T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ATEROSKLEROTİK PLAK PATOGENEZİNDE DNA HASAR TAMİR SÜRECİNDE ROL OYNAYAN MOLEKÜLLERİN VE İLİŞKİLİ MİKRO RNA'LARIN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Selin KÖSE

DANIŞMAN
Prof. Dr.Mehmet GÜVEN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

Ocak, 2023

TEZ KABUL VE ONAYI

SELİN KÖSE tarafından, **Prof. Dr.MEHMET GÜVEN**danışmanlığında hazırlanan **" ATEROSKLEROTİK PLAK PATOGENEZİNDE DNA HASAR TAMİR SÜRECİNDE ROL OYNAYAN MOLEKÜLLERİN VE İLİŞKİLİ MİKRO RNA'LARIN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI"**başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **06/01/2023** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği**ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi**olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	**Sonuç**
DANIŞMAN	Prof. Dr.MEHMET GÜVEN İSTANBULCERRAHPAŞAÜniversitesi TIBBİ BİYOLOJİ Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. İLHAN ONARAN İSTANBULCERRAHPAŞAÜniversitesi TIBBİ BİYOLOJİ Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. FAHRİ AKBAŞ BEZMİALEM VAKIF Üniversitesi TIBBİ BİYOLOJİ Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi BERK ARAPİ İSTANBULCERRAHPAŞAÜniversitesi KALP VE DAMAR CERRAHİSİ Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. BAHADIR BATAR NAMIK KEMAL Üniversitesi TIBBİ BİYOLOJİ Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

Canım babama ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

ATEROSKLEROTİK PLAK PATOGENEZİNDE DNA HASAR TAMİR SÜRECİNDE ROL OYNAYAN MOLEKÜLLERİN VE İLİŞKİLİ MİKRO RNA'LARIN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Bu tez çalışması için İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 30154

TEŞEKKÜR

Her zaman ve her koşulda desteğini yanımda hissettiğim, değerli bilgi birikimlerini ve deneyimlerini benimle paylaşan ve birlikte çalışmaktan son derece mutluluk duyduğum değerli danışman hocam Prof.Dr.Mehmet Güven'e,

Doktora eğitimim boyunca, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Turgut Ulutin ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Birlikte çalışmaktan onur duyduğum Prof.Dr.Suat Nail Ömeroğlu'na ve bir araya gelerek daha çok uzun zaman birlikte güzel işler yapacağımıza inandığım ve her zaman yanımda olan Dr. Öğr.Üyesi Berk Arapi'ye,

Çalışmamım en zorlu kısımlarında tecrübeleri ile beni aydınlatan ve laboratuvar tecrübesine çok güvendiğim Bülent Tekin, M.Sc ve Ceren Orhan, M.Sc'ye,

Yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen Prof.Dr. Duygu Gezen Ak, Prof. Dr. Erdinç Dursun ve Dr. Öğr.Üyesi Merve Alaylıoğlu'na,

Varlıkları ile eğitim sürecime her daim destek olan arkadaşlarım, Kübra Meydan, Hande Önel, Nurnisa Oya Alansal, M.Sc, Özlem Tun, M.Sc, Dr. Hülya Arkan ve Elif Çıtak, M.Sc'ye,

Hayat duruşları ile örnek aldığım, hem özel hem de çalışma hayatında nasıl bir insan olmam gerektiğini öğrendiğim, doktora sürecimde hep yanımda olan çok değerli Dr. Alp Kibaroğlu ve Emre Acar'a,

Hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, beni bugünlere getiren canım annem, babam ve ağabeyime,

Sevgisini ve sabrını benden esirgemeyen canım eşim Melih Köse'ye teşekkür ediyorum.

Ocak 2023 SELİN KÖSE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **ii**
BEYAN ..... **iii**
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xiv**
ABSTRACT ..... **xvi**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **4**
2.1. ATEROSKLEROZ 4
2.1.1. Aterosklerozun Gelişim Mekanizmaları 5
2.2. DNA HASARI 8
2.2.1. Kardiyovasküler Hastalıklarda DNA Hasar Çeşitleri 9
2.2.1.1. Oksidatif Stres *9*
2.2.1.2. Sitotoksik ajanlar ve Radyasyon *11*
2.3. DNA ONARIM MEKANİZMALARI 11
2.3.1. Direk Onarım Mekanizması 11
2.3.2. Baz Kesip Çıkarma Mekanizması (BER) 13
2.3.3. Nükleotid Kesip Çıkarma Mekanizması (NER) 14
2.3.4. Yanlış Eşleme Onarım Mekanizması 16
2.3.5. Çift Zincir Kırıkları ve Rekombinasyonel Onarım Mekanizması 17
2.4. BRCA1 GENİ VE FONKSİYONLARI 19
2.5. PARP1 GENİ VE FONKSİYONLARI 20
2.6. MİKRORNA'LAR 21
2.6.1. miR-21 Geni 23

2.6.2. mir-193b Geni 24
2.6.3. mir-484 Geni 25
3. YÖNTEM 26
3.1. ÇALIŞMA GRUPLARI VE ÖRNEK ALIMI 26
3.1.1. Çalışma Grubu Dışlanma Ölçütleri 26
3.1.2. Çalışma Grubu Klinik Ölçütleri 27
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR 27
3.3. KULLANILAN TAMPON ÇÖZELTİLER 28
3.4. DOKU HOMOJENİZASYONU 28
3.5. mRNA-GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ 29
3.5.1. mRNA İzolasyonu 29
3.5.2. mRNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçülmesi 30
3.5.3. mRNA- cDNA Sentezi 30
3.5.4. mRNA- Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) 31
3.6. MİKRORNA EKSPRESYON ANALİZLERİ 34
3.6.1. miRNA İzolasyonu 34
3.6.2. miRNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçülmesi 35
3.6.3. miRNA - cDNA Sentezi 35
3.6.4. mRNA- qRT-PZR 36
3.7. 8-OHdG HASAR TAYİNİ 39
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 40
4. BULGULAR 41
4.1. KORONER ARTER HASTALARININ GEN İFADELERİ 41
4.2. KORONER ARTER HASTALARININ KLİNİK VERİLERİ 48
4.3. 8-OHdG HASAR DÜZEYİ 50
5. TARTIŞMA 51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 60
HASTA OLUR FORMU 75
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 77
ETİK KURUL İZİN YAZISI 78
ÖZGEÇMİŞ 79

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: AP oluşumunda risk faktörleri……..…..5

Şekil 2.2: "Yaralanmaya karşı inflamatuar yanıt" hipotezi ……..….6

Şekil 2.3: Ateroskleroz plak oluşumu ……..……..8

Şekil 2.4: Vasküler hastalıklarda oksidatif stresin DNA üzerine etkisi ……...……10

Şekil 2.5 Fotoreaktivasyon ile doğrudan onarım …….12

Şekil 2.6 Baz Çıkarma Mekanizması ……...……14

Şekil 2.7 Nükleotid Kesip Çıkarma Mekanizması ……...……16

Şekil 2.8 HR ve NHEJ onarım mekanizması ……...……18

Şekil 2.9 BRCA1 geni ……...…...19

Şekil 2.10 PARP1 geni …….....21

Şekil 2.11 miRNA biyogenezi …….……...…….23

Şekil 2.12 mir-21-5p yapısı …….....24

Şekil 2.13 mir-193b-3p yapısı ……..24

Şekil 2.14 mir-484 yapısı ……..….. 25

Şekil 4-1: AP, PARP1 ve mir-484 gen ifade düzeyi karşılaştırılması……..……45

Şekil 4-2: AP, PARP1 ve mir-193b-3p gen ifade düzeyi karşılaştırılması……..….46

Şekil 4-3: AP, BRCA1 ve mir-193b-3p gen ifade düzeyi karşılaştırılması……..…46

Şekil 4-4: AP, BRCA1 ve mir-21-5p gen ifade düzeyi karşılaştırılması……..…47

Şekil 4-5: AP, BRCA1 ve PARP1 gen ifade düzeyi karşılaştırılması……..47

Şekil 4-6: Kontrol dokuda, BRCA1 ve PARP1 gen ifade düzeyi karşılaştırılması……..48

Şekil 4-7: Kontrol dokuda, BRCA1 ve PARP1 gen ifade düzeyi karşılaştırılması……..50

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3-1: cDNA sentezi için gerekli olan karışımın içeriği (bir reaksiyon için)……..……..31

Tablo 3-2: Reaksiyon döngüsü…….……31

Tablo 3-3: BRCA1 geni primer dizisi…….…….32

Tablo 3-4: PARP1 geni primer dizisi…….……...32

Tablo 3-5: ACTB geni primer dizisi……..…...33

Tablo 3-6: Her bir reaksiyonda qRT-PZR için gerekli olan karışımın içeriği……....…….33

Tablo 3-7: Reaksiyon döngüsü…….…33

Tablo 3-8: cDNA sentezi için gerekli olan karışımın içeriği (bir reaksiyon için)…….…...36

Tablo 3-9: Reaksiyon döngüsü…….……....36

Tablo 3-10: mir-21-5p primer dizisi…….…....37

Tablo 3-11: mir-193b-3p primer dizisi……..……..….37

Tablo 3-12: mir-484 primer dizisi……...…..38

Tablo 3-13: U6 (RNU6-1) primer dizisi……...……38

Tablo 3-14: Her bir reaksiyonda qRT-PZR için gerekli olan karışımın içeriği……..…..38

Tablo 3-15: Reaksiyon döngüsü……..….39

Tablo 4-1 : Aterosklerotik plak (AP) ve kontrol doku örneklerinde BRCA1, PARP1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484'ün genlerinin ifade değerleri ($2^{-\Delta CT}$)……...…42

Tablo 4-2 : AP ve kontrol doku örneklerinde BRCA1 ifade değeri……..…...43

Tablo 4-3: AP ve kontrol doku örneklerinde PARP1 ifade değeri……..….43

Tablo 4-4: AP ve kontrol doku örneklerinde mir-21-5p ifade değeri……...……43

Tablo 4-5: AP ve kontrol doku örneklerinde mir-193b-3p ifade değeri……...……44

Tablo 4-6: AP ve kontrol doku örneklerinde mir-484 ifade değeri……..……44

Tablo 4-7: Çalışma grubu örneklerinde BRCA1, PARP1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484'ün genlerinin ifade değerlerinin sigara kullanımı ile ilişkisi……..…….....48

Tablo 4-8: Çalışma grubu örneklerinde BRCA1, PARP1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484'ün genlerinin ifade değerlerinin diyabet öyküsü ile ilişkisi……..…….49

Tablo 4-9: AP ve kontrol grubu arasındaki 8-OhdG ilişkisi……...……..50

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
KAH	: Koroner arter hastalığı
MI	:Miyokard enfarktüsü
AP	:Aterosklerotik plaklar
DNA	:Deoksiribonükleik asit
LDL	:Lipoproteinin
TG	:Trigliserit
HDL	:Yüksek yoğunluklu lipoprotein
OS	:Oksidatif stres
HR	:Homolog rekombinasyon
ROS	:Reaktif oksijen türlerin
VDKH	:Vasküler düz kas hücresi
XO	:Ksantin oksidaz
NOX	:NADPH oksidazlar
ATP	:Adenozin trifosfat
SSB	:Tek zincir DNA kırıkları
DSB	:Çift zincir DNA kırıkları
IR	:İyonize radyasyon
UV	:Ultraviyole
BER	:Baz çıkarım onarımı
AP	:Abazik
APE	:AP endonükleaz
XRCC1	:X-ray cross complementing group 1
NER	:Nükleotid çıkarım onarımı
HR	:Homolog rekombinasyon
NHEJ	:Homolog olmayan uç birleştirme

Cdna	:Komplementer DNA
RING	:Really Interesting New Gene
MiRNA	:MikroRNA'lar
mRNA	:Haberci RNA'ya
RNA Pol II	:RNA polimeraz II
RISC	:RNA kaynaklı susturma kompleksi
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	:Ribonükleik asit
PARP1	: Poly [ADP-ribose] polymerase 1
BRCA1	: Breast cancer type 1 susceptibility
ACBT	:Aktin beta
qRT-PZR	:Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
MRE11	:Mayotik rekombinasyon 11
NBS1	:Nijmegen kırılma sendromu proteini 1

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ATEROSKLEROTİK PLAK PATOGENEZİNDE DNA HASAR TAMİR SÜRECİNDE ROL OYNAYAN MOLEKÜLLERİN VE İLİŞKİLİ MİKRO RNA'LARIN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

SELİN KÖSE

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

Danışman : Prof. Dr.Mehmet GÜVEN

Koroner arter hastalığı (KAH), kalbe kan akışı sağlayan koroner arter duvarında kolesterol içeren plakların damarı tıkaması sonucu gelişen bir hastalıktır. Damar duvarında biriken plakların oluşturduğu patogeneze "ateroskleroz" denir. Ateroskleroz sürecinde oksidatif strese bağlı DNA hasarlarıda rol oynar. ROS'un neden olduğu oksidatif stress, vasküler hastalıkta görülen DNA hasarının başlıca sebebidir. Oluşan bu hasarlara karşı hücrelerin verdiği yanıt, hasarların onarımı, hücre siklusunun durdurulması veya apoptoz gibi farklı yolaklar ile olmaktadır. PARP1 ve BRCA1, DNA onarımında rol oynayan önemli proteinlerdir. Mikro RNA'lar (miRNA) genlerin düzenlenmisinde rol alan kısa nükleotit dizileridir. mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484'ün, BRCA1 ve PARP1 genlerinin mRNA düzenlenmesinde rol oynadıkları gösterilmiştir. Çalışmamızda, bu genlerin ifade durumları ve birbiri ile olan ilişkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda çalışmamız, genel anestezi altında cerrahi ekip tarafından ameliyat edilen 50 hastanın karotisinde oluşmuş aterosklerotik plaklar (AP örneği) ve aynı hastalardan ameliyat sırasında çıkarılan kontrol

dokusu çalışmaya alınmıştır. Aynı zamanda, hastaların serum örneklerinde DNA hasar belirteci olarak 8-OhdG (8-hydroxy 2 deoxyguanosine) düzeyleri ölçülmüş ve 50 sağlıklı kontrolle karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda, PARP1 (p=0,006), BRCA1 (p= 0.03) ve mir-21-5p (p=0.0001) genlerinin ifade düzeyleri açısından AP örneği ve kontrol dokusu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir; AP örneğinde gen ifade düzeyleri yükselmiştir. mir-193b-3p ve mir-484 genlerinin ifade düzeyleri açısından AP örneği ve kontrol dokusu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p >0.05). AP örneklerinde (r=0.46; p=0.002) ve kontrol doku örneklerinde (r=0.71; p=0.0001) BRCA1 ve PARP1 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptandı. Hasta ve kontrol grupları arasında 8-OhdG hasar düzeyleri karşılaştırıldığında, hasta grubundaki 8-OhdG düzeyinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (p=0.0001).

Çalışmamızın, AP patogenezi ile DNA tamir moleküler mekanizmaları arasındaki ilişkilerin aydınlatılmasına yardımcı olacağını umuyoruz.

Ocak 2023 , 97 sayfa.

Anahtar kelimeler: Ateroskleroz, DNA hasarı, 8-OHdG

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF EXAMPLES OF MOLECULES AND RELATED MICRO RNAES PLAYING A ROLE IN DNA REPAIR PROCESS OF ATEROSCLEROTIC PLATE PATHOGENESIS

SELİN KÖSE

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of GraduateStudies

Department of Medical Biology

Medical Biology Programme

Supervisor: Prof. Dr.Mehmet GÜVEN

Coronary artery disease (CAD) involves blood to the heart. The pathogenesis formed by plaques accumulating on the vessel wall is called “atherosclerosis”. The process of plaque accumulation in the vessel wall is called “atherosclerosis”. DNA damage due to oxidative stress also plays a role in the atherosclerosis process. Oxidative stress caused by ROS is the main cause of DNA damage in vascular disease. The response of the cells to these damages occurs through different pathways such as repair of the damages, cell cycle arrest or apoptosis. PARP1 and BRCA1 are important proteins involved in DNA repair. Micro RNAs (miRNAs) are short nucleotide sequences involved in the regulation of genes. It has been shown that mir-21-5p, mir-193b-3p and mir-484 play a role in mRNA regulation of the BRCA1 and PARP1 genes. In our study, it was aimed to examine the expression status of these genes and their relations with each other. In this direction, our study included atherosclerotic plaques (AP sample) formed in the carotids of 50 patients who were operated under general anesthesia by the surgical team, and control tissue remaining from the

saphenous removed during the operation from the same patients. At the same time, DNA damage markers were used in the serum samples of the patients. Levels of 8-OhdG (8-hydroxy 2 deoxyguanosine) were measured and compared to 50 healthy controls.

In our study, a statistically significant difference was found between AP sample and control tissue in terms of expression levels of PARP1 (p=0.006), BRCA1 (p= 0.03) and mir-21-5p (p=0.0001) genes; Gene expression levels were increased in the AP sample. There was no statistically significant difference between AP sample and control tissue in terms of expression levels of mir-193b-3p and mir-484 genes (p >0.05). In AP samples (r=0.46; p=0.002) and when the relationship between BRCA1 and PARP1 gene expression levels in control tissue samples (r=0.71; p=0.0001) was examined, a statistically significant correlation was found. (p=0.0001).

We hope that our study will support to elucidate the relationships between the pathogenesis of AP and the molecular mechanisms of DNA repair.

January2023, 97pages.

Keywords: Atherosclerosis, DNA damage, 8-OHdG

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar (KAH), tüm koruyucu önlemler ve tedavideki gelişmelere rağmen, dünya çapında birincil ölüm nedeni arasında yer almaktadır (Björkegren ve diğ., 2022). Kalbe kan akışını sağlayan koroner arterlerin daralması veya tıkanması ile kan akışının kısmi ya da tam kesilmesine bağlı olarak aterosklerotik plaklar (AP) oluşur ve KAH'lığı gelişir (Devereux ve diğ., 1986).

AP patogenezinde, DNA hasarınında rol oynadığı gösterilmiştir. DNA hasarı, aterosklerotik plak içindeki tüm hücrelerde mevcuttur. AP'lar, vasküler düz kas hücreleri (VDKH), inflamatuvar hücreler, lipid ve hücre dışı matriks proteinlerinin birikmesinden oluşsa da, lezyon içindeki hücrelerdeki DNA hasarları hem aterogenezde hem de lezyonların davranışlarında önemli rol oynar (Mahmoudi ve diğ., 2006). Bu hasarlar zincir kırıkları, telomer kısalmaları, tek baz mutasyonları, modifikasyonları veya eksilmeleri şeklindedir.

Oksidatif stresin, ateroskleroz patogenezinde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stres, pro-oksidanların antioksidan kapasiteyi aştığı bir durum olarak tanımlanır. ROS, bazıları enzimatik olarak birbirine dönüştürülebilen serbest radikalleri (esas olarak süperoksit anyon ve hidroksil) ve normal molekülleri (hidrojen peroksit [H_2O_2] içerir (Drummond ve diğ., 2011). Oksidan sinyal mekanizmalarının, vasküler fonksiyonun kontrolünde önemli rolleri vardır. Vasküler reaktif oksijen türleri endotel seviyesinde, düz kas hücrelerinde veya çeşitli enzimler ve mitokondriyal elektron sızıntıları olarak üretilebilir. Fizyolojik koşullarda ROS oluşum hızı,eliminasyon hızı ile dengelenir. İnflamatuar koşullar altında, endojen hücresel antioksidan mekanizmalar tarafından kontrol edilemeyen yüksek konsantrasyonlarda ROS üretimi, oksidatif stres durumuna yol açar. Artan ROS üretimi, endotele sızan düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonuna, endotel kaynaklı nitrik oksidin inaktivasyonuna ve vasküler işlev bozukluğuna yol açar. Ayrıca ROS, hücre içi haberci olarak vaskülatürde hücre büyümesi, göçü, apoptozu gibi olaylara neden olabilen proinflamatuar sinyal yollarını aktive eder (Förstermann ve diğ., 2008).

DNA onarım sistemleri, endojen ve eksojen etkenlerin neden olduğu DNA hasarlarını onaran önemli bir mekanizmadır (Schreiber ve diğ., 2006 ; Hall ve diğ., 2009). Genomik bütünlüğün sürdürülmesinde DNA'nın onarılması önemli rol oynar. İnsanda bulunan farklı hücre tiplerinde, farklı DNA hasarlarına karşı farklı onarım mekanizmaları geliştirmiştir. Farklı DNA hasar türlerinin onarımları; çift zincir kırık onarımı, baz kesip çıkarma, nükleotid kesip çıkarma ve yanlış eşleşme onarımı gibi hasarını şekli ve şiddetine bağlı olarak onarım mekanizmları tarafından gerçekleştirilir (Bartek ve diğ., 2001).

Baz çıkarım mekanizması (BER), hücresel metabolizmaya bağlı hasara karşı kullanılan onarım mekanizmasıdır. ROS, iyonlaştırıcı radyasyon ve dolaylı olarak UV radyasyonu (ROS üretimi yoluyla) veya kemoterapötik ilaçlar (örn., Adriamisin, mitomisin C ve psoralen) gibi çeşitli kimyasalların sonucu olan hasarlar tamir edilir. BER'de hasarlı baz, farklı DNA glikozilazlar (hasara bağlı olarak) ve APE1 endonükleaz tarafından uzaklaştırılır. Bu, onarım sentezini kolaylaştırmak için her iki ucun PARP1 (poli(ADP-riboz) polimeraz) tarafından kırpıldığı abazik bir bölge ile sonuçlanır (Frosina ve diğ., 1996). Ayrıca, PARP1 DNA hasarına cevap olarak hedef proteinlerinden biri olan BRCA1'i katalize etmektedir (Herceg ve diğ., 2001).

Çift zincir kırıkları (DSB'ler) oldukça tehlikeli bir DNA hasar türüdür. DNA DSB'larına iyonlaştırıcı radyasyon, ROS ve kemoterapötik ilaçlar neden olabilir veya hücrenin replikasyonu sırasında ortaya çıkabilir. DNA çift sarmalının her iki sarmalı da kırıldığı için kromozomal eksilmeler (delesyon), translasyonlar meydana gelebilir. Bu nedenle hızlı onarım çok önemlidir (Mladenov ve diğ, 2013). BRCA1 proteini, DSB DNA onarımında, hücre döngü kontrolünde, protein yıkımında ve kromatin yapısının düzenlenmesinde rol oynayan multifonksiyonel bir proteindir (Matros ve diğ., 2005).

MiRNA'lar ortalama 17-22 nükleotid uzunluğunda kısa RNA dizileridir. MiRNA'lar hücre çoğalması, hücre farklılaşma, hücre yaşam döngüsü ve apoptoz gibi pek çok olayda görev almaktadırlar (Mahn ve diğ., 2011). Belli hedefleri olan mesajcı RNA'lara (mRNA) ile

etkileşeme girer ve bu mRNA'ların olgunlaşmasını engelleyerek, gen ifadesinin kontrol edilmesini sağlamaktadırlar (Bartel, 2004). Dokulara özgü ifade tiplerinin ve düzeylerinin olması, hastalıklarda farklı ifade miktarları ve stabil kalma seviyeleri kanda çok uzun olmaları sebebiyle miRNA'lar girişimsel olmayan güncel biyobelirteç adayları olarak ön plana çıkmaktadır.

Tüm bu bilgilere dayanarak çalışmamızda; KAH teşhisi konulmuş hastaların aterosklerotik plak örneklerinde DNA hasar onarım mekanizmasında görev alan moleküller olan BRCA1 ve PARP1'in ve bu moleküllerin gen ifade düzeylerinde rol oynadıkları düşünülen miRNA'lar olan miR-21-5p, miR-193b-3p ve miR-484'in gen ifade düzeylerini ve mevcut DNA hasar düzeyleri ile olan ilişkilerini incelemeyi amaçlamaktayız. DNA hasar düzeylerini, hasta ve kontrol gruplarının serum örneklerinde 8-OHdG (8-hydroxy 2 deoxyguanosine) düzeylerinin analizi ile tespit edeceğiz. Çalışmamızın, AP patogenezi ile DNA tamir moleküler mekanizmaları arasındaki ilişkilerin aydınlatılmasına yardımcı olacağını umuyoruz.

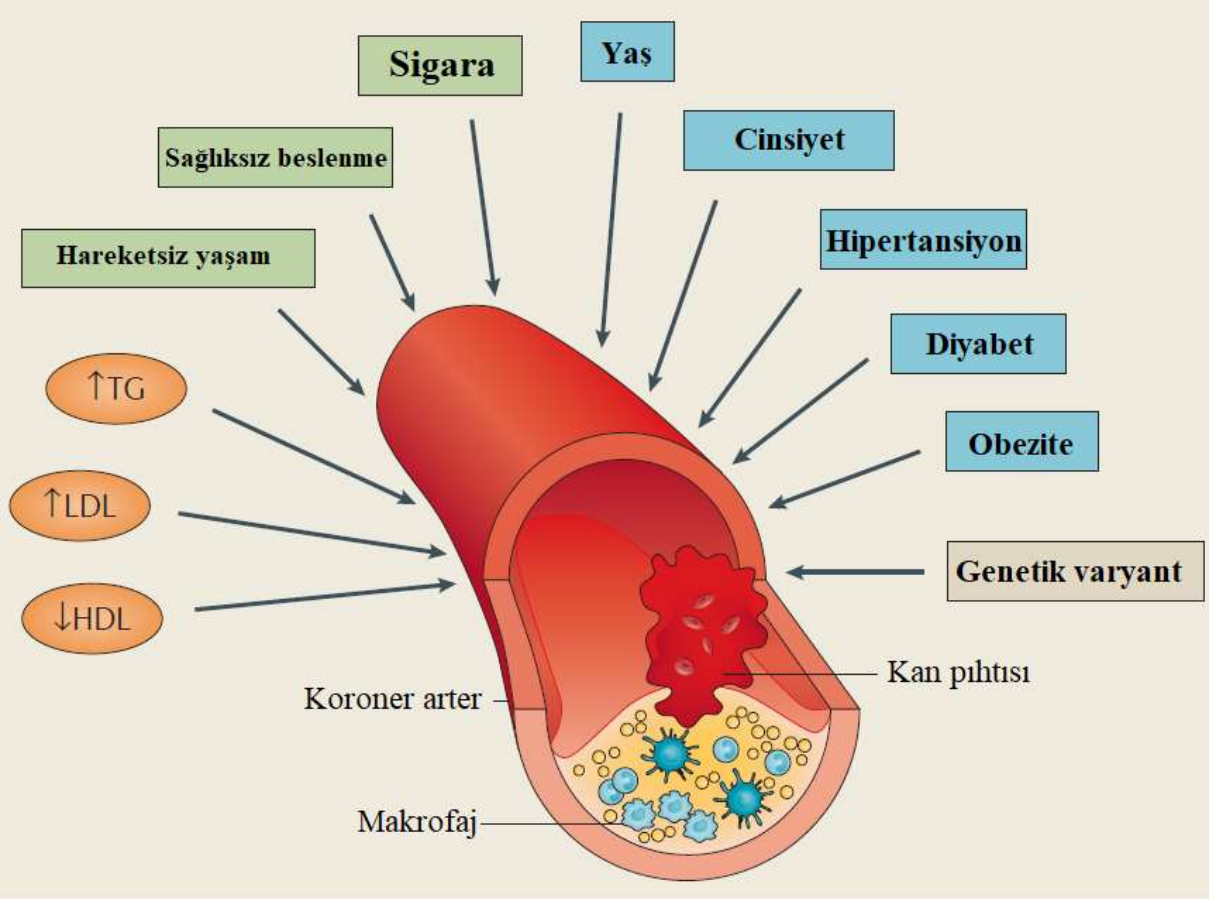
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. ATEROSKLEROZ

Koroner arter hastalığı (KAH), kanser ve COVID-19'u geride bırakarak, dünya genelinde ilk sıralarda yer alan ölüm nedenleri arasında bulunmaktadır (Vallejo ve diğ., 2021). KAH, kalbi besleyen damarlar olan koroner arterlerin duvarında kolesterol içeren plakların birikerek yıllar içinde damarı tıkaması sonucu gelişen bir hastalıktır. Damar içerisinde biriken plaklar "ateroskleroz" u meydana getirir. (Björkegren ve diğ.,2022). Atheroskleroz patogenezinde, vasküler düz kas hücreleri, lipidler, hücre dışı matris proteinleri ile birlikte inflamatuar hücrelerin damar içerisinde birikmesi ile aterosklerotik plaklar (AP) oluşur. AP'lar, kronik bir inflamatuar reaksiyon sonucu gelişmesine rağmen, lezyon içindeki hücrelerde oluşan DNA hasarının, hem aterojenezde hem de yerleşik lezyonların davranışında önemli bir rol oynadığına dair artan kanıtlar vardır. Bahsedilen DNA hasarı, tüm kromozomların veya kromozom parçalarının eksilmesi veya eklenmesi gibi makro hasarı ve DNA zinciri kopması, tek baz mutasyonları, baz modifikasyonları, DNA eklentileri gibi mikro hasarı içerir (Mohmoudi ve diğ., 2006).

Gözlemsel epidemiyoloji ve translasyonel araştırmalar, KAH'nın altında yatan patofizyolojinin anlaşılmasını geliştirmede önemli ilerlemelere yol açmıştır. Çoğu karmaşık hastalıkta olduğu gibi, KAH'nın bireylerde görülme riski, genetik ve yaşam tarzı faktörleri arasındaki etkileşim ile ilişkilidir (Khera ve diğ., 2016). KAH ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar, yaş, cinsiyet, sigara içme, yüksek kan basıncı, diyabet, obezite ve hareketsiz yaşam tarzının, MI geçirme riskinin artmasına neden olduğunu göstermiştir (Şekil 2.1). Benzer şekilde, dolaşımdaki düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), kolesterol artışı, trigliserit (TG) açısından zengin lipoproteinlerin artması veya azalmışyüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol, KAH riski ile ilişkilidir (Khera ve diğ., 2017).

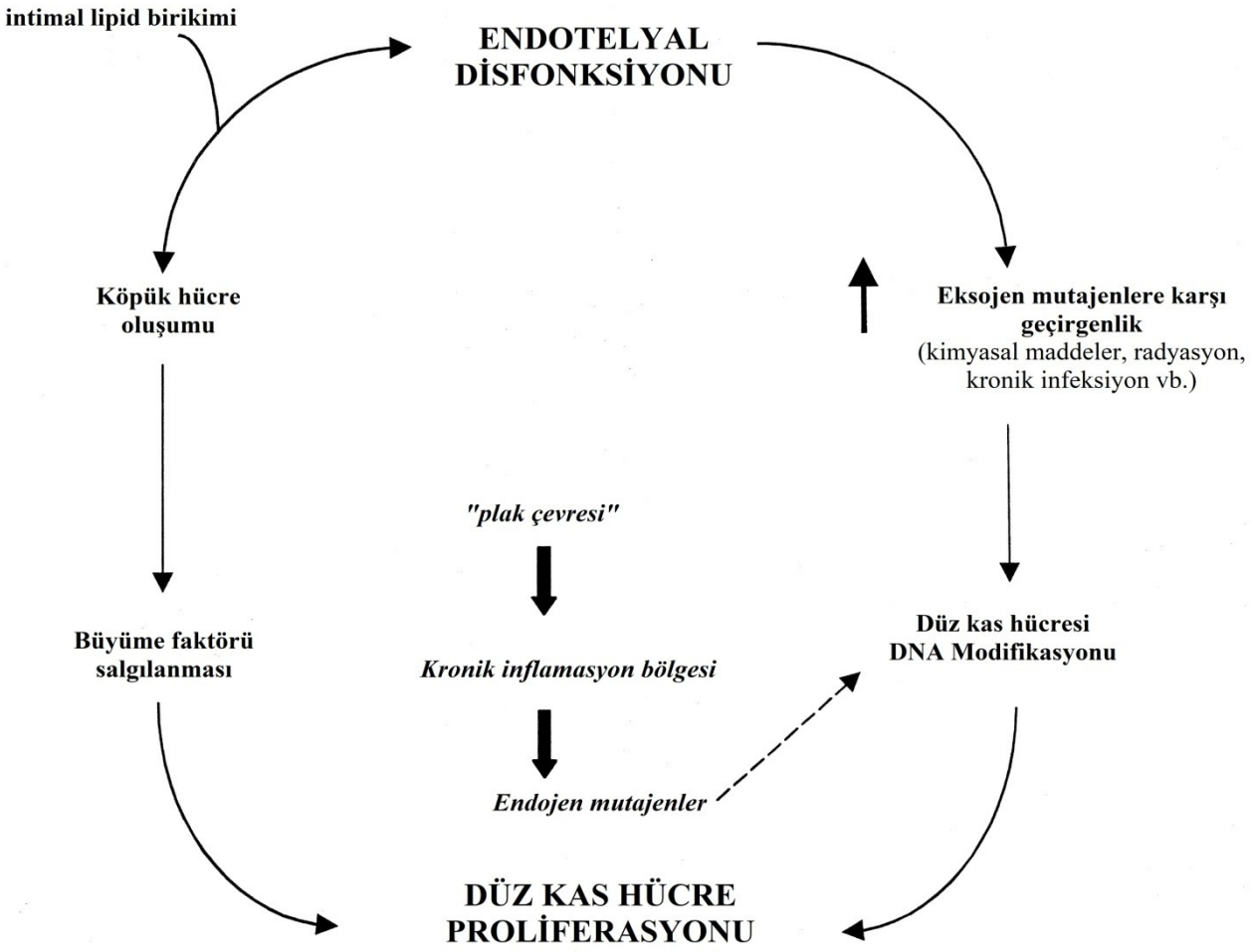
KAH'ı önlemeye yönelik çabalar sağlıklı bir yaşam tarzına dayanmaktadır; Sigara içmeme, obeziteden kaçınma, sağlıklı beslenme ve düzenli egzersiz. Yüksek riskli bireylerde ise, LDL kolesterolü (örneğin statinler) ve kan basıncını düşürmek için veya kanda pıhtı oluşumunu önlemeye yardımcı olmak (örneğin aspirin) için ek ilaçlar kullanılmaktadır. Diğer yandan MI geçirirme durumunda ise, daralan damarlara stent yerleştirme prosedürüyle kan akışı eski haline getirilebilir veya açık kalp ameliyatı yoluyla damara direkt müdahale edilir.



Şekil 2.1: Aterosklerotik plak oluşumunda risk faktörleri (Khera ve diğ., 2017)

2.1.1. Aterosklerozun Gelişim Mekanizmaları

Ateroskleroz, büyük ve orta büyüklükteki arterleri etkileyen ve fibrotik, lipid içeren plakların oluşumu ile karakterize kronik inflamatuar bir hastalıktır (Ross, 1999). Ateroskleroz hakkındaki genel görüş, endotelyumdaki çeşitli hasarlara karşı, inflamatuar-fibroproliferatif bir yanıttan kaynaklandığı "yaralanmaya karşı inflamatuar yanıt" hipotezine dayanmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: "Yaralanmaya karşı inflamatuar yanıt" hipotezi (Andreassi ve diğ., 2003)

Ateroskleroz sürecindeki ilk adım, LDL'nin artan oksidasyonu, makrofajlar tarafından oksitlenmiş LDL alımı ve köpük hücre oluşumu ile karakterize edilen bir "yağlı çizgi" oluşumudur (Andreassi ve diğ., 2003). Köpük hücreleri, çeşitli büyüme faktörlerini ve sitokinleri salgılayarak vasküler düz kas hücrelerini (VDKH) göç etmeye, çoğalmaya ve hücre dışı matris oluşturmaya teşvik eder. Daha sonraki aşamalarda plak, ölmekte olan veya ölü hücrelerle kalsifiye olur. Bu nedenle, düz kas hücre hiperplazisi, AP oluşumu ve bunun sonucunda kan damarlarının tıkanması kaçınılmaz bir sondur.

Endotel fonksiyon bozukluğu ve LDL birikimi, inflamatuar bir vasküler yanıta sebep olur. Büyüme faktörlerinin üretimi düz kas hücre proliferasyonunu uyarır. Bununla beraber, plak ortamı, kronik inflamatuar bir bölge olarak, serbest radikaller gibi çeşitli endojen mutajenleri de oluşturabilir. Ayrıca, düz kas hücreleri, DNA hasarlarına yol açabilen sigara, radyasyon ve kronik enfeksiyonlar gibi ekzojen faktörlerin hedefi olabilir (Andreassi ve diğ., 2003). Ateroskleroz sürecini başlangıç, ilerleme ve komplikasyon olarak üç aşamaya ayırabiliriz.

Başlangıç safhası:

Sağlıklı bir arter duvarı 3 tabakalı bir yapıya sahiptir. Damarın en dışındaki tabaka olan adventitia, sinir uçlarını, mast hücrelerini ve bu tabakayı besleyen mikrodamarları içerir. Media adı verilen tabaka ise, hareketsiz düz kas hücreleri, elastin, kollajen ve diğer makro moleküllerden oluşur. AP, en içte bulunan tabaka olan intimada meydana gelir. AP'nin erken safhasında, LDL molekülleri intima tabakasında birikerek oksidatif ve diğer modifikasyonlara maruz kalabilir ve bunun sonuçunda pro-inflamatuar ve immünojenik yanıt gelişebilir (Gistera ve diğ., 2017) (Şekil 2.3).

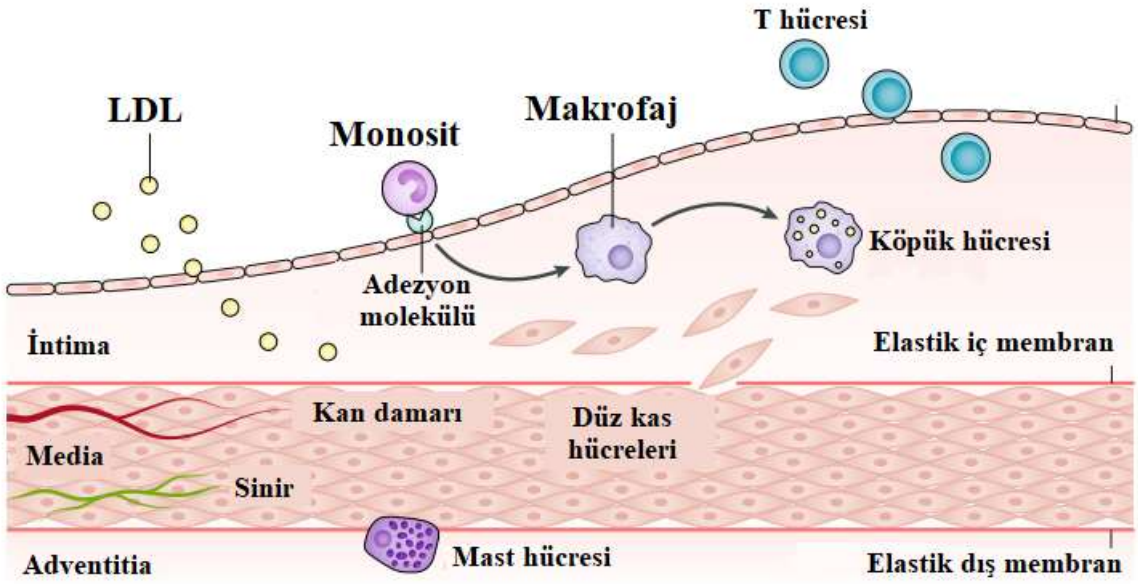
İlerleme safhası:

Oluşan pro-inflamatuar yanıta cevap olarak, monositler aktive edilmiş endotel hücreleri tarafından ifade edilen adezyon moleküllerine bağlanarak intima tabakasına girerler. Bu esnada sentezlenen kemokinler, monositlerin arter duvarına göç etmesine sebep olur (Libby ve diğ., 2019). İntimaya giren monositler, makrofajlara olgunlaşır. Bu makrofajlarda, eş zamanlı olarak çöpçü reseptörler eksprese olur. Bu reseptörler kan damarı duvarında biriken oksitlenmiş LDL'yi hücre içine alarak köpük hücrelerine dönüşür (Ketelhuth ve diğ., 2016). Oluşan bu köpük hücreler, inflamatuar sitokinleri salgılayarak ateroskleroz gelişimini hızlandırır. T lenfositler de intima tabakasına göç eder; düz kas ve endotel hücrelerinin fonksiyonlarını düzenler.

Komplikasyon safhası:

Aterosklerotik plak bölgesine yerleşmiş olan VDKH'leri, intimia tabakasının kalınlaşmasına sebep olan kollajen, elastin, proteoglikanlar ve glikozaminglikanları sentezler. IFNγ gibi T hücre aracıları ise, VDKH'lerinin kollajen sentezleme yeteneğini bozarak fibröz dokuyu onarma ve koruma yeteneğini azaltabilir (Nus ve diğ., 2016). Ayrıca, aktive edilmiş makrofajlar, kollajeni parçalayan matris metaloproteinazların üretimini arttırır. Fibröz

dokunun incelmesi ve yapısal olarak zayıflaması, plağın yırtılma hassasiyetini artırır. Lezyon ilerledikçe VDKH'leri ve makrofajlar, apoptozunda dahil olabileceği hücre ölümüne maruz kalabilir. Apoptotik hücreler ve ölen hücreler plağın temel içeriğini oluşturur (Clarke ve diğ., 2010).



Şekil 2.3:Ateroskleroz plak oluşumu (Libby ve diğ., 2019)

2.2. DNA HASARI

Hem genomik DNA hem de mitokondriyal DNA, başta reaktif oksijen türleri (ROS) olmak üzere, reaktif nitrojen türleri, radyasyon ve kullanılan ilaçlar çeşitli endojen ve eksojen uyaranlardan dolayı hasar görmektedir. Bu uyaranlar, DNA'da kırıklar, eksilmeler, artmalar, baz modifikasyonları gibi bir dizi farklı DNA hasarlarına neden olur. Oluşan DNA hasarları başta kanser olmak üzere birçok farklı hastalıklara sebep olabilir. Bu hasarlar, ateroskleroz ve anevrizma oluşumu olmak üzere birçok damar hastalığında ve bazı genetik vasküler dejeneratif sendromlara da sebep olabilmektedir. DNA hasarı ve bu hasarların onarımındaki aksaklıkların, bahsedilen hastalık sürecleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

2.2.1. Kardiyovasküler Hastalıklarda DNA Hasar Çeşitleri

Endojen ve eksojen uyaranlar, hücresel DNA hasarlarına yol açabilir. Her bir hücre DNA'sında günde 10.000 kadar DNA hasarı meydana gelmektedir (Lindahl ve diğ., 1972). Oluşan bu hasarlara karşı hücrelerin verdiği yanıt, hasarların onarımı, hücre siklusunun durdurulması veya apoptoz gibi farklı yolaklar ile olmaktadır. ROS'un neden olduğu oksidatif stres, vasküler hastalıkta görülen DNA hasarının başlıca sebebidir.

Aterosklerozda görülen DNA hasarları;

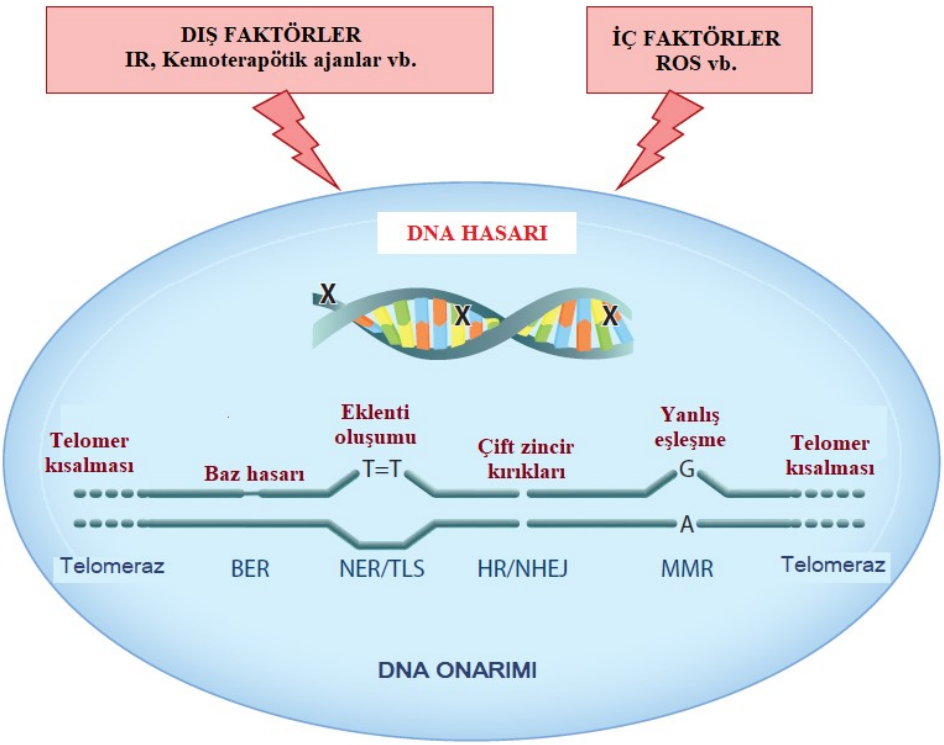
- Tek zincir DNA kırıkları (SSB'ler),
- Çift zincir DNA kırıkları (DSB'ler),
- Baz modifikasyonları,
- Yanlış eşleşme
- Telomer kısalması şeklinde kendini gösterir.

2.2.1.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres (OS), hücre ve dokularda üretilen ROS'lar ve bu ROS'ların birikimi ile bu zararlı ROS'ların zararlarının etkisiz hale getirme yeteneği arasındaki bozukluk ile tanımlanan durumdur (Pizzino ve diğ., 2017). ROS, hem normal yaşam sürecinde hem de patolojik koşullarda üretilen küçük bir reaktif molekül grubunu ifade eder. ROS, bir sinyal molekülü veya hastalıkların ortaya çıkması için bir risk faktörü olarak işlev görebilir (Valko ve diğ., 2007). Hücre içindeki ROS seviyesi, paolojik bir duruma yol açmamak için belirli bir seviyede tutulmak zorundadır. Hücre içi ROS seviyesi normal aralığın dışında olursa hücreye zarar verebilir. Hücre içi ROS, ateroskleroz, miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarı, miyokardiyal hipertrofi ve kalp yetmezliği gibi KAH patogenezi ile yakından ilişkilidir (Elahi ve diğ., 2009).

ROS, oksidatif fosforilasyonun bir yan ürünü olarak üretilir. Aynı zamanda vasküler hastalıklara ve ateroskleroza yatkınlık oluşturan bir risk faktörüdür (Dandona ve diğ., 2002). ROS, DNA'daki bazların çift bağlarına saldırarak hidrojen atomunu koparır ve DNA

hasarlarına yol açar. Bu hasarlar, hem mitokondriyal hem de nükleustaki DNA'da meydana gelir ve bazların oksidasyonu, SSB, DSB ve telomer kısalması dahil olmak üzere bir dizi hasara neden olur (Tatarkova ve diğ., 2011) (Şekil 2.4). Hücreler ROS miktarını belirli bir seviyede tutmak için enzimlere dayanan bir dizi antioksidan mekanizma geliştirmiştir. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler bu mekanizmalarda görev almaktadır. Bu enzimlerdeki fonksiyon bozukluğu ile ateroskleroz arasında ilişki tespit edilmiştir (Vendrov ve diğ., 2007).



Şekil 2.4: Vasküler hastalıklarda oksidatif stresin DNA üzerine etkisi (Uryga ve diğ., 2016)

Hücrelerde sürekli olarak düşük miktarlarda hücre içi ROS üretilmesine rağmen, ROS üretimine neden olan uyaranlardaki artışlar veya ROS temizleme sisteminin başarısızlığından kaynaklanan aşırı ROS üretimi, vasküler işlev bozukluklarının ana nedenidir. ROS'un aşırı üretimi endotel fonksiyon bozukluğuna, VDKH'nin aşırı büyümesine ve yapısal yeniden şekillenmeye neden olarak, vasküler fonksiyonları değiştirir. Ayrıca, oksidatif stres transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna, adezyon moleküllerinin yukarı regülasyonuna,

kemokin üretiminin uyarılmasına ve inflamatuar hücrelerin toplanmasına yol açarak, vasküler inflamasyon ve hasarı uyarabilir (Thomas ve diğ., 2008; Förstermann U., 2008). ROS'un vasküler fonksiyon bozukluğundaki bu rolleri göz önüne alındığında, ROS kaynaklarının ve farklı patolojik koşullar altında oynadığı rollerin net bir şekilde sınıflandırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Kardiyovasküler risk faktörleri henüz tam olarak aydınlatılamayan mekanizmalarla ROS üreten enzim sistemlerini aktive eder ve/veya ROS detoksifiye eden sistemleri zayıflatır. Ortaya çıkan oksidatif stres, redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu (proinflamatuar genlerin ekspresyonunu uyaran) ve sinyal kaskadlarının aktivasyonu (kinazların aktivasyonu, fosfatazların inhibisyonu) gibi bir dizi farklı mekanizmalar yoluyla aterojenezi destekler. Oksidatif stresin yol açtığı genomic DNA hasarları, DNA hasar onarım sistemlerini aktive edebilir (Förstermann, 2008).

2.2.1.2. Sitotoksik ajanlar ve Radyasyon

Sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi, DNA'da hasar oluşturabilir. Bu ajanlar ayrıca DNA hasarlarını artıran ROS oluşumunu da indükler. Bu hasarlar, hücrenin apoptoz sürecine girmesine neden olabilir. Farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan radyoterapi ve kemoterapi gibi uygulamalar DNA hasarına sebep olduklarından, ateroskleroz için risk faktörleridir (Uryga ve diğ., 2016).

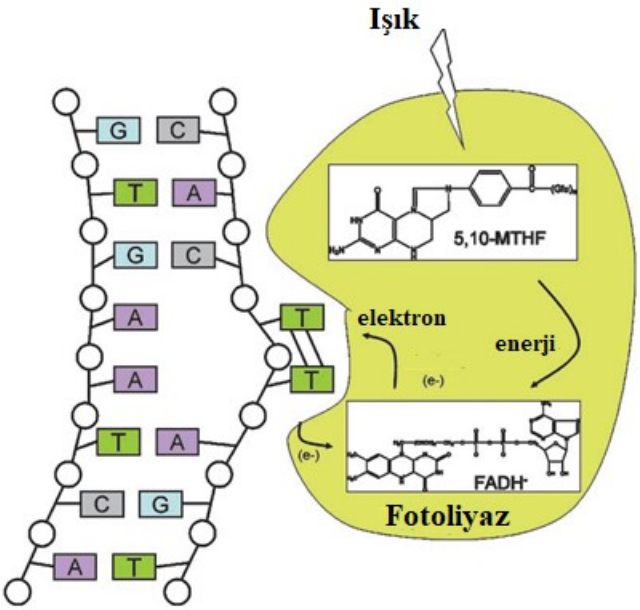
2.3. DNA ONARIM MEKANİZMALARI

2.3.1. Direk Onarım Mekanizması

Canlılarda iki doğrudan onarım mekanizması vardır. Bunlar ultraviyole (UV) ile indüklenen pirimidin dimerlerinin DNA fotoliyaz tarafından fototers çevrilmesi ve DNA metiltransferaz tarafından DNA'daki O^6-metilguanin'den (O^6MeGua) O^6-metil grubunun çıkarılması mekanizmalarıdır. Fotoliyaz, insanlar dahil pek çok türde bulunmaz, metilguanin DNA metiltransferaz ise evrensel bir onarım mekanizmasıdır.

FOTOLİYAZ: Fotoliyaz, 55-65 kDa'luk bir monomerik proteindir. Enerji kaynağı olarak mavi ışık fotonlarını kullanarak UV kaynaklı siklobütan pirimidin dimerlerini onarır (Şekil 4.5). Enzimin yüzeyinde bir foto-anten işlevi gören folat bulunur. Fotoliyaz, ışıktan bağımsız bir reaksiyonla pirimidin dimeri içeren DNA'ya bağlanır ve dimeri aktif bölge cebine çevirir. Katalitik süreç ışık absorbsiyonu ile başlatılır. Fotoliyaz kofaktörü meteniltetrahidrofolat, bir fotonu emer ve uyarma enerjisini katalitik kofaktör FADH'ye aktarır. Uyarılan FADH, dimeri iki pirimidine bölerek pirimidin dimerine bir elektron aktarır. Elektron, FADH'yi yeniden oluşturmak için flavin radikaline geri döner ve enzim, onarılan DNA'dan ayrışır (Sancar, 2003).

METİLGUANİN DNA METİLTRANSFERAZ: 20 kDa'lık küçük bir proteindir. Hasarı tanıyıp ve bu bölgede DNA ile düşük stabiliteli bir kompleks oluşturduktan sonra O^6MeGua bazını aktif bölge boşluğuna çevirir ve metil grubu aktif bölge sisteinine aktarılır (Daniels ve diğ., 2000). Protein daha sonra onarılan DNA'dan ayrılır ve enzim inaktive olur.

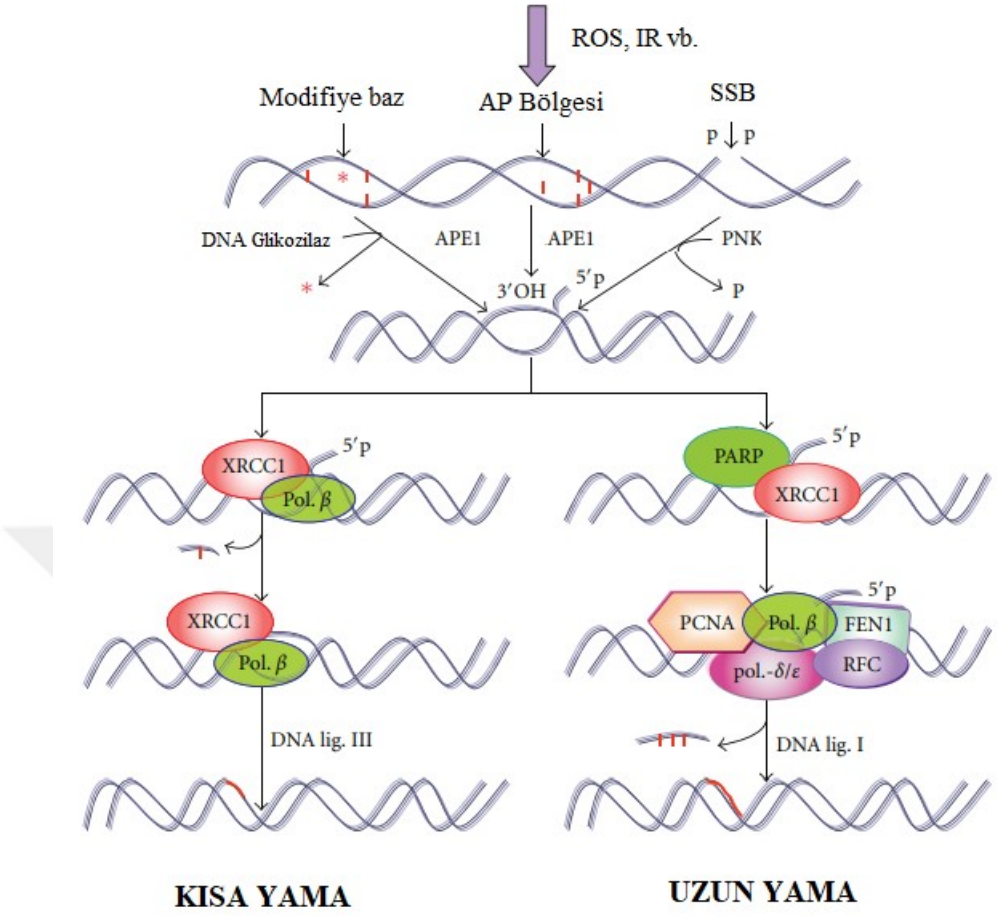


Şekil 2.5 Fotoreaktivasyon ile doğrudan onarım (Rastogi ve diğ., 2010).

2.3.2. Baz Kesip Çıkarma Mekanizması (BER)

BER, DNA'da abazik (AP) bir bölge oluşturmak için DNA glikosilaz tarafından başlatılır (Şekil 2.6). AP bölgeleri bazı durumlarda doğrudan bir hasar ürünü de olabilir (McCullough ve diğ., 1999 ; Wilson, 1998). Organizmalar, urasili, alkillenmiş pürinleri, indirgenmiş pirimidinleri veya oksitlenmiş pürinleri tanıyan enzimlere sahiptir. DNA glikozilaz, onarılacak baz ile şeker arasındaki beta-N-glikozidik bağı kırar. Bazın ayrılmasından sonra oluşan bazsız olan bölgeye AP bölgesi denir ve AP endonükleaz (APE1) tarafından bu bölge tanınır. APE1, AP bölgelerindeki şeker-fosfat omurgasını ayırır. Oluşun boşlukta 3’ hidroksil grubu ve 5’ abazik deoksiriboz fosfatlı bir çentik oluşur. Bu çentik DNA Pol β ile doldurulur ve DNA ligaz ile onarım tamamlanır. Bu onarıma insan hücrelerinde kısa yama adı verilir.

Alternatif bir mekanizma olarak uzun yama BER mekanizmasında, APE1, AP bölgesinde şeker-fosfat omurgasını ayırır, ardından DNA Pol/PCNA ve FEN1'in kombinasyonu bir flep oluşturur. FEN1, 2-10 nükleotidlik bir bölgeyi endonükleaz aktivitesi ile ortadan kaldırır. Oluşan yama daha sonra PCNA yardımıyla DNA Polβ tarafından sentezlenir ve DNA ligaz 1 tarafından bazlar birleştirilir (Frosina ve diğ.,1996 ; Klungland ve diğ., 1997). DNA Pol β ve DNA ligaz enzimlerinin hasarlı bölgeye toplanması, XRCC1 yardımıyla gerçekleşir.



Şekil 2.6 Baz Kesip Çıkarma Mekanizması (Rastogi ve diğ., 2010)

2.3.3. Nükleotid Kesip Çıkarma Mekanizması (NER)

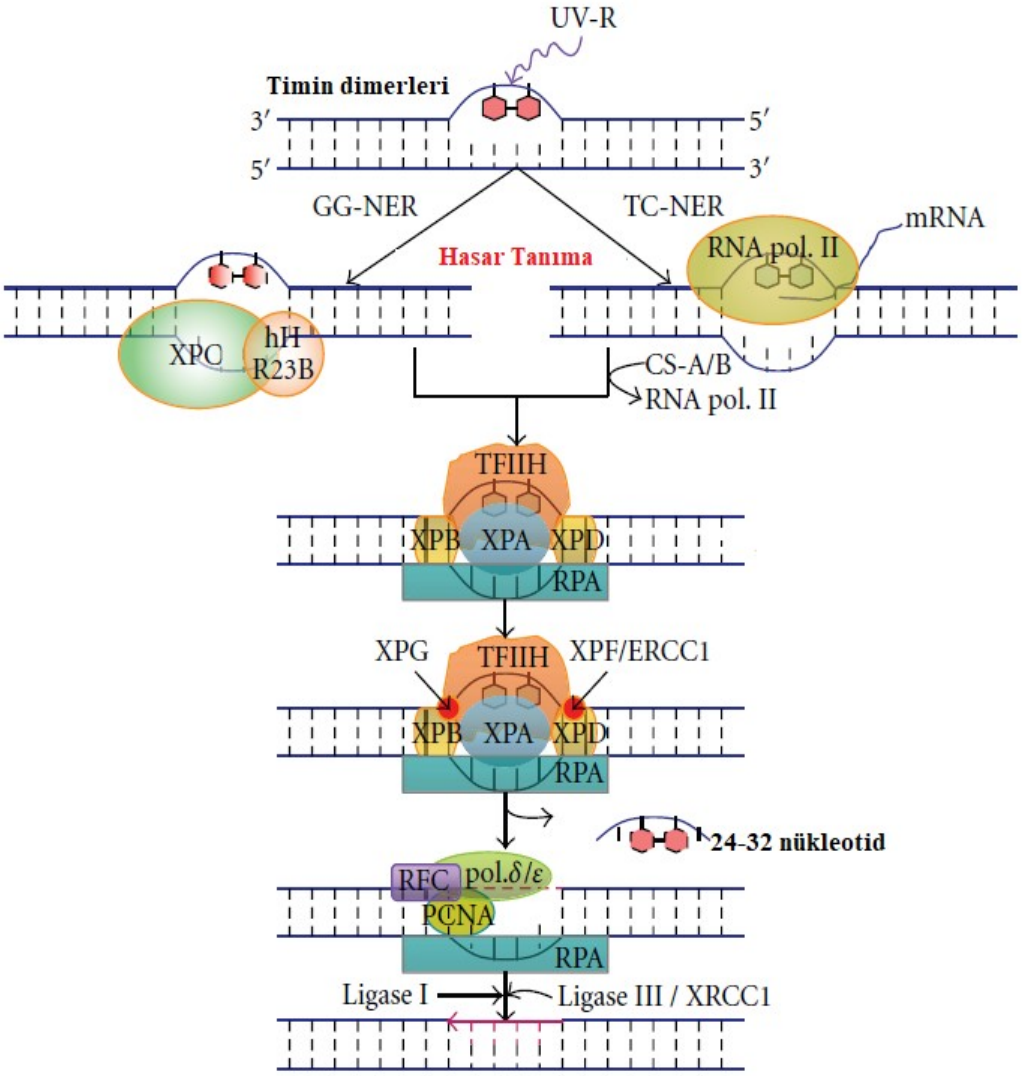
NER, UV ışığın, toksinlerin ve kemoterapötik ilaçların DNA'da oluşturdukları hasarının onarımında rol oynayan bir mekanizmadır (Kazantsev ve diğ., 1996 ; Shiyanov ve diğ., 1999) (Şekil 2.7). NER mekanizmasının iki alt yolu vardır: evrensel genom NER (GG-NER) ve transkripsiyonla birleştirilmiş NER (TC-NER). GG-NER, genomdaki hasarların onarımını kapsarken, TC-NER, RNA polimeraz II tarafından başlatılan transkripsiyon sırasında karşılaşılan DNA'daki hasarları onarır (Rastogi ve diğ., 2010).

NER mekanizmasının temel adımları hasarın tanınması ile başlar. Prokaryotlarda 12–13 nükleotidlik bir oligomer, ökaryotlarda ise 24–32nükleotidlik bir oligomerlik bölgeye kesikler atılır. Uzaklaştıralan bu nükleotidlerden oluşan boşluk ligasyon ile tamamlanır.

DNA hasarı, hasar bölgesinde bir araya gelen RPA, XPA ve XPC-TFIIH'nin ortak bağlanmasıyla tanınır. Bu moleküller, hasarlı bölgede bir kompleks oluşturur ve bu bölgeye XPB ve XPD helikazlar bağlanarak, DNA zinciriATP hidrolizi ile birbirinden ayrılır. Daha sonra XPG, daha kararlı bir kompleks oluşturmak için XPC'nin yerini alır. XPF ve ERCC1 bu bölgeye bağlanır. Hasarlı dizi XPG ve XPF tarafından kesilir. Ortaya çıkan 24–32 oligomerlik boşluk, replikasyon yardımcı proteinleri PCNA ve RFC'nin yardımıyla Polβ tarafından doldurulur (Sancar, 2003).

TC-NER mekanizması,

RNA polimeraz II'nin hasarlı zincirde işlev göstermediğinde durur ve TC-NER mekanizması, devreye girer. RNA polimeraz II, Cockayne syndrome B (CSB) ve Cockayne syndrome A (CSA) ve XPA molekülleri etkileşerek fonksiyonel TC-NER kompleksi oluşturulur. Onarım GG-NER mekanizması ile tamamlanır (Lagerwef ve diğ., 2011).



Şekil 2.7 Nükleotid Kesip Çıkarma Mekanizması (Rastogi ve diğ., 2010)

2.3.4. Yanlış Eşleme Onarım Mekanizması

Bu onarım mekanizması replikasyonda gerçekleşen hataları ve rekombinasyonu kapsar. Hatalı baz tespit edilir ve çıkarılır.. Mekanizmada en hassas durum kalıp zincir seçimidir. *E.coli*., metilasyon modifikasyonu ile bu sorunu ortadan kaldırmıştır. (Brown ve diğ., 2002). *E.coli*'deki Mut ailesi proteinleri ve DNA helikaz II görev alır. MutS hatalı bazı yakalar. MutS'den sonra MutL DNA bölgesine bağlanır ve burada bir loop yapısı oluşur. MutH ise metillenmemiş DNA' da kesi oluşturur. MutS-MutL helikaz ile birlikte, metillenmemiş ipliğin hasarlı bölgeyi çıkarır. Bölgede meydana gelen gap DNA polimeraz

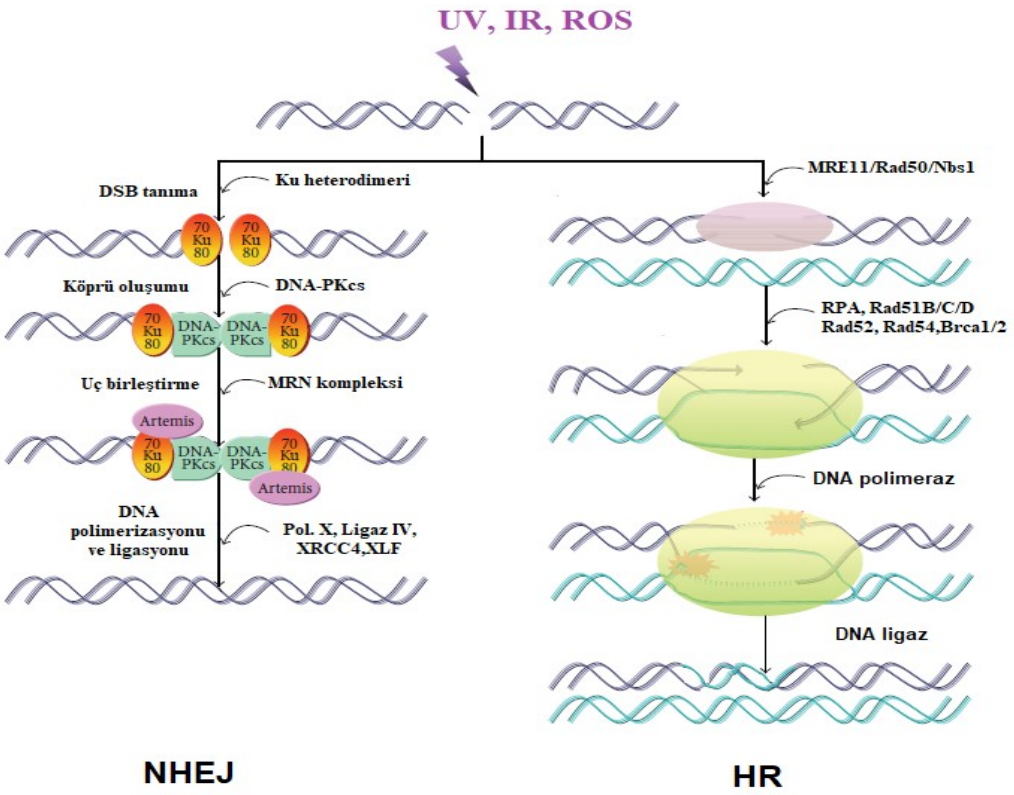
tarafından doldurulur (Polosina ve diğ., 2009). Ökaryotlarda, MutS ve MutL genlerinin homologları bulunur. MutH'ın homoloğu olmadığı için, hasarlı bazın DNA zincirinden ayrılmasında başka bir mekanizmanın rol oynadığını gösterir.

2.3.5. Çift Zincir Kırıkları ve Rekombinasyonel Onarım Mekanizması

IR (İyonlaştırıcı Radyasyon), UV, ROS ve kemoterapötik-genotoksik kimyasalların etkisi sonucunda DNA'da oluşan tek ya da çift zincir kırıklarını onaran yaygın mekanizmalar vardır. DSB'ler, iki bağımsız mekanizma ile onarılır. Rekombinasyon yoluyla DSB onarımında birçok proteinin eş zamanlı olarak fonksiyon görür ve bu proteinlerdeki fonksiyon bozuklukları kalıtsal hastalıklara neden olabilir. Örneğin, BRCA1 proteinin mutasyonu, kalıtsal meme kanserine yol açabilir.

HOMOLOG REKOMBİNASYON (HR): DSB'lerin HR ile onarım mekanizmasının aydınlatılması ile ilgili çalışmalar ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de gerçekleştirilmiş ve bu mekanizmada RAD51 ailesi ve MRE11 gibi proteinlerin rol oynadıkları tespit edilmiştir. Bu proteinleri eksprese eden genlerin çoğunun homologları, insan da dahil olmak üzere tüm ökaryotlar arasında yüksek oranda korunmuştur (Sung ve diğ., 2000 ; Cromie ve diğ., 2001). Ökaryotik RAD51 ailesi, hem mitotik hem de mayotik hücre döngüsünde genom bütünlüğünü koruyarak HR'de önemli bir rol oynar (Li ve diğ.2006). İlk olarak, kırık bölge ekzonükleazlar tarafından kesilerek tek zincirli bölgeler oluşur. Daha sonra bu bölgeye RAD51 ailesine ait proteinler toplanır. Bu bölgede oluşan nükleoprotein kompleksi, kardeş kromatidin hasar görmemiş çift zincirde hareket eder. Burada bir cross-over yapısı oluşur. DNA helikaz tarafından bu bölge büyütülür. DNA polimerazlar tarafından yeni sentezlenen DNA, DNA ligaz 1 ile birleştirilir. Çift zincir kırık onarımı tamamlanmış olur (Mladenov ve diğ., 2013).

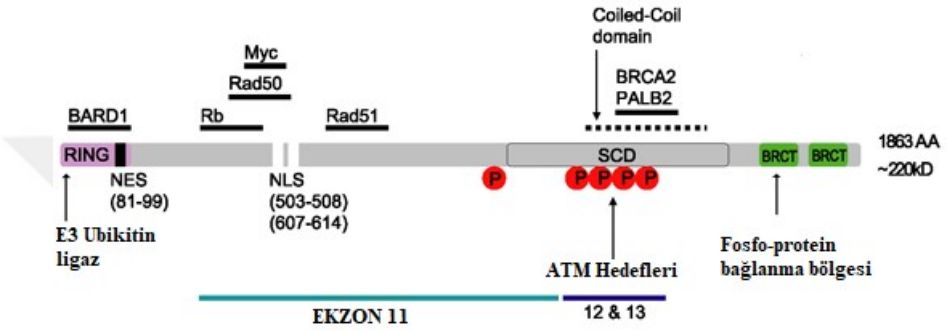
HOMOLOG OLMAYAN REKOMBİNASYON ONARIMI (NHEJ): Hasarın onarımında, kırık kromozomların uçlarını birleştirilir. Onarımda görevli Ku proteinleri bölgeyiproteazlardan korur. Kırık bölgenin bir ucuna Ku70 diğer ucuna Ku80 bağlanır. Bu iki proteinin birbirlerine afinitelerine oldukça yüksektir. Bu sayede iki kırık uç bir araya gelir. Bu birleşme ile XRCC4'ün aktive olmasına sebep olur. XRCC4, ligaz ve polimeraz ile etkileşerek hasar onarılır (Li ve diğ., 2011).



Şekil 2.8 HR ve NHEJ onarım mekanizması (Rastogi ve diğ., 2010)

2.4. BRCA1 GENİ VE FONKSİYONLARI

BRCA1 geni, 110 kb uzunluğunda olup, 24 ekzondan ve bir adet kodlanmayan psödogen bölgesinden oluşur (Miki ve diğ., 1994) (Şekil 2.9). BRCA1, 17. Kromozomun 17q21'de bulunur ve 1863 amino asit uzunluğunda bir protein kodlar (Paterson, 1998). BRCA1 proteini tümör süpresör protein olup, DNA onarımında görev alan moleküller, transkripsiyon düzenleyen moleküller ve hücre döngüsü kontrol noktalarında görev alan moleküller ile yakın ilişkilidir.



Şekil 2.9 BRCA1 geni (Clark ve diğ., 2012).

Bu proteinin fonksiyonunda amino (N) terminalinde bulunan RING (Really Interesting New Gene) bölgesi, C-terminalinde buluna iki adet BRCT bölgesi ve coiled-coil bölgesi görev alır (Wu ve diğ., 1996). RING bölgesi 110 amino asitten oluşur. Bu bölge ubikuitinizasyonda görev almaktadır (Hashizume ve diğ., 2001). RING bölgesi sadece BRCA1 değil birçok DNA onarım proteininde de bulunur. BRCA1, BARD1'in RING bölgesi ile heterodimer oluşturur ve bu yapı çeşitli hücre mekanizmalarını düzenler (Clark ve diğ., 2012). C-terminal BRCT bölgesi, 213 amino asitlik bölümden meydana gelir. DNA hasarıyla ATM ve ATR gibi kinazların aktive olur ve bu moleküllerin substratlarıyla etkileşmesine yardımcı olur (Mohammad ve diğ., 2009; Paul diğ., 2015).

BRCA1 proteini, sadece DNA onarımında görev almaz. Hücre döngüsünde, kromatin yeniden yapılanmasında, transkripsiyonda ve ubikuitinasyonunda rol oynar (Narod ve diğ., 2004). BRCA1'in fonksiyonlarından biri de DSB'leri tanıma mekanizmasıdır. BRCA1, MRN kompleksi ile birleşerek NHEJ mekanizmasında rol alır (Sartori ve diğ., 2007). BRCA1 ve BARD1'in (BRCA1-İlişkili Ring Domain 1), mikrotübül stabilizasyonu ve mitotik iğ

ipliklerinin düzenklenmesinde rol oynar. Böylece, BRCA1'in kromozom bütünlüğündeki önemi göz ardı edilemezdir (Joukov ve diğ., 2006).

2.5. PARP1 GENİ VE FONKSİYONLARI

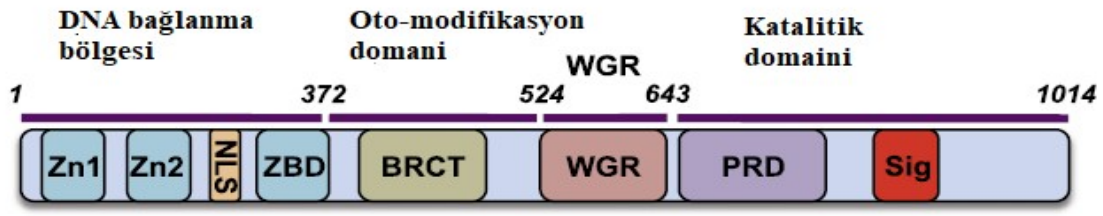
PARP-1, iyi karakterize edilmiş yapısal ve fonksiyonel alanlara sahip 116 kDa'luk bir protein olup, 1014 amino asitlik bir proteindir (Ame ve diğ., 2004)(Şekil 2.10). Amino ucundan karboksil ucuna kadar içerdiği bölgeler;

1. İki çinko parmak motifi, bir çinko bağlama alanı ve bir NLS içeren bir amino-terminal DNA bağlama alanı.
2. Fosfo-peptitleri bağlayabilen bir BRCA1 C-terminus (BRCT) motifi içeren otomodifikasyon alanı.
3. Nükleik asit bağlanmasında işlev görebilen WGR (Trp–Gly–Arg) motifi.
4. Substrat bağlama bölgesi ile etkileşime giren ve bir sarmal PARP düzenleyici alanı (PRD) içeren bir karboksil-terminal katalitik alan.
5. PAR zincirinin kontrol dallanması ve NAD+ bağlanma bölgesini oluşturan ve PARP protein ailesini tanımlayan yüksek düzeyde korunmuş PARP motifi. Bu yapısal ve işlevsel alanların tek bir proteinde toplanması, PARP-1'i çekirdekte ve genom boyunca çok çeşitli işlevleri yerine getirmek için ideal hale getirir (Krishnakumar ve diğ., 2010; Luo ve diğ.,2012).

PARP-1, en az 17 farklı protein içeren PARP ailesine aittir (Ame ve diğ., 2004; Schreiber ve diğ., 2006). Tüm PARP ailesi üyeleri enzimatik olarak aktif değildir ve bazıları PARP'ler yerine mono-ADP-ribosil-transferazlar olarak işlev görebilir. Tanımlanan PARP ailesi üyeleri, PARP'lerin çok çeşitli biyolojik fonksiyonlar sergilediğini göstermektedir.

PARP-1, çeşitli mekanizmalar yoluyla gen ifadelerini düzenler. PARP-1, kromatini veya kromatini modüle eden enzimlerin aktivitesini düzenler. Ayrıca, transkripsiyonel bir düzenleyici olarak işlev görerek gen ifadelerini düzenler ve DNA metilasyonunu organize eder. Bu düzenleyici görevleri dışında, SSB ve DSB hasarlarında aktif rol oynar.

BER ve SSB onarım mekanizmaları, bazlardaki küçük kimyasal değişimlerin ve tek zincir kırıklarının onarıldığı tamir mekanizmalarıdır (Ciccia ve diğ., 2010). SSB'ler çok hızlı bir şekilde algılanır ve kırılmış tek zincir bölgesine PARP1 bağlanarak bu bölgenin daha fazla hasarlanması önlenir (Chaudhuri ve diğ., 2017). Daha sonra DSB onarımında görev alan diğer molekülleri hasarlı bölgeye çeker (Kim ve diğ., 2005). PARP1 eksikliği veya inhibisyonunun fosforillenmiş histon H2AX ve p53 gibi proteinlerinin gecikmeli aktivasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir. PARP1 ayrıca DNA hasarı sensörleri olan mayotik rekombinasyon 11 (MRE11) ve Nijmegen kırılma sendromu proteini 1'in (NBS1) DSB' bölgelerine hızlı bir şekilde toplanmasında rol oynar (Haince, 2007).



Şekil 2.10 PARP1 geni ve fonksiyonel alanları (Ame ve diğ., 2004)

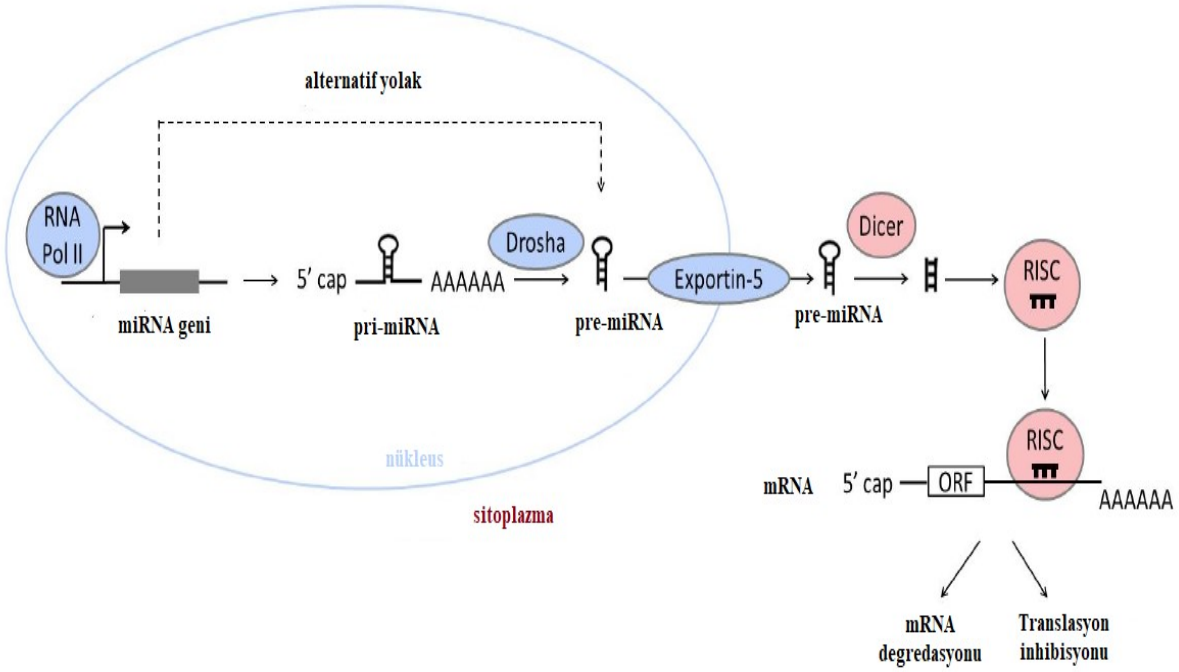
2.6. MİKRORNA'LAR

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ifadelerini mRNA düzeyinde negatif olarak düzenleyen, 17-22 nükleotit uzunluğunda, tek sarmallı, kodlamayan bir RNA sınıfıdır. İlk miRNA, lin-4, 1993'te *Caenorhabditis elegans* nematodunda keşfedildi. Günümüze kadar, insan genomunda yaklaşık 2500 miRNA tanımlanmıştır. Haberci RNA'ya (mRNA) tamamlayıcı bir şekilde bağlanırlar ve mRNA'nın yıkılması veya translasyonunun inhibisyonu yoluyla gen ifadelerinin düzenlenmelerinde rol oynarlar (Bartel, 2009). MiRNA'lar, embriyogenez, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, apoptoz, tümörogenez gibi birçok süreçlerde rol oynar (Ardekani ve diğ., 2010).

miRNA'ların kardiyovasküler sistem açısın rol oynadıkları fonksiyonlar; kardiyomiyosit büyümesinin ve kontraktilitesinin düzenlenmesi, kalp ritim gelişiminin ve sürdürülmesinin düzenlenmesi, plak oluşumu, lipid metabolizması ve anjiyogenez (Fuller ve diğ., 2014 ; Van Rooij ve diğ., 2007). MiRNA'ların protein kodlayan genlerin %30-50'sinin aktivitesini kontrol ettiği tahmin edilmektedir (Ha ve diğ., 2014). Tek bir miRNA, bir hücrede yüzlerce genin ifadesini etkileyebilir ve her bir mRNA molekülü, birbiriyle etkileşime giren veya rekabet eden birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir (Wojciechowska ve diğ.,2017).

miRNA Biyogenezi: miRNA'lar, nükleusta RNA polimeraz II tarafından birincil miRNA'lar (pri-miRNA'lar) sentezlenir. RNaz III endonükleaz ve Drosha ile birlikte protein kompleksi oluşturur. Bu kompleks, pri-miRNA'ları yaklaşık 70 nükleotitlik öncü miRNA'lara (pre-miRNA'lar) böler (Wahid ve diğ., 2010). Daha sonra, GTP'ye bağımlı bir protein olan exportin-5, pre-miRNA'ları tanır ve bu miRNA'ları nükleustan sitoplazmaya taşır (Condorelli ve diğ., 2014). Sitoplazma içerisinde pre-miRNA, RNase III endonükleaz Dicer tarafından yaklaşık 22 nükleotid çift sarmallı miRNA'lara dönüştürülür. Kılavuz sarmal olarak adlandırılan bu yapı, RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) bağlanır ve olgun miRNA'ya dönüşür.

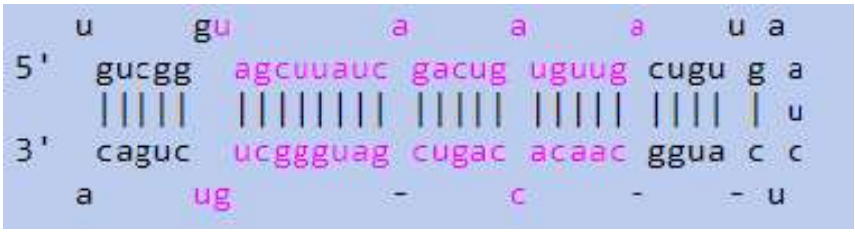
miRNA'ların çoğu hücre içinde lokalizedir, ancak bazıları proteinlerle (örneğin Ago2, nükleofosmin 1 ve HDL) birlikte veya hücre kaynaklı mikroveziküller yardımı ile (eksozomlar veya apoptotik cisimler) kana salınır. Böylece miRNA'lar dolaşımla uzak bölgelere taşınır ve hücre zarı ile kaynaşarak veya reseptör aracılı bağlanma yoluyla hücrelere girer. Dolayısıyla, miRNA'ların hücreden hücreye iletişimde rol oynadığını söyleyebiliriz (Ardekani ve diğ., 2010).



Şekil 2.11 miRNA biyogenezi (Wojciechowska ve diğ.,2017)

2.6.1. miR-21 Geni

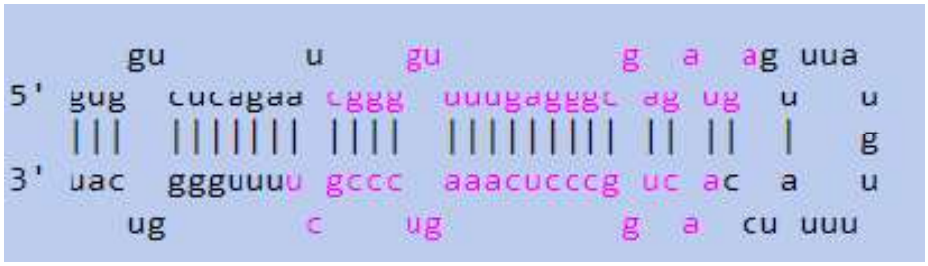
İnsan miR-21 geni, 17q23.2 kromozomunda yer alır. Transmembran Protein 49'un (TMEM 49) 3' UTR ucundan sentezlenir (Krzywinska ve diğ., 2020). miR-21'in biyojenik işlem basamakları ilk olarak 2004 yılında karakterize edilmiş olup (Cai ve diğ., 2004), tanımlanan ilk memeli mikroRNA'larından biridir. mir-21'in transkripsiyonu kodlayıcı genin intronik bölgelerinde yer almasına rağmen, kendi promotör bölgelerine sahiptir ve bağımsız olarak da kodlanabilir. Kopyalanan mir-21'in bu formu ~3433-nükleotid uzunluğunda birincil transkriptini oluşturur.



Şekil 2.12 mir-21-5p yapısı (www.mirbase.org)

2.6.2. mir-193b Geni

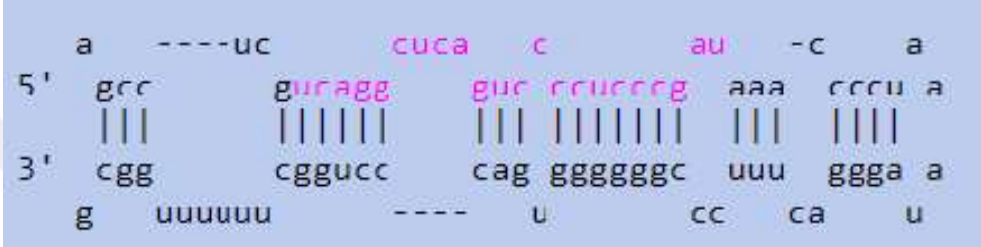
mir-193 ailesi, mir-193a-3p, mir-193a-5p, mir-193b-3p ve mir-193b-5p'den oluşur ve tümör baskılayıcı olarak fonksiyon görür. Bunlardan mir-193b olarak tanımlanan mir-193b 16.kromozom üzerinde yer alır. Olgun formda evrim sırasında yüksek oranda korunmuş, 22 nükleotit uzunluğundan oluşan kısa kodlamayan RNA'dır (Khordadmehr ve diğ., 2019). mir-193b sağlıklı hücrelerde proliferasyonu ve hücre döngüsü düzenlenmesinde görev alır.



Şekil 2.13 mir-193b-3p yapısı (www.mirbase.org)

2.6.3. mir-484 Geni

mir-484, farelerde, sıçanlarda ve insanlarda yüksek oranda korunmuş ve kromozom 16p13.11 üzerindeki Meiosis arrest dişi 1 (MARF1) genin promotör bölgesinde bulunur (Allach ve diğ.,2020). mir-484, çekirdekcikte lokalize miRNA grubunda yer alır. mir-484, yeni tanımlanmış miRNA'lardandır.



Şekil 2.14 mir-484 yapısı (www.mirbase.org)

3. YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUPLARI VE ÖRNEK ALIMI

Hasta grubu, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Tıp Fakültesine başvuran hastalardan oluşmuştur. KAH teşhisi, Kalp ve Damar Cerrahisi tarafından konulmuşur 50 kişiden oluşmuştur. Genel anestezi altında cerrahi ekip tarafından ameliyat edilen hastaların karotisinde oluşmuş aterosklerotik plaklar ve aynı hastalardan ameliyat sırasında çıkarılan safenden kalan doku parçaları çalışmaya alınmıştır. Hastalardan aynı zamanda, 8-OhdG hasar tayini için serum izolasyonu için 5 ml kan alındı. Tüm hastalar, Türkiye'nin değişik bölgelerinden gelmektedir. Hastalar arasında akrabalık ilişkisi bulunmamaktadır. Gönüllü hastalara çalışmanın amacı açıklanmıştır ve yazılı izinleri alınmıştır.

Kontrol grubu, herhangi bir kronik hastalığı olmayan bireylerden oluşmuştur. Onamları alınan sağlıklı bireylerden serum izolasyonu için 5 ml kan alındı.

3.1.1. Çalışma Grubu Dışlanma Ölçütleri

Koroner arter baypas cerrahisi dışında kalan;

- Kardiyak cerrahiler,
- KAH baypas cerrahisi ile eş zamanlı başka kardiyak cerrahi uygulanan hastalar,
- Kalp akciğer makinasının kullanılmadığı hastalar,
- Akut veya kronik böbrek yetersizliği bulunan hastalar,
- Acil ameliyat uygulanacak hastalar,
- 18 yaşından küçük hastalar,
- Gönüllü olur formu onayı vermeyen hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.
-

Kontrol grubunda ise herhangi bir kronik hastalığı olan bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir. 18 yaşından küçük ve gönüllü olur formunu imzalamayan ve çalışmanın

herhangi bir aşamasında çalışmadan ayrılmak isteyen hasta ve kontroller çalışma dışı tutulmuştur.

3.1.2. Çalışma Grubu Klinik Ölçütleri

Hastaların cerrahi müdahele öncesi rutin alınan venöz kan örneklerinden biyokimyasal parametrelerden glukoz düzeyi, kreatin, ALT, AST düzeyleri ölçüldü ve sonuçlar tarafımızla paylaşılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarına dahil olan bireyler yaş, cinsiyet, kronik hastalık durumu ve sigara kullanıp kullanmadıkları sorularak saptanıp, raporlanmıştır.

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

- Mikropipetler, Eppendorf
- Vorteks, Velp
- Hassas Terazi, CHYO
- Santrifüj, Beckman Coulter
- Ph Metre, WTW
- Buzdolabı, Arçelik
- Ultra Derin Dondurucu (-80 ºC), New Brunswick Scientific, Sanyo
- Çalkalamalı Su Banyosu, Kottermann 35
- Otoklav, Hirayama
- Termal Döngü Cihazı, ABI
- Real-time PCR Cihazı, ABI
- Nano-spektrofotometre, Thermo Fisher Scientific
- Elisa okuyucu, TFS
- Doku parçalayıcı, Next Advance
- Saf su arıtma, Millipore

3.3. KULLANILAN TAMPON ÇÖZELTİLER

1X Fosfat Tuz Tamponu

NaCl	8 gr
KCl	0,2 gr
$Na_2HPO_4.2H2O$	1,81 gr
KH_2PO_4	0,24 gr

RNA Saklama Tamponu (50 ml, pH 5.2)

Sodyum sitrat	25 ml
EDTA	40 ml
Amonyum sülfat	70 gr

3.4. DOKU HOMOJENİZASYONU

Cerrahi müdahele ile toplanılan aterosklerotik plaklar ve safen dokuları laboratuvar işlemlerine kadar -80ºC'de RNA saklama tamponu içerisinde saklandı. -80ºC'den çıkarılan örnekler kullanılacağı zaman çözdürüldü ve üzerine ticari olarak satın alınan lizis solüsyonu ve β-merkaptoetanol eklendi. Doku-tampon karışımı, parçalanmak için seramik boncuklar içeren steril tüplere alındı.Dokular en yüksek devirde ve soğutma modunda 5 dakika cihaz içerisinde parçalandı. Parçalama işlemi, soğutmalı homojenizatör cihazında gerçekleştirildi.

3.5. mRNA-GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ

3.5.1. mRNA İzolasyonu

BRCA1 ve PARP1 gen ifade miktarını tespiti için homojenize ettiğimiz plak ve kontrol dokularından RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon için ticari olarak alınan EXTRACT ME (Blirt, Polonya) kiti kullanıldı.

1. Homojenize edilen plak ve safen dokuları 60 sn vortekslendi.

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

3. Üst sıvı "DNA Purification Column"a aktarıldı ve 2dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.

4. Filtrat, steril 1.5 ml ependorfa aktarıldı.

5. Üzerine 200 µl hacimde 100% etanol ilave edildi ve 5 sn vortekslendi.

6. Karışım "Large RNA Purification Column"a aktarıldı.

7. 2dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.

8.Kolon yıkama solusyonu ile 3 kez yıkandı.

9. 2dk 18.00 g'de santrifüj edildi.

10. Süpernatant uzaklaştırıldı.

11. Kolona 50 µl miREB ilave edildi ve 2 dk 25º'de inkübe edildi.

12. 2 dk 11.000 g'de santrifüj edildi.

13. Filtreler uzaklaştırıldı.

14. Kalan örnekler miRNA izolasyonu için-80°C kaldırıldı.

3.5.2. mRNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçülmesi

Dokulardan elde ettiğimiz RNA'ların miktarı, NanoDrop One/One (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile ölçüldü. RNA miktarı 260 nm saptandı. RNA miktarı ve saflığı için aşağıdaki matematiksel hesap kullanıldı

RNA miktarı (ng/µl): Optik yoğunluk 260 nm x seyreltme faktörü x 40

RNA safllığı: Optik yoğunluk 260 / Optik yoğunluk 280>2,0

3.5.3. mRNA- cDNA Sentezi

RT-PCR (ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği ile ters transkriptaz enzimi kullanılarak mRNA zincir kalıpları cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA sentezi için, her bir mRNA örneğinden 40 ng alınıp, PCR tüpüne aktarıldı ve saf su ile 10 µl son hacime tamamlandı. cDNA sentezi High-Capacity Kit (Thermo FisherScientific) protokolüne uygun yapıldı. Bu süreçte kullanılan solüsyonlar Tablo 3-1'de ve işlem basamakları Tablo 3-2'de verilmiştir.

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit'i kullanılarak cDNA protokolü:

1. -20°C'de saklanan kitin bileşenleri 25ºC'de çözdürüldü ve birkaç kez pipetaj yapıldı. Bu bileşenler kısa süre santrifüj edildi.
2. 2X Reverse Transciription karışımı, buz üzerinde Tablo 3-1.'e göre hazırlandı. Pipet ile karıştırılan karışım 96 kuyucuklu plağın, her bir kuyucuğuna 10 µl dağıtıldı.
3. Reaksiyon plak şeması tasarlanıp, cihaza ait bilgisayara kaydedildi.
4. Kuyucuklara dağıtılan karışıma konsantrasyonları eşitlenen RNA'lar kullanıldı. Her bir kuyucuk için 10 µl olacak şekilde hesaplandı. Her bir kuyudaki toplam hacim 20 µl'dir.
5. Plakalaeın üzeri adeziv film ile kapatıldı.

6. Hazırlanan plak santrifüj edildi ve Tablo 3-2'deki sıcaklık döngüleri ayarlanarak ABI (Applied Biosystems) SimpliAmp cihazında cDNA sentezi gerçekleştirildi.

BİLEŞENLER	HACİM (µL)
10X RT Buffer	2.5 µL
25X dNTP Mix (100mM)	1.0 µL
10X Random Primers	2.5 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.25 µL

Tablo 3-1: Her bir reaksiyonda cDNA sentezi için gerekli olan karışımın içeriği

	1.BASAMAK	2.BASAMAK	3.BASAMAK	4.BASAMAK
SICAKLIK (°C)	25	37	85	4
ZAMAN (dakika)	10	120	5	∞

Tablo 3-2: Reaksiyon döngüsü

3.5.4. mRNA- Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

BRCA1 ve PARP1 genlerinin ifade analizleri, StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile Sybr Green boyası kullanılarak yapıldı. BRCA1ve PARP1'in ifade düzeyleri Aktin Beta (ACBT) geni karşılaştırılarak normalizasyon işlemi yapıldı. Çalışmada kullanılan genlere ait primerler aşağıda belirtilmiştir (Tablo 3-3, 3-4 ve 3-5).

qRT-PZR analizi için reaksiyon karışımının hazırlanması ve izlenen çalışma protokolü uygulanmıştır.

1. Çalışma öncesi reaktifler tamamen çözdürüldü. Vorteks yardımı ile reaktifler iyice karıştırıldı ve kısa süre santrifüjlendi.

2. Tüm reaktifler steril 1.5 ml tüpte Tablo 3-6'deki hacimlerde, qPCR karışımı hazırlandı. Her hasta ve kontrol cDNA'ları çift tekrarlı çalışıldı.

4. Mikropipet yardımı ile plakların her bir kuyucuğuna 2 µl cDNA dağıtıldı.

5. Hazırlanan karışım plakların her bir kuyucuğuna 18 µl olacak şekilde dağıtıldı.

6. Hazırlanan, plaklar, adeziv film ile kapatıldı.

7. Hazırlanan plak, Tablo 3-7'deki sıcaklık zaman döngüsü ile StepOnePlus™ Real-Time PCR System cihazına yüklendi.

PRİMER	DİZİ	UZUNLUK
İleri Primer	CCCAGCTACTCAGGTGGCTA	20
Geri Primer	TGATCTTGGCTCACTGCAAC	20

Tablo 3-3: BRCA1 geni primer dizisi

PRİMER	DİZİ	UZUNLUK
İleri Primer	TCTTTGATGTGGAAAGTATGAAGAA	25
Geri Primer	GGCATCTTCTGAAGGTCGAT	20

Tablo 3-4: PARP1 geni primer dizisi

PRİMER	DİZİ	UZUNLUK
İleri Primer	CCAACCGCGAGAAGATGA	18
Geri Primer	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	20

Tablo 3-5: ACTB geni primer dizisi

BİLEŞENLER	HACİM (µL)
2X Sybr Green	10 µL
İleri Primer	0.6 µL
Geri Primer	0.6 µL
50X ROX boyası	0.4 µL
cDNA	2 µL
dH_2O	6.4 µL

Tablo 3-6: Her bir reaksiyonda qRT-PZR için gerekli olan karışımın içeriği

	AKTİVASYON	DENATÜRASYON	UZAMA	
SICAKLIK (°C)	95	95	60	40 DÖNGÜ
ZAMAN (saniye)	180	5	15-30	

Tablo 3-7: Reaksiyon döngüsü

3.6. MİKRORNA EKSPRESYON ANALİZLERİ

3.6.1. miRNA İzolasyonu

mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484'ün ifade miktarını tespiti için homojenize ettiğimiz plak ve safen dokularından miRNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon için ticari olarak alınan EXTRACT ME (Blirt, Polonya) kiti kullanıldı.

1. Homojenize edilen plak ve safen dokuları 60 sn vortekslendi.
2. 2 dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.
3. Üst sıvı "DNA Purification Column"a aktarıldı ve 2dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.
4. Filtrat, steril 1.5 ml ependorfa aktarıldı.
5. Üzerine 200 µl hacimde 100% etanol ilave edildi ve 5 sn vortekslendi.
6. Karışım "Large RNA Purification Column"a aktarıldı.
7. 2dk 18.000 g'de santrifüj edildi.
8. Filtrat steril 1.5 ml ependorfa transfer edildi.
9. Üzerine 1 hacim 96-100% etanol ilave edildi ve 5 sn vortekslendi.
10. Karışım miRNA saflaştırma kolonuna aktarıldı.
11. 2 dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.
12. Filtrat uzaklaştırıldı.
13. miRNA saflaştırma kolonuna 500 µl miRW tamponu ilave edildi.
14. 1 dk 15.000 x g'de santrifüj edildi.
15. Filtrat uzaklaştırıldı.
16. miRNA saflaştırma kolonuna 500 µlmiRW tamponu ilave edildi.
17. 1 dk 15.000 x g'de santrifüj edildi.
18. Filtrat uzaklaştırıldı.
19. 3 dk 18.000 x g'de santrifüj edildi.
20. Filtreler 1.5 ml steril ependorfa transfer edildi.
21. 70 µlmiREB ilave edildi ve 2 dk 25ºC'de inkübe edildi.
22. 2 dk 11.000 x g'de santrifüj edildi.
23. Filtreler uzaklaştırıldı.

24. miRNA'lar çalışma yapılana kadar -80°C'de saklanmak için kaldırıldı.

3.6.2. miRNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçülmesi

Dokulardan elde ettiğimiz RNA'ların miktarı, NanoDrop One/One (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile ölçüldü. RNA miktarı 260 nm saptandı. RNA miktarı ve saflığı için aşağıdaki matematiksel hesap kullanıldı

RNA miktarı (ng/µl): Optik yoğunluk 260 nm x seyreltme faktörü x 40

RNA safllığı: Optik yoğunluk 260 / Optik yoğunluk 280>2,0

3.6.3. miRNA - cDNA Sentezi

RT-PCR (ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği ile ters transkriptaz enzimi kullanılarak mRNA zincir kalıpları cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA sentezi için, her bir mRNA örneğinden 80 ng alınıp, PCR tüpüne aktarıldı ve saf su ile 10 µl son hacime tamamlandı. cDNA sentezi High-Capacity Kit (Thermo FisherScientific) protokolüne uygun yapıldı. Bu süreçte kullanılan solüsyonlar Tablo 3-1'de ve işlem basamakları Tablo 3-2'de verilmiştir.

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit'i kullanılarak cDNA protokolü:

1. -20°C'de saklanan kitin bileşenleri 25ºC'de çözdürüldü ve birkaç kez pipetaj yapıldı. Bu bileşenler kısa süre santrifüj edildi.
2. 2X Reverse Transciription karışımı, buz üzerinde Tablo 3-1.'e göre hazırlandı. Pipet ile karıştırılan karışım 96 kuyucuklu plağın, her bir kuyucuğuna 10 µl dağıtıldı.
3. Reaksiyon plak şeması tasarlanıp, cihaza ait bilgisayara kaydedildi.
4. Kuyucuklara dağıtılan karışıma konsantrasyonları eşitlenen RNA'lar kullanıldı. Her bir kuyucuk için 10 µl olacak şekilde hesaplandı. Her bir kuyudaki toplam hacim 20 µl'dir.

5. Plakalaeın üzeri adeziv film ile kapatıldı.
6. Hazırlanan plak santrifüj edildi ve Tablo 3-2'deki sıcaklık döngüleri ayarlanarak ABI (Applied Biosystems) SimpliAmp cihazında cDNA sentezi gerçekleştirildi.

BİLEŞENLER	HACİM (µL)
10X RT Buffer	2.5 µL
25X dNTP Mix (100mM)	1.0 µL
miRNA Primers (mir-21-5p, mir-193b-3p, mir-484, U6)	2.5 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.25 µL

Tablo 3-8: cDNA sentezi için gerekli olan karışımın içeriği (bir reaksiyon için)

	1.BASAMAK	2.BASAMAK	3.BASAMAK	4.BASAMAK
SICAKLIK (°C)	25	37	85	4
ZAMAN (dakika)	10	120	5	∞

Tablo 3-9: Reaksiyon döngüsü

3.6.4. mRNA- qRT-PZR

mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484 miRNA'larının ekspresyon analizleri, StepOnePlus™(Thermo Fisher Scientific) cihazı ile Sybr Green boyası kullanılarak yapıldı. Her bir hedef miRNAların ifade düzeyleri U6 (RNU6-1) ile karşılaştırılarak normalizasyon işlemi yapıldı. Çalışmada kullanılan genlere ait primerler aşağıda belirtilmiştir (Tablo 3-10, 3-11, 3-12 ve 3-13).

qRT-PZR analizi için reaksiyon karışımının hazırlanması ve izlenen çalışma protokolü uygulanmıştır.

1. Çalışma öncesi reaktifler tamamen çözdürüldü. Vorteks yardımı ile reaktifler iyice karıştırıldı ve kısa süre santrifüjlendi.

2. Tüm reaktifler steril 1.5 ml tüpte Tablo 3-6'deki hacimlerde, qPCR karışımı hazırlandı. Her hasta ve kontrol cDNA'ları çift tekrarlı çalışıldı.

4. Mikropipet yardımı ile plakların her bir kuyucuğuna 2 µl cDNA dağıtıldı.

5. Hazırlanan karışım plakların her bir kuyucuğuna 18 µl olacak şekilde dağıtıldı.

6. Hazırlanan, plaklar, adeziv film ile kapatıldı.

7. Hazırlanan plak, Tablo 3-7'deki sıcaklık zaman döngüsü ile StepOnePlus™ Real-Time PCR System cihazına yüklendi.

PRİMER	DİZİ	UZUNLUK (bp)
İleri Primer	GACCAACACCAGTCGATGG	19
Geri Primer	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAA GAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTC TTTCACAGCCCA	69

Tablo 3-10: mir-21-5p primer dizisi

PRİMER	DİZİ	UZUNLUK (bp)
İleri Primer	GGAACTGGCCCTCAAAGT	18
Geri Primer	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAA GAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTC TTTCAGCGGGAC	69

Tablo 3-11: mir-193b-3p primer dizisi

PRİMER	DİZİ	UZUNLUK (bp)
İleri Primer	TCAGGCTCAGTCCCCTC	17
Geri Primer	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAA GAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTC TTTCATCGGGAG	69

Tablo 3-12: mir-484 primer dizisi

PRİMER	DİZİ	UZUNLUK (bp)
İleri Primer	CCTGGATGATGATAAGCAAATGC	23
Geri Primer	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAA GAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTC TTTCAGTCAGTTA	70

Tablo 3-13: U6 (RNU6-1) primer dizisi

BİLEŞENLER	HACİM (µL)
2X Sybr Green	10 µL
İleri Primer	0.6 µL
Geri Primer	0.6 µL
50X ROX boyası	0.4 µL
cDNA	2 µL
dH_2O	6.4 µL

Tablo 3-14: Her bir reaksiyonda qRT-PZR için gerekli olan karışımın içeriği

	AKTİVASYON	DENATÜRASYON	UZAMA	
SICAKLIK (°C)	95	95	60	40 DÖNGÜ
ZAMAN (saniye)	180	5	15-30	

Tablo 3-15: Reaksiyon döngüsü

3.7. 8-OHdG HASAR TAYİNİ

Hasta ve kontrol kanlarından serum ayrıldı ve -20°C' de saklandı. Serumdaki 8-OhdG düzeyi antijen-antikor ilişkisine dayanan ELISA yöntemi ile çalışılarak, hasta ve kontrol gruplarına ait DNA hasarı tespit edildi. Ticari kit ile (BT Lab) metot gerçekleştirildi. Kitin hassasiyeti 3.25 ng/ml'dir. İzlenen çalışma protokolü aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

1. Kit içerisinden çıkan bütün solüsyonlar, oda sıcaklığında kullanıldı.
2. Blank olarak, kit içerisinden çıkan substrat A, substrat B ve stop solüsyon blank olarak yüklendi.
3. Örnekler ve standartlar 50 µl hacimde kuyulara yüklendi. Üzerlerine 50 µl biotinli antijen eklendi ve 37ºC'de 60 dk inkübe edildi.
4. Bütün kuyular inkübasyon sonrası boşaltıldı. Yıkama solüsyonu ile kuyu başına 300 µl yıkama solüsyonu yıkandı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
5. 50 µl avidin-HRP bütün kuyulara eklendi ve 37ºC'de 60 dakika inkübe edildi.
6. Bütün kuyular inkübasyon sonrası boşaltıldı. Yıkama solüsyonu ile kuyu başına 300 µl yıkama solüsyonu yıkandı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
7. 50 µl substratA ve 50 µl substartB eklendi. 10 dakika 37ºC'de ışık almadan inkübe edildi.
8. Her bir kuyuya inkübasyon sonrası 50 ul stop solüsyonu eklendi.

9. Bu işlemden sonra hemen 450 nm de okuma yapıldı.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Analizler, istatistiksel yazılım paketi olan SPSS, v18.0, SPSS Inc., Chicago, IL programı ile gerçekleştirlmiştir. $p<0.05$'i anlamlı olarak kabul edildi. AP dokusu ve kontrol dokusu gen ifade değerleri Ortalama ± Standart hata (SE) olarak verildi ve iki grup arasındaki istatiksel karşılaştırmaStudent t ve Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirildi. Yaş ile ilgili veriler Ortalama ± Standart sapma (SD) olarak verildi. Genlerin ekpresyon düzeylerinin değerlendirmek için Pearson-korelasyon testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda , KAH teşhisi konulmuş 50 (15 Kadın ve 35 Erkek; 67±8 yaş) hasta bulunmaktadır. Bu hastaların karotisinden aterosklerotik plaklar ve sağlıklı safen dokularından (kontrol doku) PARP1, BRCA1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484 genlerinin ifadeleri tespit edildi. 8-OHdG DNA hasar tespiti için aynı KAH hastalarının serum örnekleri kullanıldı. Kontrol grubu olarak 50 sağlıklı bireyin (18 Kadın ve 32 Erkek; 60 ± 7 yaş) serum örnekleri kullanıldı. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında cinsiyet ve yaş acısından istatiksel bir fark yoktu ($p>0.05$). Çalışmaya alınan koroner arter hastalarının klinik verilerine ait dosyalar incelenmiştir.

4.1. KORONER ARTER HASTALARININ GEN İFADELERİ

Çalışmaya dahil ettiğimiz 50 KAH'sının her biri için hedef gen olarak, PARP1, BRCA1 için ACTB geni referans olarak kullanıldı. mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484 genlerinin ve referans gen olarak kullanılan ve U6 geni kullanıldı. Analizde CT (Cycle Threshold) verileri elde edildi. Aterosklerotik plak ve kontrol doku örneği için ayrı ayrı olmak üzere hedef gen CT değeri ile referans gen CT arasındaki fark alındı. Böylece, $2^{-\Delta CT}$ değeri hesaplanmıştır. Her bir hastaya ait aterosklerotik plak ve kontrol doku örneği, çift tekrar çalışıldı. Elde edilen iki CT değerinin ortalamaları alındı. Ortalama, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin hesaplamasında kullanıldı. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri Schmittgen ve Livak' ın 2008' de önerdiği denkleme göre her hasta için ayrı olarak hesaplandı. Her hasta için tek bir $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri tespit edildi.

Çalışmaya katılan hastaların aterosklerotik plak ve kontrol doku örneklerine ait PARP1, BRCA1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484 genleri ile ilgili $2^{-\Delta CT}$ değerleri aşağıda yer alan Tablo 4-1'de gösterilmiştir.

Tablo 4-1 : Aterosklerotik plak (AP) ve kontrol doku örneklerinde BRCA1, PARP1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484'ün genlerinin ifade değerleri ($2^{-\Delta CT}$)

	AP dokusu	Medyan	Kontrol doku	Medyan	P
BRCA1	42.78±15.55	1.07	1.33±0.40	0.34	**0,03**[*]
PARP1	0.23±0.14	0.2	0.04±0.15	0.007	**0,006**[*]
mir-21-5p	0.92±0.49	0.09	0.11±0.08	0.003	**0,0001**[*]
mir-193b-3p	0.15±0.07	0.006	0.16±0.06	0.01	0,91[**]
mir-484	0.08±0.03	0.002	0.04±0.01	0.003	0,33[**]

Veriler ortalama ±SE olarak verilmiştir. [*]Mann-Whitnety U testi. [**]Student t testi.

$2^{-\Delta CT}$ hesaplamasına göre mir-193b-3p ve mir-484 genlerinin aterosklerotik plaklardaki ifade düzeyleri ile kontrol dokudaki ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4-3). Aterosklerotik plak ve kontrol dokulardaki BRCA1, PARP1 ve mir-21-5p genlerinin ifade düzeyleri karşılatırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (Tablo 4-3).Her üç genin aterosklerotik plak ifade düzeyleri artmıştır.

$2^{-\Delta CT}$değerlerini,$2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine dönüştürdüğümüzde, AP'da, BRCA1 ifade düzeyinin kontrol doku örneklerine göre 4.205 kat oranında değiştiği görülmektedir (Tablo 4-2).

Tablo 4-2 : AP ve kontrol doku örneklerinde BRCA1 ifade değeri

	BRCA1 (Ort)	ACTB(Ort)	ΔC_T (Ort)	$\Delta\Delta C_T$(Ort)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Ateroskleroz	28.631	28.894	0.263	-2.072	4.205
Kontrol	28.361	26.552	-1.809	0	1

$2^{-\Delta CT}$ değerlerini, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine dönüştürdüğümüzde, AP'da, PARP1 ifade düzeyinin kontrol doku örneklerine göre 2.607 kat oranında değiştiği görülmektedir (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: AP ve kontrol doku örneklerinde PARP1 ifade değeri

	PARP1 (Ort)	ACTB(Ort)	ΔC_T (Ort)	$\Delta\Delta C_T$(Ort)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Ateroskleroz	34.300	28.193	-6.107	-1.382	2.607
Kontrol	34.204	26.715	-7.489	0	1

$2^{-\Delta CT}$ değerlerini, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine dönüştürdüğümüzde, AP'da, mir-21-5p ifade düzeyinin kontrol doku örneklerine göre 21.955 kat oranında değiştiği görülmektedir (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: AP ve kontrol doku örneklerinde mir-21-5p ifade değeri

	mir-21 (Ort)	U6(Ort)	ΔC_T (Ort)	$\Delta\Delta C_T$(Ort)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Ateroskleroz	22.302	18.528	-3.773	-4.456	21.955
Kontrol	27.407	19.177	-8.230	0	1

$2^{-\Delta CT}$ değerlerini, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine dönüştürdüğümüzde, AP'da, mir-193b-3p ifade düzeyinin kontrol doku örneklerine göre 0.611 kat oranında değiştiği görülmektedir (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: AP ve kontrol doku örneklerinde mir-193b-3p ifade değeri

	mir-193b (Ort)	U6(Ort)	ΔC_T (Ort)	$\Delta\Delta C_T$(Ort)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Ateroskleroz	25.316	18.528	-6.787	0.709	0.611
Kontrol	24.793	18.714	-6.078	0	1

$2^{-\Delta CT}$ değerlerini, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine dönüştürdüğümüzde, AP'da, mir-484 ifade düzeyinin kontrol doku örneklerine göre 0.790kat oranında değiştiği görülmektedir (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: AP ve kontrol doku örneklerinde mir-484 ifade değeri

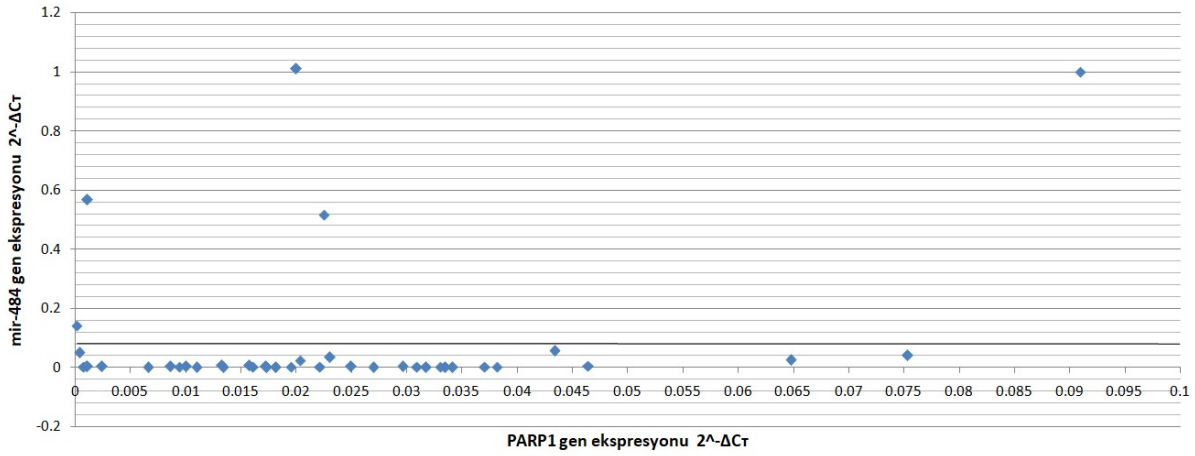
	mir-484(Ort)	U6(Ort)	ΔC_T (Ort)	$\Delta\Delta C_T$(Ort)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Ateroskleroz	26.610	18.528	-8.082	0.339	0.790
Kontrol	26.457	18.714	-7.742	0	1

PARP1, BRCA1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484 genlerine ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçlarımız 0,9-1,1 aralığına göre değerlendirildi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 0,9 değerinden küçük ise normal dokuya göre söz konusu genin ifadesinin azaldığı, 0,9-1,1 aralığında ise normal dokuya göre ilgili genin ifadesinin değişmediği, 1,1 değerinden büyük ise normal dokuya göre hedef genin ifadesinin arttığı kabul edildi. Bu değerlendirmeye göre AP'da kontrol dokulara göre BRCA1 gen ifade değeri %57 arttığı, %4 oranında değişmediği, %39 oranında azaladığı tespit edilmiştir. AP'da kontrol dokulara göre PARP1 gen ifade değeri %60 arttığı, %2 oranında değişmediği, %38 oranında azaladığı tespit edilmiştir. Mir-21-5p gen ifade değeri %72 arttığı, %28 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Mir-193b-3p gen ifade değeri %28 arttığı, %72 oranında azaldığı tespit edilmiştir. AP'da kontrol dokulara göre mir-484 gen ifade değeri %43 arttığı, %4 oranında değişmediği, %53 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda AP ve kontrol doku gruplarında BRCA1 gen ifade düzeyleri ile mir-21-5p ve mir-193b-3p ifade düzeyleri arasındaki ve PARP1 gen ifade düzeyleri ile mir-193b-3p

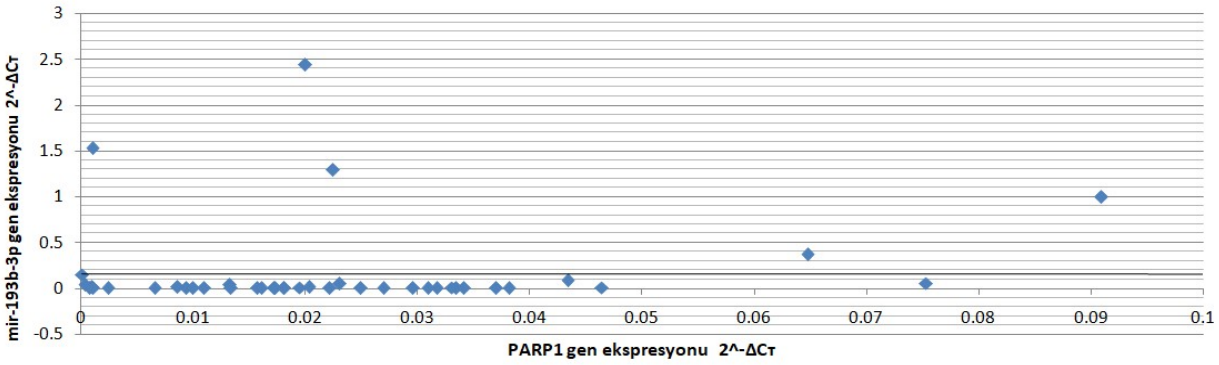
ve mir-484 ifade düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceledik. Ayrıca PARP1 Ve BRCA1 arasındaki ifade düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceledik. Karşılaştırma Pearson-korelasyon testine göre yapıldı.

AP grubunun, PARP1 ve mir-484 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatiki olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (r=-0.056; p=0.66) (Şekil 4-1). Kontrol doku grubunun, PARP1 ve mir-484 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (r=-0.18; p=0.26).



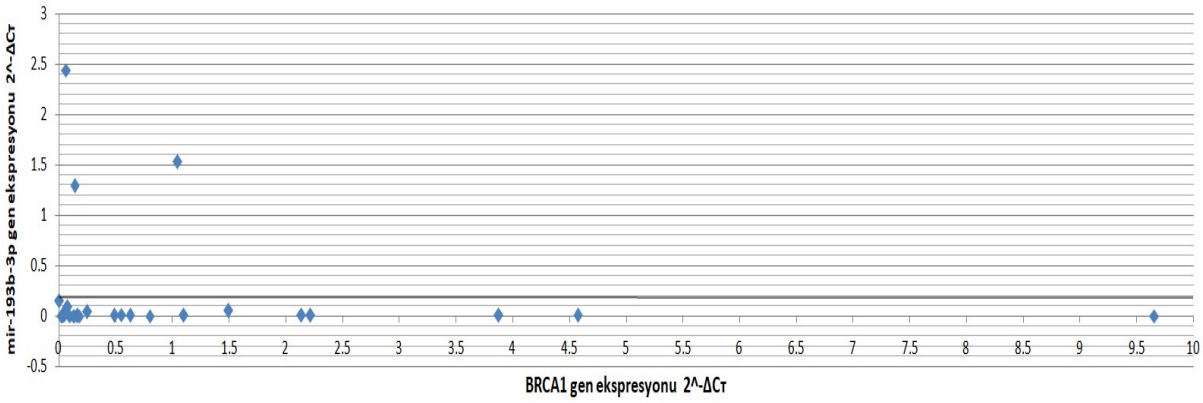
Şekil 4-1: AP, PARP1 ve mir-484 gen ifade düzeyi karşılaştırılması.

AP grubunun, PARP1 ve mir-193b-3p gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatiki olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (r=-0.07; p=0.66) (Şekil 4-2). Kontrol doku grubunun, PARP1 ve mir-193b-3p gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (r=0.20; p=0.19).



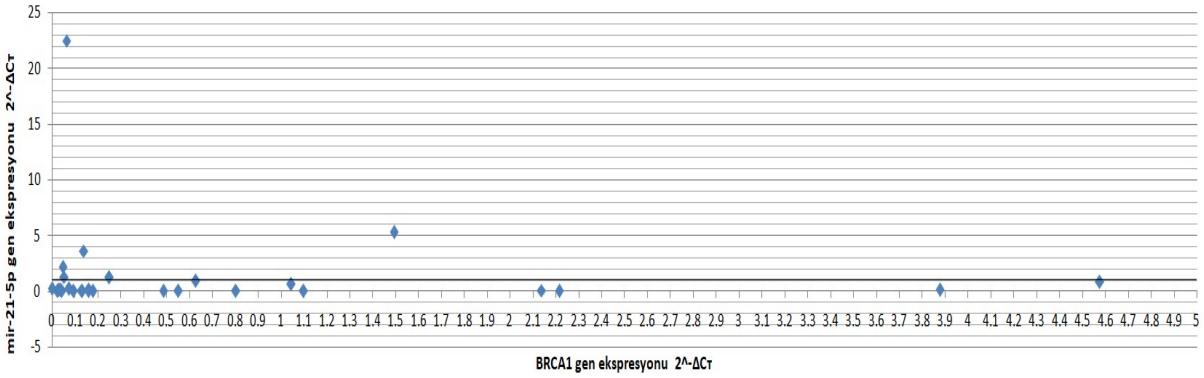
Şekil 4-2: AP, PARP1 ve mir-193b-3p gen ifade düzeyi karşılaştırılması.

AP grubunun, BRCA1 ve mir-193b-3p gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatiki olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (r=-0.12; p=0.42) (Şekil 4-3). Kontrol doku grubunun, BRCA1 ve mir-193b-3p gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (r=0.04; p=0.79).



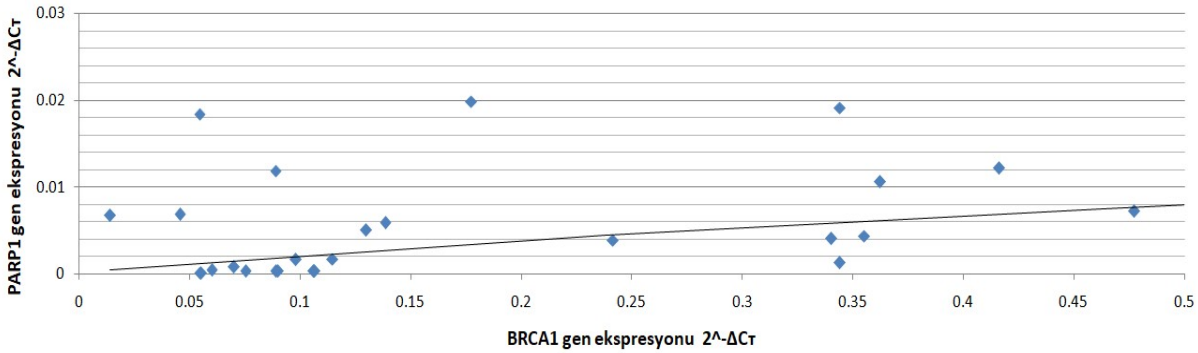
Şekil 4-3: AP, BRCA1 ve mir-193b-3p gen ifade düzeyi karşılaştırılması.

AP grubunun, BRCA1 ve mir-21-5p gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatiki olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (r=-0.11; p=0.49) (Şekil 4-4). Kontrol doku grubunun, BRCA1 ve mir-21-5p gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (r=-0.02; p=0.89).

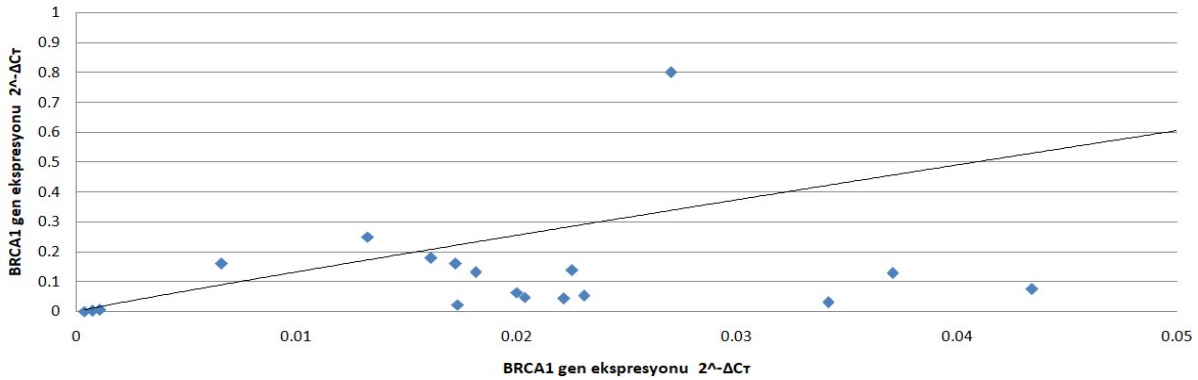


Şekil 4-4: AP, BRCA1 ve mir-21-5p gen ifade düzeyi karşılaştırılması.

AP grubunun, BRCA1 ve PARP1 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatiki olarak anlamlı bir korelasyon saptandı (r=0.46; p=0.002) (Şekil 4-5). Kontrol doku grubunun, BRCA1 ve PARP1 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptandı (r=0.71; p=0.0001) (Şekil 4-6).



Şekil 4-5: AP, BRCA1 ve PARP1 gen ifade düzeyi karşılaştırılması.



Şekil 4-6: Kontrol dokuda, BRCA1 ve PARP1 gen ifade düzeyi karşılaştırılması.

4.2. KORONER ARTER HASTALARININ KLİNİK VERİLERİ

Çalışma grubumuzu oluşturan hastaların AP örneklerindeki gen ifade düzeyleri, sigara ve diyabet öyküsüne göre incelenmiştir(Tablo 4-7 , 4-8).

Tablo 4-7: AP örneklerindeBRCA1, PARP1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484 genlerinin ifade değerlerinin sigara kullanımı ile ilişkisi

		Ort± SE	P
BRCA1	Sigara (+)	32.30±16.28	>0.05
	Sigara (-)	52.36±25	
PARP1	Sigara (+)	0.38±0.29	>0.05
	Sigara (-)	0.1±0.05	
mir-21-5p	Sigara (+)	0.53±0.19	>0.05
	Sigara (-)	1.27±0.91	
mir-193b-3p	Sigara (+)	0.19±0.09	>0.05
	Sigara (-)	0.12±0.09	
mir-484	Sigara (+)	0.1±0.05	>0.05
	Sigara (-)	0.49±0.04	

Veriler ortalama ±SE olarak verilmiştir.

Sigara kullanımının, BRCA1, PARP1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484'ün gen ifade düzeyi etkisi incelendiğinde istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05).

Tablo 4-8 AP örneklerinde BRCA1, PARP1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484 genlerinin ifade değerlerinin diyabet öyküsü ile ilişkisi

		Ort ± SE	P
BRCA1	Diyabet (+)	10.57±6.42	>0.05
	Diyabet (-)	57.81±22.2	
PARP1	Diyabet (+)	0.04±0.02	>0.05
	Diyabet (-)	0.31±0.19	
mir-21-5p	Diyabet (+)	0.3±0.12	>0.05
	Diyabet (-)	1.18±0.69	
mir-193b-3p	Diyabet (+)	0.18±0.12	>0.05
	Diyabet (-)	0.14±0.08	
mir-484	Diyabet (+)	0.12±0.07	>0.05
	Diyabet (-)	0.05±0.03	

Veriler ortalama ±SE olarak verilmiştir.

Diyabet hastalığının BRCA1, PARP1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484'ün gen ifade düzeyi etkisi incelendiğinde istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05).

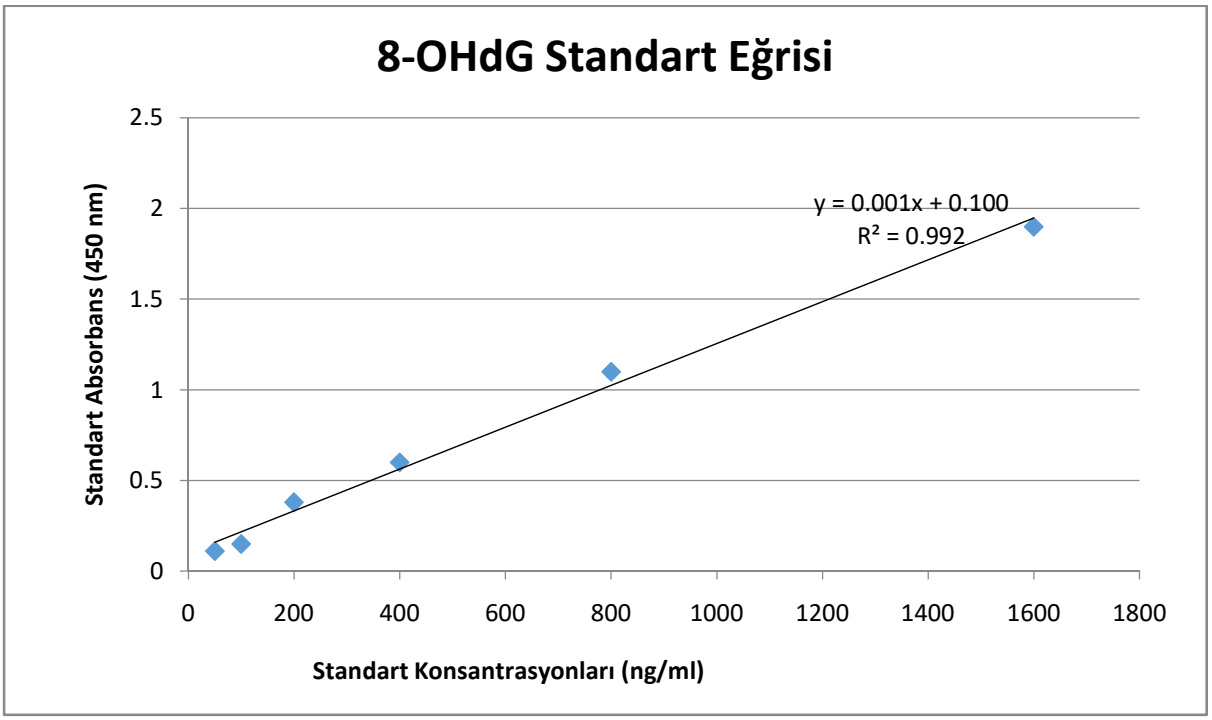
4.3. 8-OHdG HASAR DÜZEYİ

Hasta ve kontrol gruplarınınserum 8-OhdG hasar düzeyi incelendiğindeiki grup arasında istatiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir (Tablo 4-9) . Şekil 4-7'de hasta ve kontrol bireylerinin 8-OHdG hasar düzeylerinin hesaplanmasında kullanılan, standartlarla çizilmiş grafik görülmektedir.

	8-OHdG (Ort±SE)	p
Hasta	1117.09±28.08	**0.0001**
Kontrol	632.80±23.24	

-Mann Whitney testi

Tablo 4-9: AP ve kontrol grubu arasındaki 8-Ohd-G ilişkisi



Şekil 4-7: Kontrol dokuda, BRCA1 ve PARP1 gen ifade düzeyi karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

KAH, dünya genelinde yaygın olup, önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Ateroskleroz, arter duvarında lipid birikimi olarak karakterize edilen patolojik bir durum olup, KAH'lığının sebebidir. KAH ile ilgili tedavi protokolleri öncelikle hipertansiyon ve hiperlipidemi gibi risk faktörlerinin önlenmesine yönelik planlanır. Ancak toplumlardaki atero trombotik komplikasyon riski çok yüksek seyretmekte olup, her yıl dünyada milyonlarca ölüme neden olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı son yirmi yıl içinde yapılan çalışmalar ile ateroskleroz, arter duvarının lipid kaynaklı, kronik, düşük dereceli inflamatuar hastalığı olarak tanımlanmıştır (Seneviratne ve diğ., 2015).

Hipertansiyon, diyabet, hiperkolesterolemi ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörleri, damar duvarında ROS konsantrasyonunda yüksek artışlara neden olarak oksidatif stres yaratır (Förstermann ve diğ., 2006; Li, 2006; Hink, 2001). Oksidatif stres, mevcut antioksidan savunma sistemlerinin ROS'ların temizlenmesinde yetersiz kaldığı ve ROS üretiminin yüksek düzeylerde olduğu durumlarda ortaya çıkar. Oksidatfi stres, hücresel işlev bozukluğuna, protein ve lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına neden olarak, geri dönüşü olmayan hücre hasarlarına ve hücre ölümüne yol açabilir (Hiroyuki ve diğ., 2011).

Hücresel makromoleküllerden biri olan DNA, ana ROS hedeflerinden biridir. Oksidatif DNA hasarının bir belirteci olan 8-OHdG, oksidatif DNA hasarlarının olduğu hücrelerde yüksektir (Kasai, 2002). Kardiyomiyopatik hastaların kalp dokusundaki immunohistokimyasal analizlerde 8-OhdG düzeyleri yüksek bulunmuş ve KAH'ndaki 8-OHdG düzeylerinin iyi bir belirteç potansiyeline sahip olduğu ifade edilmiştir (Kono ve diğ., 2006). Biz de çalışmamızda KAH hastaları ve sağlıklı kontrollerin serumunda 8-OhdG hasar düzeyini inceledik. Hastalardaki 8-OhdG düzeylerini yüksek olarak saptadık. Kobayashi ve arkadaşlarının KAH hastaları ve sağlıklı kontrollerde gerçekleştirdikleri bir çalışmada, aort kökünden ve koroner sinüsten alınan kanda 8-OHdG incelemiş ve serum 8-OHdG'nin koroner sinüste, aort kökünden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir (Kobayashi ve diğ., 2011). Xiang ve arkadaşları dolaşımdaki 8-OHdG düzeyi ile KAH arasındaki ilişkiyi incelemek için 127 hastadan serum örnekleri toplamış ve KAH hastalarının serum 8-OHdG düzeylerinin KAH olmayanlara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (Xiang ve diğ., 2011). Susa ve arkadaşları ise üriner 8-OhdG'nin kardiyak fonksiyonun

kötüleşmesinin bağımsız belirteci olduğunu göstermiştir (Susa ve diğ., 2012). Karvedilol ile tedavinin oksidatif DNA hasarını azaltmada etkili olabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır (Kono ve diğ., 2006). Susa ve arkadaşları (Susa ve diğ., 2012) karvedilol ile tedaviden sonra üriner 8-OHdG konsantrasyonunda önemli ölçüde azalma olduğunu göstermişlerdir.

KAH'lardaki DNA hasarlarının yüksek olduğu farklı DNA hasar belirteçleri ile gösterilmiştir. Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada, DNA hasar markırı olarak kullanılan mikronukleus sıklığının KAH'ındaki düzeyinin kontrollere göre yüksek olduğu tespit edilmiş ve KAH'larındaki DNA hasarı ortaya konmuştur (Guven ve diğ., 2007). Başka bir çalışmada KAH'larının periferik kan lökositlerindeki oksidatif DNA hasarlarını değerlendirmek için comet assay metodu kullanılmış ve KAH'rındaki düzey yüksek olarak tespit edilmiştir (Bhat ve diğ., 2018).Yapılan çalışmalar ve bizim sonuçlarımız birbirini desteklemekte ve ateroskleroz sürecinde DNA hasarının varlığını açıkça ortaya koymaktadır.

Oksidatif stres kaynaklı DNA hasarları, tek zincir kırıkların (SSB) onarımı, baz çıkarım onarımı (BER) ve nükleotid eksizyon onarımlarını (NER) içeren onarım mekanizmaları ile onarılır. PARP1, DNA hasarını tespit eden ve ardından onarım yolunun seçimini kolaylaştıran ilk yanıtlayıcı protein olarak iş görür. PARP1, ADP-ribosilasyonu ile kromatin yapısını değiştirir ve DNA onarım molekülleri ile etkileşerek onarım mekanizmasına katkıda bulunur (Haince, 2007).

Çalışmamızda PARP1 gen ifade düzeylerini AP örneklerinde kontrol doku örneklerine göre yüksek bulduk. KAH'ların serum örneklerinde tespit ettiğimiz yüksek serum 8-OHdG düzeyleri DNA tamir mekanizmalarının AP patogenizinde aktive olduğunu ve aterosklerotik plağı oluşturan hücre grubunun hasara cevap verdiğini düşünmekteyiz. Bu cevap profilinde PARP1 gen ifadesi artmış olabilir.İnsan aterosklerotik plaklarında (Martinet ve diğ., 2002; Perrotta ve diğ., 2011) ve ateroskleroz deneysel hayvan modellerinde (Oumouna-Benachour ve diğ., 2007) oksidatif DNA hasarının ve PARP1 aktivasyonunun arttığını gösteren çalışmalar vardır. Vasküler hücrelerde oluşan serbest radikaller ve oksidanları oluşturan proaterojenik koşullar, PARP1'in aktivatörleri olarak tanımlanmıştır. Ateroskleroz patogenizinde damar duvarında gelişen kalsifikasyonda PARP1'in rolü araştırılmış ve PARP1 ifade düzeyi bizim çalışmamızdaki gibi yüksek seviyede tespit edilmiştir (Peng Li ve diğ., 2020).

Pacher ve arkadaşları, KAH'nda bağlı oluşan DNA hasarına yanıt olarak PARP1 aktivitesinin arttığını ve aşırı PARP1 aktivasyonun kardiyomiyosit ve endotel hücrelerinde NAD^+ seviyesinin düşmesine ve buna bağlı olarak glikolizin ve ATP üretiminin azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (Pacher ve diğ., 2007). Pacher ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada artmış oksidatif stres ve nitrit oksit düzensizliğinin kalp yetmezliğine yol açtığını bildirmiştir. Aşırı artmış PARP1 aktivasyonu ile kalp yetmezliği arasında bir ilişki bulunmuş, PARP1 inhibisyonu ile kalp yetmezliğinde tedavi yöntemi olabileceğini savunmuştur (Pacher ve diğ., 2005). Abdominal aorta anevrizma olan farelerde yapılan çalışmada, PARP1 seviyesi incelenmiş ve enzimin yüksek seviyesi tespit edilmiştir (Er-shun ve diğ., 2018). Diğer bir hayvan çalışmasında, miyokard enfartüslü farelerin kalp dokusunda PARP1'in yüksek gen ifadesi tespit edilmiştir. PARP1'in yüksek ifadesinin kardiomiyositlerde hücreyi nekroza götürdüğü gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre PARP1 gen ifade düzeyinin susturulmasının farelerde kalp hücrelerine koruyucu etkisi tespit edilmiştir (Del Re, 2019).

Yapılan birçok çalışma sonuçları ile bizim çalışmamızın sonuçları örtüşmektedir. Çalışmamızda hastaların AP örneklerindeki PARP1'in yüksek ifadesi, AP'taki hangi DNA onarım mekanizmasının devreye girdiğini ve ne tip DNA hasarlarının olduğu hakkında bilgi vermektedir.

BRCA1, DNA çift zincir kırıklarını onaran kompleksin parçasıdır. Onarım sürecine katılan BRCA2 ve RAD51 proteinleri ile etkileşime girer. Bu etkileşimler insan genomunun stabilitesinin korunmasında önemli rol oynar (Sandra ve diğ., 2013).

Çalışmamızda, AP örneklerinde kontrol doku örneklerine kıyasla BRCA1 gen ifade düzeyi yükselmiştir. AP örneklerinde PARP1 gen ifade düzeyinin de yüksek olması, AP patogenizinde sadece baz hasarları ve SSB'ler değil, DSB'lerinde oluştuğunu göstermektedir. BRCA genlerinin ateroskleroza ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmektedir.

BRCA1 geni susturulmuş hücrelerin, oksidatif strese karşı daha duyarlı olduğunu gösterilmiştir (Fridlich ve diğ., 2015). Başka bir çalışmada, BRCA1'in aşırı ekspresyonu inflamasyona sebep olurken, BRCA1 gen susturulmasının endotel hücrelerini doksoribusin kaynaklı apoptozdan korduğu tespit edilmiştir (Suzuki ve diğ., 2014). BRCA1'in, DNA onarımında oynadığı rol endotel hücrelerinin apoptozunu sınırlar ve böylece endotel fonksiyonunu iyileştirir. Ayrıca, BRCA1'in aşırı ekspresyonu, ROS oluşumunu büyük ölçüde azaltır, endotelyal NO sentazını yukarı regüle eder, Akt'ı fosforile eder ve vasküler endotelyal

büyüme faktörünün ekspresyonunu destekler (Bae ve diğ., 2004). Fare endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada, BCRA1'in aşırı ekspresyonunun, endotel disfonksiyonu olan fareler ile kontrol farelerine kıyasla kılcal damar yoğunluğunu oluşumunu arttırdığı ve iskemik arka bacaktaki kan akışını düzelttiği bildirilmiştir (Singh ve diğ., 2013).

BRCA1 ve PARP1 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, ikisi arasında pozitif yönlü bir ilişki tespit ettik. PARP1 ve BRCA1'in eş zamanlı incelendiği bir çalışmalarda, PARP inhibisyonu ve PARP1 kaybının, hiper-rekombinojenik bir fenotiple sonuçlandığı gözlemlenmiş olup, PARP1 ile BRCA1 aralarındaki pozitif ilişki gösterilmiştir (de Murcia, 1997). Bu sonuçlar, PARP1'in HR onarımında rol oynadığını ve BRCA1'in PARP1 tarafından poli-ribolizasyonunun BRCA1-RAP80 kompleksini stabilize ederek, HR'de görev alan RAP80 (reseptörle ilişkili protein 80) tarafından tanınmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Shultz ve diğ., 2003). BRCA1'in PARP1 tarafından poli-ribolizasyon eksikliği, hasarlı bölgede yüksek HR ilesonuçlanır. Bundan dolayı, PARP1 gereksiniminin hücrelerde HR sürecini kontrol etmek ve ince ayar yapmak için gerekli olduğunu düşündürür (El-Khamisy, 2005). Bizim elde ettiğimiz, PARP1 ve BRCA1'in pozitif yöndeki korelasyonu, yapılan bu çalışmaları doğrular niteliktedir. Bu bilgilere göre aterosklerotik plaklarda DSB'lerin yoğun olduğunu düşünmekteyiz.

MikroRNA'lar (miRNA'lar), yaklaşık 18-22 nükleotidden oluşan küçük, tek sarmallı, kodlamayan RNA'lardır. mRNA'ların translasyonel inhibisyonu veya hedeflenen mRNA'ların yıkılması yoluyla protein ekspresyonunu düzenleyebilir (Guo ve diğ., 2010). Bu küçük moleküllerin, çeşitli tümörlerin oluşumu ve ilerlemesi, Alzheimer, otizm, frajil X sendromu, diyabet, kalp hastalıkları ve alerjik durumlar gibi farklı hastalıkların gelişimi ile bağlantılı süreçlerde yer aldığı düşünülmektedir. Ayrıca, anormal miRNA ifadesi, hastalık teşhis ve prognozunda büyük bir potansiyele sahiptir.

miRNA'ların kardiyovasküler hastalıklarda dahil birçok hastalıkta oynadıkları roller nedeniyle, çalışmamıza PARP1 ve BRCA1'in ekspresyonlarının düzenlenesinde rol oynadıkları bilgisayar tabanlı modellemeler ile gösterilen mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484'ün ekspresyon seviyelerini inceledik.

mir-21, kanser, iltihabi süreç ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere birçok patofizyolojik süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir (Kumarswamy ve diğ., 2011).mir-21 regülasyonu ile ilgili çalışmalar, IL6/STAT3 ve PMA/AP-1 çiftlerinin mir-21 ekspresyonunun etkili indükleyicileri olduğunu ortaya çıkarmıştır (Ribas ve diğ., 2010). Diğer çalışmalarda, mir-21 için Ras yoluyla indüksiyon, ERK1/2, EGFR ve östrojen reseptörü gibi çoklu alternatif regülatörleri ortaya çıkarmıştır (Talotta ve diğ., 2009 ; Bhat-Nakshatri ve diğ., 2009). KAH'nın sürecinde ve endotel işlev bozukluğunda sinyal mekanizmaları oldukça önemlidir. Yapılan bu çalışmalar ile sinyal mekanizmalarında etkili olduğu bildirilen mir-21, KAH'nda önemli olduğunu düşünmekteyiz.

mir-21-5p'nin gen ifade düzeylerini AP örneklerinde kontrol doku örneklerine göre yüksek bulduk. mir-193b-3p ve mir-484'ün gen ifade düzeylerini açısında ise herhangi bir fark tespit etmedik. Raitoharju ve arkadaşlarının 2011'de yaptığı bir çalışmada, karotis plakları ile normal karotid arterler ile kıyaslandığında, karotis plaklarındamir-21-5p'in ekspresyon seviyesinin arttığını bildirmiştir (Raitoharju ve diğ., 2011). Tsai ve arkadaşları, felç geçirmiş ateroskleroz hastalarının serum mir-21-5p seviyesinin sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, serum mir-21-5p düzeylerinin serebrovasküler hastalıkların biyobelirteçi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Tsai ve diğ., 2013).Makrofajlardaki yüksek mir-21-5p gen ifadesinin, IL-6 salınımını düşürüp ve IL-10 düzeyini arttıraraklipid birikimini ve köpük hücrelerinin oluşumunu azaltabilineceği öne sürülmüştür (Feng ve diğ., 2014). Mir-21-5p'nin yüksek ekspresyonu atersklerozu önlemektedir.

mir-21 pro-anjiyojeniktir, vasküler düz kas hücre apoptoz ve proliferasyonunun kontrolünde ve endotelyal hücrelerin aracılık ettiği anjiyojenezin düzenlenmesinde rol oynar (Suarez ve diğ, 2009). mir-21'in, enfarktüs bölgesindeki fibroblastlar tarafından üretildiğinin gösterildiği miyokard iskemisinde, bu miRNAların kardiyomiyositler üzerinde anti-apoptotik etkiye sahip olduğu dikkate alındığında, artan mir-21-5p ekspresyonu potansiyel olarak iskemik inmede yeni gelecek terapötik stratejiler için dikkate alınabilir (Dong ve diğ., 2009). mir-21-5p'nin genellikle iskemi ve hipoksi ile ilgili süreçlerde yer aldığı ve aynı zamanda güçlü bir antiapoptotik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Bienertova-Vasku ve diğ., 2015).

Bu çalışmada bizim bulduğumuz sonuçları bu çalışmalar desteklemekte ve plak hücrelerinde DNA onarım mekanizmalarını çalışmasında pozitif bir etkiye sahip olduğunu bize düşündürmektedir.

Bilgisayar modellemeli çalışmalar ve miRNA analizleri için oluşturulan veri bankalarına göre mir-21-5p ile BRCA1 arasında bir ilişki olabileceği öne sürülmektedir (mirwalk.umm.uni-heidelberg.de). Biz de çalışmamızda, mir-21 ve BRCA1 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelendik ve istatistiksel olarak hem AP'ta hem de kontrol dokularda anlamlı bir korelasyon saptamadık. Jurkovicova ve arkadaşları meme kanseri hastalarında ve sağlıklı kontrollerde mirRNA ve hedef genlerin üzerine yaptıkları çalışmada, BRCA1 mutasyonu taşıyan hastalarda mir-21-5p'nin yüksek ifade düzeylerini tespit etmişlerdir (Jurkovıcova ve diğ., 2013). mir-21-5p ve BRCA1'in korelasyonu ile ilgi literatür çalışmaları oldukça sınırlıdır. Bizde elde ettiğimiz bu bilgiler ışığında mir-21-5p ile BRCA1 arasında kuvvetli bir ilişki olmadığı, fakat mir-21-5p aterosklerotik hücrelerde başka substratları regüle ederek, hastalığın patogenizinde rol oynadığını düşünmekteyiz.

mir-484 geni, farelerde, sıçanlarda ve insanlarda yüksek oranda korunmuştur. mir-484'ün memelilerdeki fizyolojik fonksiyonları çok yönlüdür ve endoplazmik retikulum stresi, oksidatif stres, inflamasyon, hücre proliferasyonu ve apoptoz süreçlerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Liu ve arkadaşları sıçanlar üzerine yaptıkları çalışma ile mir-484'ün, kardiyomiyosit apoptozu sırasında kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonunu baskılayarak miyokardiyal hücreleri iskemi repürfüzyon hasarından koruduğunu ileri sürmüştür (Liu ve diğ., 2020). Caparosa ve arkadaşları, karotis stenozlu semptomatik ve asemptomatik hastalardan ateroskleroz plaklarında mikroarray analizi ile hedef miRNA ve bu miRNA'ların hedef mRNA'larını belirlemek için çalışma yapmış ve bu çalışmada mir-484'ün KAH sürecinde önemli rol oynayabileceğini ifade etmiştir (Caparosa ve diğ., 2019). mir-484, hem KAH hastalarının endotelyal hücrelerinde hem de koroner aterosklerotik kalp hastalığı olan hastalardan alınan plazmada yüksek seviyede tespit edilmiştir (Wang ve diğ., 2014). mir-484'ün KAH'larının serumunda, önceki sonuçlarla tutarlı olarak sağlıklı bireylere kıyasla yüksek olduğu bildirmiştir (Gongol ve diğ., 2019). mir-484'ün en çok kalpte ifade olması ve insan iskemik kalp örneklerinde gen ifade düzensizlikleri, mir-484 ile kardiyak iskemi ile ilişkili hastalıklar arasında potansiyel yakın bir ilişki olduğunu düşündürür (Sucharov ve diğ., 2008). Biz de çalışmamızda istatiksek olarak anlamlı ifade düzeyi bulamasak da mir-484'ün ekspresyon düzeyindeki kat düzeyindeki azalma (0.790), Sucharov'u destekler niteliktedir.

Bilgisayar modellemeli çalışmalar ve miRNA analizleri için oluşan veri bankalarına göre mir-484 ile PARP1 arasında bir ilişki olabileceği öne sürülmektedir (mirwalk.umm.uni-heidelberg.de). Biz de çalışmamızda, mir-484 ve PARP1 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendik, istatistiksel olarak hem AP'ta hem de kontrol dokularda anlamlı bir korelasyon saptamadık. Elde ettiğimiz bu bilgileri desteleyecek ya da herhangi bir karşı görüş literatürde rastlanmamıştır.

mir-193b-3p birçok dokuda eksprese olan, 19 nükleotid uzunlukta kodlayıcı olmayan bir RNA'dır. mir-484 gibi, mir-193b-3p ilgili KAH'nda hakkında literatür çalışması oldukça azdır. Lee ve arkadaşları, kalp yetmezliği teşhisi konulmuş hastalar ile yapılan bir çalışmada mir-193b-3p düzeyinin kontrol grubuna göre düşük olduğunu bildirmiştir (Lee ve diğ., 2014). Diğer bir çalışmada, Eline ve arkadaşları da kalp yetmezliği olan hasta grubu ile çalışma yapmış, Lee ve arkadaşlarının sonuçları ile paralel mir-193b-3p düzeyinin azaldığını tespit etmiştir (Eline ve diğ., 2015). Uzun kodlanmayan H19'un, aort diseksiyonu yapılmış hastalarının torasik aort dokularında anormal derecede yüksek gen ifadesi edildiği tespit edilmiş olup, H19'un mir-193b-3p'ye yüksek afinitesi olduğu ve bu nedenle mir-193b-3p'yi inhibe edebileceği bildirilmiştir (Mingmingve diğ., 2021). Bu doğrultuda yapılan deneylerde, H19 inhibe edilerek mir-193b-3p ifadesindeki artışının, aort diseksiyonu olmuş farelerinde kitorasik aort patolojik hasarın önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. KAH hastalarında ve sağlıklı kontrol grubu çalışmasında serum mir-193b-3p düzeyleri araştırılmış, hasta grubu ile kontrol grubunun benzer olduğu tespit edilmiştir (Sandeep ve diğ., 2020). Tüm bu çalışmalar ile bizim bulduğumuz sonuçlar birbiriyle örtüşmektedir. AP ve kontrol dokular arasında herhangi bir gen ifade farkına rastlamadığımız için plak patogenizinde mir-193b-3p gen ifadesinin, H19 gibi kodlanmayan başka moleküller tarafından düzenlendiğini düşünmekteyiz.

Veri tabanlarından aldığımız bilgilere göre, mir-193b-3p'in BRCA1 ve PARP1'e afinitesi olabileceğini yönündedir (mirwalk.umm.uni-heidelberg.de). Bu sebeple PARP1 ve BRCA1 genlerinin ifade düzeyleri ile mir-193b-3p gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendik ve istatistiksel olarak hem AP örneklerde hem de kontrol dokularda anlamlı bir korelasyon saptamadık. Bu sonuçlara göre, mir-193b-3p'in aterosklerotik süreçte BRCA1 ve PARP1 içindüzenleyici bir molekül olmadığı yönündedir. Literatürde bu ilişki ile ilgili herhangi veriye raslanmamıştır.

Sigara tüketimi kardiyovasküler mortaliteye önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Sigara tüketimi, endotel fonksiyon bozukluğundan akut klinik olaylara kadar aterosklerozun tüm aşamalarını etkiler. Sigara dumanının toksik bileşenleri ve sigar tüketimiile ilişkili kardiyovasküler fonksiyon bozukluğuna neden olan mekanizmalar tam aydınlatılmış olmamakla beraber, sigara kullanımı inflamasyonu, trombozu ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolün oksidasyonunu artırır. Elde edilen deneysel ve klinik veriler, sigaranın kardiyovasküler işlev bozukluğunu başlatan potansiyel bir oksidatif stresi arttırıcı faktör olduğunu ortaya koymaktadır (Park ve diğ., 2002).Çalışmamızda sigara kullanımının, AP örneklerinde BRCA1, PARP1, mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484 gen ifade düzeylerine herhangi bir etkisinin olmadığını tespit ettik. Literatür verilerine göre sigara kullanımının gen ifade düzeylerine herhangi bir etkisinin gösterilmemiş olması, örnek sayısındaki sınırlamadan ve diğer çevresel ile genetik faktörlerden kaynaklanabilir.

İnsülin önemli bir anabolik hormon olup, diyabet hastalığında olduğu gibi eksikliği proteinlerde, lipidlerde ve karbonhidratlarda çeşitli metabolik anormalliklere yol açar. Lipid metabolizmasının değişmesi, aterosklerozun bir risk faktörüdür. Değişen metabolik yolaklara bağlı olarak diyabet ve aterosklerozgibi iki kronik hastalık arasındaki olası bağlantılar çok sayıda çalışmada araştırılmıştır. Diyabetin iki tipininde, ateroskleroz gelişimine neden olabileceği veya ilerlemesini daha da hızlandırabileceği gösterilmiştir (Ross ve diğ., 1999). AP örneklerinde gen ifade düzeylerini, diyabet varlığına göre sınıflandırdığımızda herhangi bir anlamlı fark tespit edemedik. Literatür verilerine göre diyabet mevcudiyetinin gen ifade düzeylerine herhangi bir etkisinin gösterilmemiş olması, örnek sayısındaki sınırlamadan ve diğer çevresel ile genetik faktörlerden kaynaklanabilir.

Tüm elde ettiğimiz verileri mevcut literatürler ile birlikte ele aldığımızda, sonuçlarımız çalışma için yola çıktığımız hipotezimizi doğrular niteliktedir. Ateroskleroz sürecinde DNA'nın yüksek oranda hasarlandığı bilgisini, biz de çalışmamızda teyit ettik. Hasarlanan DNA'nın onarım sürecine girdiğini PARP1 ve BRCA1'in artmış ifade düzeyleri ile gösterdik. Her iki genin farklı DNA tamir yolaklarındaki rolleri nedeniyle, sonuçlarımız AP örneklerindeki hasarların hem oksidatifbaz hasarları, tek zinci kırıkları hem de çift zincir kırıkları ile ilişkili olduğu yönünde olduğunu göstermektedir. Gen düzeyinde yapılan çalışmalar ve veri tabanlarından elde edilen bilgiler doğrultusunda PARP1 ve BRCA1 ile ilişkili mir-21-5p, mir-193b-3p ve mir-484 arasındaki ilişkileri araştırdığımız çalışmamızdan elde ettiğimiz ve istatiksel olarak anlamlı veya anlamsız sonuçlar, bu ilişkiler açısından

karmaşık moleküler mekanizmaların ve genler arasındaki ilişkilerin aydınlatılmasına ışık tutacaktır. Sonuçlarımızın, bu konudaki moleküler mekanizmaları aydınlatmaya yönelik yeni çalışmalara katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

KAH, yüksek ölümle sonuçlandığı için hastalığın genetik mekanizmasının aydınlatılması oldukça önemlidir. Bu konuyu aydınlatmak adına yaptığımız çalışmamızda, hastalık patogenizi üzerinde etkili olan DNA hasarı, ateroskleroz hastalarda olduğunu gösterdik. Hastalarda DNA hasarlarını etkili bir şekilde onarmak için DNA onarım mekanizmalarının doğru anlaşılması ve biyo-belirteçlerin geliştirilmesi faydalı olacaktır. Sınırlı hasta sayısı ile elde ettiğimiz bu verileri ilerleyen zamanlarda geliştirdiğimiz projeler ve arttırdığımız hasta sayısı ile desteklemek ve konu ile ilgili araştırma yapan diğer araştırmacalara ışık olmayı umuyoruz.

KAYNAKLAR

Allach EKL., Heide S., Caberg JH., Andrieux J., Doco FM., Vincent-Delorme C.,2020, 16p13.11 Microduplication in 45 New Patients: Refined Clinical Significance and Genotype-Phenotype Correlations, J Med Genet. 57(5):301–7. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105389.

Ame JC., Spenlehauer C., Murcia G., 2004, The PARP superfamily, BioEssays26:882–893.

Andreassi MG., Botto N., 2003, DNA Damage as a New Emerging Risk Factor in Atherosclerosis, Trends Cardiovasc Med., 13:270–275.

Andreassi M.G., 2008, DNA damage, vascular senescence and atherosclerosis. J. Mol. Med., 86, 1033–1043.

Ardekani AM., Naeini MM., 2010, The Role of MicroRNAs in Human Diseases. Avicenna journal of medical biotechnology; 2:161–179.

Bae I., Fan S, Meng Q., Rih JK., Kim HJ., Kang HJ., Xu J., Goldberg ID., Jaiswal AK., Rosen EM., 2004, Brca1 induces antioxidant gene expression and resistance to oxidative stress. Cancer research, 64:7893-7909.

Ballinger SW., Patterson C., Knight-Lozano CA., Burow DL., Conklin CA., Hu Z., 2002, Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. Circulation;106: 544–9.

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

Bartel DP., 2009, MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell , 136:215–233.

Bartek J., Lukas J., 2001, Mammalion G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. Curr Opin Cell Biol;13:738-747.

Bienertova-Vasku J., Novak J., Vasku A., 2015, MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension: pathogenesis, diagnosis and treatment, J Am Soc Hypertens;9(3):221–34.

Bhat-Nakshatri P., Wang G., Collins NR., Thomson MJ., Geistlinger TR., Carroll JS., 2009 Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. Nucleic Acids Res ;37:4850–4861.

Bhat MA., Gandhi G., 2018, Elevated oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease and its association with oxidative stress biomarkers, Acta Cardiologica, DOI: 10.1080/00015385.2018.1475093.

Björkegren JLM., Lusis AJ.,2022, Atherosclerosis: Recent developments, Cell, 185.

Brown KD., Rathi A., Kamath R., Beardsley DI., Zhan Q., Mannino JL., Baskaran R., 2002, The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation, Nat Genet. Jan; 33(1):80-4.

Botto N., Berti S., Manfredi S., Al-Jabri A., Federici C., Clerico A., 2005, Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease, Mutat Res;570:81–8.

Cai X., Hagedorn CH., Cullen BR., 2004, Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs, RNA, 10:1957–66.

Caparosa EM., Sedgewick AJ., Zenonos G., Zhao Y., Carlisle DL., Stefaneanu L., 2019, Regional Molecular Signature of the Symptomatic Atherosclerotic Carotid Plaque, Neurosurgery 85(2):E284–93. doi: 10.1093/neuros/nyy470.

Chaudhuri AR., Nussenzweig A., 2017, The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling, Nature Reviews Molecular Cell Biology, doi:10.1038/nrm.2017.53.

Ciccia A., Elledge SJ., 2010, The DNA damage response: making it safe to play with knives. Mol Cell ;40:179–204.

Clark SL., Rodriguez AM., Snyder RR., Hankins GD., Boehning D., 2012, Structure-function of the tumor suppressor BRCA1, Computational and structural biotechnology journal, 1(1), e201204005.

Clarke MC., Talib S., Figg NL., Bennett MR.,2010, Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1-directed inflammation: effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis. Circ. Res. 106, 363–372.

Condorelli G., Latronico MV., Cavarretta E., 2014, MicroRNAs in cardiovascular diseases: Current knowledge and the road ahead. J Am Coll Cardiol ;63:2177–2187.

Cox MM., Goodman MF., Kreuzer KN., Sherratt DJ., Sandler SJ., Marians KJ., 2000, The importance of repairing stalled replication forks, Nature 404:37–41.

Cox MM., 2002, Efficiency, specificity and DNA polymerase-dependence of translesion replication across the oxidative DNA lesion 8-oxoguanine in human cells, Mutat. Res. 510:107–20.

Cromie GA., Connelly JC., Leach DRF., 2001, Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans, Molecular Cell, vol. 8, no. 6, pp. 1163–1174, 2001.

Dandona P, Aljada A., 2002, A rational approach to pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis, Am. J. Cardiol. 90:G27–33.

Daniels DS., Tainer JA., 2000, Conserved structural motifs governing the stoichiometric repair of alkylated DNA by O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase, Mutat Res. 2000 Aug 30;460.

de Murcia, J., 1997, Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells, Proc. Natl Acad. Sci. USA 94, 7303–7307 .

Del Re DP, Amgalan D, Linkermann A, Liu Q, Kitsis RN, 2019, Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease, Physiol Rev. Oct 1;99(4):1765-1817.

Devereux RB., Alonso DR., Lutas EM., Gottlieb GJ., Campo E., Sachs I., 1986, Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy finding, Am J Cardiol;57:450-458.

Dhanasekaran A., Kotamraju S., Karunakaran C., 2005, Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: role of mitochondrial superoxide, Free Radical Biology & Medicine, vol. 39, no. 5, pp. 567–583.

Dong S., Cheng Y., Yang J., Li J., Liu X., Wang X., 2009, MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction, J Biol Chem. ;284:29514–25.

Drummond GR., Selemidis S., Griendling KK., Sobey CG., 2011, Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets, Nature Reviews Drug Discovery, vol. 10, no. 6, pp. 453–471.

El-Khamisy SF., 2005, Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1, Nature 434, 108–113 .

Elahi MM., Kong YX., Matata BM., 2009, Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2, no. 5, pp. 259–269.

Feng, J., Li, A., Deng, J., Yang, Y., Dang, L., Ye, Y., Zhang, W., 2014, miR-21 attenuates lipopolysaccharide-induced lipid accumulation and inflammatory response: Potential role in cerebrovascular disease, Lipids in Health and Disease, 13, 27. https ://doi. org/10.1186/1476-511X-13-27.

Fridlich R., Annamalai D., Roy R., Bernheim G., Powell SN., 2015, Brca1 and brca2 protect against oxidative DNA damage converted into double-strand breaks during DNA replication. DNA repair;30:11-20.

Förstermann U., 2008, Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies., Nature Clinical Practice, doi:10.1038/ncpcardio1211.

Förstermann U., Münzel T., 2006, Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace, Circulation 113: 1708–1714.

Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carrozzino F., Raspaglio G., 1996, Two pathways for base excision repair in mammalian cells, J. Biol. Chem. 271:9573–78.

Fuller AM, Qian L., 2014, MiRiad Roles for MicroRNAs in cardiac development and regeneration. Cells, 3:724–750.

Gistera, A., Hansson, G. K., 2017, The immunology of atherosclerosis. Nat. Rev. Nephrol. 13, 368–380.

Gray KL., Kumar SV., Figg N., Harrison J., Baker L., 2014, Effects of DNA damage in smooth muscle cells in atherosclerosis, Circ. Res. 116:816–26.

Griendling KK., Sorescu D., Ushio-Fukai M., 2000, NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease, Circulation Research, vol. 86, no. 5, pp. 494–501.

Gongol B., Marin T., Zhang J., Wang SC., Sun W., He M., 2019, Shear Stress Regulation of miR-93 and miR-484 Maturation Through Nucleolin. Proc Natl Acad Sci USA 116(26):12974–9. doi: 10.1073/pnas.190284411.

Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., and Bartel, D. P., 2010, Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels, Nature 466, 835–840. doi: 10.1038/nature09267.

Guven M., Guven GS., Oz E., Ozaydin A., Batar B., Ulutin T., Hacihanefioglu S., Domanic N., 2007, DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and their association with coronary artery disease risks and micronucleus frequency, Heart Vessels 22:355–360.

Ha M., Kim VN., Regulation of microRNA biogenesis, 2014, Nature reviews, Molecular cell biology, 15:509–524.

Haince, JF., 2007, Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. J. Biol. Chem. 282, 16441–16453.

Hall J., Marcel V., Bolin C., Fernet M., Tartier L., Vaslin L., Hainaut P., 2009, The associations of sequence variants in DNA-repair and cell-cycle genes with cancer risk: genotype-phenotype correlations. Biochem Soc Trans;37:527-533.

Hashizume R., Fukuda M., Maeda I., Nishikawa H., Oyake D., Yabuki Y., 2001, The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation, Journal of Biological Chemistry, 276(18), 14537-14540.

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

Hink U., 2001, Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus, Circ Res 88: E14–E22 renin-angiotensin system, Circulation 99: 2027–2033.

Hiroyuki T., Shintaro K., Shouji M., 2011, Oxidative stress and heart failure, Am J Physiol Heart Circ Physiol301: H2181–H2190.

Joukov V., Groen AC., Prokhorova T., Gerson R., White E., Rodriguez A., 2006, The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates randependent mitotic spindle assembly, Cell, 127(3), 539-552.

Jurkovıcova D., Magyerkova M., Sestakova Z., Copakova L., 2016, Evaluation of expression profiles of microRNAs and two target genes, FOXO3a and RUNX2, effectively supports diagnostics and therapy predictions in breast cancer, Neoplasma 63, 6.

Kasai H., 2002, Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis, Free Radic. Biol. Med. 33 450–456.

Kazantsev A., Mu D., Nichols AF., Zhao X., Linn S., Sancar A., 1996, Functional complementation of xeroderma pigmentosum complementation group E by replication protein A in an in vitro system, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5014–18.

Ketelhuth DFJ., Hansson, GK., 2016, Adaptive response of T and B cells in atherosclerosis. Circ. Res. 118, 668–678.

Khera AV., Kathiresan S., 2017, Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation, Nature Reviews, doi:10.1038/nrg.2016.160.

Khera A, Emdin C, Drake I, Natarajan P, Bick AG, Cook NR, Chasman DI, Baber U, Mehran R, 2016, Genetic Risk, Adherence to a Healthy Lifestyle, and Coronary Disease, N Engl J Med., 15;375(24):2349-2358.

Khordadmehr M., Shahbazi R., Sadreddini S., Baradaran B., 2019, miR-193: A new weapon against cancer, 369 Journal of cellular physiology, Circ. Res. 118, 668–678.

Kim, MY., Zhang, T., Kraus, W. L., 2005, Poly(ADP-ribosyl) ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal, Genes Dev. 19, 1951–1967.

Klungland A., Lindahl T., 1997, Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1), EMBO J. 16:3341–48.

Kobayashi S., Susa T., Tanaka T., Wada Y., Okuda S., Doi M., Nao T., Yoshiga Y., Yamada J., Okamura T., Ueyama T., Kawamura S., Yano M., Matsuzaki M., 2011, Urinary 8-hydroxy-20 -deoxyguanosine reflects symptomatic status and severity of systolic dysfunction in patients with chronic heart failure, Eur. J. Heart Fail. 13 29–36.

Kolodner RD., Marsischky GT., 1999, Eukaryotic DNA mismatch repair, Curr. Opin. Genet. Dev. 9:89–96.

Kono Y., Nakamura K., Kimura H., Nishii N., Watanabe A., Banba K., Miura A., Nagase S., Sakuragi S., Kusano KF., Matsubara H., Ohe T., 2006, Elevated levels of oxidative DNA damage in serum and myocardium of patients with heart failure, Circ. J. 70 1001–1005.

Krishnakumar R., Kraus WL., 2010, The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets, Mol Cell Jul 9;39(1):8-24.

Krzwinska O., Bracha M., Jeanniere C., Recchia E., Kedziora Kornatowska K., Kozakiewicz M., 2020, Meta-analysis of the potential role of miRNA-21 in cardiovascular system function monitoring, Biomed Res Int, 4525410. doi: 10.1155/2020/4525410.

Kumarswamy R., Volkmann I., Thum T., 2011, Regulation and function of miRNA-21 in health and disease, RNA Biol ;8:706–713.

Lagerwef S., Vrouwe MG., Overmeer RM., Fousteri MI., Mullenders LHF, 2011, DNA damage response and transcription, DNA Repair, 10, 743-750.

Lassegue B., San Martin A., Griendling KK., 2012, Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system, Circulation Research, vol. 110, no. 10, pp. 1364–1390.

Li H., 2006, Reversal of eNOS uncoupling and upregulation of eNOS expression lowers blood pressure in hypertensive rats, J Am Coll Cardiol 47: 2536–2544.

Li W., Ma H., 2006, Double-stranded DNA breaks and gene Functions in recombination and meiosis, Cell Research, vol. 16, no. 5, pp. 402–412.

Li Y., Cucinotta F., 2011, Modeling non homologous end joining, J Theor Biol . 2011 Aug 21;283(1):122-35.

Liang ES, Bai WW, Wang H, Zhang JN, Zhang F, Ma Y, Jiang F, Yin M, Zhang MX, Chen XM, Qin WD, 2018, PARP-1 (Poly[ADP-Ribose] Polymerase 1) Inhibition Protects From Ang II (Angiotensin II)-Induced Abdominal Aortic Aneurysm in Mice, Hypertension, Nov;72(5):1189-1199.

Libby P., Buring JE., Badimon l., Hansson GK., Deanfield J., Bittencourt MS., Tokgözoğlu L., Lewis E., 2019, Atherosclerosis, Nature Reviews Disease Primers, s41572-019-0106-z.

Lindahl T., Nyberg B., 1972, Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. Biochemistry 11:3610 – 18.

Liu H , MM J , Sai L., Jiang W., 2020, MiR-484 Protects Rat Myocardial Cells from Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting Caspase-3 and Caspase-9 during Apoptosis, Korean Circ J., 50(3):250-263.

Luo X., Kraus WL., 2012, On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1 Genes Dev Mar 1;26(5):417-32.

Mahmoudi M., Mercer J., Bennett M.,2006, DNA damage and repair in atherosclerosis, Cardiovascular Research, 71 259-268.

Mahmoudi M., Gorenne I., Mercer J., Figg N., Littlewood T., Bennett M., 2008, Statins use a novel Nijmegen breakage syndrome-1–dependent pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells, Circ. Res. 103:717–25.

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): 1265e9-1265e16.

Martinet W., Knaapen MW., De Meyer GR., Herman AG., Kockx MM., 2002, Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques, Circulation 106:927–32.

Martinet W., Knaapen MW., De Meyer GR., Herman AG., Kockx MM., 2001, Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering, Circ. Res. 88:733–39.

Matthews, C., Gorenne, I., Scott, S., Figg, N., Kirkpatrick P., Ritchie, A., Goddard, M., Bennett, M., 2006, Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: Effects of telomerase and oxidative stress, Circ. Res. 99, 156–164.

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 Research and Treatment, 91: 179–186 p.

McCullough AK., Dodson ML., Lloyd RS., 1999, Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures, Annu. Rev. Biochem. 68: 255–85.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., 1994, A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science, 266(5182), 66-71.

Mingming R., Tao W., Xiaolong W., Yizeng W., Chun O., Yilian X., Xiaoqiang Y., Zhen H., 2021, LncRNA H19 regulates smooth muscle cell functions and participates in the development of aortic dissection through sponging miR-193b-3p, Bioscience Reports 41.

Minko IG., Zou Y., Lloyd RS., 2002, Incision of DNA-protein crosslinks by UvrABC nuclease suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:1905–9.

Mladenov E., Magin S., Soni A., Iliakis G., 2013, DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy, Front Oncol, 3, 1-18.

Modrich P., Lahue R., 1996, Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology, Annu. Rev. Biochem. 65:101–33.

Mohammad DH., Yaffe MB., 2009, 14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response, DNA repair, 8(9), 1009-1017.

Murphy MP., 2009, How mitochondria produce reactive oxygen species, The Biochemical Journal, vol. 417, no. 1, pp. 1–13.

Narod SA., Foulkes WD., 2004, BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond, Nature Reviews Cancer, 4(9), 665-676.

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, 519–526 p.

Nus M., Mallat Z., 2016, Immune-mediated mechanisms of atherosclerosis and implications for the clinic. Expert Rev. Clin. Immunol. 12, 1217–1237.

Oumouna-Benachour K., Hans CP., Suzuki Y., Naura A., Datta R., Belmadani S., Fallon K., Woods C., Boulares AH., 2007, Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition reduces atherosclerotic plaque size and promotes factors of plaque stability in apolipoprotein E-

deficient mice: Effects on macrophage recruitment, nuclear factor-kappa B nuclear translocation, and foam cell death. Circulation; 115(18):2442–2450.

Pacher P., Sandor B., Kunos G., 2005, Cirrhotic cardiomyopathy: an endocannabinoid connection?, Br J Pharmacol Oct;146(3):313-4.

Pacher P., Szabó C., 2007, Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors, Cardiovasc Drug Rev Fall;25(3):235-60.

Page S., Powell D., Benboubetra M.,1998, Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, vol. 1381, no. 2, pp. 191–202.

Park H., Zhang,K., Ren,Y., Nadji,S., Sinha,N., Taylor,J.S. and Kang,C., 2002, Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99, 15965–15970.

Paterson JW., 1998, BRCA1: a review of structure and putative functions, Dis.Markers 13 (4): 261 74. doi:10.1155/1998/298530. PMID 9553742.

Paul A., Paul S., 2014, The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers, Frontiers in bioscience (Landmark edition), 19, 605.

Peng L., Wang Y., Liu X., 2020, Loss of PARP-1 attenuates diabetic arteriosclerotic calcification via Stat1/Runx2 axis, Cell Death Dis Jan 10;11(1):22.

Perrotta I., Brunelli E., Sciangula A., Conforti F., Perrotta E., Tripepi S., Donato G., Cassese M., 2011, iNOS induction and PARP-1 activation in human atherosclerotic lesions: An immunohistochemical and ultrastructural approach. Cardiovasc Pathol;20(4):195–203.

Pizzino G.,Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A., 2017, Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, DOI: 10.1155/2017/8416763.

Polosina YY., Mui J., Pitsikas P., Cupples CG., 2009, The Escherichia coli mismatch repair protein MutL recruits the Vsr and MutH endonucleases in response to DNA damage, J Bacteriol Jun;191(12):4041-3.

Raitoharju E., Lyytikainen LP., Levula M., Oksala N., Mennander A., Tarkka M., 2011, miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. Atherosclerosis ;219:211–7.

Rastogi R., Kumar RA.,Tyagi MB., Sinha RP., 2010, MolecularMechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair, Journal of Nucleic Acids Volume 2010, Article ID 592980, 32.

Ribas J., Lupold SE., 2010, The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts, and their implication in prostate cancer, Cell Cycle ;9:923–929.

Ross R., 1999, Atherosclerosis an inflammatory disease, N Engl J Med., 340:115–126.

Sancar A., 2003, Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors, Chem. Rev. 103:2203–38.

Sandra E., Filippini., Vega A., 2013, Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2, Frontiers in Bioscience 18, 1358-1372.

Sartori AA., Lukas C., Coates J., Mistrik M., Fu S., Bartek J., 2007, Human CtIP promotes DNA end resection, Nature, 450(7169), 509- 514.

Schreiber V., Dantzer F., Ame JC., Murcia G., 2006, Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule, Nat Rev Mol Cell Biol Jul;7(7):517-28.

Schultz N., Lopez, E., Saleh-Gohari N., Helleday T., 2003, Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. Nucleic Acids Res. 31, 4959–4964.

Seneviratne AN., Monaco C., 2015, Role of inflammatory cells and toll like receptors in atherosclerosis. Curr Vasc Pharmacol; 13: 146-60.

Shiyanov P., Nag A., Raychaudhuri P., 1999, The naturally occurring mutants of DDB are impaired in stimulating nuclear import of the p125 subunit and E2F1-activated transcription, J. Biol. Chem. 274:35309–12.

Singh KK., Shukla PC., Quan A., Al-Omran M., Lovren F., Pan Y., Brezden-Masley C., Ingram AJ., Stanford WL., Teoh H., Verma S., 2013, Brca1 is a novel target to improve endothelial dysfunction and retard atherosclerosis. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery,146:949-960 e944.

Suarez Y., Sessa WC., 2009, MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. Circ Res; 104: 442-454.

Sucharov C., Bristow MR., Port JD., 2008, miRNA Expression in the Failing Human Heart: Functional Correlates. J Mol Cell Cardiol 45(2):185–92. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.04.014.

Sumimoto H., Miyano K., Takeya R., 2005, Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 338, no. 1, pp. 677–686.

Sung P., Trujillo KM., Komen SV., 2000, Recombination factors of Saccharomyces cerevisiae, Mutation Research, vol. 451, no. 1-2, pp. 257–275.

Susa T., Kobayashi S., Tanaka T., Murakami W., Akashi S., Kunitsugu I., Okuda S., Doi M., Wada Y., Nao T., Yamada J., Ueyama T., Okamura T., Yano M., Matsuzaki M.,2012, Urinary 8-hydroxy-20 -deoxyguanosine as a novel biomarker for predicting cardiac events and evaluating the effectiveness of carvedilol treatment in patients with chronic systolic heart failure, Circ. J. 76 (2012) 117–126.

Suzuki M., Minami A., Nakanishi A., Kobayashi K., Matsuda S., Ogura Y., Kitagishi Y., 2014, Atherosclerosis and tumor suppressor molecules (review). International journal of molecular medicine, 34:934-940.

Talotta F., Cimmino A., Matarazzo MR., Casalino L., De Vita G., D'Esposito M., 2009, An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation, Oncogene ;28:73–84.

Tatarkova Z., Kuka S., Racay P., Lehotsky J., Dobrota D., 2011, Effects of aging on activities of mitochondrial electron transport chain complexes and oxidative damage in rat heart, Physiol. Res. 60:281–89.

Thomas SR., Witting PK., Drummond GR., 2008, "Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities," Antioxidants &Redox Signaling, vol. 10, no. 10, pp. 1713–1765.

Tsai PC., Liao YC., Wang YS., Lin HF., Lin RT., Juo SH., 2013, Serum microRNA-21 and microRNA-221 as potential biomarkers for cerebrovascular disease, J Vasc Res;50:346–54.

Uryga A., Gray K., Bennett M., 2016, DNA damage and repair in vascular disease,Review in Advance, Annu. Rev. Physiol., 78:5.1-5.22.

Vendrov AE., Hakim ZS., Madamanchi NR., Rojas M., Madamanchi C., Runge MS., 2007, Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27:2714–21.

Valko M., Leibfritz d., Moncol J., Cronin MT., Mazur M., Telser J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol. 39, no. 1, pp. 44–84.

Vallejo J., Cochain C., Zernecke A., Ley K., 2021, Heterogeneity of immune cells in human atherosclerosis revealed by scRNA-Seq, The European Society of Cardiology, 117,2537-2543.

Van Rooij E., Sutherland LB., Qi X., Richardson JA., Hill J., Olson EN., 2007, Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA, Science, 316:575–579.

Wahid F., Shehzad A., Khan T., Kim YY., 2010, MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. Biochim Biophys Acta ;1803:1231–1243.

Wang, J.C., Bennett, M., 2012, Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. Circ. Res., 111, 245–259.

Wang, Z. Q., 1997, PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis, Genes Dev. 11, 2347–2358.

Wang HW., Lo HH., Chiu YL., Chang SJ., Huang PH., Liao KH., 2014, Dysregulated miR-361-5p/VEGF Axis in the Plasma and Endothelial Progenitor Cells of Patients With Coronary Artery Disease. PloS One 9(5):e98070. doi: 10.1371/journal.pone.0098070.

Wilson SH., 1998, Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta, Mutat. Res. 407: 203–15.

Wojciechowska A., Braniewska A., Kozar-Kamińska K., 2017, MicroRNA in cardiovascular biology and disease, Adv Clin Exp Med, 26(5):865–874.

Wu LC., Wang ZW., Tsan JT., Spillman MA., Phung A., Xu XL., 1996, Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product, Nature genetics, 14(4), 430-440.

Xiang F., Shuanglun X., Jingfeng W., Ruqiong N., Yuan Z., Yongqing L., Juna Z., 2011, Association of serum 8-hydroxy-20 -deoxyguanosine levels with the presence and severity of coronary artery disease, Coronary Artery Disease, Vol 22 No 4.

Zhang C., 2008, The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction, Basic Research in Cardiology, vol. 103, no. 5, pp. 398–406.

EKLER

HASTA OLUR FORMU

1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum veya bana okundu ve sözlü olarak bana açıklama yapıldı.
2. Okuduğum veya bana okunan bilgilendirmeyi ve bana yapılan açıklamayı anladım.
3. Her türlü soruyu sormama izin verildi ve sorularıma tam olarak yanıt verildi.
4. Bilimsel araştırmalarda yer almayı KABUL VEYA RED ETMEKTE TAMAMEN ÖZGÜR OLDUĞUMU biliyorum.
5. Bu konuda karar vermek için DÜŞÜNMEK veya başkalarına DANIŞMAK hakkına sahip olduğumu biliyorum.
6. RED ETMEM DURUMUNDA, bana maddi veya manevi hiç bir kayıp veya zarar OLMAYACAĞINI ve herhangi bir olumsuz ayırım veya ayrıcalık YAPILMAYACAĞINI anladım.
7. KABUL ETMEM DURUMUNDA, bana herhangi bir ücret ödenmeyeceğini ve benden herhangi bir ücret talep edilmeyeceğini ve bana maddi veya manevi hiç bir kazanç veya kazanım SAĞLANMAYACAĞINI ve herhangi bir olumlu ayırım veya ayrıcalık YAPILMAYACAĞINI anladım.
8. KABUL ETMEM DURUMUNDA, söz konusu bilimsel araştırmalara ve bunların sonuçlarına ilişkin herhangi bir YÜKÜMLÜLÜK VE SORUMLULUK TAŞIMAYACAĞIMI ve herhangi bir HAK TALEBİNDE BULUNAMAYACAĞIMI anladım.
9. KABUL ETMEM DURUMUNDA, DİLEDİĞİM ZAMAN bilimsel araştırmalarda YER ALMAKTAN VAZGEÇMEK ve benden alınan materyalin ve kaydedilen kimlik ve kişisel bilgimin İMHA EDİLMESİNİ İSTEMEK HAKLARINA HER ZAMAN SAHİP OLACAĞIMI anladım.
10. Elde edilen biyolojik materyallerin İLERİDE YAPILMASI PLANLANAN TÜM ÇALIŞMALARDA kullanılmasına izin veriyorum.

Tüm bunların sonunda ve bu koşullarla, ÖZGÜR İRADEM VE GÖNÜLLÜ RIZAM İLE söz konusu bilimsel araştırmalarda yer almayı ve böylece bu bilimsel araştırmalara yardımcı ve destek olmayı KABUL ETTİM VE OLUR VERDİM.

Gönüllünün / Yakınının Adı/Soyadı	İmzası	Tarih
Araştırma Ekibinde Yer Alan ve Yetkin Bir Araştırmacının Adı/Soyadı	İmzası	Tarih
Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı/Soyadı	İmzası	Tarih

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ATEROSKLEROTİK PLAK PATOGENEZİNDE DNA HASAR TAMİR SÜRECİNDE ROL OYNAYAN MOLEKÜLLERİN VE İLİŞKİLİ MİKRO RNA'LARIN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%13	%11	%2	%5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%7
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%3
3	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1
4	www.selcukmedj.org İnternet Kaynağı	<%1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	www.haberkaos.com İnternet Kaynağı	<%1
7	acikerisim.akdeniz.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	b-ok.org İnternet Kaynağı	<%1