. siRNA, mRNA'nın kesilmesi yoluyla onun translasyona uğramasını engeller.

2.8.2. piRNA

Drosophila ve memelilerin germ hücrelerinde eksprese edilirler. PiRNA piwi proteinleri ile protein-RNA kompleksi oluşturur. Bu kompleksler, transpozon ve retroelementlerin sessizleştirilmesinde rol oynar.

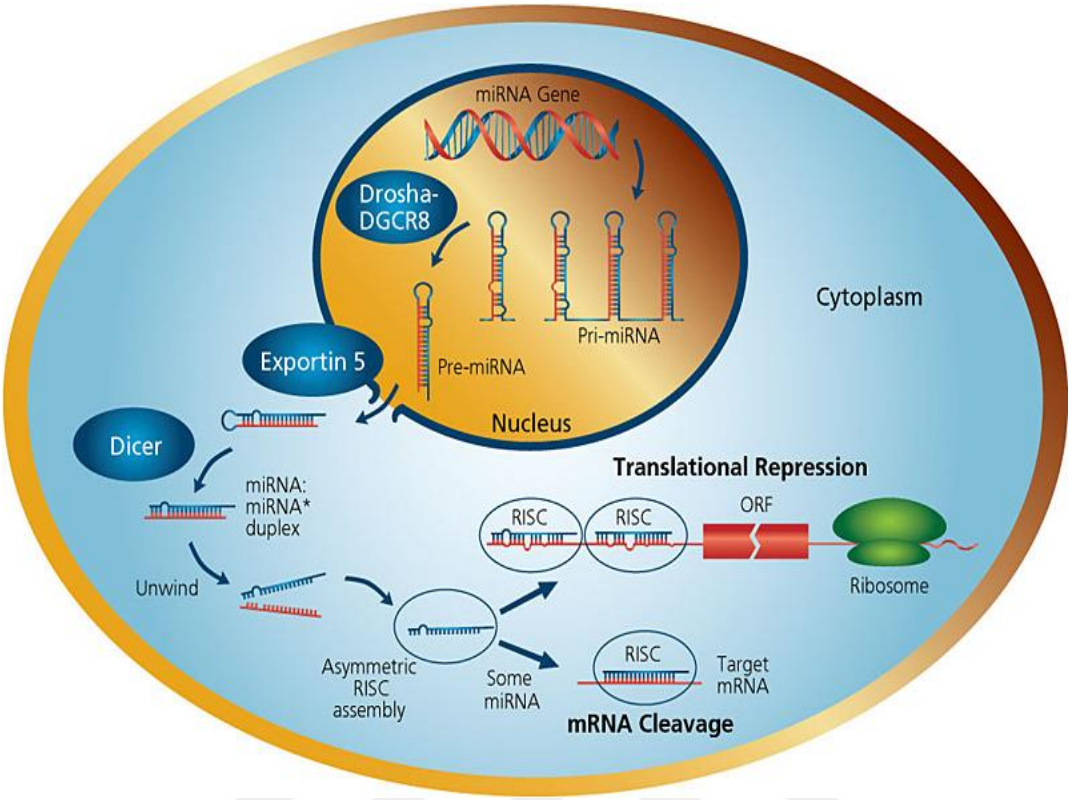
2.8.3. miRNA

MikroRNA'lar Mrna'rı hedef alarak gen ifade düzeyine mani olan küçük , kodlanmayan RNA'dır (Bartel, 2004). MikroRNA'lar (miRNA), biyolojik süreçlerde transkripsiyon sonrası modülasyonun anahtar negatif düzenleyicileri olarak işlev gören, 15-22 nukloetidlik kısa tek sarmallı RNA molekülleridir. miRNA'lar, hücre farklılaşması, proliferasyonu ve canlılığın sürdürülmesi merkezli

birçok fonksiyonda rol oynarlar. İlk olarak 1993 yılında C.elegans'ın gelişimini ile ilgili çalışmalarda keşfedildikten 7 yıl sonra, ilk memeli miRNA olan let-7 keşfedilmiştir. Günümüzde, 2000'den fazla miRNA tespit edilmiş olup, bu miRNA'ların tüm protein kodlayan genlerin yarısından fazlasını hedeflediği tahmin edilmektedir.

Mikro RNA'lar, hücre çekirdeğinde RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir. miRNA`lar saç tokası yapısı içeren en az 60-70 bç`lik çift iplikli transkriptler (pri-miRNA) halinde sentezlenir Daha sonra pri-miRNA'lar, RNaz II tip enzimi olan Drosha ve kofaktörü DGCR8 (DiGeorge'8) protein kompleksi tarafından kesilerek pre-miRNA oluşturulur. Pre-miRNA, exportin-5 tarafından nükleustan sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada pre-miRNA'ya, bir RNaz III enzimi olan Dicer ve TRBP (TAR RNA-binding protein) bağlanır. Saç tokası yapısı kesilerek, kısa çift iplikli miRNA' lar oluşur. miRNA, RNA-kaynaklı susturma kompleksine (RISC) dahil edilir. Bu kompleks içindeki Argonaute (AGO)'nin katalitik akitivitesi ile çift iplikl miRNA'nın bir ipliği (passenger strand) yıkılırken, diğer ipliği (guide strand) hedef mRNA'ya bağlanacak şekilde bırakılır. siRNA'dan farklı olarak RISC kompleksine dahil olan miRNA'lardan bazıları, mRNA ile tam bir komplementerlik gösteremez. Bu nedenle, mRNA parçalanmaz, sadece gen ifadesini susturulur. Ancak bazı miRNA'lar, siRNA gibi mRNA ile tam olarak uyum gösterir ve mRNA'yı parçalayarak gen ifadesini susturur.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, miRNA'ların nörodejeneratif hastalıklar, kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın gelişim ve ilerlemesinde rolü olduğunu gösterilmiş olup, hastalıklar ile ilgili biobelirteç olarak ve tedaviye yönelik hedef moleküller olarak kullanılması ile ilgili çalışalar yoğun olarak devam etmektedir.



Şekil 2-19:miRNA biyogenezi. (S.Wist, 2017)

2.8.3.1. miR-21-5p

Geni, 17q23.1'de loklizedir. Onkojenik bir mikroRNA'dır (Martin del Campo 2015). Karsinogenez sürecinde rol oynayan TPM1, PTEN, PDCD4, TIMP3, RHOB ve PDCD genlerinin ifade düzeyini düzenler. MiR-21 ayrıca Wnt / β-katenin, PTEN / PI3K / AKT ve RAS / MEK / ERK gibi çeşitli sinyal yollarında rol oynar (Lan ve diğerleri, 2015).

Martin del Campo SE, Latchana N, Levine KM, Grignol Başkan Vekili, Fairchild ET, Jaime-Ramirez AC, et al. MiR-21, metaloma proteinleri 3 ekspresyonunun doku inhibitörünün inhibisyonu yoluyla melanom invazivliğini arttırır: MiR-21 inhibitörünün in vivo etkileri. PLoS One. 2015; 10: e0115919.

Lan F, Pan Q, Yu H, Yue X. Sülforafan, glioblastomdaki Wnt / beta-katenin sinyali yoluyla miR-21'in aşağı regülasyonu nedeniyle temozolomide bağlı apoptozu arttırır. J Neurochem. 2015; 134: 811-8

2.8.3.2. miRNA-193b-3p

Geni 16p13.12 lokalizedir. (E Mets, J Van der Meulen, G Van Peer, M Boice, P Mestdagh, I Van de Walle, T Lammens, S Goossens, B De Moerloose, Y Benoit, N Van Roy, E Clappier, B Poppe, J Vandesompele, H-G Wendel, T Taghon, P Rondou, J Soulier, P Van Vlierberghe, F Speleman, 2015;29: 798–806 miR-193b-3p onkojenik gendir. T hücre akut lösemide MYB onkogeninin ekspresyonunu düzenler. STAT5 sinyal yolağı üzerinden etki göstererek hemopoetik hücre genişlemesini önler (Haetscher N, 2015).

Kyung Hee Choi , Chang Hoon Shin , Woo Joo Lee , Haein Ji , Hyeon Ho Kim,2019;12; Akciğer kanserinde miR-193b-3p'in siklin D1/Ajuba LIM proteini/EGF yolağında genlerinin ifadesini düzenler.

XinyaoZhou1, Qiaoli Li1, JiaweiXu, XiaojingZhang, HuijuanZhang, YuqianXiang, Chuantao Fang, TengWang, ShihuiXia, QiangZhang, QingheXing, Lin He, LeiWang, MingqingXu & XinzhiZhao. Preeklampsi plasentada TGF B2 hedef alarak trofoblast göçünü azaltır.

Jinzhi Zhang1, Jinjin Qin1, Yuanyuan 2017.11.086. Glioma doku hücrelerinde miR-193b-3p büyüme faktörü-1 (TGF-1) yolağında SMAD3 gelülasyonunu etkileyerek hücre proliferasyonunu artırır.

2.8.3.3. miRNA-484

Geni 16p13.11 lokalizedir. Yang Hu, Hong Xie, Yankun Liu, Weiying Liu, Min Liu & Hua Tang. miR-484 suppresses proliferation and epithelial–mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SMAD2 in cervical cancer cells.2017;03.s12935-017-0407-9**.** Tümör baskılayıcı bir gendir. ZEB1 ve SMAD2 ekspresyonunu aşağı regüle eder. ZEB1 hedefleyerek ETM sürecini düzenler. Hücre proliferasyonunu inhibe eder. Apoptozun artmasına yol açar.

Meme kanseri çalışmasında BRCA1 ve miR-484 ilişkili olduğu tespit edildi (Volinia et al. 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma grubu

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'nda tanısı konmuş toplam 50 KAH'sı ve 50 sağlıklı kontrol kişisi çalışmaya alınmıştır. Gögüs ağrısı, nefes darlığı, çarpıntı şikayetleri olan hastalar koroner anjiografi işlemine alındı.

Çalışma grubunda dışlanan kriterler;

- Malignite, sistemik vaskülit, inflamatuar barsak hastalığı, Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) bulunan hastalar,
- 45 yaş altı kişiler
- Hepatit B, C ve HIV infeksiyonu bulunan hastalar,
- Aktif infeksiyonu bulunan hastalar (aksiler vücut ısısı > 38 ^{0} C ve diğer bulgular),
- Çalışma protokolüne uyumsuzluk gösteren hastalar.
- Stent takılan hastalar

Çalışmanın deneysel aşaması Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

Mikropipetler, Socorex ve Eppendorf

Vorteks, Velp

Hassas Terazi, CHYO

Santrifüj, Hettich

Soğutmalı Santrifüj, Hettich

Ph Metre, WTW

Buzdolabı ve Derin Dondurucu (+4 ºC ve -20 ºC), Arçelik

Ultra Derin Dondurucu (-80 ºC), New Brunswick Scientific, Sanyo

Çalkalamalı Su Banyosu, Kottermann

Otoklav, Hirayama

Termal Döngü Cihazı, Applied Biosystems

Saf su cihazı, Millipore Elix 3

3.3. KULLANILAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER

Lenfosit İzolasyonunda Kullanilan Tampon Ve Çözeltiler;

1X Fosfat Tuz Tamponu (PBS) (1000 ml, pH 7,4)

NaCl……8 g

KCl……..0,2 g

$Na_2HPO_4.2H_2O$……..1,81 g

KH_2PO_4……...0,24 g

3.4. PERİFERİK KANDAN LENFOSİT İZOLASYONU

EDTAlı tüplere alınmış kan örnekleri PBS tamponu ile 1:1 oranında seyreltildi. PBS ile seyreltilmiş kan örnekleri Histopak (1077 g/ml, BioChrom AG, Berlin, AD) yoğunluk medyumu üzerine tabakalandırıldı ve 600 x g'de, 21°C'de, 35 dakika santrifüjleme ile lenfositler izole edidi. Lenfositlerin üzerine eşit hacimde PBS eklendi ve 600 x g'de, 21°C'de, 10 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Son olarak eritrosit kontaminasyonunu önlemek amacıyla lenfositler 3 ml kırmızı kan hücresi lizis tamponu (Roche Applied Science, Mannheim, AD) ile muamele edildi ve karışım 10 dakika elde çalkalandı. 500 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj yapıldı ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Canlı lenfosit sayısı tripan mavisi kullanılarak hemositometre ile saptandı. Lenfositler %10 dimethyl sulphoxide (Applichem GmBH, Darmstadt, AD), %60 fetal bovine serum (BioChrom AG, Berlin, AD) ve %30 RPMI 1640 medyumu (L-glutaminsiz, 2g/l $NaHCO_3$'li, BioChrom KG, Berlin, AD) içeren örnek saklama medyumunda ~$2X10^6$ hücre/ml olacak şekilde süspanse edilerek cryo tüplere aktarıldı. Her bir örnek, analizler yapılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.5. RNA İZOLASYONU

BRCA1 ve PARP1 gen ifade miktarını tespiti için izole ettiğimiz lenfositlerden (~2X10^6 hücre) RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon için EXTRACT ME (Blirt, Cat No EM12 Version 1.2018 Polonya) kiti kullanıldı.

1. Solüsyonda bekletilen lenfositler en -80°C'den çıkarılarak 37°C'de çözüldü.
2. Lenfositler 400 x g'de 5 dk santrifüj edildi.
3. Üst sıvı atıldı.
4. Üzerine 400 µl "miRLys Buffer" eklendi ve 30 sn vortekslendi.
5. 2 dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.
6. Üst sıvı "DNA Purification Column"a aktarıldı ve 2dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.
7. Filtrat, steril 1.5 ml ependorfa aktarıldı.
8. Üzerine 0,5 hacimde 96-100% etanol ilave edildi ve 5 sn vortekslendi.
9. Karışım "Large RNA Purification Column"a aktarıldı.
10. 2dk 18.000 x g'de sentrefüj edildi.
11. 70 µl miREB ilave edildi ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
12. 2 dk 11.000 x g'de santrifüj edildi.
13. Filtreler uzaklaştırıldı.
14. MiRNA örnekleri buzlu raklarda -80°C kaldırıldı.

3.5.1. TOTAL RNA KONSANTRASYONUNUN VE SAFLIĞININ ÖLÇÜLMESİ

İzole edilen RNA örnekleri, NanoDrop Scientific^{TM} 1000 (Thermo Fisher, Delavare, ABD) cihazı ile ölçüldü. RNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik yoğunlunluğundan (OD) saptandı. RNA konsantrasyonunun ve saflığının hesaplanmasında kullanılan formüller aşağıda belirtilmiştir.

RNA konsantrasyonu (ng / µl): OD 260 nm x seyreltme faktörü x 40

RNA safllığı: OD 260 / OD 280 > 2,0

3.5.2. BİRİNCİ NORMALİZASYON

cDNA sentezi için, her bir miRNA örneğinden 400 ng alınıp, PCR tüpüne aktarıldı ve saf su ile 10 mikrolitreye tamamladı.

3.5.3. QRT-PCR YÖNTEMİ KULLANILARAK BRCA1 VE PARP1 GEN İFADE DÜZEYLERİNİN KANTİTATİF OLARAK SAPTANMASI

Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniği, mRNA ifade düzeylerinin kantitatif olarak saptanmasını ve ölçülmesini sağlayan oldukça hassas fleurosan tabanlı bir PCR teknolojisidir. Bu teknik, RT-PCR tekniği içerisine kantitatif PCR (qPCR) tekniğinin dahil edilerek RT-PCR tekniğinin mRNA kantitasyonunda kullanılmasına olanak sağlar. İlk aşama, revers transkriptaz enzimi kullanılarak mRNA kalıplarının cDNA'ya dönüştürülmesi (RT-PCR) reaksiyonlarını içerir. İkinci aşama ise PCR amplifikasyonu (qPCR) ile ilgili reaksiyonları içerir. qRT-PCR'ın iki farklı uygulaması mevcuttur.

Çalışmamızda, BRCA1 ve PARP1 gen ifade düzeylerini iki basamaklı qRT-PCR reaksiyonunu kullanarak saptadık.

3.5.4. RT-PCR

RT-PCR tekniği ile ters transkriptaz enzimi kullanılarak RNA kalıpları cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA sentezi WizScript™ cDNA Synthesis Kit protokolüne uygun yapıldı.

Tablo 3-1:cDNA sentezi için gerekli olan karışımın içeriği buz üzerinde hazırlandı (1 reaksiyon için).

Bileşen	Hacim
10x reaksiyon tampon	2ul
20x dNTP karışımı	1ul
wizScript RTase	1ul
RNase İnhibitör	0.5ul
RNase free su	3.5ul
Random Hexamer	2ul

Son konsantrasyon	10ul

1. **RT reaksiyon hazırlığı için ;**

-Her bir miRNA örneğinden 400 ng alınıp, PCR tüpüne aktarıldı ve saf su ile 10 µl'ye tamamlandı.

- 10 µl RT karışımı üzerine 10 µl su mirna karışımı ilave edildi.

- Buz üzerinde yavaşca 2 kez pipetajlandı.

- Üzerindeki köpükler hafif döndürülerek giderildi.

- RT gerçekleştirilene kadar buz üzerinde tutuldu.

2. Reaksiyon karışımı dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve aşağıda belirtilen sıcaklık döngüleri kullanılarak cDNA reaksiyonları Bio Rad cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında elde edilen cDNA'lar -20^{o}C'de saklandı.

Tablo 3-2:Reaksiyon döngüleri

	1.adım	2.adım	3.adım	4.adım
Derece	25	37	85	4
Zaman	10 dk	120dk	5 dk	∞

3.5.5. İKİNCİ NORMALİZASYON

İkinci normalizasyon işlemi için, çalışılan her bir hedef genin ifade düzeyleri, aktin beta (ACTB) housekeeping geni ile karşılaştırılarak belirlendi.

Reaksiyonlarda kullanılan qPCR primerleri ve probları (BRCA1 ve PARP1)

Tablo 3-3:ACTB prob ve primerlerinin özellikleri.

Primer/Prob	**Dizi**	**Uzunluk (bç)**
İleri Primer	CCAACCGCGAGAAGATGA	18
Geri Primer	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	20

Tablo 3-4:BRCA1 prob ve primerlerinin özellikleri.

Primer/Prob	Dizi	Uzunluk (bç)
İleri Primer	CCCAGCTACTCAGGTGGCTA	20
Geri Primer	TGATCTTGGCTCACTGCAAC	20

Tablo 3-5:PARP1 prob ve primerlerinin özellikleri.

Primer/Prob	Dizi	Uzunluk (bç)
İleri Primer	TCTTTGATGTGGAAAGTATGAAG AA	25
Geri Primer	GGCATCTTCTGAAGGTCGAT	20

Gerçek zamanlı qPCR çalışmasında kullanılan malzemeler (mRNA için**).**

- 0,6 µM BRCA1, PARP1, ACTB ileri ve geri primerleri
- 6,4 µM nükleaz içermeyen su
- 10 µM qPCR master
- 0,4 µM 50x High ROX

Tablo 3-6:qPCR'ın sıcaklık döngüsü.

Adım	Sıcaklık	Süre (sn)	Döngü
Aktivasyon ve denaturasyon	**95**	**180**	**40**
Denaturasyon	**95**	**5**	
Bağlanma/uzama	**60**	**30**	

3.6. Micro RNA İZOLASYONU

İzole edilen enfositlerden (~2X10^6 hücre) miRNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon için EXTRACT ME (Blirt, Cat No EM12 Version 1.2018 Polonya) kiti kullanıldı.

Uygulanan protokol;

1.Solüsyonda bekletilen lenfositler -80^{o}C' den çıkarılarak 37 ^{o}C' de çözüldü.

2.Lenfositler 400 x g'de 5 dk santrifüj edildi.

3.Üst sıvı atıldı.

4. Üzerine 400 µl miRLys tamponu eklendi ve 30sn vortekslendi.

5. 2 dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.

6.Üst sıvı DNA saflaştırma kolonuna aktarıldı ve 2dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.

7.Filtrat steril 1.5 ml'lik ependorfa aktarıldı.

8.Üzerine 0,5 hacimde 96-100% etanol ilave edildi ve 5 sn vortekslendi.

9.Karışım Large RNA saflaştırma kolonuna aktarıldı.

10. 2dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.

11.Filtrat steril 1.5 ml ependorfa transfer edildi.

12.Üzerine 1 hacim 96-100% etanol ilave edildi ve 5 sn vortekslendi

13.Karışım miRNA saflaştırma kolonuna aktarıldı.

14. 2dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.

15.Filtrat uzaklaştırıldı.

16.miRNA saflaştırma kolonuna 500 µl miRW tamponu ilave edildi.

17.1 dk 15.000 x g'de santrifüj edildi.

18.Filtrat uzaklaştırıldı.

19.miRNA saflaştırma kolonuna 500 µl miRW tamponu ilave edildi.

20.1 dk 15.000 x g'de santrifüj edildi.

21.Filtrat uzaklaştırıldı.

22.3 dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.

23.Filtreler 1.5 ml streril ependorfa transfer edildi.

24.70 µl miREB ilave edildi ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

25.2 dk 11.000 x g'de santrifüj edildi.

26.Filtreler uzaklaştırıldı.

27.MiRNA örnekleri buzlu raklarda -80^{o}C kaldırıldı.

3.6.1. TOTAL RNA KONSANTRASYONUNUN VE SAFLIĞININ ÖLÇÜLMESİ

İzole edilen RNA örnekleri, NanoDrop Scientific™ 1000 (Thermo Fisher, Delaware, ABD**)** cihazı ile ölçüldü. RNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik yoğunlunluğundan (OD) saptandı. RNA konsantrasyonunun ve saflığının hesaplanmasında kullanılan formüller aşağıda belirtilmiştir.

RNA konsantrasyonu (ng/µl): OD 260 nm x seyreltme faktörü x 40

RNA safllığı: OD 260 / OD 280 > 2,0

3.6.2. BİRİNCİ NORMALİZASYON

cDNA sentezi için, her bir mRNA örneğinden 400ng çekilip PCR tüpüne aktarıldı ve saf su ile 10 µl tamamladı.

3.6.3. QRT-PCR YÖNTEMİ KULLANILARAK MİR21-5p, MİR193b-3p ve MİR484 GEN İFADE DÜZEYLERİNİN KANTİTATİF OLARAK SAPTANMASI

Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniği, miRNA ifade düzeylerinin kantitatif olarak saptanmasını ve ölçülmesini sağlayan oldukça hassas fleurosan tabanlı bir PCR teknolojisidir. Bu teknik, RT-PCR tekniği içerisine kantitatif PCR (qPCR) tekniğinin dahil edilerek RT-PCR tekniğinin miRNA kantitasyonunda kullanılmasına olanak sağlar. İlk aşama, revers transkriptaz enzimi kullanılarak miRNA kalıplarının cDNA'ya dönüştürülmesi (RT-PCR) reaksiyonlarını içerir. İkinci aşama ise PCR amplifikasyonu (qPCR) ile ilgili reaksiyonları içerir. qRT-PCR'ın iki farklı uygulaması mevcuttur.

Çalışmamızda, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484 gen ifade düzeylerini iki basamaklı qRT-PCR reaksiyonunu kullanarak saptadık.

3.6.4. RT-PCR

RT-PCR tekniği ile ters transkriptaz enzimi kullanılarak miRNA kalıpları cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA sentezi WizScript™ cDNA Synthesis Kit protokolune uygun yapıldı.

Her bir örneğe ait total mRNA ve primer karışımı, ince cidarlı PCR tüpü içerisinde Tablo-3-7'ye göre hazırlandı.

Tablo 3-7:cDNA sentezi için gerekli olan karışımın içeriği buz üzeinde hazırlandı (1 reaksiyon için).

Bileşen	Hacim
10x reaksiyon tampon	2ul
20x dNTP karışımı	1ul
wizScript RTase	1ul
RNase İnhibitör	0.5ul
RNase free su	3.5ul
Random Hexamer	2ul
Son konsantrasyon	10ul

RT reaksiyon hazırlığı için ;

-cDNA sentezi için, her bir mRNA örneğinden 400 ng alınıp, PCR tüpüne aktarıldı ve saf su ile 10 µl'ye tamamladı.

- 10 µl RT karışımı üzerine 10 µl su mRNA karışımı ilave edildi.
- Buz üzerinde yavaşca 2 kez pipetajlandı.
- Üzerindeki köpükler hafif döndürülerek giderildi.
- RT gerçekleştirilene kadar buz üzerinde tutuldu.

1. Reaksiyon karışımı dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve aşağıda belirtilen sıcaklık döngüleri kullanılarak cDNA reaksiyonları Bio Rad cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında elde edilen cDNA'lar -20^{o}C'de saklandı.

Tablo 3-8:Reaksiyon döngüleri.

	1.adım	2.adım	3.adım	4.adım
Derece	25	37	85	4
Zaman	10 dk	120dk	5 dk	∞

3.6.5. İKİNCİ NORMALİZASYON

İkinci normalizasyon işlemi için, çalışılan her bir hedef genin ifade düzeyleri, (U44) housekeeping geni ile karşılaştırılarak belirlendi.

Tablo 3-9:miRNA primerlerin özellikleri

Primer/Prob	**Dizi**	**Uzunluk (bç)**
miR-21-5p ileri primer	GACCAACACCAGTCGATGG	19
miR-21-5p geri primer	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGG AAGAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGC CTTCTTTCACAGCCCA	69
miR-193b-3pp ileri primer	GGAACTGGCCCTCAAAGT	18
miR-193b-3pp geri primer	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGG AAGAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGC CTTCTTTCAGCGGGAC	69
miR-484 ileri primer	TCAGGCTCAGTCCCCTC	17
miR-484 geri primer	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGG AAGAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGC CTTCTTTCATCGGGAG	69
U44 ileri primer	CCTGGATGATGATAAGCAAATGC	23
U44 geri primer	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGG AAGAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGC	70

	CTTCTTTCAGTCAGTTA	

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve kontrol grubunun verileri

PARP1, BRCA1, miR-21-5p, miR-193b-3p ve miR-484 genlerin ifade düzeyleri, KAH tanısı konulan 50 hasta ve 50 sağlıklı kontrolde tespit edildi. Hasta ve kontrol grubun demografik ve klinik verileri Tablo 4-1'de gösterilmektedir.

Tablo 4-1:Hasta ve kontrol grunbunun verileri.

		Hasta	Kontrol	P değeri
Yaş		63,9±10,5	60.5±9,2	0,08[a]
Cinsiyet	Kadın	27	22	0,64[b]
	Erkek	23	28	
Sigara	İçen	10	4	0,15[b]
	İçmeyen	32	32	
Hipertansiyon	Var	22	16	0,80[b]
	Yok	21	25	
Diyabet	Var	17	10	0,14[b]
	Yok	26	31	
Aile öyküsü	Var	18	16	0,79[b]
	Yok	25	26	

Ortalama±standart sapma;Student t testi [a] , [b]χ^2 testi/ Fisher testi.

4.2. KAH ve Kontrol gruplarının gen ifadeleri

Çalışmaya dahil ettiğimiz tüm bireylerin her biri için PARP1, BRCA1, miRNA21-5p (miR-21-5p), miRNA193b-3p (miR-193b-3p) ve miRNA484 (miR-

484) genlerinin $2^{-\Delta CT}$ değeri hesaplanmıştır. Tablo 4.2 de görüldüğü üzere, hasta ve kontrol grupları arasında $2^{-\Delta CT}$ hesaplamasına göre gen ifade düzeyleri arasında fark tespit edilmemiştir.

Tablo 4-2: Hasta ve kontrol grubunun gen ifadeleri.

	Hasta	**Kontrol**	**P değeri** [a]
miR-193b-3p	0,31±1,02	0,25±0,72	0, 7176
miR-21-5p	1,57±6,11	0,54 ±1,96	0, 2588
miR-484	13,71±32,62	17,45±36,46	0, 1741
PARP1	247,91±363,43	329,51±632,49	0, 2118
BRCA1	0,02±0,03	0,06±0,19	0, 1261

Student t testi [a]

Ayrıca ΔCT(ort) değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin hesaplaması yapıldı. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri Schmittgen ve Livak'ın 2008'de önerdiği denkleme göre her grup için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri tespit edildi. Bunun için, hasta grubuna ait ΔCT grup ortalamalarından kontrol grubu ΔCt grup ortalamaları çıkarılarak, hasta grubuna ait ΔΔCT (Delta Delta Ct) elde edildi. Elde edilen değerler ΔΔCt değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne uygulanarak kat değişimleri hesaplandı.

KAH'da, BRCA1 ifade düzeyinin kontrol grubuna göre 0,353 kat oranında azaldığı görülmektedir (Tablo 4-3).

Tablo 4-3:BRCA1 geninin hasta ve kontroldeki ifade değerleri.

	BRCA1(Ort)	**ACTB(Ort)**	**ΔC_T(Ort)**	**$\Delta\Delta C_T$ (Ort)**	**$-2^{\Delta\Delta CT}$**
HASTA	32,687	24,050	8,637	1,502	0,353
NORMAL	30,750	23,615	7,135	0	1

KAH'da, PARP1 ifade düzeyinin kontrol grubuna göre 0,332 kat oranında azaldığı görülmektedir (Tablo 4-4).

Tablo 4-4:PARP1 geninin hasta ve kontroldeki ifade değerleri.

	PARP1(Ort)	**ACTB(Ort)**	**ΔC_T(Ort)**	**$\Delta\Delta C_T$ (Ort)**	**$-2^{\Delta\Delta CT}$**
HASTA	21,561	24,050	-2,489	1,592	0,332
NORMAL	19,534	23,615	-4,081	0	1

KAH'da, miR-21-5p ifade düzeyinin kontrol grubuna göre 0,734 kat oranında azaldığı görülmektedir (Tablo 4-5).

Tablo 4-5:miR-21-5p geninin hasta ve kontroldeki ifade değerleri.

	miR-21-5p (Ort)	**ACTB(Ort)**	**ΔC_T(Ort)**	**$\Delta\Delta C_T$ (Ort)**	**$-2^{\Delta\Delta CT}$**
HASTA	35,159	29,001	6,158	0,446	0,734
NORMAL	19,534	28,894	5,712	0	1

KAH'da, miR-193b-3p ifade düzeyinin kontrol grubuna göre 0,876 kat oranında azaldığı görülmektedir (Tablo 4-6).

Tablo 4-6:miR-193b-3p geninin hasta ve kontroldeki ifade değerleri.

	miR-193b-3p(Ort)	**ACTB(Ort)**	**ΔC_T(Ort)**	**$\Delta\Delta C_T$ (Ort)**	**$-2^{\Delta\Delta CT}$**

HASTA	35,661	29,001	6,660	0,191	0,876
NORMAL	35,363	28,894	6,469	0	1

KAH'da, miR-484 ifade düzeyinin kontrol grubuna göre 1,231 kat oranında arttığı görülmektedir (Tablo 4-7).

Tablo 4-7:miR-484 geninin hasta ve kontroldeki ifade değerleri.

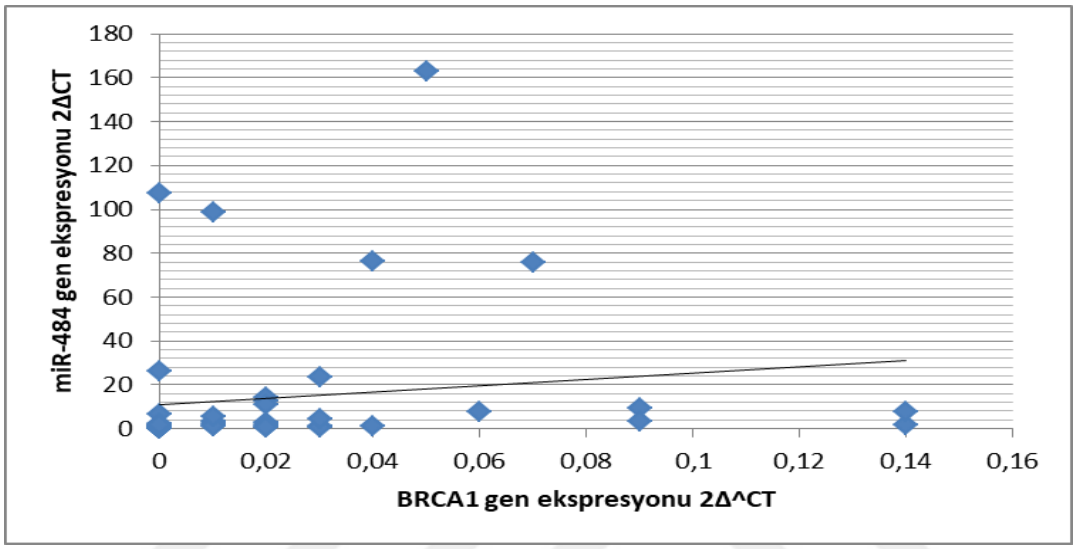
	miR484(Ort)	**ACTB(Ort)**	**ΔC_T(Ort)**	**$\Delta\Delta C_T$ (Ort)**	**$-2^{\Delta\Delta CT}$**
HASTA	27,597	29,001	-1,404	-0,300	1,231
NORMAL	27,790	28,894	-1,104	0	1

PARP1, BRCA1, miR-21-5p, miR-193b-3p ve miR-484 genlerine ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 0,9-1,1 aralığına göre de değerlendirildi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 0,9 değerinden küçük ise söz konusu genin ifadesinin azaldığı, 0,9-1,1 aralığında ise ilgili genin ifadesinin değişmediği, 1,1 değerinden büyük ise hedef genin ifadesinin arttığı kabul edildi. Bu değerlendirmeye göre hastalarda kontrole göre BRCA1 gen ifade değeri %48 oranında arttığı, %56 oranında azaldığı tespit edilmiştir. PARP1 gen ifadesi kontrole göre %32 oranında arttığı, %68 oranında azaldığı tespit edildi. miR-193b-3p gen ifade değeri %56 oranında artmış, %44 oranında ise azaldığı görüldü. miR-21-5p gen ifade değeri ise %56 oranında arttığı, %4 oranında değişmediği ve %40 oranında azaldığı görüldü. miR-484 gen ifade değeri %54 oranında arttığı, %4 oranında değişmediği ve % 42 oranında azaldığı tespit edildi.

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunlarında BRCA1 gen ifade düzeyleri ile miR-484 ifade düzeyleri arasındaki ve PARP1 gen ifade düzeyleri ile miR-

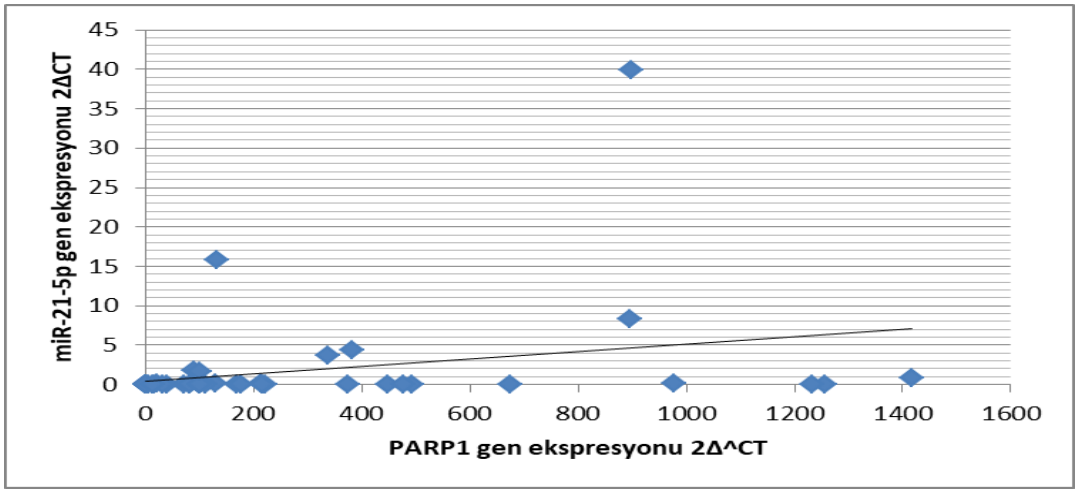
193b-3p ve miR-21-5p ifade düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceledik. Karşılaştırma Spearman's Rho testine göre yapıldı.

Hasta grubunun, BRCA1 ve miR-484 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptandı (r=0,56; p=0,000023).



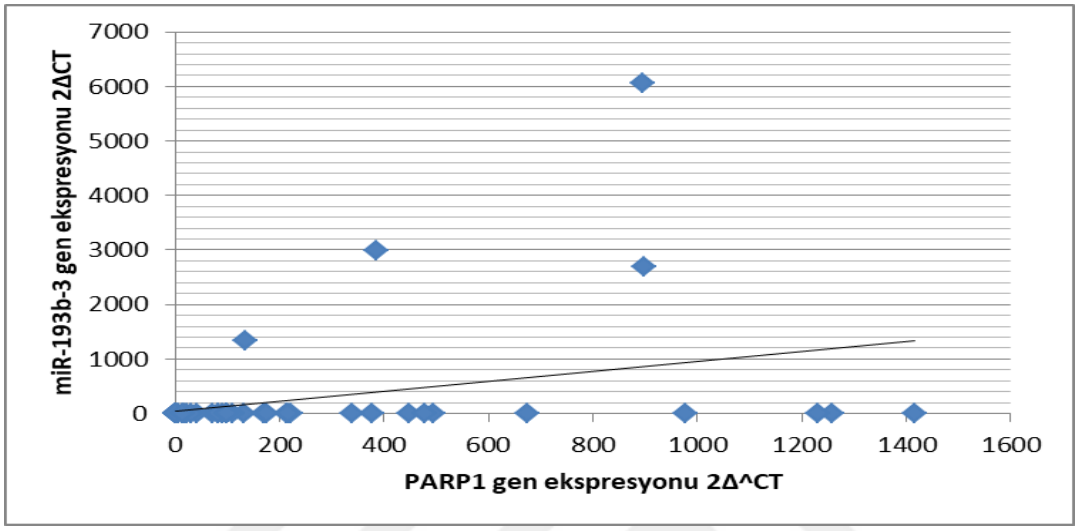
Şekil 4-1: Hasta BRCA1 ve miR-484 gen ifade düzeyi karşılaştırılması.

Hastagrubunun, PARP1 ve miR-21-5p gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptandı (r=0,66;p=0,0001).



Şekil 4-2:Hasta PARP1 ve miR-21-5p genifade düzeyi karşılaştırılması.

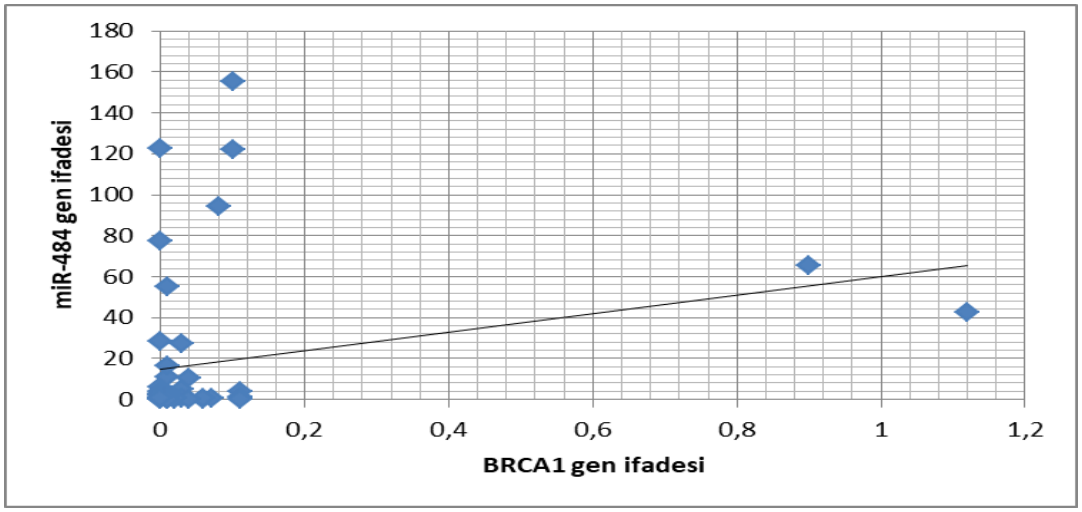
Hasta grubunun PARP1 ve miR-193b-3p gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptandı (r=0,66; p=0,0001).



Şekil 4-3:Hasta PARP1 ve miR-193b-3p gen ifade düzeyi karşılaştırılması.

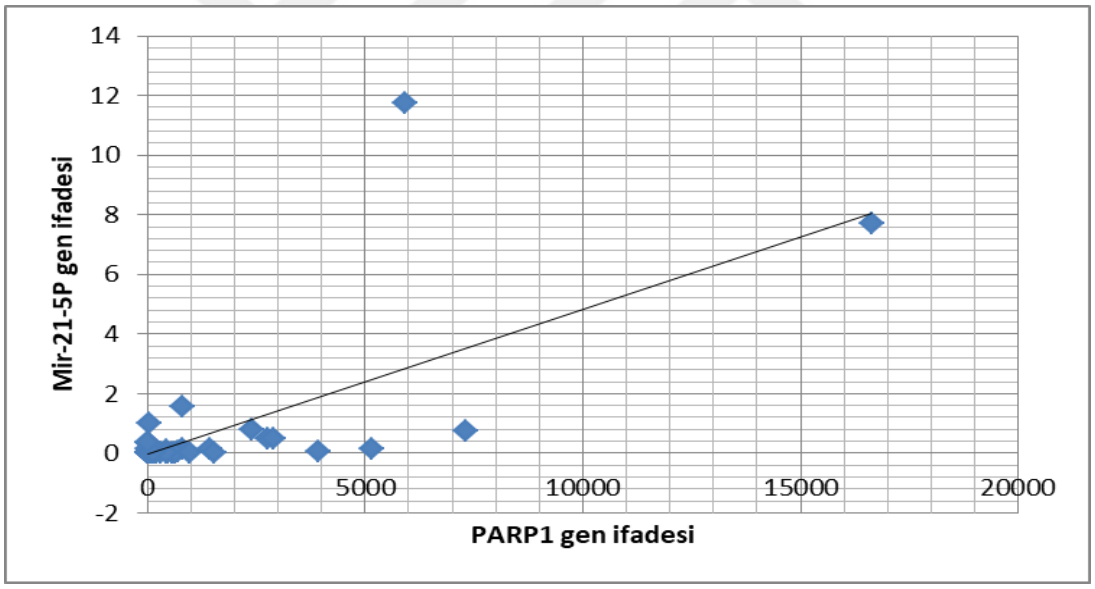
Çalışmamızda ayrıca kontrol grubunda da PARP1 gen ifade düzeyleri ile miR-193b-3p ve miR-21-5p ifade düzeyleri arasındaki ve BRCA1 gen ifade düzeyleri ile miR-484 ifade düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceledik.

Kontrol grubunun BRCA1 ve miR-484 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatistiksel olarak pozitif yönde fakat istatistiksel olarak anlamsız korelasyon saptandı (r=0,07; p=0,58476).



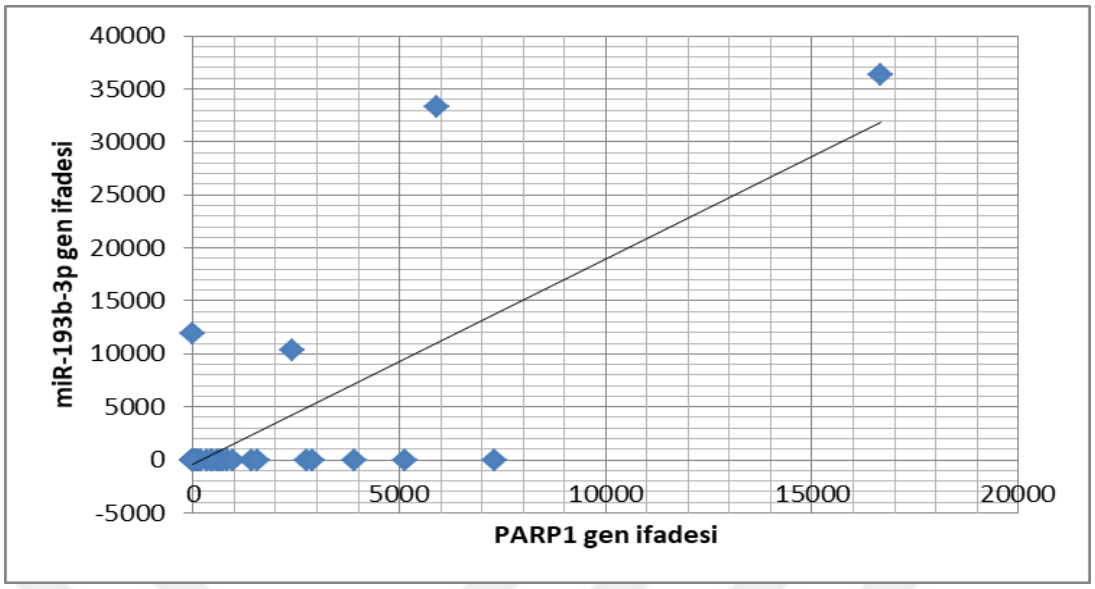
Şekil 4-4:Kontrol BRCA1 ve miR-484 gen ifade düzeyi karşılaştırılması.

Kontrol grubunun, PARP1 ve miR-21-5p gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptandı (r=0,47109; p=0,00055).



Şekil 4-5:Kontrol PARP1 ve miR-21-5p gen ifade düzeyi karşılaştırılması.

Kontrol grubunun, PARP1 ve miR-193b-3p gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptandı (r=0,403; p=0, 00371).



Şekil 4-6: Kontrol PARP1 ve miR-193b-3p gen ifade düzeyi karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Koroner arter hastalığı (KAH), koroner kalp hastalığı (KKH) ya da iskemik kalp hastalığı (İKH) olarakta bilinir. KAH dünyada ve ülkemizde vaka sayısı giderek artan kronik bir hastalıktır. Kalp kasını besleyen damarlarda plak gelişmesi ve plağın damarlarda kan akımına engel olması ile gelişen ve ilerleyen bir inflamasyon hastalığıdır. Hastalığın gelişmesini önlemeye yönelik çalışmalarda, KAH'la ilgili genler ve bu genlerle ilişkisi moleküller tespit edilmeye çalışılmaktadır (Qing Wang, 2005). KAH'lığının tedavisine yönelik çalışmalar yapılsada, sonuçlar henüz tam anlamıyla tatmin edici değildir.

Çalışmamızda KAH patogenezinde rol oynadığı düşünülen DNA hasarının tamirinde rol oynayan PARP1 ve BRCA1 genlerinin ifade düzeylerini araştırdık. Konrol grubu ile kıyasladığımızda KAH'nda gen ifade düzeylerinin değişmediğini tespit ettik. Diğer yandan hastaların PARP1 gen ifade düzeyinin hastaların %68'nde düşmüş olduğunuda tespit ettik. Bu konuda yapılmış çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Kronik kalp rahatsızlıklarında yapılan çalışmalarda ROS'un artış gösterdiği ve bu durumun DNA hasarlarına yol açtığı bildirilmiştir. DNA hasarına yanıt olarak PARP1 aktivitesinin arttığı ve bu durumun kardiyomiyosit ve endotel hücrelerdinde NAD seviyesinin düşmesine ve buna bağlı olarak glikolizin ve ATP üretiminin azalmasına yol açtığı bildirilmiştir. Bu değişiklikler kardiyomiyosit ve endotel hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır. Bu nedenle bu tip hastalıklarda PAPR1 inhibitörlerinin kullanımının faydalı olacağı bildirilmiştir (Pal Pacher; 2006).

Aterosklerotik plak oluşmuş hastalar ile yapılan çalışmalarda, bu hastalardaki inflamatuvar yanıtın PARP1 enziminin aktivasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalarda, tetrasiklin, minosiklin ve doksusiklin gibi ilaçların kullanılmasının, hastalarda PARP1 enziminin aktivitesini düşürdüğü ifade edilmektedir (Suowen Xu ve ark. 2014).

NO düzensizliği ve artmış OS kalp yetmezliğine yol açtığı bildirilmiştir. NO PARP1 enzim aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Bu çalışma PARP1'in farmokolojik yöntemle susturulmasının kalp yetmezliğinde umut verici tedavi yöntemi olabileceğini düşündürüyor (Pal Pacher ve ark. 2005).

Zagazig Universitesi'nde diyabetik kardiak iskemisik hastalarda PARP1 ifadesine bakılmış, hastalarda PARP1 ifadesinin artmış olduğu görülmüştür. PARP-1 inhibisyonunun inflamasyonda, hipertansiyonda ve epitelyal fonksiyon bozukluğunda düzelmeye yol açtığı tespit edilmiştir (Esraa Zakaria ve ark. 2016).

Ateroskleroz sürecinde damar duvarında gelişen kalsifikasyonda, PARP1 ve diğer genlerin rolünün araştırıldığı bir çalışmada, PARP1'in yüksek ifade düzeyi tespit edilmiştir. Ayrıca osteoblast farklılaşmasında etkili olan Runx2/Cbfa1 gen ifade düzeyinde tespit edilen artışın kalsifikasyon gerçekleşmesine neden olduğu tespit edilmiştir (Peng Li ve ark. 2020).

Abdominal aorta anevrizma olan farelerde yapılan çalışmada, PARP1 seviyesi incelenmiş ve enzimin yüksek seviyesi tespit edilmiştir (Er-shun Liang ve ark. 2018). Bir başka çalışmada, Mİ'lü farelerin kalp dokusunda PARP1'in yüksek gen ifadesi tespit edilmiştir (Del Re DP ve ark. 2019). PARP1'in yüksek ifadesinin kardiomiyositlerde hücreyi nekroza götürdüğü görülmüştür. Bu sonuçlara göre PARP1 gen ifade düzeyinin susturulmasının farelerde kalp hücrelerine koruyucu etkisi tespit edilmiştir (Del Re DP ve ark. 2019).

Hipertrofik kardiyomiyopatili farelerde PARP1 ifade düzeyine bakılmıştır. Çalışmada PARP-1 seviyesinin yüksek olduğu bulunmuştur ve bu hastalıkta PARP1 inhibisyonunun törapetik amaçla etkili olacağı düşünülmüştür (Pal Pacher ve ark. 2002).

Kalp hastalıklarında ROS- PARP1 yolağının kardiak ve endotelyal fonksiyon bozukluğuna yol açtığı ifade edilmektedir (Andrabi ve ark. 2006).

Yapılan çalışmaların çoğunluğundan çıkan sonuç, kalp rahatsızlarında PARP1 seviye ve ifadesinin arttığı yönündedir. Bununla beraber bizim çalışmamızda herhangi bir artış tespit edilmemiştir. Bu farkın sebebi, bizim çalışmamızın kan hücrelerindeki ifade düzeyini araştırmamızdan kaynaklanıyor olabilir. Çünkü yapılan diğer çalışmaların çoğunluğunda dokular kullanılmıştır.

Bir tümör süpresör gen olarak BRCA1'in endotel hücrelerini DNA hasarından koruyabileceği ile ilgili yapılan bir çalışmada, BRCA1 'in fonksiyon kaybı ve kazanımı durumları karşılaştırılmış ve BRCA1 ifadesinin endotel hücrelerini apopitozdan koruduğu ve dolayısı ile aterosklerotik sürecin düzeltilmesi yönünde rolü olduğu ifade edilmiştir (Krishna K.Singh ve ark. 2013) ADKH'nde ROS'un yol açtığı DNA hasarlarının düzeltilmesinde BRCA1'in rolü ile ilgili yapılan bir

çalışmada, yüksek BRCA1 ifadesine sahip sıçanlarda düşük tansiyon ve ROS tespit edilmiştir (YiPanMD ve ark. 2013).

Bizim çalışmamızda BRCA1 gen ifade düzeyleri arasında bir fark tespit edilmemiş olmasının sebebi, yine doku ile kan hücreleri arasındaki farktan kaynaklanabilir.

miRNA'lar gen ifadesinin düzenlemede rol oynayan moleküllerdir. Hücre proliferasyonu, göçü, yağ metabolizması, apoptoz, embriyogenez gibi süreçlerde gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Vasküler inflamasyonda rol oynayan hücrelerin miR ifade düzeyleri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Weber ve ark., 2010).

KAH'da hücre proliferasyonu, göçü, apoptozu, ayrıca inflamatuvar yanıtda rol oynayan ve BRCA1 gen ifadesinin düzenleyicisi olan miR-484 ifade düzeyini incelemek amacı ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde, KAH hasta kan örneklerinde, miR-484 ifade düzeyinin azaldığı görülmüştür (Weber ve ark. 2011). Bir başka çalışmada da KAH hastalarında miR-484 düzeyi yüksek bildirilmiş. Atorvastatin tedavisi ile lipit seviyesindeki düşmenin hastalardaki miR-484 seviyesinde düşmeye yol açtığı not edilmiştir (Elsa Bronze-da-Rocha; 2014). Bizim çalışmamızda ise bu iki çalışmadan farklı olarak, miR-484 düzeyinde herhangi bir fark tespit edilmemiştir.

miR-484'ün kardiyomiyositlerde mitokondrial bölünmeyi inhibe ederek apoptoza yol açtığı hipotezi üzerine yapılan çalışmada, miR-361'in miR-484 olgunlaşmasını engelleyerek apoptoza yol açtığı tespit edilmiştir (Kun Wang ve ark. 2014).

PARP1 gen ifade düzeyinin düzenleyicisi olan miR-21-5p ile ile yapılan çalışmaların birinde, Mİ gelişmesinde miR'lerın ifade düzeyi farelerde incelenmiş ve miR-21-5p ile miR-361-5p serum ifade düzeyinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Mark W. Feinberg 2016). Sigaraya bağlı gelişen aterosklerozda miRNA ifadelerini araştıran bir çalışmada, sigaraya uzun süre maruz bırakılan farelerde, miR-21 ifadesinin daha fazla arttığı gözlemlenmiştir (Yuka Yokoyama ve ark., 2018). Tayvan'da akut skemik inme geçirmiş hastaların serumunda miR-21 düzeyleri incelenmiş ve önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (Chien Tsai ve ark., 2013).

Akut miyokart infarktüsü (AMİ) olan hastalar ile yapılan bir başka çalışmada, kardiak troponin (cTnI) ve miR-21-5p serum düzeyi ölçülmüştür. AMİ'de miR-21-5p ifade düzeyinin arttığını ve serum cTnI ile korrelasyon gösterdiği bildirilmiştir. miR-21-5p'in AMİ'de yeni ve güçlü belirteç olabileceği vurgulanmıştır (Feng Wang ve ark., 2014).

miR-21-5p düzeyinin kardiyovasküler öyküsü olan tip 2 diyabetik (T2DM) hastalarda, kardiyovasküler öyküsü olmayan T2DM'lu hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Fabiola Olivieri, 2015).

İskemik inme geçirmiş hastaların serum düzeyinde miR-21'in azalmış olduğu bildirilmiş ve biobelirteç olarak kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (Mani Panagal ve ark., 2019).

Farklı kalp rahatsızlıklarında miR-21'in yüksek ve azalmış düzeyleri bildirilmiş olup, çalışmamızda miR-21 seviyesinde herhangi bir fark tespit edilmemiştir.

Kardiovasküler hastalık sonucu gelişen küçük ve büyük abdominal aorta anevrizmasında miRNA'ın ifade düzeyini incelemek için kadavra dokularında 2549 mikroRNA düzeyleri incelenmiş ve PARP1 ifade düzeyinin belirleyicilerinden biri olan miR-193b-3p ifadesinde azalma tespit edilmiştir (Vaclava Cerna v ark., 2019).

miR-193b-3p'nin inflamasyon sürecinde rol oynayan bir enzim olan 5-LOX'un 3'UTR bölgesinde bağlanarak onun inhibisyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. MiR-193b-3p, 5-LOX ifadesini azaltarak fokal serebral I/R yaralanmalarında potansiyel nöroprotektif bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (ZhihaoChen ve ark., 2020).

Stabil KAH ve stabil olmayan KAH'larındaki serum miR-193b-3p düzeylerinin kontrol grubu ile benzer olduğu tespit edilmiş ve miR-193b-3p önemli belirteç olmadığı kararına varılmıştır (Sandeep Singh ve ark. 2020). Bizim sonuçlarımız da bu çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir.

Kalp yetmezliği (KY) olan hastalar ile yapılan çalışmada ise miR-193b-3p düzeyinin kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edilmiştir (Lee Lee Wong ve ark., 2014). Aynı hasta grubu ile yapılan bir başka çalışmada da, miR-193b-3p düzeyinin azaldığı gözlemlenmiştir (Eline L. Vegter ve ark., 2015).

Hipertrofik kardiyomiyopatili hastalar ile yapılan çalışmada, miR-193b-3p ifade düzeyinin kontrol gruba kıyasla azaldığı görülmüştür (Eline L. Vegter, 2015).

Akut kap yetmezliği olan hastaşlarlada yapılan çalışmalarda da, miR-193b-3p düşük düzeyde eksprese olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızın sonuçları, araştırdığımız moleküllerin gen ifade düzeylerinde herhangi bir farklılık olmadığını göstermiştir. Literatürdeki bulgularla olan farklılığımızın sebebi, çalışmalardaki örnek kaynağındaki farklılıklardan, hastalık patolojilerinin altında yatan mekanizma farklılıklarının incelenen moleküllere olan etkilerinden ve örnek sayımızın sınırlı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Diğer yandan, BRCA1 ve PARP1 gen ifadesi ile bu moleküllerin düzenleyicisi olan miR-RNA gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki, BRCA1 ve PARP1 ile bu moleküller arasındaki ilişkinin (düzenleyici fonksiyon) doğruluğunu desteklemektedir.

KAYNAKLAR

Ali Zare, Alireza Ahade, Pegah Larke et al. (2018). "The clinical significance of miR-335, miR-124, miR-218 and miR-484 downregulation in gastric cancer." *Molecular biology reports* vol. **45,6**:1587-1595.

Anabel Varela Carver, Howard Parker, Christina Kleinert and Ornella Rimoldi. (2010). "Adverse Effects of Cigarette Smoke and Induction of Oxidative Stress in Cardiomyocytes and Vascular Endothelium", *Current Pharmaceutical Design.* **16**: 2551.

Vishnoi A, Rani S. (2017). MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol*.**1509**:1-10.

Angelini S, Kumar R, Carbone F, et al. (2005). Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. *Mutat Res*. **570(1)**:105-117.

Vasilenko, N.L., Nevinsky, G.A. (2003). Enzymes of Direct, Excision, and Mismatch DNA Repair in Pro- and Eukaryotes and Their Biological Role. *Molecular Biology* **37**:803–817.

Athyros VG, Kakafika AI, Karagiannis A, Mikhailidis DP. (2008). Do we need to consider inflammatory markers when we treat atherosclerotic disease?. *Atherosclerosis*. **200(1)**:1-12.

Banáth JP, Fushiki M, Olive PL.(1998). Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. **73(6):**649-660.

Bartek J, Lukas J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol*. **13(6)**:738-747.

Bartel DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. **116(2)**:281-297.

Brzovic PS, Rajagopal P, Hoyt DW, King MC, Klevit RE. (2001). Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat Struct Biol*. **8(10)**:833-837.

Caldecott KW. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. **2(9)**:955-969.

Carles J, Monzo M, Amat M, et al. (2006).Single-nucleotide polymorphisms in base excision repair, nucleotide excision repair, and double strand break genes as markers for response to radiotherapy in patients with Stage I to II head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. **66(4)**:1022-1030.

Djuzenova C, Mühl B, Schakowski R, Oppitz U, Flentje M. (2004).Normal expression of DNA repair proteins, hMre11, Rad50 and Rad51 but protracted formation of Rad50 containing foci in X-irradiated skin fibroblasts from radiosensitive cancer patients. *Br J Cancer*. **90(12)**:2356-2363.

Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL, et al. (2005). Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*.**11(13)**:4802-4809.

Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GD, Boehning D. (2012) Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J*. **1(1)**:e201204005.

Dahariya S, Paddibhatla I, Kumar S, Raghuwanshi S, Pallepati A, Gutti RK. (2019). Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Mol Immunol*. **112**:82-92.

Daley JM, Sung P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*. **34(8)**:1380-1388.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. **432(7014)**:231-235.

Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, et al. (1986). Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol*. **57(6)**:450-458.

Zare A, Ahadi A, Larki P, et al. (2018). The clinical significance of miR-335, miR-124, miR-218 and miR-484 downregulation in gastric cancer. *Mol Biol Rep*. **45(6)**:1587-1595.

Duncan JA, Reeves JR, Cooke TG. (1998). BRCA1 and BRCA2 proteins: roles in health and disease. *Mol Pathol*. **51(5)**:237-247.

Mets E, Van der Meulen J, Van Peer G, et al. (2015). MicroRNA-193b-3p acts as a tumor suppressor by targeting the MYB oncogene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. **29(4)**:798-806.

Ahmed EA, de Boer P, Philippens ME, Kal HB, de Rooij DG. (2010). Parp1-XRCC1 and the repair of DNA double strand breaks in mouse round spermatids. *Mutat Res*. **683(1-2)**:84-90.

Falk E, Shah PK, Fuster V. (1995). Coronary plaque disruption. *Circulation*. **92(3)**:657-671.

Lovren F, Pan Y, Quan A, et al. (2014). BRCA1 shields vascular smooth muscle cells from oxidative stress. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **147(6)**:1946-1955.

Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. (2010). Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **30(7)**:1282-1292.

Trevisani F, Ghidini M, Larcher A, et al.(2016). MicroRNA 193b-3p as a predictive biomarker of chronic kidney disease in patients undergoing radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. **115(11)**:1343-1350.

Song Q, Song J, Wang Q, et al. (2016). miR-548d-3p/TP53BP2 axis regulates the proliferation and apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Med*. **5(2)**:315-324.

Glass CK, Witztum JL. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. **104(4)**:503-516.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*.**123(4)**:631-640.

Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. (1998). Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol*. **32(5)**:1454-1459.

Janet Hall, Virginie Marcel, Celeste Bolin, Marie Fernet, Laurence Tartier, Laurence Vaslin, Pierre Hainaut. (2009). The associations of sequence variants in

DNA-repair and cell-cycle genes with cancer risk: genotype–phenotype correlations. *Biochem Soc Trans*. **37 (3)**:527–533.

Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*. **250(4988)**:1684-1689.

Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB, et al. (2008). Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque?. *Prog Cardiovasc Dis*. **51(3)**:183-194.

Rauhala HE, Jalava SE, Isotalo J, et al. (2010). miR-193b is an epigenetically regulated putative tumor suppressor in prostate cancer. *Int J Cancer*. **127(6):**1363-1372.

Caligiuri, G., Rudling, M., Ollivier, V. et al. (2003). Interleukin-10 Deficiency Increases Atherosclerosis, Thrombosis, and Low-density Lipoproteins in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Mol Med.* **9**:10–17

Henderson BR. (2005). Regulation of BRCA1, BRCA2 and BARD1 intracellular trafficking. *Bioessays*. **27(9)**:884-893.

Herceg Z, Wang ZQ. (2001). Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res*. **477(1-2)**:97-110.

Hoeijmakers JH. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. **361(15)**:1475-1485.

Ko HL, Ren EC. (2012). Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules*. **2(4)**:524-548.

Wakabayashi I. (2017). Gender differences in cardiovascular risk factors in patients with coronary artery disease and those with type 2 diabetes. *J Thorac Dis*. **9(5)**:E503-E506.

Iyama T, Wilson DM 3rd. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. **12(8)**:620-636.

Hwang JW, Chung S, Sundar IK, et al. (2010). Cigarette smoke-induced autophagy is regulated by SIRT1-PARP-1-dependent mechanism: implication in pathogenesis of COPD. *Arch Biochem Biophys*. **500(2)**:203-209.

Merhautova J, Hezova R, Poprach A, et al. (2015). miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib. *Biomed Res Int*. **2015**:941980.

Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. (2009). The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. **202(2)**:321-329.

Jeppesen DK, Bohr VA, (2011). Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*. **94(2)**:166-200.

Zhang J, Qin J, Su Y. (2017). miR-193b-3p possesses anti-tumor activity in ovarian carcinoma cells by targeting p21-activated kinase 3. *Biomed Pharmacother*. **96**:1275-1282.

Meloche J, Pflieger A, Vaillancourt M, et al. (2014). Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. **129(7)**:786-797.

Zhang J. (2013). The role of BRCA1 in homologous recombination repair in response to replication stress: significance in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Biosci*. **3(1)**:11.

Gray K, Kumar S, Figg N, et al. (2015). Effects of DNA damage in smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res*. **116(5)**:816-826.

Singh KK, Shukla PC, Quan A, et al. (2013). BRCA1 is a novel target to improve endothelial dysfunction and retard atherosclerosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **146(4)**:949-960.

Kulaksız G, Sancar A. (2007). Nükleotid Eksizyon Onar›m› ve Kanser. Türk Biyokimya Dergisi. ***32 (3)***:104-111.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. **294(5543)**:853-858.

Langelier MF, Planck JL, Roy S, Pascal JM. (2011). Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *J Biol Chem*. **286(12)**:10690-10701.

Martin LJ. (2008). DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. **67(5)**:377-387.

Lei EP, Silver PA. (2002). Protein and RNA export from the nucleus. *Dev Cell*. **2(3)**:261-272.

Levy D, Murabito JM, Anderson KM, Christiansen JC, Castelli WP. (1992). Echocardiographic left ventricular hypertrophy: clinical characteristics. The Framingham Heart Study. *Clin Exp Hypertens A*. **14(1-2)**:85-97.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK.(2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. **473(7347)**:317-325.

Libby P. (1995). Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. **91(11)**:2844-2850.

Libby P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev*. **65(12 Pt 2)**:140-S146.

Luna A, Aladjem MI, Kohn KW. (2013). SIRT1/PARP1 crosstalk: connecting DNA damage and metabolism. *Genome Integr*. **4(1)**:6.

Melli Mahmoudi, John Mercer, Martin Bennett. (2006). DNA damage and repair in atherosclerosis, *Cardiovascular Research*. 71(2):259–268.

Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. (2011). Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology*. **77(5)**:1265.e9-1265.e1.265E16.

Mallika V, Goswami B, Rajappa M. (2007). Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. *Angiology*. **58(5)**:513-522.

Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, Miron A, Iglehart JD, Richardson AL. (2005). BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res Treat*. **91(2)**:179-186.

Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. **125(5)**:887-901.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. **266(5182)**:66-71.

Niwa Y, Oyama T, Nakajima T. (2000). BRCA1 expression status in relation to DNA methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast cancers. *Jpn J Cancer Res*. **91(5)**:519-526.

Paterson JW. (1998). BRCA1: a review of structure and putative functions. *Dis Markers*. **13(4)**:261-274.

Pierce AJ, Stark JM, Araujo FD, Moynahan ME, Berwick M, Jasin M. (. 2001). Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol*. **11(11)**:S52-S59.

Prasad R, Horton JK, Dai DP, Wilson SH. (2019). Repair pathway for PARP-1 DNA-protein crosslinks. *DNA Repair (Amst)*. **73**:71-77.

Ridker PM, Silvertown JD. (2008). Inflammation, C-reactive protein, and atherothrombosis. *J Periodontol*. **79(8 Suppl)**:1544-1551.

Jackson SP, Bartek J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. **461(7267)**:1071-1078.

Satoh MS, Poirier GG, Lindahl T. (1994). Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry*. **33(23)**:7099-7106.

Lee ES, Won YJ, Kim BC, et al. (2016). Low-dose irradiation promotes Rad51 expression by down-regulating miR-193b-3p in hepatocytes. *Sci Rep*. **6**:25723.

Sayols-Baixeras S, Lluís-Ganella C, Lucas G, Elosua R. (2014). Pathogenesis of coronary artery disease: focus on genetic risk factors and identification of genetic variants. *Appl Clin Genet*. **7**:15-32.

Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. (2009). Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res*. **335(1)**:191-203.

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*. **531(1-2)**:231-251.

Ramachandran SS, Muiwo P, Ahmad HM, et al. (2017). miR-505-5p and miR-193b-3p: potential biomarkers of imatinib response in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. **58(8)**:1981-1984.

Xu S, Bai P, Little PJ, Liu P. (2014). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) in atherosclerosis: from molecular mechanisms to therapeutic implications. *Med Res Rev*. **34(3)**:644-675.

Tabas I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*. **10(1)**:36-46.

Triboulet R, Chang HM, Lapierre RJ, Gregory RI. (2009). Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor. *RNA*. **15(6)**:1005-1011.

Eyileten C, Wicik Z, De Rosa S, et al. (2018). MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Ischemic Stroke-A Comprehensive Review and Bioinformatic Analysis. *Cells*. **7(12)**:249.

Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği, Koroner Arter Hastalığı, 2018.

King BS, Cooper KL, Liu KJ, Hudson LG. (2012). Poly(ADP-ribose) contributes to an association between poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xeroderma pigmentosum complementation group A in nucleotide excision repair. *J Biol Chem*. **287(47)**:39824-39833.

Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG. (2003). PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol*. **31(6)**:446-454.

Virani SS, Polsani VR, Nambi V. (2008). Novel markers of inflammation in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. **10(2)**:164-170.

Wang Q, Zhang H, Guerrette S, et al. (2001). Adenosine nucleotide modulates the physical interaction between hMSH2 and BRCA1. *Oncogene*. **20(34)**:4640-4649.

Warmoes M, Jaspers JE, Pham TV, et al. (2012). Proteomics of mouse BRCA1-deficient mammary tumors identifies DNA repair proteins with potential diagnostic and prognostic value in human breast cancer. *Mol Cell Proteomics*. **11(7)**:M111.013334.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. **11(3)**:228-234.

Witztum JL, Lichtman AH. (2014). The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. **9**:73-102.

Yang JS, Lai EC. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell*. **43(6)**:892-903.

Hu Y, Xie H, Liu Y, Liu W, Liu M, Tang H. (2017). miR-484 suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SMAD2 in cervical cancer cells [published correction appears in Cancer Cell Int. 2020 Jul 17;20:318]. *Cancer Cell Int*. **17**:36.

Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN. (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res*. **34(16)**:4622-4629.

Yoshida K, Miki Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. **95(11)**:866-871.

Yokoyama Y, Mise N, Suzuki Y, et al. (2018). MicroRNAs as Potential Mediators for Cigarette Smoking Induced Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* **19(4)**:1097. Wu, J., Lu, L. & Yu, X. The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein Cell* **1,** 117–123 (2010).

Zeng Y, Cullen BR.. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem*. **280(30)**:27595-27603.

Zhang C. (2008). The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol*. **103(5)**:398-406.

Xiaoxiao Zhang, Yan Zeng. (2010). The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer, *Nucleic Acids Research*. **38(21)**:7689–7697.

Ko, H.L.; Ren, E.C. (2012). Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules*. **2**:524-548.

Mao Z, Hine C, Tian X, et al. (2011). SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science*. **332(6036)**:1443-1446.

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

KAH'ın kan örneklerinde DNA hasar tamir mekanizmasında görev alan moleküller ile bu moleküllerin regülasyonu ile ilişkili olan mikro RNA'ların gen düzeyinde ifadesini ve mevcut DNA hasarı ile olan ilişkilerini araştırmayı amaçlamaktayız. Araştırmanın ismi "**Koroner arter hastalarında DNA hasar tamir sürecinde rol oynayan moleküllerin ve ilişkili mikro RNA'ların ifadesinin araştırılması**" dır.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ortak katılımı ile KAH'ın teşhisine katkı sağlayacak araştırma gerçekleştirilecektir. Bu çalışmaya katılmanız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Prof.Dr. Bilgehan Karadağ veya çalışmanın beraber yürütüldüğü hekimler tarafından görevlendirilen bir hemşire tarafından, izniniz doğrultusunda operasyon sırasında rutin test için alınan kanlar laboratuvar işlemi sonrası çalışmaya alınacaktır. Bu kanlardan DNA ve RNA elde edilecektir.

- *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Protein Laboratuvarı*'nın yapacağı / katılacağı / katkıda bulunacağı bu bilimsel araştırmada gönüllü hasta olarak yer almanız istenmektedir.

Yer almanız istenen bilimsel araştırma, **ulusal ve uluslararası yasal ve etik mevzuat ve düzenlemelere uygun olarak** tasarlanıp yapılacak ve bu bilimsel araştırmanın öncesinde bağımsız ve yasal bir ulusal **ETİK DEĞERLENDİRME KURULU'nun izni ve onayı** alınmış olacaktır.

Yer almanız istenen bu bilimsel araştırmanın **ulusal ve uluslararası düzeyde bilime özgün katkılar** yapması ve böylece **hastalıkların tanılarının aydınlatılması ve tedavilerinin bulunması yönünde hasta bireylere önemli yararlar** sağlaması beklenmektedir.

Bu bilimsel araştırmada yer almanız için, tarafımızdan size **yazılı olarak gerekli bilgilendirmenin ve sözlü olarak gerekli açıklamanın yapılması**, sizin yazılı bilgilendirme ve sözlü açıklama ile ilgili **her türlü sorunuza tam ve doğru olarak yanıt verilmesi**, sizin bu bilgilendirme ve açıklamayı **tam ve doğru olarak anlamış olmanız** ve sonrasında **ÖZGÜR İRADENİZ VE GÖNÜLLÜ RIZANIZ İLE bu bilimsel araştırmada yer almayı kabul etmiş (bilgilendirilmiş gönüllü olur vermiş) olmanız** ve bu form ile bu **BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR**'unuzun yazılı olarak belgelenmiş olması gerekmektedir.

Bilimsel araştırmalarda yer almayı **KABUL VEYA RED ETMEKTE TAMAMEN ÖZGÜRSÜNÜZ** ve **karar vermek için DÜŞÜNMEK veya başkalarına DANIŞMAK hakkına sahipsiniz**. **KABUL ETMENİZ DURUMUNDA**, bunun için size herhangi bir **ücret ödenmeyecek** ve sizden herhangi bir **ücret talep edilmeyecek** ve size maddi veya manevi hiç bir **kazanç veya kazanım SAĞLANMAYACAK** ve herhangi bir **olumlu ayırım veya ayrıcalık YAPILMAYACAKTIR**. **RED ETMENİZ DURUMUNDA**, size maddi veya manevi hiç bir **kayıp veya zarar OLMAYACAK** ve herhangi bir **olumsuz ayırım veya ayrıcalık YAPILMAYACAKTIR**.

- Yukarıda istendiği gibi bilimsel araştırmada **HASTA BİREY olarak yer almayı KABUL ETMENİZ DURUMUNDA**, SİZE AŞAĞIDA BELİRTİLEN 2 İŞLEM UYGULANACAKTIR:

Çalışmamız için sizden ek kan alınmayacaktır. Rutin test için alınan kan örnekleri işlem sonrası tarafımızdan kullanılacaktır. Alınan kanlar Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında laboratuarda incelenecektir. Araştırmada sizin üzerinizde herhangi bir tedavi veya invaziv bir işlem denenmeyecek, size herhangi bir madde verilmeyecektir. Bu çalışma sizin için bir risk oluşturmayacaktır.

İKİNCİ İŞLEM OLARAK, **bazı kimlik ve kişisel bilgileriniz** (*adınız-soyadınız, cinsiyetiniz, doğum tarihiniz, anneniz-babanız arasında akrabalık*

durumu, düzenli olarak kullandığınız ilaçlar, sigara ve alkol kullanımınız) **sizden öğrenilerek kaydedilecektir**. Bu kimlik ve kişisel bilgileriniz **bilgisayar ortamında saklı ve gizli tutulacak,** herhangi bir yerde **size ait olacak biçimde açıklanmayacak** ve sorumlu/yetkili bilimsel araştırmacılar dışında **başka hiç bir kimse veya kurum/kuruluş tarafından size ait olacak biçimde bilinmeyecektir**.

Sizden alınan **KAN ÖRNEKLERİ**, bu kandan elde edilecek **GENETİK/BİYOLOJİK ARAŞTIRMA MATERYALİ** ve kaydedilen **KİMLİK VE KİŞİSEL BİLGİNİZ**, sadece, **ulusal ve uluslararası yasal ve etik mevzuat ve düzenlemelere uygun** olarak tasarlanıp yapılacak olan, bağımsız ve yasal bir ulusal **ETİK DEĞERLENDİRME KURULU'nun izni ve onayını almış** olan ve söz konusu hastalığın nedenlerinin anlaşılmaya çalışılacağı **bilimsel araştırmalarda kullanılacak olup**, bunun dışında hiç bir şekilde **başka bilimsel amaçlarla veya bilimdışı başka amaçlarla kullanılmayacaktır**. **Kanlarınız hiç bir şekilde yurtdışına gönderilmeyecektir. Siz dahil bu çalışma 100 gönüllü ile gerçekleştirilecektir.**

- Yukarıda istendiği gibi bilimsel araştırmada **yer almayı KABUL ETMENİZ DURUMUNDA**, söz konusu bilimsel araştırma ve bunun sonuçlarına ilişkin **herhangi bir hukuki/ekonomik/bilimsel veya diğer bir YÜKÜMLÜLÜK VE SORUMLULUK TAŞIMAYACAK ve herhangi bir hukuki/ekonomik/bilimsel veya diğer bir HAK TALEBİNDE BULUNAMAYACAKSINIZ**.

- Yukarıda istendiği gibi bu bilimsel araştırmada **yer almayı KABUL ETMENİZ DURUMUNDA**, **DİLEDİĞİNİZ ZAMAN bilimsel araştırmalarda YER ALMAKTAN VAZGEÇMEK** ve sizden alınan örneğin, bu örnekten elde edilen **genetik/biyolojik araştırma materyalinin** ve kaydedilen **kimlik ve kişisel bilginizin İMHA EDİLMESİNİ İSTEMEK HAKLARINA HER ZAMAN SAHİP OLACAKSINIZ**.

- Bağlı olduğunuz sosyal güvenlik kurumu (SGK)'dan herhangi bir ücret ALINMAYACAKTIR.

- Araştırma esnasında sizi ilgilendirecek bir bilgi söz konusu olduğunda siz

veya yasal temsilcinize derhal haber verilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiyi Malikova Narmina alabilirsiniz. (05383921094 no'lu telefondan ulaşabilirsiniz.)

Bilgilendirilmiş onay formundaki tüm açıklamaları okudum, dinledim, anladım. İstediğim soruları sordum ve cevaplarını aldım. Bu araştırmaya gönüllü olarak hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllü Adı ve Soyadı İmzası Tarih

Açıklamaları yapan
Araştırmacı Adı ve Soyadı İmzası Tarih

Olur alım işlemini takip eden
Kişinin Adı ve Soyadı İmzası Tarih

A. KİŞİSEL BİLGİLER

Adı soyadı: Narmina Malikova

Doğum tarihi: 15.04.1986

Yabancı dil bilgisi: Türkçe, İngilizce, Rusca,

Görev yeri:İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

E-posta adresi: narmina555@hotmail.com

Telefon: 05383921094

B. EĞİTİM BİLGİLERİ

Mezun olduğu üniversite/fakülteyi lütfen belirtiniz: Khazar Üniversitesi,Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü

Mezuniyet tarihini lütfen yıl olarak belirtiniz: 2010

Varsa, akademik ünvanları lütfen belirtiniz:

C. İŞ TECRÜBESİNE AİT BİLGİLER

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojı Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı

Azerbaycan Devlet Hazar Deniz Gemicilik (ADXDG) Hastanesinde Biyokimya Laboratuvarında (Azerbaycan)

D. KLİNİK ARAŞTIRMALARLA İLGİLİ GENEL BİLGİLER

"Tip 2 diyabet olgularında oksidatif DNA hasarı ve onarımının DNA onarım geni hOGG1 Ser326Cys polimorfizmi ile ilişkili olarak değerlendirilmesi" BAP Arastırma Projesi, 31436, Araştırmacı, (2017).

"DNA tamir enzim polimorfizmleri ile STEMI arasındaki ilişkinin incelenmesi" BAP Arastırma Projesi, 34061, Araştırmacı, devam ediyor (2019).

"ST yükselmeli miyokard infarktüsü STEMI geçiren hastalarda adrenoreseptör gen polimorfizminin sıklığı ve önemi" BAP Arastırma Projesi, 32344, Araştırmacı, devam ediyor (2019).

E. ÖZGEÇMİŞ SAHİBİNİN İMZASI

El yazısıyla adı soyadı:

Tarih (gün/ay/yıl olarak): .../…/…..

İmza:

ETİK KURUL KARARI

İÜC Tarih ve Sayı: 08/10/2018-71759

T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Narmina MALİKOVA'nın etik kurul kararı A-24

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :21.09.2018 tarih, 66018902-604.02.02-61828 sayılı yazı

Anabilim Dalınız öğretim üyesi **Prof.Dr.Mehmet GÜVEN'in danışmanlığında Yüksek Lisans Öğrencisi Narmina MALİKOVA'nın yürütücülüğnde Prof.Dr.Bilgehan KARADAĞ ve Uzm.Dr.Eser DURMAZ'ın** yardımcılığında **"Koroner Arter Hastalarında DNA Hasar Tamiri Sürecinde Rol Oynayan Moleküllerin ve İlişkili Mikro RNA'ların Ekspresyonlarının Araştırılması"** başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **02 Ekim 2018** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar etik kurulunca müzakere edilmiş olup;Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN
Bölüm Başkanı

NOT:Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak İçin:http://dogrulama.istanbulc.edu.tr/enVision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE8V0KSV0
Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 Faks : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbulc.edu.tr

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KORONER ARTER HASTALARINDA DNA HASAR TAMİR SÜRECİNDE ROL OYNAYAN MOLEKÜLLERİN VE İLİŞKİLİ MİKRO RNA'LARIN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%12	%8	%4	%7
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	%2
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to Fatih University Öğrenci Ödevi	%1
4	yasamboyuhaber.com İnternet Kaynağı	%1
5	tr.wikipedia.org İnternet Kaynağı	%1
6	www.nature.com İnternet Kaynağı	<%1
7	www.tubas.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Cumhuriyet University Öğrenci Ödevi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Narmina	**Soyadı**	Malikova
Doğ.Yeri	Azerbaycan	**Doğ.Tar.**	15.04.1986
Uyruğu	Azervaycanlı	**TC Kim No**	
Email	narmina555@hotmail.com	**Tel**	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans		
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**