

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**MİRNA-223 İFADE DÜZEYİNİN HDL
KOLESTEROL SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EZGİ YALBIR, Biyomüh.

DANIŞMAN
Prof. Dr. Turgay İSBİR

İstanbul-2018

TEZ ONAYI

TEZ ONAYI FORMU

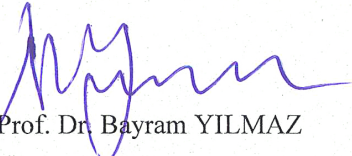
Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program : Moleküler Tıp Anabilim Dalı
Tez Başlığı : miRNA-223 İfade Düzeyinin HDL Kolesterol Seviyesi Üzerine Etkisinin Araştırılması
Tez Sahibi : Ezgi Yalbir
Sınav Tarihi : 26 Ocak 2018

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Jüri Başkanı: (Danışman)	Prof. Dr. Turgay İsbir Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D./ Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Moleküler Tıp A.D.	
Üye:	Prof. Dr. İnci Özden Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya A.D.	
Üye:	Prof. Dr. Uzay Görmüş Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya A.D.	

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 08./02./2018... tarih ve 2018/03-07..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

EZGİ YALBIR

İTHAF

Sevgili Annem'e, Babam'a ve Kız Kardeşim'e
ve
Sayın Hocam Prof Dr Turgay İsbir'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimin ve tezimin her aşamasında bana destek olan, araştırmanın yürütülmesi ve deneysel çalışmaların yapılabilmesi için gerekli olan tüm olanakları sağlayan Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Tezim için gerekli hastaların seçimi ve örneklerin sağlanmasındaki destek ve katkılarından dolayı Marmara Üniversitesi ve Yeditepe Üniversitesi'ne,

İstatistik çalışmalarında yardımını esirgemeyen sayın Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Altunok'a,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca hiç bir zaman desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen canım arkadaşlarım Biyomüh. A. Dilara Aydemir ve Mol. Bio. Tuğçe Gül'e,

Tüm Yüksek Lisans eğitimim boyunca her zaman, her konuda desteklerini hissettiğim Dr. G. Seda Yılmaz Güleç, Dr. Selvi Duman, Dr. Müge Kopuz, MSc. Emre Murat Altıncılık, MSc. Hüseyin Ayhan ve Bio. Hüseyin Kilili'ye,

Her zaman yanımda olan canım annem Zeynep Semra Yalbir'a, canım babam Murat Yalbir'a ve canım kız kardeşim Merve Yalbir'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

EZGİ YALBIR

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
ABSTRACT	xii
ÖZET.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. MikroRNA'lar Hakkında Genel Bilgiler	3
2.2. MikroRNA 223 Hakkında Genel Bilgiler.....	6
2.3. Kolesterol Metabolizması	9
2.4. Plazma Lipoproteinleri	15
2.5. Ateroskleroz.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Örnek Seçimi ve Tanımı	23
3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	23
3.2.1. Kullanılan Sarf ve Ayrac Malzemeler.....	23
3.2.2. Kullanılan Cihazlar	24
3.3. Yöntemler	24
3.3.1. Serumdan miRNA izolasyonu	24
3.3.2. cDNA Eldesi	25
3.3.4. mikroRNA Düzeylerinin Belirlenmesi	26
3.3.5. Eş Zamanlı PZR ile miRNA Ekspresyon Analizi	26
3.3.6. Lipid Profillerinin Ölçülmesi	28
3.3.7. İstatistiksel Analiz.....	28
4. BULGULAR	29
4.1. Çalışma Gruplarına Ait Demografik veriler	29
4.2. miRNA 223 Ekspresyon Sonuçları.....	31

4.3. miRNA 223 ROC Analiz Sonuçları.....	35
4.4. miRNA 223 Ekspresyon Düzeyinin Korelasyon Sonuçları.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	42
HAM VERİLER.....	60
FORMLAR.....	62
ETİK KURUL KARARI.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	72

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.3.2-1. cDNA Sentezi için PZR İÇeriği	25
Tablo 3.3.2-2. cDNA Sentezi için İnkübasyon Koşulları	25
Tablo 3.3.5-1. MikroRNA Ekspresyon için Eş Zamanlı PZR İÇeriği.....	27
Tablo 3.3.5-2. MikroRNA Ekspresyon için Eş Zamanlı PZR Koşulları	27
Tablo 4.1-1. HDL Kolesterol Seviyesi 40 mg/dl'nin Üstünde ve Altında Olan Gruplara Ait Demografik Veriler	29
Tablo 4.1-2. HDL Seviyesi 40 mg/dl'nin Üstünde ve Altında Olarak Belirlenen Çalışma Gruplarına Ait Lipid Değerleri	31
Tablo 4.2-1. HDL Seviyesi 40 mg/dl'nin Üstünde ve Altında Olan Gruplara ait miRNA 223 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	35
Tablo 4.4-1. HDL Seviyesi 40 mg/dl'nin Üstünde Olan Grup için miRNA 223 Seviyesinin VKİ, VYA ve Lipid Düzeyleri ile Olan Korelasyonları.....	38
Tablo 4.4-2. HDL Seviyesi 40 mg/dl'nin Altında Olan Grup için miRNA 223 Seviyesinin VKİ, VYA ve Lipid Düzeyleri ile Olan Korelasyonları.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1-1. Yıllara Göre Literatürde miRNA'ların Aranma Sonuçları (10).	3
Şekil 2.1-2. MikroRNA Biyogenezi (27).....	5
Şekil 2.2-1. miRNA 223'ün kromozomal lokasyonu (35).....	6
Şekil 2.2-2. miRNA 223'ün Farklı Canlılardaki Nükleotid Dizisi (35).	7
Şekil 2.2-3. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol (HDL-C) metabolizmasında mikroRNA'ların (miRNA) düzenlenme mekanizmaları (47).....	8
Şekil 2.3-1. Kolesterol ve Kolesteril Ester Yapısı (53).....	10
Şekil 2.3-2. Asetil-KoA'dan Mevalonat Sentezlenmesi (54).....	11
Şekil 2.3-3. Mevalonatın İki Aktif İzoprene Dönüştürülmesi (54).....	12
Şekil 2.3-4. Aktifleştirilmiş İzopren Birimlerinden Skualen Oluşturulması (54).....	13
Şekil 2.3-5. Skualenin Dört Halkalı Steroid Çekirdeğine Dönüştürülmesi (54).	14
Şekil 2.4-1. Plazma Lipoproteinlerinin Yaklaşık Boyut ve Yoğunlukları (56).....	16
Şekil 2.4-2. Plazma Lipoproteinlerinin Şematik Yapısı (64).....	17
Şekil 2.4-3. Yassı ve Küresel HDL Taneciklerinin Şematik Yapısı (71).	19
Şekil 2.5-1. LDL Oksitlenmesi ve Lipid Birikmesine Bağlı Lezyon Oluşumu (76).....	21
Şekil 2.5-2. Ateroskleroz Gelişimi (77).....	22
Şekil 4.2-1. miRNA 223 Ekspresyon Seviyesi Analizleri.	33
Şekil 4.3-1. Plazma miRNA223 seviyesinin HDL seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde ve HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında olan gruplara göre ROC Analizi grafikleri.	36
Şekil 4.4-1. HDL Seviyesi 40 mg/dl'nin Üstünde Olan Grup için miRNA 223 Seviyesinin Korelasyon Grafik Analizleri.	40
Şekil 4.4-2. HDL Seviyesi 40 mg/dl'nin Altında Olan Grup için miRNA 223 Seviyesinin Korelasyon Grafik Analizleri.	41

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABCA1	: ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcıları
AGO	: Argonaute
AUC	: Doğru Altında Kalan Alan
Apo	: Apolipoprotein
CETP	: Kolesterol Ester Transfer Proteini
DGCR8	: DiGeorge Sendromu Kritik bölge Geni 8
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HDL-C	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (HDL) Kolesterol
HMGCS1	: 3-hidroksi-3-metiltrasit-CoA Sentaz 1
HMG-CoA	: 3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A
HMGCR	: 3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A Redüktaz
HTGL	: Hepatik Trigliseric Lipaz
ICAM-1	: Intraselüler Adhezyon Molekülü
IDL	: Orta Yoğunluklu Lipoprotein
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
KVH	: Kardiyovasküler Hastalıklar
lncRNA	: Uzun Kodlanmayan RNA
LCAT	: Lesitin Kolesterol Açıltransferaz
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LDL-C	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL) Kolesterol
LPL	: Lipoprotein Lipaz
miRNA	: mikroRNA
PIWI	: P-element induced Wimpily Testis
piRNA	: PIWI interacting miRNA
siRNA	: Küçük Susturucu RNA
pri-miRNA	: Primer RNA
pre-miRNA	: Prekürsör RNA
RISC	: İndüklenmiş RNA Susturma Kompleksi

SC-4MOL	: Metilsterol Monooksigenaz 1
SR-B1	: Scavenger Reseptörü
TG	: Trigliserid
TRBP	: Transaktive Edici Yanıt Oluşturan RNA Bağlanma Proteini
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
VYA	: Vücut Yüzey Alanı
3' UTR	: 3' Translasyonu Olmayan Bölge

ABSTRACT

Yalbr E. Investigation of the Effect of MiRNA-223 Expression on HDL Cholesterol Level. Yeditepe University Health Sciences Institute, Department of Molecular Medicine. Master Thesis. İstanbul, 2018.

In this study, it was aimed to investigate the effect of miRNA 223 expression on HDL cholesterol level. miRNA 223 is thought to be used as a biomarker for coronary artery diseases, atherosclerosis and cardiovascular diseases by acting on the level of plasma HDL cholesterol. The study groups were determined according to their HDL cholesterol levels. 45 subjects were selected with an HDL level higher than 40 mg/dl as a control group and 45 subjects were selected with an HDL level lower than 40 mg/dl as a patient group. Expression levels of miRNA 223 between the two groups were determined by real-time PCR and statistical analysis of the obtained data was performed. miRNA 223 expression levels of two groups were compared with each other by using two independent sample student t test but no statistically significant difference was observed. Furthermore, according to the ROC analysis results, it was concluded that miRNA 223 expression level could not be evaluated as a threshold value and miRNA 223 had no effect on HDL cholesterol level and also it was not an effective biomarker for coronary artery, atherosclerosis and cardiovascular diseases. However, when the relationship between miRNA 223 expression level and fold change with all lipid values was analyzed by using the bivariate Pearson correlation test, it was shown that there were positive and negative correlations between miRNA 223 expression levels and fold change with plasma cholesterol level, LDL cholesterol level and HDL cholesterol level.

Key Words: miRNA 223, HDL Cholesterol, Coronary Artery Disease

ÖZET

Yalbr E. MiRNA-223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi İstanbul, 2018.

Bu çalışmada koroner arter hastalıkları, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklar için biyobelirteç olabileceği düşünülen miRNA 223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma grupları bireylerin HDL kolesterol seviyelerine göre HDL seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde (kontrol) olan 45 kişi ve 40 mg/dl'nin altında (hasta) olan 45 kişi ile oluşturulmuştur. İki grubun arasındaki miRNA 223 ifade düzeyleri gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiş ve elde edilen verilerin istatistiksel analizi yapılmıştır. Yapılan ikili bağımsız örneklem student t testi ile iki gruba ait miRNA 223 ifade düzeyleri karşılaştırılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Ayrıca yapılan ROC analizi sonuçlarına göre de miRNA 223 ifade düzeyinin eşik değer olarak değerlendirilemeyeceği ve miRNA 223'ün HDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin olmadığı ve koroner arter, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklar için etkin bir biyobelirteç olmadığı kanısına varılmıştır. Ancak miRNA 223 ifade düzeyi ve kat değişimi ile tüm lipid değerleri arasındaki ilişki ikili değişkenli Pearson korelasyon testi kullanılarak analiz edildiğinde miRNA 223 ifade düzeyleri ve kat değişimi ile plazma kolesterol düzeyi, LDL kolesterol düzeyi ve HDL kolesterol düzeyi arasında pozitif ve negatif korelasyonlar olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: miRNA 223, HDL Kolesterol, Koroner Arter Hastalığı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Plazma kolesterol konsantrasyonu, bireylerde ve topluluklarda ateroskleroz ve özellikle koroner kalp hastalığının gelişiminde belirgin bir risk göstergesidir (1). Gelişmiş ülkelerde ateroskleroz komplikasyonları ile birlikte önde gelen koroner kalp hastalıkları morbidite ve mortalite nedenidir. Türkiye'de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması (TEKHARF) verilerine göre ülkemizde koroner arter hastalığı (KAH) görülme sıklığı 45-54 yaş grubunda %6, 55-64 yaş grubunda yaklaşık %17, 65 yaş ve üzerindeki bireylerde ise %28 düzeyine kadar yükselmektedir (2).

Ateroskleroz kan damarlarında oluşan plaklar nedeniyle damar daralmasına ve kan akışının aksamasına neden olan damar sertleşmesi olarak da adlandırılan bir durumdur. Plak oluşumu, lipid ve kolesterol taşınma mekanizmasında oluşabilecek aksaklıklar ve karaciğer tarafından kolesterol homeostazının dengede tutulamaması sonucu gerçekleşebilir. Damar endoteline alınan kolesterol ve lipidler zamanla damar içinde birikerek ateromları oluşturur. Zamanla aşınan ve yırtılan ateromlardan çıkan kolesterol parçacıkları ise daha dar olan damarları tıkayarak damar tıkanması gibi hayati tehlike yaratabilecek kardiyovasküler hastalıklara neden olur. HDL plazma lipoproteinleri ters yönde kolesterol taşıma sistemi ile ateroskleroz ve koroner arter hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterir. HDL parçacıkları damar endotelinden ve oluşan köpük hücrelerinden aldığı kolesterolü karaciğere geri taşıyarak plak oluşumunu engeller.

mikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık 19-25 nükleotid uzunluğunda tek zincirli bir RNA molekülüdür ve gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. miRNA'lar, DNA'da transkripsiyonu yapılan ancak translasyonu yapılmayan genler tarafından kodlanır. miRNA'lar son yıllarda yapılan çalışmalar ile genler ve transkripsiyon üzerindeki etkilerinin keşfi ile araştırmalarda odak noktası haline gelmeye başlamıştır (3). miRNA'ların apoptozdan hücre bölünmesine, hücre farklılaşmasına, kanserden kalp hastalıklarına kadar birçok hastalığın biyolojik ve fizyopatolojisinin aydınlatılmasında ve kişisel tıp alanında epigenetik mekanizmaların belirlenmesinde önemli bir biyobelirteç özelliği taşıyacakları düşünülmektedir (4).

Yapılan çalışmalarda mikroRNA 223'ün lipid ve kolesterol mekanizmasında etkili genlerin ifade düzeylerinin regülasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

Özellikle, kolesterolün ters taşınmasını sağlayan HDL lipoproteini ve miRNA 223 arasındaki ilişki göz önüne alındığında, miRNA 223'ün HDL metabolizmasını ne şekilde etkilediği ve koroner kalp hastalığı için bir biyobelirteç olup olamayacağı odak noktası haline gelerek bu konuda yapılan çalışmalar günümüzde gittikçe artmaya başlamıştır.

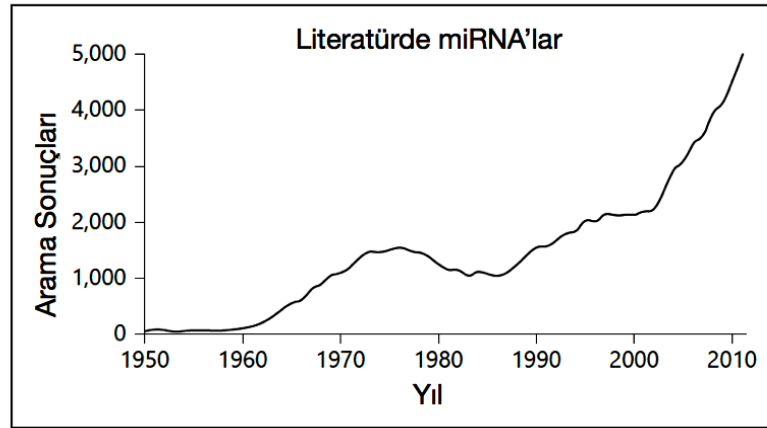
Yapılan literatür taramalarında günümüze kadar yapılmış bir çok çalışmanın hücre kültürü düzeyinde sürdürüldüğü, *in vivo* çalışmaların ise fareler üzerinde yapıldığını görmekteyiz. Ancak bugüne kadar ateroskleroz tanısı konmuş hastalarda miRNA 223 ve HDL ifade düzeyine etkisi ile ilgili yapılmış fazla çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada koroner arter tanısı konmuş hastalardan ve sağlıklı kişilerden alınan örnekler ile Türk Kardiyoloji Derneğinin belirlemiş olduğu referans HDL plazma düzeyi olan 40 mg/dl'den düşük ve yüksek değerlere sahip kişilerden oluşturulan iki grup kullanılarak, miRNA 223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MikroRNA'lar Hakkında Genel Bilgiler

1993 yılında keşfedilen ilk mikroRNA (miRNA) olan Lin-4, Lee ve arkadaşları tarafından *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) organizması kullanılarak keşfedilmiştir. 2001 yılında ise *C.elegans*'tan sonra omurgalı canlılarda ilk kez miRNA'lar keşfedilmiştir (5-7). İlk kez 1993'teki keşfinden günümüze, gen düzenlemesinde miRNA'ların önemi gittikçe takdir kazanmış ve günümüzde miRNA biyolojisi, miRNA sentezi ve miRNA'ların gen ekspresyonlarına etkileri büyük bir ilgi alanına girmiştir (8,9). Son yıllarda yapılan miRNA araştırmaları hızlı bir artış göstermiş (Şekil 2.1-1) ve çalışmalar sonucu alınan verilerde miRNA'ların hücrel proselerde aracı moleküller oldukları gösterilmiştir (10).



Şekil 2.1-1. Yıllara Göre Literatürde miRNA'ların Aranma Sonuçları (10).

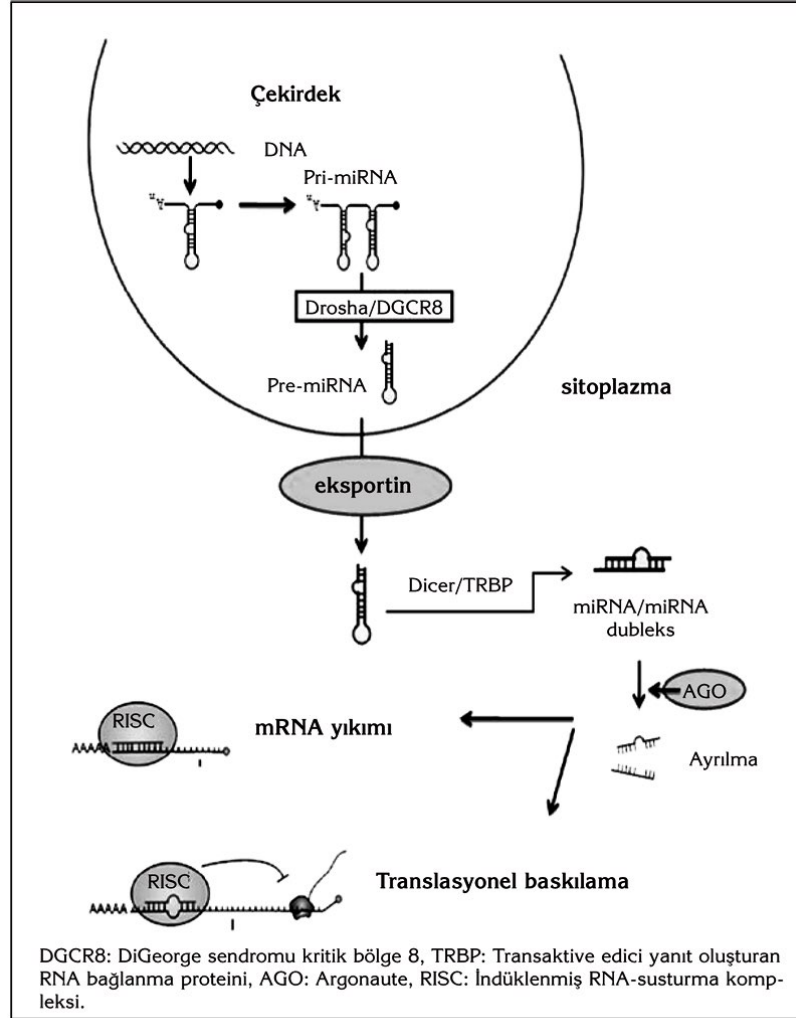
Son yıllarda yapılan tüm genom çalışmalarında, insan genomunun binlerce kodlanmayan RNA transkribe ettiği ortaya konulmuştur. En sık çalışılan kodlanmayan RNA çeşitleri ise başta mikroRNA (miRNA)'lar olmak üzere, P-element induced Wimpily Testis (PIWI) etkileşen RNA (interacting RNAs: piRNA)'lar, küçük müdahale eden RNA (small interfering RNAs: siRNA)'lar ve diğer uzun kodlanmayan RNA (long noncoding RNA: lncRNA)'lardır (11).

MikroRNA'lar genomun hem intergenik hem de genik bölgelerinden transkribe edilen, 19-25 nükleotid uzunluğunda, kısa, tek zincirli ve protein kodlamayan bir RNA çeşididir. MiRNA'lar transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede negatif gen düzenleyici olarak görev yaparlar (12,13). miRNA'lar konakçı gen öncü bölgeleri (promoter) ile birlikte transkribe edilebilir ya da kendi spesifik öncü bölgelerine sahip olabilirler (14).

Son yapılan çalışmalar insan genomunun yaklaşık %3'ünü oluşturan çeşitli miRNA'ların protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'ının düzenlenmesinde görev aldığını göstermektedir (15,16). miRNA'lar hedef mRNA'ların çevrilmeyen (transkribe olmayan) 3' ucunda bulunan spesifik bağlanma bölgeleriyle eşleşerek gen ekspresyonunu düzenler (17). Hedef mRNA'ların 3'UTR bölgesinde bulunan yaklaşık 2-8 bazlık kısımları ile miRNA'ların 5' uçlarında bulunan bazlar eşleşme yaparak bağlanırlar. Tek bir miRNA için birden fazla hedef mRNA olabildiği gibi tek bir mRNA'yı hedef alan birden fazla miRNA da olabilmektedir (15,18). miRNA'lar kendilerini kodlayan genlerdeki bazı varyasyonlardan negatif etkilenerek ilişkili oldukları protein sentez regülasyonunu da etkiler ve çeşitli hastalıkların da ortaya çıkmasına neden olabilirler (19). Günümüzde miRNA'lar ile yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda miRNA'ların bazı hastalıkların erken teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği tespit edilmiş ve tanı amaçlı yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

miRNA'ların biyogenezini üç basamakta gerçekleşmektedir (Şekil 2.1-2). İlk basamakta RNA polimeraz II tarafından miRNA genlerinden genellikle boyut olarak birbirinden farklı, çift zincirli, uzun primer miRNA (pri-miRNA)'lar sentezlenir (20). İkinci basamakta pri-miRNA'lar hücre çekirdeğinde, RNaz III enzim ailesinden bir endonükleaz olan ve mikroşlemci kompleks olarak da adlandırılan Drosha ve kofaktörü olan çift zincirli RNA bağlama proteini DGCR8 ((DiGeorge Sendromu Kritik bölge Geni 8 = DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) ile kesilerek 70-100 nükleotid uzunluğundaki prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara dönüştürülürler (21). Üçüncü basamakta ise sitoplazmada olgun miRNA'ların oluşumu gerçekleşir, ancak bu basamağın gerçekleşebilmesi için hücre çekirdeğinde oluşturulan pre-miRNA'lar bir nükleer taşıma reseptörü olan eksportin 5'e bağlanarak sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA'lar sitoplazmada bulunan ve RNaz III enzim ailesinden bir endonükleaz olan Dicer ve TRBP (Transaktive edici yanıt oluşturan RNA bağlanma proteini =

Transactivating Response RNA Binding Protein) tarafından kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli olgun miRNA'lara dönüştürülür (miRNA/miRNA dubleks) (22). miRNA dubleks Dicer tarafından kesildikten sonra tek zincirli miRNA'lardan yalnızca biri (kılavuz iplik = guide strand) Argonaute (AGO) içeren RISC (İndüklenmiş RNA susturma kompleksi = RNA induced silencing complex)'e bağlanırken, diğer tek zincirli miRNA (yolcu iplik = passenger strand) ise yıkılır. Kılavuz iplik ve RISC'in etkileşime girmesi ile hedef mRNA'nın susturularak protein sentezinin baskılanması ya da mRNA yıkımı başlamış olur. Böylece, hedef mRNA ifadesi posttranskripsiyonel düzeyde düzenlenir (23-26).



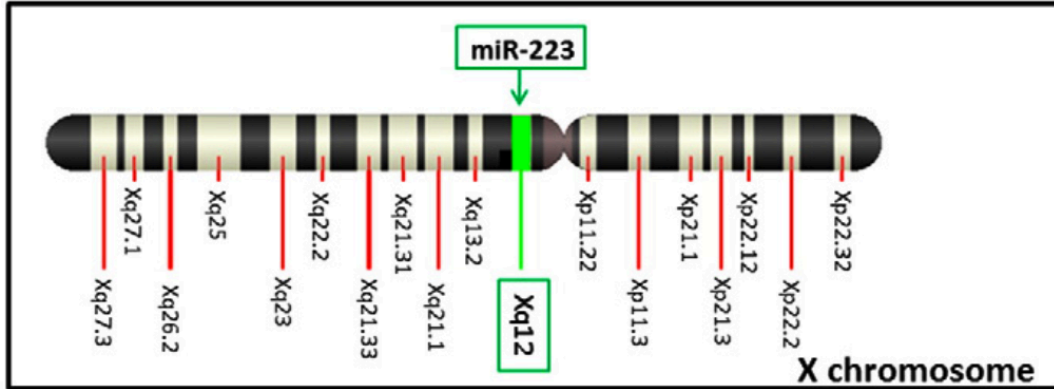
Şekil 2.1-2. MikroRNA Biyogenezisi (27).

2.2. MikroRNA 223 Hakkında Genel Bilgiler

miRNA'ların fizyolojik ve patolojik durumlarda birçok işlevi vardır ve bazı miRNA'ların da lipid homeostazı üzerinde önemli etkilerinin olduğu gösterilmiştir (28-30). Son birkaç yılda yapılan çalışmalar ile, lipoprotein metabolizmasının kontrolünde özellikle miRNA33, miRNA122 ve miRNA223'ün önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (31).

MikroRNA 223 (miRNA 223)'ün, monosit farklılaşmasını kontrol ettiği, monositlerde ve makrofajlarda çok sayıda inflamatuvar geni düzenlediği daha önce ortaya konulmuştur (32,33). Bununla birlikte, biyoinformatik verilerine bakıldığında, miRNA 223'ün lipid ve kolesterol metabolizması ile ilişkili pek çok genin düzenlenmesinde rol aldığı ortaya konulmuştur (34).

miRNA 223 X kromozomunun q12 kolunda bulunan (Şekil 2.2-1) ve insanda 22 nükleotid uzunluğunda olan bir miRNA'dır (Şekil 2.2-2).



Şekil 2.2-1. miRNA 223'ün kromozomal lokasyonu (35).

Human	5'- UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA - 3'
Chimpanzee	5'- UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC - 3'
Gorilla	5'- UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC - 3'
Rhesus	5'- UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC - 3'
Mouse	5'- UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA - 3'
Rat	5'- UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC - 3'
Dog	5'- UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC - 3'
Horse	5'- UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA - 3'
Chicken	5'- UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC - 3'

Şekil 2.2-2. miRNA 223'ün Farklı Canlılardaki Nükleotid Dizisi (35).

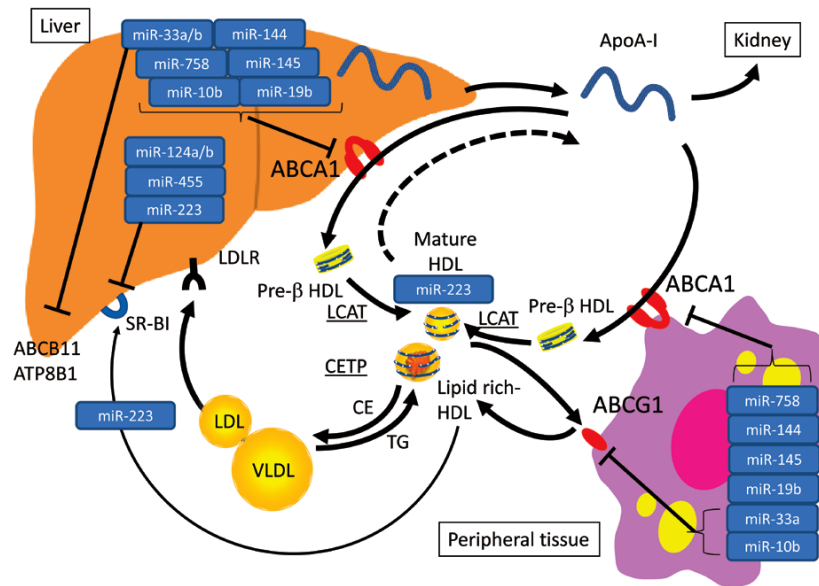
İlk olarak yapılan çalışmalar her ne kadar miRNA 223'ün myeloid hücrelerle sınırlı olduğu bildirilmiş olsa da (36), fonksiyonel miRNA 223 ekspresyonunun hepatositler de dahil olmak üzere myeloid olmayan hücre tiplerinde de gerçekleştiği birden fazla grup tarafından gösterilmiştir (37).

Hepatik miRNA 223 düzeyleri iskemik/reperfüzyon hasarında (119) anlamlı olarak artmış ve hepatosellüler karsinomda azalma saptanmıştır (38).

Kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde görev alan miRNA'ların sayısının giderek artmasıyla birlikte miRNA 223'ün kompleks kolesterol metabolizması için çok yönlü bir merkezi düzenleyici olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (39,40). Vickers ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, miRNA 223 transkripsiyonunun ve olgunlaşan seviyelerin hücre içi kolesterol değişimlerine duyarlı olduğu, miRNA 223'ün kolesterol biyosentezini, alımını ve akışını düzenlediği ve böylece onu kolesterol metabolizmasının kritik bir post-transkripsiyonel düzenleyici koordinatörü olarak ortaya koyduğu gösterilmiştir (41).

miRNA 223 promotör aktivitesi ve olgun miRNA 223 ekspresyon seviyeleri, fare makrofajları ve insan hepatom hücrelerindeki hücrel kolesterol durumlarıyla bağlantılıdır (42). İnsanlarda, miRNA 223'ün SCARB1 genini direkt baskılayarak HDL kolesterol alımını düzenlediği ve 3-hidroksi-3-metiltrasit-CoA sentaz 1 (HMGCS1) ve metilsterol monooksijenaz 1'i (SC-4MOL) hedefleyerek kolesterol sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, miRNA 223 dolaylı olarak ABCA1 (ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcıları = ATP Binding Cassette Transporter) gen ekspresyonunu Sp3 aracılığı ile yükselterek hücrel kolesterol akışını artırır. miRNA223'ün genetik

olarak kaybının ise artmış HDL kolesterol düzeyleri ve parçacık boyutunun yanı sıra hepatik ve plazma total kolesterol düzeylerinde artışa neden olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda miRNA223'ün kolesterol biyosentezinde, kolesterol alımında ve çoklu genlerin doğrudan ve dolaylı yoldan düzenlenmesiyle kolesterol regülasyonunda aktif rol oynadığı gösterilmiştir (43). Bazı miRNA'lar insan plazmasından saflaştırılmış HDL fraksiyonlarında bulunmuştur (115). Bu miRNA'lar arasında miktarı en yüksek olanı ise miRNA223'tür. HDL parçacıklarının hedef alıcı hücelere miRNA223 taşıdığı ve SR-B1 (Scavenger Reseptörü) yoluyla miRNA223 hedef gen ifadesinde önemli bir azalmaya aracılık edebildiği gösterilmiştir (Şekil 2.2-3). Aynı zamanda, HDL'den türeyen miRNA223'ün endotel hücrelerine aktarılabilirdiği ve hücre içi adhezyon molekülü 1'i (ICAM-1=Intracellular Adhesion Molecule 1) inhibe edebildiği, böylece monosit yapışmasını ve iltihaplanmayı azalttığı da saptanmıştır (44). Bu bulgular ile HDL kolesterolün anti-inflamatuvar etkileri açıklanabilir (45). Ono ve arkadaşlarının yaptığı insan kanından izole edilen HDL'ye bağlanmış miRNA'ları analiz eden çalışmada, HDL'ye bağlanan miRNA'lardan konsantrasyonu en yüksek olanın miRNA223 olduğu gösterilmiştir (46).



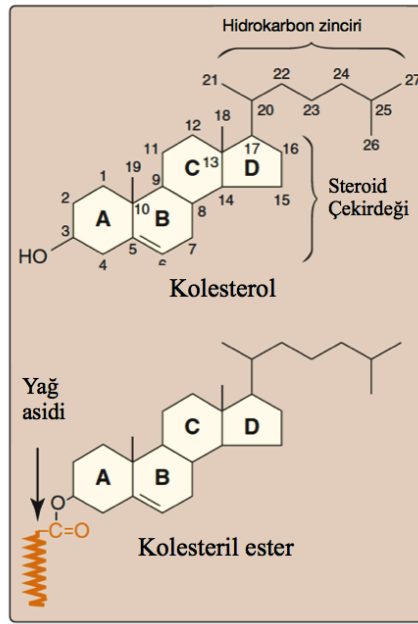
Şekil 2.2-3. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol (HDL-C) metabolizmasında mikroRNA'ların (miRNA) düzenlenme mekanizmaları (47).

Dislipidemi ve buna bağlı metabolik bozukluklar dünya genelinde endiŐe verici bir oranda artmaya devam etmekte ve artmış kardiyovaskler hastalık riski ile iliŐkilendirilmektedir. Yüksek plazma seviyeli düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-C = Low Density Lipoprotein Cholesterol), koroner arter hastalığı (KAH) için önemli bir risk faktörüdür. Birincil ve ikincil klinik müdahale çalıŐmalarına göre, kolesterol biyosentezini inhibe eden statinlerle [3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz (HMGCR) inhibitörleri] terapi yapılmasının LDL kolesterol seviyelerini etkili bir Şekilde azalttığı ve kanıtlandığı gibi koroner arter hastalığı riskini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (48,49). Ancak, yüksek dozda statin ile tedavi edilen hastaların hala önemli kardiyovaskler hastalık riski altında oldukları da çalışmalar sonucu gösterilmiştir (50,51).

2.3. Kolesterol Metabolizması

Kolesterol hayvansal dokularda bulunan bir steroid alkol yani steroldür ve vücutta bir takım temel iŐlevleri yerine getirir. Kolesterolün temel iŐlevleri arasında tüm hücre membranlarının yapısal bileŐeni olması ve hücre akıŐkanlıęını modüle etmesi, ve özel dokularda safra asitleri, steroid hormonlar ve D vitamini sentezine öncülük etmesi sayılabilir. Bu nedenle vücutta bulunan doku ve hücrelerin gerekli miktarda kolesterole sahip olmaları gerekmektedir. Vücuttaki kolesterol homeostazının düzenlenmesi karaciğer tarafından yapılır. Diyetle alınan kolesterolün yanı sıra, vücutta bulunan ekstrahepatik hücreler tarafından *de novo* olarak sentezlenen kolesterol de karaciğerde bulunan kolesterol havuzuna giriş yapar. Kolesterol, safra içinde deęiŐiklięe uğramadan karaciğerden atılır ya da safra tuzlarına dönüŐtürülerek bağırsak lümenine salgılanabilir. Bunun yanında kolesterol periferik dokulara gönderilen plazma lipoproteinlerinin bir parçası olarak da karaciğerden çıkabilir. İnsanlarda, kolesterolün karaciğere alımı ve karaciğerden diğer dokulara gönderilmesi arasındaki denge bazı durumlarda sağlanamamakta ve akıbeti belli olmayan kolesterol dokularda, özellikle kan damarlarının endotel tabakasında kademeli bir Şekilde birikerek plak oluŐumuna neden olmaktadır. Plak oluşumu, kan damarlarının daralmasına (ateroskleroz) neden olarak kardiyovaskler ve periferik damar hastalıklarının riskini arttırarak hayati tehlike oluşturan bir durumdur (52).

Kolesterol yapısı steroid çekirdeği olarak adlandırılan dört hidrokarbon halkasından (A,B,C,D) oluşan, 27 karbonlu, oldukça hidrofobik bir bileşiktir. D halkasında bulunan 17. karbona bağlı sekiz karbonlu dallı hidrokarbon zinciri bulundurur. A halkasında bulunan 3. karbondaki ise bir hidroksil grubu bulunur. B halkasının 5. ve 6. karbonu arasında ise çift zincir bulunduran bir yapıdadır (Şekil 2.3-1).



Şekil 2.3-1. Kolesterol ve Kolesteril Ester Yapısı (53).

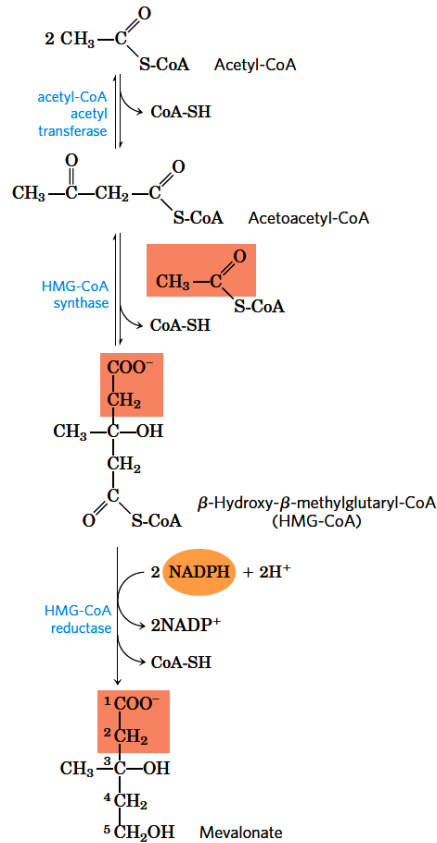
Çoğu plazma kolesterolü 3. karbona bağlı yağ asidi içererek esterleşmiş halde bulunur. Esterleşmiş kolesterol ise yapıyı serbest (esterleşmemiş) kolesterolden daha hidrofobik yapar. Kolesteril esterler hücre membranlarında bulunmaz ve çoğu hücrede düşük seviyelerde bulunurlar. Kolesterol ve kolesteril esterleri hidrofobiklikleri sebebiyle, dolaşımında bir lipoprotein parçacığı ile taşınmalıdır ya da safrada bulunan fosfolipidler ve safra tuzlarıyla çözünebilir hale getirilmelidir (52).

Kolesterol, uzun zincirli yağ asitlerinin sentezlenmesi gibi asetil-KoA'dan sentezlenir. Sentez, dört aşamada gerçekleşir; 1. aşamada üç asetat birimi altı karbonlu bir ara ürün olan mevalonatı oluşturmak üzere yoğunlaşır; 2. aşamada mevalonat aktif izopren birimlerine dönüştürülür; 3. aşamada 30 karbonlu lineer skualen oluşturmak

üzere altı adet 5 karbonlu izopren birimi polimerleştirilir; 4. aşamada ise skualen halka yapısına geçerek steroid çekirdeğinde bulunan dört hidrokarbon halkasını oluşturur, ayrıca oksitlenme, metil gruplarının uzaklaştırılması veya migrasyonu gibi bir dizi değişiklik ile kolesterol sentezlenir (54).

1. Aşama: Asetattan Mevalonat Sentezlenmesi

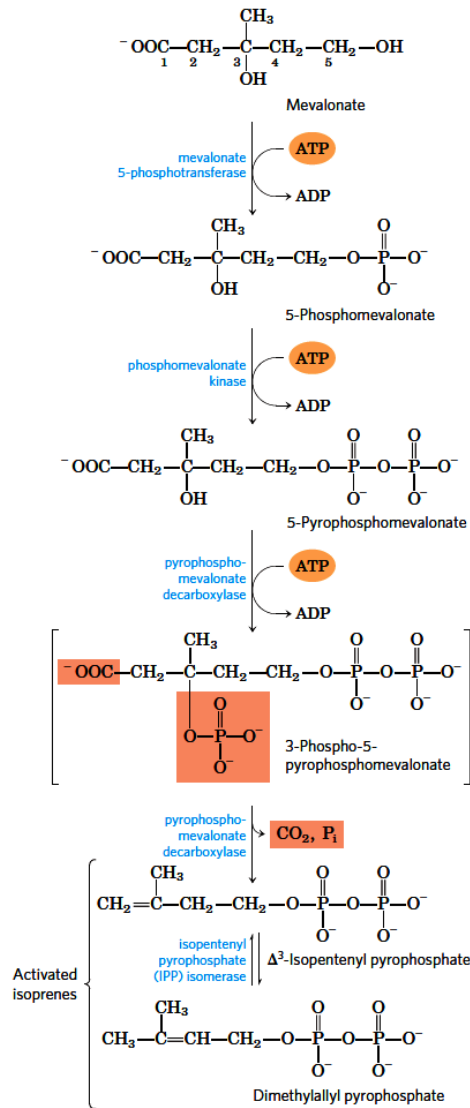
İki molekül asetil-KoA asetil-KoA asetil transferaz enzimi (tiolaz) yardımıyla birleşerek asetoasetil-KoA'yı oluşturur ve bu moleküle bir molekül asetil-KoA daha eklenerek, HMG-KoA Sentaz enzimi yardımıyla 6 karbonlu bir bileşik olan β -hidroksi- β -metilglutaril-KoA (HMG-KoA) oluşturulur. İki molekül NADPH molekülünün her biri iki elektron vererek, HMG-KoA redüktaz enzimi ile HMG-KoA'yı mevalonata indirir. Bu basamak kolesterol sentezi için kontrol basamağı olarak kabul edilir (Şekil 2.3-2) (54).



Şekil 2.3-2. Asetil-KoA'dan Mevalonat Sentezlenmesi (54).

2. Aşama: Mevalonatın İki Aktif İzoprene Dönüştürülmesi

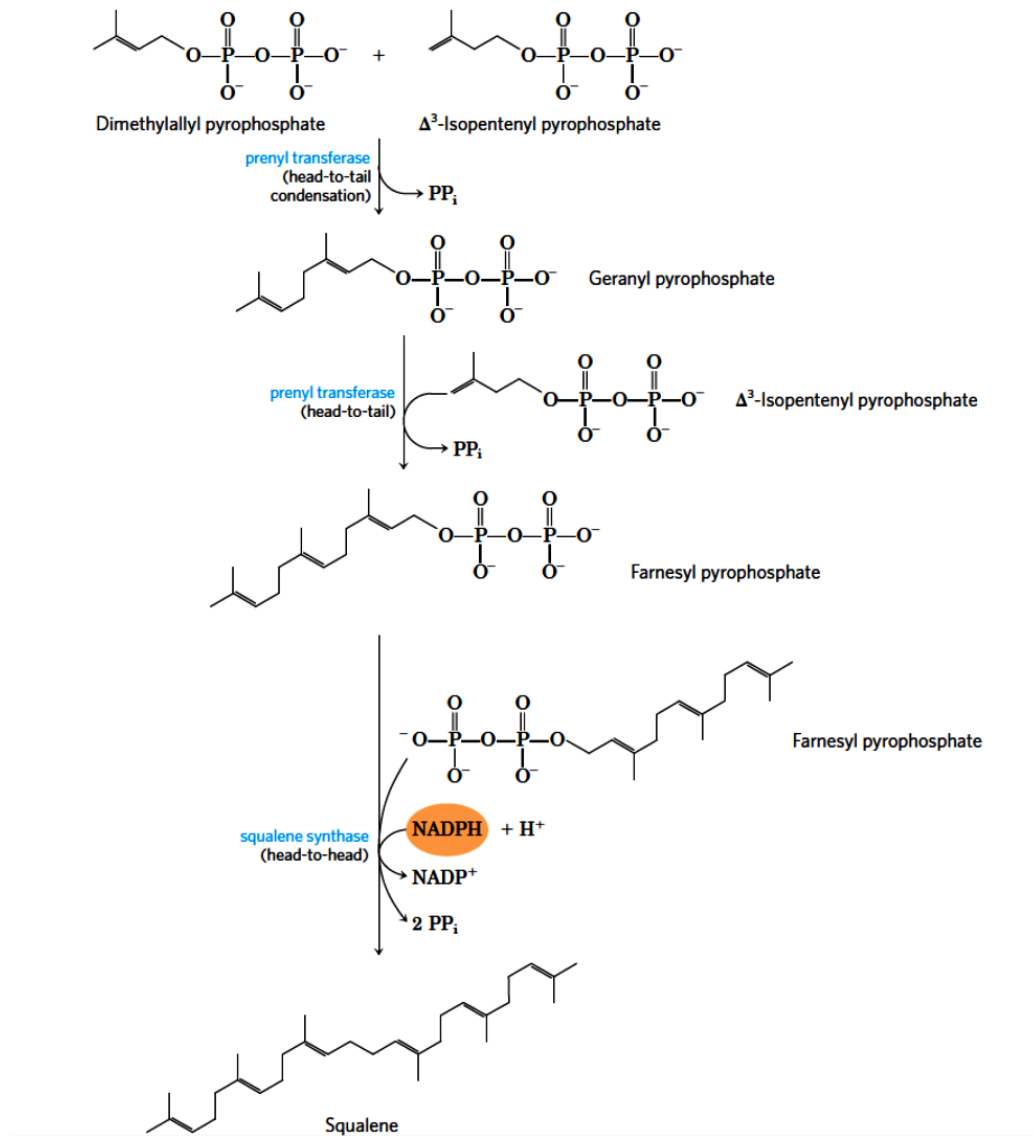
Kolesterol sentezinin bu evresinde üç ATP'den üç fosfat grubu mevalonat 5-fosfotransferaz enzimi ile mevalonata transfer edilir. Oluşan 3-fosfo-5-pirofosfomevalonat ara ürünündeki mevalonatın 3. karbonunda bulunan hidroksil grubuna bağlı fosfat iyi ayrılabilen bir gruptur. Sonraki aşamada bu fosfat ve yanındaki karboksil grubu beş karbonlu Δ^3 -izopentil pirofosfat molekülünde bir çift bağ oluşturarak beraber ayrılırlar. Oluşan molekül, kolesterol sentezindeki aktifleştirilmiş iki izopren molekülünden biridir. 3-izopentil pirofosfatın izomerleştirilmesiyle oluşan dimetilallil pirofosfat molekülü ise diğer aktif izopren molekülüdür (54).



Şekil 2.3-3. Mevalonatın İki Aktif İzoprene Dönüştürülmesi (54).

3. Aşama: Aktifleştirilmiş Altı İzopren Biriminden Skualen Oluşturulması

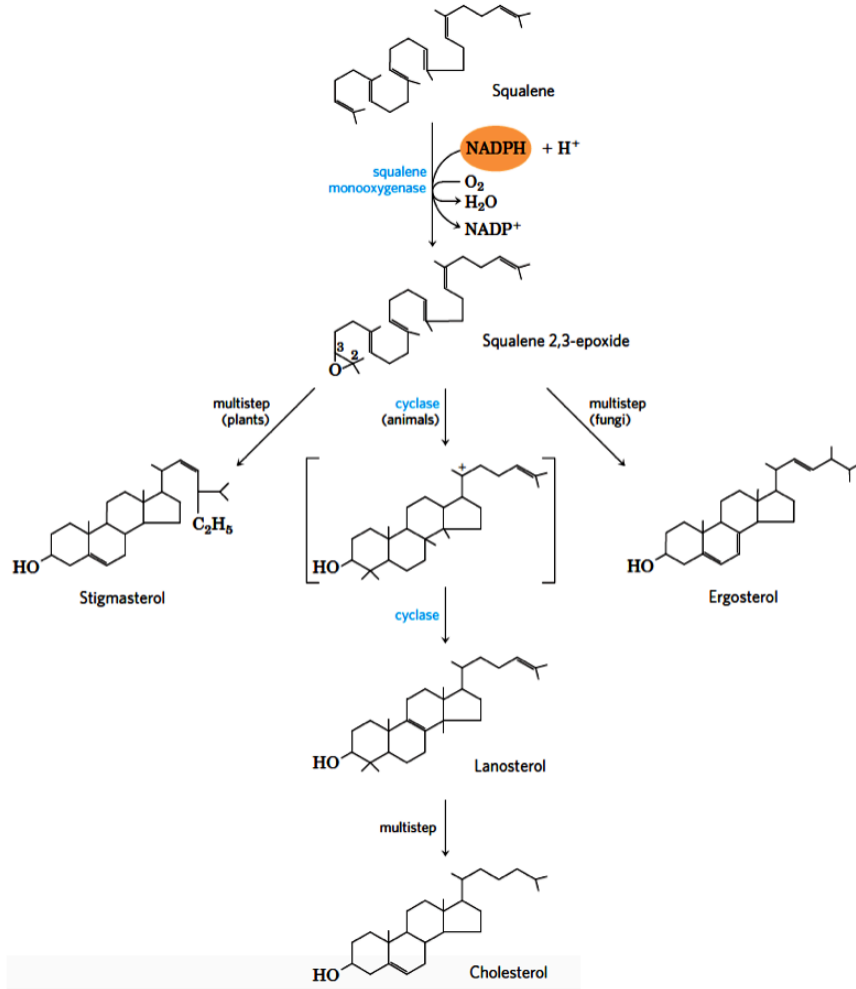
İzopentil pirofosfat ve dimetilallil pirofosfat birleşir ve bir pirofosfat grubu ayrılarak 10 karbonlu geranil pirofosfat oluşturulur. Oluşan geranil pirofosfat ile izopentil pirofosfat birleşerek 15 karbonlu bir ara ürün olan farnezil pirofosfatı oluşturur. Daha sonra oluşan farnezil pirofosfat başka bir farnezil pirofosfatla baş başa birleşerek, bir pirofosfat ayrılmasıyla, ve skualen sentaz enzimi yardımıyla 30 karbonlu skualeni oluşturur (54).



Şekil 2.3-4. Aktifleştirilmiş İzopren Birimlerinden Skualen Oluşturulması (54).

4. Aşama: Skualenin Dört Halkalı Steroid Çekirdeğine Dönüştürülmesi

Skualen monooksijenaz enzimi, bir O₂ molekülünden bir oksijen atomunu bir epoksit oluşturmak üzere skualen molekülünün ucuna ekleyerek skualen-2,3-epoksit molekülünü oluşturur. NADPH ise O₂ molekülünün diğer oksijen atomunu H₂O'ya indirir. Skualen-2,3-epoksit molekülünde buluna çift bağlar lineer yapıda olan skualeni halkasal yapıya dönüştürebilecek şekilde konumlanmıştır. Hayvan hücrelerinde gerçekleşen bu halkalı yapıya geçiş süreci steroid çekirdeğin dört halkasını bulunduran lanosterol oluşumuyla sonuçlanır. Lanosterolün oluşmasının ardından ise bazı metil gruplarının yer değiştirmesi ve bazı grupların ayrılmasını içeren yaklaşık 20 tepkime sonucu oluşan lanosterol kolesterole çevrilmiş olur (54).

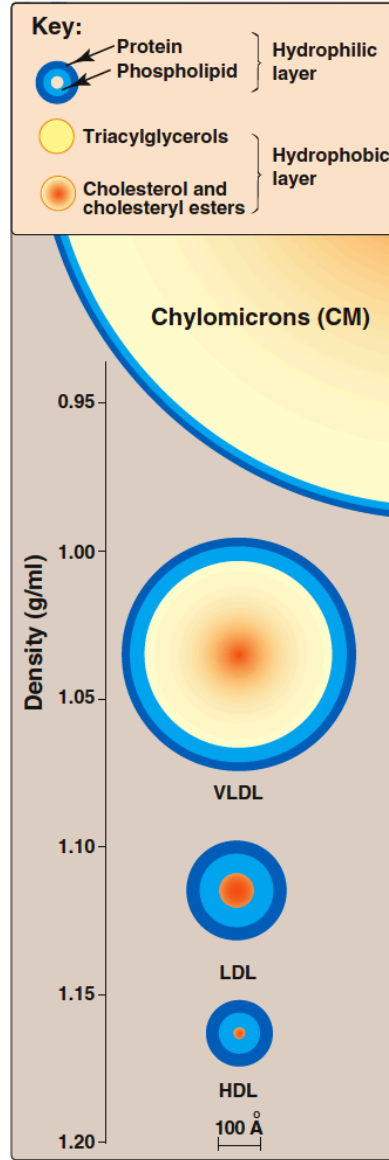


Şekil 2.3-5. Skualenin Dört Halkalı Steroid Çekirdeğine Dönüştürülmesi (54).

Kolesterol ve kolesteril esterleri triaçilgliserol ve fosfolipidler gibi suda çözünmeyen moleküllerdir, ancak bu moleküllerin vücut içinde kan dolaşımını yardımcı ile sentezlendiği dokulardan diğer doku ve hücrelere taşınması gerekmektedir. Bu moleküllerin taşınmalarını kolaylaştırmak için plazma lipoproteinleri ve spesifik taşıyıcı proteinlerden oluşan makromolekül kompleksleri olan apolipoproteinler kullanılır.

2.4. Plazma Lipoproteinleri

Lipoproteinler, protein ve lipidlerden oluşan globüler yapıdaki bileşimlerdir. Lipoproteinler amfipatik moleküller olup; iç kısmında trigliserid ve esterleşmiş kolesterol gibi hidrofobik moleküller bulunurken, dış kısmında kolesterol, fosfolipidler, proteinler ve reseptör bağlayıcı ve düzenleyici olarak görev yapan apolipoproteinler gibi hidrofilik moleküller yer almaktadır. Lipid moleküllerinin suda çözünürlüğü düşüktür ve bu yüzden kan dolaşımına tek başlarına katılamazlar. Lipoproteinler suda çözünürlükleri düşük olan lipid moleküllerini hidrofobik iç kısımlarında taşıyarak kan dolaşımına katılmasını sağlarlar. Lipoproteinler yoğunluklarına göre en hafiften (en çok lipid, en az protein) en yoğun olana doğru şilomikronlar, çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL: Very Low Density Lipoprotein), orta yoğunluklu lipoproteinler (IDL: Intermediate Density Lipoprotein), düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL: Low Density Lipoprotein), ve yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL: High Density Lipoprotein) olmak üzere sıralanırlar (Şekil 2.4-1) (55).



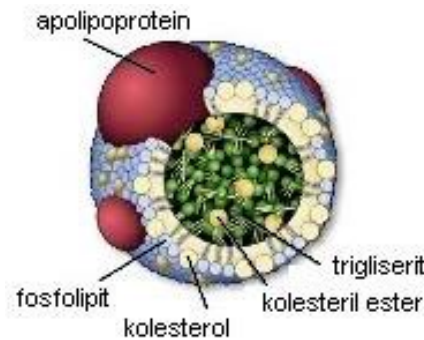
Şekil 2.4-1. Plazma Lipoproteinlerinin Yaklaşık Boyut ve Yoğunlukları (56).

Lipoproteinler boyutları, lipid kompozisyonları ve apolipoprotein içerikleri bakımından farklılık gösterirler (Şekil 2.4-2) (56). Bu özellikler, lipoprotein lipaz (LPL) (57), hepatik trigliserid lipaz (HTGL) (58), lesitin-kolesterol açıltransferaz (LCAT) (59,60) ve kolesterol ester transfer proteini (CETP) (61) gibi enzimlerin etkisiyle değişiklik gösterebilir. Apolipoproteinler bu enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesinde görev alırlar ve farklı lipoprotein sınıfları arasında geçiş yapabilirler. Ayrıca apolipoproteinler lipoproteinlerin dayanıklılığını artırmanın yanı sıra lipoprotein metabolizmasının düzenlenmesinde etki gösterirler. Apolipoproteinler, membran lipoprotein reseptörlerine bağlanarak lipoproteinlerin hücre alımını kontrol eder. Ayrıca

lipoproteinler dokular arasındaki trigliserid (TG) dağılımını sağlayarak metabolizmaya katkıda bulunurlar. Ayrıca, hücre dışı bir depo ve kolesterol taşınması için bir araç olarak kullanılırlar. Lipoprotein metabolizmasındaki anormallikler aterogenez, obezite, insülin direnci ve diyabet açısından önemlidir (62).

Şilomikronlar:

Şilomikronlar 75-1200 nm çaplı, yapısında %1-2 oranında protein ve %98-99 oranında lipid bulunduran ve ince bağırsak mukoza hücreleri tarafından üretilen lipoproteinlerdir. Şilomikronlar tarafından taşınan başlıca apolipoproteinler apoB-48, apoA-I, apoA-II ve apoA-IV'tür. Diyetle vücuda alınan trigliseridler, besinsel lipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri şilomikronlar tarafından periferik dokulara taşınırlar. Periferik dokulara taşınan trigliseridler, bu dokularda bulunan lipoprotein lipaz (LPL) enzimi tarafından hidroliz edilerek serbest yağ asitlerine dönüşürler. Ortaya çıkan yağ asitleri dokular tarafından emilirken gliserol kana karışır. İnce bağırsaklarda üretilen şilomikronlar ekzositoz yoluyla ince bağırsak lenf sistemine geçerek plazmaya ulaşırlar. Şilomikronlar plazmaya geçtikten sonra HDL ile etkileşerek apoE ve apoC-II ile birleşirler. Bu birleşme sonucu, dokulardaki LPL enzimi kofaktörü olan apoC-II sayesinde aktifleşerek trigliserid hidrolizinin başlamasına neden olur. Hidroliz sonucu oluşan yağ asitleri dokulara dağıtıldıktan sonra apoC-II tekrar HDL'ye geçer fakat apoE şilomikronlarda kalır ve apoE içeren bu lipoproteinlere 'artık şilomikron' denir. Artık şilomikronlar ise apoE ve apoB tarafından karaciğerde tutulur ve parçalanır. Bu sayede şilomikronlar tarafından taşınan kolesterol de karaciğere taşınmış olur (63).



Şekil 2.4-2. Plazma Lipoproteinlerinin Şematik Yapısı (64).

VLDL:

Yoğunlukları 0,95-1,006 g/mL arasında olan plazma lipoproteininin bir alt grubudur. VLDL, karaciğerde üretilen ve tek başlarına kan dolaşımına katılamayan fazla trigliserid, fosfolipid, kolesterol ve kolesteril esterleri alarak kan dolaşımına katılır. VLDL tarafından yapılan bu taşınma 'endojen lipid taşıma sistem' olarak adlandırılır. Kan dolaşımı yoluyla taşıdığı molekülleri dokulara ileterek LDL'ye dönüşürler. VLDL'de bulunan apoB ve apoE apolipoproteinleri ile sağlam bir yapıya sahip olan VLDL'ler aynı zamanda bu apolipoproteinler sayesinde hücreler tarafından tanınarak endositoz yoluyla dolaşımdan çıkarılırlar. Yeni oluşan VLDL'de apoB-100 proteini bulunmaktadır. Yeni oluşmuş VLDL kan dolaşımına katıldıktan sonra HDL ile etkileşime geçerek apoC-II ve apoE proteinlerini edinir ve böylece olgunlaşmış VLDL olarak adlandırılır. VLDL'nin apoC-II proteinini edinmesi ile LPL enzimi aktifleşir ve taşınan trigliseridlerin yağ asitlerine hidrolizi başlamış olur. Oluşan yağ asitleri ihtiyaca göre hücre içine alınıp depolanır ya da enerji üretimi için kullanılır. Hidroliz sonrası VLDL tekrar HDL ile etkileşime geçerek apoC-II'yi HDL'ye geri verir ancak apoE VLDL'de kalır. Ayrıca, VLDL'de bulunan trigliserid ile HDL'de bulunan kolesteril esterleri arasında, kolesteril ester transfer proteini (CETP: Cholesteryl Ester Transfer Protein) kullanılarak değiş tokuş sağlanır. Bu değiş tokuş sonrası VLDL'nin yoğunluğu artarak LDL'yi oluşturur (65). Plazmada yüksek düzeyde VLDL'nin bulunması ateroskleroz riskini arttıran faktörler arasında gösterilir (66).

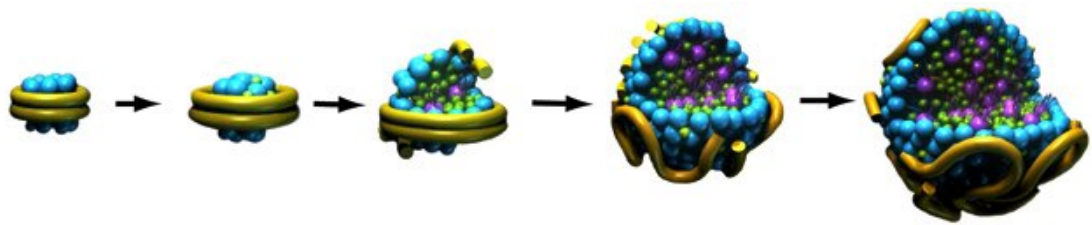
LDL:

Yoğunlukları 1,019-1,063 g/mL arasında olan ve kanda kolesterol taşınmasını sağlayan lipoproteinlerdir. LDL plazma içinde taşıdığı lipidler dışında yapısında apoB-100 ve apoE apolipoproteinlerini barındırır. LDL'nin asıl görevi kolesterol ve trigliserid sentezleyen doku ve hücrelerden bu molekülleri alarak ihtiyacı olan doku ve hücrelere kan dolaşımı yolu ile taşınmalarını sağlamaktır. Vücuttaki toplam kolesterol miktarının yaklaşık olarak %70' i LDL' de bulunmaktadır. Bu yüzden plazmada yüksek düzeyde bulunan LDL'nin kalp hastalıkları ile arasında ilişki olduğu gösterilmiş ve 'kötü kolesterol' olarak da anılmaya başlanmıştır (67). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalara göre, LDL'de bulunan kolesterolün miktarından çok LDL'nin büyüklüğü ve

yoğunluğunun ateroskleroz riskini etkileyen bir faktör olduğu gösterilmiştir. Çok sayıda bulunan küçük LDL parçacıklarının ateroskleroz, kalp hastalıkları ve ölüm riskini daha çok arttırdığı saptanmıştır (68).

HDL:

HDL karaciğerde üretilen ve dokulardan aldığı fazla kolesterolü kan dolaşımı yolu ile karaciğere taşıyan yüksek yoğunluklu lipoproteinlerdir. LDL'nin aksine HDL dokularda ve damarlarda biriken fazla kolesterolü vücuttan atılmak üzere alarak karaciğere taşıdığı için 'iyi kolesterol' olarak da anılmaya başlanmıştır. HDL lipoproteinler arasında boyutları en küçük olanlardır ancak yapılarında taşıdıkları fazla proteinden dolayı yüksek yoğunluklu parçacıklardır. HDL parçacıkları yapılarında apoA-I ve apoA-II apolipoproteinlerini bulundurlar. HDL karaciğerde yassı bir yapı olarak sentezlenir ve bu yeni oluşmuş yassı HDL tanecikleri dokulardaki fazla kolesterolü alır. Dokulardan alınan kolesterol ise plazmada bulunan Lesitin kolesterol açiltransferaz (LCAT: Lecithin Cholesterol Acyl Transferase) enzimi ile kolesterol esterlerine dönüştürülür (69). Kolesterol esterleri serbest kolesterole göre daha hidrofobik yapıdadır. Bu yüzden HDL tarafından alınan kolesterol esterleri yassı HDL parçacıklarının ortasında birikerek HDL'nin küresel bir yapıya dönüşmesini sağlarlar (Şekil 2.4-3). HDL plazmada dolaştığı süre boyunca farklı dokulardan ve hücrelerden fazla kolesterolü almaya devam ederek büyür. HDL'nin ateroskleroz ve kalp hastalıklarına karşı koruyucu özelliği ise taşıdığı kolesterol miktarına değil, ne kadar büyük HDL tanecikleri oldukları ile ilişkilendirilmiştir (70).



Şekil 2.4-3. Yassı ve Küresel HDL Taneciklerinin Şematik Yapısı (71).

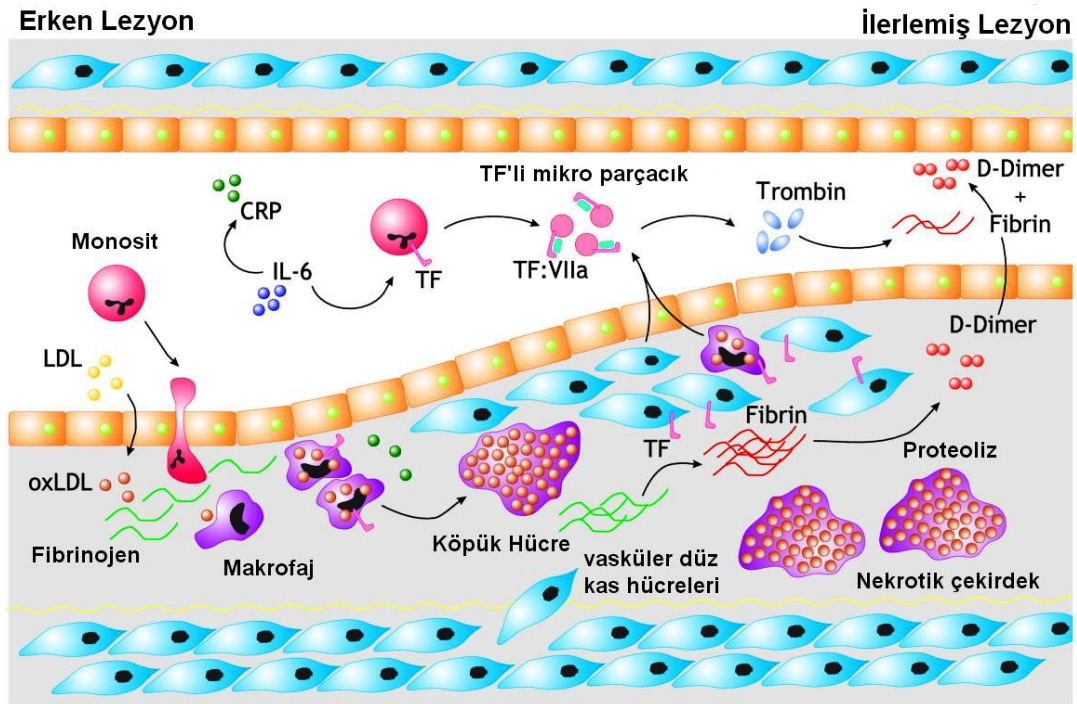
Ters Yönde Kolesterol Taşınması:

HDL kolesterolün ters yönde taşınmasında önemli bir rol oynayarak köpük hücrelerinin oluşmasından kaynaklanan hasarı azaltır. Kolesterol seviyesi düşük HDL parçacıkları, ekstrahepatik dokularda ve köpük hücrelerde biriken kolesterolü alarak karaciğere taşır. HDL molekülünde bulunan bir apolipoprotein olan apoA-I, kolesterol bakımından zengin hücrelerde kolesterolün hücrelerden çıkışını düzenleyen iki ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcısı olan ABCA1 ile etkileşime geçer. ABCA1 ise HDL ile etkileşime geçtikten sonra hücre içindeki kolesterolü lipid bakımından zayıf olan apoA-I'e vererek kolesterolün hücre dışına çıkararak karaciğere taşınmasını sağlar. Bir diğer ABC taşıyıcısı olan ABCG1 ise olgunlaşmış HDL ile etkileşerek kolesterolün hücreden çıkarak HDL'ye girişini kolaylaştırır. Bu sistem kolesterolün ters yönde taşınması olarak adlandırılır ve özellikle kardiyovasküler hastalığı olan bireylerde, damarlarda oluşan köpük hücrelerin plak alanlarında birikimini önlemek için kritik bir öneme sahiptir (52,54).

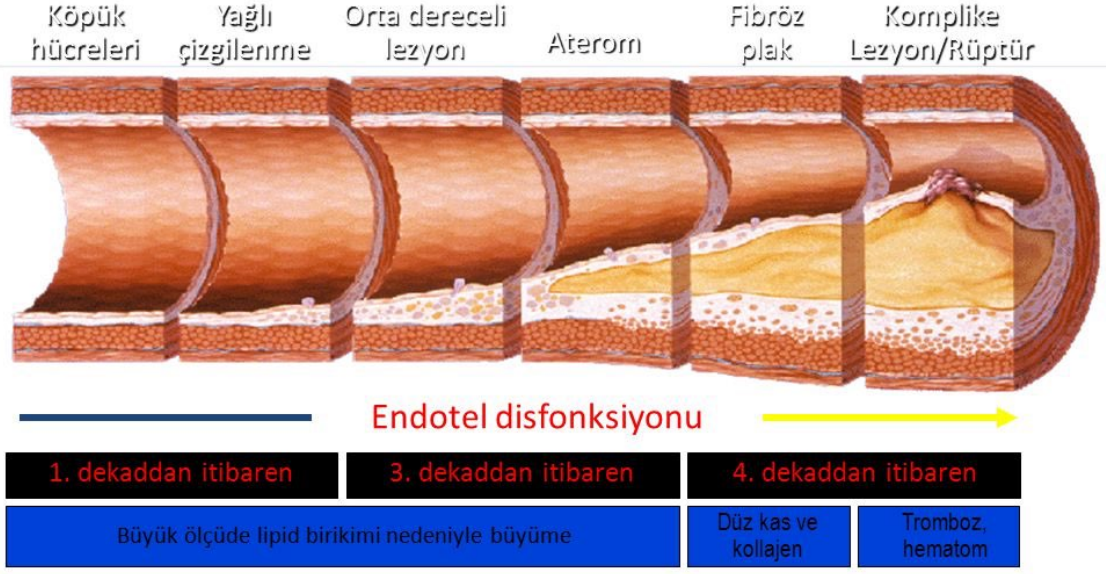
2.5. Ateroskleroz

Ateroskleroz, damar sertleşmesi olarak da adlandırılan, arterleri etkileyerek hayati tehlikesi olan çeşitli kalp damar hastalıklarının altında yatan en temel etkenlerden biridir. Daha çok orta ve büyük boy arterlerde görülen lezyonlardan yani aterosklerotik plak ya da ateromlardan oluşan yapısal bozukluklardır (72,73). Ateroskleroz ve aterogenezin oluşum mekanizması incelendiğinde endotel hücreleri, arterlerin duvarında bulunan düz kas hücreleri, monositler ve trombositler gibi çeşitli hücrelerin lipoproteinlerle etkileşimleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aterosklerotik lezyonların oluşumunda üç temel faktör olduğu düşünülmektedir. Bu faktörler, lipid metabolizmasında ortaya çıkan bozukluklar, inflamasyon ve vasküler hücrelerin aktivasyonu ve bu faktörlerin birbirleriyle etkileşimleri sonucunda lezyon oluşumlarının (yağlı çizgilenme) olduğu gösterilmiştir (72,73). Endotel hücreleri damarların geçirgenliğini ve damarların homeostazını sağlayan önemli hücrelerdir. Bu hücrelerde görülebilecek fonksiyon bozuklukları aterosklerozun meydana gelmesinde temel basamaklardan biridir (74). Aterosklerozun bir diğer temel nedeni ise dolaşımdaki kolesterol seviyesi ve kolesterol taşıyan lipoproteinlerden olan LDL'dir. LDL,

karaciğerden sentezlenen kolesterolü hücelere taşır ve damarlarda bulunan endotel hücelerine girerek oksitlenir ve damarlarda kolesterol birikmesine, böylece ateroskleroza neden olur (Şekil 2.5-1) (76). Oksitlenmiş LDL'in damar endoteline girmesiyle monositler ve trombositler de damar duvarına yapışırlar. Monositler daha sonra farklılaşarak makrofajlara dönüşür ve oksitlenmiş LDL'yi içlerine alarak köpük hüceleri oluştururlar. Köpük hüceleri içlerinde çok miktarda lipid ve kolesterol bulundurur ve zamanla parçalanarak içlerindeki kolesterol ve lipidlerin damar içinde oluşan ateromlarda birikmesine neden olurlar (Şekil 2.5-2) (77). HDL ise kolesterolü damar duvarından ters taşıma sistemi ile karaciğere geri taşıyarak ateroskleroz riskini azaltır (75).



Şekil 2.5-1. LDL Oksitlenmesi ve Lipid Birikmesine Bağlı Lezyon Oluşumu (76).



Şekil 2.5-2. Ateroskleroz Gelişimi (77).

Ateromlar damarın iç yüzeyinde biriken yumuşak, sarımsı yapılardır. Damar içinde oluşan ateromlar zamanla aşınabilir ya da yırtılabilir. Bu yırtılma sonucu ateromları oluşturan parçacıklar kan akışı ile dolaşıma katılarak arterlerden daha dar olan damarları tıkayarak tromboza neden olabilirler. Ateromların yırtılması dışında oluşabilecek bir diğer risk ise stenoz yani ateromların büyüyerek damarı daraltması ve kan akışını zorlaştırması durumudur. Tromboz ve stenozun yaşamı tehdit eden ve genellikle mortalite ya da kalıcı hasarlara yol açan patolojik durumlara neden olduğu bilinmektedir (72,73).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnek Seçimi ve Tanımı

Çalışmada kullanılan örnekler Marmara Üniversitesi Pendik Araştırma Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran koroner arter hastalığı teşhisi konulmuş kişiler ve check-up kontrolü için yine aynı kliniğe başvuran sağlıklı kişilerden oluşturulan iki grup olarak belirlenmiştir. Çalışmada miRNA223 ekspresyon düzeyleri ile HDL kolesterol seviyesi arasında ilişki inceleneceğinden örnekler Türk Kardiyoloji Derneği'nin (78) belirtmiş olduğu referans değerleri göz önünde bulundurularak HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl' den düşük (n=45) ve 40 mg/dl'den yüksek (n=45) olarak ikiye ayrılmıştır. Sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere iki grup arasındaki koroner arter hasta sayısı ile sağlıklı kişi sayısı eşit tutulmaya çalışılmıştır.

3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

3.2.1. Kullanılan Sarf ve Ayraç Malzemeler

mirRNA İzolasyonu:

mikroRNA İzolasyon Kiti (miRNeasy Serum/Plazma Kit, Qiagen): Trizol (Quiazol, Qiagen), Kloroform (Sigma Aldrich) %100 Etanol (Sigma Aldrich), cDNA Reverse Transkripsiyon kiti (miScript II Kit, Qiagen): microRNA Universal Primer (Qiagen), miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen), miReasy Spike in kontrol (mir39, Qiagen), microRNA Primer Assay (miRNA223, Qiagen), microRNA Housekeeping Assay (SNORD68, Qiagen), İzolasyon da kullanılan RWT Tamponu Guanidine tuzu içerir ve izolasyona başlamadan önce 44 µl etanol eklenerek hazırlanır. RPE Tamponu izolasyon sırasında kolonlarda kalan tuz ve kalıntıları uzaklaştırmak için kullanılır ve 30 µl etanol eklenerek hazırlanır.

Fluorometre ile mikroRNA düzey belirleme:

miRNA'ya özgü Reagent, miRNA tamponu ile çalışma solüsyonu (working solution) hazırlanır. miRNA düzeylerini ölçmeden hemen önce cihaz kalibrasyonu 10 ng/µl rRNA içeren standart 1 ve 250 pg/µl rRNA standart 2 kullanılarak yapılır. (Qubit 3.0 microRNA Assay kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc).

Real Time PCR 96 Well Plate (Thermo Fisher Scientific Inc), DNase RNase free 18 m Ω su, Microamp Clear Adhesive Film.

3.2.2. Kullanılan Cihazlar

NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc), Gerçek Zamanlı PZR (Lightcycler 480 II Instrument, Roche Diagnostics), Gerçek Zamanlı PZR (Fast Real Time 7500, Applied Biosystems), Fluorometre (Quibit 3.0, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc), Plate Santrifüj (Hettich), Santrifüj (Centrifuge 22R, Beckman Coulter), +4°C Buzdolabı (Haier), -20°C Buzdolabı (Haier), Ultra saf su cihazı (Purelab option Q, Elga), Vorteks (V.I. Plus Biosan), Pipet Takımı (Thermo Fisher Scientific Inc).

3.3.Yöntemler

3.3.1. Serumdan miRNA izolasyonu

miRNA izolasyonu için hasta ve sağlıklı gönüllülerden düz tüpe alınan kan örnekleri 4500 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek serum elde edilmiştir ve elde edilen serumlar çalışma yapılana kadar -80°C' de saklanmıştır.

miRNA izolasyonuna başlamadan önce serum örnekleri -80°C'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldıktan sonra 37°C de inkübe edildi. 200 μ l serum örneği steril eppendorflara konularak, her bir eppendorfa 1000 μ l liziz çözeltisi (Qiazol Lysis Solution) eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Bu işlemden sonra örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletildi ve her birine daha önce hazırlanan stok solüsyondan 3,5 μ l "miReasy Spike in kontrol" (1.6×10^8 kopya/ μ l) eklendi. Çeker ocak altında örneklere 200 μ l kloroform eklendikten sonra 5 dk vorteks ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dk bekletildi. Hazırlanan karışım +4°C de 12.000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Üstte bulunan renksiz sıvıdan (supernatant) 600 μ l alınarak yeni eppendorflara konuldu. Ayrılan supernatanta 900 μ l %100 etanol eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Bu karışımdan 700 μ l alınarak kolonların üstüne konulduktan sonra oda sıcaklığında 8000 g'de 15 sn santrifüj edildi ve aynı işlem tekrarlanarak tüplerde biriken sıvı atıldı. Kolonların üzerine 700 μ l RWT tamponu eklendikten sonra 8000 g'de 15 sn yapılan santrifüj işleminden sonra biriken sıvı atıldı. Aynı işlem 500 μ l RPE tamponu eklenerek tekrarlandı. Aynı kolonlara 500 μ l %80 etanol eklendikten sonra 8000 g'de 2 dk

santrifüj edildi ve biriken sıvı ve koleksiyon tüpleri atıldı. Kolonlar yeni tüplere yerleştirildi ve kuru olarak en yüksek hızda 5 dk santrifüj edildi. Son olarak üzerine 14 µl RNA free su eklenerek en yüksek hızda 1 dk santrifüj edilerek miRNA izolasyonu tamamlandı.

3.3.2. cDNA Eldesi

İzole edilen miRNA'lara ters transkripsiyon işlemi (Tablo 3.3.2-1) uygulanarak (miScript II Kit, Qiagen) cDNA'ya çevrildi (Tablo 3.3.2-2). Elde edilen cDNA'lar çalışma yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır (81).

Tablo 3.3.2-1. cDNA Sentezi için PZR İçeriği

5x miScript Hiflex Buffer	4 µl
10x miScript Nucleic mix	2 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
RNA free su	10,5 µl
mikroRNA	1,5 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.3.2-2. cDNA Sentezi için İnkübasyon Koşulları

60 dk	37 °C
5 dk	95 °C
∞	95 °C

3.3.3. MikroRNA Saflık Tayini

Serumdan izole edilen miRNA örneklerin saflığı Nanodrop2000 cihazı ile ölçüldü ve saflığı OD₂₆₀/ OD₂₈₀ oranı kullanılarak belirlendi. Saflık değeri OD₂₆₀/ OD₂₈₀ değeri 2.0'dan büyük olan örnekler uygun olarak kabul edildi (80).

3.3.4. mikroRNA Düzeylerinin Belirlenmesi

miRNA düzeyleri fluorometrik olarak belirlendi. İlk aşamada örnek başına 199 µl miRNA Tamponu ve 1 µl miRNA Reagent (Qubit microRNA Assay, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) karıştırılarak 200 µl çalışma solüsyonu (working solution) hazırlandı. 10 µl standart 1 üzerine 190 µl çalışma solüsyonu eklenerek 1 numaralı standart ve 10 µl standart 2 üzerine 190 µl çalışma solüsyonu eklenerek 2 numaralı standart hazırlanarak sırayla cihaza standartlar tanıtıldı. Her bir örnek ölçümü için Qubit tüplerine 198 µl çalışma çözeltisi ve 2 µl örnek eklenerek 200 µl'lik karışım elde edildi. Elde edilen karışımların miRNA düzeyleri Qubit cihazında okuma yapılarak belirlendi (82).

3.3.5. Eş Zamanlı PZR ile miRNA Ekspresyon Analizi

Çalışma çerçevesinde araştırılması planlanan miRNA “mirbase” ve “targetscan” veri tabanları (<http://www.mirbase.org/>, <http://www.targetscan.org/>) kullanılarak belirlenmiştir. Lipoprotein ve kolesterol mekanizması üzerinde farklı etkileri olan miRNAlar v bu veri tabanları ile analiz edilmiştir. HDL kolesterol seviyesi üzerine etkileri olan miRNA223 araştırılmak üzere seçilmiştir. miRNA ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak delta Ct (ΔC_t) ve kat değişimi farklarını hesaplamak için internal kontrol (housekeeping assay = SNORD68) kullanılmıştır. miRNA düzey belirleme hesaplamaları Livak formülü ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) kullanılarak yapılmıştır (83).

miRNA ekspresyon analizi Gerçek Zamanlı PZR cihazında (Fast Real Time 7500, Applied Biosystems) gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3.5-1 ve Tablo 3.3.5-2). SYBR Green (miScript SYBR Green PCR, Qiagen) ile işaretlenmiş cDNA dizisine analiz edilecek miRNA primeri (miRNA223, Qiagen) ve miRNA endojen kontrol (housekeeping) primeri (SNORD68, Qiagen) bağlanması sonucunda cihaz ile SYBR

green'in floresan ışımaya miktarı saptanarak miRNA223'ün ekspresyon analizi yapılmıştır (84).

Tablo 3.3.5-1. MikroRNA Ekspresyon için Eş Zamanlı PZR İçeriği

SYBR Green PCR Mix	12,5µl
miScript Universal Primer	2,5 µl
miScript Primer Assay	2,5 µl
RNAase free su	2,5 µl
cDNA	5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.3.5-2. MikroRNA Ekspresyon için Eş Zamanlı PZR Koşulları

Denatürasyon	95°C	15 dk	
Döngü Evresi	94°C	15 sn	} 40 döngü
	55°C	30 sn	
	70°C	34 sn	
Ergime	95°C	30 sn	

3.3.6. Lipid Profillerinin Ölçülmesi

Plazma kolesterol, TG, VLDL, HDL düzeyleri Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında bulunan klinik otoanalizatörler ile enzimatik yöntemler kullanılarak ölçülmüştür.

3.3.7. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasının istatistiksel analizi lisanslı SPSS 25.0 ve Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic=ROC) analizi için MedCalc paket programları kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık kabul edilmesi için p değeri < 0.05 olarak alınmıştır.

HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'nin altında ve üstünde olan bireylerden oluşturulan iki gruba ait tüm demografik veriler ikili bağımsız örneklem student t testi, ki kare, Fisher exact ve Pearson testleri uygulanarak karşılaştırıldı. İki gruba ait tüm lipid değerleri ikili bağımsız örneklem student t testi kullanılarak karşılaştırıldı. İki gruba ait miRNA 223 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması ikili bağımsız örneklem student t testi kullanılarak yapıldı. İki gruba ait ekspresyon analiz sonuçları ile vücut kitle indeksi, vücut yüzey alanı ve tüm lipid değerlerinin korelasyonları ikili değişkenli Pearson korelasyon testi kullanılarak yapıldı. miRNA 223 ekspresyon seviyeleri ROC analizi ile de tanı saptamak için karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarına Ait Demografik veriler

Tez projemize katılan plazma HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında (HDL<40 mg/dl) olan 45 kişi ve plazma HDL seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde (HDL>40 mg/dl) olan 45 kişinin demografik verileri karşılaştırmalı olarak Tablo 4.1-1'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1-1. HDL Kolesterol Seviyesi 40 mg/dl'nin Üstünde ve Altında Olan Gruplara Ait Demografik Veriler

Grup		HDL > 40 (n=45)	HDL < 40 (n=45)	p değeri
Cinsiyet (K / E)		%51,1 / %48,9 (n=23) / (n=22)	% 22,2 / % 77,8 (n=10) / (n=35)	0,004*
Yaş (Yıl)		59,93±13,83	58,73±14,09	0,684
Vücut Kitle İndeksi (VKİ) (kg/m ²)		28,12±5,14	28,60±5,88	0,679
Vücut Yüzey Alanı (VYA) (m ²)		1,84±0,17	1,93±0,20	0,024*
Sigara	kullanan	% 24,4 (n=11)	%43,3 (n=28)	0,000*
	kullanmayan	% 75,6 (n=34)	% 56,7 (n=17)	
Diabet	var	% 33,3 (n=15)	% 33,3 (n=15)	1,000
	yok	% 66,7 (n=30)	% 66,7 (n=30)	
Kolesterol İlaç Kullanımı	var	% 22,2 (n=10)	% 22,2 (n=10)	1,000
	yok	% 77,8 (n=35)	% 77,8 (n=35)	
KOAİ	var	% 13,3 (n=6)	% 13,3 (n=6)	1,000
	yok	% 86,7 (n=39)	% 86,7 (n=39)	

n=örnek sayısı, $\bar{X} \pm SD$ (Ortalama \pm Standart Sapma), K/E= Kadın / Erkek, KOAİ=Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

* Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerler istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (p<0,05). Gruplar arası farklılık ileri ki-kare testi (X^2), ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

İleri ki kare ve student-t testi analizi ile HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde (kontrol) ve HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'nin altında olan iki gruba ait demografik veriler karşılaştırıldığında; HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında olup, patolojik kabul edilen grupta cinsiyet dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p=0,004$). Gruplar arasında vücut kitle indeksi (VKİ) anlamlı bir farklılık göstermezken, vücut yüzey alanının (VYA) patolojik olarak kabul edilen HDL<40 mg/dl grupta anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,024$).

İki grup arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada KOAH, diabet ve kolesterol ilacı kullanımı arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=1,000$; $p=1,000$; $p=1,000$). Ancak gruplar arasında sigara kullanımı için istatistiksel karşılaştırma yapıldığında HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında olan grupta sigara kullanan kişi sayısının kullanmayan kişi sayısına göre anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir ($p=0,000$).

Çalışmamızda kullanılan iki gruba ait tüm ortalama lipid değerleri istatistiksel analiz yapılarak karşılaştırılmıştır. Gruplara ait tüm ortalama lipid değerleri Tablo 4.1-2'de özetlenmiştir.

Oluşturulan gruplar HDL kolesterol değerlerine göre 40 mg/dl'nin altında ve 40 mg/dl'nin üstünde olarak belirlenmiş olup yapılan istatistiksel analizde iki grubun ortalama HDL kolesterol seviyeleri karşılaştırıldığında beklenildiği gibi anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p=0,000$).

HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'nin altında olan grubun ortalama plazma kolesterol düzeyi $174,56 \pm 42,90$ mg/dl ve HDL kolesterol seviyesi 40 ml/dl'nin üstünde (kontrol) olan grubun ortalama plazma kolesterol seviyesi $194,67 \pm 46,18$ mg/dl olarak belirlenmiş, ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,035$).

Ortalama trigliserid seviyesi HDL kolesterol seviyesi 40 ml/dl'nin altında olan grup için $149,44 \pm 83,08$ mg/dl ve HDL kolesterol seviyesi 40 ml/dl'nin üstünde olan grup için $138,29 \pm 64,32$ mg/dl olarak belirlenmiş ancak iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Ortalama LDL kolesterol seviyesi HDL kolesterol seviyesi 40 ml/dl'nin altında olan grup için $109,44 \pm 39,55$ mg/dl ve HDL kolesterol seviyesi 40 ml/dl'nin üstünde

olan grup için $119,00 \pm 38,21$ mg/dl olarak belirlenmiş ancak iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Ortalama VLDL kolesterol seviyesi HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'nin altında olan grup için $29,51 \pm 19,75$ mg/dl ve HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde olan grup için $28,64 \pm 12,50$ mg/dl olarak belirlenmiş ancak iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Tablo 4.1-2. HDL Seviyesi 40 mg/dl'nin Üstünde ve Altında Olarak Belirlenen Çalışma Gruplarına Ait Lipid Değerleri

		HDL>40 (n=45)	HDL<40 (n=45)	p değeri
Plazma Kolesterol (mg/dl)	($\bar{X} \pm SD$)	194,67 ± 46,18	174,56 ± 42,90	0,035*
Trigliserid (mg/dl)	($\bar{X} \pm SD$)	138,29 ± 64,32	149,44 ± 83,08	0,478
LDL (mg/dl)	($\bar{X} \pm SD$)	119,00 ± 38,21	109,44 ± 39,55	0,247
HDL (mg/dl)	($\bar{X} \pm SD$)	50,49 ± 10,34	31,60 ± 3,70	0,000*
VLDL (mg/dl)	($\bar{X} \pm SD$)	28,64 ± 12,50	29,51 ± 19,75	0,782

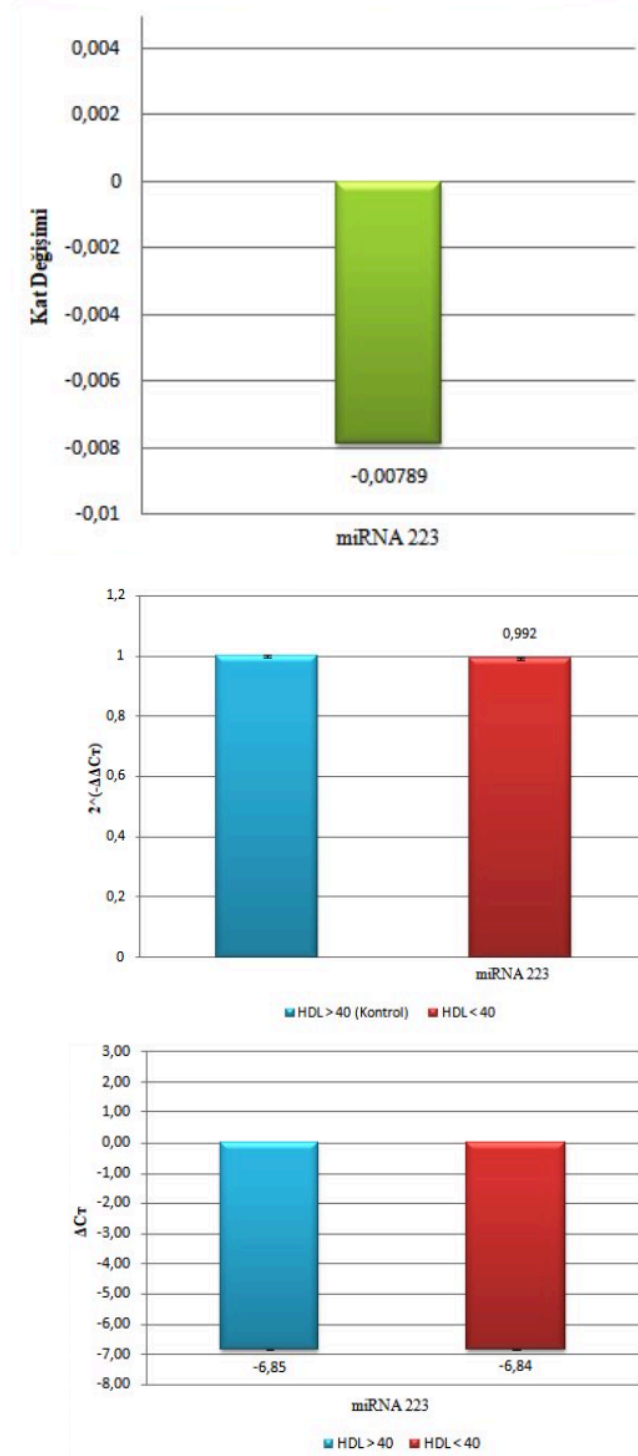
n=örnek sayısı, ($\bar{X} \pm SD$) (Ortalama ± Standart Sapma), * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerler istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p < 0,05$). Gruplar arası farklılık ileri ki-kare testi (X^2), ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

4.2. miRNA 223 Ekspresyon Sonuçları

miRNA 223 ifade düzeyi incelenirken kontrol grubuna ait Ct (Cycle treshold) değerlerinin ortalaması alınarak oluşturulan meta kontrol değeri ile yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen kat değişim ($Ln[2^{-(\Delta\Delta Ct)}]$) değeri Şekil 4.2-1A'da gösterilmiştir. miRNA 223 ifade düzeyi internal kontrol değeri olarak alınan sıfır değeri ile karşılaştırılmıştır. Internal kontrole göre miRNA 223 ifade düzeyinin 0,0078 kat azaldığı belirlenmiştir.

miRNA 223 ifade düzeyi Livak formülüne ($2^{(-\Delta\Delta C_T)}$) göre incelendiğinde ise internal kontrol değeri olarak alınan 1 değeri ile karşılaştırılmıştır. $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ değişimi Şekil 4.2-1B'de gösterilmiştir. İnternal kontrole göre miRNA 223 için $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ değişiminin 0,992 kat azaldığı saptanmıştır.

miRNA 223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde (kontrol) ve HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'nin altında olan iki grup için karşılaştırılması yapılırken, elde edilen Ct değerlerinden internal kontrol (SNORD 68) Ct değerleri çıkarılarak ΔC_T değerleri elde edilmiştir. Elde edilen ΔC_T değerleri ile miRNA 223 ifade düzeyinin internal kontrole göre kontrol grubu için 6,85 kat, HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında olan grubu için ise 6,84 kat azaldığı Şekil 4.2-1C'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2-1. miRNA 223 Ekspresyon Seviyesi Analizleri.

A. Gerçek Zamanlı PZR ile belirlenen plazma miRNA 223 seviyesinin kat değişim ($\ln[2^{(-\Delta\Delta Ct)}]$) grafiği kontrol (0) kat değerine göre çizilmiştir, **B.** $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerinin grafiği kontrol (1) kat değerine göre çizilmiştir, **C.** ΔCt değerleri dağılım grafiği kontrol (0) değerine göre çizilmiştir.

miRNA 223 ifade düzeyi incelenirken elde edilen miRNA 223 Ct değerleri, bu değerlerden internal kontrol olarak kullanılan SNORD 68 (housekeeping assay) Ct değerlerinin çıkarılmasıyla elde edilen ΔCt değerleri, Livak formülü kullanılarak hesaplanan değerle ve bu değerlerin Ln tabanında hesaplanmasıyla belirlenen kat değişimi değerleri Tablo 4.2-1’de gösterilmiştir.

HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl’nin üstünde olan grubun Ct ortalaması $23,48 \pm 2,07$, HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl’nin altında olan grubun Ct ortalaması ise $23,85 \pm 2,86$ olarak hesaplanmış ve iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır.

miRNA 223 Ct değerlerinden SNORD 68 Ct değerleri çıkarılarak elde edilen ΔCt değerlerinin ortalaması ise HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl’nin üstünde olan grup için $-6,85 \pm 1,87$, HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl’nin altında olan grup için $-6,84 \pm 2,66$ olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Hesaplanan ΔCt değerlerinden meta kontrol ve tüm internal kontrol ΔCt değerleri farkı çıkartılarak hesaplanan $\Delta \Delta Ct$ değerleri Livak formülü kullanılarak $2^{(-\Delta \Delta Ct)}$ hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlarda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir.

$2^{(-\Delta \Delta Ct)}$ değerlerinin Ln tabanında logaritmasının hesaplanması ile elde edilen kat değişim değerleri HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl’nin üstünde olan grup için $0,0007 \pm 1,29$, HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl’nin altında olan grup için $-0,0078 \pm 1,84$ olarak hesaplanmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 4.2-1. HDL Seviyesi 40 mg/dl'nin Üstünde ve Altında Olan Gruplara ait miRNA 223 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

		$\bar{X} \pm SD$	<i>p</i> değeri	%95 Güven Aralığı
C_T	HDL > 40 (n=45)	23,48 ± 2,07	0,488	-0,67984 - 1,41317
	HDL < 40 (n=45)	23,85 ± 2,86		
ΔC_T	HDL > 40 (n=45)	-6,85 ± 1,87	0,981	-0,95112 - 0,97468
	HDL < 40 (n=45)	-6,84 ± 2,66		
$2^{(-\Delta\Delta C_T)}$	HDL > 40 (n=45)	2,37 ± 4,37	0,215	-1,59326 - 6,96971
	HDL < 40 (n=45)	5,05 ± 13,78		
Ln ($2^{(-\Delta\Delta C_T)}$)	HDL > 40 (n=45)	0,0007 ± 1,29	0,980	-0,67574 - 0,65885
	HDL < 40 (n=45)	-0,0078 ± 1,84		

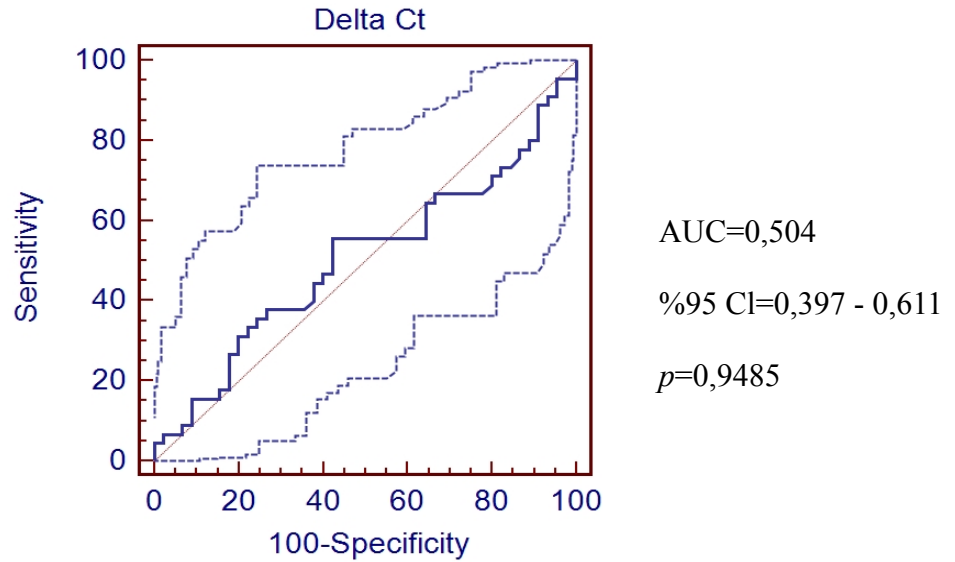
n=örnek sayısı, ($\bar{X} \pm SD$) (Ortalama ± Standart Sapma), * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerler istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p < 0,05$). Gruplar arası farklılık ileri ki-kare testi (X^2), ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

4.3. miRNA 223 ROC Analiz Sonuçları

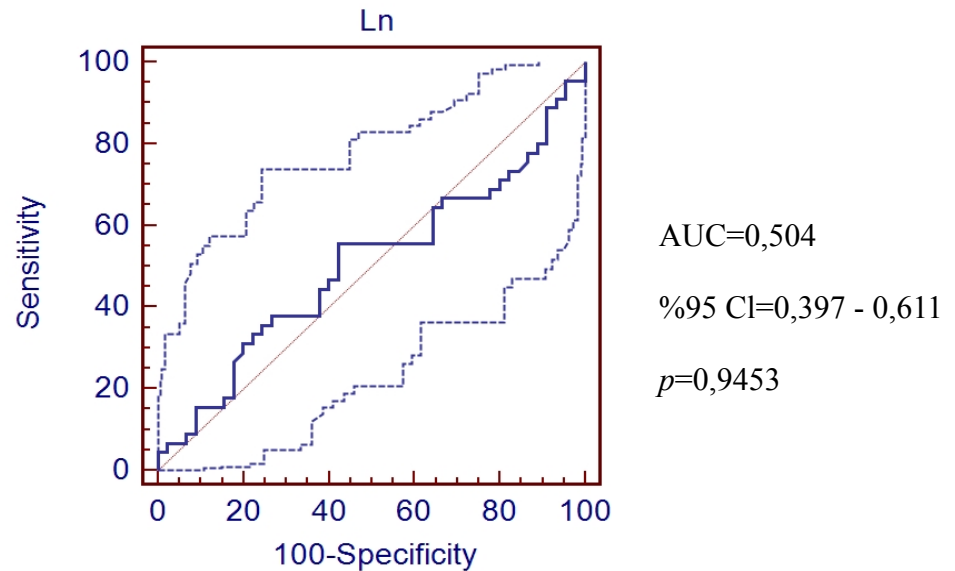
HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında (hasta) ve HDL seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde (kontrol) gruplarına ait tüm plazma miRNA 223 seviyelerini saptamak için MedCalc Programı kullanılarak Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic=ROC) analizi yapılmıştır. Şekil 4.3-1'de görüldüğü gibi miRNA 223 ifade düzeyinin hasta grubu olarak kabul edilen HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında olan grup için bir tanı olarak değerlendirilebileceği bir eşik değer saptanmamıştır. ΔC_T değerlerine göre AUC (Area Under Curve) = 0,504 olarak gösterilmiştir ($p=0,9485$).

Kat değişimi değerlerine göre ise $AUC = 0,504$ olarak saptanmıştır ($p=0,9453$). ROC analiz sonuçlarından elde edilen p değerlerine göre $p < 0,005$ değerleri anlamlı olarak kabul edilirse analiz sonucunda elde edilen miRNA 223 ifade düzeyi hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark oluşturmamaktadır.

A. miRNA 223 ROC grafiği (ΔC_T)



B. miRNA 223 ROC grafiği (kat değişimi)



şekil 4.3-1. Plazma miRNA223 seviyesinin HDL seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde ve HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında olan gruplara göre ROC Analizi grafikleri.

A. ΔC_T değerlerine göre miRNA 223 seviyesinin analizleri. **B.** Kat değişimine [$\text{Ln}(2^{-\Delta C_T})$] göre miRNA 223 seviyesinin analizleri. * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p<0,05$).

4.4. miRNA 223 Ekspresyon Düzeyinin Korelasyon Sonuçları

Çalışmamızda gerçek zamanlı PZR sonucu elde edilen miRNA 223 Ct, ΔC_T , $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ve $\ln(2^{(-\Delta\Delta C_T)})$ değerleri ile vücut kitle indeksi (VKİ), vücut yüzey alanı (VYA) ve tüm lipid değerleri arasındaki korelasyonlarına bakılmıştır. Ct değerinin yüksek olması çalışılan grupta miRNA seviyesinin ya da ifade düzeyinin düşük olmasını ya da tam tersi Ct değerinin düşük olması miRNA seviyesinin yüksek olmasını ifade eder. ΔC_T ise miRNA Ct değerlerinden internal kontrol Ct değerleri çıkartılarak hesaplanmış ve miRNA ifade düzeyinin internal kontrole göre düşük ya da yüksek olduğu gösterilmiştir. Ct değerinde olduğu gibi ΔC_T değerinin yüksek olması miRNA seviyesinin düşük, ΔC_T değerinin düşük olması miRNA seviyesinin yüksek olduğunu gösterir. Ancak Livak formülü kullanılarak yapılan hesaplama ve Ln tabanında yapılan hesaplama ile miRNA seviyesinin internal kontrole göre upregüle ya da downregüle olup olmadığı gösterilir. Elde edilen sonuçların yüksek olması miRNA seviyesinin de yüksek olduğunu, sonuçların düşük olması ise miRNA seviyesinin düşük olduğunu belirtir. ΔC_T ve kat değişimi sonuçlarına bakıldığında, ΔC_T değeri negatif olup ekspresyon seviyesi yüksek olan miRNA'ya ait kat değişim değerinin pozitif, ΔC_T değeri pozitif olup ekspresyon seviyesi düşük olan miRNA'ya ait kat değişim değerinin ise negatif olması beklenmektedir.

HDL seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde olan gruba ait korelasyonlar Tablo 4.4-1'de verilmiştir. HDL seviyesinin 40 mg/dl'nin üstünde olması durumunda, Ct değerleri ve VKİ arasında çok güçlü olmayan pozitif korelasyon (Pearson korelasyonu = 0,362, $p = 0,015$), Ct değerleri ile HDL seviyesi arasında yine çok güçlü olmaya pozitif korelasyon (Pearson korelasyonu = 0,269, $p = 0,049$) gösterilmiştir. ΔC_T ile VYA arasında pozitif korelasyon (Pearson korelasyonu = 0,331, $p = 0,026$) ve aynı zamanda kat değişimi ile VYA arasında negatif korelasyon (Pearson korelasyonu = -0,330, $p = 0,027$) gösterilmiştir. ΔC_T ile LDL seviyesi arasında negatif korelasyon (Pearson korelasyonu = -0,309, $p = 0,039$) ve aynı zamanda kat değişimi ile LDL seviyesi arasında pozitif korelasyon (Pearson korelasyonu = 0,309, $p = 0,039$) gösterilmiştir.

Tablo 4.4-1. HDL Seviyesi 40 mg/dl'nin Üstünde Olan Grup için miRNA 223 Seviyesinin VKİ, VYA ve Lipid Düzeyleri ile Olan Korelasyonları

		VKİ	VYA	Kolesterol	Trigliserid	LDL	HDL	VLDL
Ct	Pearson korelasyonu	0,362*	0,287	0,049	0,222	-0,291	0,296*	0,189
	<i>p</i> değeri	0,015*	0,056	0,751	0,142	0,052	0,049*	0,213
ΔC_T	Pearson korelasyonu	0,250	0,331*	0,024	0,064	-0,309*	0,269	0,017
	<i>p</i> değeri	0,098	0,026*	0,875	0,675	0,039*	0,074	0,911
$2^{(-\Delta\Delta C_T)}$	Pearson korelasyonu	-0,112	-0,155	-0,059	-0,032	0,242	-0,100	0,076
	<i>p</i> değeri	0,463	0,309	0,700	0,833	0,109	0,515	0,619
Kat Değişimi [Ln ($2^{(-\Delta\Delta C_T)}$)]	Pearson korelasyonu	-0,249	-0,330*	-0,024	-0,065	0,309*	-0,269	-0,018
	<i>p</i> değeri	0,099	0,027*	0,874	0,671	0,039*	0,074	0,906

* Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerler istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p < 0,05$).

HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında olan gruba ait korelasyonlar Tablo 4.4-2'de verilmiştir. HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında olması durumunda, $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ile kolesterol seviyesi arasında çok güçlü olmayan negatif korelasyon (Pearson korelasyonu = -0,309 , $p = 0,023$) ve $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ile LDL seviyesi arasında çok güçlü olmayan negatif korelasyon (Pearson korelasyonu = -0,311 , $p = 0,038$) saptanmıştır.

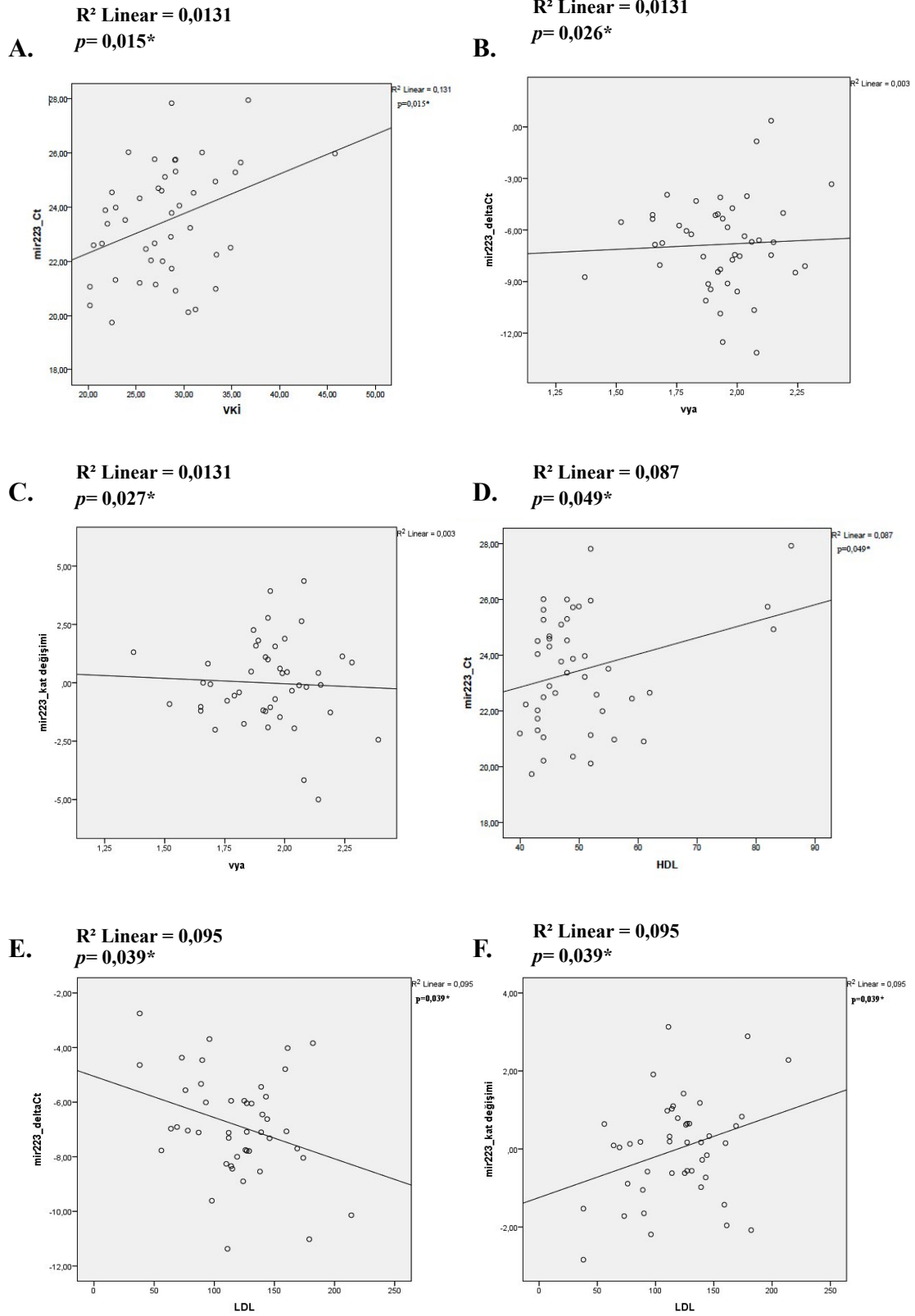
Tablo 4.4-2. HDL Seviyesi 40 mg/dl'nin Altında Olan Grup için miRNA 223 Seviyesinin VKİ, VYA ve Lipid Düzeyleri ile Olan Korelasyonları

		VKİ	VYA	Kolesterol	Trigliserid	LDL	HDL	VLDL
Ct	Pearson korelasyonu	0,144	0,162	-0,047	0,004	-0,092	-0,126	0,028
	p değeri	0,344	0,287	0,759	0,981	0,546	0,410	0,853
ΔC_T	Pearson korelasyonu	-0,023	0,050	0,128	0,045	0,034	-0,154	0,050
	p değeri	0,883	0,742	0,404	0,768	0,824	0,313	0,743
$2^{(-\Delta\Delta C_T)}$	Pearson korelasyonu	0,228	0,105	-0,339*	-0,031	-0,311*	-0,127	-0,023
	p değeri	0,132	0,491	0,023*	0,838	0,038*	0,406	0,882
Kat Değişimi [Ln ($2^{(-\Delta\Delta C_T)}$)]	Pearson korelasyonu	0,023	-0,050	-0,127	-0,045	-0,034	0,154	-0,050
	p değeri	0,881	0,743	0,404	0,769	0,825	0,313	0,743

* Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerler istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p < 0,05$).

Tablo 4.4-1 ve Tablo 4.4-2'de özetlenmiş olan korelasyon sonuçlarına göre çizilmiş istatistiksel olarak anlamlılık gösteren korelasyon doğru grafikleri p değerleri ile birlikte Şekil 4.4-1 ve Şekil 4.4-2'de gösterilmiştir.

Şekil 4.4-1'de gösterilmiş olan korelasyonlar HDL seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde olan gruba ait Ct, ΔC_T ve kat değişimi grafikleridir. Şekil 4.4-1A'da Ct ve VKİ arasındaki pozitif korelasyon açıkça görülmektedir. Şekil 4.4-1B'de ise ΔC_T ile VYA arasındaki pozitif korelasyon gösterilirken, Şekil 4.4-1C'de kat değişimi ile VYA arasındaki negatif korelasyon gösterilmiştir. Şekil 4.4-1D'de Ct ve HDL arasındaki pozitif korelasyon, Şekil 4.4-1E'de ΔC_T ve LDL arasındaki negatif korelasyon ve Şekil 4.4-1F'de kat değişimi ile LDL arasındaki pozitif korelasyon gösterilmiştir.

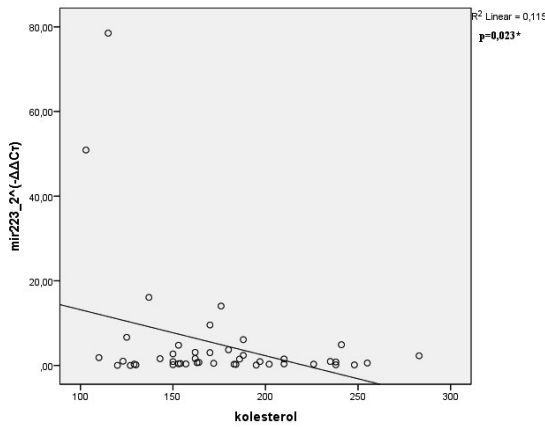


Şekil 4.4-1. HDL Seviyesi 40 mg/dl'nin Üstünde Olan Grup için miRNA 223 Seviyesinin Korelasyon Grafik Analizleri.

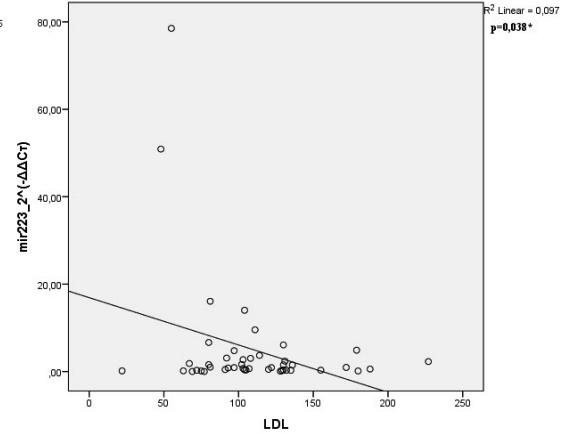
A. Vücut Kitle İndeksi (VKİ) değerlerine göre plazma miRNA223 C_T, **B.** HDL değerlerine göre plazma miRNA 223 C_T, **C.** Vücut Yüzey Alanı (VYA) değerlerine göre plazma miRNA223 ΔC_T, **D.** Vücut Yüzey Alanı (VYA) değerlerine göre plazma miRNA223 kat değişimi, **E.** LDL değerlerine göre plazma miRNA 223 ΔC_T, **F.** LDL değerlerine göre miRNA 223 kat değişim seviyelerinin analizi.

Şekil 4.4-2’de gösterilmiş olan korelasyonlar HDL seviyesi 40 mg/dl’nin altında olan gruba ait $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ grafikleridir. Şekil 4.4-2A’da $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ve kolesterol seviyesi arasındaki negatif korelasyon, Şekil 4.4-2B’de ise $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ve LDL seviyesi arasındaki negatif korelasyon gösterilmiştir.

A. R^2 Linear = 0,115
 $p=0,023^*$



B. R^2 Linear = 0,097
 $p=0,038^*$



Şekil 4.4-2. HDL Seviyesi 40 mg/dl’nin Altında Olan Grup için miRNA 223 Seviyesinin Korelasyon Grafik Analizleri.

A. Kolesterol değerlerine göre plazma miRNA223 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, **B.** LDL değerlerine göre plazma miRNA 223 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ seviyelerinin analizi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Plazma kolestrol konsantrasyonu, bireylerde ve topluluklarda ateroskleroz ve özellikle koroner kalp hastalığının gelişiminde belirgin bir risk göstergesidir (1). Gelişmiş ülkelerde ateroskleroz komplikasyonları ile birlikte önde gelen koroner kalp hastalıkları morbidite ve mortalite nedenidir. Türkiye'de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması (TEKHARF) verilerine göre ülkemizde koroner arter hastalığı (KAH) yaygınlığı 45-54 yaş grubunda %6, 55-64 yaş grubunda yaklaşık %17, 65 yaş ve üzerindeki bireylerde ise %28 düzeyine kadar yükselmektedir (2).

Bu çalışmada koroner arter tanısı konmuş hastalardan ve sağlıklı kişilerden alınan örnekler ile Türk Kardiyoloji Derneğinin belirlemiş olduğu referans HDL plazma düzeyi olan 40 mg/dl'den düşük ve yüksek değerlere sahip kişilerden oluşturulan iki grup kullanılarak, miRNA 223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yapmış olduğumuz bu tez çalışmasında öncelikle HDL plazma düzeyi 40 mg/dl'nin üstünde (HDL>40) olup kontrol grubu olarak kabul edilen ve HDL plazma düzeyi 40 mg/dl'nin altında (HDL<40) olup patolojik durum kabul edilen grupların tüm demografik verileri ile iki grubun özellikleri tanımlanmıştır. İki grup arasında yapılan istatistiksel analizler sonucunda cinsiyet, vücut yüzey alanı (VYA) ve sigara kullanma durumu için anlamlı bir fark gösterilmiştir ($p=0,004$; $p=0,024$; $p=0,000$). İki grup arasında cinsiyet karşılaştırması yapıldığında HDL düzeyi 40 mg/dl'nin altında olan erkek sayısının kadın sayısına göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Vücut yüzey alanının ise HDL düzeyi 40 mg/dl'nin altında olan bireylerde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Patolojik durum olarak kabul edilen HDL düzeyinin 40 mg/dl'nin altında olması durumunda sigara içen bireylerin içmeyenlere göre daha yüksek olduğu da yapılan istatistiksel analizler ile gösterilmiştir (85).

Elde ettiğimiz bulgular Forey ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (2013) (85) gösterdikleri gibi sigara içen bireylerin HDL kolesterol konsantrasyonlarının sigara içmeyen bireylere göre daha düşük (86,87) olduğu bulgular ile örtüşmektedir. Yapılan çalışmada HDL kolesterol konsantrasyonunun, önceden sigara içip bırakmış olan bireylerde halen sigara içmekte olan bireylere göre daha yüksek olduğu

kanıtlanmıştır (88). Ayrıca, daha önce Maeda ve arkadaşları tarafından (2003) (89) yapılmış çalışmada sigarayı bırakan kadınlarda erkeklere göre daha fazla HDL kolesterol artışı olduğu gösterilmiştir.

Tez çalışmamızda yer alan tüm bireylerin lipid değerleri 1999 yılında 9000 katılımcı ile R.W. Mahley tarafından yapılmış olan (90) tüm Türkiye'yi kapsayan Türk kalp çalışması ile belirlenmiş olan sınır değerler dikkate alınarak belirlenmiştir. Mahley tarafından verilen lipid değerleri şu şekildedir: Plazma kolesterol seviyesinin 200 mg/dl'den düşük olması normal, 200-240 mg/dl arasında olması sınırda yüksek ve 240 mg/dl'den fazla olması yüksek olarak kabul edilmiştir. Trigliserid seviyesinin 200 mg/dl'den düşük olması normal, 200-240 mg/dl arasında olması sınırda yüksek ve 240 mg/dl'nin üstünde olması yüksek olarak kabul edilmiştir. LDL kolesterol seviyesinin 130 mg/dl'nin altında olması normal, 130-159 mg/dl arasında olması sınırda yüksek ve 160 mg/dl'nin üstünden olması yüksek olarak belirlenmiştir. HDL kolesterol seviyesinin ise 35 mg/dl'nin altında olması düşük, 35-44 mg/dl arasında olması normal ve 45 mg/dl'nin üstünde olması yüksek olarak kabul edilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada HDL kolesterol seviyeleri 40 mg/dl'nin altında 45 kişi ve 40 mg/dl'nin üstünde 45 kişi rastgele seçilerek iki grup oluşturulmuştur. Oluşturulan iki grubun tüm lipid değerlerinin ortalaması istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise plazma kolesterol seviyeleri arasında da anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p=0,035$). HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'den yüksek olan grubun ortalama plazma kolesterol seviyesinin $194,67 \pm 46,18$ mg/dl ve HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'den düşük olan grupta ise $174,56 \pm 42,90$ mg/dl olduğu saptanmıştır. Kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde lipid düzeyleri önemli bir yere sahiptir. Yüksek total kolesterol ve LDL kolesterol seviyesinin yüksek olmasının, Castelli ve arkadaşları tarafından 1983'te yapılan çalışmalar (91) ile kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında düşük HDL kolesterol seviyesinin de kardiyovasküler hastalıkların gelişimiyle yakından ilgili olduğu ve yüksek HDL kolesterol seviyesinin ise kardiyovasküler hastalıklar için koruyucu etkisinin olduğu daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (92).

miRNA'lar kısa bir süre önce keşfedilmiş, gen ekspresyonunu olumsuz şekilde kontrol eden kodlanmamış kısa RNA'lar olarak tanımlanmıştır (93). Son yıllarda

miRNA'lar üzerinde oldukça çok çalışma yapılmış ve halen yapılmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar hücre canlılığında, insan malignitelerinin başlamasında ve ilerlemesinde miRNA'ların rolünü desteklemektedir. Son beş yıldaki bulgular, hücre proliferasyonu, apoptoz, gelişim, farklılaşma ve metabolizma gibi önemli süreçlerin düzenlenmesinde miRNA'ların rolünü göstermektedir. Son zamanlarda ise miRNA ekspresyonu ve miRNA'lar ile ilgili işlev bozuklukları özellikle kanser ile ilişkilendirilmiştir (94-99).

Tez çalışmasında kullanılan iki gruba ait miRNA 223 ekspresyon düzeylerini karşılaştırmak üzere delta Ct (ΔC_T) ve kat değişim farklarını göstermek için bir internal kontrol (housekeeping assay = SNORD 68) kullanılmıştır. miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için yapılan hesaplamalar Livak formülü ($2^{\Delta\Delta C_T}$) (83) kullanılarak yapılmıştır. Livak formülüne göre hesaplama yapılırken hedef miRNA'nın Ct değerinden internal kontrolün Ct değeri çıkarılarak (hedef Ct - internal kontrol Ct) ΔC_T hesaplanmış, daha sonra hedef miRNA ve internal kontrol için hesaplanan ΔC_T değerlerinden meta kontrol için hesaplanan ΔC_T ve tüm internal kontrol için hesaplanan ΔC_T farkı çıkarılarak (ΔC_T hedef - ΔC_T internal kontrol) - (ΔC_T meta kontrol - ΔC_T internal kontrol) $\Delta\Delta C_T$ değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan $\Delta\Delta C_T$ değeri logaritma 2 tabanında ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) hesaplanmış ve bulunan değer Ln tabanında logaritması alınarak ($\ln 2^{-\Delta\Delta C_T}$) kat değişim değeri bulunmuştur (83). Daha önce yapılan DNA, mRNA ve miRNA ekspresyon seviyelerinin saptanmasında kullanılan Livak formülü hesaplamaları doku ve hücre kültürü çalışmalarında uygulanmıştır. Bu yüzden daha önce yapılan doku çalışmalarında sağlam doku ve hücre kültüründe sağlam hücre hatlarının karşılaştırılması ile Livak formülünün uygulanabilirliği bu çalışmaya göre daha elverişlidir. Bu çalışmada Livak formülünü uygulayabilmek için yapılması gereken miRNA ekspresyon seviyesi incelenecek grubun hem meta kontrol grubu hem de tüm internal kontrol grubuna ait ΔC_T değerlerinin karşılaştırılmasıdır.

Çalışmamızda gerçek zamanlı PZR sonucu elde ettiğimiz Ct değerleri ile yapılan hesaplamalar sonucu miRNA 223 ifade düzeyi ΔC_T , $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve $\ln 2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri cinsinden elde edildi. miRNA 223 ekspresyon seviyesi HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde ve altında olan iki grup arasında istatistiksel analizler

yapılarak karşılaştırıldı. Yapılan student t test analiz sonucuna göre çalışmada ele alınan iki grup arasında miRNA 223 ifade düzeyinde herhangi bir anlamlılık görülmemiştir. Student t test sonucu herhangi bir anlamlılık bulunmamasına rağmen yapılan Alıcı İşletim Karakteristiği (ROC) analizi ile hasta ve kontrol olarak kabul edilen iki grup için miRNA 223'ün biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı analiz edilmiştir. Student t test analizinde iki grup arasında karşılaştırma yapılırken ortalama değerler ile analiz yapılırken ROC analizinde tüm değerler birbiriyle kıyaslanır ve böylece ortalama değer içinde göze batmayan yanlış negatif ya da yanlış pozitif değerlerin de değerlendirilmesi yapılmış olur. Bu nedenle ROC analizinin yapılması laboratuvar test sonuçlarının kalitesini ve gerçekliğini arttırmaktadır. ROC eğrisinde x eksenini ile 'duyarlılık' (yanlış negatif) ve y eksenini ile 'seçicilik' (yanlış pozitif) gösterilmektedir. Yapılan testte elde edilen ROC eğrisi ne kadar yukarıda ve sola doğru ise tanı testinin o kadar iyi olduğu söylenebilir. ROC eğrisi çizildikten sonra eğrinin altında kalan alan (AUC = Area Under Curve) değeri ne kadar yüksek ise (ne kadar 1'e yakın ise) tanı testinin o kadar başarılı olduğu kabul edilir. ROC analizi özellikle tıp alanında yanlış pozitif ve yanlış negatiflikleri ortaya koyduğu için, ve biyobelirteç belirlemek üzere oldukça önem taşıyan istatistiksel bir analiz olarak kabul edilir (100).

Çalışmamızda yapılan miRNA 223 ΔC_T ROC eğrisinde AUC 0,504 olarak hesaplanmış ve istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir. miRNA kat değişim ROC eğrisinde ise AUC yine 0,504 olarak hesaplanmış ve istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır. ROC analizi sonucunda miRNA 223'ün HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında olup patolojik durum olarak kabul edilen grup ve HDL seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde olup kontrol olarak kabul edilen grup için uygun bir biyobelirteç olmadığı gösterilmiştir.

Biyobelirteç olarak kullanılan kavram hastalıkların erken teşhis ve bazı hastalıklar için tedavi yöntemi olarak kullanılacak rehberler olarak tanımlanmaktadır (101). Bir molekülün ideal bir biyobelirteç olarak kabul edilebilmesi için 3 temel koşulu sağlaması gerekmektedir. İlk olarak analiz edilecek örneğin serum, plazma ya da idrar gibi invaziv olmayan yöntemlerle alınması gerekmektedir. İkinci koşul analiz edilecek molekülün yarılanma ömrünün uzun olması gerektiğidir. Üçüncü ve son koşul ise analiz yönteminin güvenilirliğinin yüksek olması ve kısa sürede sonuç verebilecek bir yöntem

olmasıdır (101). Biyobelirteç olarak kullanılan moleküllerden en yaygın olanları proteinler ve polipeptidler olmakla birlikte özellikle son yıllarda miRNA'ların da bir çok hastalık için biyobelirteç olarak kullanılabilceği düşünölmeye başlanmış ve miRNA'lar ile yapılan çalışmalar önemli derecede artmıştır. miRNA'ların başta kanser olmak üzere, koroner arter hastalıkları, ateroskleroz ve diğer çeşitli hastalıkların tanısında ve tedavisinde kullanılabilcek biyobelirteçler olabileceği görüşü gün geçtikte artmaktadır (102).

Dünya geneline bakıldığında önde gelen ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda kardiyovasköler hastalıklar (KVH) bulunmaktadır. Ateroskleroza neden olan en önemli risk faktörleri ise plazmada bulunan LDL ve HDL kolesterol seviyeleridir (103,104). Son yıllarda yapılan çalışmalar doğrultusunda miRNA'ların dolaşımda bulunan lipidleri düzenlediği ve kardiyovasköler hastalıkların riskini etkileyerek KVH için biyobelirteç olarak kullanılabilceği düşünölmektedir (105-110). Plazma kolesterol seviyelerini düzenleyen miRNA'ların sayısı, miRNA 223 de dahil olmak üzere gün geçtikçe artmaktadır.

HDL molekölü dokulardan ve hücrelerden aldığı kolesterolü karaciğere taşıyarak ters kolesterol taşınmasını karaciğerde bulunan Scavenger reseptörü (SRB1) yoluyla gerçekleştirir. Vickers ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2014) (111) miRNA223'ün kolesterol biyosentezini gerçekleştiren genleri (HMGS1, SC4MOL) baskılayarak kolesterol sentezini durdurduğu ve SRB1 genini baskılayarak karaciğere HDL alımını düşürdüğu gösterilmiştir. Aryal ve arkadaşlarının yaptığı çalışma (2017) (106) ile de Vickers ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı destekleyen sonuçlar ile SRB1 reseptörünün miRNA 223 ve bazı miRNA'lar tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Özellikle miRNA 223 ve SRB1 reseptörünün düzenlenmesinde görev alan miRNA'ların aşırı ekspresyonunun karaciğer hücrelerinde SRB1 reseptörünün ekspresyon seviyesini azaltarak HDL alımını düşürdüğu saptanmıştır. Fareler üzerinde yapılan miRNA 223 geninin susturulması ile hepatik SRB1 reseptörünün ekspresyon seviyesinin ve farelerin plazma HDL seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir (112,113).

Vegter ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (2017) (114) ise dolaşımda bulunan miRNA 223'ün kalp yetmezliği ve ateroskleroz hastalarındaki seviyesi ile sağlıklı bireylerdeki seviyesi karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucu ise

kalp yetmezliği bulunan bireylerde sağlıklı bireylere kıyasla dolaşımdaki miRNA 223 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak dolaşımdaki miRNA 223 seviyesi ateroskleroz ile ilişkilendirildiğinde, miRNA 223 seviyesinin aterosklerozun ilerleme derecesine göre değiştii ve ateroskleroz derecesi ilerledikçe azaldığı rapor edilmiştir. Ayrıca daha önce yapılmış Vegter ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaları destekler nitelikte olan bir çok çalışma ile, miRNA 223 ifade düzeyinin obezite, insülin direnci, Tip 2 diabet, ateroskleroz ve inflamatuvar bozukluklar gibi birçok kardiyometabolik hastalıkta değişebiledeği savı ileri sürülmüştür (115-117).

Schulte ve arkadaşlarının 2015'te (118) büyük bir koroner arter hasta topluluğu ile yaptığı çalışmada, miRNA 223 ve miRNA 197'nin miktarının ve ekspresyon seviyesinin kardiyovasküler ölümlerin öngörülmesinde ve ileride karşılaşılabilecek kardiyovasküler hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir. Buna ek olarak, akut koroner sendrom hastaları için alt grup analizi yapılarak yükseltilmiş miRNA 223 ve miRNA 197 seviyeleri ile gelecekteki kardiyovasküler ölüm arasında kuvvetli bir ilişki ortaya koyulmuştur.

Çalışmamızda amaçlanan miRNA 223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması ve HDL'ye bağlı metabolik bozukluklarda miRNA 223'ün biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağı olmakla birlikte, kolesterol ve lipid metabolizması bir bütün olarak düşünölmelidir. Bu görüş doğrultusunda çalışmamızda, elde edilen miRNA 223 ifade düzeylerinin tüm lipid değerleriyle ve buna ek olarak vücut kitle indeksi ve vücut yüzey alanı ile olan korelasyonlarına Pearson korelasyon testi ile bakılmış ve korelasyonların pozitif ya da negatif olduğu korelasyon doğru grafikleri ile gösterilmiştir.

HDL taşıyan miRNA'ların ilk kez 2013 yılında bağımsız doğrulama yöntemi kullanılarak Wagner ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmaları gösterilmiştir (45). Bu çalışmada kullanılan kantitatif PZR ile (qPCR) insan HDL'sinde miRNA 223 bulunduğunu doğrulanmıştır. Bu yöntem ile insan HDL'sinin 1 µg'ında 10,000 kopyadan fazla miRNA 223 olduğu saptanmıştır. Ayrıca, HDL-miRNA 223 seviyesinin total plazma miRNA'larının yaklaşık 8%'ini oluşturduğu bildirilmiştir. Wagner ve arkadaşları aynı çalışmayı insan LDL'sini kullanarak da yapmışlardır, ve sonuç olarak

miRNA 223'ün LDL'de bulunan diğer miRNA'lara göre daha fazla miktarda olduğunu bildirmişlerdir. Ancak, LDL'de bulunan miRNA 223 1 µg'da yaklaşık 1500 kopya olarak HDL'de bulunan miktarına göre oldukça düşük seviyede saptanmıştır (45).

Bu çalışmada miRNA 223 ekspresyon seviyesinin plazma kolesterol, trigliserid, LDL, HDL ve VLDL ile olan korelasyonlarına bakıldığında da daha önce yapılan çalışmaları destekler nitelikte tüm lipid değerleri ile ilişkili olduğu Pearson korelasyon testi ile gösterilmiştir.

HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'nin üstünde olup kontrol olarak kabul edilen bireylerde miRNA 223 Ct değerleri ile HDL kolesterol seviyesi arasında pozitif korelasyon görülmüştür. Ct değerinin yüksek olması miRNA 223 ekspresyon seviyesinin düşük olduğunu ifade etmektedir. Ct değeri ve HDL seviyesi arasındaki pozitif ilişki, miRNA ekspresyon seviyesinin düşük olmasının plazma HDL kolesterol seviyesinin artışına neden olduğunu göstermektedir. Daha önce bir kaç grubun yapmış olduğu çalışma ile gösterilen, farelerde miRNA 223 geninin susturulması ile hepatik SRB1 ve plazma HDL seviyesinin artışı (112,113) çalışmamızı destekler niteliktedir. miRNA 223 ΔC_T değerleri ile LDL kolesterol seviyesi arasında da negatif korelasyon, kat değişimi ile LDL seviyesi arasında ise pozitif korelasyon saptanmıştır.

Ayrıca miRNA 223'ün obezite ile de ilişkili olduğu ve ifade düzeyinin obeziteye bağlı olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda miRNA 223 ekspresyon seviyesinin obezite tanısında dikkat edilen vücut kitle indeksi ve vücut yüzey alanı ile ilişkisine bakıldığında da Ct ve ΔC_T değerleri ile korelasyonlarının olduğu istatistiksel analizler ile gösterilmiştir.

HDL kolesterol seviyesi 40 mg/dl'nin altında olup hasta olarak kabul edilen bireylerde miRNA 223'ün Livak formülüne ($2^{(-\Delta\Delta C_T)}$) göre hesaplanan kat değişimi ile plazma kolesterol ve LDL arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ hesabına göre miRNA 223 ekspresyon seviyesinin yüksek olması plazma kolesterol ve LDL seviyesinin düşmesine neden olmaktadır.

SONUÇ OLARAK DİYEYEBİLİRİZ Kİ;

Bu tez çalışması sonucu elde ettiğimiz verilere göre miRNA 223 ifade düzeyi HDL seviyesi 40 mg/dl'nin altında olan ve hasta olarak kabul edilen grup için ateroskleroz, koroner arter hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklar için ayırt edici bir biyobelirteç olarak kullanılmamakla birlikte, miRNA 223 ifade düzeyi ile plazma kolesterol düzeyi, LDL kolesterol düzeyi ve HDL kolesterol düzeyi arasında pozitif ya da negatif korelasyonlar olduğu gösterilmiştir.

Yapılan çalışmanın hasta ve kontrol olarak kabul edilen gruptaki birey sayısının artırılarak yapılması, miRNA 223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesine etkisinin araştırılması üzerine daha etkili olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1) Krishnan, M.N. Coronary heart disease and risk factors in India – On the brink of an epidemic? *Indian Heart J*, 2012. **64**(4): 364-367.
- 2) Onat A, Uğur M, Çiçek G, Ayhan E, Doğan Y, Kaya H, Can G. TEKHARF 2009 taraması: Kırsal kesim ve kentlerde benzer kardiyovasküler ölüm riski. *Türk Kardiyol Dern Arş*, 2010. **38**(3):159-163.
- 3) Ninova, M. Ronshaugen, M and Griffiths-Jones, S. miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *PLoS One*, 2015. **10**(12): e0145930.
- 4) Brevini, T.A. Pennarossa, G. Manzoni E.F. Gandolfi, C.E. Zenobi, A. and Gandolfi, F. The quest for an effective and safe personalized cell therapy using epigenetic tools. *Clin Epigenetics*, 2016. 8: 119.
- 5) Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001. 294: p. 853–858.
- 6) Lau, N.C. Lim, L.P. and Weinstein, E.G. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001. 294: p. 858–862.
- 7) Lee, R.C. and Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001. 294: p. 862–864.
- 8) Lee, R.C. Feinbaum, R.L. and Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993. 75: p. 843–854.
- 9) Du, T. and Zamore, P.D. Beginning to understand microRNA function. *Cell Res*, 2007. 17: p. 661–663.
- 10) Lewis, B.P. Burge, C.B. and Bartel, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005. 120: p. 15–20.
- 11) Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004. 16;431(7006): 350-5.

- 12) Rodriguez, A. Griffiths-Jones, S. Ashurst, J.L. and Bradley, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 2004. 14: p. 1902–1910.
- 13) Mourelatos, Z. Small RNAs: The seeds of silence. *Nature*, 2008. 455: p. 44–45.
- 14) Saini, H.K. Griffiths-Jones, S. and Enright, A.J. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104: p. 17719–17724.
- 15) Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 2005; 433: p. 769-773.
- 16) Claverie, J.M. Fewer genes, more noncoding RNA. *Science*, 2005. 309: p. 1529–1530.
- 17) Lewis, B.P. Shih, I.H. Jones-Rhoades M.W. Bartel, D.P. and Burge, C.B. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, 2003. **115(7)**: p. 787–798.
- 18) Pasquinelli, A.E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*, 2012. 13: p. 271–282.
- 19) Etheridge, A. Lee, I. Hood, L. Galas, D. and Wang, K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res*. 2011. **717(1-2)**: p. 85-90.
- 20) Barca-Mayo O. and Lu, Q.R. Fine-Tuning Oligodendrocyte Development by microRNAs. *Front Neurosci*, 2012. 6: p. 6-13.
- 21) Lee, Y. Ahn, C. Han, J. Choi, H. Kim, J. Yim, J. Lee, J. Provost, P. Rådmark, O. Kim, S. and Kim, V.N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003. **425(6956)**: p. 415-419.
- 22) Lund, E. Güttinger, S. Calado, A. Dahlberg, J.E. and Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004. **303(5654)**: p. 95-98
- 23) Krol, J. and Krzyzosiak, W.J. Structural aspects of microRNA biogenesis. *IUBMB Life*, 2004. **56(2)**: p. 95-100.
- 24) Gregory, R.I. Chendrimada, T.P. Cooch, N. and Shiekhattar, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 2005. 123: p. 631-40.

- 25) Hammond, S.M. Boettcher, S. Caudy, A.A. Kobayashi, R. and Hannon G.J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 2001. 293: p. 1146–1150.
- 26) Preall, J.B. Sontheimer, E.J. RNAi: RISC gets loaded. *Cell*, 2005. 123: p. 543–545.
- 27) Kim, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6: p. 376-85.
- 28) Rottiers, V. and Näär, A.M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. 13: p. 239-50. (Review)
- 29) Moore, K.J. Rayner, K.J. Suárez, Y. and Fernández-Hernando, C. micro- RNAs and cholesterol metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 2010. 21: p. 699-706. (Review)
- 30) Norata, G.D. Sala, F. Catapano, A.L. and Fernández-Hernando, C. Micro-RNAs and lipoproteins: a connection beyond atherosclerosis? *Atherosclerosis*, 2013. 227: p. 209-15. (Review)
- 31) Horie T, Ono K, Horiguchi M, et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107: p. 17321- 6.
- 32) Li, T. Morgan, M.J. Choksi, S. Zhang, Y. Kim, Y.S and Liu Z.G. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NFkappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nat Immunol*, 2010. 11(9): p. 799-805.
- 33) Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*, 2008; 451(7182): p. 1125–1129.
- 34) Vickers KC, Shoucri BM, Levin MG, et al. MicroRNA-27b is a regulatory hub in lipid metabolism and is altered in dyslipidemia. *Hepatology*, 2013; 57(2): p. 533–542.
- 35) Taïbi, F. Meuth, V.M. Massy, Z.A. and Metzinger, L. miR-223: An inflammatory oncomiR enters the cardiovascular field. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014. p. 1001-1009.
- 36) Fukao T, Fukuda Y, Kiga K, et al. An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell*, 2007; 129(3): p. 617–631.

- 37) Wu L, Li H, Jia CY, et al. MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation. *FEBS Lett*, 2012; **586**(7): p. 1038–1043.
- 38) Wong QW, Lung RW, Law PT, et al. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology*, 2008; **135**(1): p. 257–269.
- 39) Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*, 2010; **328**(5985): p. 1570–1573.
- 40) Vickers, K.C. and Remaley, A.T. MicroRNAs in atherosclerosis and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2010. **17**(2): p. 150–155.
- 41) Vickers KC, Landstreet SR, Levin MG, et al. MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014; **111**(40): p. 14518–14523
- 42) Novák, J. Bienertová-Vašku, J. Kára, T. and Novák, M. MicroRNAs Involved in the Lipid Metabolism and Their Possible Implications for Atherosclerosis Development and Treatment. *Mediators of Inflammation*, 2014. p. 1-14.
- 43) Canfrán-Duque, A. Lin3, C.S. Goedeke, L. Suárez, Y. and Fernández-Hernando, C. microRNAs and HDL Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(6): p. 1076–1084.
- 44) Tabet F, Vickers KC, Cuesta Torres LF, et al. HDL-transferred microRNA- 223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nat Commun*, 2014; **5**: p. 3292.
- 45) Wagner J, Riwanto M, Besler C, et al. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013; **33**: p. 1392–1400.
- 46) Ono, K. Horie, T. Nishino, T. Baba, O. Kuwabara, Y. and Kimura, T. MicroRNAs and High-Density Lipoprotein Cholesterol Metabolism. *Int Heart J*, 2015. **56**(4): p. 1-5.
- 47) Ono, K. Horie, T. Nishino, T. Baba, O. Kuwabara, Y. and Kimura, T. MicroRNAs and High-Density Lipoprotein Cholesterol Metabolism. *Int Heart J*, 2015. **56**(4): p. 5.
- 48) Cheng, A.Y. and Leiter, L.A. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Curr Opin Cardiol*, 2006. **21**: p. 400-404. (Review)

- 49) Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *J Am Coll Cardiol*, 2004; 44: p. 720-32. (Review)
- 50) Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 2004; 350: p. 1495-504.
- 51) LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med*, 2005; 352: p. 1425-35.
- 52) Harvey, R.A., Ph. D. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. Wolters Kluwer Health: Philadelphia, 2011. Print.
- 53) McDonald, J.G. Smith, D.D Stiles, A.R. and Russell D.W. A comprehensive method for extraction and quantitative analysis of sterols and secosteroids from human plasma. *Journal of Lipid Research*, 2012. 53: p. 1399-1409.
- 54) Lehninger, A.L. Nelson, D.L. and Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th ed. Worth Publishers: New York; (2000). p. 859-864.
- 55) Baynes, J. *Medical Biochemistry*. 3rd ed. London: Elsevier Mosby, 2009. p. 653
- 56) Lossow, W.J. Lindgren, F.T. Murchio, J.C. Stevens, G.R. and Jensen, L.C. Particle size and protein content of six fractions of the Sf >20 plasma lipoproteins isolated by density gradient centrifugation. *The Journal of Lipid Research*, 1969. 10: p. 68-76.
- 57) Olivecrona, T. and Bengtsson-Olivecrona, G. Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol*, 1990. 1: p. 222–230.
- 58) Zambon, A. Hokanson, J.E. Brown, B.G. and Brunzell, J.D. Evidence for a new pathophysiological mechanism for coronary artery disease regression: hepatic lipase-mediated changes in LDL density. *Circulation*, 1999. 99: p. 1959–1964.
- 59) Rousset X, Vaisman B, Amar M, et al. Lecithin: cholesterol acyltransferase-from biochemistry to role in cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009; 16: p. 163–171.
- 60) Applebaum-Bowden, D. Lipases and lecithin:cholesterol acyltransferase in the control of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 1995. 6: p. 130–135.

- 61) Hesler, C.B. Swenson, T.L. and Tall, A.R. Purification and characterization of a human plasma cholesterol ester transfer protein. *J Biol Chem*, 1987. 262: p. 2275 – 2282.
- 62) Dominiczak, M.H. and Caslake, M. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem*, 2011; 48: p. 498–515.
- 63) Ramasamy, I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med*, 2014. **52**(12): p. 1695-1727.
- 64) Textbook of Medical Biochemistry, 5th ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd: New Delhi, 2002.
- 65) Libby, P. Inflammation In Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. 32: p. 2045-2051.
- 66) Mahley, R.W. Weisgraber, K.H. and Huang, Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res*. 2009. 50 Suppl:S183-8.
- 67) Griffin B, Freeman DJ, Tait GW, et al. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis*, 1994; **106**(2): p. 241-53.
- 68) Weber, C. and Noels, H. Atherosclerosis: Current Pathogenesis And Therapeutic Options. *Nat Med*, 2011. 17: p. 1410-1422.
- 69) Mahley, R.W. Innerarity, T.L. Rall, S.C. and Weisgraber, K.H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*, 1984. **25**(12): p. 1277-1294.
- 70) Kontush, A. Chantepie, S. and Chapman, M.J. Small, dense HDL particles exert 137 potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(10): p. 1881-1888.
- 71) Asztalos, B.F. High-density lipoprotein particles, coronary heart disease, and niacin. *Journal of Clinical Lipidology*, 2010. 4: p. 405-410.
- 72) Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy finding. *Am J Cardiol*, 1986; 57: p. 450-458.
- 73) Gerszten Re, Rosenzweig A. Coronary Atherosclerosis In: *Principles Of Molecular Medicine*. Chicago: Humanna Press Edited By Jamesson JI; 1998.

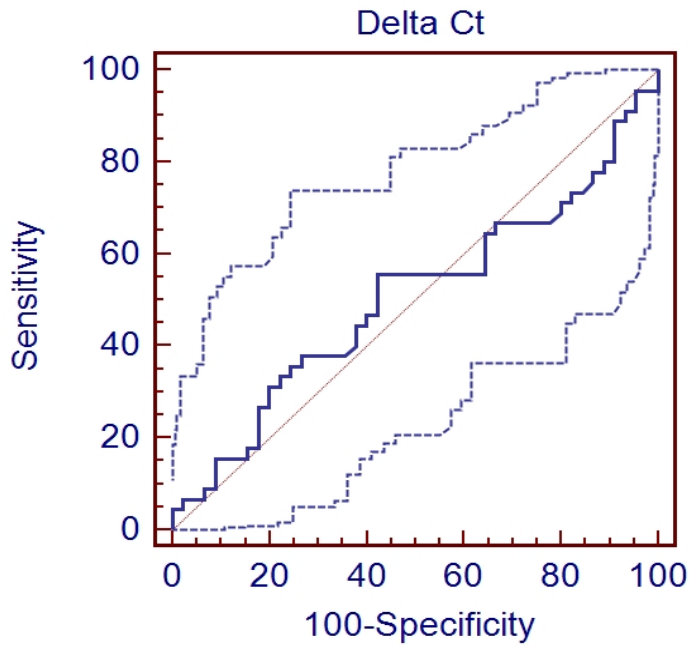
- 74) Wang, T. Palucci, D. Law, K. Yanagawa, B. Yam, J. and Butany, J. Atherosclerosis: Pathogenesis And Pathology. *Diag Histopathol*, 2012. 18: p. 461-467.
- 75) Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest*, 2011; 121: p. 2921-31.
- 76) Spronk, H.M.H. Voort, D. and Cate, H. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. *Thrombosis Journal*, 2004. 2(12): p. 4.
- 77) Moss, J. and Ramji, D.P. Nutraceutical therapies for atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*, 2016. 13(9): p. 513-532.
- 78) <https://www.tkd.org.tr>
- 79) Witt, S. Neumann, J. Zierdt, H. Gebel, G. and Röscheisen, C. Establishing a novel automated magnetic bead-based method for the extraction of DNA from a variety of forensic samples. *Forensic Sci Int Genet*, 2012. 6(5): p. 539-547.
- 80) Li, X. Wu, Y. Zhang, L. Cao, Y. Li, Y. Li, J. Zhu, L. and Wu, G. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem*, 2014. 451: p. 18-24.
- 81) Page K, Guttery DS, Zahra N, et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *Plos One*, 2013; 8(10): e77963.
- 82) Li, X. Ben-Dov, I.Z. Mauro, M. and Williams, Z. Lowering the quantification limit of the Qubit™ RNA HS assay using RNA spike-in. *BMC Mol Biol*, 2015. 6: p. 16-19.
- 83) Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-408.
- 84) Moret I, Sánchez-Izquierdo D, Iborra M, et al. Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *Plos One*, 2013; 8(12): e82753.
- 85) Forey, B. Fry1, J. Lee, P. Thornton, A. and Coombs, K. The effect of quitting smoking on HDL-cholesterol - a review based on within-subject changes. *Biomarker Research*, 2013. 1(26): p. 1-12.
- 86) Craig, W.Y. Palomaki, G.E. and Haddow J.E. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *BMJ*, 1989. 298: p. 784–788.

- 87) US Surgeon General: The health benefits of smoking cessation. A report of the Surgeon General: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Rockville, Maryland: Office on Smoking and Health; 1990. DHHS Publication No. (CDC) 90-8416. <http://www.surgeongeneral.gov/library/reports/index.html>.
- 88) US Surgeon General: The health consequences of smoking. A report of the Surgeon General. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2004. <http://www.surgeongeneral.gov/library/reports/index.html>.
- 89) Maeda, K. Noguchi, Y. and Fukui, T. The effects of cessation from cigarette smoking on the lipid and lipoprotein profiles: a meta-analysis. *Prev Med*, 2003. 37: p. 283-290.
- 90) Mahley RW, Palaoğlu KE, Atak Z, et al. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J Lipid Res*, 1995; 36(4): p. 839-59.
- 91) Castelli, W.P. Abbott, R.D. and McNamara, P.M. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation*, 1983. 67(4): p. 730-4.
- 92) Castelli, W.P. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis*, 1996 Jul;124 Suppl:S1-9. Review.
- 93) Gregory, R.I. and Shienkhattar, R. MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(9): p. 3509-3512.
- 94) Cheng, A. Byrom, M.W. Shelton, J. and Ford, L.P. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acid Res*, 2005. 33: p. 1290-1297.
- 95) Xu, P. Guo, M. and Hay, B.A. MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends Genet*, 2004. 20: p. 617-624.
- 96) Karp, X. and Ambros, V. Developmental biology, encountering microRNAs in cell fate signaling. *Science*, 2005. 310: p. 1330-1333.
- 97) Chen, C. Li L., Lodish, H.F. and Bartel D.P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004. 303: p. 83-85.

- 98) Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic-islet specific miRNA regulates insulin secretion. *Nature*, 2004; 432: p. 226–230.
- 99) Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002; 99: p. 15524–15529.
- 100) Metz, C.E. ROC analysis in medical imaging: a tutorial review of the literature. *Radiol Phys Technol*, 2008. 1(1): p. 2-12.
- 101) Min, P.K. and Chan, S.Y. The biology of circulating microRNAs in cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest*, 2015. 45(8): p. 860-874.
- 102) Pilbrow AP, Cordeddu L, Cameron VA, et al. Circulating miR-323-3p and miR-652: candidate markers for the presence and progression of acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*, 2014; 176(2): p. 375-385.
- 103) Glass, C.K. and Witztum, J.L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 2001. 104: p. 503–516.
- 104) Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature*, 2000. 407: p. 233–241.
- 105) Canfran-Duque, A. Ramirez, C.M. Goedeke, L. Lin, C.S. and Fernandez-Hernando, C. MicroRNAs and HDL life cycle. *Cardiovasc Res*, 2014. 103: p. 414–422.
- 106) Aryal, B. Singh, A.K. Rotllan, N. Price, N. and Fernandez-Hernando, C. MicroRNAs and lipid metabolism. *Lipid Metabolism*, 2017. 28: p. 1-8.
- 107) Horie T, Ono K, Horiguchi M, et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107: p. 17321–17326.
- 108) Marquart, T.J. Allen, R.M. Ory, D.S. and Baldan, A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010. 107: p. 12228–12232.
- 109) Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328:1566–1569.
- 110) Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*, 2010; 328:1570–1573.

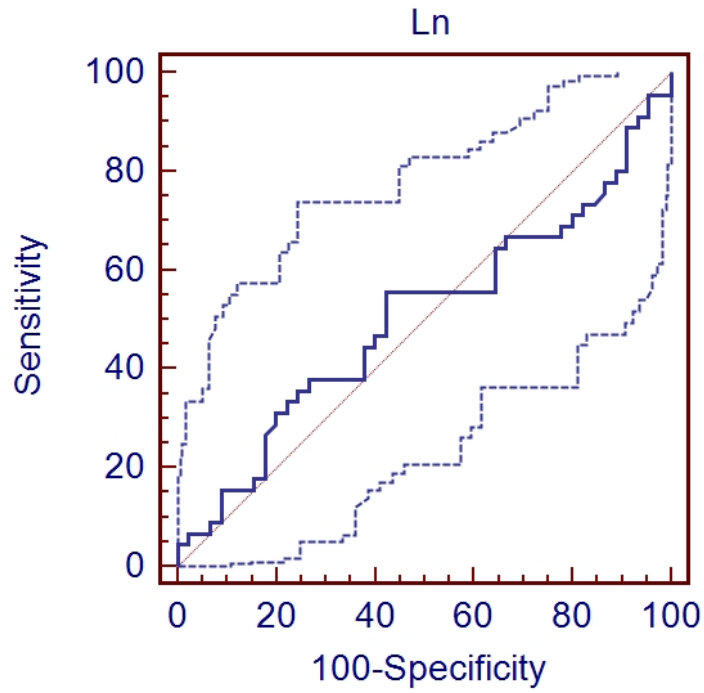
- 111) Vickers KC, Landstreet SR, Levin MG, et al. MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014; 111: p. 14518–14523.
- 112) Hu, Z. Shen, W.J. Kraemer, F.B. and Azhar, S. MicroRNAs 125a and 455 repress lipoprotein-supported steroidogenesis by targeting scavenger receptor class B type I in steroidogenic cells. *Mol Cell Biol*, 2012. 32: p. 5035–5045.
- 113) Wang L, Jia XJ, Jiang HJ, et al. MicroRNAs 185, 96, and 223 repress selective high-density lipoprotein cholesterol uptake through posttranscriptional inhibition. *Mol Cell Biol*, 2013; 33: p. 1956–1964.
- 114) Vegter EL, Ovchinnikova ES, van Veldhuisen DJ, et al. Low circulating microRNA levels in heart failure patients are associated with atherosclerotic disease and cardiovascular-related rehospitalizations. *Clin Res Cardiol*, 2017; **106**(8): p . 598-560.
- 115) Vickers, K.C. Palmisano, B.T. Shoucri, B.M. Shamburek, R.D. and Remaley, A.T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 2011. 13: p. 423-433.
- 116) Haneklaus, M. Gerlic, M. O'Neill, L.A. and Masters, S.L. miR-223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med*, 2013. 274: p. 215-26.
- 117) Chuang TY, WuHL, ChenCC, et al. MicroRNA-223 expression is upregulated in insulin resistant human adipose tissue. *J Diabetes Res*, 2015; 2015: 943659.
- 118) Schulte C, Molz S, Appelbaum S, et al. miRNA-197 and miRNA-223 predict cardiovascular death in a cohort of patients with symptomatic coronary artery disease. *PLoS One*, 2015; 10: e0145930.
- 119) Yu, C.H. Xu, C.F. and Li, Y.M. Association of MicroRNA-223 expression with hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Dig Dis Sci*, 2009. **54**(11): p. 2362–2366.

HAM VERİLER
ROC Analizleri ΔC_t



Variable	Delta_Ct
	Delta Ct
Classification variable	Diagnosis
Positive group	
Diagnosis	= 1
Sample size	45
Negative group	
Diagnosis	= 0
Sample size	45
Disease prevalence (%)	unknown
Area under the ROC curve (AUC)	0,504
Standard Error	0,0612
95% Confidence Interval	0,397 to 0,611
z statistic	0,0646
Significance level P (Area=0.5)	0,9485

ROC Analizleri Kat Değişim



Variable	Ln
Classification variable	Diagnosis
Positive group	
Diagnosis	= 1
Sample size	45
Negative group	
Diagnosis	= 0
Sample size	45
Disease prevalence (%)	unknown
Area under the ROC curve (AUC)	0,504
Standard Error	0,0612
95% Confidence Interval	0,397 to 0,611
z statistic	0,0686
Significance level P (Area=0.5)	0,9453

FORMLAR

	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ OLGU RAPOR FORMU
--	---

1. ÇALIŞMANI ADI: MİRNA-223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması

<p>ÇALIŞMAYA / ARAŞTIRMAYA DAHİL <u>EDİLME</u> KRİTERLERİ</p> <p>Deney Grupları için;</p> <ul style="list-style-type: none">• Gönüllü Olma• Ateroskleroz Hastası Olma• 18 – 85 yaş aralığında olma• Yukarıda belirtilenler haricinde bir hastalığa sahip olmama <p>Kontrol Grubu için ;</p> <ul style="list-style-type: none">• Gönüllü olma• Sağlıklı olma (yukarıda belirtilenlerde dahil olmak üzere hiçbir hastalığa sahip olmama)• 18 – 85 yaş aralığında olma
<p>ÇALIŞMAYA / ARAŞTIRMAYA DAHİL <u>EDILMEME</u> KRİTERLERİ</p> <ul style="list-style-type: none">• Gönüllü olmama• 18 – 85 yaş aralığı dışında olma• Yukarıda belirtilenler dışında bir hastalığa sahip olma

Sorumlu Araştırmacı

OLGU RAPOR FORMU

Adı Soyadı :
Yaş :
Cinsiyet :
Boy :
Kilo :
Şikayeti :
Tanısı :
ASA :

Randomizasyon Sayısı:

VAS Skoru
Geliş :
Redüksiyon :

Sedasyon Derinliği

- Sedasyon yok, anksiyöz
- Uyanık ,sakin-konuşuyor
- İyi sedatize, konuşması peltek

Ek Sedasyon gereksinimi oldu mu ?

Evet / Hayır

Evet ise ne kadar (mg) uygulandı?

Sedasyon Başlama Süresi

Derlenme Süresi :
Taburculuk Süresi :

Hipoksi (Sat O₂<%95) gelişti mi ?

- EVET Kaç saniye/dk : Oksijen verildi mi: Evet / Hayır
- HAYIR Entübasyon yapıldı mı: Evet / Hayır

Yan etkiler:

- Bulantı / Kusma / Halusinasyon / Solunum depresyonu / Aritmi / Diğer

Hasta memnuniyeti: Çok iyi / İyi / Orta / Kötü / Çok kötü

Uygulayıcı memnuniyeti: Çok iyi / İyi / Orta / Kötü / Çok kötü

	TA (mmHg)	Nabız(vr/dk)	End Tidal CO ₂	O ₂ Sat (%)
Geliş				
0. dk				
5. dk				
10. dk				
30. dk				
60. dk				
90. dk				
120. dk				

AGREEMENT FOR TRANSFER OF BIOLOGICAL MATERIAL TO BE USED IN
CLINICAL TRIALS

Full name of the clinical trial:

Protocol code :

Summary of the clinical trial:

Click here on enter text

By this agreement, the investigator and the institution who send the biological material requires the CONSIGNEE and CONSIGNOR to agree on the below terms before sending (Specify biological material type and amount) which shall be used for to be dispatched to the address of

1. Delivered biological materials shall be used only for the above-mentioned purposes. CONSIGNEE shall use those materials only for secondary purposes, which are initially approved by the CONSIGNOR in written.
2. Prior to the dispatch of the biological materials to the CONSIGNEE, Turkish Medicines and Medical Devices Agency and Ethics Committee approved informed consent forms, which belong to the persons for whom the biological material is provided, should be obtained. This consent form should explain all the purposes of use of the biological samples.
3. CONSIGNEE cannot provide the biological material to the third parties without prior written approval of the CONSIGNOR.
4. Biological materials shall be dispatched by the CONSIGNOR to the CONSIGNEE without the identity or any descriptive information of the individuals.
5. CONSIGNEE shall use the biological materials in accordance with as the United Nations Human Genome and Universal Declaration of Human Rights.
6. CONSIGNEE acknowledges and agrees that the biological materials to be dispatched under this agreement shall be utilized for research purposes and have some risks associated with their usage. Appropriate preventive actions should be taken for those risks.
7. CONSIGNOR and CONSIGNEE shall mutually agree that the biological materials cannot be used as a source for any commercial profit and the rights relating to a joint publication or a patent right that may arise may be the only exception for that. CONSIGNOR and CONSIGNEE shall mutually agree on those rights prior to trial initiation.
8. CONSIGNEE agrees to return or dispose of all materials and to evidence such acts accordingly in the event of termination of the agreement or withdrawal of written consent of the volunteer referred in item 2.
9. This agreement shall be terminated in the event of, termination of the trial, violation on the terms of related regulations or noncompliance with agreement clauses of either of the parties.
10. CONSIGNEE and CONSIGNOR shall be responsible from the execution of this Agreement and performances hereunder. In case of conflict, both countries of the parties' courts are authorized.

KLİNİK ARAŞTIRMALARDA KULLANILACAK BİYOLOJİK MATERYAL
TRANSFER ANLAŞMASI

Araştırmanın Açık Adı : **MIRNA-223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması**

Protokol Numarası :

Araştırmanın Özeti :

MikroRNA (miRNA, miR) yaklaşık 18-25 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli, protein kodlamayan RNA molekülü türüdür ve neredeyse her organizmada bulunur. miRNA'lar, spesifik mRNA'ların dizilerinin tamamlayıcılığına göre 3' çevrilmemiş bölgeye (UTR) bağlanır ve translasyonu engeller veya mRNA parçalanmasını teşvik eder. İnsanlarda protein kodlayan genlerin %60'ından fazlası, miRNA'lara eşlik etmeyi sürdürmek için seçici bir baskı altındadır. Bugüne kadar, insanlarda yaklaşık 2.500 miRNA tespit edilmiştir. miRNA'ların fizyolojik ve patolojik durumlarda birçok işlevi vardır ve bazı miRNA'ların lipid homeostazi üzerinde önemli bir etkisi olduğu gösterilmiştir. MiR-223'ün daha önce monosit farklılaşmasını kontrol ettiği ve birden fazla enflamatuvar geni düzenlediği bulunmuştur. Bununla birlikte monositlerde ve makrofajlarda miR-223'ün ayrıca kolesterol homeostazi ile ilişkili birçok geni düzenlediği de gösterilmiştir. miRNA'ların plazma kolesterol seviyelerine olan etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) yaklaşık olarak %30 fosfolipidlerden, %25 kolesterolden ve %5 trigliseridlerden oluşur. Daha büyük sferik yapıdaki HDL partikülleri kolesterol ester (CE) ve trigliseridin hidrofobik çekirdeğini içerirken, disk şeklindeki HDL partikülleri ise apolipoproteinA-I (apoA-I), fosfolipid ve serbest kolesterolden oluşur. Yapılan çalışmalarda ve TargetScan (targetscan.org) ve miRanda (microrna.org) gibi biyoinformatik çalışmaların yer aldığı veri tabanları aracılığı ile miRNA-223'ün HDL metabolizmasına etki ettiği gösterilmiştir. Elde edilen bilgiler ışığında bu bu tez çalışmasında miRNA-223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine olan etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

İşbu anlaşma ile biyolojik materyali gönderen araştırmacı ve kurum "MIRNA-223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması" isimli araştırmada kullanılmak üzere gönderilecek "5ml ve araştırma" amacı ile kullanılması üzere 26 Ağustos Yerleşkesi Yeditepe Üniversitesi Kayışdağı / İSTANBUL adresindeki Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı' ndaki merkeze göndermeden önce GÖNDERİCİ ve ALİCİ'dan aşağıdaki koşulları kabul etmesi istenmektedir;

1. Gönderilen biyolojik materyaller yalnızca yukarıda yazılı amaç için kullanılabilir. ALİCİ biyolojik materyallerin alınma amacından dışında ikinci amaç için kullanıma isteklerini GÖNDERİCİ'ye yazılı olarak bildirecektir.
2. Biyolojik materyaller ALİCİ'ya gönderilmeden önce biyolojik materyalin sağlandığı göndülülere ait

Biyolojik Materyal Transfer Formu 2
(Biological Material Transfer Form)
01.09.2015 Versiyon 1.0

INFORMATION REGARDING THE INVESTIGATOR SENDING THE BIOLOGICAL MATERIAL

Name Surname and Title :
Specialization :
Institution :
Address :
Telephone :
Fax :
E-mail :

INFORMATION REGARDING THE CONSIGNEE RECEIVING THE BIOLOGICAL MATERIAL

Name Surname and Title :
Specialization :
Institution :
Address :
Telephone :
Fax :
E-mail :

I read and understood the terms under this agreement. I hereby agree and undertake that I will act in accordance with the terms of this agreement with respect to the dispatched materials.

	CONSIGNOR			CONSIGNEE
	Consignor Investigator	Consignor Sponsor Company Official or Legal Representative	Chief of the Institution / Rector or Assigned Person	
Name Surname and Title in Handwriting				
Date Signature				

Note: Instead of the signature of the consignee representative, a signed "end use certificate" including clauses similar to this agreement's to be issued by the consignee institution may also be accepted.

- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu ve Etik Kurulu'nun onayladığı tüm kullanım amaçlarına yönelik olarak düzenlenmiş bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun her bir göbüllüden alınmış olması gerekmektedir.
- ALICI biyolojik materyali GÖNDERİCİ'nin yazılı izni olmadan üçüncü kişil/kuurumlara vermeyecektir.
 - Biyolojik materyaller GÖNDERİCİ tarafından bireyin kimlik ve tanımlayıcı bilgileri olmaksızın ALICI'ya gönderilecektir.
 - ALICI biyolojik materyalleri Birleşmiş Milletler İnsan Genomu ve İnsan Hakları Evrensel Beyannamesine uygun olarak kullanacaktır.
 - Bu anlaşma ile gönderilecek biyolojik materyalin araştırma için kullanılacak olduğu ve biyolojik materyal kullanımına ait risklerin var olduğu ALICI tarafından kabul edilmektedir. Söz konusu risklere karşı uygun önlemlerin alınması gerekmektedir.
 - GÖNDERİCİ ve ALICI gönderilen biyolojik materyalin herhangi bir şekilde ticari kazanç kaynağı olarak kullanılmayacağı ancak elde edilebilecek fikri mülkiyet ve patent haklarının bu durumdan başlangıcında karşılıklı olarak belirlenecektir.
 - ALICI bu anlaşmanın sonlanması veya biyolojik materyalin sağlandığı göbüllüleri alt anlaşmanın 2. maddesinde belirtilen olurun geri çekilmesi halinde bütün materyalleri geri vermeyi veya ortadan kaldırmayı ve bunu belgelemeyi kabul eder.
 - Bu anlaşma, araştırmanın sonlanması, ilgili mevzuat hükümlerine uyulmaması veya ilgili tarafların anlaşma hükümlerine uymaması durumlarında son bulacaktır.
 - Bu anlaşmanın yürütülmesinde ALICI ve GÖNDERİCİ yetkileri sorumludur. Anlaşmazlık halinde ihtilafın çözümünü için her iki ülke mahkemeleri de yetkilidir.

BIYOLOJİK MATERYALİ GÖNDEREN ARAŞTIRMACI BİLGİSİ

Adı Soyadı ve Unvanı : Muzaffer Değertekin, Prof.Dr. Muzaffer Değertekin
Uzmanlık Alanı : Kardiyooloji
Kurumu : Yeditepe Üniversitesi
Adresi : İçerenköy Mahallesi Hastane Sokak No: 4, 4/1 Ataşehir - İstanbul
Telefon : 02165784000
Faks :
E-posta : mdegertekin@yeditepe.edu.tr

BIYOLOJİK MATERYALİ ALAN ALICI BİLGİSİ

Adı Soyadı ve Unvanı :
Uzmanlık Alanı :

Biyolojik Materyal Transfer Formu 3
(Biological Material Transfer Form)
01.09.2015 Versiyon 1.0

Kurumu :
Adresi :
Telefon :
Faks :
E-posta :

Bu anlaşmada belirtilen koşulları okudum ve anladım. Gönderilen materyalde bu anlaşmada belirtilen koşullara uyacağımı taahhüt ederim.

	GÖNDERİCİ			ALICI
	Gönderen Araştırmacı	Gönderen Destekleyici Firma Yetkilisi veya Yasal Temsilcisi	Eğitim Görevlisi / Ana Bilim Dalı Başkanı	
El Yazısı ile Adı Soyadı Unvanı Tarih İmza			Kurum Amirii / Rektör veya Yetkilendirilgi Makam	Alıcı Kurum Yetkilisi

Not: Bu anlaşmada yer alan alıcı kurum yetkilisinin imzası yerine alıcı kurum tarafından verilecek olan ve içerik olarak bu anlaşmadaki hükümlere benzer hükümleri içeren imzalı "end use certificate" "son kullanım sertifikası" de kabul edilebilir.

Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Sayın Hastamız,

- Bu belge bilgilendirilme ve aydınlatılmış onam haklarınızdan yararlanabilmenizi amaçlamaktadır.
- Size gerçekleştirilebilecek klinik araştırmalar amaçlı girişimler konusunda, tüm seçenekler ile bu girişimlerin yarar ve muhtemel zararları konusunda anlayabileceğiniz şekilde bilgi alma hakkınız ve bir kopyasını isteme hakkınız vardır.
- Yasal ve tıbbi zorunluluk taşıyan durumlar dışında bilgilendirmeyi reddedebilirsiniz. Yazılı bildirmek koşulu ile bilgi almama veya yerinize güvendiğiniz bir kimsenin bilgilendirilmesini talep etme hakkına sahipsiniz.
- klinik araştırmalara katılım konusunda bilgilendirildikten sonra bunu kabul edebilirsiniz. Ya da karar verebilmek için uygun zaman talep edebilirsiniz.
- Hayatınız veya hayati organlarınız tehlikede olmadığı sürece onamınızı (yazılı talep etme koşulu ile) dilediğiniz zaman geri alabilir ya da önceden kabul etmediğiniz herhangi bir tanı/tedavi amaçlı girişimi tekrar talep edebilirsiniz.
- Hastanemizde verilen hizmetleri Hastane Tanıtım Broşüründen edinebilirsiniz. Ayrıca Hastane personeli hakkında <http://www.yeditepe.edu.tr> web sayfasından daha detaylı bilgilere ulaşabilirsiniz.
- Burada belirtilenlerden başka sorularınız varsa bunları yanıtlamak görevimizdir.

TANIMLAMA

1. *Araştırmanın Adı:* MiRNA-223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması

Araştırmaya Katılımcı Sayısı: 200

Bu araştırmanın Amacı:

MikroRNA (miRNA, miR) yaklaşık 18-25 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli, protein kodlamayan RNA molekülü türüdür ve neredeyse her organizmada bulunur. MiRNA'lar, spesifik mRNA'ların dizilerinin tamamlayıcılığına göre 3' çevrilmemiş bölgeye (UTR) bağlanır ve translasyonu engeller veya mRNA parçalanmasını teşvik eder [1]. İnsanlarda protein kodlayan genlerin %60'ından fazlası, miRNA'lara eşlik etmeyi sürdürmek için seçici bir baskı altındadır. Bugüne kadar, insanlarda yaklaşık 2.500 miRNA tespit edilmiştir. MiRNA'ların fizyolojik ve patolojik durumlarda birçok işlevi vardır ve bazı miRNA'ların lipid homeostazı üzerinde önemli bir etkisi olduğu gösterilmiştir. MiR-223'ün daha önce monosit farklılaşmasını kontrol ettiği ve birden fazla enflamatuar geni düzenlediği

bulunmuştur. Bununla birlikte monositlerde ve makrofajlarda miR-223'ün ayrıca kolesterol homeostazi ile ilişkili birçok geni düzenlediği de gösterilmiştir [2]. MiRNA'ların plazma kolesterol seviyelerine olan etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) yaklaşık olarak %30 fosfolipidlerden, %25 kolesterolden ve %5 trigliseridinden oluşur. Daha büyük sferik yapıdaki HDL partikülleri kolesterol ester (CE) ve trigliseridin hidrofobik çekirdeğini içerirken, disk şeklindeki HDL partikülleri ise apolipoproteinA-I (apoA-I), fosfolipid ve serbest kolesterolden oluşur [3]. Yapılan çalışmalarda ve TargetScan (targetscan.org) ve miRanda (microrna.org) gibi biyoinformatik çalışmaların yer aldığı veritabanları aracılığı ile MiRNA-223'ün HDL metabolizmasına etki ettiği gösterilmiştir. Elde edilen bilgiler ışığında bu bu tez çalışmasında miRNA-223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine olan etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Süresi: 1 Yıl

İzlenecek Yöntem/Yöntemler:

Hasta (n=100) ve kontrol (n=100) grubu olmak üzere iki gruptan oluşması planlanmıştır.

miRNA izolasyonu:

miRNA izolasyonu için hasta ve kontrol grubundan alınan kanlar 4500 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilecek ve elde edilen serumlar çalışma yapılana kadar -80'de saklanacaktır. miRNA izolasyonu için Qiagen serum plazma kiti kullanılacaktır. Qiagen kiti kullanılarak cDNA sentezi yapılacaktır. miRNA ekspresyon seviyesi 7500 gerçek zamanlı PZR kullanılarak ölçülecektir

Araştırma Sonunda Beklenen Fayda

MiRNA-223 ifade düzeyinin HDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Bu Çalışmada Herhangi Bir Alternatif Tedavi yada Girişimde Bulunulmayacaktır.

Bu Araştırma Gönüllüler İçin Hiçbir Risk Teşkil Etmemekte ve Hiçbir Rahatsızlığa Sebep olmamaktadır.

ONAM (RIZA)

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim

tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Bu durumda hastanenin çalışma düzeni ve hastalara verilen bakımda aksaklık olmayacağı konusunda bilgilendirildim. Bu araştırmaya katılırken zorlama, maddi çıkar ve ast üst ilişkisine dayalı herhangi bir baskı olmaksızın bu çalışmaya katıldığımı beyan ederim. Bu bilimsel çalışmanın devamı esnasındaki süreçle ilgili olarak ayrıca eklenen çalışma protokolü ile bilgilendirildim. Tarafımdan alınan kan ve doku örneklerinin daha sonra başka araştırma çalışmalarında kullanılmasında herhangi bir sakınca yoktur.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün:

Adı Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Açıklamaları Yapan Kişinin:

Adı Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin:

Adı Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Gerekliyse Yasal Temsilcinin :

Adı Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Klinik Araştırma Proje Koordinatörü İletişim Bilgileri:

Adı Soyadı:

Uzmanlık alanı:

Kurumu:

E-posta adresi:

Telefon numarası:

ETİK KURUL KARARI



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

Sayı : 37068608-6100-15-1383

23/11/2017

Konu: Klinik Araştırmalar
Etik kurul Başvurusu hk.

İlgili Makama (Ezgi Yalbr)

Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı Prof. Dr. Turgay İsbir'in sorumlu olduğu "MiRNA-223 İfade Düzeyinin HDL Kolesterol Seviyesi Üzerine Etkisinin Araştırılması" isimli araştırma projesine ait Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (KA EK) Başvuru Dosyası (1363 kayıt Numaralı KA EK Başvuru Dosyası), Yeditepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 22.11.2017 tarihli toplantıda incelenmiştir.

Kurul tarafından yapılan inceleme sonucu, yukarıdaki isimi belirtilen çalışmanın yapılmasının etik ve bilimsel açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir (KA EK Karar No: 753).

Prof. Dr. Turgay ÇELİK

Yeditepe Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Ezgi	Soyadı	Yalбір
Doğ.Yeri	Ankara	Doğ.Tar.	09.01.1992
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	50131494322
Email	ezgi.yalbir@gmail.com	Tel	05537402448

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakóltesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü	2016
Lise	Çağrıbey Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre
1.	Stajyer	Yale Üniversitesi, Neurosurgery Laboratuvarı	2017, Eylül-Ekim
2.	Stajyer	Yale Üniversitesi, Neurosurgery Laboratuvarı	2015, Haziran-Temmuz

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

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) ALES Puanı	74,41	73,97	67,08

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Bilimsel Çalışmaları

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

Ezgi Yalbir, Dilara Aydemir, Tuğçe Gül, Seda Güleç Yılmaz, Selvi Duman, Selim İsbir, Atike Tekeli Kunt, Orhan Fındık, Turgay İsbir. Effects of GCK-MODY (MODY2) Gene Polymorphism on Chr.7:44163407 in Patients With Coronary Artery Disease. Turkish Journal of Molecular Biology & Biotechnology Supplement 1, Number 01, Volume 02, May 2017

Dilara Aydemir, Ezgi Yalbir, Tuğçe Gül, Seda Güleç Yılmaz, Emre Murat Altıncılıç, Selim İsbir, Atike Tekeli Kunt, Orhan Fındık, Turgay İsbir. Analysis of GCK-MODY (MODY2) Gene Polymorphism on Chr. 7:44149424 in Coronary Artery Disease Patients. Turkish Journal of Molecular Biology & Biotechnology Supplement 1, Number 01, Volume 02, May 2017

Tuğçe GUL, Dilara AYDEMİR, Ezgi YALBIR, Seda GULEC YILMAZ, Hüseyin AYHAN, Selim ISBİR, Atike TEKELI KUNT, Orhan FINDIK, Turgay ISBİR. Investigation of Mody 2 (c.7: 44183880G>A) Polymorphism in Patients With Coroner Artery Disease. Turkish Journal of Molecular Biology & Biotechnology Supplement 1, Number 01, Volume 02, May 2017