

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

**ATEROSKLEROZ HASTALIĞINDA
APOLİPOPROTEİN E (APOE) POLİMORFİZMİ
İLE MİKRORNA 221/222 ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

GÜLSÜM SEDA GÜLEÇ YILMAZ, MSc

İstanbul-2016

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

**ATEROSKLEROZ HASTALIĞINDA
APOLİPOPROTEİN E (APOE) POLİMORFİZMİ
İLE MİKRORNA 221/222 ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

GÜLSÜM SEDA GÜLEÇ YILMAZ, MSc





DANIŞMAN
Prof. Dr. Turgay İSBİR

İstanbul-2016

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program : Multidisipliner Moleküler Tıp Anabilim Dalı
Tez Başlığı : Ateroskleroz Hastalığında Apolipoprotein E (ApoE) Polimorfizmi ile MikroRNA 221/222 Arasındaki İlişkinin Araştırılması
Tez Sahibi : Gülsüm Seda Güleç Yılmaz
Sınav Tarihi : 25 Ağustos 2016

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

	Ünvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Tez danışmanı: (Jüri Başkanı)	Prof Dr Turgay İsbir Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD /Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp ABD	
Üye:	Prof Dr Bedia Çakmakoğlu İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp ABD	
Üye:	Prof Dr Arzu Ergen İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp ABD	
Üye:	Prof Dr Uzay Görmüş İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD	
Üye:	Doç Dr Altay Burak Dalan Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD	

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 09/09/2016. tarih ve 2016/191-01.....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.

GÜLSÜM SEDA GÜLEÇ YILMAZ



İTHAF

Sevgili Anne ve Babam'a
ve
Çok Değerli Hocam Prof Dr Turgay İsbir'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tezin yapılabilmesi için en ileri düzeyde eğitim ve araştırma imkanları sağlayan Yeditepe Üniversitesi Kurucu Başkanı Sayın Bedrettin Dalan'a,

Doktora eğitimime başladığım günden beri bilimsel, akademik ve kişisel gelişimime katkı sağlayan, tezimin her aşamasında destek olarak araştırmanın yürütülmesi ve deneysel çalışmaların yapılabilmesi için gerekli olan tüm olanakları büyük bir cömertlikle sunan, öğrencisi olmaktan büyük gurur duyduğum, Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı çok değerli hocam Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Tezim için gerekli hastaların seçimi, örneklerin sağlanması ile klinik değerlendirmelerindeki destek ve katkılarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Selim İsbir'e,

Çok kıymetli hocam Doç Dr Atike Tekeli Kunt ve Uzm Dr Orhan Fındık'a,

İstatistik çalışmalarında sabırla ve içtenlikle yol gösteren Yrd Doç Dr Çiğdem Kaspar'a,

Tüm tez çalışmalarım boyunca bana destek olan Moleküler Tıp ailesinin çok değerli üyeleri MSc Murat Altıkılıç, MSc Selvi Duman, Bio. Selda Türkmen, Bio. Hüseyin Ayhan, Bio. Hüseyin Kilili'ye,

Her zaman desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Abdurrahman Yılmaz'a, varlıklarıyla hayatımı değiştiren kızım Güneş ve oğlum Çınar'a, annem Ulviye Güleç'e, babam Tahsin Güleç'e, canım kardeşim Duygu Güleç Erdoğan'a ve en zor zamanlarımda desteğini esirgemeyen ablam Şeyda Akbay'a, canım teyzem Ayla Ekiz'e ve manevi ablam Gülay Turan'a en içten teşekkürlerimi sunarım

G. Seda GÜLEÇ YILMAZ

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi-vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii-ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ABSTRACT	xii
ÖZET.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kalbin Anatomisi Ve Fizyolojisi	4
2.2. Sol Ventrikül Hipertrofisi Ve Patofizyolojisi	6
2.2.1. Sol Ventrikül Hipertrofisinin Moleküler Mekanizması	6
2.2.2. Sol Ventrikül Hipertrofisinin Tanısı.....	7
2.2.3 SolVentrikül Hipertrofisinin Gelişmesinde Sorumlu Olan Risk Faktörleri 7	
2.3. Ateroskleroz.....	8
2.3.1. Ateroskerozun Moleküler Mekanizması.....	8
2.3.2. Aterosklerotik Lezyonlar.....	11
2.4. Lipoproteinler	14
2.4.1. Lipoprotein Metabolizması.....	14
2.4.2. Hiperlipidemi Tipleri Ve Lipoprotein İlişkili Genetik Bozukluklar.....	16
2.5. Apolipoproteinler	17
2.6. Apolipoprotein E.....	17
2.6.1 ApoE Geni Yapısı ve Fonksiyonu.....	19
2.6.2. ApoE'nin Ateroskleroz ile İlişkisi.....	20
2.7. MikroRNA'lar.....	21
2.7.1 MiRNA Biyosentezi.....	21
2.7.2. MiRNA221ve miRNA222.....	24
2.7.3. MiRNA 143 ve MiRNA 145.....	27
2.7.4. MiRNA 133a.....	28
2.7.5. MiRNA 133b.....	28
2.7.6 MiRNA 122a.....	29
2.7.7. MiRNA 494.....	30
2.7.8. MiRNA 499.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Örnek Seçimi ve Tanımı.....	32
3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar.....	33
3.2.1. Kullanılan Sarf ve Ayraç Malzemeleri	33

3.2.2. Kullanılan Cihazlar.....	35
3.3. Yöntemler.....	35
3.3.1. Kandan Genomik DNA ve MiRNA İzolasyonu ve Saflık Tayini 35	
3.3.1.1 Kandan Genomik DNA İzolasyonu.....	35
3.3.1.2 Genomik DNA Saflık ve Düzey Ölçümü.....	36
3.3.1.3 Serumdan MikroRNA İzolasyonu.....	36
3.3.1.4. cDNA Eldesi	37
3.3.1.5. MikroRNA Saflık Tayini.....	37
3.3.1.6.MikroRNA Konsantrasyonun Belirlenmesi.....	37
3.4.1. Eş Zamanlı PZR ile Genotip ve MiRNA Ekspresyon Analizleri 38	
3.4.1.1. Eş Zamanlı PZR ile ApoE Genotip Analizleri.....	38
3.4.1.2.Eş Zamanlı PZR ile MiRNA Ekspresyon Analizler.....	40
3.4.2. Serum ApoE Düzeylerinin Belirlenmesi.....	42
3.4.3.Lipid Alt Grup Analizleri.....	42
3.3.4.Lipid Profillerinin Ölçülmesi.....	45
3.3.5. İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Çalışma Gruplarına Ait Demografik Veriler.....	46
4.2 Çalışma Gruplarına Ait Lipid Değerleri.....	48
4.3.Lipid Alt Grup Analizleri	52
4.4 ApoE Genotip ve Allel Dağılımları İstatistiksel Açidan Değerlendirilmesi 54	
4.5.MikroRNA Sonuçları.....	70
4.6. MikroRNA ROC Sonuçları.....	73
4.7.MikroRNA ve Lipid Değerlerine Karşılaştırma Analizleri.....	79
4.8. Sol Ventrikül Hipertrofisi Tanısı Olan Grupların Analizleri.....	90
5. TARTIŞMA.....	98
KAYNAKLAR.....	126
HAM VERİLER.....	142
FORMLAR.....	160
ETİK KURUL KARARI.....	167
ÖZGEÇMİŞ.....	169

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.4.1-1. Lipoproteinlerin sınıflandırılması	15
Tablo 2.4.2-1. Hiperlipidemi Tipleri	16
Tablo 2.5-1. İnsan Apolipoproteinlerinin Genel Özellikleri	18
Tablo 3.3.1.1.4-1. cDNA Sentezi için PZR İçeriği.....	37
Tablo 3.3.1.1.4-2. cDNA Sentezi için İnkübasyon Koşulları.....	37
Tablo 3.4.1.1-1. ApoE Genotipleme için PZR İçeriği.....	38
Tablo 3.4.1.1-2. ApoE Genotipleme için PZR Koşulları.....	39
Tablo 3.4.1.1-3. ApoE Genotipleme için Yorumlama Tablosu.....	40
Tablo 3.4.1.2-1. Kullanılan mikroRNA primer dizileri.....	41
Tablo 3.4.1.2-2. MikroRNA Ekspresyon için Eş Zamanlı PZR İçeriği.....	41
Tablo 3.4.1.2-3. MikroRNA Ekspresyon için Eş Zamanlı PZR Koşulları.....	41
Tablo 4-1. Ateroskleroz ve Kontrol Gruplarına ait Demografik Veriler.....	46
Tablo 4-2. Hasta ve kontrol demografik verilerinin logistik regresyon analizleri.....	47
Tablo 4-3. Hasta ve Kontrol Gruplarına ait Lipid Değerleri	49
Tablo 4-4. Hasta ve kontrol grubu lipid değerlerinin logistik regresyon analizleri.....	50
Tablo 4-5. Hasta ve kontrol gruplarının lipid alt grup analiz sonuçları.....	52
Tablo 4-6. Hasta ve kontrol örneklerinin lipid alt grup logistik regresyon analizleri.....	53
Tablo 4-7. Hasta ve kontrol örneklere ait ApoE Genotip ve Allel Dağılımları.....	55
Tablo 4-8. Hasta ve kontrol örneklere ait ApoE Genotip ve Allel Dağılımlarının logistik regresyon analizleri.....	56
Tablo 4-9. Hasta ve Kontrol Gruplarına ait ApoE Seviyelerini Genotip ve Allel Dağılımları ile Karşılaştırılması.....	58
Tablo 4-10. Hasta ve kontrol gruplarına ait ApoE Genotip lipid değerleri ile karşılaştırılması.....	61

Tablo 4-11. Hasta ve kontrol gruplarına ait ApoE Allel ve lipid değerleri ile karşılaştırılması.....	68
Tablo 4-12. Hasta ve kontrol örneklere ait ApoE genotip ve allel dağılımlarının lipid değerlerinin logistik regresyon analizleri.....	69
Tablo 4-13. Hasta ve kontrol gruplarının plazma MiRNA düzeylerinin logistik regresyon analizleri.	72
Tablo 4-14. Plazma miRNA düzeylerine göre plazma kolesterol değerlerinin doğrusal regresyon analizleri.....	80
Tablo 4-15. Trigliserid değerlerine göre plazma miRNA düzeylerinin doğrusal regresyon analizleri.....	81
Tablo 4-16. miRNA122a'nin TG >400 ile karşılaştırma analizleri.....	83
Tablo 4-17: VLDL değerlerine göre plazma miRNA düzeylerinin doğrusal regresyon analizleri.	84
Tablo 4-18. miRNA122a'nin VLDL ile karşılaştırma analizleri.....	86
Tablo 4-19. LDL değerlerine göre plazma miRNA düzeylerinin doğrusal regresyon analizleri.....	88
Tablo 4-20. HDL değerlerine göre plazma miRNA düzeylerinin doğrusal regresyon analizleri.....	89
Tablo 4-21. SVH tanısı olan ve olmayan örneklere ait demografik veriler.....	90
Tablo 4-22. SVH olgularının ekokardiyografik parametre bilgileri.....	91
Tablo 4-23. Sol Ventrikül Hipertrofisi tanısı olan ve olmayan örneklere ait ApoE Genotip ve Allel Dağılımları	93
Tablo 4-24: Sol Ventrikül Hipertrofisi tanısı olan ve olmayan örneklere ait partikül yoğunluğu ve büyüklüğüne göre lipid alt grup analiz sonuçları.....	94
Tablo 4-25. Sol Ventrikül Hipertrofisi tanısı olan ve olmayan örneklere ait partikül yoğunluğu ve büyüklüğüne göre lipid alt gruplarının logistik regresyon analizleri.....	95
Tablo 4-26. Ateroskleroz ve Sol Ventrikül Hipertorfisi olan hastaların plazma miRNA seviyelerinin karşılaştırılması	97

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.6.1-1. ApoE Geninin Yapısı	20
Şekil 2.7.1-1. miRNA Biyosentezi.....	22
Şekil 2.7.2-1. miRNA 221 ve miRNA 222 kromozomal lokasyonları	24
Şekil 2.7.2-2. miRNA221 ve miRNA222 Nükleotid dizileri	24
Şekil 2.7.2-3. İnsan miRNA221 ve miRNA 222nin Biyogenezi.....	26
Şekil 2.7.3-1. miRNA 143 ve miRNA145 kromozomal lokasyonları.....	27
Şekil 2.7.3-2. miRNA 143 ve miRNA145 Nükleotid dizileri	27
Şekil 2.7.4-1. miRNA 133a kromozomal lokasyonu	28
Şekil 2.7.4-2. miRNA 133a Nükleotid dizisi	28
Şekil 2.7.5-1. miRNA 133b kromozomal lokasyonu	28
Şekil 2.7.5-2. miRNA 133b Nükleotid dizisi	29
Şekil 2.7.6-1. miRNA 122a kromozomal lokasyonu.....	29
Şekil 2.7.6-2. miRNA 122a Nükleotid dizisi	29
Şekil 2.7.7-1. miRNA 494 kromozomal lokasyonu.....	30
Şekil 2.7.7-2. miRNA 494 Nükleotid dizisi.....	30
Şekil 2.7.8-1. miRNA 499a kromozomal lokasyonu.....	31
Şekil 2.7.8-2. miRNA 499a nükleotid dizisi.....	31
Şekil 3.4.1-1. ApoE Genotipleme için PZR Eğrileri.....	39
Şekil 3.4.4.1. LDL Alt Grup Analizleri.....	43
Şekil 3.4.4.2. HDL Alt Grup Analizleri.....	44
Şekil 4-1. VKİ ve LDL Alt grubu Doğrusal Regresyon Analizleri.....	54
Şekil 4-2 mikroRNA Analizleri.....	71
Şekil 4.3. Plazma miRNA221 ve miRNA222 seviyelerinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi grafikleri.	74
Şekil 4.4. Plazma miRNA133a ve miRNA133b seviyelerinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi grafikleri.....	75
Şekil 4.5. Plazma miRNA143 ve miRNA145 seviyelerinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi grafikleri.....	76
Şekil 4.6. Plazma miRNA494 ve miRNA499a seviyelerinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi grafikleri.....	77
Şekil 4.7. Plazma miRNA122a seviyesinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi grafikleri.....	78
Şekil 4-8. miRNA122a ve TG doğrusal regresyon grafik analizi.....	82
Şekil 4-9. miRNA122a ve VLDL doğrusal regresyon grafik analizi.....	85
Şekil 4-10 SVH miRNA Analizleri.....	96

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KAH	: Koroner Arter Hastalığı
SVH	: Sol Ventrikül Hipertrofisi
VKİ	:Vücut Kitle İndeksi
VYA	:Vücut Yüzey Alanı
ApoE	:Apolipoprotein E
miRNA	: MikroRNA
EDTA	:Etilendiamin Tetraasetik Asit
HDL	:Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
LDL	:Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
TG	:Trigliserid
VLDL	:Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
EDV	: Diyastol Sonu Hacim
ESV	: Sistol Sonu Hacim
MAP	: Ortalama aortik basınç
RCA	: Sağ Koroner Arter
LAD	: Sol Ön İnen Arter
Cx	: Sirkumfleks Arter
SV	: Stroke Volume
LVEDP	:Sol Ventrikül Diyastol Sonu Basıncı
LVEDV	: Sol Ventrikül Diyastol Sonu Hacmi
LVK	: Sol Ventrikül Kütlesi
LVDSÇ	: Sol Ventrikül Diyastol Sonu Çapı
İDK	: İnterventriküler Septum Kalınlığı
ADK	: Arka Duvar Kalınlığını
MCP-1	: Monosit Kemokin Proteini-1
MMP	: Metalloproteinaz
VCAM-1	: Damar Hücresi Adhezyon Molekülü-1
3'UTR	: 3' Translasyonu Olmayan Bölge
SVKI	: Sol Ventrikül Kütle İndeksi
DDKH	: Damar Düz Kas Hücreleri
VEH	: Vasküler Endotel Hücreleri

ABSTRACT

Güleç Yılmaz G. S. Investigation of Correlation Between Apolipoprotein E gene polymorphism, and miRNA 221/222 Expression Levels in Atherosclerosis. Yeditepe University Health Sciences Institute, Department of Molecular Medicine. Doctorate Thesis. İstanbul, 2016.

Atherosclerosis is the major cause of death and disability in the world. This study aims to investigate the relations between atherosclerosis and Apolipoprotein E (ApoE) gene variations and complex mechanism of microRNAs (miRNA) especially miRNA 221 and miRNA222. ApoE genotyping and miRNA expression analysis were performed by using real-time polymerase chain reaction and lipid subfraction analysis assessed for blood samples from a group of patients with atherosclerosis (n=89) and control group (n=93). We observed that there was an association between low HDL and cardiovascular risk (p=0,011). The frequency of the E3/E4 genotype was found to be significantly higher in patients compared to controls (p=0.029) and carrying this allele has increased the cardiovascular risk. Individuals carrying the E2/E3 genotype had significantly higher in control group (p=0,011). However carrying E2 allele was reduced the cardiovascular risk 10 times (p=0,006). Lipid analysis emerged that E/E3 genotype carriers had higher plasma cholesterol (p=0,012) and LDL levels (p=0,039). Furthermore risk estimating ratio, [cholesterol]/[HDL], higher in the E3/E3 genotype group (p=0,0027). Carrying E2 allele had positive effect meanwhile E4 allele negative affects on lipid profiles. The miRNA expression analysis showed that miRNA 221 and miRNA222 expressions were lower in the patient group. By the ROC analysis, we observed that miRNA 221 and miRNA222 are candidate biomarkers for atherosclerosis (p=0,004 ve p=0,003). Also analysis showed that there are relations between miRNA122a and plasma TG (p=0,046) and VLDL (p=0,029) levels.

Key Words: Atherosclerosis, ApoE, miRNA 221, miRNA222

ÖZET

Güleç Yılmaz G. S. Ateroskleroz Hastalığında Apolipoprotein E (ApoE) Polimorfizmi İle Mikrorna 221/222 Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı. Doktora Tezi İstanbul, 2016.

Bu çalışmada tüm dünyada önde gelen morbidite ve mortalite nedeni olan aterosklerozda ApoE gen varyasyonlarının etkilerinin araştırılması ve başta miRNA221/222 olmak üzere miRNAların hastalıkla olan ilişkisinin moleküler açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 89 ateroskleroz tanısı almış hasta ve 93 sağlıklı kontrolden oluşan çalışma grubumuzun gerçek zamanlı pqr ile ApoE genotiplenmesi, mikroRNA ifade düzeylerinin belirlenmiş ve lipid altgrup analizi yapılmıştır. Yapmış olduğumuz risk analizlerinde düşük HDL değerine sahip olmanın kardiyovasküler riskle ilişkili olduğu belirlenmiştir (p=0,011). ApoE genotip ve allel frekansları kontrol ve ateroskleroz hasta olguları ile karşılaştırıldığında E3/E4 genotipine sahip olguların hasta grubunda yüksek olduğu ve riskini artırdığı (p=0,029), E2/E3 genotipinin ise kontrol grubunda yüksek olduğu ve riski azalttığı gözlenmiştir (p=0,011). E2 alleli taşımanın ateroskleroz riskini 10 kat azalttığı gözlenmiştir (p=0,006). Lipid değerleri incelendiğinde E3/E3 genotipine sahip olguların sınır değerlerinin üstünde plazma kolesterol (p=0,012) ve LDL düzeylerine (p=0,039) sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca [kolesterol]/[HDL] oranının da E3/E3 genotipinde yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0,027). Allel düzeyindeki değerlendirmelerde E2 allelinin kolesterol değerleri üzerinde olumlu etki gösterdiği (p=0,036) E4 allelinin ise negatif etkilediği (p=0,038) gözlenmiştir. MiRNA ifade düzeyleri incelendiğinde miRNA221 ve miRNA221'nin hasta grubunda bu miRNAların daha az ifade edildiği belirlenmiştir. Ayrıca ROC analizi sonuçlarına göre miRNA221 ve miRNA221 ifade düzeylerinin eşik değeri olarak değerlendirilebileceği ve ateroskleroz tanısında biyobelirteç adayı olabileceği gösterilmiştir (p=0,004 ve p=0,003)). Ayrıca lipid düzeyleri ve miRNAlar üzerinde yapılan incelemelerimizde miRNA122a ifade düzeyinin azalmasının TG (p=0,046) ve VLDL (p=0,029) düzeyinde artışa neden olarak kardivasküler riski artırabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Atheroskleroz, ApoE, miRNA 221, miRNA222

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişmiş ülkelerde ateroskleroz komplikasyonları ile birlikte önde gelen morbidite ve mortalite nedenidir. Türkiye'de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması (TEKHARF) verilerine göre ülkemizde koroner arter hastalığı (KAH) prevalansı 45-54 yaş grubunda %6 iken, 55-64 yaş grubunda %17 dolayına, 65 yaş ve üzerindeki bireylerde %28 düzeyine yükselmektedir. Söz konusu prevalanslar 1990 yılındakilere kıyasla 50 yaş üstü kesimde %80 oranında artmıştır. Yine aynı çalışmasının verilerine göre tüm ölümlerin %42'si koroner kalp hastalığına, %10'u da serebrovasküler hastalıklara bağlıdır. Bu veriler ışığında ateroskleroza bağlı ölümler hemen hemen tüm ölümlerin yarısından sorumlu olduğu düşünülmektedir (1).

Ateroskleroz morbitite ve mortaliteye yol açan, periferik veya santral yerleşimli pek çok vasküler bozukluğun altında yatan temel patolojik tablo olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde arter duvarında kolesterol birikimi ile bunun yarattığı kronik inflamatuvar cevapla birlikte seyreden multifaktöriyel bir hastalık olduğu görüşü hakimdir. Aterosklerozun dönüşümü olmadan ilerleyen bir hastalıktan ziyade tıbbi tedaviye yanıt verebilen, dinamik inflamatuvar bir süreç olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca aterosklerozun klinik sonuçlarının lümen daralmasından ziyade plağın içeriğine odaklanan yeni tanısal yaklaşımları gündeme getirmiştir (2).

Apolipoprotein E (ApoE), yüksek yoğunluklu ve trigliserid zengin lipoproteinlerin yapısında bulunan ve vücutta lipid homeostasını düzenleyen bir lipoproteindir ve aterosklerozdan korunmak için önemli bir role sahip olduğu tespit edilmiştir (3).

MikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikli RNA molekülüdür ve gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynarlar. miRNA, DNA'da transkripsiyonu yapılan ancak translasyonu yapılmayan genler tarafından kodlanır. miRNA'ların genler ve transkripsiyon üzerindeki etkisinin keşfi ile araştırmalarda odak noktası haline gelmeye başlamıştır (4). miRNA'lar apoptozdan hücre bölünmesine, hücre farklılaşmasına, kanserden kalp hastalığına kadar birçok hastalığın biyolojik ve fizyopatolojisinin aydınlatılmasına ve kişisel tıp alanında epigenetik mekanizmaların belirlenmesine katkı sağlamaktadır (5).

miRNA 221/222 hücre bölünmesinde görev alan genler üzerindeki etkisi nedeniyle özellikle çeşitli kanser türleri üzerinde etkileri incelenmiş ve kanser için biyomaker adayı olabileceği üzerine araştırmalar yapılmıştır (6). Hücre döngüsünde etkileri belirlenen miRNA 221/222'nin, aterosklerozun oluşum mekanizmasında önemli basamaklar olan endotel bozukluğu ve damar düz kas hücrelerinin farklılaşmasındaki etkilerinin belirlenmesi hastalığın mekanizmasının açıklanabilmesi için yeni bir boyut kazandırmaktadır (7). miRNA221/222'nin ifadesinde azalmanın hücre döngüsü proteini olan p27Kip1'in çalışmasını etkileyerek ateroskleroz plak yırtılmasına neden olabileceği bildirilmiştir (8). Xue ve arkadaşları (2015) tarafından miRNA 221/222 ifade düzeylerindeki değişimlerin insan damar endotelinde fonksiyon bozukluğuna neden olduğu açıklanmıştır (9). Ayrıca miRNA221/222 üzerinden dokuya özgü etki göstererek damar endotel hücrelerinin proliferasyonunu artırarak damar içinde endotel bütünlüğünü sağlar. Damar bütünlüğün korunması makrofajların subendotelyal alana geçerek inflamasyonu tetiklemelerini de engeller (10). Kothapalli ve arkadaşlarının (2013) ApoE geni susturulmuş farelerle yapılmış in vitro çalışmada ApoE geninin ve miRNA221/222 düzenlenmesini anlamlı şekilde etkilediğini göstermiştir. ApoE geninin etkin olması vücutta lipid metabolizmasına pozitif etki gösterdiği gibi, arterlerdeki damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu baskı altında tutarak arterlerdeki intima kalınlaşmasını ve inflamatuvar sikokinlerin salgılanmasını engellemektedir. Sonuç olarak ApoE genin de miRNA221/222 ifadesi üzerine etkili olduğu belirlenmiştir (11).

Atheroskleroz oluşum mekanizması farklı açılardan daha geniş değerlendirmek için miRNA ve hedef proteinlerinin veri tabanları araştırılmış (<http://www.mirbase.org/>, <http://www.targetscan.org/>) ve konuyla ilgili çalışmalar değerlendirilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda herbiri farklı bir açıdan aterosklerozu etkileyen yedi miRNA daha belirlenerek konunun kapsamı genişletilmiştir. Damar düz kas hücrelerinin farklılaşması üzerinde etkili olduğu belirlenen miRNA143/145 kümesinin atherosklerozdaki rolünün araştırılması amaçlanmıştır (12). Ayrıca bu çalışmada hücrelerde hipertrofiye neden olan genlerin düzenlenmesinde aldığı rol nedeniyle miRNA133a ve miRNA133b'nin atheroskleroz ve özellikle Sol Ventrikül Hipertrofisi ile ilişkisi araştırılmıştır (13). Lipoprotein metabolizması ve kolesterol mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülen miRNA122a'nın atheroskleroz ve HDL kolesterol metabolizması üzerinde etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir (14,15). Hücreler arası alan (ekstraselüler alan) sentezi sağlayan genlerin düzenlenmesinde görev alan ve

hücreler arası iletişimde rol oynadığı belirlenen (16) miRNA494 ve miRNA499, hastalar üzerinde aterosklerozun oluşumundaki etkilerini incelemek için seçilmişlerdir.

Yapılan literatür taramalarında bir çok çalışmanın hücre kültürü düzeyinde sürdürüldüğü in vivo çalışmaların ise fareler üzerinde yapıldığı görmekteyiz. Ancak bugüne kadar ateroskleroz tanısı almış hastalarda yapılmış bu kapsamda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Son yıllarda miRNA'ların hastalıkların etimiyolojisinde ve fizyopatolojisinde rolünün araştırılması moleküler çalışmaların odak noktasında yer almaktadır. Bu çalışmada ateroskleroz hastalarında ApoE gen mutasyonlarının etkilerinin araştırılması ve başta miRNA221/222 olmak üzere belirlenen diğer mikroRNAların (miRNA143, miRNA145, miRNA133a, miRNA133b, miRNA122a, miRNA494, miRNA499) ilişkisinin moleküler açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KALBİN ANATOMOSİ VE FİZYOLOJİSİ

Kalp orta mediastende, sağ ve sol akciğerin arasında ve özafagusun önünde, perikard adı verilen bir kese içerisinde yer almaktadır. Büyüklüğü yaşa ve cinsiyete göre değişmekle birlikte, ağırlığı kadınlarda 230-280gr, erkeklerde ise 280-340gr olan bir organ olup kabaca 4 boşluktan oluşan kassal bir organ olarak tanımlanmaktadır. Sağ ve sol atriyum ve sağ ve sol ventriküller bu boşluklara verilen isimlerdir (17,18). Normal kalpte birbirinden farklı yapıya sahip iki ayrı atriyum vardır. Normal kalpte sistemik venler sağ atriyuma açılırlar (19). Yine normal kalpte birbirinden farklı morfolojiye sahip iki ayrı ventrikül mevcuttur. Sağ ventrikül çıkımında pulmoner arter, sol ventrikül çıkımında da aort ve bu arterlerin kapakları yer almaktadır. Bu kapaklar semilunar kapaklar olarak isimlendirilir ve bu kapakların açılıp kapanması, kan akımı ve basınç farkı sayesinde gerçekleşmesini sağlamaktadır (20,21). Sol atriyum ve sol ventrikül mitral kapak ile birbirinden ayrılırken, sağ atriyum ve sağ ventrikül ise triküspid kapak ile birbirinden ayrılır. Bu kapaklar sayesinde kan tek yönde hareket etmektedir. Kalbin duvar yapısı histolojik olarak endokard, miyokard ve epikarddan oluşmaktadır. Kalbin boşluklarını içeriden döşeyen kat endokard, kalbe özgü kas dokusundan oluşan kat miyokard ve kalbin dış yüzeyini kaplayan kat da epikard olarak isimlendirilir. Atriyumların duvar kalınlığı 2-3mm, sağ ventrikülün 5-8mm ve sol ventrikülün duvar kalınlığı 10-15mm olduğu gösterilmiştir (22).

Kalp koroner arterler ile beslenir. Bu arterler; sağ koroner arter (RCA), sol ön inen arter (LAD) ve sirkumfleks (Cx) arter olarak isimlendirilir (22). Bu arterlerde oluşan darlıklar veya tıkanıklıklar ise koroner arter hastalığına yol açmaktadır. Koroner sinüs ve diğer kardiyak venler ise kalbin venöz kan dönüşünü sağlamaktadırlar (23).

Kalp anatomik bir pompa görevi görerek tüm vücuda kanı dağıtmaktan sorumludur. Sinir sisteminden etkilenir ancak otonom olarak çalışmaktadır. Sinüs düğümünde başlayan ileti, atriyoventriküler düğüme ve bu ileti de miyokard liflerine doğru dağıldığı açıklanmıştır (23).

Kardiyak döngünün mekanizması Mill ve arkadaşları (1997) (23) tarafından gösterilmiştir şöyleki; elektriksel uyarı sinoatriyal düğümde başlar ve her iki atriyuma ulaşarak atriyal kontraksiyonu sağlanmaktadır. Sonrasında ileti atriyoventriküler

düğüne gelir. Burada ileti yavaşlayarak his demetine, oradan da sağ ve sol ventrikül dallarına geçerek ventriküler kontraksiyonu sağlanmaktadır. Özetle kalp boşlukları koordineli olarak kasılır (sistol) ve ardından gevşeme (diyastol) dönemine geçer ve sonuçta kan sol ventrikülden aorta ve sistemik dolaşıma gönderilirken sağ ventrikülden de pulmoner artere ve akciğer dolaşımına gönderilmektedir.

Kalbin pompa görevi kalp debisi ve venöz dönüşü dengelemektedir. Kalp debisi her bir ventrikülden bir dakika içerisinde pompalanan kan miktarı olarak tanımlanmaktadır. Normal bir erişkinde kalp debisi 5lt/dakika olup egzersiz dönemlerinde pompalanan kan miktarı ise artmaktadır. Genellikle sol ventrikülün pompaladığı kan miktarı ölçülürerek kalp debisi sol ventrikül fonksiyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Kalp debisi, kalp hızı ve atım hacmi (stroke volume, SV) çarpımı sonucu elde edilen bir değerdir. Kalp her bir dakikada yaklaşık 75ml kan pompalar bu da atım hacmi olarak isimlendirilir atım hacmi üç faktöre bağlı olarak değişmekte olup sözkonusu faktörler aşağıda özetlenmiştir (24):

1. Sistolün başlangıcında ventrikülün içerdiği kan miktarı (diyastol sonu hacim, EDV)
2. Ventriküllerin kasılma gücü(sistol sonu hacim, ESV)
3. Ortalama aortik basınç (MAP).

Kalp kası kasılması beş ayrı faktör tarafından düzenlenir, sırasıyla (24);

1. Önyük (preload)
2. Ardyük (afterload)
3. Kontraktilite
4. Diyastolik kompliyans
5. Kalp hızı.

Önyük: Kalp kasılması öncesi miyozitlerin uzamasına sebep olan pasif doluş olarak isimlendirilir. Sol ventrikül diyastol sonu basıncı (LVEDP) ve sol ventrikül diyastol sonu hacmi (LVEDV) önyüğü öngörmek için kullanılan verilerdir. Frank Starling Yasası: Kalp, önyüğü arttığında hem kasılmasını hem de atım hacmini arttırarak bu duruma cevap verebilir. Bu yasada; miyozilerdeki uzunluk ve gerilim ile güç ve hız ilişkisini içerir. Sonuç olarak sarkomer uzunluğunun artması sonucunda, aktin ve miyozin arasındaki aktifleşmiş bölümlerin sayısının arttığı gösterilmiştir (25).

Ardyük: Kalbin sistolü sırasında kısılması gereken miyokardiyal liflere karşı oluşan yüklerin tümüne ardyük isim verilmektedir.. Ardyükün arttığı durumlarda Frank-Starling yasasına göre, miyokardiyal liflerde kısılma hızı azaltılmaktadır. Laplace kanuna

göre ventrikül duvar gerilimi, ventrikül içi basınç ve ventrikül çapı ile doğru orantılıken, duvar kalınlığı ile ters orantılı olduğu rapor edilmiştir (26).

2.2. SOL VENTRİKÜL HİPERTROFİSİ VE PATOFİZYOLOJİSİ

Kalp hemodinamik bir sorunla ile karşılaştığında, bu problemi üç şekilde kontrol altına alınabilmektedir (26):

1. Frank-Starling mekanizması ile aktin ve miyozin arasındaki aktifleşmiş bölümlerin sayısını çoğaltmak,

2. Oluşan fazla yüke katlanabilmek için kas kütlelerini arttırmak,

3. Kasılma gücünü arttırabilmek için nörohormonal mekanizmaları çalıştırmak.

Hemodinamik yükün artmasına bağlı kalbin kullandığı en önemli mekanizma kas kütlelerini arttırmaktır. Kas kütlelerini arttırmanın tek yolu ise var olan miyositlerin hipertrofiye uğraması sonucu oluşmaktadır (27).

Aort darlığı veya hipertansiyon sonucu ortaya çıkan basınç yüküne cevap olarak sarkomerler paralel olarak eklenmesi sonucu miyosit genişliği artar, sonuçta duvar kalınlığı artmaktadır. Bu remodeling (yeniden yapılanma) **konsantrik hipertrofi** olarak isimlendirilmektedir (27).

Kronik aort yetmezliği, mitral yetmezlik veya anemi gibi kalbin hacim yükünün arttığı durumlarda ise sarkomerler seri halinde çoğalırlar ve miyosit boyu uzayarak ventriküler hacim artar. Bu remodeling ise **eksantrik hipertrofi** olarak tanımlanmıştır (27).

2.2.1. Sol Ventrikül Hipertrofisinin Moleküler Mekanizması

Nedeni ne olursa olsun, kardiyak hipertrofinin genlerin yeniden programlanmalarındaki karmaşık değişiklikler sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu değişiklikler immatür kardiyak genlerin reekspresyonunu kapsamaktadır. Bunlar; 1. Motor ünitenin oluşumunu ve düzenlenmesini modifiye eden genler, 2. Enerji metabolizmasını modifiye eden genler, 3. Hormonal yolların komponentlerini kodlayan genler olarak sıralanabilir. Bunlara ek olarak, intraselüler iyon homeostazını modifiye eden genlerde de değişiklikler görülebilir ve kilit parasempatik ve sempatik reseptörler 'downregüle' edilmektedir (28).

Ventriküler hipertrofinin temelinde miyositteki sarkomer sayısının artması yer almaktadır. Miyosit üzerindeki güç nasıl oluyor da sarkomer sayısının artmasını sağlıyor? Bu sorunun cevabı, mekanik bir inputun biyokimyasal bir olaya dönüşmesidir ve bu da ekstraselüler matriks (ECM) yoluyla olmaktadır (29). ECM'deki tirozin-

fosforile-kinazlar ve serin-threonin kinazlar hipertrofideki sinyal mekanizmalarında rol oynamaktadır (30).

Anjiyotensin II'nin AT1 reseptörü yoluyla hipertrofi gelişmesinde önemli rol oynadığı Sadoshima ve arkadaşları (1993) tarafından gösterilmiştir (31). Çünkü söz konusu hormonun, erken kardiyak büyümeye neden olan moleküler olayları direkt olarak indüklemesi bu görüşü kuvvetlendirmektedir (32).

Kardiyak hipertrofinin çeşitli genlerin ekspresyonuyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Kuster ve arkadaşları (2013) (33) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda, kardiyak mast hücrelerindeki gen ifade düzeylerinin kardiyak hipertrofisi olan hastalarda ve sağlıklı donörlerde farklılık gösterdiğini ve kardiyak hipertrofinin erken evrelerde geri dönüşümlü olduğu olduğunu göstermişlerdir. Transkripsiyon faktörleri, miyokardinin ekspresyonu aktive olmuş B hücrelerinin nükleer faktörü ile inhibe edilebilmektedir (NF-k-light chain enhancer). Bu faktör kardiyomiyositlerdeki gen ifade düzeylerini modifiye ederek kardiyak hipertrofiyi inhibe etmektedir. Endothelin-1, atriyal natriüretik peptit (ANP) upregülasyonu yoluyla kardiyak hipertrofiye neden olabilir (34). Sonuç olarak yeni hipertrofi ilişkili genlerin belirlenmesi ve bunların moleküler mekanizmaları kardiyak hipertrofinin tanısında ve tedavisinde klinik önem taşıdığı bilim dünyasında gün geçtikçe taraftar toplamaktadır (35).

2.2.2. Sol Ventrikül Hipertrofisinin Tanısı

Sol Ventrikül Hipertrofisi (SVH) tanısı ekokardiyografi veya noninvazif görüntüleme tetkikleri ile yapılabilmektedir. Sağ ve sol ventrikül kütlelerinin normal sınırları sağlıklı erkek ve kadınlarda bilinmektedir. Erkeklerde sol ventrikül kütlesi $113\text{gr}/\text{m}^2$ iken, kadınlarda $95\text{gr}/\text{m}^2$ olduğu gösterilmiştir (36). Sol ventrikül kütlesi (LVK)= $1.04 \times [(\text{LVDSÇ} + \text{İDK} + \text{ADK})^3] - 13.6\text{gr}$ formülü kullanılarak hesaplanmaktadır (37). (LVDSÇ= Sol ventrikül diyastol sonu çapı; İDK = İnterventriküler septum kalınlığı; ADK= Arka duvar kalınlığını simgelemektedir).

2.2.3. Sol Ventrikül Hipertrofisinin Gelişmesinde Sorumlu Olan Risk Faktörleri

Sol Ventrikül Hipertrofisi (SVH) gelişiminde rol oynayan risk faktörler; ileri yaş, obezite, hipertansiyon, koroner arter hastalığı ve düşük ejeksiyon fraksiyonu olarak tanımlanmaktadır (38).

Sol Ventrikül kütlesinin artması, ani kardiyak ölüm riskini arttırmaktadır, ancak SVH hastaları uzun yıllar hiçbir şikayetle ve bulguları olmadan ve normal veya normale yakın egzersiz rezervleri ile yıllarca yaşayabilirler. Bir kısım SVH hastası ise

diyastolik disfonksiyon, sistolik disfonksiyon veya her ikisine bağı kalp yetmezliği geliştirebilirler. Tüm bunlardan dolayı SVH tanısının konulmasına ve tedavi stratejilerinin belirlenmesine yönelik genetik çalışmaların yapılması büyük önem taşımaktadır (39).

2.3. ATEROSKLEROZ

2.3.1 Aterosklerozun Moleküler Mekanizması

Aterosklerosis, koroner arter hastalığı (KAH), karotid arter hastalığı ve peripheral arter hastalığının altında yatan en temel patolojik tablodur. İleri dönemde neden olduğu thrombosis ya da atheroslerotik plağın aşınması ve rüptürü sonucunda hayati tehlike yaratan akut koroner sendrom veya inme gibi yaşamı tehdit eden ve çoğunlukla mortalite ya da kalıcı hasarlara yol açtığı rapor edilmiştir (37,40).

Aterogenez ve aterosklerozun oluşum teorisi, endotel hücrelerinin, arter duvarındaki düz kas hücrelerinin, monositlerin, trombositlerin ve lipoproteinlerin etkileşimi ile açıklanmaktadır. Erken aterosklerotik lezyonların oluşmasında 3 önemli faktör düşünülmektedir. Bunlar; lipid metabolizma bozuklukları, vasküler hücre aktivasyonu ve enflamasyondur ve bunların etkileşimleri sonucunda da yağlı çizgilenmelerin oluştuğu gösterilmiştir (41).

Endotel Disfonksiyonu, aterosklerozun patogenezinde ilk temel basamağı oluşturur. Endotel, damar duvarında geçirgenliği belirleyen, damar lümenindeki hemostazı kontrol eden ve salgıladığı vazoaktif maddeler yoluyla damar tonusunu ve bağ doku yapımını kontrol eden bir organ olarak isimlendirilmektedir (41). Kronik hiperkolesterolemi, sigara kullanımı, sistemik hipertansiyon ve hiperglisemi gibi faktörler endotel disfonksiyonuna neden olarak ateroskleroz oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Endotel disfonksiyonu sonucu endotel hücreleri aktive olur ve adezyon molekülleri, sitokinler (IL-1, TNF- α), kemokinler (MCP-1, IL-8) ve büyüme faktörleri (PDGF, FGF) salgılanır. Adezyon molekülleri; Vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1), interselüler adezyon molekülü 1 ve 2 (ICAM-1, ICAM-2), Trombosit/endotel hücre adzyon molekülü (PECAM), selektinler (E-Selektin; endotel üzerinde, P-Selektin; trombosit üzerinde, L-Selektin; lökosit üzerinde) ve kadherinler olarak sınıflanabilir. Selektinler, endotel üzerinde, lökositlerin sıçrama ya da yuvarlanma şeklindeki hareketlerini uyarır (42). Endotel disfonksiyonu geliştiğinde, vazodilatör etkiye sahip nitrik oksit (NO) salınımı azalacağından dolayı vazokonstriksiyon geliştiği gibi oksijen radikallerinin üretimi de artmaktadır. Damar duvarının geçirgenliği artar ve lipoproteinlere geçirgenlik kazanır. Doku faktörünün ekspresyonuna bağı tromboz

gelişir ve hasara bağlı olarak adezyon moleküllerinin ekspresyonu, kemokin ve sitokin salınımı artmasının yanında trombositlerin ve enflamatuvar hücrelerin damar duvarına adezyonu artırdığı gösterilmiştir (43). Aktive olmuş endotel hücreleri aynı zamanda PDGF (plateletlerden türeyen büyüme hormone=platelet-derived growth factor) gibi büyüme faktörlerini salgılayarak vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve negatif yüklü proteoglikanlardan zengin ekstraselüler matriks depolanmasına neden olmaktadır. Yağlı çizgilenmelerin özellikle bu intimal kalınlaşma bölgelerinde olduğu bilinmektedir. Bu bölgede negatif yüklü proteoglikanların pozitif yüklü LDL partiküllerine bağlandığı ve makrofajların da LDLyi fagosite ettiği gösterilmiştir (44).

LDL Oksidasyonu ve Lipid Birikmesi, interstisyel boşlukta yağ depolanabilmesi için bir yağ kaynağına gereksinim vardır. Bu kaynak dolaşımdaki yağlardır. Dolaşımdaki yağların depolanması özellikle yüksek kolesterol düzeyleri ile bağlantılıdır (41). Kolesterol kanda değişik şekilde lipoproteinler olarak dolaşması yanında düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ateroskleroz oluşumunu arttırırken, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterolün damar duvarından ters taşınmasına neden olarak ateroskleroza karşı koruyucu rol oynamaktadır. LDL damar duvarına girmeden önce reaktif oksijen türevleri tarafından oksitlenir (okside LDL) (45). Okside LDL'nin yapısındaki ApoB100 değişikliğe uğradığı için LDL'nin makrofajlarda fagositoz hızı yükseltmekte olup intima içerisinde depolanmaktadır. Okside LDL kemokinlerin sitokinlerin adezyon moleküllerinin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasını uyarıldığı rapor edilmiştir (46).

Enflamasyon, aterosklerozda damar duvarında depolanmış lipidlere doğru aktive olmuş enflamatuvar hücreler yönlenmektedir (41, 46). Dolaşımdaki lökositler karakteristik olarak lipid akümüülasyonunun olduğu damar duvarındaki bölgelerde tutulurlar. Başlangıçta bu lökositler monosit halindeyken aktive olduklarında makrofajlara dönüşmektedirler (47). Lökosit aktivasyonu vasküler hücrelerden salınan kemokinler yoluyla olmaktadır. Monosit kemokin proteini-1 (MCP-1) endotelden okside LDL ve çeşitli uyarılarla salgılanmaktadır. MCP-1 monositlerin seçici yönlendirilmiş göçünde önemli sorumluluk yüklenmiştir. Lökositler üzerindeki CXCR2'e bağlanan bir molekül olan interlökin-8 de deneysel ateroskleroz oluşumunda rol oynamaktadır. IL-1, TNF α , CRP gibi sitokinler, adezyon moleküllerinin salınımını artırmasının yanında endotele daha çok lökosit ve LDL bağlanmasına neden olarak trombojenisiteyi arttırırlar. Aynı zamanda CRP monositleri uyararak koagülasyonda rol oynayan doku faktörü salınımını artırır. Tüm bunlar sonucunda lipid hareketliliği

tehlike sinyali olarak algılayan köpük hücreleri proinflamatuar hücrelerden olan hepler tipi T lenfositleri gibi daha fazla inflamatuvar hücre tutulumuna neden olurlar. “Helper T” lenfositleri ise IFN- γ ve IL-2 gibi sitokinlerin salınımına neden olarak monositlerin aktive makrofaj haline dönüşmesini sağlamaktadır. Yağlı çizgilenmenin klinik önemi olmadığı düşünülse de bazı yağlı çizgilenmeler fibrin ve yağ içeren gerçek aterosklerotik plaklara dönüşebilmektedirler (46). Aterosklerozun kompleks plaklar haline dönüşmesinde düz kas hücreleri önemli sorumluluk yüklenmektedir. Düz kas hücreleri, subendotelyal aralığa göç ederler, bölünürler ve sonucunda ekstrasellüler matriksi sentezlerler. Aterosklerotik plağın önemli kısmını hücre dışı matriks kısmı oluşturur. Düz kas hücrelerinden fazla miktarda kollajen üretimini sağlayan uyarılar; PDGF ve TGF- β ’ dır. Hücre dışı matriksin birikiminde de matriks moleküllerinin biyosentezinin matriks metalloproteinazlarla (MMP) dengesine bağlıdır. Hücre dışı matriksin MMP’ larla yıkımından ortaya çıkan makromoleküller düz kas hücrelerinin media tabakasından intimaya göç etmesine neden olur. Sonuçta lezyonun lipid dolu çekirdeğini, endotelyal yüzeyden ayıran fibröz bir şapka oluşur. Bu şapka, çevresinde kendi matriksinin kalın tabakaları bulunan uzun düz kas hücrelerinden meydana gelmektedir. Fibröz başlıkta bir yandan düz kas hücreleri tarafından ekstrasellüler matriks yapımı devam ederken diğer taraftan makrofajlar tarafından üretilen proteinazlar tarafından bağ dokusu yıkımı söz konusudur. Bu yapım ve yıkım çok sayıda sitokin tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (47).

Lökositlerin Bir Araya Toparlanması: Normal endotel hücresi lökositlerin adezyonuna direnç göstermektedir. Endotel yüzeyinde adezyon moleküllerinin ekspresyonu monositler ve T lenfositlerin endotele adezyonunu sağlamaktadır. Adezyon moleküllerinin başında immünglobülin üst ailesinden olan VCAM-1 ve 2 gelmektedir. Diğer bir lökosit adezyon molekülü ise selektinlerdir. Selektinler endotel hücresinde lökositlerin sıçrayan veya yuvarlanma tarzı hareketini teşvik etme eğilimi gösterirken immünglobülin ailesine ait olan adezyon molekülleri daha sıkı adeziv etkileşimi ve lökositlerin hareketsizleşmesini teşvik etme eğilimindedir (48).

Adezyondan sonra lökositlerin intima içine girmesi için bir sinyal gerekmektedir. Bu sinyali kemokin olarak bilinen moleküller tarafından sağlanmaktadır. Okside olmuş LDL’nin uyarması sonucunda endotel ve düz kas hücreleri dahil bir çok hücre tarafından MCP-1 proteini salgılanır. MCP-1 monositlerin seçici yönlendirilmiş göçünü sağlamaktadır. Lökositler üzerindeki CXCR2’ye bağlanan bir molekül olan interlökin-8 de deneysel ateroskleroz oluşumundan sorumludurlar (49).

2.3.2. Aterosklerotik Lezyonlar

Yağlı çizgilenme, çok sayıda köpük hücrelerinin intimada birikmesi ve erken yaşlarda bile gözlenebilen ateroskleroz lezyonudur. Makroskopik olarak bakıldığında damar lümeninde kan akımı yönünde sarı çizgiler olarak görülürler. Kan LDL düzeyi azalması ile birlikte lezyona göç eden lipid miktarı azalması sonucunda lipid düzeyinin artmasına bağlı olarak lezyonun gerilediği ve yerinde sadece skatriks dokusu kalır. Eğer tersi olursa lezyon bir ileri lezyona geliştiği rapor edilmiştir (50).

Fibröz plaklar makroskopik olarak çoğunlukla lümeneye doğru büyüyen beyaz renkli lezyonlar olarak tanımlanan mikroskopik olarak lipid çekirdek, büyük miktarda düz kas hücreleri, makrofajlar, köpük hücreleri, T lenfositler ve ekstra sellüler matrikste yer almaktadır (51).

Lezyonlar ilerledikçe hücre dışı lipid birikmeye başlar. Hücre dışı lipid havuzunun büyük miktarını köpük hücrelerinin apoptosizi sonucu köpük hücrelerinde depolanan kolesterol esterlerinin açığa çıkması sonucunda oluşmaktadır. Çok az kısmını ise lümeneye geçen lipoproteinlerden meydana gelmektedir. Makrofajların sürekli çoğaldıkları ve monositlerin de sürekli lezyon içine göçtükleri göz önüne alındığında makrofaj sayısının aşırı artmaması apoptosizi görüşünü desteklemektedir. Plakda ise lipid çekirdek etrafında metalloproteazları üreten makrofajların yer aldığı belirlenmiştir (52).

Olgunlaşan aterosklerotik plakta lipid çekirdeğin üzeri fibröz başlık ile örtülüdür. Fibröz başlık medyadan intimaya geçen düz kas hücreleri ve onların ürettiği bağ dokusundan (kollajen lifleri, elastin, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar) oluşmaktadır. Düz kas hücrelerinin göçü ve proliferasyonu PDGF, FGF gibi büyüme faktörlerinin uyarısı ile gerçekleşir. Düz kas hücreleri ekstrasellüler matriks yapma yeteneğinde olan onarıcı hücreleri olarak tanımlanmıştır (53).

Fibröz başlıkta bir yandan düz kas hücreleri tarafından ekstrasellüler matriks yapımı devam ederken diğer taraftan makrofajlar tarafından üretilen proteazlar tarafından bağ dokusu yıkımı olmaktadır. Bu yapım ve yıkım çok sayıda sitokin tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir (53).

Fibröz plaklar damar lümenini anlamlı bir şekilde daraltsalar bile sağlam kaldıkları sürece önemli klinik olaylara yol açmadıklarına inanılmaktadır. Fibröz başlık ne kadar kalınsa plak o kadar dayanıklıdır. Lipid ve inflamatuvar hücrelerden zengin ve

ince fibröz kapsüle sahip plaklar yüksek yırtılma, zedelenme riskine sahip olduğu gösterilmiştir (53).

Komplike lezyonlar, lipid, enflamatuvar hücre ve fibröz dokuya ek olarak hematom, hemoraji ya da trombüs içeren plaklardır. Komplike olmaya aday plaklara kararsız, dayanıksız (unstable veya vulnerable) plaklar ismi verilmiştir (53).

Dayanıklı olmayan plaklar, plak hacminin en az yarıya yakınına oluşturan büyük lipid çekirdek, çok sayıda inflamasyon hücresi, düz kas hücresi ve kollajen içeriği azalmış ince fibröz kapsül ve çevresinde artmış çevresel stres ile karakterize edilmektedir. Kararsız plakların yaralanmaya en açık bölgeleri fibröz kapsülün damar duvarı ile birleştiği omuz bölgelerinde yer almaktadır (52).

Lipid çekirdeğin etrafındaki makrofajlar tarafından salgılanan metalloproteinazlar (kollajenaz, elastaz, strome, lizin) ismi verilen enzimler fibröz kapsülün kollajen içerikli matriksini parçalar. Ayrıca aktive olmuş makrofajlardan salınan IL-1 β , TNF α ve T lenfositlerden salgılanan INF- γ sinerjistik etki göstererek düz kas hücrelerinin ölümüne ve ekstrasellüler matriks azalmasına neden olurken bir yandan yıkımın artması diğer yandan yapımın azalması ile fibröz kapsül zayıflar ve en sonunda çatlar. Fibröz başlığı hasarlaşmış plakta prokoagulan maddeler kan elemanları ve pıhtılaşma faktörleri ile karşılaşp trombüs oluşumu tetiklemeye neden olmaktadır. Plak rüptürü ve trombüs oluşumu ile birlikte akut koroner sendromlar ismi verilen klinik olaylar başlamışlamasına neden olurlar (53). Aterom plağın rüptüre olması için damar lümenini önemli miktarda daraltması gerekmez. Ancak lümeni ciddi miktarda daraltmayan yukarıda bahsedilen dayanıksız plaklarda rüptüre olarak akut koroner sendromlara neden olabileceği hipotezi ileri sürülmüştür (54).

Amerikan Kalp Birliği (American Heart Association, AHA) lezyonların ilerleme sürecini 8 farklı evreye ayırmıştır. Bu yeni sınıflama morfolojik değişiklikleri klinik sonuçlarla birleştirerek konunun anlaşılmasını kolaylaştırdığı savı ileri sürülmüştür (52).

Tip I lezyon, az lipid ve seyrek köpük hücreleri bulunmaktadır. Tip I lezyonlar genellikle adaptif intimal kalınlaşmalarla aynı yerleşime sahiptir. Tip II lezyonlarda ise köpük hücreleri oldukça artmış olup, yağlı çizgilenmeyi oluştururlar (55). Bu lezyonlarda seyrek T hücreleri, mast hücreleri ve lipid dolu düz kas hücreleri de bulunabilir. Bu lezyonların bir bölümü geriler veya yaşam boyu değişikliğe uğramadan

kalırken bir kısmı tip III lezyona ilerler. Tip II lezyonlar da, adaptif intimal kalınlaşmalar ile aynı yerleşimde olma eğilim gösterdiği açıklanmıştır (56).

Tip III lezyon, klasik patolojide aterosklerotik plak veya aterom olarak kabul edilen ilk lezyon evresidir. Tip II lezyon–dan en önemli farkı, makrofajların ve T hücrelerinin altında, lezyonun daha derin bölgelerinde, az da olsa hücre dışı lipid birikimlerinin başlamasıdır. Tip III lezyonların, gelecekteki klinik hastalığın başlatıcısı oldukları görüşü bilim dünyasında taraftar topladığı gözlemlenmektedir (54).

Tip IV lezyonlarda, artan hücre dışı lipidler kolesterol havuzu oluşturmaktadır. Lipidler, yıkılan köpük hücrelerinden veya lipoproteinlerin doğrudan birikimlerinden kaynaklandığı gösterilmiştir (47). Lipid çekirdek, enflamatuvar hücreler ile çevrelenir. Düz kas hücreleri ve bağ dokusu, ince bir tabaka şeklinde bu lipid çekirdeğini kaplamaktadır. Adventisyadaki damar dokusundan kaynaklanan kılcal damarlar, plağın daha derin bölümlerine doğru ilerlemeye başlamaktadır (56). Tip IV lezyonlarda, adaptif intimal kalınlaşma bölgelerinde gelişim göstermektedir. Bu lezyonlar, genellikle hilal şeklindedir ve bir çatallanma bölgesinde akımı bölen karşıt arter duvarının kalınlığını arttırmaktadır. Bu evrede arter, ilk lümen hacmini koruyabilmek için yeniden biçimlenir ve damarın dış sınırına doğru ovalleşmektedirler. Tip IV lezyonu anjiyografi ile göstermek zordur. Klinik olarak sessiz olsalar da, yırtılma potansiyelleri nedeniyle intravasküler ultrasonografi, manyetik rezonans gibi değişik görüntüleme yöntemleriyle tanınmaları mümkündür. Son anjiyografik değerlendirmesi normal olan bir koroner arterde, tıkanıklık ya da anlamlı bir darlık geliştiğinde en muhtemel açıklama, yırtılmış tip IV lezyon üzerinde trombüs gelişimi olarak tarif edilmektedir (55).

Tip V lezyonlarda, lipid çekirdeği örten fibröz dokunun hacminin artması sonucu oluşan bu fibröz doku artışı düz kas hücrelerine bağlıdır. Düz kas hücreleri, çoğalırlar ve kollajen ve proteoglikanlar gibi ekstrasellüler matriks proteinlerin salgılanmasından sorumludur. İnsan arter intiması, normalde bir miktar düz kas hücresi içermektedir. Tip V lezyonlarda fibröz dokuyu oluşturan düz kas hücrelerinin, medyadan mı geldikleri ya da önceden var olan intimal hücrelerden mi kaynaklandığı konusu henüz açıklık kazanmamıştır (57). Kollajen, tip V lezyonların baskın unsuru olup kılcal damarların lezyon içindeki gelişimleri, tip IV lezyona göre daha belirgindir. Tip V lezyonlar, yeniden biçimlenme ile dengelenemeyecek kadar büyük olduklarından, arter lümenini daraltırlar ve anjiyografi ile görüntülenebilir özellik kazanırlar. Klinik olarak angina pektoris neden olabilirler. Tip V lezyonlar sıklıkla lümene yayılırlar ve

laminer kan akımını bozmaktadır. Tip VI lezyonlar, trombüs ya da hemoraji odakları bulunan komplike plaklardır. Tip VI lezyon gelişiminin ana nedeni, plak yırtılmasıdır. Bu tip lezyonlarda endotel altı fibröz dokunun fissür, erozyon ve ülserasyonlarına da sık rastlanır. Tip VI lezyonlar, damar dokularının plak içine ulaşan kılcal damarların kanaması sonucu da oluşabilirler. Akut koroner sendromlar, bir kaç istisna dışında tip VI lezyonuna bağlıdır (55, 57). Ancak, tip VI lezyonlar klinik semptomlar olmaksızın da gelişebilir. Yırtılmış plak üstünde gelişen trombüslerin çoğu fibrinolitik sistem tarafından kaldırılrsa da bir kısmı plak içine girebilir. Trombotik materyal, düz kas hücreleri tarafından fibröz dokuya dönüştürülür ve bu iyileşme süreci sonunda lezyon, tip V morfolojisine geri döndüğü gösterilmiştir (55, 58).

Tip VII ve tip VIII lezyonlar, lipid içermez ya da çok az lipid içermektedir. Tip VII lezyonlar kalsiyumdan, tip VIII lezyonlar ise kollajen açısından daha zengindir. Bu lezyonların, hastalığın son evresini oluşturduklarına inanılır. Kalsifikasyon, 69 yaş üzeri bireylerin koroner arterlerinde yaygın olarak bulunmasına rağmen genellikle plak büyümesine etki etmediği açıklanmıştır. Tip VIII lezyonlar, tip V ve VI lezyonlardan daha kararlıdır (58).

2.4. LİPOPROTEİNLER

2.4.1 Lipoprotein Metabolizması

Lipoprotein molekülleri globuler yapıdadır. Lipoproteinlerin iç kısmında hidrofobik (esterleşmiş kolesterol ve trigliserid) yer alırken, dış yüzeyinde hidrofilik (fosfolipid, kolesterol, proteinler) yapılar yer almaktadır (59).

Lipoproteinlerin yüzeysel proteini olan apolipoproteinler, yapının dayanıklılığını artırmanın yanı sıra metabolik aktivitelerinin belirlenmesin de görev alırlar. Lipoproteinlerin sınıflandırılması Tablo 2.4.1-1’de özetlenmiştir (59). Aterosklerozda önemli rol oynayan plazma lipoproteinleri metabolik açıdan yapısında ApoB olan (şilomikronlar, VLDL, LDL) ve yapısında olmayan (HDL) olarak iki gruba ayrılmıştır. Diyetle alınan lipidlerin ince bağırsak mukoza hücresine girmesiyle serbest yağ asitleri polar olmayan trigliseritleri, serbest kolesterol ise kolesterol esterlerini oluşturur. Polar lipitler ve ince bağırsak kaynaklı olan apolipoproteinler Golgi’de toplanarak paketlenirler. Şilomikron olarak isimlendirilen bu veziküller, ince bağırsak lenf sisteminden geçerek plazmaya ulaşırlar. Daha sonra HDL ile etileşerek ApoE ve ApoCII ile birleşirler (60).

Tablo 2.4.1-1. Lipoproteinlerin sınıflandırılması (59).

Lipoprotein	Yoğunluk (kg/L)	Temel Bileşeni	Apolipoprotein	Çapı (nm)
Şilomikron	0,95	TG	B48 (A,C,E)	75-12000
VLDL	0,95-1.006	TG	B100 (A,C,E)	30-80
IDL	1.006-1.019	TG,Kolesterol	B100, E	25-35
LDL	1.019-1.063	Kolesterol	B100	18-25
HDL	1.063-1.210	Protein	AI, AII, (C, E)	5-12

TG: Trigliserid, VLDL: çok düşük yoğunluklu lipoprotein, LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein, IDL: orta yoğunluklu lipoprotein, HDL: yüksek yoğunluklu lipoprotein.

Şilomikronlar plazmaya girdiğinde yapısında bulunan trigliseritler ApoCII tarafından aktive edilen Lipoprotein Lipaz (LPL) enzimi ile hidrolize olarak serbest yağ asitlerine dönüşmektedirler. Kalıntıları plazmadan ApoE ve ApoB reseptörleri ile temizlenmektedirler. Endojen lipid taşınma sistemi, ApoB100 içeren trigliserid açısından zengin lipoproteinlerin (VLDL) karaciğerden salınması ile başlamaktadır. VLDL'de bulunan trigliseridler lipolize uğrayarak serbest yağ asitlerine dönüşürler. Plazmada kalan IDL ve VLDL kalıntıları dolaşımında ApoE ve ApoB reseptörleri aracılığıyla temizlenmektedir. LDL, karaciğer ve perifer hücre zarlarında bulunan LDL reseptörleri ile etkilerak endositozla karaciğere alınarak yıkıldıkları gösterilmiştir (60).

Anti-aterojenik lipoprotein olarak kabul edilen HDL metabolik açıdan iki şekilde incelenebilir. Birincisi HDL'nin alt gruplarının ortaya çıkmasını sağlayan metabolik yolaktır. İkincisi ise ApoE'nin yer aldığı ters kolesterol taşınma yollarıdır. Plazmada bulunan ApoE'nin %50'si HDL1 alt grubundan kaynaklanmaktadır. Ters kolesterol taşınmasında oluşabilecek düzensizlikler tüm kolesterol metabolizmasını dolayısıyla ateroskleroz gelişimini etkilemektedir. Ayrıca ApoE'nin genetik mutasyonları lipid taşınması ve ApoB regülasyonunda önemli değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir (61).

2.4.2 Hiperlipidemi Tipleri Ve Lipoprotein İlişkili Genetik Bozukluklar

Hiperlipidemi tipleri beş ana başlık altında toplanmıştır (Tablo 2.4.2-1) ApoE polimorfizm ile yakından ilişkili olduğu belirlenen Tip III hiperlipidemilerde , aterojen ve antiaterojen lipoproteinlerin yapısal proteinleri olan ApoE, ApoA, ApoC gibi apolipoproteinler mutasyonel şekilleri mevcuttur. Kolesterol ester transfer proteini, lipoprotein lipaz gibi metabolizmada görev alan enzimlerin eksiklikleri ya da LDL reseptörü gibi reseptörlerin sayısal veya nitelik olarak anomali göstermesi, genetik hiperlipidemilere ve koroner hastalıklara neden olan diğer ana faktörler arasında önemli bir yeri olabileceği rapor edilmiştir (59,62).

Tablo 2.4.2-1. Hiperlipidemi Tipleri (59).

Hiperlipidemi Tipi	Lipid/Lipoprotein Bozukluğu	İkincil Etkenler
Tip I	Yüksek TG Şilomikreon artışı	Lupus, diabet
Tip II (Ave B)	Yüksek Plazma Kolesterolu VLDL artışı LDL artışı	Nefrotik sendrom, diabet, obesite
Tip III	Yüksek TG Yüksek Plazma Kolesterolu Şilomikron artışı IDL Artışı	Genetik nedenler, lupus, hipotroid, Diabet, Obesite
Tip IV	Yüksek TG Normal Plazma Kolesterol VLDL artışı	Alkol, Renal Yetmezlik, Cushing, beta bloker
Tip V	Çok yüksek TG Şilomikron artışı VLDL artışı	Alkol, Renal Yetmezlik, Cushing, beta bloker

TG: Trigliserid, VLDL: çok düşük yoğunluklu lipoprotein, LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein, IDL: orta yoğunluklu lipoprotein, HDL:yüksek yoğunluklu lipoprotein.

ApoE polimorfizmi ile ilgili olduğu tespit edilen Tip III hiperlipidemilerde (61) olduğu gibi atorejen ve antiaterojen lipoproteinlerin yapısal proteinleri olan ApoE, ApoA, ApoC gibi apolipoproteinlerin mutasyonel şekilleri mevcuttur. Metabolizmaya katılan enzimler (LPL, HL, LCAT, CETP) eksiklikleri ya da LDL reseptörü gibi reseptörlerin nicel ve sayısal anomali göstermesi genetik hiperlipidemilerin ortaya çıkmasına ve ciddi koroner hastalıklara neden olabileceği gösterilmiştir (60,62).

2.5. APOLİPOPROTEİNLER

Lipoproteinlerin organ ve dokulara taşınması ve metabolik fonksiyonlarını tamalamaları ApoA, ApoB, ApoC, ApoE gibi özel yapısal proteinler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu proteinlerin özellikleri ve görevleri Tablo 2.5-1.'de özetlenmiştir (59). Apolipoproteinlerin metabolik görevleri birbirine yakın olmakla beraber genel fonksiyonları iki temel noktada toplanmıştır. Bunlar fiziksel özellikleri nedeniyle lipidlerin plazmada çözünürlüklerini sağlamaları ve dayanıklılık kazandırmaları, diğeri ise kolesterol ve lipoprotein metabolizmasında düzenlenmesini sağlamalarıdır. Hücre yüzeyindeki özgül protein reseptörlere bağlanarak yapısına katıldıkları lipoprotein hücre içine alınmasında ve hücre içi kolesterol dengesinde görev almaktadır (60,62).

2.6. APOLİPOPROTEİN E

Apolipoprotein E (ApoE), 1973 yılında Mahley ve arkadaşları tarafından (2009) VLDL'nin yapısal proteini olarak tanımlanmış ve sonraki yıllarda en fazla ilgi çeken apolipoproteinlerden biri olmuştur (63). ApoE, şilomikron, şilomikron kalıntıları, IDL, VLDL, VLDL kalıntıları ve HDL'nin 'ApoE'li HDL diye isimlendirilen, molekül ağırlığı 34.125 dalton alt olan, polipeptid yapıda olan yapısal proteindir. ApoB'yi tanıyan LDL reseptörü, hepatik reseptör ve LDL reseptör ilişkili protein tarafından tanınarak kolesterol hemostazı ve lipoprotein metabolizmasında önemli rol oynar (59). ApoE'nin en önemli fizyolojik görevi lipoprotein metabolizmasında rol almasıdır. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörleri için ligand olarak görev yapan ve bu reseptörlerle etkileşimi sonucu çeşitli vücut hücrelerindeki kolesterol ve diğer lipidlerin taşınmasına katılan bir plazma proteini olarak görev yaptığı belirlenmiştir. Hücre içi kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde ve ters kolesterol taşınmasında önemli sorumluluk yüklenmiştir (62). Yapılan çalışmalarda ApoE'nin lipid metabolizmasının yanı sıra Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarla da etkili olduğu belirlenmiştir (63).

Tablo 2.5-1. İnsan Apolipoproteinlerinin Genel Özellikleri (62).

Apolipoprotein	Lipoprotein İlişkisi	Kr Sayısı	Gen Baz Sayısı	Molekül Ağırlığı (Kd)	Amino Asit Sayısı	Sentez Yeri	Fonksiyonu
A-I	HDL Şilomikron	11	1870	28	243	Karaciğer, İncebağırsak	lesitin kolesterol akil transferazı(LCAT) aktive eder
A-II	HDL Şilomikron	1	1337	17	77	Karaciğer	Reseptöre HDL bağlar, Reseptöre ApoE bağlayarak E-II kompleksi oluşturur
A-IV	Şilomikron	11	2600	45	376	İncebağırsak	LCAT aktivatörü kolesterol transportunda görev alır
B48	Şilomikron			246	2152	İncebağırsak	Yapısal protein, kolesterol transportunda görev alır
B100	VLDL LDL	2	4300	513	4536	Karaciğer	Yapısal protein, LDL reseptörüne bağlanır
C-I	Şilomikron VLDL HDL	19	4653	6,6	57	Karaciğer	LCAT aktivatörü
C-II	Şilomikron VLDL HDL	19	3320	8,9	79	Karaciğer	LPL için yardımcı kofaktör
C-III	Şilomikron VLDL HDL	11	3133	8,8	79	Karaciğer	Reseptör bağlayıcı
E	VLDL HDL	19	597	34	299	Karaciğer	LDL ve ApoE Reseptörüne Bağlanır
Apo a		6		400-800	4-6000	Karaciğer	Trombolizi ve Fibrinolizi modüle eder
D	HDL	3	12000	22	169	İnce Bağırsak	LCAT aktivatörü

ApoE %75 oranında karaciğer tarafından üretilmektedir. Astrosit hücreleri tarafından da sentezlenmesi nedeniyle beyin omurilik sıvısında ApoE'nin varlığı saptanmıştır (63). Bunun yanında yapılan araştırmalarda ApoE'nin mRNA'sının adrenal bez, akciğer, dalak, testis, over gibi pek çok organ ve dokuda bulunduğu gösterilmiştir. ApoE'nin normal plazma düzeyleri yaklaşık 4 ± 1 mg/dl olduğu belirlenmiştir. ApoE'nin metabolizma üzerindeki esas etkisi polimorfik varyasyonlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (64).

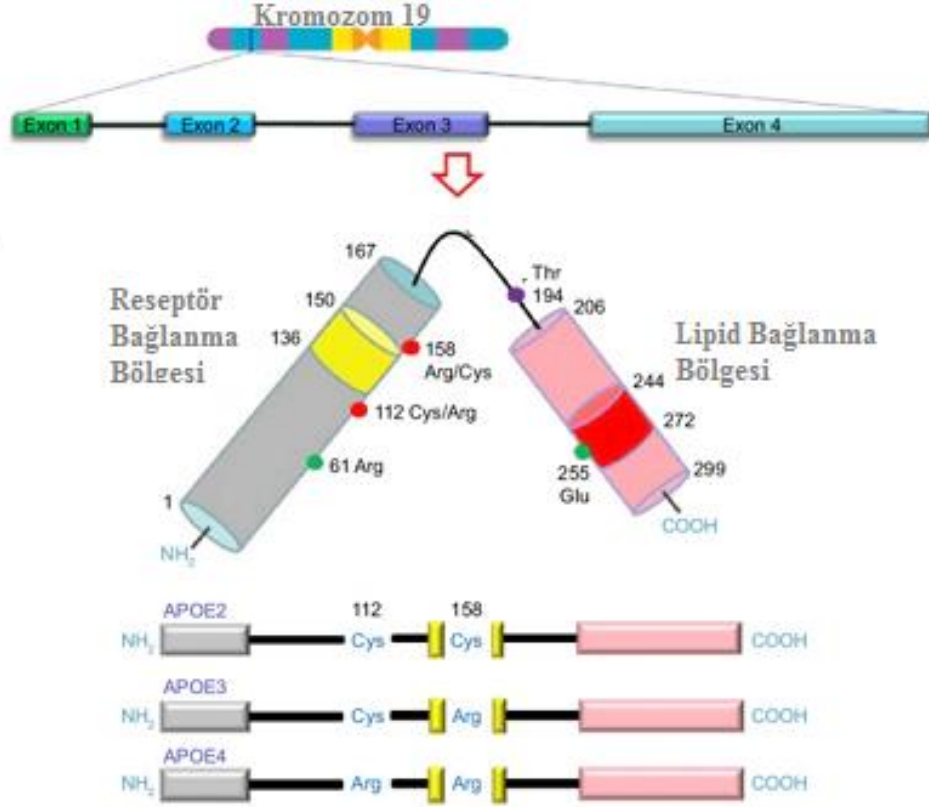
2.6.1 ApoE Geni Yapısı ve Fonksiyonu

Apo E geni 19. kromozom üzerinde yer almaktadır ve apolipoprotein CI (apo CI) ve bir apo CI pseudogenine bağlıdır. LDL reseptör geni ve apo CII geni de söz konusu kromozomun üzerinde yer almaktadır. Yer aldığı kromozomun uzun kolundaki 3,6 kilobaz uzunluğunda, dört ekson ve 3 introndan oluşan ApoE geninin dizisinin tamamı dizileme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (65). ApoE mRNA'sı 1163 nükleotidden oluşur ve ilk translasyon ürünü 317 amino asitten meydana gelmektedir. Plazmaya salınan olgun ApoE 299 (787 nükleotid) amino asit içerir (66). Oldukça karmaşık gen regülasyonuna sahip ApoE geninin her hücreye özgül 5' ve 3' bölgeleri mevcuttur. ApoE molekülü globular proteinlerin yapısal özelliklerinin tamamını taşımakta olup alfa heliks (%62), beta tabaka (%9), beta dönüm (%11) ve düzensiz olmak üzere 4 farklı yapıdan oluşmaktadır. Karboksi terminaline yakın, amfipatik alfa helikal bölge (202 ve 299 amino asitler arasında bulunan kısım) tüm apolipoproteinlerde olduğu gibi lipid bağlama ve taşınmasında önemli sorumlulukları söz konusudur. Bu ortak özellik alfa helikal yapının bir yüzünün polar diğer yüzünün apolar olmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 2.6.1-1). Ayrıca ApoE heparine bağlanabilme özelliğine sahiptir. Heparin ve ApoE molekülünün bağlanma bölgeleri 142-147 ve 243-272. amino asitleri arasında yer aldığı görülmüştür (67).

ApoE'nin en yaygın görülen üç temel izoformunun, tek bir gen lokusunda bulunan üç allelin ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) ürettiği Apo E2, E3 ve E4 olduğu kabul edilmiştir .

ApoE izoformlarının aminoasit dizilimi şu şekilde oluşmaktadır (63):

ApoE3	112.amino asit Sistein	158.amino asit Arginin
ApoE2	112.amino asit Sistein	158.amino asit Sistein
ApoE4	112.amino asit Arginin	158.amino asit Arginin



Şekil 2.6.1-1. ApoE Geninin Yapısı (67)

2.6.2. ApoE'nin Ateroskleroz ile İlişkisi

Çeşitli toplumlarda yapılan çalışmalarda ApoE4'ün yüksek plasma total ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolü ve koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (68). Koroner arter hastası erkeklerde izoelektrik odaklama ve Western Blotlama ile yapılan apo E fenotipleme çalışmalarında, plazma total ve LDL-kolesterol düzeyi apoE fenotipi izleyen şu sıraya göre arttığı gösterilmiştir: E3/2 < E3/3 < E3/4 < E4/4. Myokard infarktüsülü hastaların rölatif sıklığının da aynı sıraya göre arttığı belirlenmiştir. ApoE2 allelinin ise serum trigliserid düzeylerinde artışa neden olduğu savı öne sürülmüştür. ApoE4 alleline sahip bireylerin koroner arter hastalığı açısından yüksek risk taşıdığı ve bu hastaların daha sık infarktüs geçirdikleri bildirilmiştir. Ayrıca ApoE4'ün ateroskleroz için bir risk faktörü olduğunu ayrıca apoE4 allelinin koroner arter hastalığının şiddetini artırdığı yapılan araştırmalarda ortaya konulmuştur (69).

2.7. MİKRORNA

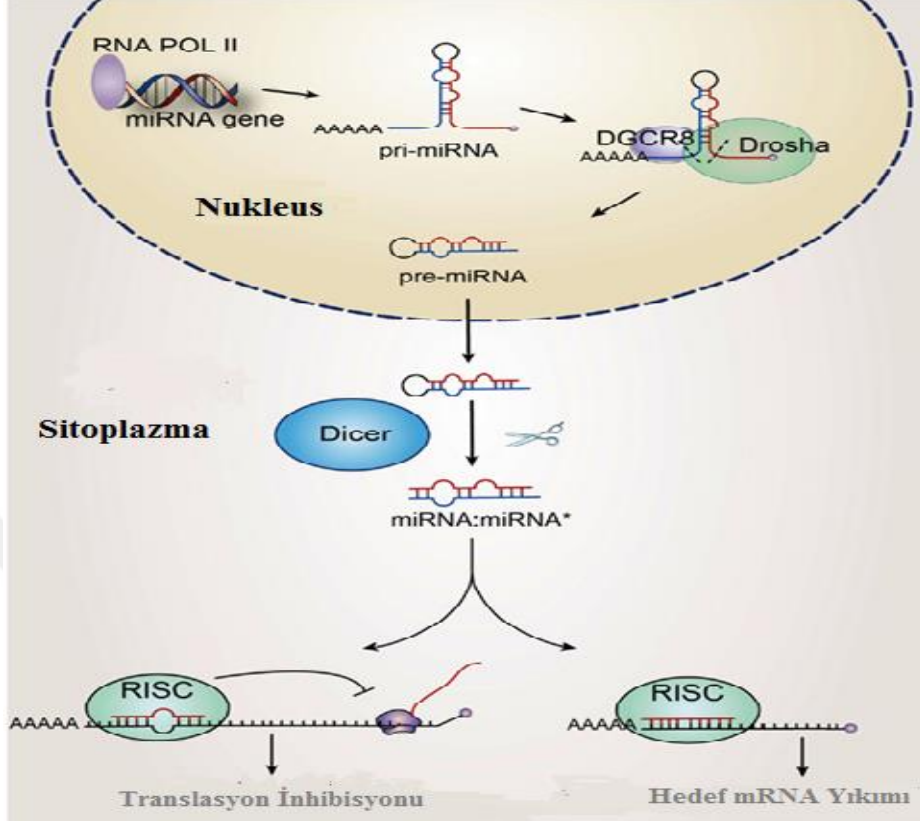
Son yıllarda yapılan tüm genom ve işlevsel analiz çalışmaları insan genomunun yaygın olarak binlerce düzenleyici kodlanmayan RNA'lar transkribe ettiğini ortaya koymuştur. MikroRNA (miRNA)'lar, küçük müdahale eden RNA (small interfering RNA: siRNA)'lar, P-element-induced Wimpily Testis (PIWI) etkileşen RNA (interacting RNAs: piRNA)'lar ve çeşitli uzun kodlanmayan RNAlar (long non-coding RNA: lncRNA)'lar en sık çalışılan kodlanmayan RNA'lardır (70). Ayrıca, genom üzerinde yer alan ve hastalıklarla ilişkili olan genetik varyasyonların büyük bir kısmının, protein kodlayan bölgelerin dışında kalan ve transkripsiyonu kontrol eden öncü (promoter), artırıcı (enhancer) gibi bölgelerde ve gen ekspresyonunu düzenlemede görev yapan kodlanmayan RNA'larla ilişkili olduğu gösterilmiştir (71).

miRNAlar transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyede negatif gen düzenleyici olarak görev yapan, yaklaşık 20-25 nükleotid uzunluğunda tek zincirli protein kodlaması yapmayan RNA dizileri olarak tanımlanmaktadır (70) İnsan genomunun %3'ünü oluşturan miRNA'lar protein kodlayan genlerin %30'unun düzenlenmesinde rol alır (72). miRNAlar hedef mRNA'ların 3' ucunda yer alan ve transkribe olmayan bölgesinde bulunan özgül bağlanma bölgeleriyle baz eşleşmesi yaparak gen ekspresyonunu düzenler (73). miRNAlar 5' uçlarında bulunan ve eşleşme sağlayan kısımları ile hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesinde 2-9 bazlık eşleşme yaparak bağlanmaktadır. Düşük özgüllükte bağlanma kapasitesine sahip olan miRNAların gen ifadesinin kontrolünde önemli bir rolü bulunmaktadır. Tek bir miRNA birden fazla mRNA'yı hedefi olabildiği gibi bir mRNA'yı hedefleyen birden fazla miRNA bulunabilmektedir (72). miRNAlar kendilerini kodlayan genlerdeki varyasyonlardan dolayı ilişkili oldukları protein sentez düzenlenmesini etkiledikleri için çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Ayrıca günümüzde çeşitli hastalıkların erken tanısında kullanılmak üzere çeşitli miRNA biyobelirteçleri belirlenmiş ve tanı amaçlı olarak yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.(74)

2.7.1. MiRNA Biyosentezi

miRNAların biyosentezi birbirini izleyen 3 aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 2.7.1-1). İlk basamakta miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA) transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci basamakta pri-miRNA'lar preküsör mi-RNA (pre-

miRNA)'lara dönüştürülür. Üçüncü basamakta ise olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleştiği gösterilmiştir (75).



Şekil 2.7.1-1. MiRNANA Biyosentezi (76).

Pri-mirRNA'lar, RNA Polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir,. Yaklaşık 700 nükleotid uzunluğunda, 5' Cap ve 3' Poli A kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadırlar (77). Çift zincirli pri-miRNA, RNAaz II enzim ailseinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü DGCR8 (DiGeorge Sendromu Kritik bölge Geni 8=DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) tarafında yaklaşık 70-100 nükleotid uzunluğunda ve hairpin yapısında olan pre-miRNA'ya dönüştürülür. Drosha ve DGCR8'in oluşturduğu komplekse Mikroişlemci Kompleksi (Microprocessor Complex) ismi verilmiştir (78).

Pre-miRNA, bir nülear taşıma reseptörü olan Exportin 5 tarafından tanınarak sitoplazmaya taşınır. Bu aşamadan sonra pre-miRNA sitoplazmada bulunan RNAaz III enzim ailesinden bir endonükleaz olan Dicer enzimi ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA olan miRNA: miRNA dubleksine çevrildiği gösterilmiştir (79).

Bir RNA bağlanma proteini olan TRBP (Transaktive edici cevabı oluşturan RNA bağlanan protein= Transaktivating Response RNA Binding Protein) Argonaute ve Dicer proteinleri ile bir araya gelerek trimerik bir ribonukleoprotein kompleksi olan RISC (RNA Tarafından Uyarılmış Susturma Kompleksi=RNA Induced silencing Kompleks) oluşumunu başlatır. Dicer tarafından pre-miRNA'nın sap ilmiği kesildikten sonra miRNA-miRNA dubleksinden sadece biri RISC kompleksine katılır . Bu kılavuz iplik (Guide strand) olarak adlandırılır ve RISC ile hedef mRNA'nın susturulması için etkileşime girer. Bu sırada diğer iplik (passenger strand) uzaklaştırılarak yıkıma yönlendirilir. Steem-loop pozisyonu ve termodinamik stabilitesi hangi ipliğin aktif olacağını belirleyen faktörler olduğu düşünülmektedir (80). miRNA, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra Argonaute proteini yardımıyla hedef mRNA yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olduğu gösterilmiştir (81).

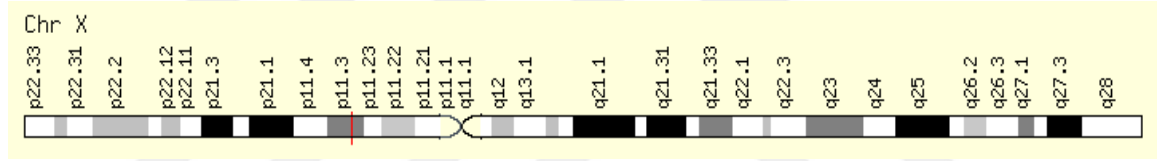
miRNAlar, hedef mRNA'ya seed adı verilen, yüksek oranda korunmuş ve 6-8 nükleotitten oluşan bir bölgeye (seed-site) bağlanarak etkileşir. Hedef mRNA ve miRNA'nın seed dizisi 5'ucunda yer alan 2.-8. Nükleotidleri arasında eşleşme olması hedefin belirlenmesi açısından önemlidir. miRNAlar, hedef mRNA'ya kısmi veya tam eşleşme göstererek bağlanabilir (82). Hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3'UTR (3' untranslated region) bölgesi ile miRNA seed dizisi arasındaki eşleşmenin seviyesi miRNA'nın hedefini ne kadar ve nasıl baskılayacağını belirler (83). miRNAların hedef mRNA'ya bağlanma bölgesi genellikle 3'UTR'dir ancak 5'UTR veya açık okuma çerçevesine (ORF=open reading frame) de bağlanabilmekte ve gen ifadesini baskılayabilmektedir (84). miRNAlar post transkripsiyonel düzenlemeyi genellikle tranlasyonu baskılayarak veya mRNA hedeflerinin yıkımına neden olarak gerçekleştirir. Eğer eşleşme çok yüksek seviyede ise RISC hedef mRNA'yı degrade eder. Bu yıkım RISC içindeki klavuz iplik (guide strand) aracılığıyla mRNA'nın poli A kuyruklarının ve 5'cap yapılarının yok edilmesiyle gerçekleştiği belirlenmiştir (85). Poli A kuyrukları ve 5'cap yapılarının yok olması sonucunda kararlılıkları azalan mRNA'lar hücrede bulunan enzimler ile parçalanır. Memeli canlılarda eşleşme az olduğu durumlarda translasyonun azaldığı gözlenmiştir. Mekanizma tam olarak aydınlatılamamış olsa da hedef genin mRNA seviyesi artarken protein seviyesinin değişmediği gözlenmiş, bu nedenle baskılamanın translasyonel seviyede olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda translasyonel seviyede düzenlemenin translasyonun

başlangıcında miRNA-RISC kompleksinin çeşitli transkripsiyon faktörlerini etkileyerek translasyonun başlangıç ve uzama aşamalarında engellendiği gözlenmiştir (86).

miRNAlar hücre proliferasyonu ve büyümesi, apoptosis, embriyonik gelişim ve doku farklılaşması gibi bir çok hücrel olayda rol oynayan anahtar moleküller olarak tanımlanmaktadır. MiRNAlarda oluşabilecek mutasyon ve ifade seviyesi bozukluklarının nörodejenartif hastalıklardan diabete, kalp hastalıklarından kansere kadar bir çok hastalığa neden olduğu düşünülmektedir (74).

2.7.2. miRNA221ve miRNA222

miRNA221ve miRNA222, X Kromozomunun p11.3 kolunda yer alan 23 nükleotidden oluşan kodlanmayan RNAlardır (Şekil 2.7.2-1 ve Şekil 2.7.2-2). Özellikle translasyonel fazda baskılama yaptıkları saptanmıştır. 528 tamamen, 184 az korunmuş bölge içerir. Korunmuş bölgelerinin 496 transkripti bulunduğu Felli ve arkadaşları (2005) tarafından gösterilmiştir (87).



Şekil 2.7.2-1. miRNA 221 ve miRNA222 kromozomal lokasyonları (88).

miRNA221ve miRNA222'nin sentezlendikleri kromozom bölgeleri arasında 726bp uzaklık bulunmaktadır. Şekil 2.7.2-3'de görüldüğü üzere iki miRNA, RNA Pol II tarafından uzun tek bir pri-miRNA olarak sentezlendikten sonra nükleusta bulunan mikroprosesör kompleks olan DGSR8 (DiGeorge Sendromu Kritik bölge Geni 8=DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) ile kesilerek ayrılırlar. Oluşan pre-mi221 ve pre-222 110 nükleotid uzunluğundadır ve Exportin 5 ve RAN-GTP RNA bağlayan proteinleri ile sitoplazmaya taşınırlar. Burada Dicer öncü pre-miRNAları olgun (mature miRNA) dublekslerine ayrılırlar. Her miRNA RISC (RNA Induced Silencing Complex) yapısının merkezi olan heterotrimetrik kompleks ile stabilize edilir. Bu kompleks Argonaute-2 (Ago2), TAR RNA bağlayan protein (TRBP) ve protein kinaz R-aktivasyon proteininden (PACT) meydana gelir. Bu aşamada RISC kompleksine bağlanan çift zincirli miRNAyı Dicer proteini tek tek zincirlere ayırır. Bu aşamadan sonra miRNA'nın rehber zinciri (guide strand) içeride kalırken geçici zinciri (passenger strand) kompleksi terk eder. Rehber zincir ve RISC kompleksi miRISC yapısını oluşturur. miRISC oluşumunda Glisin-triptofan proteinin 182kDa (GW182),

Metadherin (MTDH), Stafilokokal Nukleaz Domaini İçeren Protein 1(SND1) gibi bazı proteinler bu yapıya katılır. GW182'in iki durdurucu bölgesi bulunur ve translasyonel baskılamayı başlatarak hedef mRNA'nın bozulmasına neden olur. Ayrıca aynı baskılayıcı bölgeler çok sayıda glisin/triptofan tekrarı içerdiği için RISC kompleksinin dayanıklılığına destek oluşturur. SND1 ökaryotik birçok transkripsiyon faktörü için kofaktördür ve spliceosome gibi ribonükleoprotein komplekslerinin bir bileşenidir. Bu özellikleri nedeniyle RISC kompleksinin fonksiyonel etkinliğini ve kinetiğini artırır. MTDH, RISC kompleksinin iskele yapısını oluşturur ve RNaya bağlanma özelliklerini artırdığı gözlenmiştir (89).

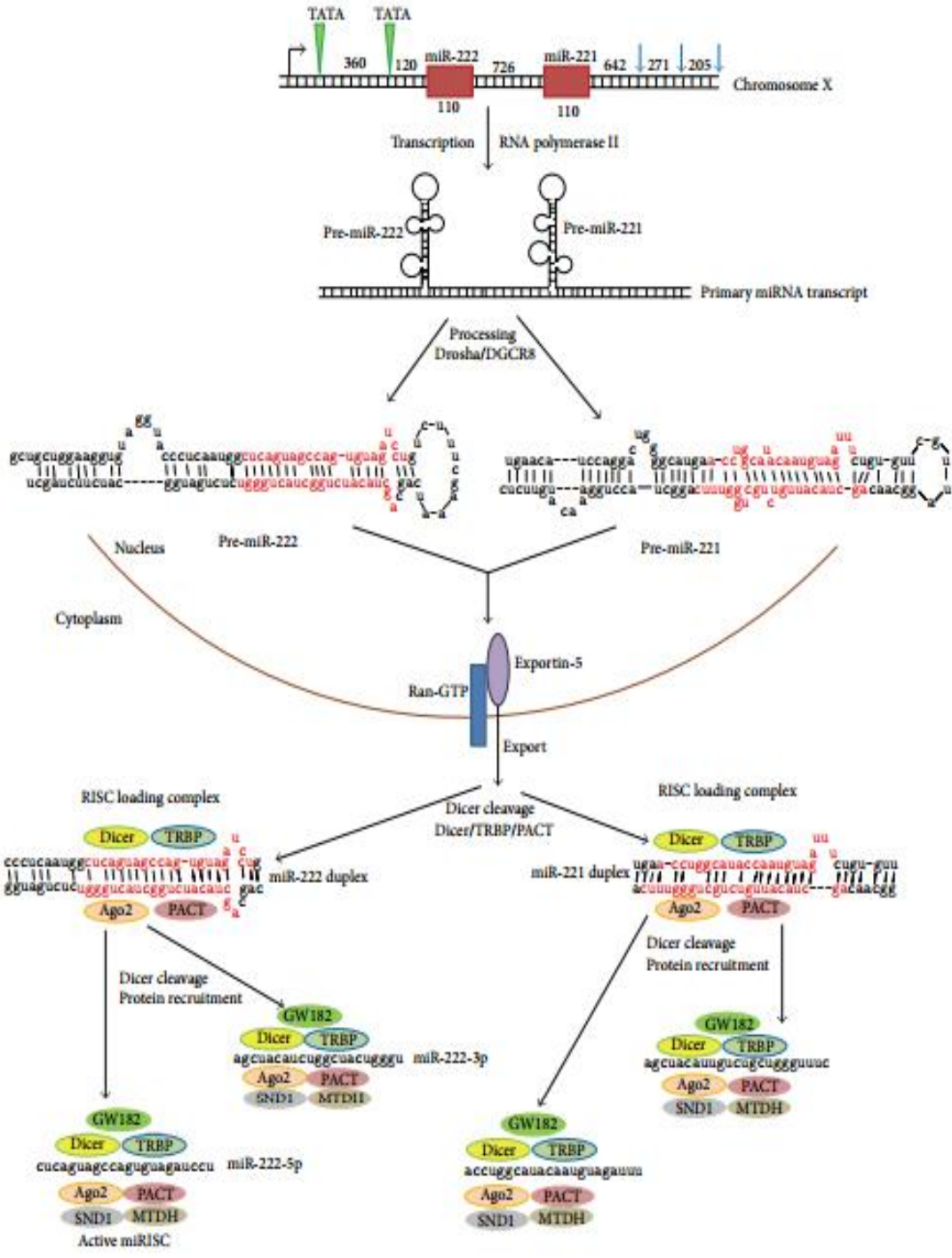
miRNA221-3p Dizisi : AGCUACAUGUCUGCGGGUUUC (90)

miRNANA222-3p Dizisi : AGCUACAUCUGGCUACUGGGU (90)



Şekil 2.7.2-2. miRNA 221 ve miRNA222 Nukleotid dizileri (91).

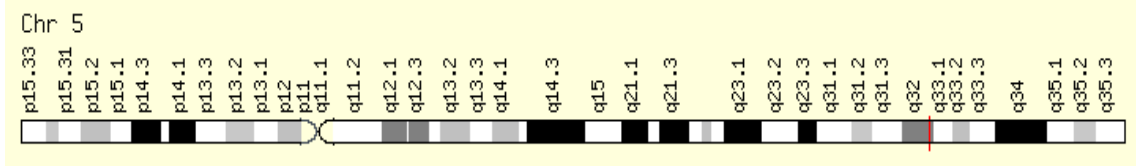
miRNA221ve miRNA222'nin belirli hedef genlerin bazıları sırasıyla Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B (p27, Kip1), Transkripsiyon faktörü 12, Pantothenate kinaz 3, gamma-aminobütirik asid (GABA), KİT geni, A Reseptör Alfa 1, MIS12 Kinetekor Komplkes Komponenti, Ökaryotik Translasyon Başlatıcı Proteini 5A2, Şaperon içeren TCP1, Altünite 5 (epsilon), mitokondrial ribozomal Protein S7, Tubulin, alfa 1a, Annexin A3, Acyl-CoA dehidrogenaz, C-4'den C-12'e düz zinciri, Ökaryotik Translasyon Başlatıcı Faktör 3, Altünite J, Poly(A)'ya bağlanan protein ilişkili protein 2, Düzenleyici Faktör X'dir (92).



Şekil 2.7.2-3. İnsan miRNA221 ve miRNA222'nin Biyogenezisi. (Ago2=Argonaute-2, DGCR8= DiGeorge Sendromu Kritik bölge Geni 8=DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8, GW182=Glisin-triptofan proteinin 182kDa, MTDH=Metadherin, PCAT= Protein kinaz-R Aktivör proteini, Ran-GTP:=Ran proteinine bağımlı GTP, SND1=Stafilokokal Nukleaz Domainsi İçeren Protein 1, TRBP=TAR RNA bağlanma proteini)(89).

2.7.3. miRNA 143 ve miRNA 145

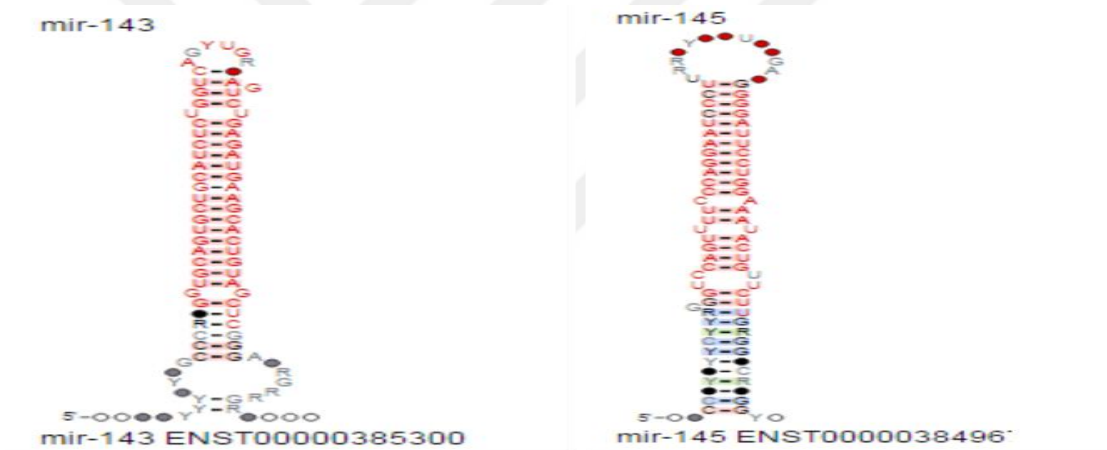
miRNA143ve miRNA145 kromozom 5'in q32 kolunda yer alan aynı küme miRNAlarıdır (Şekil 2.7.3-1 ve Şekil 2.7.3-2). Aynı kromozom bölgesinden transkribe olan bu miRNAlar hücre farklılaşması ve apoptosis yolları üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir (93)



Şekil 2.7.3-1. miRNA143 ve miRNA145 kromozomal lokasyonları (88).

miRNA143-3p Dizisi : UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC (90).

miRNA145-5p Dizisi : GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU (90).

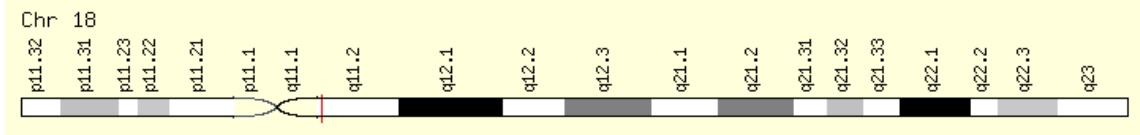


Şekil 2.7.3-2. miRNA 143 ve miRNA145 Nukleotid dizileri (91).

miRNA143'ün belirli hedef genlerin bazıları; Glukozid Xylosyltransferaz 1, Vazohibin 1, İntegral Membran Protein 2B, Atpase, Sınıf V, Tip 10A, İnsulin-Benzeri Büyüme Faktöre Bağlanan Protein 5, Musashi RNA-Bağlanan Protein 2, Atpase, H+ Taşıyıcısı Lizozomal 70kda, V1 Altünite A Olarak Tanımlanmışken MiRNA145-5p İçin; ATP-Bağlanan Kaset Protein, Alt-Aile E (OABP), Üye 1, Miyelin Protein Sıfır-Benzeri 2, Dab, Mitogen Cevabı Sorumlusu Fosfoprotein, Homolog 2, Potasyum Voltaj Bağımlı Kanal , Shaker-İlişkili Alt-Ailesi, Member 4, Abhidrolaze Domain İçeren 17C Olarak Tanımlanmıştır (92).

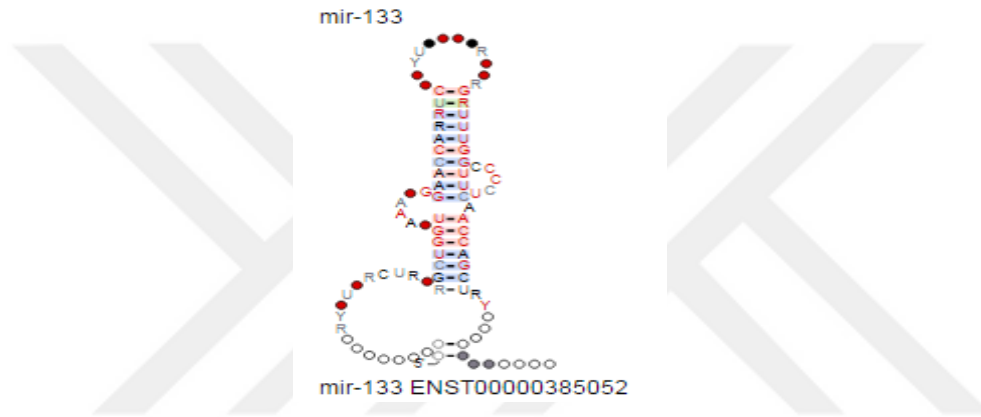
2.7.4. miRNA 133a

miRNA 133a, 18.kromozomun q11.2 kolunda yer almaktadır(Şekil 2.7.4-1 ve Şekil 2.7.4-2). Genellikle kas dokusunda bulunan kas ile ilişkili olmayan genler üzere baskılama görevi yaptığı gözlenmiştir (94).



Şekil 2.7.4-1. miRNA 133a kromozomal lokasyonu (88).

miRNA133a-3p Dizisi : AGCUGGUA AAAUGGAACCAA AU (90).

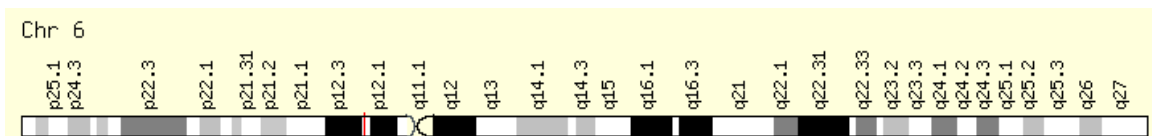


Şekil 2.7.4-2. miRNA 133a Nukleotid dizisi (91).

miRNA 133a'nın tanımlanmış hedef genlerine örnekler: Ubiquitin-Benzeri Aktive Edici Enzim 2, Lipoma HMGIC Füzyon Partneri, RNA Bağlayan Motif Proteini, X-bağlantılı Sifingozin-1-Fosfat, Fosfotaz 1, Kalatrin, Hafif Zincir A, Zinc Finger Protein 131, Transgelin 2 (92).

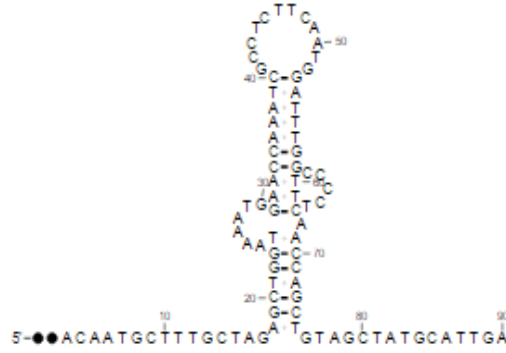
2.7.5. miRNA 133b

miRNA 133b, 6. kromozomun p12.2 kolunda yer almaktadır (Şekil 2.7.5-1 ve Şekil 2.7.5-2). Hücre büyümesini ve hücre döngüsünün ilerlemesini baskılayıcı görev yaptığı belirlenmiştir. Kemik Morfogenik Faktörü (Bone morphogenic factor=BMP) ve has hipertorifisinde görev alan genlerin üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (94).



Şekil 2.7.5-1. miRNA 133b kromozomal lokasyonu (88).

MiRNA133b-3p Dizisi : UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA (90).

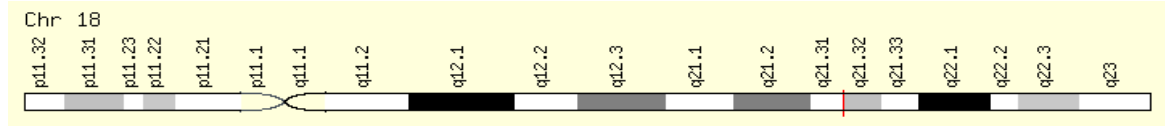


Şekil 2.7.5-2. miRNA 133b Nükleotid dizisi (91).

miRNA 133b'nin belirli hedef genleri sırasıyla; Lipoma HMGIC Füzyon Eşlikçisi, RNA Bağlanan Motif Proteini, X-bağlı Ubiquitin-Benzeri Aktivatör Artırıcı Enzim 2, Solute Taşıyıcı Ailesi 6 (Nörotransmitter Protein), Member 1, CUGBP, Elav-Benzeri Ailesi Üyesi 4, Protein Fosfotaz 2, Katalitik Subünit, Beta İzoenzim, Nükleoporin 153kDa, Klathrin, Hafif Zincir A olarak gösterilmiştir (92).

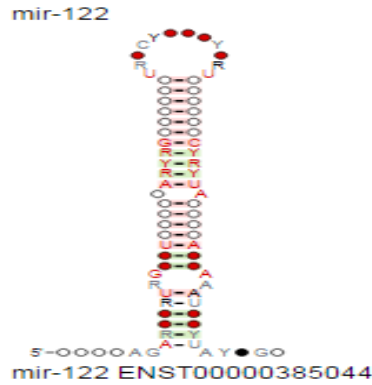
2.7.6 miRNA 122a

miRNA 122a, kromozom 18 de q21.31 lokasyonundan transkripte edilmektedir (90). (Şekil 2.7.6-1 ve Şekil 2.7.6-2).



Şekil 2.7.6-1. miRNA 122a kromozomal lokasyonu (88)

MiRNA122a-5p Dizisi : UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG (90).

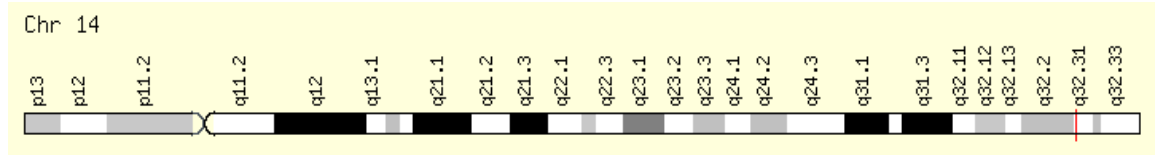


Şekil 2.7.6-2. miRNA 122a Nükleotid dizisi (91).

miRNA122a'nın belirli hedef genlerine örnekler sırasıyla; Heterogenik Nükleer Ribonükleoprotein U (Scaffold Ek A), klorid intrasellüler kanal 5, klorid intrasellüler kanal 4, Fosfotidilinositol-5-Fosfat 4-Kinaz, Tip II Alfa, Sitoplazmik Poliadenilasyon Elementi Bağlanan Protein 1, FK506 Bağlanan Protein 5 olarak tanımlanmıştır (92).

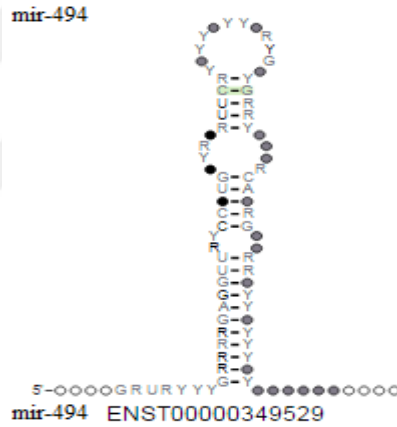
2.7.7. miRNA 494

miRNA 494, 14. kromozomun q32.31 kolunda yer almaktadır (90). (Şekil 2.7.7-1 ve Şekil 2.7.7-2).



Şekil 2.7.7-1. miRNA 494 kromozomal lokasyonu (88).

miRNA494-3p Dizisi : UGAAACAUACACGGGAAACCUC (90).

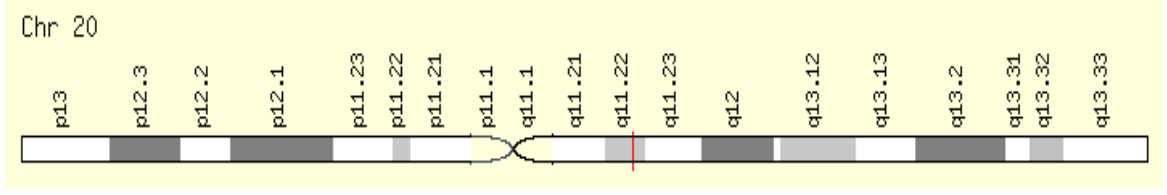


Şekil 2.7.7-2. miRNA 494 Nükleotid dizisi (91).

miRNA 494'ün belirli hedef genleri, Mikrofibrillar ilişkili Protein 3, Protein Tirozin Fosfat, Reseptör Protein Tip 12, Mörö-Onkolojik Ventral Antijen 1, K(Lizin) Asetiltransferaz 6A, A Kinaz (PRKA) Bağlayan Protein 7'olarak tanımlanmaktadır (92).

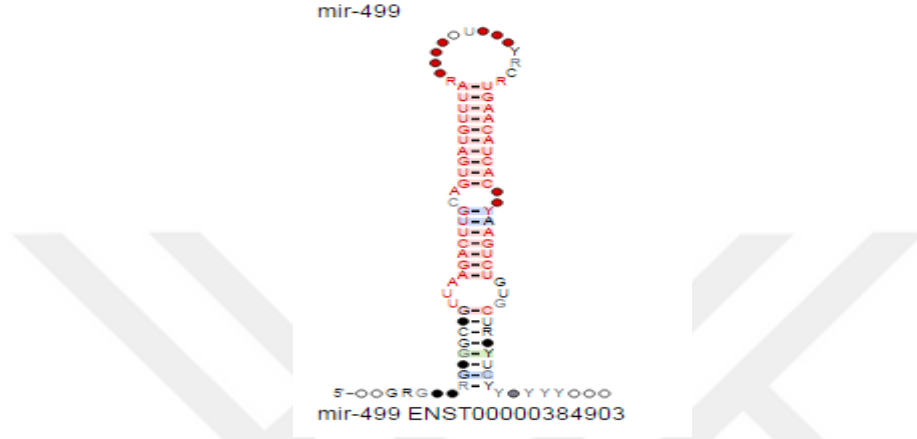
2.7.8. miRNA 499

miRNA 499, 20. kromozomun q11.22 kolunda yer almaktadır (90). (Şekil 2.7.8-1 ve Şekil 2.7.8-2).



Şekil 2.7.8-1. miRNA 499a kromozomal lokasyonu (88).

miRNA499-5p Dizisi : UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU (90).



Şekil 2.7.8-2. miRNA 499a nükleotid dizisi (91).

miRNA 499'un tanımlanmış hedef genleri sırasıyla; SRY (Cinsiyet Belirleyici Bölge Y=Sex Determining Region Y), EPM2A (Laforin) İlişkili Protein 1, Vav 3 Guanin Nükleotid Değişim Faktörü, Ekinoderm Mikrotübül İlişkili Protein Benzeri 4, DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Heliksaz 1, Arginine ve Glutamat Zengin Protein 1, Retikulokalbin 2, EF-terafı Kalsiyum Bağlayan Bölgesi, Karyoferin Alfa 3 (importin Alfa 4), Solute Taşıyıcı Ailesi 30 (Bakır taşıyıcısı), Member 4, Reseptör yardımcı Protein 1, Oksiterol Bağlayan Protein-Benzeri 1A, Çatalbaş kutusu P2, SKI-benzeri onkogen genleri olabilecekleri gösterilmiştir (92).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnek Seçimi Ve Tanımı

Çalışma Ateroskleroz Hasta grubu (n=89), Sağlıklı Kontrol (n=93) grubu olmak üzere 2 ana gruptan ve Hasta Grubu Sol Ventrikül Hipertrofisi tanısı olan (n=16) ve olmayan (n=73) 2 altgruptan oluşmaktadır. Çalışmaya Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran hastalar ve check-up kontrolü için yine aynı kliniğe başvuran sağlıklı kontroller dahil edildi. Kalp ve damar cerrahisi servisine başvuran ve muayene ile tanımlanmış koroner arter hastalığı tanısı konularak kardiyoloji kliniği tarafından koroner anjiyografi yapılan ve konsey kararı ile koroner arter baypas greft (KABG) ameliyatı planlanan hastalar dahil edilmiştir. Kontrol grubu ise, check-up kontrolü için kalp ve damar cerrahisi polikliniğine başvuran ve hikaye, fizik muayene, laboratuvar tetkikleri ve ekokardiyografi sonucunda koroner veya periferik arter hastalığı tanısı olmadığı tespit edilen bireyler arasından seçilmiştir.

Çalışmaya alınma kriterleri;

Elektif izole KABG cerrahisi uygulanacak olan koroner anjiyografi ile koroner arter hastalığı tanısı (ateroskleroz) konulmuş hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya alınmama kriterleri;

1. Sadece veya KABG ile kombine kalp kapak hastalığı, torasik aort anevrizması veya erişkin konjenital kalp hastalığı nedeniyle opere edilecek hastalar,

2. Üre, kreatinin yüksekliği veya böbrek yetmezliği olan hastalar ile diyalize giren hastalar,

3. Acil cerrahi uygulanacak hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

Hem çalışma hem de kontrol gruplarından, açlık kan şekeri, üre, kreatinin, ALT, AST, total kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol, trigliserit düzeyi, hemogram, HbA1c, C-reaktif protein düzeyleri ölçülmüştür.

Ateroskleroz tanısı

Ateroskleroz, belirti oluşturacak düzeye gelmedikçe klinik tanısı konulamaz. Kardiyoloji polikliniğine göğüs ağrısı ve/veya efor dispnesi gibi bulgular ile başvuran hastalardan hikaye, fizik muayene, elektrokardiyografi, efor testi, ekokardiyografi ve nihayetinde koroner anjiyografi yapılarak koroner arterlerde daralma ve/veya tıkanıklık

saptanılan ve KABG kararı alınan hastalar çalışmamıza ateroskleroz (+) olarak dahil edilmişlerdir.

Sol ventrikül hipertrofisi (SVH) tanısı

SVH tanısı için, sol ventrikül kütle indeksi (SVKI) esas alındı. Amerikan Ekokardiyografi Birliği'nin önerdiği şekilde septum, sol ventrikül çapları ve arka duvar kalınlıkları transtorasik ekokardiyografi ile deneyimli bir kardiyolog tarafından ölçüldü. Ölçülen değerler kullanılarak Devereux formülüne göre SVK hesaplanmıştır (37).

Bu formüle göre,

Sol ventrikül kütlesi (SVK)= $1.04 \times [(SVDSC\checkmark + İDK + ADK)^3] -13.6gr$ (SVDSC= Sol ventrikül diyastol sonu çapı; İDK = İnterventriküler septum kalınlığı; ADK= Arka duvar kalınlığı).

SVKI ise bu değer hastaların vücut yüzey alanlarına (VYA) bölünmesi ile bulundu (SVK/VYA) ve 90 birimin üzeri SVH için kriter olarak seçilmiştir.

Koroner arter bypass operasyonu

Çalışma grubundaki hastaların hepsine ameliyap öncesi gece ağız yoluyla ve operasyondan 1 saat önce 10mg intramüsküler yol ile Diazepam ile premedikasyon uygulanmıştır. Tüm hastalarda endotrakealentübasyon ile genel anestezinin indüksiyonu ve idamesi sağlanarak (fentanil, midazolam ve isofluran ile) ve standardize edilmiştir. Ameliyatlar aynı cerrahi ekip tarafından uygulanmıştır. Ameliyat sırasında kalp akciğer pompası olarak Terumo roller pompası (Terumo Advanced Perfusion System 1), membran oksijenatörü (Dideco Compactflo Evo) kullanılmıştır. Tüm hastalarda hafif-moderate (28-32°C) hipotermi ve 2.2-2.4L/m² pulsatil akım uygulanmıştır. Miyokardiyal koruma tepid antegrad kan kardiyoplejisi ile ve kros klemp kaldırılması öncesi 250-500ml sıcak kan ile "hot-shot" uygulaması ile sağlanmıştır. Perfüzyon basıncının perfüzyon süresince >70mmHg olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

3.2.1.Kullanılan Sarf ve Ayrac Malzemeler

DNA izolasyon:

İzolasyon karışımı pH 8,8 olan 10,5mM Tris-Cl, 10,5mM NaCl, 10,5nM EDTA, 8M Guanidiniumhydrochloride, 1,12mg/ml Proteinaz K'dan oluşmaktadır. DNA İzolasyon sistemi (iPrep Purelink, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc),

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 (miRNA221-3p, miRNA222-3p, mir 143-3p, miRNA 145-3p, miRNA133a-3p, miRNA 133b-3p, miRNA 122a-3p, miRNA 494-3p, miRNA 499-3p, Qiagen), microRNA Housekeeping Assay (mirRU6, mirSNORD61, SNORD68, Qiagen),

İzolasyon için kullanılan RWT Tamponu Guanidine tuzu içerir ve işlem den hemen önce 44 µl etanol eklenerek hazırlanır. RPE Tamponu izolasyon sırasında kolonlarda kalan tuz ve kalıntıları uzaklaştırmak için kullanılır ve 30 µl etanol eklenerek hazırlanmıştır.

Fluometre ile mikroRNA düzey belirleme: miRNA özgü Reagent, miRNA tamponu ile çalışma solüsyonu hazırlanır. Cihaz kalibrasyonu 10ng/µl rRNA içeren standart 1 ve 250pg/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 18m Ω su, Microamp Clear Adhesive Film,

LDL ve HDL Altgrup Analizinde Kullanılan Malzemeler:

Polyakrilamid jel içeren hazır jel kolonların içerisinde akrilamid, bisakrilamid, gliserol, pH 8,8 Tris tamponu, amonyum persülfad ve Tetramethylethylenediamine (TEMED), %1'lik Sudan Black (etilen glikol içinde), Lipoprint LDL Analiz kiti (Quantimetrix), Lipoprint HDL Analiz kiti (Quantimetrix), Lipoprint LDL Standart (Quantimetrix),

ApoE Genotipleme:

Tek bir reaksiyonda iki polimorfik kodonun (112 ve 158) eşzamanlı analizi için, Lightcycler 480 II Gerçek zamanlı PZR Cihazının kanallarında renk uygulama ve tanımlama sistemi kullanılmıştır (LightMix® Kit-Color Compensation 530/640 sistemi (TIB MOLBIOL, Roche Diagnostics). İki rehber boyanın farklı uyarılma ve ışım spektrum seviyeleri arasında fark kodonların ergime derecelerinin işaretlenmesi için

kullanılmıştır. ApoE Genotipleme Kiti (Lightmix ApoE C112R R158C Kit, TIB MOLBIOL, Roche Diagnostics), LightCycler Fast Start DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics),

ApoE Elisa:

Biotinle işaretlenmiş insan antijenleri, streptavidin HRP immun kompleksi, bovin serum albumin, saflaştırılmış apolipoprotein, sodyum fosfat tamponu pH7,4, iyonik olmayan deterjanlar (Twin 20), Kromojen A ve B çözeltileri içerir. ApoE Elisa Kit (Sun Redbio),

3.2.2. Kullanılan Cihazlar

DNA İzolasyon Robotu (iPrep Purelink, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc), NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc), Gerçek Zamanlı PZR (Lightcycler 480 II Instrument, Roche Diagnostics), Gerçek Zamanlı PZR (Fast Real Time 7500, Applied Biosystems), Lipoprint Dikey Elektropherez Tankı (Quantimetrix Model 1500), 7,6cm boyunda ve 0,5cm çapında hazır cam kolonlar, Elektropherez güç kaynağı (EC 100 XL, Thermo Fisher Scientific Inc), Densinometre (Artiscan M1 Microtek), Lipoprint LDL- HDL Altgrup Analiz Programı (V1.82 ImageSXM, Quantimetrix), Bilgisayar Apple), Fluorometre (Quibit 3.0, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc), Plate Santrifüj (Hettich), Santrifüj (Centrifuge 22R, Beckman Coulter), Microplate Yıkama Chazı (WHYM200, Poweam Medical Co.), Microplate Yıkama Chazı (WHYM200, Poweam Medical Co.), +4 C⁰ Buzdolabı (Haier), -20 C⁰ 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. Kandan Genomik DNA ve MiRNA İzolasyonu ve Saflık Tayini

3.3.1.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarından 5 cc'lik EDTA'lı tüplere alınan venöz kan örnekleri DNA izolasyonu yapılana kadar +4C⁰ buzdolabında saklanmıştır. Kan örneklerinden DNA izolasyonu, iPrep DNA ekstraksiyon robotu (Invitrogen) ile iPrep kandan genomik DNA izolasyon kiti (iPrep gDNA Blood kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ortamdaki tamponun pH'ı üzerinden

değiştirilebilir yüzey yüküne bağlı manyetik boncuk tabanlı teknoloji olarak tanımlanan robotik sistem için 350 µl kan örneklerinden DNA izole edilmiştir. Düşük pHlarda pozitif yüklü CST® (ChargeSwitchTechnology®) negatif yüklü nükleik asit iskeletine bağlanır. Pozitif yüke sahip proteinler ve diğer kirlenmeler söz konusu boncuklara bağlanamaz ve sıvı yıkama tamponu ile ortamdan uzaklaştırılırlar. Boncuklara bağlı DNA molekülü pH 8,5'e yüksek tampon çözeltileri ile nötralize edilerek izole edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri uygun tüplere alındıktan sonra +4°C buzdolabında saklanmıştır (95).

3.3.1.2. Genomik DNA Saflık ve Düzey Ölçümü

DNA örneklerin saflığı Nanodrop2000 cihazı ile ölçüldü. DNA örneklerinin saflığı OD₂₆₀/ OD₂₈₀ oranı kullanılarak belirlendi. Genotipleme için uygun saflıkta kabul edilen DNA'nın OD₂₆₀/ OD₂₈₀ değeri 1,7-1,9 arasında olan örnekler temiz olarak kabul edildi. Genomik DNA konsantrasyonları ng/ µl biriminde elde edilmiştir (96).

3.3.1.3. Serumdan mikroRNA İzolasyonu

MikroRNA izolasyonu için hasta ve sağlıklı gönüllülerden düz tüpe alınan kanlar örnekleri 4500rpm'de 15 dk santrifüj serum elde edilerek çalışma yapılana kadar -80°C 'de saklandı.

Serum örnekleri -80 °C'den çıkarılarak oda ısısında çözünmeye bırakıldıktan sonra 37 °C de inkübe edildi. 200 µl serum steril ependorflara alındı, üzerlerine 1000 µl liziz çözeltisinden (Qiazol Lysis Solution) eklendi ve çalkalandı. Bu işlemden sonra örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletildi ve üzerine stok olarak hazırlanan 3,5 µl "miReasy Spike in kontrol" (1.6 x 10⁸ kopya/µl) ilave edildi. Çeker ocak altında örnekler 200 µl kloroform eklendikten sonra 5dk vorteks cihazı ile çalkalandı ve oda ısısında 3 dk bekletildi. Söz konusu karışım +4 C de 12.000g'de 15 dk. santrifüj edildi. Üstte bulunan renksiz sıvıdan 600 µl alınarak temiz ependorflara alındı. Ayrılan berrak karışıma 900 µl %100 etanol eklendi ve vortexle karıştırıldı. Bu karışımdan 700 µl alınarak kolonların üstüne konulduktan sonra oda sıcaklığında 15 sn 8000g'de santrifüj edildi ve aynı işlem tekrarlandı. Kolonların üzerine 700 µl RWT tamponu eklendikten sonra 15 sn 8000g'de yapılan santrifüj işleminden sonra supernatant atıldı. Aynı işlem 500 µl RPE tamponu eklenerek tekrarlandı. Aynı kolonlara 500 µl % 80 etanol eklendi, 2 dk 8000g santrifüj edildi, supernatant atıldı. Kolonlar yeni tüplere yerleştirildi

ve kuru olarak 5 dk en yüksek hızda santrifüj edildi. Son olarak üzerine 14 µl RNA free su koyuldu 1 dk en yüksek hızda santrifüjlenerek mikroRNA izolatu elde edildi.

3.3.1.4. cDNA Eldesi

Elde edilen mikroRNA izolatlarına ters transkripsiyon işlemi (Tablo 3.3.1.4-1) uygulanarak (miScript II Kit, Qiagen) cDNA'ya çevrildi (Tablo 3.3.4-2). Elde edilen örnekler çalışmaya kadar -20°C 'de saklanmıştır (97).

Tablo 3.3.1.4-1. 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 3.3.1.4-2. cDNA Sentezi için İnkübasyon Koşulları

60 dk	37 °C
5 dk	95 °C
∞	95 °C

3.3.1.5. MikroRNA Saflık Tayini

RNA örneklerin saflığı Nanodrop2000 cihazı ile ölçüldü ve saflığı OD₂₆₀/ OD₂₈₀ oranı kullanılarak belirlendi. Saflık değeri OD₂₆₀/ OD₂₈₀ değeri 2'den büyük olan örnekler uygun olarak kabul edildi (98).

3.3.1.6. mikroRNA Düzeylerinin Belirlenmesi

mikroRNA düzeyleri fluometrik olarak belirlendi. İlk aşamada 199µl miRNA Tamponu ve 1µl miRNA Reagent (Qubit microRNA Assay, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) karıştırılarak 200µl çalışma solüsyonu hazırlandı. 10µl standart 1 üzerine 190µl çalışma solüsyonuna eklenerek 1 numaralı standart ve 10µl standart 2 üzerine 190µl çalışma solüsyonuna eklenerek 2 numaralı standart hazırlanmış ve sırayla cihaza standartlar tanıtılmıştır. Her örnek ölçümü için 198µl çalışma çözeltisine 2µl örnek

eklenerek toplamda 200µl'lik karışım elde edilmiş ve cihazda okuma yapılarak miRNA düzeylerinin tayinleri yapılmıştır (99).

3.4.1. Eş Zamanlı PZR ile Genotip ve MikroRNA Ekspresyon Analizleri

3.4.1.1. Eş Zamanlı PZR ile ApoE Genotip Analizleri

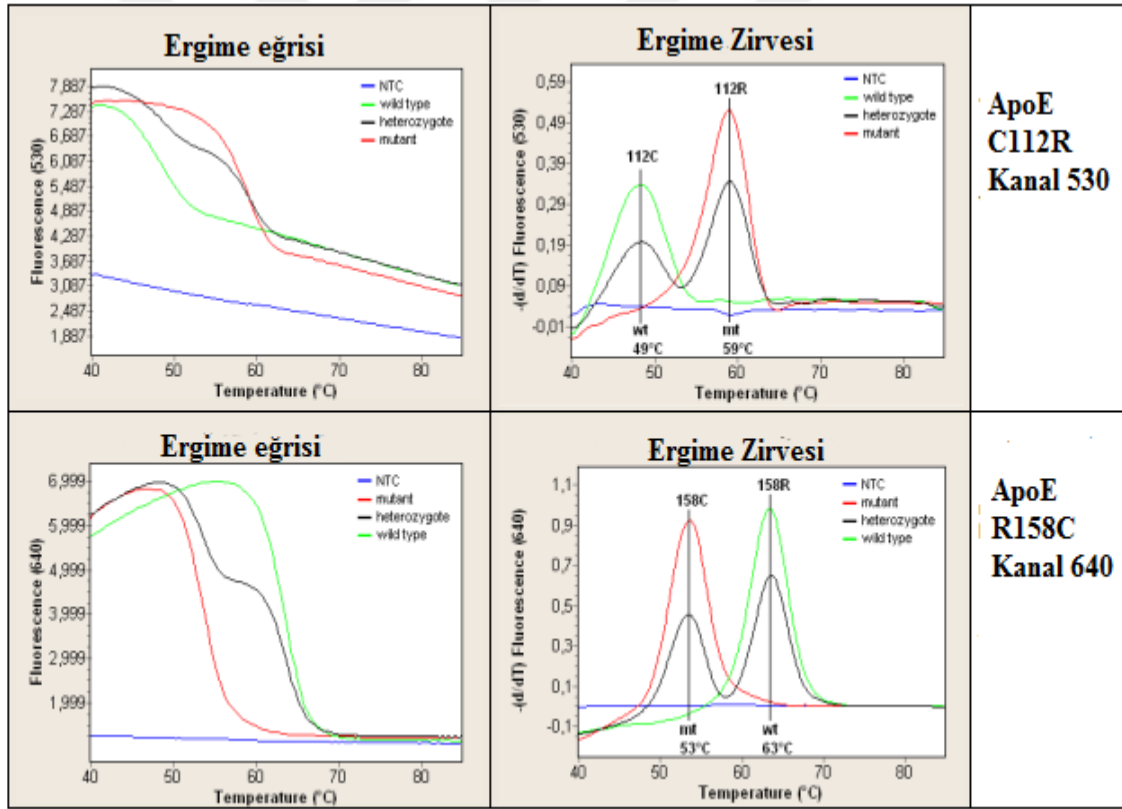
ApoE Genotipleme için Tablo 3.4.1-1'de belirtilen miktarlarda karışım hazırlanmış ve Tablo 3.4.1-2'de gösterilen koşullarda PZR uygulanmıştır. İnsan ApoE geninin 4 exonu, SimpleProbe® olarak bilinen, 265 bp uzunluğundaki spesifik primerlerle çoğaltılmaktadır. Primerlerin 3' ucunda floresans işaretli proplar yer almaktadır. Hibridizasyon prob çiftleri (keşif ve çakılı proplar) aynı ipliğin işaretlenmemiş PZR primerlerini hibriditize etmektedir. Proplar tarafından LightCycler cihazına özgü Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) üretilmesi sırasında ışımaya cihaz tarafından tanımlanır. FRET gerçekleşirken alıcı floresan 530nm ve 640nm dalga boylarında okuma yapmaktadır. 530 kanalında incelenen ApoE C112R probunda 112C varyansının ergime noktası (T_m) 49.0°C'de iken 112R varyansının T_m değeri 59.0°C olarak saptanmıştır. 640 kanalında analizi yapılan ApoE R158C kodonunun, 158R varyansı 63.0°C'de T_m değerine sahipken 158C varyansının T_m değeri 53.0°C olarak belirlenmiştir. Floresan uyarılmaları 530nm ve 640nm dalga boylarında sıcaklık düşüp proplar DNAdan ayrılıncaya kadar sürekli olarak kaydedilmiştir. Uygun kanallarda kaydedilen sinyaller daha sonra floresan negatif türevleri ile uygun ısı seviyesi farkı hesaplanarak ergime tepelerine (melting peaks) dönüştürüldü (Şekil 3.4.1.1-1). Farklı Floresan kanallarındaki ergime tepeleri homozigot ve heterozigot olarak ayırım yapılmasını sağlanmıştır. Sonuç olarak elde edilen değerler Tablo 3.4.1-3'de gösterilen ApoE Genotipleme tablosuna göre yorumlanmıştır (100).

Tablo 3.4.1.1-1. ApoE Genotipleme için PZR İçeriği

Ayıraç Karışımı (Reagent Mix)	1 µl
PZR Raksiyon Karışımı (Fast Start Master HybProbe Mix)	2 µl
MgCl ₂	1,6 µl
PZR Kalitesinde (PCR Grade) Su	10,4 µl
DNA	5 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.4.1.1-2. ApoE Genotipleme için PZR Koşulları

Denatürasyon	95 °C	10 dk	
Döngü Evresi	95 °C	5 sn	} 45 döngü
	60 °C	10 sn	
	72 °C	15 sn	
Ergime	95 °C	20 sn	} 1 döngü
	40 °C	20 sn	
	85 °C	00 sn	
Soğutma	40 °C	30 sn	



Şekil 3.4.1.1-1. ApoE Genotipleme için PZR Eğrileri: 530 kanalında C112R probu 112C/C homozigot doğal tip, 112C/R heterozigot, 112R/R homozigot mutant olarak değerlendirilmektedir. 640 kanalında R158C probu 158R/R homozigot doğal tip, 158R/C heterozigot, 158C/C homozigot mutant olarak belirlenmektedir.

Tablo 3.4.1.1-3. ApoE Genotipleme için Yorumlama Tablosu

Allel-Amino Asid	112C/C	112C/C	112C/C	112C/R	112C/R	112R/R
	158R/R	158C/C	158C/R	158C/R	158R/R	158R/R
ApoE Tipi	E3 / E3	E2 / E2	E2 / E3	E2 / E4	E3 / E4	E4 / E4
530 kanalındaki Tm pikleri	55 °C	55 °C	55°C /64°C	55°C /64°C	55°C /64°C	64°C
640 kanalındaki Tm pikleri	63 °C	63 °C	53°C /63°C	53°C /63°C	63°C	63°C

3.4.1.2.Eş Zamanlı PZR ile MikroRNA Ekspresyon Analizleri

Çalışma çerçevesinde araştırılması planlanan mikroRNAlar “mirbase” ve “targetscan” veri tabanları (<http://www.mirbase.org/>, <http://www.targetscan.org/>) kullanılarak belirlenmiştir. Aterosklerozun moleküler mekanizması üzerinde farklı etkileri olan mikroRNAlar ve hedef proteinleri bu veri tabanları ile analiz edilmiştir. Hücrelerinin çoğalmasında etkili olan hsa-miR-221-3p ve hsa-miR-222-3p, lipid metabolizmasında yer alan hsa-miR-122a-5p, kardiyak hipertrofide rol aldığı belirlenen hsa-miR-133a-3p ve hsa-miR-133b-3p, kardiyomiyopatide rol aldığı belirlenen hsa-miR-143-3p ve hsa-miR-145-5p, hücrelerin farklılaşmasında etkili hsa-miR-494-3p ve hsa-miR-499a-5p araştırılmak üzere seçilmiştir. Seçilen mikroRNAların primer dizileri Tablo 3.4.2-1’de verilmiştir. MikroRNA ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak delta Ct (ΔC_T) ve kat değişimi farklarını hesaplamak için 3 internal kontrol (housekeeping assay =mirRU6, mirSNORD61, SNORD68) kullanılmıştır. mikroRNA düzey belirleme hesaplamaları Livak formülü ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) kullanılarak yapılmıştır (101).

miRNA ekspresyon analizleri Gerçek Zamanlı PZR cihazında (Fast Real Time 7500, Applied Biosystems) gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4.2-2 ve Tablo 3.4.2-3). Syber Green (miScript SYBR Green PCR, Qiagen) ile işaretlenmiş cDNA dizisine analiz edilecek mikroRNA primerleri (miRNA221-3p, miRNA222-3p, miRNA143-3p, miRNA145-3p, miRNA133a-3p, miRNA 133b-3p, miRNA 122a-3p, miRNA 494-3p, miRNA 499a-5p, Qiagen) ve mikroRNA endojen kontrol (housekeeping) primerleri (mirRU6, mirSNORD61, SNORD68, Qiagen) bağlanması sonucunda cihaz tarafından cyber green boyasının floresan ışımaya miktarı saptanılması ile gerçekleştirilmiştir (102).

Tablo 3.4.1.2-1. Kullanılan mikroRNA primer dizileri

mikroRNA	Primer Dizisi
hsa-miR-221-3p	-AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC-
hsa-miR-222-3p	- AGCUACAUCUGGCUACUGGGU-
hsa-miR-122a-5p	- UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG -
hsa-miR-133a-3p	- UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG -
hsa-miR-133b-3p	- UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA -
hsa-miR-143-3p	- UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC -
hsa-miR-145-5p	- GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU -
hsa-miR-494-3p	- UGAAACAUACACGGGAAACCUC -
hsa-miR-499a-5p	- UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU -

Tablo 3.4.1.2-2. 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	5,5 µl
cDNA	2 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.4.1.2-3. 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	30 sn	
Ergime	95 °C	15 sn	} 1 döngü
	60 °C	1 dk	
	95 °C	30 sn	
Soğutma	60 °C	15 sn	

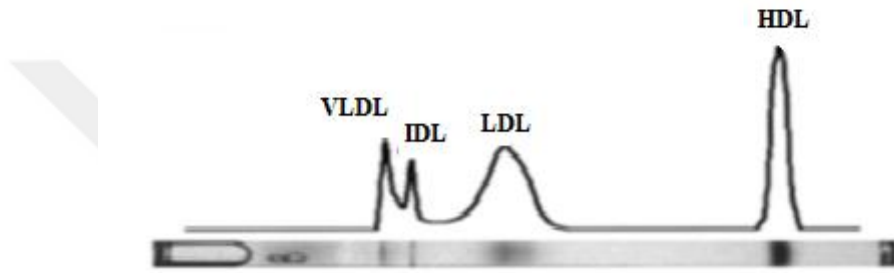
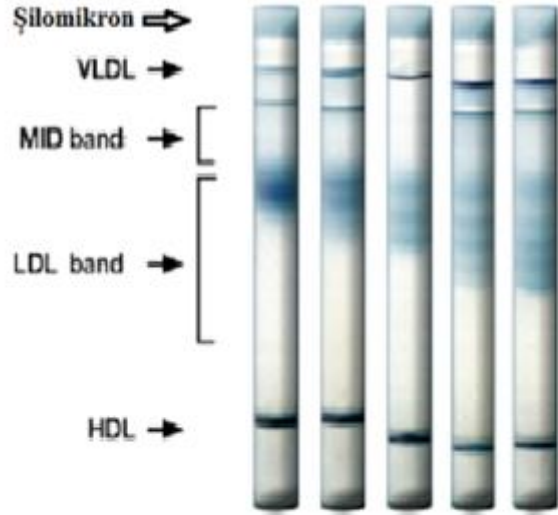
3.4.2.Serum ApoE Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum ApoE düzeyi SunRedBio marka Human ApoE™ ELISA Kiti kullanılarak ölçüldü. Çalışma öncesi -20° C derin dondurucuda saklanan serum örnekleri kullanılmıştır. Beş adet seyreltilmiş standart sırasıyla 160µg/ml, 80µg/ml, 40µg/ml, 20µg/ml, 10µg/ml olarak hazırlanmıştır. Standart kuyucuklarına 50µl standart ve 50µl Streptavidin-HRP eklenerek hazırlandıktan sonra serum örnekleri kuyucuk başına 40µl örnek, 50µl Streptavidin-HRP ve ApoE antikoru eklenmiştir daha sonra karışım çalkalandı ve mikropate'in üstü kapatılarak 37°C' de 60 dakika etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası otomatik mikropate yıkama cihazı ile 3 kere yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 50µl kromojen solüsyonu A ve sonrasında 50µl kromojen solüsyonu B eklendi ve mikropate hafifçe çalkalandıktan sonra 37°C' de 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50µl reaksiyon durdurma çözeltisi eklenip 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Her örneğin serum ApoE düzeyi µg /ml cinsinden hesaplanmıştır. Sistemin duyarlılığı 0,779 µg/ml ve değer aralığı 1 µg/ml -300 µg/ml olduğu Bury ve arkadaşları (1986) tarafından uygulanan yöntem ile gösterilmiştir. (103).

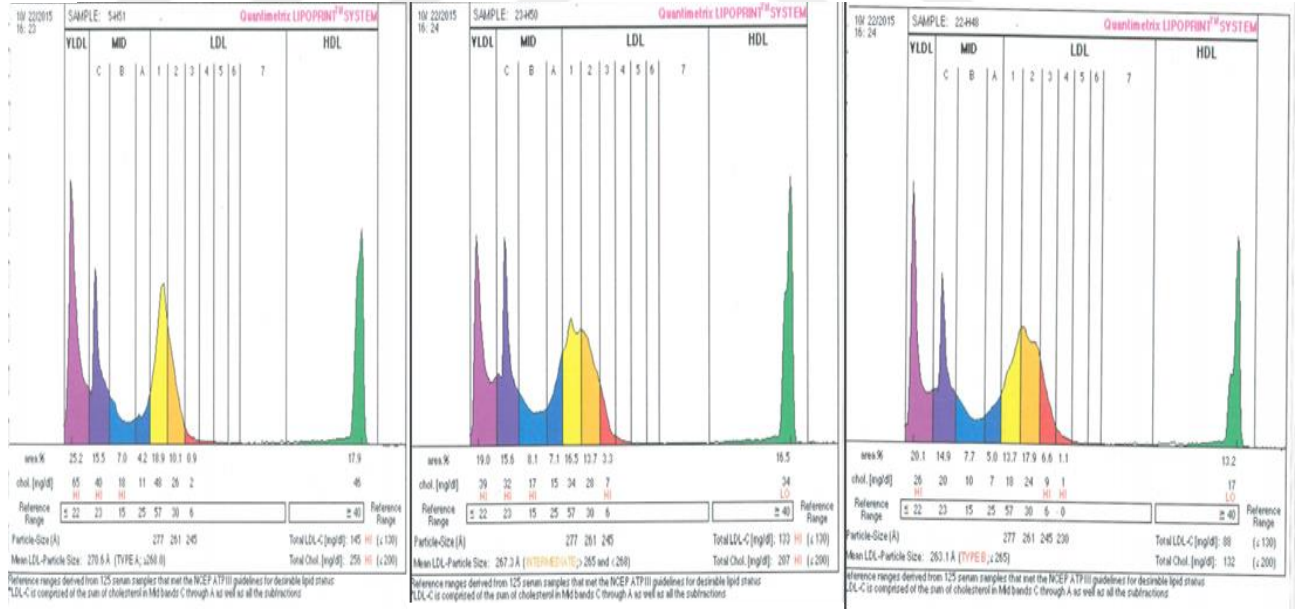
3.4.3.Lipid Alt Grup Analizleri

Düz tüplere alınan kan örneklerinden 45000rpm'de 15 dk santrifüj edilerek ayrılan serumlar -20C⁰'de saklanmıştır. LDL ve HDL altgrupları analizi için içerisinde %3'lük poliakrilamid karışımı TEMED ve aminonyum persülfad içeren 7,6cm boyunda ve 0,5cm çapında kolonlar kullanılmıştır. 25 µl serum, %1'lik W/V sudan black , etilen gliserol içeren karışım kolona ilave edildikten sonra oda ısında 30 dk foto-polimerizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu şekilde hazırlanan kolonlara tüp başına 3mA olacak şekilde 1 saat elektroforez işlemi uygulanmıştır. Daha sonra kolonlar 610nM dalga boyunda ölçülerek densinometrik olarak değerlendirilmiştir. LDL alt grupları densinometrik olarak ayrılması Tip A, Tip B ve Intermediate ve HDL alt grupları ise yoğunlukları ve boyutlarına göre küçük, orta ve büyük olarak değerlendirilmişlerdir. Densinometrik bulguların kantitatif olarak ölçümü Uluslararası Sağlık enstitüsü tarafından geliştirilen Microsoft bilgisayar programına göre yapılmıştır ([www.http://rsb.info.nih.gov/nih-image/](http://rsb.info.nih.gov/nih-image/)). LDL standartı mevcut olduğundan kantitatif olarak değerlendirilmiştir. (Şekil 3.4.4.1). HDL standartı mevcut olmadığı için kantitatif değerlendirme yapılamamıştır (Şekil 3.4.4.2) (104).

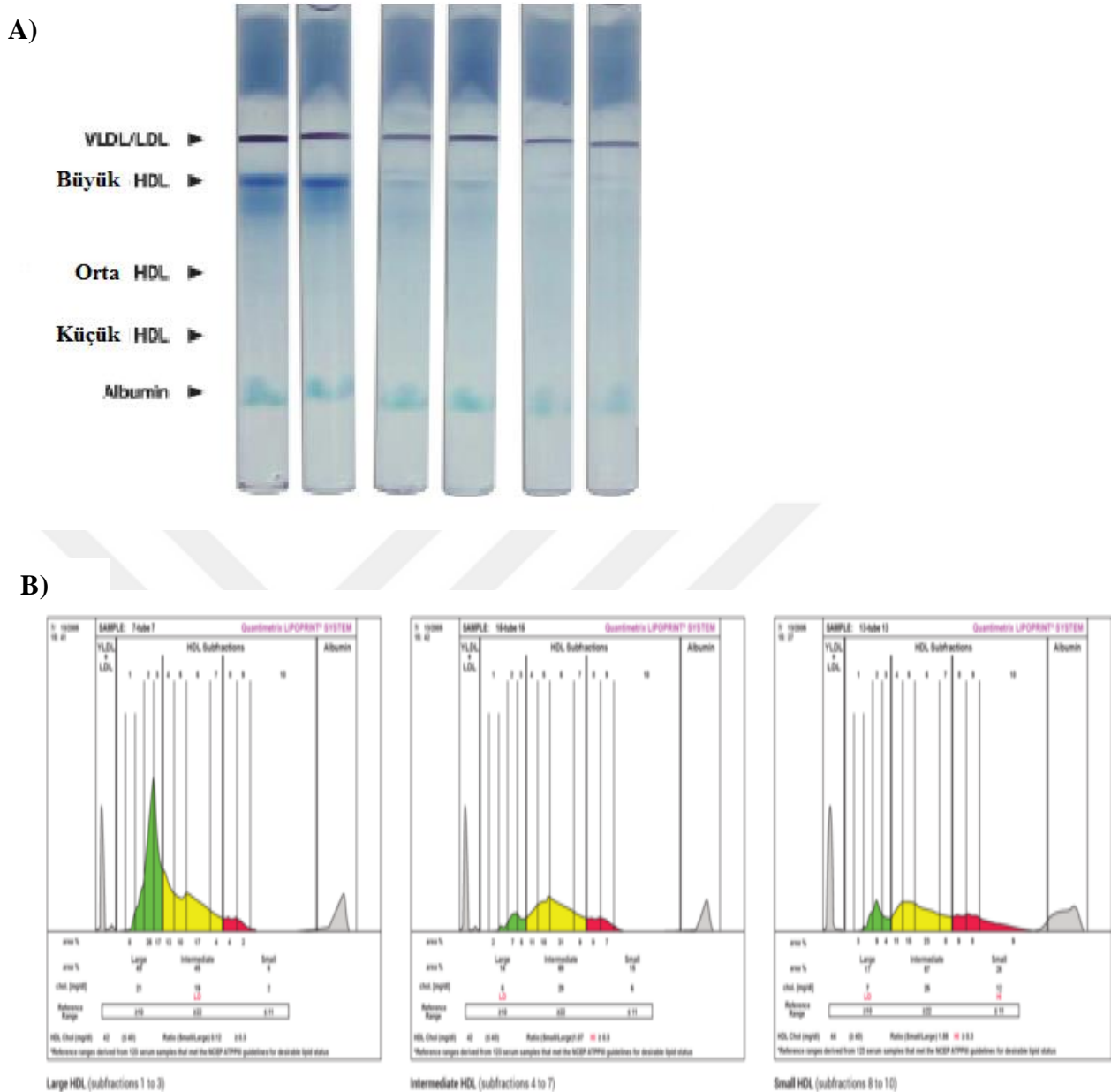
A)



B)



Şekil 3.4.4.1. LDL Alt Grup Analizleri: A) Lipoproteinlerin LDL Altgrup analiz sistemi ile elektroforetik olarak ayrılması. Elektroforez uygulamasından sonra görüntüsü alınmıştır. Elektroforetik göç tütün en üstünden (katod) alta doğru (anod) gerçekleşmektedir. Şilomikronlar yükleme jelinde kalmaktadır, VLDL yavaş göç ederken HDL hızlı ilerlemektedir. LDL partikülleri jelin ortasında konumlanmıştır. B) Tip A, Intermediate ve Tip B'nin densinometrik tarama görüntüleri



Şekil 3.4.4.2. HDL Alt Grup Analizleri: A) Lipoproteinlerin HDL Altgrup analiz sistemi ile elektroforetik olarak ayrılması. Elektroforez uygulamasından sonra görüntüsü alınmıştır. Elektroforetik göç tüpün en üstünden (katod) alta doğru (anod) gerçekleşmektedir. VLDL ve LDL yavaş göç ettiği için en üst bantta, albumin hızlı ilerlediği için kolonun en altında yer almaktadır. HDL yoğunluklarına göre ayrılmıştır ve jelin ortasında yer almaktadır. B) HDL alt gruplarının densitometrik tarama görüntüleri

3.3.4.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.

3.3.5.İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizi lisanslı SPSS 23.0 ve Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic=ROC) analizi için MedCalc paket programları kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak alınmıştır.

Genotip ve allelerin görülme sıklığının gruplararası farklılıklarının değerlendirilmesinde ki-kare, pearson ve fisher exact testleri kullanılmıştır. Ki-kare analizi sonrası değerler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Allel frekansları gen sayma metoduna göre yapılmıştır. Genotip ve allellerin aktivite üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde ve hasta ve kontrol gruplarına ait serum düzeylerinin karşılaştırılmasında ikili bağımsız örneklem student t-testi kullanılmıştır. Risk faktörü olarak görülen parametreler lojistik ve doğrusal regresyon analizi ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarına Ait Demografik Veriler

Tez projemize katılan 89 Ateroskleroz Hasta Grubu ve 93 sağlıklı kontrolün demografik verileri karşılaştırmalı olarak Tablo 4-1’de özetlenmiştir.

Tablo 4-1. Ateroskleroz ve Kontrol Gruplarına ait Demografik Veriler

Grup		Kontrol (n=93)	Atheroskleroz Hasta Grubu (n=89)	p değeri
Cinsiyet (E / K)		% 55,9 / % 44,1 (n=52) / (n=41)	% 69,7 / % 30,3 (n=62) / (n=27)	0,055
Yaş (Yıl)		52,69±9,80	64,31±13,79	0,000*
Vücut Kitle İndeksi (VKİ) (kg/m ²)		27,79±4,92	28,66±6,04	0,284
Vücut Yüzey Alanı (VYA) (m ²)		1,86±0,17	1,88±0,18	0,418
Sigara	kullanan	% 35,5 (n=33)	%46,1 (n=41)	0,146
	kullanmayan	% 64,5 (n=60)	% 53,9 (n=48)	
Diabet	var	% 16,1 (n=15)	% 34,8 (n=31)	0,004*
	yok	% 83,9 (n=78)	% 62,5 (n=58)	
Aile Hikayesi	var	% 82,8 (n=77)	% 68,5 (n=61)	0,025*
	yok	% 17,2 (n=16)	% 31,5 (n=28)	
Sistolik KB >140 Diastolik KB >90	var	% 23,7 (n=22)	% 51,7 (n=46)	0,000*
	yok	% 76,3 (n=71)	% 48,3 (n=43)	

n=örnek sayısı, $\bar{X} \pm SD$ (Ortalama \pm Standart Sapma), E/K =Erkek / Kadın , KB =Kan Basıncı

* Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatiksel olarak anlamlılık göstermektedir (p<0,05). Gruplararası farklılık ileri ki-kare testi (χ^2), ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

İleri kikare ve student-t testi analizi ile kontrol ve atherosleroz hasta grupları demografik özellikler açısından karşılaştırıldığında; ateroskleroz hasta grubunda cinsiyet dağılımları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (p=0,055). Vücut kitle indeksi ile vücut yüzey alanları hasta grubunda daha yüksek olduğu gözlenirse de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,284, p=0,418). Tablo 4-1’de görüldüğü gibi diabet tanısı konmuş olgular ateroskleroz hasta grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermektedir (p=0,004). Bu sonuçlar doğrultusunda yapılan logistik regresyon analizi sonuçlarına göre diabet tanısı atheroskleroz riskini 2.7 kat artırmaktadır (Tablo 4-2). Ailesinde ateroskleroz tanısı olanların hasta grubunda ise anlamlı olarak bir farklılık tespit edilmiş (p=0,027) ve bu faktörün de riski 2.2 kat artırdığı gözlemlenmiştir (Tablo 4-2).

Hasta grubunu sistolik kan basıncı ortalaması 133,88±17,69 mmHg iken kontrol grubunda ortalama değerleri 128,49±15,53 mmHg olarak saptanmıştır. Diastolik kan basıncı ortalaması hasta grubunda 84,49±6,61 mmHg, kontrol grubunda 83,06±9,97 mmHg olduğu belirlenmiştir. Ateroskleroz hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında sistolik ve diastolik kan basıncı ortalaması arasında anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,300, p=0,258).

Tablo 4-2. Hasta ve kontrol örneklerinin demografik verilerinin logistik regresyon analizleri.

	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	Risk (Odds Ratio)	%95 Güven Aralığı
Yaş	0,083	0,016	0,000*	1,087	1,054-1,120
Diabet	1,022	0,359	0,004*	2,779	1,375-5,619
Aile Hikayesi	0,793	0,357	0,027*	2,209	1,097-4,449
Sistolik KB >140 Diastolik KB >90	1,239	0,323	0,000*	3,452	1,832-6,506

KB: Kan Basıncı. * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (p<0,05).

Tablo 4-1’de görüldüğü gibi hipertansiyon tanısı konmuş olgular ateroskleroz hasta grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p=0,000$). Bu sonuçlar doğrultusunda yapılan logistik regresyon analizi sonuçlarına göre hipertansiyon tanısının ateroskleroz riskini 3,4 kat artırdığı saptanmıştır (Tablo 4-2).

4.2. Çalışma Gruplarına Ait Lipid Değerleri

Atheroskleroz hasta ve kontrol gruplarının tüm lipid değerleri, belirlenen sınır değerlerin altında ve üstünde yer alan bireylerin sayı ve yüzdesi karşılaştırmalı olarak Tablo 4-3’de verilmiştir.

Kontrol grubunda kolesterol düzeyi $188,20 \pm 39,17$ mg/dl hasta grubunda $185,25 \pm 48,21$ mg/dl olarak belirlenmiş ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,650$). Kontrol grubunda yer alanların %52,2’sinin ($n=59$), hasta grubunda yer alanların %47,8’si ($n=54$) plazma kolesterol düzeylerinin 200mg/dl’nin altında olduğu gözlenmiş olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,701$). Plazma kolesterol değerleri 200-239 mg/dl olanların dağılımlarının kontrol grubunda %57,8 ($n=26$) iken hasta grubunda %42,2 ($n=19$) olduğu saptanmıştır ($p=0,302$). Plazma kolesterol değeri 240mg/dl’nin üstünde olduğu saptanan olgularının %61,9’si ($n=13$) hasta grubunda yer alırken %38,1’i ($n=8$) kontrol grubunda bulunmakta olup gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0,205$).

Trigliserid değerlerinin ortalaması kontrol grubunda $146,35 \pm 89,67$ mg/dl, hasta grubunda $149,18 \pm 56,90$ mg/dl olarak hesaplanmıştır ($p=0,799$). TG düzeyleri 200mg/dl’nin altında bulunan olguların %48,7’si ($n=73$) kontrol grubuna bulunurken, %51,3’ü ($n=77$) hasta grubunda yer almaktadır ($p=0,155$). Kontrol grubunda yer alan olguların %60’ı ($n=18$) hasta grubunun %40’ı ($n=12$) 200-239 mg/dl TG değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir ($p=0,286$). TG değeri 400 mg/dl’nin üzerinde olan 2 kişi kontrol grubunda yer almaktadır, gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,497$).

Tablo 4-3. Hasta ve Kontrol Gruplarına ait Lipid Değerleri

		Kontrol (n=93)	Atheroskleroz Hasta Grubu (n=89)	p değeri
Plazma Kolesterol (mg/dl)	$(\bar{X} \pm SD)$	188,2 ± 39,17	185,25 ± 48,21	0,650
< 200 mg/dl	n (%)	59 (% 52,2)	54 (% 47,8)	0,701
200-239 mg/dl	n (%)	26 (% 57,8)	19 (% 42,2)	0,302
≥240 mg/dl	n (%)	8 (% 38,1)	13 (% 61,9)	0,205
Trigliserid (mg/dl)	$(\bar{X} \pm SD)$	146,35 ± 89,67	149,18 ± 56,90	0,799
< 200 mg/dl	n (%)	73 (% 48,7)	77 (% 51,3)	0,155
200-399 mg/dl	n (%)	18 (% 60)	12 (% 40)	0,286
≥ 400 mg/dl	n (%)	2 (% 100)	0 (% 0)	0,497
LDL (mg/dl)	$(\bar{X} \pm SD)$	118,97 ± 36,94	117,38 ± 40,56	0,650
< 130 mg/dl	n (%)	61 (% 55)	50 (% 45)	0,193
130-159 mg/dl	n (%)	19 (% 48,7)	20 (% 51,3)	0,737
≥ 160 mg/dl	n (%)	13 (% 43,3)	17 (% 56,7)	0,352
HDL (mg/dl)	$(\bar{X} \pm SD)$	42,49 ± 10,72	38,61 ± 8,62	0,008*
< 35 mg/dl	n (%)	20 (% 38,5)	32 (% 61,5)	0,031*
35-44 mg/dl	n (%)	42 (% 51,2)	40 (% 48,8)	0,976
≥45 mg/dl	n (%)	31 (% 64,6)	17 (% 35,4)	0,029*
Kolesterol / HDL Oranı		4,64	4,95	0,130
< 3,5	n (%)	14 (% 46,7)	16 (% 53,3)	0,595
3,6-4,5	n (%)	37 (% 66,1)	19 (% 33,9)	0,007*
> 4,5	n (%)	43 (% 43,4)	56 (% 56,6)	0,024*
VLDL (mg/dl)	$(\bar{X} \pm SD)$	29,12 ± 17,63	29,54 ± 10,70	0,847
ApoE (mg/dl)	Ortalama değer	10,59	10,46	0,987

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

Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) değerlerinin ortalaması kontrol grubunda $118,97 \pm 36,94$ mg/dl iken hasta grubunda bu değerler $117,38 \pm 40,56$ mg/dl olarak saptanmıştır ancak gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,650$). Hasta grubunda bulunan olguların %45'inin ($n=50$), kontrol grubunda yer alanların %55'inin ($n=55$) LDL değerleri 130mg/dl altında yer almaktadır ($p=0,193$). LDL değerleri 130-159mg/dl arasında yer alan olguların %48,7'si ($n=19$) kontrol grubunda yer alırken %51,3'ü ($n=20$) hasta grubunda yer aldığı gözlenmiştir ($p=0,737$). LDL değeri 160mg/dl'nin üstünde olanların %56,7'si ($n=17$) hasta grubunda yer alırken %43,3'ü ($n=13$) kontrol grubunda yer aldığı belirlenmiş ve gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0,352$).

Ateroskleroz hasta grubunun HDL değerlerinin ortalamasının $42,49 \pm 10,72$ mg/dl iken kontrol grubunda ortalama $38,61 \pm 8,62$ mg/dl olup bu verilere göre gruplar arasında istatistiksel olarak fark olduğu gözlenmiştir ($p=0,008$).

Tablo 4-4. Hasta ve kontrol örneklerine ait lipid değerlerinin logistik regresyon analizleri.

Lipid Değerleri	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	Risk (Odd Ratio)	%95 Güven Aralığı
HDL (mg/dl)	-0,044	0,017	0,011*	0,957	0,925-0,990
HDL<35 mg/dl	0,717	0,335	0,032*	0,488	0,253-0,942
HDL>45 mg/dl	-0,750	0,348	0,031*	0,472	0,239-0,934
Kolesterol/HDL Oranı 3,6 - 4,5	-0,890	0,334	0,008*	0,411	0,213-0,791
Kolesterol/HDL Oranı > 4,5	0,680	0,302	0,025*	1,973	1,091-3,569

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

Ayrıca ateroskleroz hasta grubunda yer alan olguların %61,5'i (n=32), kontrol grubunda yer alanların %38,5'si (n=20) 35mg/dl'den daha düşük değerlere sahiptir (p=0,031). Ayrıca kontrol grubunda yer alan katılımcıların %64,6'sı (n=31), hasta grubunda yer alan olguların %35,4'sinin (n=17) HDL değerlerinin 45mg/dl'den yüksek olduğu görülmüştür. Bu veriler sonucunda yapılan logistik regresyon analizi sonuçlarına göre plazma HDL değerlerinin düşük olması ateroskleroz riskini artırmaktadır (Tablo 4-4). Aynı zamanda HDL'nin sınır değerden daha düşük olması hastalık riskini 2 kat artırırken HDL'nin 45 mg/dl'den fazla olması riski 2,12 kat azaldığı gözlenmiştir.

Ateroskleroz riski için parametre olarak değerlendirilen plazma kolesterolün HDL'ye göre oranı hasta grubunda 4,95 iken kontrol grubunda 4,64 olarak belirlenmiştir (p=0,130). Kolesterol/HDL oranı 3,5'in altında olanların %53,3'ü (n=16) hasta grubunda yer alırken %46,7'si (n=14) kontrol grubunda yer almaktadır. Kolesterol/HDL oranı 3,6-4,5 olanların ise %33,9'u (n=19) hasta grubunda yer alırken %66,1'i (n=37) kontrol grubunun içerisinde yer aldığı belirlenmiştir ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0,007). Kolesterol/HDL oranı 4,5 üstünde olanların %56,6'sı hasta grubunda yer alırken %43,4'ü (n=43) kontrol grubunda yer almaktadır. Kolesterol/HDL ateroskleroz hasta grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermektedir (p=0,024). Bu veriler ışığında yapılan logistik regresyon analizleri sonucunda yüksek Kolesterol/HDL oranlarının sahip olmanın ateroskleroz riskini 4 kat artırdığı belirlenmiştir (Tablo 4-4).

Tablo 4-3 de görüldüğü gibi VLDL değerlerinin ortalaması kontrol grubunda $29,12 \pm 17,63$ mg/dl iken hasta grubunda bu değerler $29,54 \pm 10,70$ mg/dl olduğu gözlenmiştir (p=0,847).

Plazma ApoE değerlerinin ortalaması kontrol grubunda 10,59 mg/dl iken hasta grubunda ortalama 10,46 mg/dl olarak saptanmıştır ancak gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (p=0,987).

4.3.Lipid Alt Grup Analizleri

Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) altgrup analizi verilerine göre büyük yoğunluklu LDL ortalaması kontrol grubunda $53,7 \pm 14,29$ mg/dl iken hasta grubunda bu değer $54,71 \pm 19,11$ mg/dl olduğu görülmüştür ($p=0,698$). Küçük boyutlu LDL ortalamasının hasta grubunda $7,12 \pm 8,18$ mg/dl , kontrol grubunda $4,04 \pm 6,69$ mg/dl olduğu belirlenmiştir ve gruplar arasında anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir ($p=0,008$) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5. Hasta ve kontrol gruplarına ait partikül yoğunluğu ve büyüklüğüne göre lipid alt grup analiz sonuçları.

			Kontrol (n=93)	Atheroskleroz Hasta Grubu (n=89)	p değeri
Büyük boyutlu LDL	(mg/dl)	$(\bar{X} \pm SD)$	$53,7 \pm 14,29$	$54,71 \pm 19,11$	0,698
Küçük boyutlu LDL	(mg/dl)	$(\bar{X} \pm SD)$	4,04 ± 6,69	7,12 ± 8,18	0,008*
LDL Alt Grup	Tip A (Düşük Risk)	n (%)	59 (% 70,2)	47 (% 54,7)	0,770
	Intermediate (Orta risk)	n (%)	15 (% 17,9)	19 (% 23,3)	0,386
	Tip B (Yüksek Risk)	n (%)	10 (% 11,9)	20 (% 22,1)	0,050*
Büyük Boyutlu HDL	(mg/dl)	$(\bar{X} \pm SD)$	$13,19 \pm 6,32$	$11,76 \pm 6,63$	0,169
Orta Boyutlu HDL	(mg/dl)	$(\bar{X} \pm SD)$	$21,49 \pm 4,95$	$21,49 \pm 5,49$	0,999
Küçük Boyutlu HDL	(mg/dl)	$(\bar{X} \pm SD)$	8,07 ± 3,70	6,59 ± 3,21	0,008*

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

Küçük boyutlu LDL düzeyi ve yoğunluğuna göre yapılan risk analizlerinde kontrol grubunda yer alanların %70,2'sinin (n=59), hasta grubunda yer alanların ise %54,7'sinin (n=47) Tip A (düşük risk) grubunda olduğu belirlenmiş olup gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edilmemiştir (p=0,770). Hasta grubunda yer alan olguların %23,3'ü (n=19), kontrol grubunda bulunanların %17,9'u (n=15) intermediate (orta risk) taşıyan grupta yer almaktadır ve istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (p=0,386). Kontrol grubunda yer alanların ise %11,9'u (n=10) Tip B (yüksek risk) grubunda yer alırken hasta grubunda olanların %22,1'i (n=20) bu grupta yer almaktadır (p=0,050). Logistik regresyon analizi sonucunda yüksek riskteki grubuna dahil olma riskini 2,2 kat artırdığını gözlenmiştir (Tablo 4-6).

Yapılan HDL altgrup analizlerine göre büyük yoğunluklu HDL ortalaması kontrol grubunda $13,19 \pm 6,32$ mg/dl iken hasta grubunda bu değer $11,76 \pm 6,63$ mg/dl olduğu görülmüştür. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (p=0,169). Kontrol grubunda orta boyutlu HDL ortalaması $21,49 \pm 4,96$ mg/dl iken hasta grubunda $21,49 \pm 5,49$ mg/dl olarak belirlenmiştir (p=0,999). Küçük boyutlu HDL ortalamasının kontrol grubunda $8,07 \pm 3,70$ mg/dl iken hasta grubunda $6,59 \pm 3,21$ mg/dl olarak belirlenmiştir ve gruplar arasında anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir (p=0,008). Logistik regresyon analizlerine göre küçük boyutlu HDL'ye sahip olmanın riski 1,13 kat azalttığı saptanmıştır (Tablo 4-6).

Tablo 4-6. Hasta ve kontrol örneklerine ait partikül yoğunluğu ve büyüklüğüne göre lipid alt gruplarının logistik regresyon analizleri.

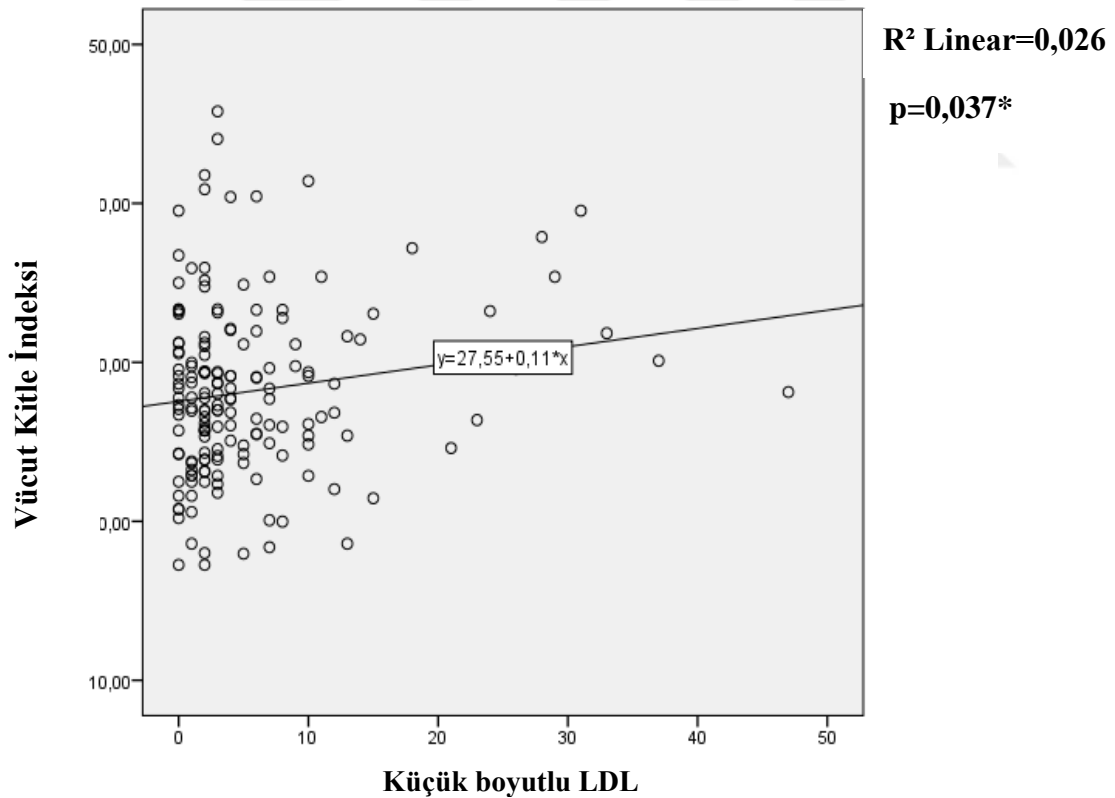
Lipid Alt Grup Değerleri	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	Risk (Odd Ratio)	%95 Güven Aralığı
Küçük Boyutlu LDL (mg/dl)	0,063	0,026	0,014*	1,065	1,013-1,120
LDL Alt Grup B (Yüksek Risk)	0,808	0,423	0,050*	2,242	0,979-5,135
Küçük Boyutlu HDL (mg/dl)	-0,125	0,048	0,010*	0,882	0,802-0,970

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

Vücut kitle indeksi (VKİ) ve küçük boyutlu LDL arasındaki ilişkiyi belirleyebilmek için yapılmış olan doğrusal regresyon analizi sonucunda VKİ'si 27,55 kg/m²'den fazla olan kişilerin daha fazla küçük boyutlu LDL miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (p=0,037) (Şekil 4-1).

4.4 ApoE Genotip ve Allel Dağılımlarının İstatistiksel Açından Değerlendirilmesi

ApoE genotip frekansları kontrol ve ateroskleroz hasta olguları ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($X^2=11,376$, $p=0,023$). Kontrol grubunda yer alanların %83,9'u (n=78) E3/E3 genotipine, %4,3'ü (n=4) E3/E4 genotipine, %9,7'si (n=9) E2/E3 genotipine, %1,1'i (n=1) E2/E2 genotipine, %1,1'i (n=1) E4/E4 genotipine sahipken E2/E4 genotipine rastlanmamıştır. (Tablo 4-7). Hasta grubunda yer alan olguların %84,3'ü (n=75) E3/E3 genotipine, %13,5'i (n=12) E3/E4 genotipine, %1,1'i (n=1) E2/E3 genotipine, %1,1'i (n=1) E4/E4 genotipine sahiptir, bu grupta E2/E2 ve E2/E4 genotiplerine saptanmamıştır (Tablo 4-7).



Şekil 4-1. VKİ ve LDL Alt grubu Doğrusal Regresyon Analizleri. Tüm çalışma gruplarının Vücut Kitle İndeksi ve Küçük boyutlu LDL değerlerinin Doğrusal Regresyon Analizi Dağılım Grafiği. * ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p<0,05$).

Tablo 4-7. Hasta ve kontrol örneklerine ait ApoE Genotip ve Allel Dağılımları

Genotip	Kontrol Grubu (n=93)	Ateroskleroz Hasta Grubu (n=86)	p değeri
E3/E3	% 83,90 n= 78	% 84,30 n= 75	0,941
E3/E4	% 4,30 n= 4	% 13,50 n= 12	0,029*
E2/E3	% 9,70 n= 9	% 1,10 n= 1	0,011*
E2/E4	%0 0	%0 0	-
E2/E2	% 1,1 n= 1	%0 0	0,327
E4/E4	% 1,10 n= 1	% 1,10 n= 1	0,975
Allel	Allel Sayımı (%)	Allel Sayımı (%)	p değeri
E2	11 (% 90,90) n= 10	1 (% 9,10) n= 1	0,006*
E3	169 (% 50,80) n= 78	163 (% 49,20) n= 76	0,586
E4	6 (% 29,40) n= 5	14 (% 70,60) n= 12	0,060

n=örnek sayısı, * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (p<0,05). Gruplararası farklılık ileri ki-kare testi (χ^2), ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

ApoE genotip frekansları kontrol ve ateroskleroz hasta gruplarında karşılaştırıldığında; E3/E3, E2/E2, E4/E4 genotiplerini taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($\chi^2=0,005$, p=0,941; $\chi^2=0,962$, p=0,327, $\chi^2=0,001$, p=0,975). E3/E4 genotipine sahip olgular değerlendirildiğinde hasta

ve kontrol grupları arasında anlamlı fark olduğu gözlenmiş ($X^2=4,782$, $p=0,029$) ve Tablo 4-8’de gösterilen logistik regresyon analizi sonucunda bu genotipi taşımanın ateroskleroz riskini 3,4 kat artırdığı belirlenmiştir. E2/E4 genotip frekansının gruplar arasındaki dağılımı incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($X^2=6,408$, $p=0,011$). Logistik regresyon analizi sonucuna göre E2/E4 genotipine sahip olmak ateroskleroz riskini 10 kat azaldığı gözlenmiştir.

Tablo 4-8. Hasta ve kontrol örneklere ait ApoE Genotip ve Allel Dağılımlarının logistik regresyon analizleri

Genotip	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	Risk (Odds Ratio)	%95 Güven Aralığı
E3/E3	0,030	0,405	0,941	1,030	0,466-2,280
E3/E4	1,243	0,598	0,038*	3,468	1,074-11,195
E2/E3	-2,244	1,065	0,035*	0,106	0,013-0,855
E2/E4	-0,044	0,148	0,767	0,957	0
E2/E2	-21,170	-	1	0	0
E4/E4	0,044	1,422	0,975	1,045	0,064-16,973
Allel					
E2	-2,361	1,060	0,026*	0,094	0,012-0,753
E3	0,660	1,234	0,593	1,934	0,172-21,713
E4	1,009	0,565	0,069	2,743	0,925-8,135

n=örnek sayısı, * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p<0,05$).

ApoE allel frekansları kontrol ve ateroskleroz hasta gruplar karşılaştırıldığında olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($X^2= 10,189$, $p=0,006$). E2 alleleline sahip olanların %90,9'u ($n=10$) kontrol grubunda yer alırken %9,1'i ($n=1$) hasta grubunda yer almaktadır, istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir ($X^2=7,426$, $p=0,06$) (Tablo4-7). Bu veriler sonucunda yapılan logistik regresyon analizi verisine göre E2 alleli taşımak ateroskleroz riskini 10 kat azaldığı gözlenmiştir (Tablo4-8).

E3 alleli taşıyanların oranını hasta grubunda %49,2 ($n=85$), kontrol grubunda %50,8 ($n=91$) olduğu gözlenmiş ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0,586$).

E4 alleleline sahip olanların %29,4'ü ($n=5$) kontrol grubunda yer alırken %70,6'sı ($n=12$) hasta grubunda yer almaktadır, istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmemiştir ($p=0,060$).

ApoE genotip ve allel dağılımları ile serum ApoE seviyeleri karşılaştırılmalı olarak Tablo 4-9'da yer almaktadır. E3/E3 genotipi taşıyanların ApoE ortalaması $102,15\pm 48,70$ mg/dl ve taşımayan olgular $117,66\pm 62,31$ mg/dl olarak belirlenmiştir ($p=0,155$). E3/E4 genotipi taşıyanların ortalaması $109,23\pm 23$ mg/dl, taşımayanların ise $104,07\pm 50,90$ mg/dl olduğu gözlenmiştir ($p=0,710$). E2/E3 genotipi taşıyanlarda serum ApoE düzeyi $125,15\pm 79,44$ mg/dl, taşımayanlar da ise bu seviye $103,37\pm 49,21$ mg/dl olduğu gözlenmiştir ($p=0,215$). Çalışma grubunda E2/E4 genotipi taşıyan birey yer almamıştır. E2/E2 ve E4/4 genotipi taşıyan birer katılımcının ortalamaları sırasıyla $165,30$ mg/dl ve $129,10$ mg/dl'dir, gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0,234$ ve $p=0,631$). Serum ApoE seviyeleri E2 alleli taşıyanlarda $129,17\pm 75,96$ mg/dl, E3 alleli taşıyanlarda $104,02\pm 51,19$ mg/dl ve E4 alleli $104,40\pm 49,36$ mg/dl olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (E2 $p=0,117$, E3 $p=0,236$, E4 $p=0,992$) (Tablo4-9).

Tablo 4-9. Hasta ve Kontrol Gruplarına ait ApoE Seviyelerini Genotip ve Allel Dağılımları ile Karşılaştırılması

Genotip		n	ApoE (mg/dl) ($\bar{X} \pm SD$)	p değeri
E3/E3	Taşıyan	144	102,15±48,70	0,155
	taşımayan	26	117,66±62,31	
E3/E4	taşıyan	15	109,23±23	0,710
	taşımayan	155	104,07±50,90	
E2/E3	taşıyan	9	125,15±79,44	0,215
	taşımayan	161	103,37±49,21	
E2/E4	taşıyan	0	0	-
	taşımayan	170	104,52±51,14	
E2/E2	taşıyan	1	165,30	0,234
	taşımayan	169	104,15±51,08	
E4/E4	taşıyan	1	129,10	0,631
	taşımayan	169	104,38	
Allel				
E2	taşıyan	10	129,17±75,96	0,117
	taşımayan	160	102,98±49,12	
E3	taşıyan	168	104,02±51,19	0,236
	taşımayan	2	147,20±25,59	
E4	taşıyan	15	104,40±49,36	0,992
	taşımayan	155	104,54±51,46	

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

Plazma lipid düzeyi ile ApoE genotip dağılımlarının karşılaştırılması Tablo 4-10'da yer almaktadır. E3/E3 genotipi taşıyan 153 katılımcının plazma kolesterol ortalaması $190,29 \pm 44,50$ mg/dl ve taşımayan 29 katılımcının değerlerinin $168,10 \pm 34,42$ mg/dl olduğu belirlenmiş ve bu iki grup arasında anlamlı olarak fark olduğu saptanmıştır ($p=0,012$). E3/E4 taşıyanlarda ($n=16$) ortalama $170,44 \pm 41,94$ mg/dl ve taşımayan ($n=166$) ortalama değer $188,33 \pm 43,70$ mg/dl olduğu gözlenmiştir ($p=0,118$). E2/E3 genotipi taşıyan 10 kişide plazma kolesterol ortalaması $166 \pm 22,81$ mg/dl ve bu genotipi taşımayan 172 kişi de bu değer $187,97 \pm 44,38$ mg/dl'dir, gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0,123$). E2/E2 genotipi taşıyan 1 kişide kolesterol değeri 198 mg/dl ve taşımayan 181 kişide ortalama değer $186,70 \pm 43,84$ mg/dl olarak tespit edilmiştir ($p=0,797$). E4/E4 genotipi taşıyanlarda ($n=2$) ortalama değer $145,18 \pm 2,82$ mg/dl, taşımayanlarda ($n=181$) ortalama $187,22 \pm 43,75$ mg/dl olarak belirlenmiştir ($p=0,175$) (Tablo 4-10).

Plazma kolesterol değeri 200mg/dl'nin altında olanlar genotip özelliklerine göre değerlendirildiklerinde; E3/E3 genotipi taşıyan 88 katılımcı ile bu genotipi taşımayan 25 kişi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($X^2=8,525$, $p=0,004$). Diğer genotiplerin dağılımları ve plazma kolesterol değeri 200mg/dl'nin altında olanlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (E3/E4 $n=13$; $p=0,185$, E2/E3 $n=1$; $p=0,098$, E2/E2 $n=1$; $p=0,621$, E4/E4 $n=2$; $p=0,384$) (Tablo 4-10).

Tablo 4-10'da görüldüğü gibi plazma kolesterol değerleri 200-239mg/dl arasında olanların genotip dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (E3/E3 $n=88$; $p=0,137$, E3/E4 $n=3$; $p=0,764$, E2/E3 $n=1$; $p=0,455$, E2/E2 $n=0$; $p=0,753$, E4/E4 $n=0$; $p=0,586$).

Plazma kolesterol değeri 240mg/dl'nin üstünde olan ve E3/E3 genotipi taşımayan katılımcı bulunmamaktadır ancak bu genotipi taşıyan ($n=21$) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($X^2=8,525$, $p=0,004$). Diğer genotiplerin dağılımları ve plazma kolesterol değeri 240mg/dl'nin üstünde olanlar kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır (E3/E4 $n=3$; $p=0,764$, E2/E3 $n=1$; $p=0,455$, E2/E2 $n=0$; $p=0,753$, E4/E4 $n=0$; $p=0,586$) (Tablo 4-10).

Trigliserid düzeyleri genotipler ile karşılaştırıldığında E3/E3 genotipinde olanlarda ($n=153$) ortalama değer $150,91 \pm 77,86$ mg/dl iken taşımayanlarda ($n=29$) $131,42 \pm 57,92$ mg/dl olarak saptanmıştır ($p=0,192$). E3/E4 genotipi taşıyan 16

katılımcının TG düzeyi $123,88 \pm 61,02$ mg/dl, taşımayan 166 katılımcının ise $150,04 \pm 76,25$ mg/dl olarak belirlenmiş ve gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0,185$). E2/E3 genotipi taşıyanların ($n=10$) TG seviyesi $132,40 \pm 51,15$ mg/dl iken taşımayanlarda ($n=172$) $148,63 \pm 76,43$ mg/dl olduğu belirlenmiştir ($p=0,509$). E2/E2 genotipindeki 1 katılımcının TG seviyesi 236mg/dl ve bu genotipte olmayan 181 katılımcının ortalama değeri $147,25 \pm 75,17$ mg/dl olarak saptanmıştır ($p=0,241$). E4/E4 genotipi taşıyanların TG ortalaması ($n=2$) $128,50 \pm 51,61$ mg/dl, taşımayanların ($n=180$) ise $147,55 \pm 75,55$ mg/dl olarak tespit edilmiştir ($p=0,717$).

Plazma TG değerleri 200mg/dl'nin altında olanların ApoE genotip dağılımlarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (E3/E3 $n=124$; $p=0,264$, E3/E4 $n=15$; $p=0,312$, E2/E3 $n=9$; $p=0,448$, E2/E2 $n=0$; $p=0,176$, E4/E4 $n=2$; $p=0,678$).

TG değerleri 200-399mg/dl arasında olanların genotip dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (E3/E3 $n=27$; $p=0,331$, E3/E4 $n=1$; $p=0,478$, E2/E3 $n=1$; $p=0,486$, E2/E2 $n=1$; $p=0,165$, E4/E4 $n=0$; $p=0,697$).

ApoE Genotip dağılımları ve TG değerleri 400mg/dl üstünde olanlar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (E3/E3 $n=88$; $p=0,137$, E3/E4 $n=3$; $p=0,764$, E2/E3 $n=1$; $p=0,455$, E2/E2 $n=0$; $p=0,753$, E4/E4 $n=0$; $p=0,586$).

Tablo 4-10'da ApoE genotip dağılımlarının LDL ortalama değerleri ile karşılaştırılması yer almaktadır. E3/E3 genotipinde olanlarda ($n=153$) ortalama değer $120,14 \pm 40,32$ mg/dl iken taşımayanlarda ($n=29$) $107,93 \pm 26,50$ mg/dl olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,119$). E3/E4 genotipi taşıyan 16 katılımcının LDL ortalaması $106,75 \pm 27,75$ mg/dl, taşımayan 166 katılımcının ise $119,30 \pm 39,43$ mg/dl olarak belirlenmiştir ($p=0,216$). E2/E3 genotipi taşıyanların ($n=10$) LDL ortalaması $106,70 \pm 21,47$ mg/dl iken taşımayanlarda ($n=172$) $118,86 \pm 39,36$ mg/dl olduğu gözlenmiştir ($p=0,335$). E2/E2 genotipindeki 1 katılımcının LDL seviyesi 164mg/dl ve bu genotipte olmayan 181 katılımcının ortalama değeri $117,25 \pm 38,61$ mg/dl olup gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0,236$). E4/E4 genotipi taşıyanların ($n=2$) LDL ortalaması $95,50 \pm 21,92$ mg/dl, taşımayanların ($n=180$) ise $118,44 \pm 38,76$ mg/dl olduğu gözlenmiştir ($p=0,405$).

LDL değerleri 130mg/dl'nin altında olanların ApoE genotip dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (E3/E3 $n=90$; $p=0,169$, E3/E4 $n=11$; $p=0,505$, E2/E3 $n=8$; $p=0,320$, E2/E2 $n=1$; $p=0,390$, E4/E4 $n=2$; $p=0,371$).

Tablo 4-10. Hasta ve kontrol gruplarına ait ApoE Genotip lipid değerleri ile karşılaştırılması

	E3/E3 n=153	E3/E4 n=16	E2/E3 n=10	E2/E2 n=1	E4/E4 n=2
Plazma Kolesterol (mg/dl)	190,29± 44,50 p=0,012*	170,44 ± 41,94 p=0,118	166,00 ± 22,81 p=0,123	198** p=0,797	145 ± 2,82 p=0,175
< 200	n=88 p=0,004*	n=13 p=0,098	n=1 p=0,092	n=1 p=0,621	n=2 p=0,384
200-239	n=88 p=0,137	n=3 p=0,764	n=1 p=0,455	n=0 p=0,753	n=0 p=0,586
> 240	n=21 p=0,028*	n=0 p=0,223	n=0 p=0,240	n=0 p=0,885	n=0 p=0,782
Trigliserid (mg/dl)	150,90± 77,86 p=0,192	123,88± 61,02 p=0,185	132,40± 51,158 p=0,509	236** p=0,241	128,50± 51,61 p=0,717
< 200	n=124 p=0,264	n=15 p=0,312	n=9 p=0,448	n=0 p=0,176	n=2 p=0,678
200-399	n=27 p=0,331	n=1 p=0,478	n=1 p=0,486	n=1 p=0,165	n=0 p=0,697
> 400	n=2 p=0,536	n=0 p=0,659	n=0 p=0,893	n=0 p=0,989	n=0 p=0,978
LDL (mg/dl)	120,13± 40,32 p=0,119	106,75± 27,75 p=0,216	106,70± 21,479 p=0,335	164** p=0,236	95,50± 21,92 p=0,405
< 130	n=90 p=0,169	n=11 p=0,505	n=8 p=0,320	n=1 p=0,390	n=2 p=0,371
130-159	n=32 p=0,698	n=5 p=0,316	n=2 p=0,635	n=0 p=0,786	n=0 p=0,616
> 160	n=29 p=0,039*	n=0 p=0,063	n=0 p=0,372	n=0 p=0,165	n=0 p=0,697
HDL (mg/dl)	40,45± 9,73 p=0,672	41,94 ± 13,53 p=0,572	41,70 ± 7,42 p=0,718	38** p=0,794	36 ± 8,48 p=0,512
< 35	n=46 p=0,305	n=4 p=0,741	n=1 p=0,286	n=0 p=0,714	n=1 p=0,491
35-44	n=67 p=0,431	n=7 p=0,913	n=6 p=0,350	n=1 p=0,451	n=1 p=0,699
> 45	n=40 p=0,872	n=5 p=0,064	n=3 p=0,725	n=0 p=0,736	n=0 p=0,541
Kolesterol/HDL Oranı	4,89 ± 1,42 p=0,027*	4,33 ± 1,31 p=0,163	4,33 ± 1,31 p=0,163	5,2** p=0,769	4,13 ± 0,89 p=0,503
< 3,5	n=23 p=0,226	n=4 p=0,336	n=3 p=0,216	n=0 p=0,835	n=0 p=0,697
3,6-4,5	n=46 p=0,637	n=4 p=0,601	n=5 p=0,283	n=4 p=0,692	n=1 p=0,522
> 4,5	n=21 p=0,259	n=8 p=0,712*	n=2 p=0,190	n=1 p=0,544	n=1 p=0,705
VLDL (mg/dl)	29,99 ± 15,20 p=0,161	25,50 ± 11,96 p=0,275	24,70 ± 9,87 p=0,305	28** p=0,928	33** p=0,722

n=örnek sayısı, $\bar{X} \pm SD$ (Ortalama \pm Standart Sapma), * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (p<0,05). Gruplararası farklılık ileri ki-kare testi, (X^2) ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir. **örnek sayısı az bulunduğu için standart sapma hesaplanamamıştır
NOT: Genotip taşımayan olguların lipid değerleri metin içinde verilmiştir.

Plazma LDL seviyesi 130-159mg/dl arasında olanların genotip dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (E3/E3 n=32; p=0,698, E3/E4 n=5; p=0,316, E2/E3 n=2; p=0,635, E2/E2 n=0; p=0,786, E4/E4 n=0; p=0,616).

LDL değerleri 160mg/dl'nin üstünde olanların ApoE genotipleri incelendiğinde E3/E genotipi taşıyanların (n=29) taşımayanlar (n=1) arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmıştır ($X^2=4,258$, p=0,038). Diğer genotipler incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (E3/E4 n=0; p=0,063, E2/E3 n=0; p=0,372, E2/E2 n=0; p=0,165, E4/E4 n=0; p=0,697).

Plazma HDL düzeyleri ve genotipler ile karşılaştırıldığında E3/E3 genotipinde olanlarda ortalama değer 40,46±9,73mg/dl iken taşımayanlarda 41,31±11mg/dl olarak saptanmıştır (p=0,672). E3/E4 genotipi taşıyanların HDL ortalaması 41,94±13,53mg/dl, taşımayanların ise 40,46±9,54mg/dl olarak belirlenmiş ve gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir (p=0,572). E2/E3 genotipi taşıyanların HDL ortalaması 41,70±7,42mg/dl iken taşımayanlarda bu değer 40,53±10,06mg/dl olarak tespit edilmiştir (p=0,718). E2/E2 genotipindeki 1 katılımcının HDL seviyesi 38mg/dl'dir ve bu genotipte olmayan diğer katılımcıların ortalama değeri 40,61±9,94mg/dl olarak bulunmuştur (p=0,794). E4/E4 genotipi taşıyanların HDL ortalaması 36±8,48mg/dl, taşımayanların ise 40,64±9,94mg/dl'dir, gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,512).

HDL değerleri 35mg/dl'nin altında olanların ApoE genotip dağılımlarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (E3/E3 n=46; p=0,305, E3/E4 n=4; p=0,741, E2/E3 n=1; p=0,286, E2/E2 n=0; p=0,714, E4/E4 n=1; p=0,491).

HDL seviyesi 35-44mg/dl arasında olanların genotip dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (E3/E3 n=67; p=0,431, E3/E4 n=7; p=0,913, E2/E3 n=6; p=0,350, E2/E2 n=1; p=0,451, E4/E4 n=1; p=0,699).

ApoE Genotip dağılımları ve HDL değerleri 45mg/dl üzerinde olanlar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (E3/E3 n=40; p=0,872, E3/E4 n=5; p=0,064, E2/E3 n=3; p=0,725, E2/E2 n=0; p=0,736, E4/E4 n=0; p=0,541).

Plazma kolesterolun HDL düzeylerine oranı ve ApoE genotip dağılımlarının karşılaştırılması Tablo 4-10'da yer almaktadır. E3/E3 genotipi taşıyanların oran ortalamaları 4,89±1,42 ve bu genotipi taşımayanların oran ortalamalarının 4,26±1,13

olduğu ve bu iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olduğu saptanmıştır (p=0,027). E3/E4 genotipi taşıyanlarda ortalama $4,33\pm 1,31$ ve taşımayanlarda ortalama oran $4,84\pm 1,40$ olarak bulunmuştur (p=0,163). E2/E3 genotipi taşıyanlarda ortalama $4,10\pm 0,95$ ve taşımayanlarda ise $4,83\pm 1,41$ olarak saptanmıştır (p=0,108). E2/E2 genotipi taşıyan bir kişide oran 5,21, taşımayanlarda ortalama oran $4,79\pm 1,40$ olduğu gözlenmiştir (p=0,769). E4/E4 genotipi taşıyanlarda oran $4,13\pm 0,89$, taşımayanlarda oran ortalaması $4,80\pm 1,40$ olarak saptanmıştır (p=0,503).

Kolesterol/HDL oranı 3.5'in altında olanlar genotip özelliklerine göre değerlendirildiklerinde; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmemiştir. ((E3/E3 n=23; p=0,226, E3/E4 n=4; p=0,336, E2/E3 n=3; p=0,216, E2/E2 n=0; p=0,835, E4/E4 n=0; p=0,697) (Tablo 4-10).

Tablo 4-10'da görüldüğü gibi kolesterol/HDL oranı 3.5-4.5 arasında olanların genotip dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (E3/E3 n=46; p=0,637, E3/E4 n=4; p=0,601, E2/E3 n=5; p=0,283, E2/E2 n=4; p=0,692, E4/E4 n=1; p=0,522).

Kolesterol/HDL oranı 4.5'in üstünde olanların ApoE genotiplerinin dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ((E3/E4 n=21; p=0,259, E3/E4 n=8; p=0,712, E2/E3 n=2; p=0,190, E2/E2 n=1; p=0,544, E4/E4 n=1; p=0,705) (Tablo 4-10).

Çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) düzeyleri ortalamasının genotipler ile karşılaştırıldığında E3/E3 genotipi taşıyanların ortalaması $29,99\pm 15,20$ mg/dl iken taşımayanlarda $25,83\pm 10,60$ mg/dl olduğu saptanmıştır (p=0,161). E3/E4 genotipi taşıyanların VLDL ortalaması $25,50\pm 11,96$ mg/dl, taşımayanların ise $29,69\pm 14,83$ mg/dl olarak belirlenmiştir (p=0,275). E2/E3 genotipi taşıyanların VLDL ortalaması $24,70\pm 9,87$ mg/dl iken taşımayanlarda bu değer $29,59\pm 14,83$ mg/dl olarak bulunmuştur (p=0,305). E2/E2 genotipindeki bir katılımcının VLDL seviyesi 28mg/dl'dir ve bu genotipte olmayan diğer katılımcıların ortalama değeri $29,33\pm 14,66$ mg/dl olarak tespit edilmiştir (p=0,928). E4/E4 genotipi taşıyanların VLDL ortalaması $33\pm 0,00$ mg/dl, taşımayanların ise $29,28\pm 14,70$ mg/dl olduğu saptanmıştır (p=0,722).

Tablo 4-11'de plazma lipid değerleri ile ApoE allel dağılımlarının karşılaştırılması yer almaktadır. E2 alleli taşıyan 11 katılımcının plazma kolesterol ortalaması $168,91\pm 23,69$ mg/dl ve taşımayan 171 katılımcının değerlerinin

187,91±44,51mg/dl olduğu ve bu iki grup arasında anlamlı olarak fark olmadığı saptanmıştır (p=0,163). E3 alleli taşıyanlarda (n=179) kolesterol değerleri ortalama değer 187,16±43,86mg/dl ve taşımayan (n=3) ortalama değer 162,67±30,66mg/dl'dir, gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark belirlenmemiştir (p=0,337). E4 alleli taşıyan 17 kişide plazma kolesterol ortalaması 165,82±40,75mg/dl ve bu alleli taşımayan 165 kişi de bu değer 188,92±43,57mg/dl olduğu belirlenmiş olup gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmıştır (p=0,038).

Plazma kolesterol değeri 200mg/dl'nin altında olanlar allel dağılımlarına göre değerlendirildiklerinde; E2 alleli taşıyan 10 katılımcı ile bu genotipi taşımayan 103 kişi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($X^2=4,132$, p=0,042). E3 ve E4 alleli dağılımları ve plazma kolesterol değeri 200mg/dl'nin altında olanlar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (E3 alleli; p=0,237, E4 alleli; p=0,057) (Tablo 4-11).

Plazma kolesterol değerleri 200-239mg/dl arasında olanların allel dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamamıştır (E2 alleli; p=0,298, E3 alleli; p=0,424, E4 alleli; p=0,353) (Tablo 4-11).

Kolesterol değeri 240mg/dl'nin üstünde olan ve E2 alleli taşıyanlar (n=0) ve taşımayanlar (n=21) karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (p=0,368). Ayrıca E3 taşıyan (n=21) ve taşımayanlar (n=0) karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,691). Plazma kolesterol değeri 240mg/dl'nin üstünde olanların E4 allel taşıyan (n=0) ve taşımayanların (n=21) karşılaştırılması sonucunda istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,112) (Tablo 4-11).

Trigliserid değerleri ile ApoE allel dağılımları karşılaştırıldığında E2 alleli taşıyanların ortalaması 141,82±57,71mg/dl ve taşımayanların ortalamasının 148,12±76,36mg/dl olduğu ve bu iki grup arasında anlamlı olarak fark olmadığı gözlenmiştir (p=0,789). E3 alleli taşıyanlarda ise ortalama TG düzeyleri 147,46±75,47mg/dl ve taşımayanlarda ise ortalama değer 164,33±72,00 mg/dl olarak belirlenmiştir (p=0,701). E4 alleli taşıyan kişilerde TG düzeyleri ortalaması 124,88±60,46mg/dl ve bu alleli taşımayanlarda ise bu değer 150,09±76,38mg/dl olarak bulunmuştur (p=0,189).

Trigliserid değeri 200mg/dl'nin altında olanların ApoE allel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (E2 alleli; p=0,957, E3 alleli; p=0,237, E4 alleli; p=0,057) (Tablo 4-11).

Trigliserid değerleri 200-399mg/dl arasında olanların allel dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir (E2 alleli; p=0,569, E3 alleli; p=0,419, E4 alleli; p=0,190).

Plazma TG değeri 400mg/dl'nin üstünde olanların allel dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (E2 alleli; p=0,882, E3 alleli; p=0,967, E4 alleli; p=0,821).

Tablo 4-11'de yer alan ApoE allel dağılımlarının LDL ortalama değerleri ile karşılaştırılması sonuçlarına göre E2 alleli taşıyanlarda ortalama değer 111,91±26,71mg/dl iken taşımayanlarda 118,60±39,32mg/dl olduğu gözlenmiştir (p=0,580). E3 alleli taşıyanlarda ortalama LDL düzeyi 111,91±26,71mg/dl, taşımayanlarda 118,19±38,71mg/dl olarak bulunmuştur (p=0,995). LDL değeri E4 allele göre karşılaştırıldığında bu alleli taşıyanlarda ortalama değer 104,12±27,01mg/dl iken taşımayanlarda 119,64±39,43mg/dl olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,115).

LDL değerleri 130mg/dl'nin altında olanların ApoE allel dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (E2 alleli; p=0,314, E3 alleli; p=0,663, E4 alleli; p=0,394).

Plazma LDL seviyesi 130-159mg/dl arasında olanların allel dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (E2 alleli; p=0,569, E3 alleli; p=0,483, E4 alleli; p=0,400).

LDL değerleri 160mg/dl'nin üstünde olanların ApoE allel dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (E2 alleli; p=0,431, E3 alleli; p=0,419, E4 alleli; p=0,080).

ApoE allel dağılımlarının HDL ortalama değerleri ile karşılaştırılması sonuçlarına göre E2 alleli taşıyanlarda ortalama değer 41,36±7,13mg/dl iken taşımayanlarda 40,54±10,08mg/dl olduğu belirlenmiştir (p=0,791). E3 alleli taşıyanlarda ortalama HDL seviyesi 40,66±9,97mg/dl, taşımayanlarda 36,67±6,11mg/dl olduğu gözlenmiştir (p=0,491). LDL değeri E4 allele göre karşılaştırıldığında bu alleli

taşıyanlarda ortalama değer $41,00 \pm 13,37$ mg/dl iken taşımayanlarda $40,55 \pm 9,55$ mg/dl olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,860$).

Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) değerleri 35 mg/dl'nin altında olanların ApoE allel dağılımlarına göre incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (E2 alleli; $p=0,125$, E3 alleli; $p=0,638$, E4 alleli; $p=0,936$).

HDL seviyesi 35-44 mg/dl arasında olanların allel dağılımlarına göre yapılan istatistiksel çalışmada gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (E2 alleli; $p=0,167$, E3 alleli; $p=0,426$, E4 alleli; $p=0,530$).

ApoE allel dağılımları ve HDL değerleri 45 mg/dl üstünde olanlar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (E2 alleli; $p=0,592$, E3 alleli; $p=0,397$, E4 alleli; $p=0,519$).

Plazma kolesterolün HDL düzeyine oranı ve ApoE allel frekanslarının karşılaştırılması Tablo 4-11'da yer almaktadır. E2 alleli taşıyanların oran ortalamaları $4,2 \pm 0,96$ mg/dl ve bu alleli taşımayanların oran ortalamalarının $4,8 \pm 1,41$ mg/dl olduğu ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,499$). E3 alleli taşıyanlarda ortalama $4,83 \pm 1,41$ mg/dl ve taşımayanlarda ortalama oran $4,94 \pm 0,88$ mg/dl'dir, gruplar arasında anlamlı fark belirlenmemiştir ($p=0,706$). Bu oran E4 alleli taşıyanlarda ortalama $4,33 \pm 1,29$ mg/dl ve taşımayanlarda ortalama $4,84 \pm 1,40$ mg/dl gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,132$).

Kolesterol/HDL oranı 3.5'in altında olanlar allel frekanslarına göre değerlendirildiklerinde; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (E2 alleli; $p=0,264$, E3 alleli; $p=0,581$, E4 alleli; $p=0,299$) (Tablo 4-11).

Tablo 4-11'da görüldüğü gibi kolesterol/HDL oranı 3.5-4.5 arasında olanların allel frekansları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (E2 alleli; $p=0,221$, E3 alleli; $p=0,671$, E4 alleli; $p=0,353$).

Kolesterol/HDL oranı 4.5'in üstünde olanların ApoE allel dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmemiştir (E2 alleli; $p=0,177$, E3 alleli; $p=0,586$, E4 alleli; $p=0,899$) (Tablo 4-11).

ApoE allel dağılımlarının VLDL ortalama değerleri ile karşılaştırılması sonuçlarına göre E2 alleli taşıyanlarda ortalama değer $25 \pm 9,4$ mg/dl iken taşımayanlarda $29,60 \pm 14,87$ mg/dl olarak belirlenmiştir ($p=0,313$). E3 alleli taşıyanlarda ortalama

VLDL seviyesi $29,29 \pm 14,74$ mg/dl, taşımayanlarda ise $31,33 \pm 2,88$ mg/dl olarak saptanmıştır ($p=0,811$). VLDL düzeyi E4 alleline göre karşılaştırıldığında bu alleli taşıyanlarda ortalama değer $26,53 \pm 11,81$ mg/dl iken taşımayanlarda $29,61 \pm 14,88$ mg/dl olarak tespit edilmiştir ($p=0,409$) (Tablo 4-11).

Tüm lipid profilleri ve hasta-kontrol örneklere ait ApoE genotip ve allel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olan gruplarının logistik regresyon analizleri Tablo 4-12’de verilmiştir. Yüksek plazma kolesterol düzeyinin E3/E3 genotipi ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu genotipi taşımanın plazma kolesterol düzeyinin 240mg/dl üstünde olma riskini 5,2 kat artırdığı görülmüştür. Ayrıca bu genotipi taşımayanların, taşıyanlara göre 5 kat daha fazla oranla kolesterol düzeyinin 200mg/dl’nin altında olduğu gözlenmiştir. Kolesterol/HDL oranı E3/E3 genotipi taşıyanlarda 1.4 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (Tablo 4-12).

E4 alleli taşıyanlarda plazma kolesterol seviyelerlerinin taşımayanlara oranla bir kat daha düşük olduğu gözlenmiştir (Tablo 4-12)

Tablo 4-11. Hasta ve kontrol gruplarına ait ApoE Allel ve lipid değerleri ile karşılaştırılması

	Apo E2		Apo E3		Apo E4	
	taşıyan n=11	taşımayan n=171	taşıyan n=179	Taşımayan n=3	taşıyan n=17	taşımayan n=165
Plazma Kolestertol (mg/dl)	168,91± 23,69	187,91 ± 44,51	187,16 ± 43,86	162,67± 30,66	165,82 ± 40,75	188,92 ± 43,57
< 200	n=10	n=103	n=110	n=3	n=14	n=99
200-239	n=1	n=41	n=45	n=0	n=3	n=42
> 240	n=0	n=21	n=21	n=0	n=0	n=21
	p=0,163		p=0,337		p=0,038*	
	p=0,036*		p=0,237		p=0,057	
	p=0,298		p=0,424		p=0,353	
	p=0,368		p=0,691		p=0,112	
Trigliserid (mg/dl)	141,82± 57,71	148,12± 76,36	147,46± 75,47	164,33± 72,00	124,88± 60,46	150,09± 76,38
< 200	n=9	n=141	n=148	n=2	n=16	n=134
200-399	n=2	n=28	n=29	n=1	n=1	n=29
> 400	n=0	n=2	n=3	n=0	n=0	n=2
	p=0,789		p=0,701		p=0,189	
	p=0,957		p=0,442		p=0,159	
	p=0,569		p=0,419		p=0,190	
	p=0,882		p=0,967		p=0,821	
LDL (mg/dl)	111,91± 26,71	118,60± 39,32	118,19± 38,71	118,33± 42,47	104,12± 27,01	119,64± 39,43
< 130	n=8	n=103	n=109	n=2	n=12	n=99
130-159	n=2	n=37	n=39	n=0	n=5	n=34
> 160	n=1	n=29	n=29	n=1	n=0	n=30
	p=0,580		p=0,995		p=0,115	
	p=0,314		p=0,663		p=0,394	
	p=0,569		p=0,483		p=0,400	
	p=0,431		p=0,419		p=0,080	
HDL (mg/dl)	41,36± 7,13	40,54 ± 10,08	40,66 ± 9,97	36,67± 6,11	41,00± 13,37	40,55 ± 9,55
< 35	n=1	n=51	n=51	n=1	n=5	n=47
35-44	n=7	n=75	n=80	n=2	n=8	n=74
> 45	n=3	n=45	n=48	n=0	n=4	n=44
	p=0,791		p=0,491		p=0,86	
	p=0,125		p=0,638		p=0,936	
	p=0,167		p=0,426		p=0,530	
	p=0,592		p=0,397		p=0,519	
Kolesterol / HDL Oranı	4,20 ± 0,96	4,83± 1,41	4,80± 1,41	4,49± 0,88	4,3 ± 1,29	4,84 ± 1,40
< 3,5	n=3	n=27	n=149	n=3	n=4	n=26
3,6-4,5	n=5	n=51	n=55	n=0	n=4	n=52
> 4,5	n=4	n=95	n=97	n=0	n=9	n=90
	p=0,149		p=0,706		p=0,132	
	p=0,264		p=0,581		p=0,299	
	p=0,221		p=0,671		p=0,353	
	p=0,177		p=0,586		p=0,899	
VLDL (mg/dl)	25,00 ± 9,40	29,60 ± 14,87	29,29 ± 14,74	31,33 ± 2,88	26,53 ± 11,81	29,61 ± 14,88
	p=0,313		p=0,811		p=0,409	

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

Tablo 4-12. Hasta ve kontrol örneklere ait ApoE genotip ve allel dağılımlarının lipid değerlerinin logistik regresyon analizleri

Genotip	Lipid Değerleri	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	Risk (Odds Ratio)	%95 Güven Aralığı
	Plazma kolesterol (mg/dl)	0,012	0,005	0,014*	1,012	1,002-1,022
	Plazma kolesterol <200 mg/dl	-1,530	0,563	0,007*	0,217	0,072-0,653
	Plazma kolesterol >240 mg/dl	1,663	0,203	0,034*	5,276	0,751-6,973
E3/E3	LDL >160 mg/dl	1,879	1,038	0,070	6,548	0,856-50,121
	Kolesterol/HDL Oranı	0,357	0,163	0,029*	1,429	1,038-1,967
Allel						
E2	Plazma kolesterol <200 mg/dl	1,887	1,060	0,075	6,600	0,826-52,751
E4	Plazma kolesterol (mg/dl)	-0,013	0,006	0,041*	0,987	0,976-1,000

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

4.5. mikroRNA Sonuçları

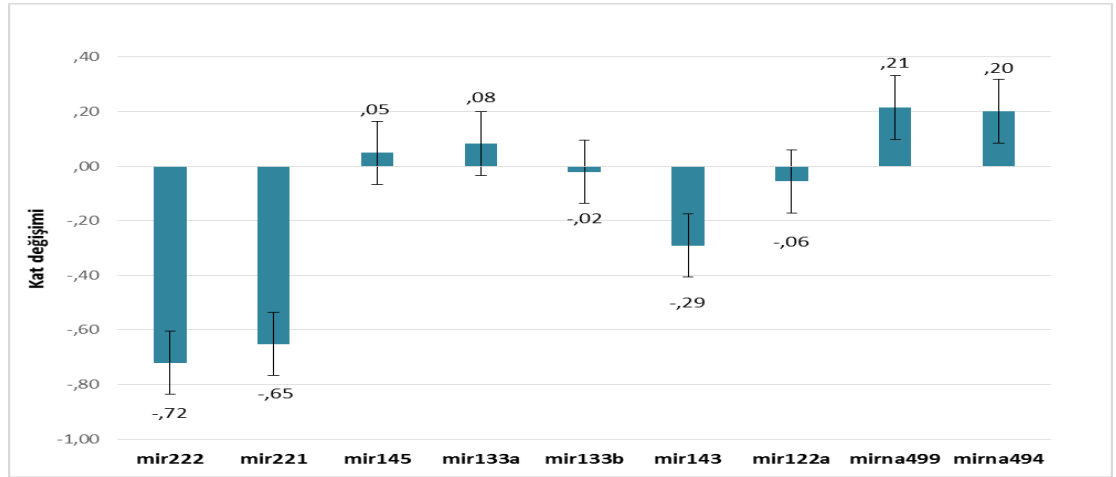
İncelenen miRNAların tüm kontrol oluşturularak hesaplanan ($LN[2^{(-\Delta\Delta Ct)}]$) kat değişim değerleri Şekil 4-2A'da gösterilmiştir. Tüm kontrole göre ekspresyonu seviyelerinin miRNA222'de 0,72 kat, miRNA221'de 0,65 kat, miRNA133b'de 0,02 kat, miRNA143'de 0,29 kat, miRNA122a'da 0,06 kat azaldığı saptanmıştır. İfade düzeylerinin miRNA145 0,05 kat, miRNA133a 0,08 kat, miRNA499a 0,21 kat ve miRNA494 0,20 kat arttığı belirlenmiştir.

$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değişimi incelendiğinde ise miRNA222'de 0,48 kat, miRNA221'de 0,51 kat, miRNA133b'de 0,98 kat, miRNA143'de 0,76 kat, miRNA122a'da 0,96 kat azaldığı saptanmıştır. İfade düzeylerinin miRNA145 1,05 kat, miRNA133a 1,16 kat, miRNA499a 1,33 kat ve miRNA494 1,23 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4-2B).

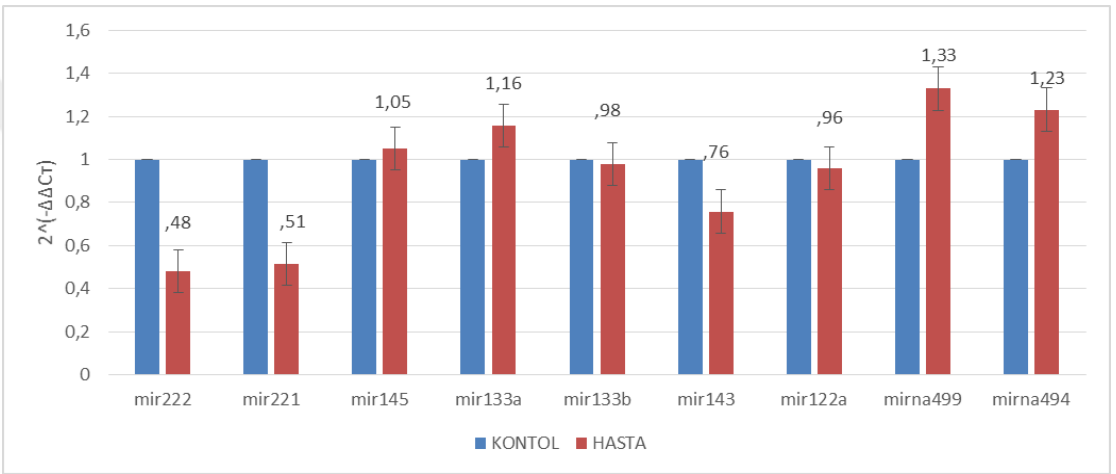
miRNAların ifade düzeyleri internal kontrol (SNORD61, SNORD68, U6) ile kıyaslandığı ΔCt sonuçlarının miRNA222 -1,64, miRNA221 -2,78, miRNA145 -2,82, miRNA143 -0,27, miRNA122a -2,96, miRNA494 -5,02 kat azaldığı miRNA133a 1,22, miRNA133b 1,5, miRNA499a 1,82 kat arttığı saptanmıştır (Şekil 4-2C).

Plazma mikroRNA seviyelerinin ΔCt ve kat değişim değerlerinin regresyon analizleri Tablo 4-13'de verilmiştir. MiRNA221 ve miRNA221 düzeylerinin ΔCt ve kat değişimi değerlerine göre karşılaştırıldığında kontrole göre hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır (miRNA221: OR=1,33;p=0,004 ve OR=0,71; p=0,011; miRNA222: OR=1,42;p=0,001 ve OR=0,65; p=0,004). Diğer mikroRNAlar ΔCt ve kat değişim açısından değerlendirildiklerinde; hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmemiştir (miRNA145 OR=0,98; p=0,900/OR=1,02;p=0,823, miRNA143 OR=1,14;p=0,138/OR=0,832;p=0,148, miRNA133a OR=1,10;p=0,836/OR=0,971;p=0,836, miRNA133b OR=0,98;p=0,872/OR=1,01;p=0,914, miRNA122a OR=1,05;p=0,525/OR=0,948;p=0,642, miRNA494 OR=0,92;p=0,444/OR=1,22;p=0,147, miRNA499a OR=0,88; p=0,396/ OR=1,09;p=0,638).

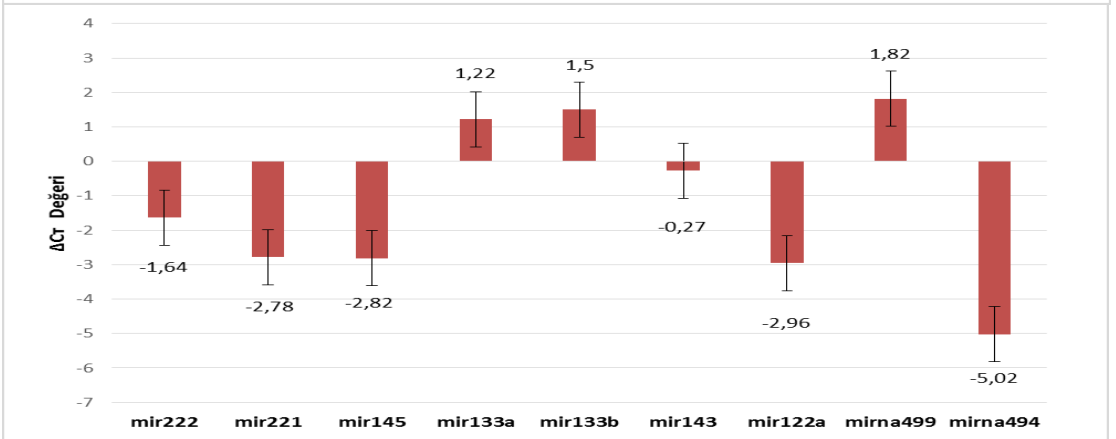
A)



B)



C)



Şekil 4-2 mikroRNA Analizleri. (A):Real Time PCR ile belirlenen plazma miRNA seviyelerinin kat değışımi ($LN[2^{(-\Delta\Delta Ct)}]$) dağılım grafiği kontrol (sıfır) kat değerine göre çizilmiştir, (B) $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerlerinin dağılım grafiği kontrol (1) kat değerine göre çizilmiştir, (C): ΔCt değeri dağılım grafiği kontrol (sıfır) değerine göre çizilmiştir.

Tablo 4-13. Hasta ve kontrol gruplarının plazma miRNA düzeylerinin logistik regresyon analizleri.

MiRNA	Yöntem	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	Risk (Odds Ratio)	%95 Güven Aralığı
MiRNA221	ΔC_T	0,291	0,100	0,004*	1,338	1,099 - 1,629
	Kat Değişimi	-0,338	0,133	0,011*	0,713	0,549 - 0,926
MiRNA222	ΔC_T	0,352	0,108	0,001*	1,421	1,150 - 1,757
	Kat Değişimi	-0,422	0,145	0,004*	0,656	0,494 - 0,872
MiRNA145	ΔC_T	0,020	0,091	0,823	1,021	0,853 - 1,221
	Kat Değişimi	-0,016	0,129	0,900	0,984	0,763 - 1,268
MiRNA143	ΔC_T	0,134	0,090	0,138	1,143	0,958 - 1,364
	Kat Değişimi	-0,184	0,127	0,148	0,832	0,648 - 1,068
MiRNA133a	ΔC_T	0,018	0,880	0,839	1,108	0,856 - 1,210
	Kat Değişimi	-0,030	0,128	0,816	0,971	0,755 - 1,248
MiRNA133b	ΔC_T	-0,017	0,106	0,872	0,983	0,799 - 1,210
	Kat Değişimi	0,017	0,155	0,914	1,017	0,751 - 1,376
MiRNA122a	ΔC_T	0,051	0,081	0,525	1,052	0,899 - 1,232
	Kat Değişimi	-0,054	0,115	0,642	0,948	0,756 - 1,188
MiRNA494	ΔC_T	-0,082	0,107	0,444	0,921	0,747 - 1,137
	Kat Değişimi	0,199	0,137	0,147	1,220	0,932 - 1,596
MiRNA499a	ΔC_T	-0,118	0,140	0,396	0,888	0,676 - 1,168
	Kat Değişimi	0,088	0,188	0,638	1,092	0,756 - 1,578

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

4.6. mikroRNA ROC Sonuçları

Tüm plazma miRNA seviyelerinin ve hasta ve kontrol gruplarında tanı değerini sahip saptamak için MedCalc Programı kullanılarak Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic=ROC) analizi yapılmıştır. Şekil 4-3'de görüldüğü üzere miRNA221 ve mir 222 ifade seviyelerinin hasta gruplarında eşik değeri olarak değerlendirilebileceği saptanmıştır. Kat değişimi değerlerine göre miRNA221 eşik değeri $\leq -0,783$ Area Under Curve (AUC)=0,623 olarak belirlenmiş ve $p=0,0086$, ΔC_T için ise $> -2,61$ 'dir, AUC=0,636 olarak tespit edilmiştir ($p=0,0044$). Kat değişimi değerlerine göre miRNA222 eşik değeri $\leq -0,471$, AUC=0,654, olarak belirlenmiştir ($p=0,0006$), ΔC_T için ise $> -2,98$ 'dir ($p=0,0003$).

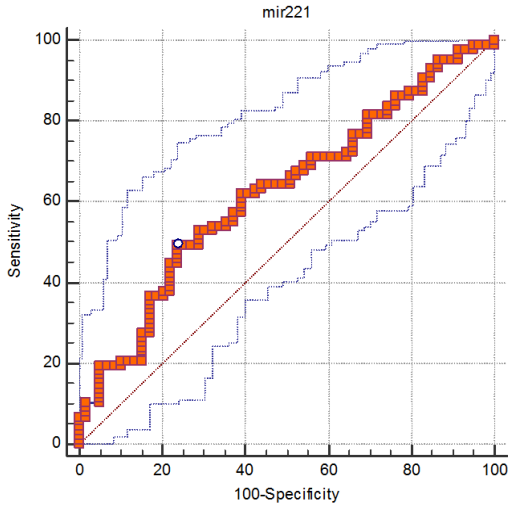
Yapılan analiz sonucunda miRNA133a ve miRNA133b ifade düzeylerinin hasta gruplarında tanı olarak değerlendirilebileceği eşik değeri belirlenmemiştir. Kat değişimi değerlerine göre miRNA133a AUC=0,623 olarak saptanmıştır ($p=0,730$) ΔC_T için AUC=0,506 olarak belirlenmiştir ($p=0,91$). Kat değişimi değerlerine göre miRNA133b, AUC=0,540 $p=0,503$ olarak bulunmuştur, ΔC_T için ise AUC=0,535'dir ($p=0,590$) (Şekil 4.4).

Şekil 4.5'de görüldüğü üzere miRNA143 ve miRNA145 ifade seviyelerinin hasta gruplarında tanı olarak değerlendirilebileceği eşik değeri saptanmamıştır. Kat değişimi değerlerine göre miRNA143 AUC=0,556 olarak belirlenmiştir ($p=0,249$). ΔC_T için AUC=0,568 olarak saptanmıştır ($p=0,164$). Kat değişimi değerlerine göre miRNA145, AUC=0,508 olarak ($p=0,867$), ΔC_T için ise AUC=0,515 ($p=0,769$) olarak belirlenmiştir,

miRNA 494 ve miRNA 499a ifade seviyelerinin hasta gruplarında tanı olarak değerlendirilebileceği eşik değeri ortaya konulmamıştır. Kat değişimi değerlerine göre miRNA494 AUC=0,545 olarak gösterilmiş ve $p=0,360$ 'dir, ΔC_T için AUC=0,522 olarak gösterilen ve $p=0,667$ olarak tespit edilmiştir. Kat değişimi değerlerine göre ise miRNA499a, AUC=0,542 $p=0,557$ olarak saptanmıştır, ΔC_T için ise AUC=0,568, $p=0,347$ 'dir. (Şekil4.6)

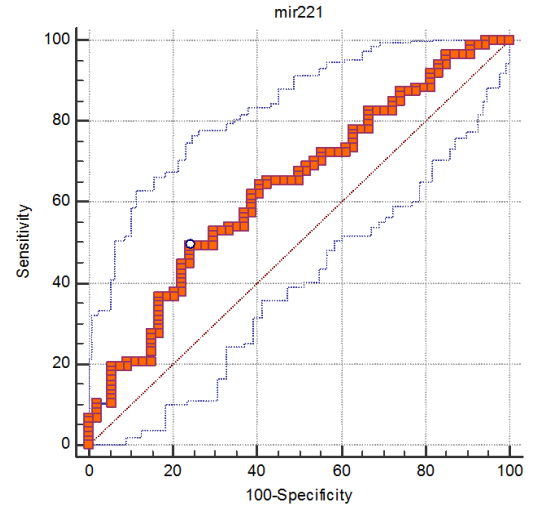
miRNA122a ifade seviyesinin hasta gruplarında tanı olarak değerlendirilebileceği eşik değeri saptanılmamıştır. Kat değişimi değerlerine göre ise miRNA122a AUC=0,524 olarak belirlenmiştir ($p=0,623$), ΔC_T için AUC=0,534 olarak saptanmıştır ($p=0,491$) (Şekil4.7).

A) miRNA 221 ROC grafiği (kat değişimi)



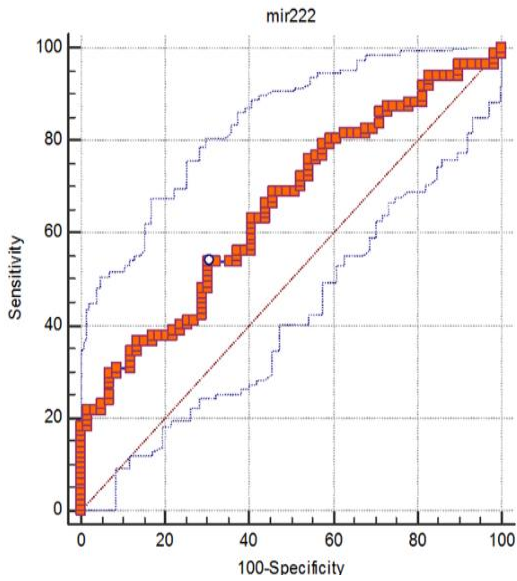
AUC=0,623
%95 CI=0,539 - 0,702
≤ -0,783
p=0,0086*

B) miRNA 221 ROC grafiği (ΔC_T)



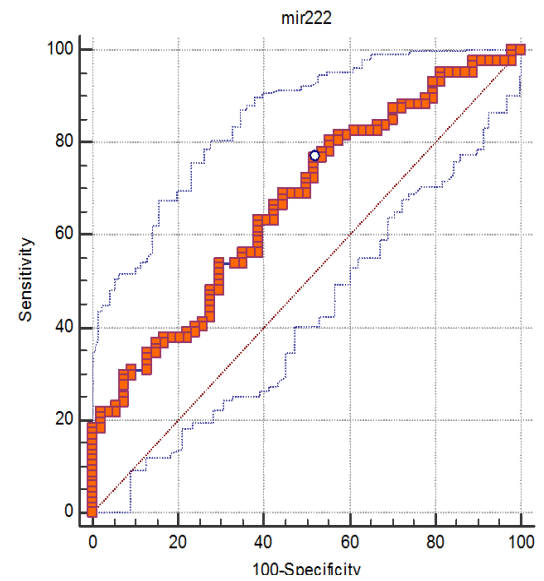
AUC=0,636
%95 CI=0,551 - 0,715
> -2,61
p=0,0044*

C) miRNA 222 ROC grafiği (kat değişimi)



AUC=0,654
%95 CI=0,571 - 0,731
≤ -0,471
p=0,0006*

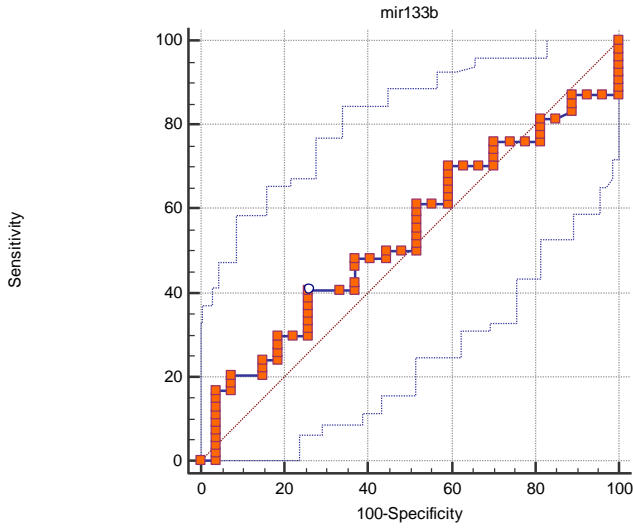
D) miRNA 222 ROC grafiği (ΔC_T)



AUC=0,667
%95 CI=0,539 - 0,702
> -2,98
p=0,0003*

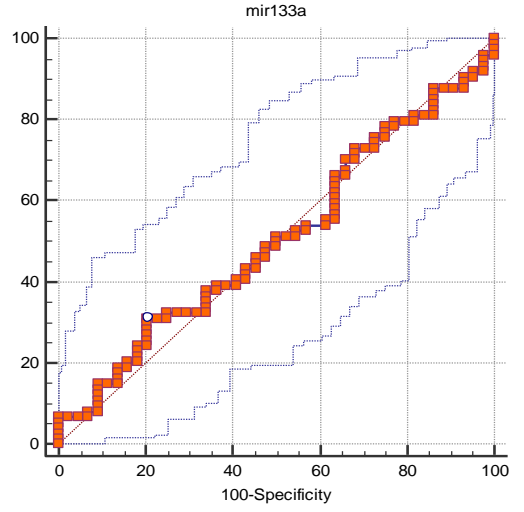
şekil 4.3. Plazma miRNA221 ve miRNA222 seviyelerinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi grafikleri. A) Kat değişimine [LN (2^{-ΔΔC_T})] göre miRNA221 seviyesinin analizleri. B) ΔC_T değerlerine göre miRNA221 seviyesinin analizleri. C) Kat değişimine [LN (2^{-ΔΔC_T})] göre miRNA222 seviyesinin analizleri. D) ΔC_T değerlerine göre miRNA222 seviyesinin analizleri. * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık gostermektedir (p<0,05).

A) miRNA133a ROC grafiği (kat değişimi)



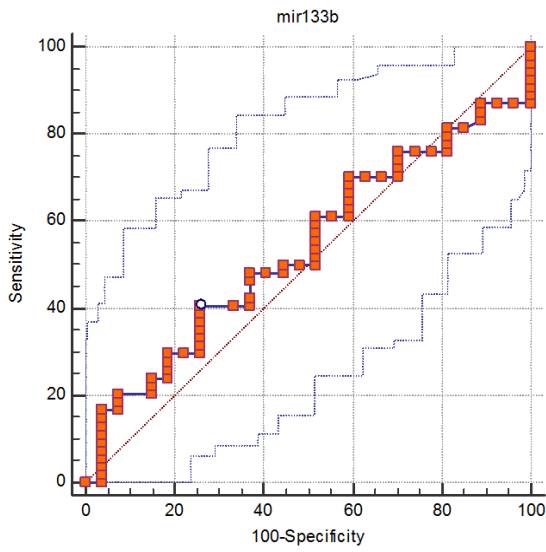
AUC=0,518
%95 CI=0,420 - 0,614
 $\leq -1,039$
p=0,730

B) miRNA133a ROC grafiği (ΔC_T)



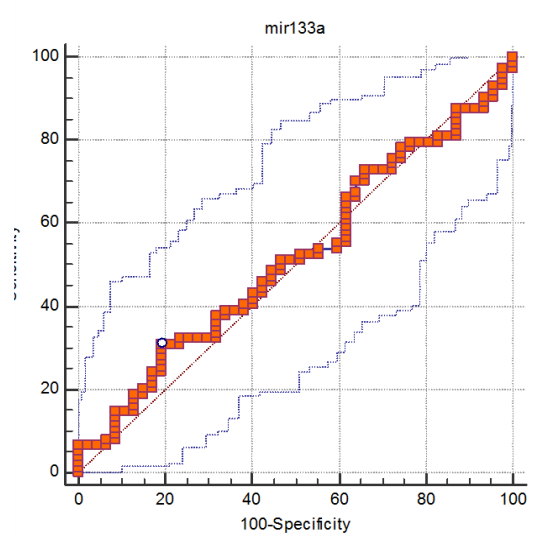
AUC=0,506
%95 CI=0,413 - 0,599
 $> 2,77$
p=0,910

C) miRNA133b ROC grafiği (kat değişimi)



AUC=0,540
%95 CI=0,107 - 0,140
 $> 0,510$
p=0,503

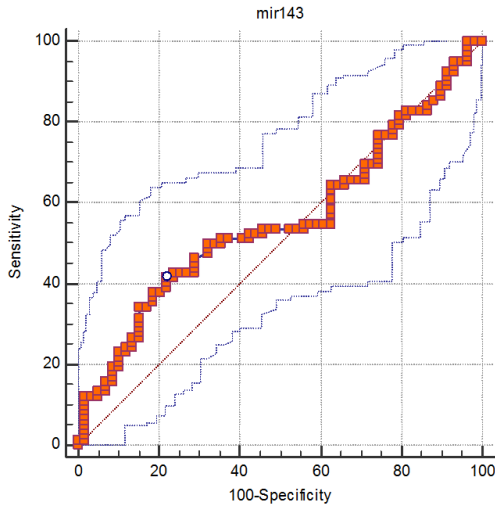
D) miRNA133b ROC grafiği (ΔC_T)



AUC=0,535
%95 CI=0,421 - 0,647
 $\leq -0,58$
p=0,590

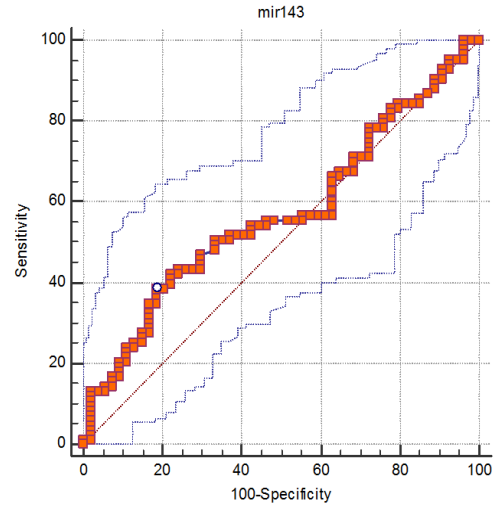
şekil 4.4. Plazma miRNA133a ve miRNA133b seviyelerinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi grafikleri. A) Kat değişimine [$\text{LN}(2^{-\Delta\Delta C_T})$] göre mir133a seviyesinin analizleri. B) ΔC_T değerlerine göre mir133a seviyesinin analizleri. C) Kat değişimine [$\text{LN}(2^{-\Delta\Delta C_T})$] göre mir133b seviyesinin analizleri. D) ΔC_T değerlerine göre mir133b seviyesinin analizleri. * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık gstermektedir ($p < 0,05$).

A) miRNA 143 ROC grafiği (katdeğişimi)



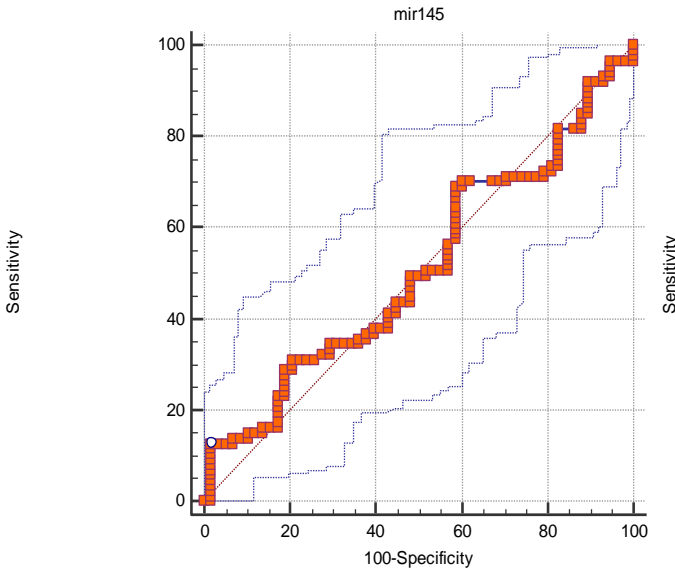
AUC=0,556
%95 CI=0,470 - 0,640
≤ -0,596
p=0,249

B) MiRNA 143 ROC grafiği (ΔC_T)



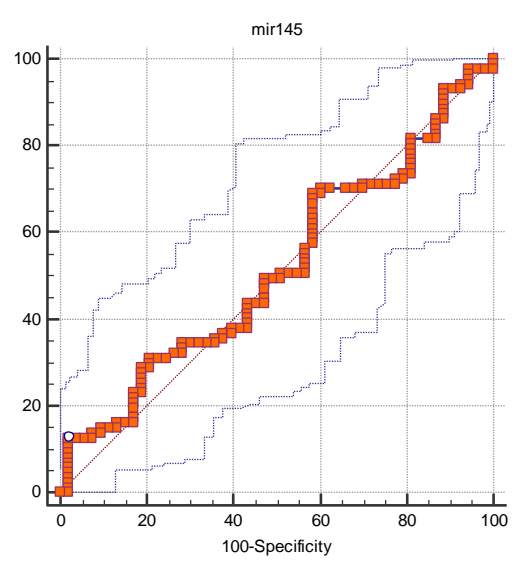
AUC=0,568
%95 CI=0,088 - 0,298
> 0,32
p=0,164

C) miRNA 145 ROC grafiği (kat değişimi)



AUC=0,508
%95 CI=0,424 - 0,592
≤ -1,649
p=0,867

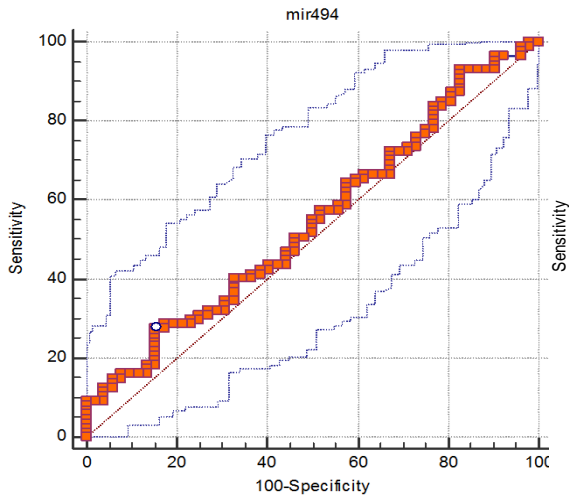
D) miRNA 145 ROC grafiği (ΔC_T)



AUC=0,515
%95 CI=0,429 - 0,600
> -0,39
p=0,769

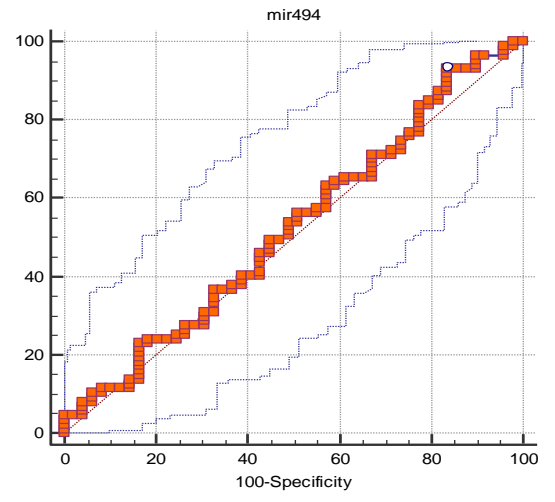
şekil 4.5. Plazma miRNA143 ve miRNA145 seviyelerinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi grafikleri. A) Kat değişimine [$\ln(2^{-\Delta\Delta C_T})$] göre mir143 seviyesinin analizleri. **B)** ΔC_T değerlerine göre mir143 seviyesinin analizleri. **C)** Kat değişimine [$\ln(2^{-\Delta\Delta C_T})$] göre mir145 seviyesinin analizleri. **D)** ΔC_T değerlerine göre mir145 seviyesinin analizleri. * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık gstermektedir ($p < 0,05$).

A) miRNA 494 ROC grafiği (kat değişimi)



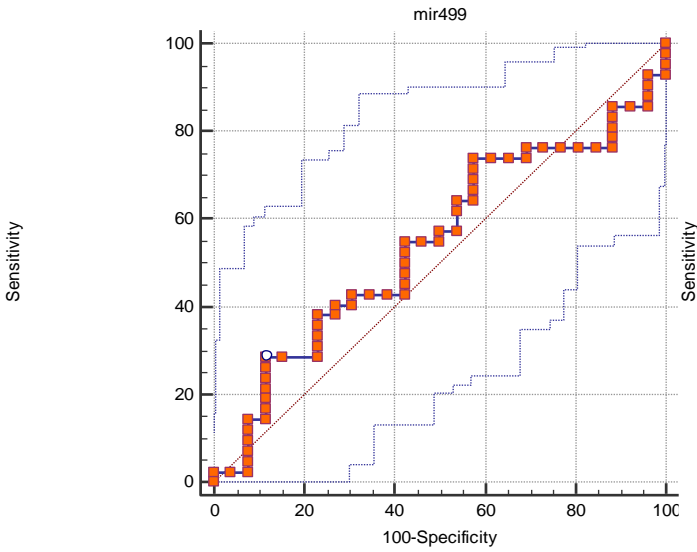
AUC=0,545
%95 CI=0,459 - 0,630
> 1,16
p=0,360

B) miRNA 494 ROC grafiği (ΔC_T)



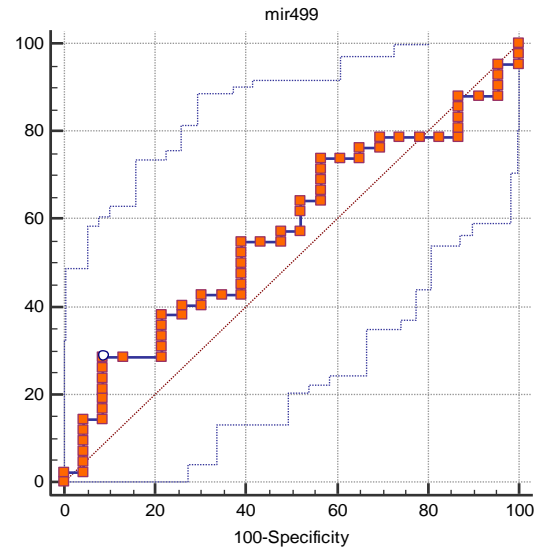
AUC=0,522
%95 CI=0,435 - 0,609
 \leq -2,78
p=0,667

C) miRNA499 ROC grafiği (kat değişimi)



AUC=0,542
%95 CI=0,417 - 0,664
> 0,82
p=0,557

D) miRNA 499 ROC grafiği(ΔC_T)

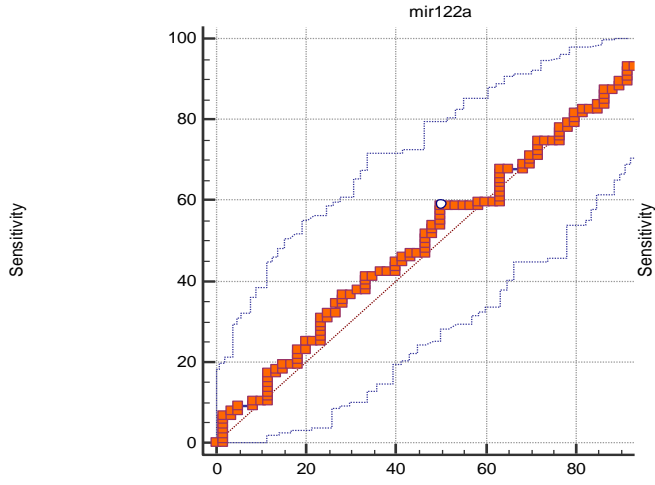


AUC=0,568
%95 CI=0,440 - 0,691
 \leq 0,82
p=0,347

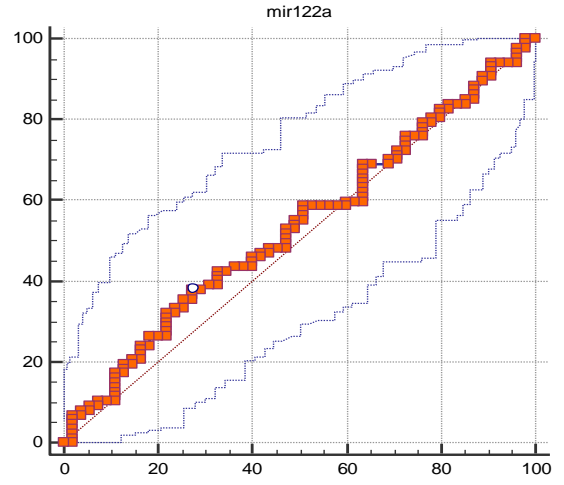
şekil 4.6. Plazma miRNA494 ve miRNA499 seviyelerinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi grafikleri.A) Kat değişimine [$\text{LN}(2^{(-\Delta\Delta C_T)})$] göre mir494 seviyesinin analizleri. B) ΔC_T değerlerine göre mir494 seviyesinin analizleri. C) Kat değişimine [$\text{LN}(2^{(-\Delta\Delta C_T)})$] göre mir499 seviyesinin analizleri. D) ΔC_T değerlerine göre mir145 seviyesinin analizleri. * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p < 0,05$).

A) miRNA122a ROC grafiği (kat değişimi)

B) miRNA122a ROC grafiği (ΔC_T)



AUC=0,524
%95 CI=0,440 - 0,607
 $\leq 0,08$
p=0,623



AUC=0,534
%95 CI=0,448 - 0,618
> -2,14
p=0,491

şekil 4.7. Plazma miRNA122a seviyesinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi grafikleri. A) Kat değişimine $[\text{LN}(2^{-\Delta\Delta C_T})]$ göre miRNA122a seviyesinin analizleri. B) ΔC_T değerlerine göre miRNA122a seviyesinin analizleri. * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık gostermektedir ($p < 0,05$).

4.7.mikroRNA ve Lipid Değerlerine Karşılaştırma Analizleri

miRNAların ΔC_T ve kat değişimi değerlerine ile plazma kolesterol düzeyleri arasında ilişki doğrusal regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Karşılaştırılan veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (miRNA221 ΔC_T p=0,279; kat değişimi p=0,172, miRNA222 ΔC_T p=0,460; kat değişimi p=0,316, miRNA145 ΔC_T p=0,367; kat değişimi p=0,303, miRNA143 ΔC_T p=0,930; kat değişimi p=0,971, miRNA133a ΔC_T p=0,799; kat değişimi p=0,832, miRNA133b ΔC_T p=0,621; kat değişimi p=0,671, miRNA122a ΔC_T p=0,656; kat değişimi p=0,793, miRNA494 ΔC_T p=0,719; kat değişimi p=0,752, miRNA499a ΔC_T p=0,544; kat değişimi p=0,830) (Tablo 4-14).

Tablo 4-15’de görüldüğü üzere plazma miRNAların ΔC_T ve kat değişimi değerlerine ile TG düzeyleri arasında ilişkiyi göstermek için doğrusal regresyon analizi kullanılmıştır. miRNA122a ΔC_T seviyesi ve TG düzeyi arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (kat sayısı=131,55±11,01, p=0,046, %95CI 109,78-153,32); kat değişimi verileri ile anlamlılığa yakın bir ilişki gözlenmiştir (kat sayısı=149,47±6,34, p=0,059, %95CI 136,92-165,01). Diğer miRNAlar ve TG düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanamamıştır (miRNA221 ΔC_T p=0,279; kat değişimi p=0,172, miRNA222 ΔC_T p=0,460; kat değişimi p=0,316, miRNA145 ΔC_T p=0,367; kat değişimi p=0,303, miRNA143 ΔC_T p=0,930; kat değişimi p=0,971, miRNA133a ΔC_T p=0,799; kat değişimi p=0,832, miRNA133b ΔC_T p=0,621; kat değişimi p=0,671, miRNA494 ΔC_T p=0,719; kat değişimi p=0,752, miRNA499a ΔC_T p=0,544; kat değişimi p=0,830).

miRNA122a ve TG düzeyleri ile ilişkisinin doğrusal regresyon analizleri grafik formunda şekil 4.8’de gösterilmiştir. TG düzeyi ile ilişkili olduğu belirlenen miRNA122a ifade düzeyi TG düzeyi 200mg/dl’nin altında, 200-399mg/dl ve 400mg/dl’nin üstünde olan grupların mir 122a ifade seviyeleri regresyon analizleri ve ikili bağımsız örneklem verileri ise student t test analizi ile incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda miRNA122a ifade düzeyinin TG seviyesinin 400mg/dl üzerinde olma riskini 4,22 kat artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca TG düzeyi 400mg/dl’nin üstünde olan katılımcıların miRNA122a ifade düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı olarak farklı olduğu belirlenmiştir (p=0,008) (Tablo 4-16).

Tablo 4-14. Plazma MiRNA düzeylerine göre plazma kolesterol değerlerinin doğrusal regresyon analizleri.

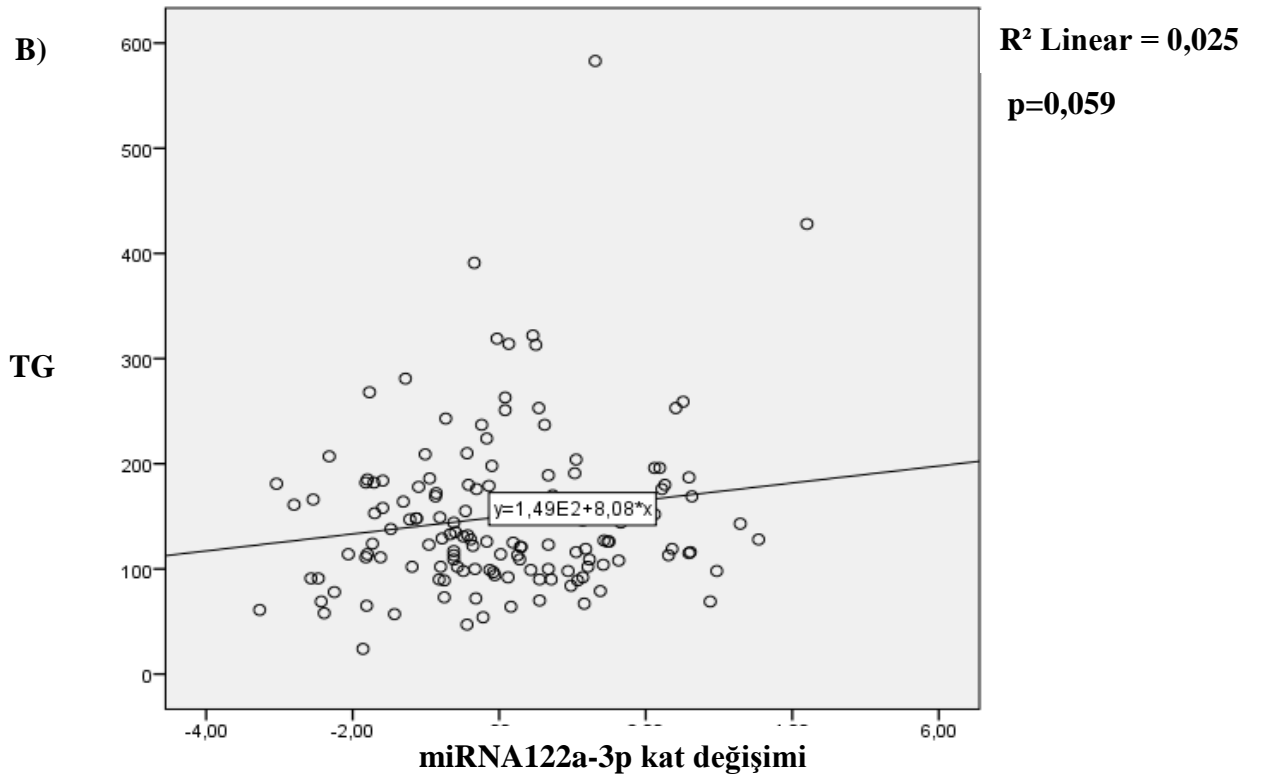
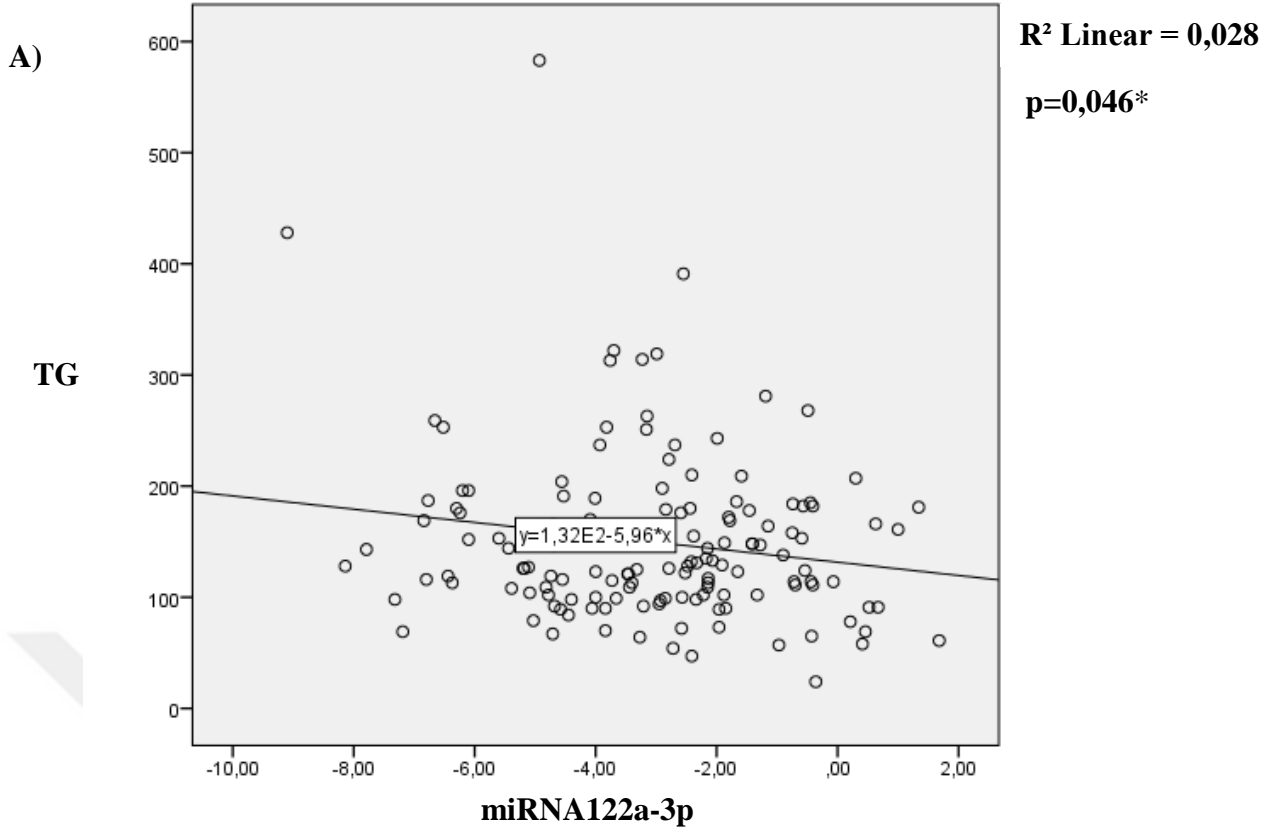
miRNA	Yöntem	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	%95 Güven Aralığı
miRNA221	ΔC_T	193,01	7,39	0,279	178,38 – 207,64
	Kat Değişimi	184,89	3,98	0,172	177,01 – 192,77
miRNA222	ΔC_T	189,34	5,78	0,460	177,90 – 200,79
	Kat Değişimi	185,00	4,06	0,316	176,97 – 193,03
miRNA145	ΔC_T	191,91	6,81	0,367	178,45 – 205,38
	Kat Değişimi	186,92	3,86	0,303	179,28 – 194,55
miRNA143	ΔC_T	187,04	4,10	0,930	178,92– 195,16
	Kat Değişimi	186,94	3,99	0,971	179,04 – 194,84
miRNA133a	ΔC_T	186,41	5,07	0,799	176,35 – 196,46
	Kat Değişimi	187,08	4,31	0,832	178,53 – 195,63
miRNA133b	ΔC_T	183,45	6,78	0,621	169,94 – 196,96
	Kat Değişimi	185,28	5,44	0,671	174,44– 196,12
miRNA122a	ΔC_T	183,96	6,74	0,656	170,62– 197,30
	Kat Değişimi	186,40	3,88	0,793	178,72 – 194,07
miRNA494	ΔC_T	182,95	12,43	0,719	158,36 – 207,54
	Kat Değişimi	186,94	4,03	0,752	178,95 – 194,93
miRNA499a	ΔC_T	184,70	8,42	0,544	167,86 – 201,54
	Kat Değişimi	188,52	5,39	0,830	177,75 – 199,30

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

Tablo 4-15. Triglicerid değerlerine göre plazma miRNA düzeylerinin doğrusal regresyon analizleri.

miRNA	Yöntem	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	%95 Güven Aralığı
miRNA221	ΔC_T	151,83	12,31	0,841	127,48 – 176,18
	Kat Değişimi	149,21	6,65	0,744	136,06 – 162,36
miRNA222	ΔC_T	145,38	9,60	0,542	126,39 – 164,36
	Kat Değişimi	150,62	6,75	0,644	137,27 – 163,97
miRNA145	ΔC_T	157,46	11,35	0,466	135,00 – 179,91
	Kat Değişimi	150,72	6,44	0,439	137,99 – 163,46
miRNA143	ΔC_T	147,86	6,69	0,407	134,62 – 161,09
	Kat Değişimi	149,68	6,51	0,419	136,79 – 162,57
miRNA133a	ΔC_T	147,15	6,60	0,726	133,47 – 160,84
	Kat Değişimi	145,90	5,87	0,711	134,26 – 157,54
miRNA133b	ΔC_T	143,93	8,51	0,998	127,14 – 161,02
	Kat Değişimi	144,08	10,61	0,981	126,84 – 156,12
miRNA122a	ΔC_T	131,55	11,01	0,046*	109,78 – 153,32
	Kat Değişimi	149,47	6,34	0,059	136,92 – 162,01
miRNA494	ΔC_T	124,00	20,28	0,169	138,89 – 164,12
	Kat Değişimi	148,32	6,56	0,091	135,34 – 161,31
miRNA499a	ΔC_T	158,42	13,28	0,335	131,88 – 184,96
	Kat Değişimi	149,81	8,45	0,251	134,92 – 166,69

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



Şekil 4-8. MiRNA122a ve TG doğrusal regresyon grafik analizi. A)TG değerlerine göre plazma miRNA122a ΔC_T B) miRNA122a-3p kat değişimi seviyelerinin doğrusal regresyon grafik analizi.

Tablo 4-16. miRNA122a'nin Trigliserid >400 ile karşılaştırma analizleri

A) miRNA122a'nin TG >400 logistik regresyon

miRNA	Yöntem	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	Risk (Odds Ratio)	%95 Güven Aralığı
miRNA122a	ΔC_T	-1,000	0,476	0,036*	0,368	0,145 – 0,935
	Kat Değişimi	1,440	0,696	0,039*	4,221	1,079 – 16,514

B) miRNA122a'nin TG >400 ikili bağımsız örneklem student t-testi analizleri

Plazma miRNA122a düzeyi	Yöntem	ortalama	Standart sapma	p değeri	%95 Güven Aralığı
ΔC_T	2	-7,01	2,94	0,008*	-6,98 – -1,08
	140	-2,98	2,09		
Kat Değişimi	2	2,75	2,04	0,009*	0,69 – 4,82
	140	-0,008	1,46		

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

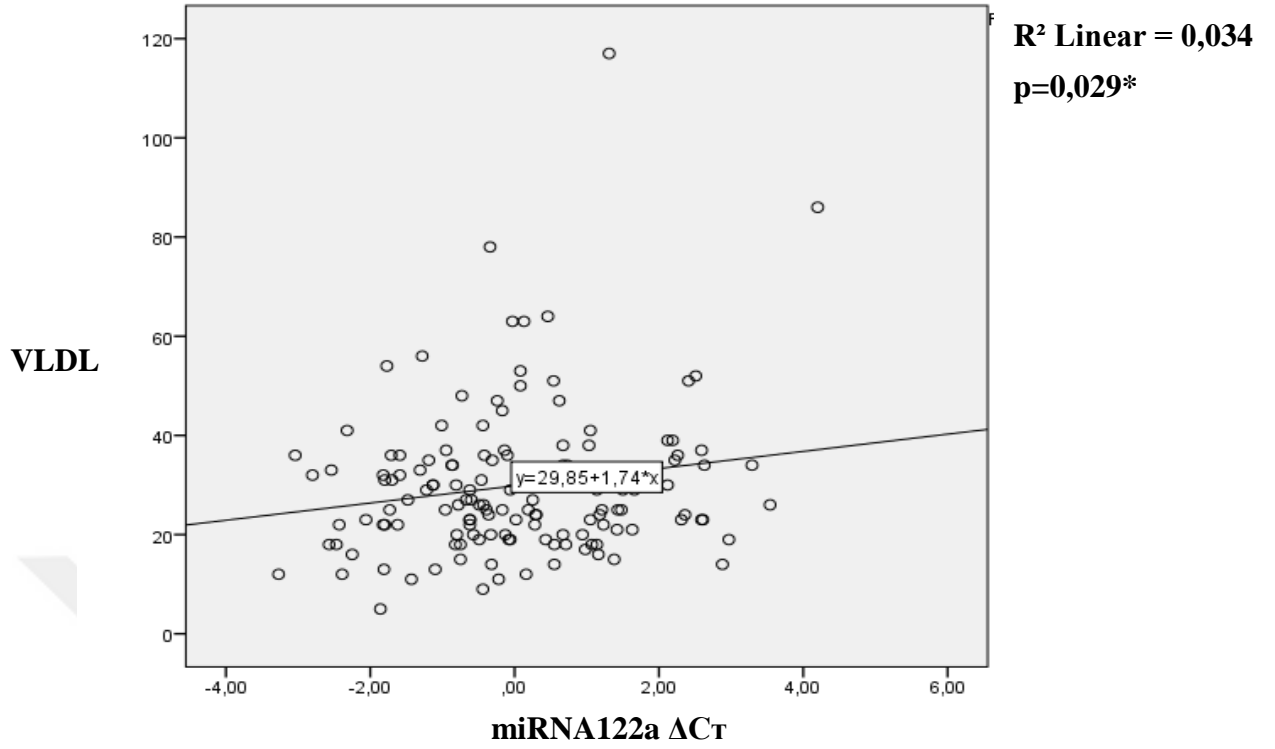
VLDL düzeyleri ve miRNA ların ΔC_T ve kat değişimi değerleri arasında ilişki göstermek için doğrusal regresyon analizi yapılmıştır. miRNA122a ΔC_T seviyesi ve VLDL düzeyi arasında (kat sayısı=26,01±2,14, p=0,029, %95CI 21,76-30,26) ve kat değişimi verileri ile arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (kat sayısı=29,84±1,23, p=0,038, %95CI 27,40-32,29). Diğer miRNAlar ve VLDL düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (miRNA221 ΔC_T p=0,988; kat değişimi p=0,878, miRNA222 ΔC_T p=0,355; kat değişimi p=0,447, miRNA145 ΔC_T p=0,601; kat değişimi p=0,568, miRNA143 ΔC_T p=0,336; kat değişimi p=0,344, miRNA133a ΔC_T p=0,478; kat değişimi p=0,464, miRNA133b ΔC_T p=0,660; kat değişimi p=0,637, miRNA494 ΔC_T p=0,205; kat değişimi p=0,108, miRNA499a ΔC_T p=0,172; kat değişimi p=0,128) (Tablo 4-17).

Tablo 4-17: VLDL değerlerine göre plazma miRNA düzeylerinin doğrusal regresyon analizleri.

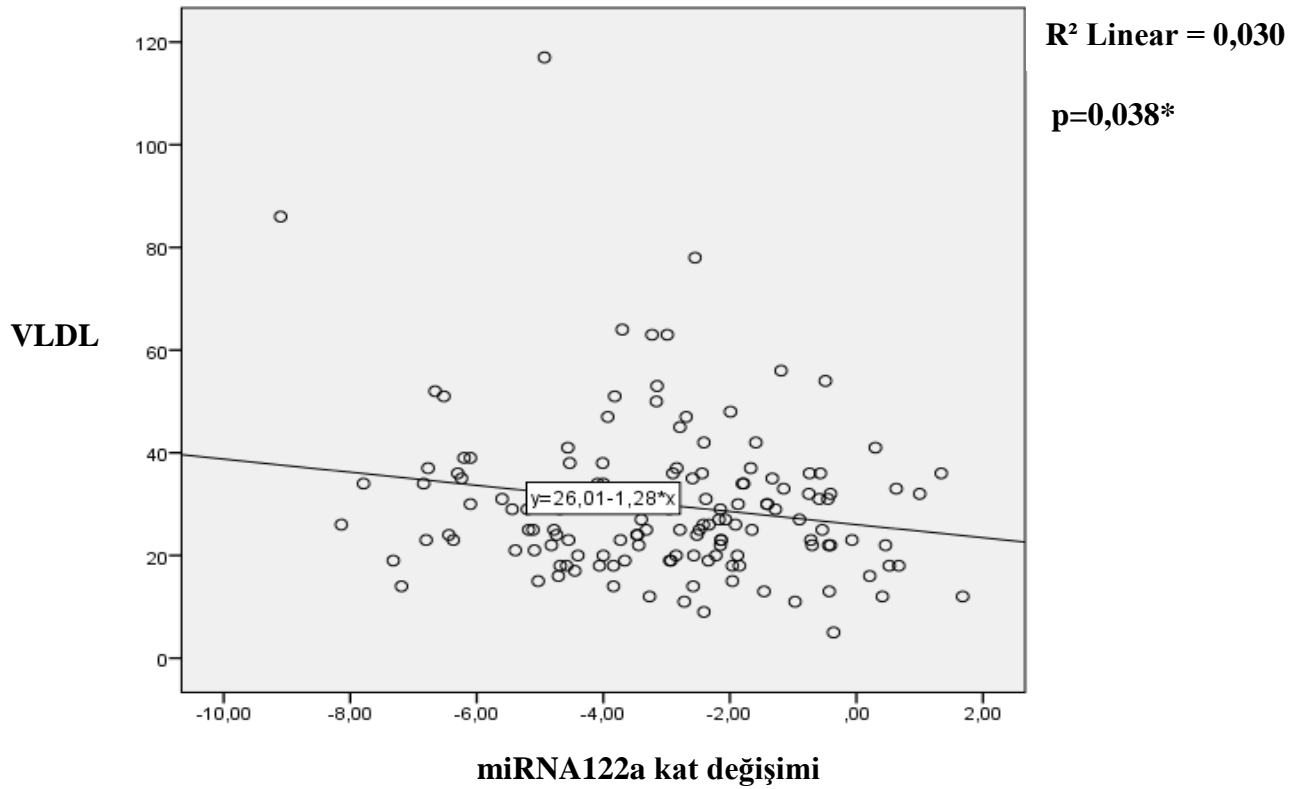
miRNA	Yöntem	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	%95 Güven Aralığı
miRNA221	ΔC_T	29,94	2,41	0,988	25,17 – 34,70
	Kat Değişimi	29,86	1,30	0,878	27,28 – 32,43
miRNA222	ΔC_T	28,62	1,87	0,355	24,91 – 32,32
	Kat Değişimi	30,19	1,31	0,447	27,58 – 32,80
miRNA145	ΔC_T	31,04	2,22	0,601	26,64 – 35,44
	Kat Değişimi	30,10	1,26	0,568	27,60 – 32,59
miRNA143	ΔC_T	29,49	1,30	0,336	26,90 – 32,08
	Kat Değişimi	29,90	1,27	0,344	27,38 – 32,42
miRNA133a	ΔC_T	26,60	1,32	0,478	26,98 – 32,23
	Kat Değişimi	29,11	1,12	0,464	26,88 – 31,35
miRNA133b	ΔC_T	29,17	2,04	0,660	25,10 – 33,23
	Kat Değişimi	28,68	1,63	0,637	25,43 – 31,95
miRNA122a	ΔC_T	26,01	2,14	0,029*	21,76 – 30,26
	Kat Değişimi	29,84	1,23	0,038*	27,40 – 32,29
miRNA494	ΔC_T	25,28	3,96	0,205	17,44 – 33,126
	Kat Değişimi	29,65	1,28	0,108	27,11 – 32,18
miRNA499a	ΔC_T	32,42	2,64	0,172	27,13 – 37,71
	Kat Değişimi	29,95	1,68	0,128	26,58 – 33,31

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

A)



B)



şekil 4-9. A) VLDL değerlerine göre plazma miRNA122a Δ C_T seviyelerinin B) miRNA122a- kat değişim seviyelerinin doğrusal regresyon grafik analizi.

MiRNA122a ve VLDL düzeyleri ile ilişkisinin doğrusal regresyon analizleri grafik formunda şekil 4.9’de gösterilmiştir. VLDL düzeyi ile ilişkili olduğu belirlenen miRNA122a ifade düzeyi regresyon analizleri ve ikili bağımsız örneklem verileri ise student t test analizi ile incelenmiş ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4-18)

Tablo 4-18. miRNA122a’nin VLDL ile karşılaştırma analizleri

A) miRNA122a’nin VLDL logistik regresyon

MiRNA	Yöntem	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	Risk (Odds Ratio)	%95 Güven Aralığı
MiRNA122a	ΔCt	-0,029	0,70	0,715	0,971	0,83 – 1,13
	Kat Değişimi	1,440	0,696	0,858	1,020	0,81 – 1,27

B) miRNA122a-3p’nin VLDL ikili bağımsız örneklem student t-testi analizleri

Plazma miRNA122a düzeyi	tanı	ortalama	Standart sapma	p değeri	%95 Güven Aralığı
ΔCt	Hasta (n=87)	-2,95	2,17	0,528	-0,49 – 0,96
	Kontrol (n=55)	-3,19	2,11		
Kat Değişimi	Hasta (n=87)	-0,15	1,52	0,640	-0,63 – 0,39
	Kontrol (n=55)	-0,10	1,46		

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

MikroRNAların ΔC_T ve kat değişimi değerlerine ile LDL seviyeleri arasında ilişki doğrusal regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Karşılaştırılan veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (miRNA221 ΔC_T p=0,763; kat değişimi p=0,480, miRNA222 ΔC_T p=0,704; kat değişimi p=0,467, miRNA145 ΔC_T p=0,990; kat değişimi p=0,850, miRNA143 ΔC_T p=0,304; kat değişimi p=0,271, miRNA133a ΔC_T p=0,256; kat değişimi p=0,276, miRNA133b ΔC_T p=0,170; kat değişimi p=0,199, miRNA122a ΔC_T p=0,835; kat değişimi p=0,692, miRNA494 ΔC_T p=0,468; kat değişimi p=0,628, miRNA499a ΔC_T p=0,366; kat değişimi p=0,607) (Tablo 4-19).

Tablo 4-20'de görüldüğü üzere mikroRNAların ΔC_T ve kat değişimi değerlerine ile HDL düzeyleri arasında bağlantı doğrusal regresyon analizi ile değerlendirilmiştir ve veriler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanamamıştır (miRNA221 ΔC_T p=0,562; kat değişimi p=0,391, miRNA222 ΔC_T p=0,662; kat değişimi p=0,462, miRNA145 ΔC_T p=0,606; kat değişimi p=0,523, miRNA143 ΔC_T p=0,961; kat değişimi p=0,835, miRNA133a ΔC_T p=0,091; kat değişimi p=0,095, miRNA133b ΔC_T p=0,447; kat değişimi p=0,503, miRNA122a ΔC_T p=0,752; kat değişimi p=0,709, miRNA494 ΔC_T p=0,501; kat değişimi p=0,345, miRNA499a ΔC_T p=0,593; kat değişimi p=0,571)

Tablo 4-19. LDL değerlerine göre plazma MiRNA düzeylerinin doğrusal regresyon analizleri.

MiRNA	Yöntem	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	%95 Güven Aralığı
MiRNA221	ΔCt	119,37	6,52	0,763	106,46 – 132,28
	Kat Değişimi	117,11	3,52	0,480	110,14 – 124,07
MiRNA222	ΔCt	119,12	5,09	0,704	109,05 – 129,30
	Kat Değişimi	116,94	3,57	0,467	109,87 – 124,01
MiRNA145	ΔCt	118,32	6,00	0,990	106,45 – 130,20
	Kat Değişimi	118,27	3,40	0,850	111,54 – 125,01
MiRNA143	ΔCt	117,88	3,54	0,304	110,87 – 124,89
	Kat Değişimi	119,10	3,44	0,271	112,29 – 125,92
MiRNA133a	ΔCt	115,13	4,42	0,256	106,37 – 123,88
	Kat Değişimi	117,74	3,76	0,276	110,29 – 125,19
MiRNA133b	ΔCt	112,86	5,55	0,170	101,80 – 123,92
	Kat Değişimi	116,99	4,46	0,199	108,11 – 125,88
MiRNA122a	ΔCt	118,94	5,93	0,835	107,20 – 130,67
	Kat Değişimi	117,95	3,41	0,692	111,21 – 124,70
MiRNA494	ΔCt	110,96	10,96	0,468	89,28 – 132,64
	Kat Değişimi	118,17	3,56	0,628	111,12 – 125,21
MiRNA499a	ΔCt	117,77	7,71	0,366	102,35 – 133,18
	Kat Değişimi	122,85	4,94	0,607	112,97 – 132,74

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

Tablo 4-20. HDL değerlerine göre plazma MiRNA düzeylerinin doğrusal regresyon analizleri.

MiRNA	Yöntem	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	%95 Güven Aralığı
MiRNA221	ΔC_T	39,05	1,60	0,562	35,89 – 42,21
	Kat Değişimi	40,01	0,86	0,391	38,31 – 41,72
MiRNA222	ΔC_T	39,38	1,24	0,662	36,91 – 41,85
	Kat Değişimi	40,03	0,87	0,462	38,29 – 41,76
MiRNA145	ΔC_T	39,13	1,48	0,606	36,19 – 42,07
	Kat Değişimi	39,75	0,84	0,523	38,08 – 41,41
MiRNA143	ΔC_T	36,69	0,83	0,961	38,08 – 41,30
	Kat Değişimi	39,67	0,792	0,835	38,10 – 41,23
MiRNA133a	ΔC_T	41,67	1,11	0,091	39,47 – 43,87
	Kat Değişimi	40,69	0,94	0,095	38,82 – 42,56
MiRNA133b	ΔC_T	39,10	1,21	0,447	36,68 – 41,52
	Kat Değişimi	38,60	0,97	0,503	36,65 – 40,54
MiRNA122a	ΔC_T	39,46	1,45	0,752	36,59 – 42,33
	Kat Değişimi	39,83	0,83	0,709	38,18 – 41,49
MiRNA494	ΔC_T	41,64	2,72	0,501	36,26 – 47,03
	Kat Değişimi	40,07	0,88	0,345	38,32 – 41,82
MiRNA499a	ΔC_T	39,84	1,69	0,593	36,45 – 43,24
	Kat Değişimi	39,22	1,08	0,571	37,05– 41,39

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

4.8. Sol Ventrikül Hipertrofisi Tanısı Olan Grupların Demografik Verileri

Tez projemize katılan 16 Sol Ventrikül Hipertrofisi Tanısı Olan ve 166 tanısı olmayan katılımcılara ait demografik verileri karşılaştırmalı olarak Tablo 4-21’de gösterilmiştir.

Tablo 4-21. Sol Ventrikül Hipertrofisi tanısı olan ve olmayan örneklere ait demografik veriler.

Grup		SVH tanısı olmayan (n=166)	SVH tanısı olan (n=16)	p değeri
Cinsiyet (E / K)		% 62 / % 38(n=103) / (n=63)	% 68,8 / % 31,3 (n=11) / (n=5)	0,597
Yaş (Yıl)		57,61±13,34	66,31±10,51	0,012*
Vücut Kitle İndeksi (VKİ) (kg/m ²)		27,91±5,30	31,38±6,64	0,016*
Vücut Yüzey Alanı (VYA) (m ²)		1,86±0,17	1,91±0,16	0,340
Sigara	kullanan	% 41 (n=68)	% 37,5 (n=6)	0,788
	kullanmayan	% 59 (n=98)	% 62,5 (n=10)	
Diabet	var	% 24,7 (n=41)	% 31,2 (n=5)	0,565
	yok	% 75,3 (n=125)	% 68,8 (n=11)	
Aile Hikayesi	var	% 23,5 (n=39)	% 68,8 (n=5)	0,489
	yok	% 76,5 (n=127)	% 31,8 (n=11)	
Sistolik KB >140 Diastolik KB >90	var	% 36,1 (n=60)	% 50 (n=8)	0,274
	yok	% 63,9 (n=106)	% 50 (n=8)	

n=örnek sayısı, $\bar{x} \pm SD$ (Ortalama \pm Standart Sapma), E/K =Erkek / Kadın , KB =Kan Basıncı , SVH: Sol Ventrikül Hipertrofisi, * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (p<0,05). Gruplararası farklılık ileri ki-kare testi (χ^2), ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

Sol ventrikül tanısı olan ve olmayan gruplarına ait demografik özellikler açısından İleri kikare ve student-t testi analizi ile karşılaştırıldığında; ateroskleroz hasta grubunda cinsiyet dağılımları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (p=0,597) ve yaş dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0,012). Ayrıca vücut kitle indeksi açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmıştır (p=0,016). (Tablo 4-21).

Sol ventrikül tanısı konması için gerekli ekokardiyografik parametreler Tablo 4-22’de gösterilmiştir ve gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Tablo 4-22. Sol Ventrikül Hipertrofisi tanısı olan ve olmayan örneklere ait ekokardiyografik parametre bilgileri

			SVH tanısı olmayan (n=166)	SVH tanısı olan (n=16)	p değeri
Arka Duvar Kalınlığı	(mm)	($\bar{X} \pm SD$)	1,35 ± 0,17	0,089 ± 0,10	0,000*
İnterventrikülerseptum Duvar Kalınlığı	(mm)	($\bar{X} \pm SD$)	1,56 ± 0,27	0,95 ± 0,11	0,000*
Solventrikül Diastolik Sonu Çapı	(mm)	($\bar{X} \pm SD$)	5,58 ± 0,47	4,09 ± 0,23	0,000*
Sol Ventrikül Kütlesi	(g)	($\bar{X} \pm SD$)	583,48 ± 132,13	218,85 ± 33,00	0,000*
Sol Ventrikül Kütle İndeksi	(g/m ²)	($\bar{X} \pm SD$)	310,98 ± 71,67	118,51 ± 23,41	0,000*

n=örnek sayısı, $\bar{X} \pm SD$ (Ortalama ± Standart Sapma)

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

ApoE genotip dağılımları sol ventrikül hipertrofisi (SVH) tanısı olan ve olmayan gruplar arasında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanılmıştır ($X^2= 0,461$, $p=0,977$). SVH grubunda yer alanların %87,5'i (n=14) E3/E3 genotipine, %6,3'ü (n=1) E3/E4 genotipine, %6,3'ü (n=1) E2/E3 genotipine, sahiptir, ancak bu grupta E2/E2, E2/E4 ve E4/E4 genotiplerine rastlanmamıştır. SVH tanısı olmayanların %83,7'si (n=139) E3/E3 genotipine, %9'u (n=15) E3/E4 genotipine, %5,4'ü (n=9) E2/E3 genotipine, %0,6'sı (n=1) E2/E2 genotipine, %1,2'si (n=2) E4/E4 genotipi içerirken E2/E4 genotipine saptanılmıştır (Tablo 4-23)

ApoE allel frekansları SVH tanısı olan ve olmayan gruplar karşılaştırıldığında olgular arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark gözlenmemiştir ($X^2= 0,198$, $p=0,906$). E2 alleleline sahip olanların %91,8'i (n=10) SVH tanısı olmayan grubunda yer alırken %8,8'i (n=1) SVH tanısı olan grupta yer almakta olup istatistiksel açıdan anlamlı fark belirlenmemiştir ($X^2=0,001$, $p=0,647$) (Tablo4-23).

E3 alleli taşıyanların oranı SVH tanısı olan grupta %8,9 (n=16), SVH tanısı olmayan grupta %91,1 (n=163) olduğu gözlenmiştir ($X^2=0,294$, $p=0,758$).

E4 alleleline sahip olanların %94,1'i (n=5) SVH tanısı olmayan grubunda yer alırken %5,9'u (n=1) SVH tanısı olan grupta yer aldığı belirlenmiştir ($X^2=0,198$, $p=0,545$) (Tablo4-23).

Tablo 4-24'de belirtildiği gibi LDL altgrup analizi verilerine göre büyük yoğunluklu LDL ortalaması SVH tanısı olmayan grubunda $54,3\pm 16,64$ mg/dl iken SVH grubunda bu değer $53,38\pm 19,43$ mg/dl olduğu görülmüştür ($p=0,836$). Küçük boyutlu LDL ortalamasının SVH grubunda $5,15\pm 7,20$ mg/dl, SVH tanısı olmayan grupta $9,63\pm 10,12$ mg/dl olduğu belirlenmiş ve gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir ($p=0,025$) ve bu veriler ışığında yapılan logistik regresyon analizi sonuçları Tablo 4-25'de gösterilmiştir.

Tablo 4-23. Sol Ventrikül Hipertrofisi tanısı olan ve olmayan örneklere ait ApoE Genotip ve Allel Dağılımları

Genotip	SVH tanısı olmayan (n=166)	SVH tanısı olan (n=16)	p değeri
E3/E3	% 83,7 n= 139	% 87,5 n= 14	0,514
E3/E4	% 9 n= 15	% 6,3 n= 1	0,578
E2/E3	% 5,4 n= 9	% 6,3 n= 1	0,611
E2/E4	%0 0	%0 0	-
E2/E2	% 0,6 n= 1	%0 0	0,912
E4/E4	%1,2 n= 2	%0 0	0,831
Allel	Allel Sayımı (%)	Allel Sayımı (%)	p değeri
E2	11 (% 91,8) n= 10	1 (% 8,8) n= 1	0,647
E3	302 (% 91,1) n= 163	29 (% 8,9) n= 16	0,758
E4	19 (% 94,1) n= 5	1 (% 5,9) n= 1	0,545

n=örnek sayısı, SVH : Sol Ventrikül Hipertrofisi, * Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (p<0,05). Gruplararası farklılık ileri ki-kare testi (χ^2), ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

Küçük boyutlu LDL miktarına ve yoğunluğuna göre yapılan risk analizlerinde SVH tanısı olmayan grupta yer alanların %65,6'sının (n=101), SVH grubunda yer alanların ise %31,3'ünün (n=5) Tip A (düşük risk) grubunda olduğu belirlenmiştir (p=0,755)(Tablo 4-24)

Tablo 4-24: Sol Ventrikül Hipertrofisi tanısı olan ve olmayan örneklere ait partikül yoğunluğu ve büyüklüğüne göre lipid alt grup analiz sonuçları.

			SVH tanısı olmayan (n=166)	SVH tanısı olan (n=16)	p değeri
Büyük boyutlu LDL (mg/dl)	($\bar{x} \pm SD$)		54,30 ± 16,64	53,38 ± 19,43	0,836
Küçük boyutlu LDL (mg/dl)	($\bar{x} \pm SD$)		5,15 ± 7,20	9,63 ± 10,12	0,025*
LDL Alt Grup	Tip A (Düşük Risk)	n (%)	101 (% 65,6)	5 (% 31,3)	0,755
	Intermediate (Orta risk)	n (%)	29 (% 18,8)	5 (% 31,3)	0,065
	Tip B (Yüksek Risk)	n (%)	24 (% 15,6)	6 (% 37,5)	0,029*
Büyük Boyutlu HDL (mg/dl)	($\bar{x} \pm SD$)		12,70 ± 6,62	9,80 ± 4,57	0,100
Orta Boyutlu HDL (mg/dl)	($\bar{x} \pm SD$)		21,39 ± 5,12	22,47 ± 6,31	0,451
Küçük Boyutlu HDL (mg/dl)	($\bar{x} \pm SD$)		7,33 ± 3,54	6,80 ± 3,34	0,580

n=örnek sayısı, $\bar{x} \pm SD$ (Ortalama ± Standart Sapma), SVH : Sol Ventrikül Hipertrofisi

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

SVH grubunda yer alan olguların %31,3'ü (n=5), SVH tanısı olmayan grupta bulunanların %18,8'i (n=29) intermediate (orta risk) taşıyan grupta yer almaktadır ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,065). SVH tanısı olmayan grupta yer alanların %15,6'sı (n=24) Tip B (yüksek risk) grubunda yer alırken SVH grubunda olanların %37,5'i (n=6) bu grupta yer almaktadır. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark gözlenmiştir (p=0,029) ve logistik regresyon analizi sonucunda yüksek riskteki grubuna dahil olmanın riskini 3,25 kat artırdığı saptanmıştır (Tablo 4-25).

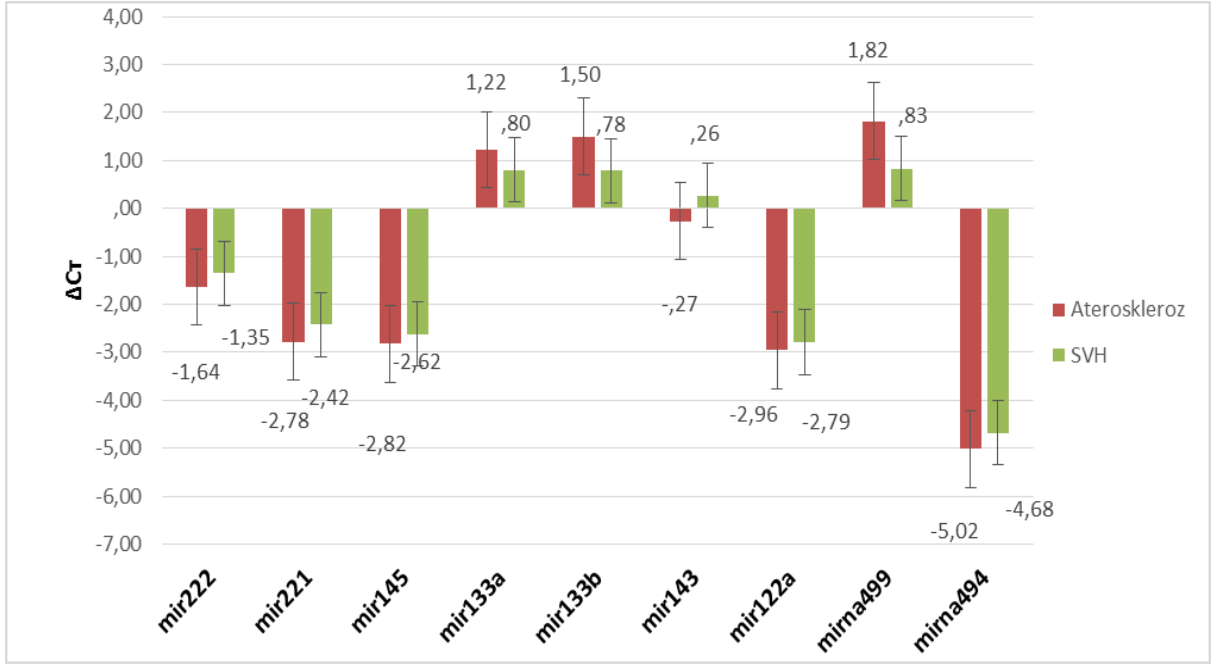
Yapılan HDL altgrup analizlerine göre büyük yoğunluklu HDL ortalaması SVH tanısı olmayan grupta $12,70 \pm 6,62$ mg/dl iken SVH grubunda bu değer $9,80 \pm 4,57$ mg/dl olduğu görülmüştür, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,100). SVH tanısı olmayan grupta orta boyutlu HDL ortalaması $21,39 \pm 5,12$ mg/dl, SVH grubunda ortalama değer $22,47 \pm 6,63$ mg/dl olarak belirlenmiştir (p=0,451). Küçük boyutlu HDL ortalaması SVH tanısı olmayan grupta $7,33 \pm 3,54$ mg/dl iken SVH grubunda bu değer $6,80 \pm 3,34$ mg/dl olduğu gözlenmiştir (p=0,580).

Tablo 4-25. Sol Ventrikül Hipertrofisi tanısı olan ve olmayan örneklerle ait partikül yoğunluğu ve büyüklüğüne göre lipid alt gruplarının logistik regresyon analizleri.

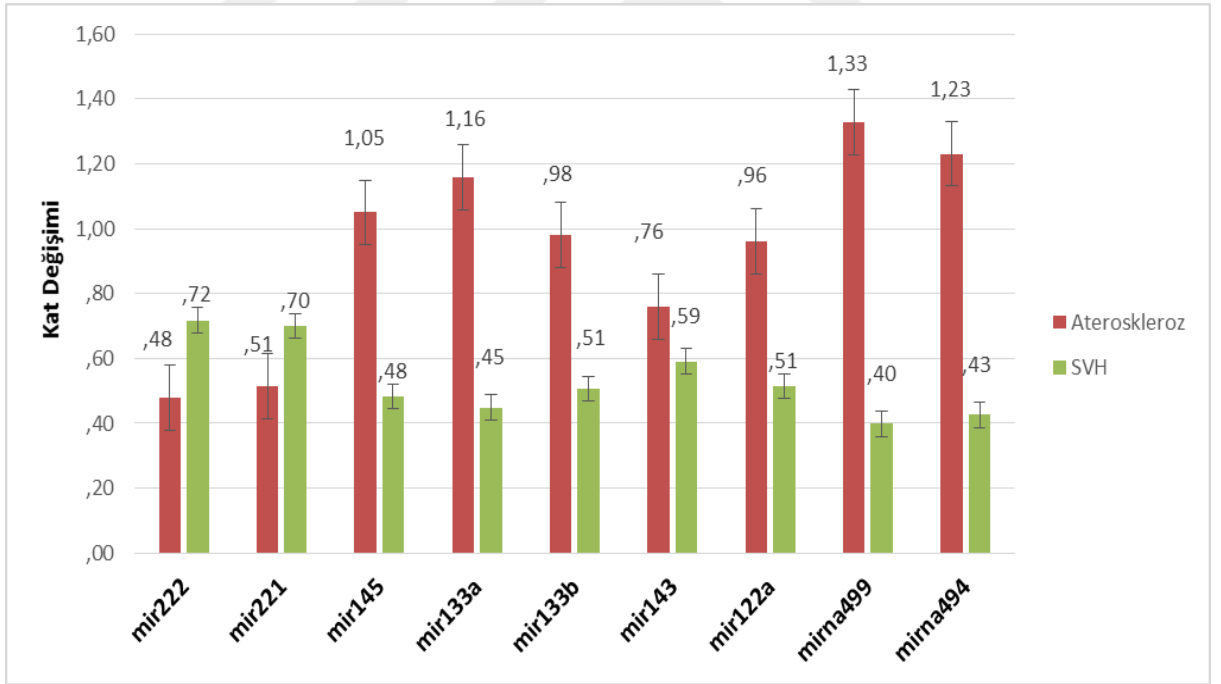
Lipid Alt Grup Değerleri	Katsayı B	Standart Hata	p değeri	Risk (Odd Ratio)	%95 Güven Aralığı
Küçük Boyutlu LDL (mg/dl)	0,053	0,026	0,037*	1,055	1,003-1,190
LDL Alt Grup B (Yüksek Risk)	1,179	0,562	0,036*	3,250	1,080-9,781

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

A)



B)



Şekil 4-10. SVH MikroRNA Analizleri. (A):Tüm hasta grubunun Real Time PCR ile belirlenen plazma mikroRNA seviyelerinin ΔC_T değeri dağılım grafiği **(B):** Kat Değişimi $LN[2^{(-\Delta\Delta C_T)}]$ değerlerinin Sol Ventrikül Hipertrofisi tanısı olan ve tanısı olmayan Ateroskleroz hastaları ile karşılaştırıldığındaki dağılım grafiği. Grafikler kontrol (1) kat değerine göre çizilmiştir, şekildeki değerler tabloda $\bar{X} \pm SD$ (Değer \pm Standart Sapma) olarak verilmiştir.

Plazma mikroRNA seviyelerinin ΔC_T ve kat değişim değerlerinin regresyon analizleri yapılmış ve SVH tanısı ve Ateroskleroz tanısı alan grupların mikroRNA ifade seviyeleri ΔC_T ve kat değişim açısından değerlendirildiklerinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark belirlenmemiştir (Tablo 4-26).

Tablo 4-26. Ateroskleroz ve Sol Ventrikül Hipertorfisi olan hastaların plazma miRNA seviyelerinin karşılaştırılması .

MirRNA	Yöntem	p değeri	%95 Güven Aralığı
MiRNA221	ΔC_T	0,556	-0,741 - 1,368
	Kat Değişimi	0,759	-0,683 – 0,933
MiRNA222	ΔC_T	0,530	-0,744 - 1,435
	Kat Değişimi	0,915	-0,773 – 0,861
MiRNA145	ΔC_T	0,675	-0,868 - 1,334
	Kat Değişimi	0,943	-0,814 – 0,757
MiRNA143	ΔC_T	0,599	-0,910 - 1,568
	Kat Değişimi	0,432	-1,238 – 0,534
MiRNA133a	ΔC_T	0,362	-2,205 – 0,815
	Kat Değişimi	0,417	-0,613 – 1,464
MiRNA133b	ΔC_T	0,942	-2,378 – 2,211
	Kat Değişimi	0,849	-1,718 – 1,419
MiRNA122a	ΔC_T	0,741	-1,028 – 1,438
	Kat Değişimi	0,955	-0,889 – 0,840
MiRNA494	ΔC_T	0,155	-0,246– 1,522
	Kat Değişimi	0,302	-1,227 – 0,385
MiRNA499a	ΔC_T	0,520	-2,567 – 1,320
	Kat Değişimi	0,748	-1,225 – 1,691

* Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p < 0,05$). Gruplararası farklılık ileri ki-kare testi (X^2),

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gelişmiş ülkelerde ateroskleroz komplikasyonları ile birlikte önde gelen morbidite ve mortalite nedenidir. Türkiye'de yapılmış geniş çaplı prevalans verilerine göre ülkemizde koroner arter hastalığı 45-54 yaş grubunda %6 iken, 55-64 yaş grubunda %17 dolayına, 65 yaş ve üzerindeki bireylerde %28 düzeyine yükseldiği gözlenmiştir. Bu prevalanslar 1990 yılındakilere kıyasla 50 yaş üstü kesimde %80 oranında artmıştır. Yine aynı çalışmasının verilerine göre ateroskleroza bağlı ölümlerin neredeyse tüm ölümlerin yarısından sorumlu olduğu düşünülmektedir (1). Ateroskleroz morbitite ve mortaliteye yol açan, periferik veya santral yerleşimli pek çok vasküler bozukluğun altında yatan temel patolojik tablo olarak tanımlandığı rapor edilmiştir (2).

Bu çalışmada aterosklerozun genetik ve epigenetik mekanizmalarına açıklık getirilmesi amaçlanmıştır. ApoE genotipinin hastalığın gelişimi üzerine etkileri ve bunun yanında genotiplerin lipid profillerindeki etkinliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu hedeflerimiz doğrultusunda lipid profillerinin daha geniş incelenmesi için LDL ve HDL lipid altgrupları da çalışmaya dahil edilerek hem ApoE genotipi hem de mikroRNA düzeyleri ile bağlantısı araştırılmıştır. Aterosklerozun epigenetik mekanizmalarını farklı açılardan daha geniş değerlendirmesi amacıyla miRNA221 ve miRNA222 nin yanı sıra farklı genler üzerinde etkisi belirlenmiş yedi miRNA (miRNA122a, miRNA133a, miRNA133b, miRNA143, miRNA145, miRNA494, miRNA499) daha çalışmaya dahil edilerek kapsam genişletilmiştir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada öncelikle hasta ve kontrol grubunun tüm demografik verileri karşılaştırılarak grupların özellikleri tanımlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda hasta grubunda diyabet tanısı alan bireylerin istatistiksel olarak anlamlı olarak fazla olduğu ve diyabetin ateroskleroz riskini 2.7 kat artırdığı saptanmıştır ($p=0,004$, $OD=2,779$, $\%95CI=1,375-5,619$) (Tablo 4.2). Folsom ve arkadaşları tarafından yapılmış çalışmada (1998) elde etmiş olduğumuz verileri destekleyen sonuçlar elde edilmiştir (105). Çeşitli etnik ve ırksal grupları kapsayan prospektif çalışmada, diyabetik kişiler arasında koroner arter hastalığı (KAH) mortalitesinin 2-4 kat daha fazla olduğu ve bu hastalarında inme (stroke) bağlı ölüm riskinin yaklaşık 3 kat artış göstermekte olduğu saptanmıştır. Ayrıca diyabet hastalarının diyabetik olmayan hastalara göre daha kötü bir prognoza sahip olduğu gözlenmiştir (105).

Bu konuda yapılmış diğerk bir çalışma da makrovasküler bir hastalık olarak tanımlanan diabetin ateroskleroz gelişiminin hızlanmasında rol aldığı gözlenmiştir (106). Diabetin aterosklerozun karakteristik kronik inflamatuvar sürecinde rol oynadığı ve süreci hızlandırdığı düşünülmektedir (106). Amerikan Kalp Derneği (AHA) tarafından diabetin kardiyovasküler bir hastalık olarak tanımlanmıştır (106). Çalışmamızda ateroskleroz grubunda ailesinde hastalık tanısı konmuş olanların anlamlı olarak fazla olduğu belirlenmiş ve yapılan logistik regresyon analizi sonucunda ve riskin 2.2 kat artırmış olduğunu saptanmıştır ($p=0,027$, $OD=2,209$, $\%95Cl=1,097-4,449$) (Tablo 4.2). Elde ettiğimiz veriler, kalp hastalıklarında kalıtsal risk faktörünün önemini gösteren verileri (107) desteklerken, multifaktöriyel kalıtım özelliği gösteren aterosklerozda aileden miras gelen genetik yapının önemini ortaya koymaktadır.

Dünya Sağlık Komitesinin tanı kriterlerine göre sistolik kan basıncının 140 mmHg, diyastolik kan basıncının da 90 mHg veya üzerinde bulunması hipertansiyon olarak tanımlanmıştır (108). Bu kriterler dahilinde yapmış olduğumuz değerlendirmede hipertansiyon tanısı almış kişilerin ateroskleroz grubunda istatistiksel açıdan anlamlı olarak fazla olduğu tespit edilmiş ve regresyon analizi sonucunda hipertansiyon tanısı alınmanın ateroskleroz riskini 3,4 kat artırdığı gözlenmiştir ($p=0,000$, $OD=3,452$, $\%95Cl=1,832-6,506$) (Tablo 4.2). Hipertansiyonun, kardiyovasküler riskini ortaya koyan Lotufa ve arkadaşlarının (2015) yapmış olduğu kohort çalışmada (109), hipertansiyonun klinik belirti vermeyen kardiyovasküler uç organ hasarları için tanı belirteci olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ateroskleroz patolojisinde hipertansiyonun rolünün, damarların media tabakasında hipertrofiye neden olmasından dolayı önemli olduğu düşünülmektedir (110). Çalışmamızda hasta grubunda yer alan katılımcıların sistolik ve diastolik kan basıncı ortalamalarının ($133,88\pm17,69$ mmHg ve $84,49\pm6,61$) kontrol grubuna göre ($128,49\pm15,53$ mmHg ve $83,06\pm9,97$ mmHg) daha yüksek olduğu belirlemiştir. MacMahon ve arkadaşlarının yaptığı 1990 yılında yaptıkları ve 420.000 kişinin uzun süreli izlendiği metaanalizde 105 mmHg üzeri diyastolik kan basıncı olanlarda koroner arter hastalığı riskinini dört kat yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında sistolik kan basıncı değerleri arttıkça koroner arter hastalığı, inme ve mortalite oranlarının da yükseldiği belirlenmiştir (111). Tüm bu veriler hipertansiyonun ateroskleroz tanısındaki önemini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda yer alan tüm katılımcıların lipid değerleri R.W. Mahley tarafından 1999 yılında yapılmış olan (112) ve 9000 katılımcıyla tüm Türkiye'nin kapsayan Türk Kalp çalışması tarafından belirlenen sınır değerler dikkate alınarak hazırlanmıştır. Plazma Kolesterol Düzeyleri: Normal: 200 mg/dl'den düşük, sınırda yüksek: 200-240 mg/dl ve yüksek: 240 mg/dl'den fazla olarak sınıflandırılmıştır. Trigliserid Değerleri : Normal: 200 mg/dl'den düşük, sınırda yüksek: 200-240 mg/dl ve yüksek: 240 mg/dl'den fazla olarak tanımlanmıştır. LDL Kolesterol Düzeyleri :Normal: 130 mg/dl den düşük, sınırda yüksek: 130-159 mg/dl ve yüksek: 160 mg/dl ve üzeri olarak belirlenmiştir. HDL Kolesterol Değerleri: düşük: 35 mg/dl'den az, normal: 35-44 mg/dl arası ve yüksek: 45 mg/dl'den fazla olarak gruplanmıştır. Plazma Kolesterol /HLD Oranı : Normal: 3,5 dan düşük, sınırda yüksek: 3,6-4,5 mg/dl ve yüksek: 4,5'dan fazla olduğu saptanmıştır (112). Tüm bu kriterler çerçevesinde yaptığımız analizlerde plazma kolesterol değeri yüksek (>240mg/dl) olan katılımcıların %61,9'unun ve yüksek LDL kolesterol seviyesine (>160mg/dl) sahip olanların ise %56,7'sinin hasta grubunda olduğu gözlenmiştir. Yüksek kolesterol ve değerlere sahip katılımcıların çoğunlukla ateroskleroz grubunda bulunması literatür ile uyum göstermektedir (112). Castelli ve arkadaşlarının (1983) yapmış olduğu metaanalizlerde (113), yüksek total kolesterol ve LDL değerlerinin kardiyovasküler hastalıkların gelişimiyle yakından ilişkili olduğu gözlenmiştir. LDL dokulara girmeden önce reaktif oksijen türevleri tarafından okside LDL'ye dönüşmektedir. Bu molekül, kemokinlerin sitokinlerin adhezyon moleküllerinin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasını uyarmaktadır. İntima içinde depolanan okside LDL, makrofajların köpük hücre dönüşmesini tetikleyerek ateroskleroz oluşumuna sebep olduğu rapor edilmiştir (46). Bu nedenle kolesterol metabolizmasının durdurucu basamağında etkili olan 3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA (HMG-KoA) redüktaz inhibitörleri (statinler) yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Statinlerin etkinliği ile ilgili yapılan çalışmalarda kolesterol ve LDL kolesterol seviyelerinin yüksek seviyelerden normal değerlere düşürülmesinin ateroskleroz oluşum mekanizmasını engelleyerek kardiyovasküler nedenli ölümleri %30 azalttığı savı ileri sürülmüştür (114).

Çalışma gruplarımızın HDL kolesterol değerlerinin ortalaması karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan bir fark olduğu gözlenmiştir ($p=0,008$). Hasta grubunda ortalamanın $42,49 \pm 10,727$ mg/dl iken kontrol grubunda ortalama $38,61 \pm 8,624$ mg/dl olduğu gösterilmiştir. Yapmış olduğumuz logistik regresyon analizinde düşük HDL değerine sahip olmanın ateroskleroz riskini artırdığı gözlenmiştir ($p=0,011$, $OD=0,957$, $\%95CI=0,925-0,990$) (Tablo 4-4). Türk Kalp Çalışması özellikle HDL kolesterol değerleri ortalaması açısından çok çarpıcı veriler ortaya koymuştur. Türk toplumu coğrafi olarak yakın olmasına rağmen Avrupa'dan çok daha düşük HDL kolesterol düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir. Söz konusu çalışmaya göre Avrupa ve Türk toplumunda erkek bireylerin ortalama kolesterol düzeyleri sırasıyla $47,8$ mg/dl ve $34-38$ mg/dl olduğu gösterilmiştir. Kadınlarda bu farkın daha da fazla olması dikkat çekicidir; Avrupa'da ortalama 56 mg/dl iken Türkiye'de $37-45$ mg/dl olarak belirlenmiştir. Bu anormal seviyede düşük HDL kolesterol düzeyinin genetik faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (112). Yapmış olduğumuz bu çalışmada hasta grubunda normalden düşük (<35 mg/dl) HDL düzeyine sahip bireylerin ateroskleroz grubunda anlamlı olarak fazla olduğu ($p=0,031$) ve bunun hastalık riskini 2 kat artırdığı gösterilmiştir ($p=0,038$, $OD=0,488$, $\%95CI=0,253-0,942$). Bunun yanında elde ettiğimiz bulgulara göre HDL düzeyleri yüksek (>45 mg/dl) katılıncıların kontrol grubunda anlamlı olarak fazla olması ($p=0,029$) ve yapılan regresyon analizleri ile yüksek HDL kolesterol düzeyine sahip olmasının hastalık riskini 2,12 kat azalttığını göstermektedir ($p=0,031$, $OD=0,472$, $\%95CI=0,239-0,934$) (Tablo4-4). Elde ettiğimiz tüm bulgular yüksek düzeyde HDL'nin düşük kardiyovasküler risk ile ilişkili olduğu (107) görüşü ile örtüşmektedir.

Plazma kolesterolün HDL'ye göre oranı ateroskleroz riski için parametre olarak değerlendirilmektedir (112). Çalışmamızda bu oran hasta grubunda (4,95) kontrol grubunda (4,64) oranla daha yüksek tespit edilmiştir ($p=0,130$). [Kolesterol]/[HDL] oranına göre normal sınırlar içinde olanların (3,6-4,5) kontrol grubunda istatistiksel açıdan daha yüksek olduğu ($p=0,007$) ve bu gruba dahil olmanın ateroskleroz riskini 2,5 kat azalttığı gözlenmiştir ($p=0,008$, $OD=0,411$, $\%95CI=0,213-0,791$) (Tablo4-4). [Kolesterol]/[HDL] oranına göre yüksek risk ($>4,5$) grubuna dahil olanların hasta grubunda anlamlı olarak fazla olduğu ($p=0,024$) ve riski 4 kat artırdığı belirlenmiştir ($p=0,025$, $OD=1,973$, $\%95CI=1,091-3,569$).

Castelli ve arkadaşlarının 1983 yılında yapmış olduğu 2291 katılımcının bulunduğu çalışmada (113), kolesterol/HDL oranının diğer lipid değerleriyle beraber veya tek başına koroner kalp hastalığının tanısında önemli bir parametre olabileceğini ortaya koymuştur. Çalışmada hem tek değişkenli (univariate) hem de çok değişkenli (multivariate) parametrelerle ile logistik regresyon analizleri yapılmıştır. Hasta ve sağlıklı kadın ve erkek katılımcıların değerlendirildiği analizlerde cinsiyetten bağımsız olarak hasta grubunda [Kolesterol]/[HDL] oranı kontrol grubuna oranla istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek çıkmıştır (113). Tek başına plazma kolesterol ve HDL düzeylerinin kan lipid değerleri klinik biyokimya parametresi olarak uzun süredir kullanılmaktadır. Castelli ve arkadaşlarının (1983) çalışması (113) bu iki lipid parametresinin oranın kardiyovasküler hastalık riskinin belirlenmesi için hızlı, uygun kolay bir veri olduğu tezini ileri sürmüştür ve bu tezleri büyük oranda kabul görmüştür.

Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) değerlerinin gruplar arasında birbirine yakın olduğu gözlenmiştir ($p=0,650$, kontrol grubu $118,97 \pm 36,947$ mg/dl, hasta grubu $117,38 \pm 40,560$ mg/dl). Bunun yanında LDL değerleri düşük (<130 mg/dl) olan katılımcıların çoğu kontrol grubunda yer alırken. LDL değeri sınır değer üstünde (>160 mg/dl) olanların çoğu hasta grubunun içerisinde yer almaktadır. Kardiyovasküler riskin görülme sıklığında eşik kabul edilen 40/100 noktasını LDL seviyesi 150mg/dl'nin üstünde olanların geçtiği belirlenmiştir. Bu nedenle LDL düzeyi, kardiyovasküler hastalıklar için en güçlü ve bağımsız risk faktörü olarak kabul edilmektedir.(107). Katılımcıların 6 yıl süre ile izlendiği prospektif tasarımlı PROCAM çalışmasında LDL kolesterol düzeyi sınır değerlerin üstünde olanların %25'inin i infarktüs geçirdiği ortaya koymuştur (115). Mahley ve arkadaşları tarafından 1995 yılında Türk toplumu üzerinde yapılmış çalışma da tüm lipid değerleri arasında LDL kolesterol düzeyinin önemini vurgulamaktadır (112). Ayrıca bu çalışmanın ilginç verilerinden biri de sosyoekonomik seviye ve LDL seviyeleri arasındaki ilişkinin Türk toplumu ve Amerika nüfusu arasında dramatik şekilde farklı olduğunun gösterilmesidir. Amerika'da eğitim seviyesinin yüksek olmasının sağlık ve düşük koroner kalp hastalıkları riski ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (116). Bu verilere göre Amerika'da refah ve eğitim seviyesi arttıkça LDL seviyeleri düşme eğilimi gösterirken (116). Türkiye'de bu durumun tam ters olduğu saptanmıştır (112). Mahley'in çalışmasında Türk toplumunda eğitim ve refah seviyesi ile plazma kolesterol ve LDL düzeyi de arttığını vurgulanmıştır (112).

Çalışmamızda çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) değerlerinin ortalaması kontrol grubunda $29,12 \pm 17,63$ mg/dl iken hasta grubunda $29,54 \pm 10,70$ mg/dl olduğu gözlenmiştir ($p=0,847$). VLDL ve orta yoğunluklu lipoproteinlerin LDL gibi oksifatif modifikasyona uğrayarak aterojenik potansiyeli olabileceği ileri sürülmektedir (2). Ayrıca VLDL partiküllerinin kendi başlarına damar endotelial hücrelerinin inflamatuvar fonksiyonlarını aktive ettiği belirlenmiştir (47).

Plazma ApoE değerlerinin ortalaması kontrol grubunda 10,59 mg/dl iken hasta grubunda ortalama 10,46 mg/dl olarak saptanmıştır. Ancak gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu gözlenmemiştir ($p=0,987$). ApoE, yüksek yoğunluklu ve trigliserid zengin lipoproteinleri yapısında bulundurmaktadır (3). En önemli fizyolojik fonksiyonu lipoprotein metabolizmasında görev almasıdır. ApoE'nin hücre içi kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde ve ters kolesterol taşınmasındaki önemli rolü nedeniyle aterosklerozdan riskinin etkilediği arttığı çalışmalar ile ortaya konmuştur (59,62).

Çalışmamızın LDL altgrup analizi verilerine göre büyük yoğunluklu LDL ortalaması kontrol grubunda $53,70 \pm 14,293$ mg/dl iken hasta grubunda ise bu değer $54,71 \pm 19,115$ mg/dl olduğu görülmüştür ($p=0,698$). Küçük boyutlu LDL ortalamasının hasta grubunda ($7,12 \pm 8,184$ mg/dl) kontrol grubuna ($4,04 \pm 6,690$ mg/dl) göre istatistiksel açıdan anlamlı yüksek olduğu ($p=0,008$) ve logistik regresyon analizi ile hastalık riskinin artırdığı gösterilmiştir ($p=0,014$, $OD=1,065$, $\%95CI=1,013-1,120$) (Tablo 4-6). Ayrıca küçük boyutlu LDL düzeyi ve yoğunluğuna göre yapılan risk analizlerinde hasta grubunda yer alanların çoğu Tip B (yüksek risk) grubu içerisinde yer almaktadır ($p=0,050$) (Tablo 4-5) ve bu grupta yer alanların 2,2 kat daha fazla risk taşıdığı saptanmıştır (Tablo 4-6). Griffin ve arkadaşları (1994) tarafından yapılmış çalışmada (117) KKH teşhisi olanlarda küçük yoğunluklu LDL düzeyinin yüksek olmasının yanında düzeylerinin hasta ve sağlıklı grup arasındaki ayırt edici değer olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında bu parametrenin akut miyokard infarktüsü (AMI) geçirme riskini 7 kat artırdığını belirtmişlerdir (117).

Elde ettiğimiz bulguları desteleyen bir çalışma da Hirayama ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılmıştır (118). Bu çalışmaya göre küçük boyutlu LDL düzeyinin azaltılmasının kardiyovasküler riski de azalttığını, küçük boyutlu LDL'nin bu etkisinin yapısal ve fonksiyonel özelliklerine bağlı olduğunu görüşünü ileri sürmüşlerdir (117,118). Küçük boyutlu LDL'nin aterojenik özelliğinin temel nedeninin küçük yapısı nedeniyle arterial duvara kolaylıkla penetre olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (118). Ayrıca arterial duvardaki proteoglikanlara olan yüksek ilgisinin subendotelyal bölgede uzun süre yerleşmesi ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Küçük boyutlu LDL'nin proteoglikanlara olan bu afinitesinin yapısındaki sialik asit içeriğinin fazla olmasından kaynaklandığı Anber ve arkadaşları tarafından (1996) yaptıkları çalışma ile gösterilmiştir (119). Yapılan değerlendirmeler sonucu küçük boyutlu LDL'nin LDL reseptörlerine düşük afinite gösterdiği bu nedenle de plazmadan temizlenemediği düşünülmektedir (120). Goulinet ve arkadaşları tarafından (1997) yapılan çalışmada küçük boyutlu LDL partiküllerinin yapısında E vitamini bulunmasına bağlı olarak oksidasyona duyarlılık kazanması sonucu olarak aterojenik özellik gösterdiği görüşü ileri sürülmüştür (121).

HDL'nin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkisi uzun süredir bilinen bir bulgudur (107). HDL kolesterol, yoğunluklarına göre büyük, orta ve küçük yoğunluklu HDL olmak üzere 3 temel altgruba ayrılmaktadır. Bu alt gruplar biyokimyasal özellikleri, vasküler metabolizmaları ve biyolojik aktivitelerine göre işlevsel farklılık gösterirler (122). Bu etkinin mekanizmasını açıklayabilmek için HDL altgruplarının heterojenitesi ve fonksiyonlarını üzerine bir çok araştırma yapılmıştır. Yapmış olduğumuz HDL altgrup analizlerine göre büyük yoğunluklu HDL ortalamasının kontrol grubunda ($13,19 \pm 6,32$ mg/dl) hasta grubuna ($11,76 \pm 6,63$ mg/dl) oranla daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,169$). Kontrol grubunda orta boyutlu HDL ortalamalarının hasta grubu ile hemen hemen aynı düzeyde olduğu saptanmıştır ($p=0,999$). Çalışmamızın hasta grubunda da görüldüğü üzere büyük ve orta yoğunluklu HDL'nin daha az bulunması aterosklerozun gelişimi ile ilişkili olabileceği izlenimi vermektedir. Ancak bir çok çalışma daha etkin rolü olduğu düşünülen küçük yoğunluklu HDL üzerine odaklanmaktadır (107,122). Küçük boyutlu HDL ortalamasının kontrol grubunda ($8,07 \pm 3,70$ mg/dl) hasta grubuna ($6,59 \pm 3,21$ mg/dl) göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,008$) Sonuç olarak çalışmamızda daha fazla

küçük boyutlu HDL sahip olmanın hastalık riskini 1,13 kat azalttığı saptanmıştır (Tablo 4-6). Tiozzzo ve arkadaşları tarafından (2014) yapılmış çalışmada küçük yoğunluklu HDL'nin artmasının karotid plak oluşumu azalttığını ortaya koymaktadır (122). Küçük yoğunluklu HDL düzeyi yüksek olanların plak alanının küçük olduğunu bunun yanında büyük yoğunluklu HDL'si yüksek olanların ise plak kalınlığının daha ince olduğunu belirlenmişlerdir Bunun nedeninin küçük yoğunluklu HDL'nin plağın lipid zengin çekirdeğinin yapısını etkileyerek plağın aterosklerotik özelliğini azaltması olabileceği görüşü ile desteklenmişlerdir (122). HDL kolesterol antiaterogenik özelliğinin yanında potansiyel antioksidant ve antinflamatuar etkinliğe de sahiptir. Bu etkisinin yapısında taşıdığı apolipoproteinler ve antioksidant moleküllerden kaynakladığı düşünülmektedir. HDL'nin oksidatif modifikasyonlara uğrayabildiği ve LDL'nin oksidasyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. HDL partikülleri paraoksonaz (PON), platelet aktivasyon faktör asetilhidrolaz (platelet-activating factor acetylhydrolase=PAF-AH), lesitin-kolesterol açiltransferaz (lecithin-cholesterol acyltransferase=LCAT) ve glutatyon selenoperoksidaz gibi antioksidan yapılar içermektedir. Yapılarındaki bu moleküller sayesinde LDL'yi etkili şekilde oksidasyondan koruduğu savı ileri sürülmektedir. Kontush ve arkadaşları (2003) bu veriler ışığında yapmış olduğu çalışmada altgrupları içinde yoğun yapısı nedeniyle küçük yoğunluklu HDL'nin en fazla antioksidatif etkiye sahip olduğunu saptamışlardır (123). Ayrıca bu altgrup HDL, büyük yoğunluklu HDL'ye göre endotel hücrelerde daha fazla adhezyon moleküllerini baskılayıcı etki gösterebileceği bu görüşü desteklemektedir (123). Shuhei ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada da küçük yoğunluklu HDL'nin oksidasyon özelliklerini incelemişler ve PON aktivitesinin büyük yoğunluklu HDL'ye göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (124). Yaptıkları analizlerde antioksidant etkinin LDL oksidasyonun ileri safhalarında ve lipid peroksidlerinin birikimi fazla olduğunda belirginleştiğini saptamışlardır. Bu etkinin yoğun HDL'nin, okside LDL partikülleri oluşumu nedeniyle ortaya çıkan antioksidant sistem ile etkileşerek sinerjik etkiye sahip olmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (124). Sonuç olarak bu veriler çalışmamızda olduğu gibi küçük boyutlu HDL'nin ateroskleroz riskini azalttığı görüşümüzü destekler niteliktedir.

Çalışmamızda yapılmış olan doğrusal regresyon analizi sonucunda VKİ'si 27,55 kg/m²'den fazla olan kişilerin daha fazla küçük boyutlu LDL miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4-1). Vücut kitle indeksi (VKİ) ve küçük boyutlu LDL arasındaki

ilişkiyi gösteren çok az çalışma bulunmaktadır. Kardiyovasküler riski oluşturan nedenler arasında obezite, diyabet, hipertansiyon ilk sıralarda yer almaktadır. VKİ hesaplamaları obeziteyi klinik olarak tanımlamak için kullanılan en temel parametre olarak kabul edilmektedir (125). VKİ arttığında plazma bulunan lipidlerin ve kolesterolün de yoğunluklarının ve içeriklerinin değiştiği saptanmıştır (125). Parlesak ve arkadaşlarının 2014’de yaptığı bu çalışmada yüksek kolesterol içeren diyet ve düşük fiziksel aktivitenin neden olduğu VKİ artışının daha fazla küçük boyutlu LDL sentezlenmesine neden olabileceği rapor edilmiştir (125). Wood ve arkadaşlarının 2006 yılında yayınladığı çalışmada kalori kısıtlaması ile diet yapan kişilerde kilo kaybı ile küçük boyutlu LDL düzeylerinin de azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca VKİ azaldığında plazma TG düzeyinin düştüğünü ve buna bağlı olarak plazmadaki VLDL ve LDL’nin de azaldığını ancak LDL’nin çapının arttığını ve yoğunluğunun ise azaldığı aynı çalışmanın önemli bulguları arasında yer almaktadır (126). Tüm bu veriler VKİ ile plazma lipidleri ve özellikle de küçük boyutlu LDL ile arasında bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar bulgularımızın desteklendiğini göstermektedir.

ApoE genotip frekansları kontrol ve ateroskleroz hasta olguları ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmiştir ($X^2= 11,376$, $p=0,023$). Tüm katılımcılar incelendiğinde en sık görüldenen daha az görülen genotipler sırasıyla: E3/E3 (%84,1) , E3/E4 (%8,8) , E2/E3 (%5,5) , E4/E4 (%1,1) , E2/E2 (%0,5) olurken E2/E4 genotipine rastlamamıştır (Tablo 4-7). ApoE polimorfizmlerinin metabolizma üzerine etkileri nedeniyle pek çok ülkedeki araştırmacı ve klinisyenlerin dikkatini çekmektedir. Hallman ve arkadaşları tarafından 1991 yılında (127) ApoE genotip ve alleleri bakımından dokuz farklı popülasyon üzerinde tarama çalışması yapmışlardır . Mahley ve arkadaşlarının (1995) yapmış oldukları ve diğer toplumlardaki dağılımlarının Türk toplumu ile karşılaştırıldığı Türk Kalp Çalışması’nda ilginç sonuçlar elde edilmiştir (112). Türkiye’deki genotip dağılımları Amerika ve Avrupa topluluklarından daha ziyade Japonya ırkı ile paralellik göstermektedir. Mahley’in çalışmasında Türkiye’de E3/E3 genotipi Türkiye’de %74,2 olarak saptanırken Japonya’da bu oran %72,1, Almanya’da %59,8, Amerika’da %58, Finlandiya’da %46,8, Sudan’da %39,8 olarak belirlenmiştir (127,112). Çalışmamızda E3 allelinin görülme sıklığı %84,6, E4 allelinin ise %9,4 ve E2 allelinin ise %6 olduğu gösterilmiştir. Elde ettiğimiz ApoE allel frekansları da Türk Kalp çalışması verilerine göre allel dağılımları (E3 %86, E4 %7,9 ve E2 %6,1) ile uyumluluk göstermektedir

(112). Hallman ve arkadaşlarının (1991) çalışma verilerine göre allel dağılımları Almanya'da E3 %77,3, E4 %15, E2 %7,7, Amerika'da E3 %76, E4 %11, E2 %13, Sudan'da E3 %61,9, E4 %29,1, E2 %8,1, Finlandiya E3 %69,5, E4 %24,4, E2 %6,2 olduğu rapor edilmiştir (127). Toplumumuzun allel frekansları da Japon ırkı ile benzer dağılımlar gösterirken (E3 %84,6, E4 %7,4, E2 %8) diğer toplumlarla son derece farklı tablo çizmektedir. Mahley bu etkinin Türk toplumunun Orta Asya kökenli olmasından kaynaklanabileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir (112). Ayrıca E3 alleli Türk toplumunda daha yaygın olmasının yanı sıra E4 allelinin özellikle Amerika ve Avrupa toplumlarına göre daha az bulunması dikkat çekmektedir.

ApoE genotip frekansları kontrol ve ateroskleroz hasta grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanılmıştır ($X^2=11,376$, $p=0,023$). E3/E4 genotipine sahip olgular değerlendirildiğinde hasta grubunda istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiş ($X^2=4,782$, $p=0,029$) ve logistik regresyon analizi sonucunda bu genotipi taşımanın ateroskleroz riskini 3,4 kat artırdığı belirlenmiştir (Tablo4-7 ve Tablo 4-8). E2/E4 genotip frekansının ise kontrol grubunda istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde yüksek olduğu görülmüştür ($X^2=6,408$, $p=0,011$). Logistik regresyon analizi sonucuna göre E2/E4 genotipine sahip olmak ateroskleroz riskini 10 kat azaldığı gözlenmiştir (Tablo 4-8). Ayrıca tip III hiperlipidemi ile ilişkili olduğu bildirilen (62) E2/E2 genotipi taşıyan bir katılımcının lipid değerlerinden sadece LDL sınır değerden yüksek çıkmıştır. Elde ettiğimiz veriler Lenzen ve arkadaşlarının (1986) 570 miyokard enfarktüsü geçirmiş hastalar üzerinde yaptığı çalışmadaki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir (128). Çalışmada E3/E4 genotipi taşıyanların diğer genotiplere göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha fazla ve daha genç yaşta miyokard enfarktüsü geçirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın analizlerimiz ile paralellik gösteren diğer bir veri ise E2/E3 genotipi taşıyanlarda daha düşük koroner kalp hastalığı riski taşıdığı saptanmıştır. Bunun nedeninin E2/E3 taşıyanların diğer genotiplere göre serumda LDL kolesterolün daha az düzeyde bulunmasından kaynaklandığı izlenimi vermektedir (128).

ApoE allel dağılımları kontrol ve ateroskleroz hasta grupları ile karşılaştırıldığında E2 taşıyan olguların ateroskleroz grubunda yüksek olduğu saptanmıştır ($X^2= 10,189$, $p=0,006$) (Tablo4-7). Bu veriler sonucunda yapılan logistik regresyon analizi verisine göre E2 alleli taşımak ateroskleroz riskini 10 kat azalttığı gözlenmiştir (Tablo4-8). Lenzen ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da E2

alleleline kontrol grubunda istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha fazla rastlanmıştır ve bu allelin koroner kalp hastalığı riskini azalttığı sonucuna varılmıştır (128). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları Lenzen ve arkadaşlarının verileri ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda E3 ve E4 alleli taşıyanların hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0,586$). Rall ve arkadaşları (1982) toplumda en yaygın bulunan E3 allelinin esas allel olarak kabul edilebileceğini öne sürmüşlerdir (129). Ayrıca ApoE4 içeren lipoproteinlerin reseptör ile etkileşiminin azaldığı bunun yanında ApoE2 içeren lipoproteinlerin ise reseptörlerle daha fazla bağlanma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir (129). Tüm bu veriler ApoE polimorfizmlerinin koroner kalp rahatsızlığı üzerine etkili olabileceği izlenimi vermekte ve bulgularımız ile paralellik göstermektedir.

ApoE genotip ve allel dağılımları ile serum ApoE seviyeleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4-9). E2 alleli taşıyanların serum ApoE düzeyinin çok yüksek olduğu gözlenirken (129,17 mg/dl), E3 ve E4 allel gruplarının (104,02 mg/dl ve 104,40 mg/dl) çok daha düşük ve birbirine yakın olması dikkat çekicidir. Elde ettiğimiz veriler Schiele ve arkadaşlarının 2000'de yaptığı (130) ve Avrupa'nın birçok farklı ülkesini kapsayan ApoEurope Projesi'nin sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada ülkeler arası farklar olsa da sonuç olarak E2 alleleline sahip olan katılımcıların yüksek ApoE düzeylerine sahip olması belirlenirken, E4 alleleline taşıyan katılımcıların ise gruplar arasındaki en düşük düzeye sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca aynı çalışma ile incelenen toplumların yaş ve cinsiyet faktörlerine bağlı olarak ApoE düzeylerinin değiştiğini saptamışlardır (130). Buna göre ApoE düzeylerinin erkeklerde daha yüksek olduğu, yaş grupları değerlendirildiğinde genç ve orta yaşlı gruplarda eşit düzeyde olduğu belirlenirken serum ApoE seviyesinin yaş ile doğru orantılı olarak azaldığını tespit etmişlerdir. Tüm Avrupa'yı kapsayan çalışmanın dikkat çekici sonuçlarından biri de Akdeniz bölgesinden kuzey Avrupaya doğru serum ApoE seviyelerinin azalma eğilimi göstermesidir. Bu etkinin Kuzey Avrupa'da E4 allelinin görülme sıklığının diğer gruplarına oranla daha yüksek olması olarak açıklanmaktadır (130). Ayrıca Manila ve arkadaşlarının (2013) yapmış olduğu kohort analiz sonuçlarına göre plazmadaki ApoE düzeylerinin %10 veya %20'sinin ApoE genotip varyasyonları ile ilişkili olduğu iddia edilmektedir (131). Sonuç olarak tüm bu veriler ışığında serum ApoE düzeyleri

üzerinde ApoE polimorfizmlerinin dahil olduğu genetik faktörlerin yanı sıra çevresel, cinsiyet ve yaş gibi faktörlerin de etkili olabileceği izlenimi vermektedir.

Plazma kolesterol düzeyleri ile ApoE genotip dağılımlarının karşılaştırıldığında E3/E3 genotipi taşıyanların plazma kolesterol ortalaması $190,29 \pm 44,50$ mg/dl iken taşımayanlarda ise $168,10 \pm 34,42$ mg/dl olduğu belirlenmiş ve bu iki grup arasında anlamlı olarak fark olduğu saptanmıştır ($p=0,012$). En düşük ortalama değerine E4/E4 genotipi taşıyanların ($145,18 \pm 2,82$ mg/dl) sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca plazma kolesterol değeri 200mg/dl'nin altında olanların çoğunun E3/E3 genotipi taşımadıkları ($X^2=8,525$, $p=0,004$) ve E3/E3 taşıyanların çoğunun plazma kolesterol değerinin 240mg/dl'nin üstünde olduğu gözlenmiştir ($X^2=8,525$, $p=0,004$) (Tablo 4-10). Günümüze kadar yapılan bir çok çalışmada toplumlardaki kolesterol oranlarının hem genetik hem de çevresel kaynaklara bağlı olabileceği kabul gören bir teori olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu konuda çalışma yapan Weggemans ve arkadaşlarının (2001) verilerine göre plazma kolesterol düzeylerinin ApoE polimorfizmleri ile ilişkili olduğunu; diyetle alınan doymamış yağlar veya karbonhidratların metabolizmasının bu ApoE varyasyonlar tarafından etkilendiğini kanısına varılmıştır (132). E3/E3 genotipi taşıyan bireylerin E2/E3 ve E2/E2 taşıyanlara göre daha düşük kolesterol düzeylerine sahip olduğu bu nedenle bu genotipi taşıyanlarda ise daha yüksek oranda koroner arter hastalığı riski taşıdığı görüşü ileri sürülmektedir (132).

Çalışmamızda E3/E3 genotipine sahip olanların TG düzeylerinin diğer genotiplere göre çok daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($150,91 \pm 77,86$ mg/dl- $131 \pm 57,92$ mg/dl, $p=0,192$). Ayrıca TG değerleri 400mg/dl üstünde olan 2 katılımcının da bu grupta yer aldığı gözlenmiştir ($p=0,137$) (Tablo 4-10). Dong ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan metaanaliz çalışmasında E3/E3 genotipine göre E2/E2 ve E2/E4 genotiplerinin daha düşük TG düzeylerine sahip oldukları sonucuna varılmıştır (133). Bir noktada bu bulgu çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

ApoE E3/E3, E3/E4, E2/E3, E4/E4 genotiplerinin LDL düzeyi ortalamaları sırasıyla $120,14 \pm 40,32$ mg/dl; $106,75 \pm 27,75$ mg/dl, $119,30 \pm 39,43$ mg/dl, $95,50 \pm 21,92$ mg/dl ve E2/E2 genotipindeki bir olguda ise 164 mg/dl olarak saptanmıştır. (Tablo 4-10). Kardiyovasküler risk faktörü olarak kabul edilen sınır LDL değeri 160mg/dl'nin üstünde olanların E3/E3 genotipi taşıyanların istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır ($X^2=4,258$, $p=0,038$).

ApoE3'ün reseptör bağlanma bölgeleri 118. (tirozin) ile 162. (tirozin) amino asitleri arasında yer alır. Molekülün dördüncü sarmalını çevrelediği bu bölgesi (134-160. amino asitler arası) çok daha düzenli bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir (65). Reseptör bağlanmasında etkili olan amino asitlerin arginin ve lizin olduğu, ayrıca sisteinde olduğu gibi amino asitlerdeki serbest sülfidril gruplarının diğer proteinlerle disülfid bağları yaptığı gösterilmiştir. Bu bölgede olabilecek korformasyonel bir değişikliğin ya da polimorfik bir farklılığın (örneğin 158. amino asitin arginin yerine sistein olması gibi) bağlanma bozukluğuna neden olabileceği gözlenmiştir (69). Bu yapı farklılıkları lipoproteinlerin de LDL reseptörü ile bağlanması engelleneceğinden plazmada fazla miktarda bulunduğu rapor edilmiştir (134). Çalışmada elde edilen bulgular kardiyovasküler olaylardaki düşük LDL düzeyinin bu mekanizmaya bağlı olabileceği izlenimi elde edilmiştir.

Plazma kolesterol düzeylerinin HDL'ye oranı [kolesterol]/[HDL] kardiyovasküler risk parametresi olarak değerlendirilmektedir (113). Bu oranın genotiplere dağılımı incelendiğinde E3/E3 genotipine sahip olanlarda ($4,89 \pm 1,42$) anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür (E3/E3 taşımayan $4,26 \pm 1,13$, $p=0,039$, Tablo 4-10), yapılan regresyon analizi sonuçlarına göre bu genotipi taşımanın riski 1,42 kat artırdığı saptanmıştır ($p=0,029$, $OD=1,429$, $\%95CI=1,038-1,967$) (Tablo 4-6). Mahley tarafından yapılan Türk Kalp Çalışması verilerine göre plazma [kolesterol]/[HDL] oranı toplumumuzda Almanya ve Amerika'ya göre çok daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeninin toplumumuzda HDL düzeylerinin diğer toplumlara göre daha düşük olmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (112).

Plazma kolesterol düzeylerinin düşük değerlerden yükseğe doğru sırasıyla E4 ($165,82 \pm 40,75$), E2 ($168,91 \pm 23,69$), E3 ($187,16 \pm 43,86$) allelleri olarak sıralanmaktadır. Ayrıca Apo E4 alleli taşıyan katılımcıların düzeylerin anlamlı şekilde fazla olduğu saptanmıştır ($p=0,038$). E2 alleli taşıyan olguların çoğunun plazma kolesterol düzeyinin 200mg/dl düşük olduğu belirlenmiştir ($X^2=4,131$, $p=0,036$) (Tablo 4-11). E2 allelinin düşük kolesterol ve LDL seviyeleri ile ilişkisini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır (127,130). Türk Kalp Çalışması da popülasyonumuzda E2 alleli taşıyan bireylerin düşük LDL ve kolesterol düzeylerine sahip olduğunu gösterilmiştir. E2 allelini tek başına taşımak ve E2/E2 genotipinde olmak arasında kardiyovasküler risk olarak büyük fark bulunmaktadır (112). E2 allelinin E3 ve E4 ile karşılaştırıldığında LDL reseptörlere bağlanma kapasitesinin 50-100 kat az olduğu saptanmış ve bu nedenle Tip III

Hiperlipoproteinemi gibi çeşitli lipid bozuklukları ile ilişkilendirilmektedir (134). Ailesel Tip III Hiperlipoproteinemi (primer disbetalipoproteinemi) genetik bir lipid bozukluğu olup yüksek plazma, TG, LDL-kolesterol ve VLDL ile karakterizedir (129). Tip II Hiperlipoproteinemi olan bireylerin lipoprotein reseptörleriyle etkileşme kapasitesi bireylere göre farklılık göstermektedir. Bunun nedeninin E2/E2 fenotipindeki yapısal heterojenitesinden kaynaklandığı izlenimi vermektedir (65). Ayrıca E2/E2 genotipine sahip bireylerin sadece %5'inde bu hastalık görülmektedir. E2 allelindeki sistein amino asiti, pozitif yüklenmiş lisin analogları tarafından kimyasal olarak modifiye edildiğinde bağlanma aktivitesi artmış olabileceği düşünülmektedir. E2 allelinin 158. amino asit dizisindeki tek bir değişiklik (arginin yerine sistein bulunması) bağlanma aktivitesini etkilediği düşünülmektedir (129). Çalışmamızda E4 alleli taşıyan veya E4/E4 genotipine sahip olan bireylerin diğer gruplara oranla daha yüksek seviyede kolesterol, LDL, VLDL düzeylerine sahip olduğu gözlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler ile paralellik gösteren Davignon ve arkadaşlarının 1988 yılında yaptığı çalışmada E4 alleleline sahip kişilerin daha düşük plazma kolesterol ve TG düzeylerine sahip olduğu rapor edilmiştir (68). Ancak Boer ve arkadaşları 1998 yılında, E4 allelinin lipid profillerini etkilediği ve daha yüksek LDL, VLDL, TG düzeyleri nedeniyle kardiyovasküler riski artırdığını ileri sürmektedir. Hollanda da yapılan bu çalışmada ApoE allelelerinin etkinliğinin cinsiyet faktörü ile değiştiğini; E2 allelinin kadınlarda koruyucu etki gösterdiği ve erkeklerde ise E4 alleleline sahip olmanın kardiyovasküler riski artırabileceği görüşü ileri sürülmektedir (135). Bu etkinin E4 alleleline çok sık rastlanan Kuzey Avrupa ülkelerinde en yüksek olduğu ve bu etkinin etnik kökene bağlı olabileceği görüşü ileri sürülmüştür (136). Sonuç olarak tek başına E2 alleli taşımak lipid profilleri açısından bir avantaj oluşturarak E2/E2 genotipinde olmak kardiyovasküler olarak risk taşıyabileceği görüşüne ulaşılmıştır. Bu veriler ışığında E4 allelinin ve E4/E4 genotipinin risk oluşturabileceği izlenimi elde edilmiştir.

Yaygın olarak görülen ApoE allelinin E3 olması nedeniyle doğal tip olarak kabul edilirken E2 ve E4 allelinin mutant olarak değerlendirilmesi yaygın bir düşüncedir. Ancak Miyata ve arkadaşlarının 1996 yılında yapmış olduğu çalışmada E2 allelinin oksidatif hasardan koruyucu antioksidan etkiye sahip olduğu ve bunun da betaamyloid peptidlerin oluşumuna karşı koruyucu etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada hücre kültüründe B12 hücreleri üzerinde hidrojen peroksid sitotoksitesinin etkileri araştırılmış E2 allelinin en koruyucu ApoE izoformu olduğu saptanmıştır (137).

Lehrer 1998 yılında E4 allelinin prostat kanseri üzerinde koruyucu etki gösterdiği savını ileri sürmüştür. Norveç toplumunda yapılan bu çalışmada E4 allelinin de antioksidan aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (138). Bu verileri destekleyen bir çalışma da 2014 yılında Ciberia ve arkadaşları tarafından yapılmış ve E2 alleli taşımanın meme kanseri üzerinde olumlu etki gösterdiği görüşünü ileri sürülmüştür (139). E2 alleli taşıyanların daha düşük TG düzeyine sahip oldukları belirlenen bu çalışmada plazmada TG'in azalmasının cinsiyet hormonu bağlayan globulin düzeylerini de azaltarak estrogen üzerinde etki gösterdiğini belirlemişlerdir (139). İsbir ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladığı çalışmada E2 alleli taşımanın prostat kanseri evreleme kriteri olan Gleason Skoru üzerinde olumlu etki gösterdiğini saptamışlar ve E4 allelinin de prostat kanseri riskini azaltan potansiyel bir faktör olabileceği savını ileri sürmüşlerdir (140). E4 alleli ile yapılmış diğer bir araştırma Yaylın ve arkadaşları tarafından 2003 yılında Türk toplumunda yapılmıştır. Bu çalışmada ApoE allel dağılımlarının meme kanseri ve hasta grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark göstermediği ve E4 allelinin meme kanserinde risk faktörü olamayacağı görüşünü ileri sürülmüştür (141).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın etimolojisinde miRNAlarla ilgili işlev bozukluklarının yer aldığı gösterilmiştir (70,71). Çeşitli işlev bozukluklarının diğer mekanizmalara bağlı olarak oluşabileceği ve bunlar arasında en önemli grubu miRNA ifade düzeylerindeki değişiklikler olduğu ileri sürülmüştür (72).

Genetik kaynaklı ifade değişikliklerine delesyon veya translokasyon gibi büyük ölçekli genom değişiklikleri sebep olmakta, kodlayan dizideki değişiklik nedeniyle miRNA miktarı azalırken hedef mRNA ve kodlanan proteinler artmaktadır. Nokta mutasyonlar da genomda yaptıkları dizi değişiklikleri nedeniyle miRNA-mRNA etkileşimini azaltıcı veya artırıcı etki yapabilmektedir (71). miRNA kodlayan dizilerin kırılğan genom bölgelerinde normal bölgelere göre 9 kat daha fazla oranda buldukları belirlenmiştir (142). miRNA kodlayan dizilerin DNA zincirinin yapısal olarak daha savunmasız olduğu kırılğan genom bölgelerinde daha fazla bulunmaları miRNAların işlev bozukluklarındaki rolü, gün geçtikçe yapılan araştırmalarla ortaya konmaktadır. Günümüzde hastalıkların mekanizmalarını açıklayan çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir (142).

miRNA kaynaklı işlev bozukluğu sonucu ortaya çıkan hastalıkların başında kanser gelmektedir. Kanserleşme sürecinde, büyüme, çoğalma ve farklılaşma gibi

olayları kontrol eden miRNAların etkisinin büyük olduğu ileri sürülmektedir (75). MiRNAların bir kısmı onkogenik bir kısmı ise tümör baskılayıcı etkiye sahip olduğunu vurgulayan önemli araştırmalar yapılmaktadır (73).

Onkogenik miRNAlar, hücre çoğalmasını baskılayıcı proteinlerin miRNAlarına bağlanarak etkilerini azaltırken tümör baskılayıcı miRNAlar, büyüme faktörü reseptörleri gibi hücre çoğalmasını uyaran proteinlerin mRNAlarını hedef almaktadırlar (75).

MiRNAların kanda oldukça kararlı bir yapıya sahip olması nedeniyle klinik hastalıkların tanısı ve tedavisinde önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği çeşitli araştırmalar ile ortaya konulmaya devam edilmektedir. MiRNAlar RNAazlara karşı oldukça dirençli olması, pH değişimlerinden etkilenmemekte ve dondurma-çözdürme gibi uygulamalara da yapısında bozulma olmadan dayanıklılık gösterebilme özellikleri sayesinde invaziv yöntemlere gerek kalmadan serum ve plazma örneklerinde kolaylıkla tespit edilebilme kolaylığı sağlamaktadır. Bu avantajları nedeniyle miRNAların ifade düzeylerinin ölçülmesi hastalıkların tedavi edilmesi ile ilgili bilgiler edinilebilmekte ve tümör belirteci olarak kullanılabilir (143).

Kardiyovasküler hastalıklar ve miRNA ilişkisini gösteren bir çok çalışma vardır. miRNAların kardiyak hücrelerin farklılaşmasında, angiogenesis ve miyosit gelişimde önemli sorumluluklar yüklendiği araştırmalar sonucu ortaya koyulmuştur. Ayrıca miRNA düzeylerindeki farklılıklar kardiyovasküler hastalıkların patolojisine neden olan endotel disfonksiyonu ve damar düz kas hücrelerinin çoğalma ve farklılaşması gibi çeşitli işlev bozukluklarına neden olabileceği görüşü gün geçtikçe kuvvet kazanmaktadır (144).

MikroRNA ekspresyon düzeylerini karşılaştırmak delta Ct (ΔC_T) ve kat değişimi farklarını göstermek için 3 internal kontrol (housekeeping assay =mirRU6, mirSNORD61, SNORD68) kullanılmıştır MikroRNA düzey belirleme hesaplamaları Livak formülü ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) kullanılarak yapılmıştır. Hesaplama yapılırken (ΔC_T hedef- ΔC_T internal kontrol)-(ΔC_T tüm kontrol- ΔC_T internal kontrol) değeri belirlenmiş ve logaritma 2 tabanında ($2^{-(\Delta\Delta C_T)}$) delta delta Ct hesaplanmıştır. Elde edilen değer LN tabanında logaritmasının alınması kat değişimi değerini vermektedir (101). Livak formülü doku ve hücre kültüründe örneklerin DNA, mRNA veya miRNA ifade düzeylerinin saptanmasında kullanılmaktadır. Ancak bu araştırmalar formül, dokuda sağlam doku veya hücre kültüründe sağlıklı hücre hatlarının karşılaştırılması için

kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda hem tüm kontrol grubu değerleriyle hasta grubunu karşılaştırılarak hesaplanan ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) hem de örneklerin aynı koşullarda PZR yapılan internal kontrollerle karşılaştırıldığı ΔCt değerleri ayrı ayrı gösterilmiştir. Yapmış olduğumuz literatür taramalarda hasta gruplarıyla yapılan araştırmalarda her iki hesaplamasında kullanıldığı belirlenmiştir (101).

Çalışmamızda incelenen mikroRNA'ların tüm kontrol grubunda ($LN[2^{(-\Delta\Delta Ct)}]$) kat değişim değerleri belirlenmiştir. Tüm kontrole göre ekspresyonu düzeylerinin miRNA222'de 0,72 kat, miRNA221'de 0,65 kat azaldığı görülmüştür (Şekil 4-2A). $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değişimi incelendiğinde ise miRNA222'de 0,48 kat, miRNA221'de 0,51 kat azaldığı saptanmıştır (Şekil 4-2B). mikroRNAların ifade düzeyleri internal kontrol (SNORD61, SNORD68, U6) ile karşılaştırıldığı ΔCt sonuçlarının miRNA222 -1,64, miRNA221 -2,78, miRNA145 -2,82, miRNA143 -0,27, miRNA122a -2,96, miRNA494 -5,02 kat azaldığı saptanmıştır (Şekil 4-2C). Plazma mikroRNA seviyelerinin ΔCt ve kat değişim değerlerinin regresyon analizlerine göre. mir 221 ve miRNA221 düzeylerinin ΔCt ve kat değişimi değerlerine göre karşılaştırıldığında kontrole göre hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı daha az olduğu gözlenmiştir (miRNA221: OR=1,33;p=0,004 ve OR=0,71; p=0,011-miRNA222: OR=1,42;p=0,001 ve OR=0,65; p=0,004) (Tablo 4-13).

Hücre döngüsünde etkileri belirlenen miRNA 221/222'nin, aterosklerozun oluşum mekanizmasında önemli basamaklar olan endotel bozukluğu ve damar düz kas hücrelerinin farklılaşmasındaki etkilerinin gösterilmesi hastalığın mekanizmasının açıklanabilmesi yanında yeni tedavi seçeneklerinin belirlenebilmesi için yeni açılımlar getirebileceği görüşü bilim dünyasında gün geçtikçe taraftar toplamaktadır (7).

İn vitro angiogenesis için değerli bir model kabul edilen 'insan kordon veni endotelial hücreleri (HUVECs=Human Umbilical Vein Endothelial Cells), tüp denen kapiller benzeri yapılar oluşturma kabiliyetine sahip en ideal uyarıcılara sahip olduğu bilinmektedir (145). Polisen ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları bir araştırmada bu hücreler kullanılmış ve angiogenesis ilişkili genlerin posttranskripsiyonel düzenlenmesinde miRNAların rolünü incelemiştir (145). MiRNA221 ve miRNA222'nin angiogenik kök hücre faktörünün aktivitesini düzenlediğinin gösterilmesinin yanında bu etkiyi KİT geni (V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarkoma Viral Onkogen Homolog Geni) tarafından kodlanan bir protoonkogen olan ve kök hücre faktörü için reseptör olarak görev yapan c-Kit proteinin aktivitesini

azaltarak yaptığı ortaya konmuştur (145). MiRNA221 ve miRNA222, c-kit proteinin 3'UTR bölgesini hedef alarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma C-kit aktive ederek kök hücre faktörlerinin işlevini azaltır, hücrelerin tüp şeklinde düzenlenmesine, göçüne (migrasyonuna) ve hücre sayısında azalmaya neden olmaktadır. MiRNA221 ve miRNA222 ifadesinin transfeksiyon yöntemi ile artırıldığında bu hücrelerin tüp formu oluşturamadıkları gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada hücrelerin hem göç (migrasyon) potansiyellerinin azaldığı ve hem de sayılarının da azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada c-kitin transkripsiyonunu yapan mRNA ifade düzeyleri de incelenmiş ve mRNA düzeyinde anlamlı değişim olmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak bu miRNA221 ve miRNA222'nin posttranskripsiyonel değişimler neden olarak c-kitin aktivasyonunu ve fonksiyonunu etkileyerek angiogenesisine neden olabilen önemli bir faktör olduğu görüşü ileri sürülmüştür (145).

MiRNA222'nin angiogenesis üzerine etkisini araştıran bir araştırma da Chen ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılmıştır (146). Bu çalışmada miRNA222'nin endotelial hücrelerin tüp formu oluşturabilme kabiliyeti ve göçü üzerinde azaltıcı etki gösterdiği görüşü ileri sürülmüştür. Angiogenesisi tetikleyici rol oynayan vasküler endotelial hücreler (VEH), pro-onkogen ve antiangiogenik gibi çeşitli genlerin dengeli ifadeleri ile sağlıklı gelişimlerini sürdürürler. Homeobox genleri, anatomik gelişimde (morfogenesis) düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Mezenşim homeobox geni olarak bilinen ve 7.kromozomun p21.2 kolunda yer alan GAX geni (MEOX2 olarak da bilinir), VEH hücrelerinin angiogenik aktivitenin temel düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır. GAX geni homeodomain-içeren transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır ve ZEB2 geni (transkripsiyonel baskılayıcı) tarafından baskılanmaktadır. GAX geni p21'i aktifleştirerek VEH proliferasyonunu durdurarak hücreleri Go/G1 fazında kalmasına neden olmaktadır. İnsan Kordon Veni Endotelial Hücreleri (HUVEC) ile in vitro tasarlanan çalışmada MiRNA221'in transfeksiyonu sonucunda ZEB2 geninin ifadesi inhibe edilince GAX geninin ekspresyonun arttığı (upregüle) olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında araştırmacılar miRNA221 düzeylerinin belirlenmesinin angiogenesis için bir tedavi stratejisi olabileceği görüşü ileri sürmüştürler. (146).

Dantelli ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışmada miRNA221 ve miRNA222'nin inflamasyon kaynaklı neoangiogenesis üzerine etkisi araştırılmıştır (147). Bir sinyal iletim yolu proteini olan Sinyal artırıcı ve transkripsiyon aktifleştirici 5A (Signal transducer and activator of transcription 5A=STAT5A) proteini IL-3 ün

proliferatif etkisine aracılık görevi yapar. Mir 222'nin direk hedefleri arasında STAT5A geninin de olduğu ve yapılan in vitro çalışmada miRNA222'nin ifade düzeyinin arttığında STAT5A gen ifadesinin ve dolayısıyla inflamatuvar kaynaklı neoangiogenesisin azaldığı bildirilmiştir (147). Hazır hücre serileri ile normal ve aterosklerotik plaklardan VEH izole edilmiş (primer hücre kültürü) örnekler bu araştırma Chen ve arkadaşlarının (2010) sonuçlarından (146) farklı olarak ne c-kit ne de p27 protein düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla beraber miRNA222'nin fazla ifade edildiğinde VEH'lerde proliferasyonun azaldığı gözlenmiştir. Ancak aynı çalışmanın diğer basamağında birincil (primer) kültür örneklerinde miRNA222 ifade düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır. Sonuçlar birincil hücre kültürü örneklerinde lezyonlar seviyeleri ilerledikçe miRNA221 ifade düzeylerinin azaldığı saptanmıştır. Ancak bunun dokuya özgü bir durum olduğu tezi ileri sürülmüştür. Bu etkinin nedenini tespit etmek için yapılan ileri analizlerde ileri lezyonlarda anti- α -düz kas aktine rastlanmamış, IL-3 etkisi ile VDKH'lerde miRNA222 ifade düzeylerinde değişim gözlenmemiş, makrofaj koloni uyarıcı faktör ile uyarılmış periferik kan mononükleer hücrelerinde miRNA222'nin belirlenemeyecek düzeyde azaldığı gözlenmiştir. İleri lezyonlarda endotel hücrelerin çoğalma oranının miRNA222'nin neovaskülasyonu olumsuz etkilemesi nedeniyle etkilendiğini ancak yine de miRNA222 ifade düzeyi azaldığında damar sayısının arttığı belirtilmiştir. Bu veriler ışığında mir222'nin antiangiogenik bir miRNA olduğu sonucuna varılmıştır (147).

Vasküler Endotel Hücrelerinde (VEH) proliferasyonu azalttığı tespit edilen (145,146,147) miRNA221 ve miRNA222 konusunda son günlerde araştırmacıların ilgi alanları arasında yer almaktadır. Bunun nedeni miRNA221 ve miRNA222'nin hücre döngüsünde durdurucu etki yapan genleri hedef alması ve bu genlerin fonksiyonlarını düzenlemesinden sorumlu olabileceğinin gösterilmiş olmasından kaynaklanmaktadır (11). İe Sage ve arkadaşları tarafından 2007'de yapılmış araştırmada miRNA221 ve miRNA222'nin hücre döngüsünde baskılayıcı görev yapan p27 Kip1 genini hedef alarak hücre çoğalmasını artırıcı etki gösterdiğini saptanmıştır (148). p27Kip1 geni, siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olarak görev yaptığı; CDK2 ve Siklin E kompleksine bağlanarak hücrelerin G1 fazından S fazına geçmesini durdurucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (149). p27Kip1 geninin ifadesinin azalması p27Kip1 protein düzeyinde de azalmasına neden olarak agresif tümör oluşumuna, metastaz yaygınlığına ve hasta sağkalımlarında azalmaya neden olabileceği düşünülmektedir (149). İe Sage ve

arkadaşlarının (2007) yapmış olduğu in vitro moleküler çalışmada çeşitli miRNA221 retroviral vektörleri kullanılarak p27Kip1 ifade düzeyleri araştırılmıştır. MiRNA221 ve miRNA222 seed bölgesinin p27Kip1 geninin 3'UTR bölgesi ile etkileşerek translasyonu baskıladığı gözlenmiştir. Bu çalışmada p27Kip1'in tüm genom analizi yapılmaması ve tüm mRNAların profillerinin belirlenememesi kısıtlamalarına rağmen miRNA221/222'nin p27Kip1'yi inhibe ederek onkogen benzeri etki gösterdiği izlenimi edinilmiştir (148). VEH ile yapılan çalışmalarda miRNA221/222'nin hücre çoğalmasına engelleyici etki gösterirken kanser hücre hatlarında ise artırıcı etki göstermesi miRNA'ların doku ve hücreye özgü etki gösterdiği izlenimi vermektedir (149).

Togliatto ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı hem in vitro hem in vivo yöntemlerin kullanılarak yaptığı çalışmada İleri Glikozilasyon Ürünleri (AGEs) kaynaklı damar hasarında miRNA221 ve miRNA222'nin tümör baskılayıcı genler p27Kip1 ve p27Kip2 üzerindeki postranslasyonel etkileri araştırılmıştır (150). Bu çalışmada yüksek glikoz düzeyinde ve AGEs kaynaklı damar hasarında çok etkin rolü olabileceği belirlenmiştir, yapılan in vitro çalışmada miRNA221 ve miRNA222'nin transfeksiyonla ifade düzeyi baskılandığında p27Kip1 ve p27Kip2 mRNA düzeyinde fark görünmese de protein düzeyinde anlamlı şekilde azalma saptanmıştır. Farelerde glikoz seviyesi yükseldiğinde ise miRNA221 ve miRNA222'nin ifadesinin azaldığı bu nedenle hedef genleri p27Kip1 ve p27Kip2 düzeyi artarak hücre çoğalmasının engelleyerek damar hasarına neden olabileceği gösterilmiştir. Bu veriler ışığı altında miRNA221 ve miRNA222'nin p27Kip1 ve p27Kip2 genlerinin post-transkripsiyonel düzenlenmesinde kritik rol aldığı sonucuna varılmıştır (150).

Togliatto ve arkadaşlarının (2011) yaptığı hayvan ve hücre kültürü sonuçları (150) ile örtüşen bir çalışma da Coleman ve arkadaşları tarafından 2012 yılında diabet hastaları kullanılarak yapılmıştır (151). Bypass ameliyatı olan 37 diabet hastasından alınan damar örneklerinden DDKH izole edilmiş gerçek zamanlı PZR ile mir 221 ve miRNA222 ve p27Kip1 mRNA ifade düzeyleri araştırılmıştır. Bu çalışmada hasta grubunda p27Kip1 genini hedef alan mir 221 ve miRNA222'nin ifade düzeyinin arttığını, p27Kip1 mRNA ifade düzeyinin ise azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca mir 221 ve miRNA222'nin ifade düzeyinin artışın DDKH'lerin de proliferasyona ve migrasyona neden olabileceği gösterilmiştir. Tüm bu etkilerin damar intimasında kalınlaşmasına neden olması yanında arter hasarına da neden olabileceği savını ileri sürmüşlerdir (151).

Damar düz kas hücreleri (DDKH) damar hastalıklarında ve aterosklerozun pathogenezinde önemli rol olan hücrelerdir (44). Damar lümenin hemen çevresinde yer alan ve damarın desteklenmesi, gerekli uyarılar oluştuğunda ise kasılarak veya gevşerek kan akışını kontrol eden DDKH'ler normal koşullarda nadiren proliferasyon gösterirler (45). Hasarlanma, LDL dispoziyonu veya inflamasyona cevap olarak gelişir ve bölünerek çoğalarak ateroskleroz oluşumuna neden olurlar (48). Bu hücrelerin düzenlenmesinden sorumlu olan bir çok miRNA'nın varlığı gösterilmiştir (7,11,16).

Liu ve arkadaşları (2012), hem in vivo hem de in vitro basamaklar içeren bir araştırma planıyla mir 221 ve miRNA222'nin damarlar üzerindeki moleküler etkisini incelemişlerdir (9). Sıçanlarda karotis arter balon yaralanma modeli oluşturmuşlardır. Birinci grubun hasarlı damar bölgesine mir 221 ve miRNA222 susturmak için sentetik inhibitörler (knock out) ve kontrol grubu oluşturmak için içinde sadece tampon bulunan çözelti enjekte edilmiştir. İkinci gruba yine aynı bölgede aynı yöntemler kullanılarak mir 221 ve miRNA222 fazla ifade eden adenovirüsler kullanılmıştır. Sprague-Daley tipi sıçanlardan elde edilen aortlardan DDKH ve VEH'ler in vitro araştırma için kullanılmıştır. Oligotransfeksiyon ile bu hücrelerin bir grubunda mir 221 ve miRNA222 ve c-kit geni susturularak diğer grupta mir 221 ve miRNA222 ve p27Kip1 ifade düzeyi artırılmıştır. DDKH'lerinde mir 221 ve miRNA222 hücre çoğalması ve göçü artarken apoptosisin azaldığı gözlenmiştir. Ancak VEH'lerde bu miRNAlar tam ters etki göstererek hücre çoğalmasını ve göçünü engelleyici bir etki gösterirken apoptosisi artırdığı gözlenmiştir. mir 221 ve miRNA222'nin hedef genleri p27Kip1 ve p57Kip2 genleri DDKH'lerde fazla iken VEH'lerde az ifade düzeyleri gözlenmiştir. c-kit geni ise VEH'lerde DDKH'lerden çok daha fazla ifade düzeylerine sahiptir. Sıçanlarda yapılan balon hasarından sonra izole edilen damar duvarı dokusunda mir 221 ve miRNA222'nin ifade düzeyinin arttığı (upregüle olmaktadır) görülmüştür. Mir 221 ve miRNA222 bu hücrelerde farklı etki göstermekte ve upregüle olduğunda neointimal yapıyı artırırken endotelizasyonu azaltmaktadır. Bu veriler sonucunda mir 221 ve miRNA222'nin vasküler sistemde hücreye özgü etki gösterdiği görüşü ileri sürülmüştür (9).

MiRNA221 ve miRNA222'nin hücre döngüsünde ve fonksiyonundaki etkileri nedeniyle sadece hedef gen ve mRNA düzeyinde değil farklı yapılarla olan ilişkisi de ilgi çeken bir araştırma konusudur. Rippe ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada mir 221 ve miRNA222'nin Endotel Nitrik Oksit Sentetaz (eNOS) yoluyla VEH'lerde apoptosis ve inflamasyon üzerindeki etkisini araştırmışlardır (152). eNOS

düzeyindeki artışın mir 221 ve miRNA222 ifade düzeyinde azalmaya neden olduğu bunun da p27Kip1 düzeyinde artışa neden olabileceği saptanmıştır. Vasküler disfonksiyonu gelişiminin altta yatan mekanizmanın nedenlerinden birinin de mir 221 ve miRNA222'nin düzeyinde azalmanın yarattığı anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkinin olabileceğini ileri sürmüşlerdir (152).

ApoE'nin lipid metabolizması üzerine olan etkisinin yanında DDKH'lerinin proliferasyonunu engelleyerek de kardiyovasküler hastalık riskini azaltabileceği görüşü desteklenmektedir (153). Kathopalli ve arkadaşlarının 2013'de yaptığı araştırmada ApoE'nin bu özelliğinin miRNA221 ve miRNA222 ifade düzeyinde azalmaya neden olmasından kaynaklanabileceği gösterilmektedir (11). İzole edilmiş DDKH ile yapılan bu çalışmada mediuma serum olarak ApoE3 eklenmiş, hücrelerin mir 221 ve miRNA222 ve p27Kip1 ifade düzeyleri ölçülmüştür. Yapılan analizler sonucunda ortama ApoE3 eklenen grupta mir 221 ve miRNA222 düzeylerinde istatistiksel açıdan azalma belirlenirken p27Kip1 seviyesinde artış gözlenmiştir. Sonuç olarak DDKH'lerinin çoğalmasının ve göçlerinin azaldığı saptanmıştır (11). MiRNA'ların hedef genleri ile etkileşimi bile son derece hassas ve karmaşıkken, kendi hedefi olmayan proteinlerin translasyonlarındaki etkisinin de olduğunun belirlenmesi moleküler çalışmalara farklı ve yeni boyutlar kazandırmaktadır.

Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic=ROC) ismi, doğru radyo sinyallerini gürültüden ayırt etmeye yarayan bir radar teriminden türetilmiştir. Bu yöntem testin ayırt etme gücünün belirlenmesinde, çeşitli testlerin etkinliklerinin kıyaslanmasında, uygun pozitiflik eşiğinin belirlenmesinde, laboratuvar sonuçlarının kalitesinin izlenmesinde, farklı uygulayıcıların etkinliklerinin kıyaslanması ve özelliklerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. ROC eğrisi x ekseninde 'duyarlılık' (yanlış negatiflik) y ekseninde ise 'seçiciliği' (yanlış pozitiflik) temsil eden ordinatlar yardımıyla hazırlanır. İkili sınıflandırma sistemlerinde ayırım eşik değerinin farklılık gösterdiği durumlarda, hassasiyetin kesinliliğe olan oranıyla ortaya çıkmaktadır. Tanı testi ne kadar iyi ise eğri o kadar yukarıya ve sola doğru kayar. Böyle bir eğri çizildikten sonra, eğrinin altında kalan alan Eğrinin Altında Kalan Alan (Area Under Curve =AUC) olarak tanımlanmaktadır. AUC değeri ne kadar yüksek ise, tanı testi o kadar iyi bir ayırım yeteneğine sahip olduğu düşünülmektedir. AUC değeri 0.975 üzerindeki bir analiz mükemmel sayılmaktadır. AUC'nin 0.5'den farklı olup olmadığı istatistiksel olarak test edilmeli ve buna ait p değeri de belirlenmelidir. İki farklı testin AUC

değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ise AUC'si büyük olan test daha fazla ayırım gücüne sahip demektir. Kısaca ROC, doğru pozitiflerin, yanlış pozitiflere olan kesri olarak da ifade edilmektedir.. Tıp alanında tanı ve tedaviye yeni bir boyut kazandırması nedeniyle önem taşıdığı gösterilmiştir (154).

Yapmış olduğumuz çalışmada plazma mikroRNA seviyelerinin ve hasta ve kontrol gruplarında tanı değerini sahip saptamak için MedCalc Programı kullanılarak ROC analizi yapılmıştır (Şekil 4-3). Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında miRNA221 ve miRNA222 ifade düzeylerinin hasta gruplarında eşik değeri olarak değerlendirilebileceği saptanmıştır. Kat değişimi değerlerine göre miRNA221 ifade düzeyinde eşik değeri $\leq -0,783$ (AUC=0,623, p=0,0086), miRNA222'nin eşik değeri $\leq -0,471$ olarak tespit edilmiştir (AUC=0,654, p=0,0006), Hastaların miRNA222 ifade düzeyleri tüm kontrole göre 0,72 kat, miRNA221'de 0,65 kat azalmaktadır (Şekil 4-2A). miRNA221'in ΔC_T için eşik değeri $>-2,61$ olarak belirlenirken (AUC=0,636, p=0,0044). miRNA222'nin eşik değerinin $>-2,98$ olduğu saptanmıştır (AUC=0,667 , p=0,0003).

Biyobelirteçler, hastalıkların teşhis ve tedavisi için kullanılan rehberler olarak tanımlanmaktadır (155). İdeal bir biyobelirteç için sağlanması gereken 3 temel kriter bulunmaktadır. Öncelikle analiz için alınacak örneğin plazma, serum, idrar gibi invaziv olmayan yöntemlerle temin edilmesi gerekmektedir. Analiz edilecek materyalin yarılanma ömrünün uzun olması, analiz yapılana kadar geçen süreden etkilenmemesi ve yanlış veri elde edilmesini önleyen ikinci kriterdir. Uygulanacak analizin güvenilirliğinin yüksek olması ve hızlı sonuç alınabilecek yöntemle sahip olması son kriterdir (155). Günümüzde tıp alanında en yaygın olarak kullanılan biyobelirteçler polipeptidler ve proteinlerdir. Kardiyovasküler hastalık ve biyobelirteç denince ilk akla gelen troponin ise ancak infarktüs geçirildikten sonra saptanılmaktadır. Bu alanda duyarlılığı ve seçiciliği yüksek ideal biyobelirteçlerin bulunması hayati risk oluşmadan hastalığın patogenezi hakkında klinisyenlere rehberlik edebilecektir (156). Son yıllarda dolaşımdaki miRNAların aterosklerozun neden olduğu hastalıklarda, gerek tanısal gerekse terapötik uygulamalar için yeni ve potansiyel biobelirteçler olabileceği görüşü bilim dünyasında taraftar toplamaktadır. Başta kanser olmak üzere kardiyovasküler hastalıkların tanı ve tedavisinde biyobelirteç adayı olabilecek miRNAlar üzerinde yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Ateroskleroz ile ilişkili olduğu düşünülen miRNAlar ve hedef genlerinin, aterosklerozun moleküler tanısındaki rolünün

araştırıldığı sınırlı vakaların olduğu az sayıdaki çalışmada, biyobelirteç adayı olabilecek miRNA'ların varlıkları gösterilmiştir (157).

Plazma miRNA122a miRNA ların ΔC_T ve kat değişimi değerlerine ile TG düzeyleri arasında ilişkiyi göstermek için doğrusal regresyon analizi yapılmış ve miRNA122a ΔC_T seviyesi ile TG düzeyi arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (kat sayısı=131,55±11,01, p=0,046, %95CI 109,78-153,32); kat değişimi verileri ile anlamlılığa yakın bir ilişki gözlenmiştir (kat sayısı=149,47±6,34, p=0,059, %95CI 136,92-165,01) (Tablo 4-15, Şekil 4.8). TG düzeyi ile ilişkili olduğu belirlenen miRNA122a ifade düzeyi TG düzeyi 200mg/dl'nin altında , 200-399mg/dl ve 400mg/dl'nin üstünde olan grupların mirRNA 122a ifade seviyeleri regresyon analizleri ve ikili bağımsız örneklem verileri ise student t test analizi ile incelenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda miRNA122a ifade düzeyinin TG seviyesinin 400mg/dl üzerinde olma riskini 4,22 kat artırdığı saptanmıştır (kat sayısı=1,440±0,696, p=0,039, %95CI 1,079-16,514). Ayrıca TG düzeyi 400mg/dl'nin üstünde olan katılımcıların miRNA122a ifade düzeylerinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak az olduğu belirlenmiştir (ΔC_T ; p=0,008, kat değişimi ; p=0,009) (Tablo 4-16).

VLDL düzeyleri ve miRNA ların ΔC_T ve kat değişimi değerleri arasında ilişkiyi gösterebilmek için doğrusal regresyon analizi yapılmıştır. MiRNA122a ΔC_T seviyesi ve VLDL düzeyi arasında (kat sayısı=26,01±2,14, p=0,029, %95CI 21,76-30,26) ve kat değişimi verileri ile arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (kat sayısı=29,84±1,23, p=0,038, %95CI 27,40-32,29) (Tablo 4-17, Şekil 4.9). Plazma VLDL düzeyi ile ilişkili olduğu belirlenen miRNA122a ifade düzeyi regresyon analizleri ve ikili bağımsız örneklem verileri ise “student t test” analizi ile incelenmiş ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4-18).

Karaciğer, kolesterol ve lipoprotein metabolizmasında ana düzenleyici olarak görev yapmaktadır. miRNA 122 karaciğerdeki hepatosit hücreleri tarafından en fazla sentezlenen mikroRNadır. MiRNA 122, karaciğerden sentezlenen tüm miRNAların %70'ini oluşturduğu belirlenmiş ve bu nedenle karaciğere özgü miRNA olarak tanımlanmaktadır (158). MiRNA 122'nin lipid metabolizmasındaki rolü Esau ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan araştırma ile gösterilmiştir (159).

MiRNA122 susturulması için antisense oligonükleotid kullanılan bu çalışmada, miRNA 122 inhibisyonunda hepatik yağ asidi oksidasyonun arttığı ve kolesterol sentezinin azaldığı gösterilmiştir. Buna ek olarak miRNA 122 inhibisyonun total kolesterol düzeyinde % 25-35 azalmaya neden olarak buna bağlı LDL ve HDL düzeylerinde değişimlere neden olduğu da belirlenmiştir. miRNA 122 inhibisyonun hangi genler üzerine etkisinin gösterilmesi ile ilginç sonuçlar elde edilmiştir. miRNA 122 ana hedef genlerinin; glikoz homeostazis ve Aldolase A ve sitrat sentetaz gibi Krebs döngüsü enzim genleri olduğu bilinmektedir (92). Hepatositlerde miRNA 122 düzeyi azaldığında hedef geni olmamasına rağmen 3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA (HMGCoA) reduktaz, HMGCoA Sentetaz, 7-dehydrokolesterol redüktaz (DHCR7) genlerinin de azaldığı tespit edilmiştir. miRNA 122 ifadesi artırıldığında bu genlerin de ifade düzeylerinin de artması miRNA 122'nin henüz anlaşılmayan hücre içi yollar ile lipid metabolizmasını etkilediğini düşündürmektedir. Ayrıca miRNA 122 inhibisyonun hiçbir toksik etki göstermeden kolesterol düzeyini azaltması yeni bir kolesterol tedavi adayı olabileceği izlenimi yaratmıştır (159).

Tüm kontrole göre ifade düzeyleri incelendiğinde ($LN[2^{(-\Delta\Delta C_T)}]$) miRNA143'de 0,29 kat azaldığı ancak miRNA145'in 0,05 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 4-2A). $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ değişimi incelendiğinde ise miRNA143'de 0,76 kat azaldığı, miRNA145 1,05 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4-2B). saptanmıştır. MikroRNAların ifade düzeyleri internal kontrol (SNORD61, SNORD68, U6) ile kıyaslandığı ΔC_T sonuçları değerlendirilmiş ve miRNA145 -2,82, miRNA143 -0,27 kat azaldığı saptanmıştır (Şekil 4-2C). MirRNA143ve miRNA145 kümesi, kardiyak transkripsiyonel faktörlerin düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır (93). Bu küme miRNA ile özellikle aterosklerozun patogeneğinde etkin rol aldığı ileri sürülen DDKH proliferasyonu ve farklılaşması üzerinden etkili olduğu düşünülmektedir (12). Cheng ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış olduğu araştırmada normal damar duvarında mir 145'in bolca bulunduğunu ancak neointimal lezyon oluşmuş örneklerden alınan DDKH kültüründe çok az bulunduğu (downregüle olduğunu) belirlenmiştir (160). mir 145'in hedef geni olan Kruppel-benzeri faktör (KLF5) üzerinden DDKH hücrelerinin farklılaşmasında etkili olduğu düşünülmektedir. KLF5 ifadesinin miRNA145 ile baskılanması sonucunda DDKH farklılaşma belirteci genleri olan Düz Kas Alfa Aktin, Kalponin, Düz Kas-Miyosin Ağır Zincir genlerinin ifade düzeyinin arttığı belirlenmiştir. (160). MiRNA145'in DDKH için fenotipik marker olduğu savını ileri süren Zang ve

arkadaşları (2016) damar hasarlarında gösterdikleri yüksek etki nedeniyle neonatal lezyon formasyonuna sebep olduğunu tespit etmişlerdir (161). Wei ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmada miRNA143 ve miRNA145'in transkripsiyonel hedefleri olan çeşitli genlerin ifade düzeyleri ile olan ilişkisi araştırılmıştır (162). Damar hasarı olduğunda serum cevap faktörü (Serum respond factor), miyokardin, NK2 transkripsiyon faktörünün miRNA143 ve miRNA145 ifade düzeyi ile paralel olarak azaldığını göstermişlerdir. MiRNA143 ve miRNA145 ifadesi arttığında bir onkogen olan KLF4 düzeyinin azaldığını ve DDKH farklılaşmasının artarken, hücrelerin çoğalması ve göçünün baskılandığını saptamışlardır. Ayrıca miRNA143 ve miRNA145 ifadesi susturulduğunda DDKH göçünün de arttığı da rapor edilmiştir (162).

MiRNAların ifade kontrol örneklerine göre ifade düzeyleri incelendiğinde miRNA133a 0,08 kat artarken miRNA133b'de 0,02 kat azaldığı belirlenerek Şekil 4-2A'da gösterilmiştir. $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değişimi incelendiğinde ise miRNA133b'de 0,98 kat azaldığı, miRNA133a'nın ise 1,16 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4-2B). ΔCt sonuçlarına göre miRNA133a 1,22, miRNA133b 1,5 arttığı saptanmıştır (Şekil 4-2C). MiRNA 133a ve miRNA133b aynı miRNA kümesinde bulunan, iskelet ve kardiyak kasların patofizyolojisinde çok önemli rolleri olan miRNAlar olarak tanımlanmaktadır (93). Torella ve arkadaşlarının (2011) yaptığı in vivo ve in vitro araştırmalarda olan çalışmada; miRNA133'ün DDKH için potansiyel inhibitör görevi yaptığını saptamışlardır. Bu etkinin miRNA133a ve miRNA133b hedef geni olan KLF4 ve Sp-1 transkripsiyon faktörü inhibisyonu ile hücre proliferasyonunu azaltmasından kaynaklandığını saptamışlardır (163). Wen ve arkadaşlarının 2014'de yaptıkları çalışmada miRNA133a'nın kardiyak hipertrofi için biyobelirteç olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yapılan bu çalışmada Sol Ventrikül Hipertrofisi (SVH) olan hastalarda miRNA133a düzeyinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşük olduğunu tespit etmişlerdir (13). Embriyonik dönemde miyokard hücrelerinde miRNA profilini inceledikleri araştırmada McCarthy ve arkadaşları (2007) miRNA 133a'nın miyokard farklılaşmasında düzenleyici olarak görev yaptığı gözlemlenmiştir (164). Fare embriyolarında yaptıkları bu araştırmada miRNA133a'nın miyokard hücrelerinin farklı gelişim safalarında farklı ifade düzeylerinde olduğunu gösterilmiştir. Miyokard hücreleri çoğalırken miRNA133a'nın ifadesi %50 artarken, hücreler farklılaşırken ifade düzeyinin 2 kat arttığı açıklanmıştır. Bu çalışma sonucunda miRNA133a'nın miyokard hücrelerine özgü bir miRNA olduğu ve farklı gelişim dönemlerinde hücrelerin

gelişimine özgü ifade düzeylerinde bulunabileceği görüşü ileri sürülmüştür (164). Fichtscherer ve arkadaşlarının (2010) koroner arter hastaları üzerinde yaptığı çalışmada kardiyak kasları üzerinde etkili miRNA133a'nın hasta grubunda daha yüksek gözlenmiştir. Hastaların troponin seviyesi ile kontrol edilmiş ve düzeyinde yükselme izlenmediği için kalp kas hücrelerinde yıkım olmadığı sonucuna varılmıştır. Kas yıkımı olmadığı halde hastalarda oluşan hasarın hücre proliferasyonunu KLF4 ve Sp1 genlerini baskılayarak inhibe eden miRNA133a düzeyindeki artışa bağlı olabileceği görüşü ileri sürülmüştür (165).

MiRNA499a ifade düzeyinin kat değişimine göre 0,21 kat (Şekil 4-2A), $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değişimi incelendiğinde ise miRNA499a 1,33 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4-2B). MiRNAların ifade düzeyleri internal kontrol ile kıyaslandığı ΔCt sonuçlarının miRNA499a'de 1,82 kat arttığı saptanmıştır (Şekil 4-2C). Wang ve arkadaşlarının (2010) akut miyokard infarktüsü (AMİ) geçirmiş hastalarında ve hayvan modellerinde yapmış olduğu çalışmada miRNA499'un kalp kasına özgü bir miRNA olduğunu göstermişlerdir (166). Bu çalışmada kapsamında tavşan ve sıçanların farklı dokuları üzerinde ve array analizleri yapmışlar sonuç olarak miRNA208 ve miRNA499a'nın sadece kalp kası dokusuna özgü olduğu belirlemişlerdir. AMİ modeli oluşturulmuş sıçanlarda farklı saatlerde miRNA499a'nın düzeyleri izlendiğinde ise 1-3. saatler arasında zirve yaptığı gözlenmiştir. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmada plazma örnekleri ile yapılan GZ-PZR analizinde miRNA499a'nın seviyesinde anlamlı artış gözlenirken yapılan ROC analizinde miRNA499a'nın AMİ için biyobelirteç olabileceği sonucuna varılmıştır (AUC=0,822) (166). Bu verileri destekleyen bir çalışma ise Adachi ve arkadaşları (2010) tarafından AMİ geçirmiş hastalarda yapılmıştır (167). Biyobelirteç adayı olarak miRNA499a kullanımının GZ-PZR ile araştırıldığı bu çalışmada AMİ geçiren olgularda miRNA499a'nın ifade düzeyinin diğer tüm miRNAlardan daha fazla yüksek olduğu saptanmıştır (167). Chua ve arkadaşları (2015), miRNA499a'nın etkisinin hedef genlerinden Kalcineurin A genini inhibe etmesinden dolayı p53 genin aktive olduğunu ve sonuç olarak apoptosisin artışına neden olabileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir (168).

Çalışmamızda miRNA494 ifade düzeyi kat değişimine göre 0,20 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 4-2A). $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değişimi incelendiğinde ise miRNA494 1,23 kat arttığı gözlenmiştir (Şekil 4-2B). MikroRNAların ifade düzeyleri internal kontrol ile

kıyaslanarak ΔC_t sonuçlarına göre değerlendirildiğinde miRNA494 5,02 kat azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4-2C). MiRNA494 inhibisyonunun hücrelerin apoptotik yollarını bloke ettiği tespit eden Welten ve arkadaşları (2014), miRNA494'ün neovaskülarizasyon için yeni bir tedavi alternatifi olabileceği görüşünü ileri sürmüştür. MiRNA494 ifade düzeylerinin kardiyak miyosit hücrelerinin hem çoğalmasında hem de hayatta kalmasını etkileyen bir faktör olduğu düşünülmektedir. MiRNA494'ün hücre proliferasyona etkisinin miyoblastlara bulunduğu ancak arteryal endotel hücreleri üzerinde etkili olmadığı gözlenen bu araştırmada farklı hücrelerde miRNA494'ün farklı hücre içi yollarını uyararak dokuya özgü etki gösterdiği sonucuna varılmıştır(169).

SONUÇ OLARAK DİYE BİLİRİZ Kİ;

Yapmış olduğumuz risk analizlerinde düşük HDL değerine sahip olmanın kardiyovasküler risk ile ilişkili olduğu belirlenmiştir ve [Kolesterol]/[HDL] oranının ateroskleroz riskini artırdığı gözlenmiştir.

Küçük boyutlu LDL'nin hastalık riskinin artırdığı küçük boyutlu HDL2nin ise bu riski azalttığı saptanmıştır. Ayrıca VKİ'si 27,55 kg/m²'den fazla olan kişilerin daha fazla küçük boyutlu LDL miktarına sahip olduğu da belirlenmiştir.

ApoE genotip frekansları kontrol ve ateroskleroz hasta olguları ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmiştir. E3/E4 genotipine sahip olguların hasta grubunda yüksek olduğu ve ateroskleroz riskini artırdığı, E2/E3 genotipinin ise kontrol grubunda yüksek olduğu ve riski azalttığı gözlenmiştir. Allel frekansları değerlendirildiğinde E2 alleli taşımanın ateroskleroz riskini 10 kat azalttığı gözlenmiştir.

Lipid değerleri incelendiğinde E3/E3 genotipine sahip olguların anlamlı olarak sınır değerlerinin üstünde plazma kolesterol ve LDL düzeylerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kardiyovasküler risk parametresi olan [kolesterol]/[HDL] oranının da E3/E3 genotipinde istatistiksel açıdan yüksek olduğu belirlenmiştir. Allel düzeyindeki değerlendirmelerde E2 allelinin kolesterol değerleri üzerinde olumlu etki gösterdiği E4 allelinin ise negatif etkilediği belirlenmiştir.

MiRNA ifade düzeyleri incelendiğinde miRNA221 ve miRNA221 düzeylerinin ΔC_T ve kat değişimi değerlerine göre karşılaştırılmış ve kontrole göre hasta grubunda bu miRNAların daha az ifade edildiği gözlenmiştir. Bu veriler ışığı altında yapılan ROC analizi yapılmış sonuç olarak miRNA221 ve miRNA221 ifade düzeylerinin eşik değeri olarak değerlendirilebileceği ve ateroskleroz tanısında biyobelirteç adayı olabileceği belirlenmiştir.

Lipid düzeyleri ve miRNAlar üzerinde yapılan incelemelerimizde TG ve VLDL ile plazma miRNA122a ifade düzeyleri arasında ilişki belirlenmiştir. MiRNA122a ifade düzeyinin azalmasının TGve VLDL düzeyinde artışa neden olarak kardivasküler riski artırabileceği tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz veriler kalp hastalıklarında kalıtsal risk faktörün ve eşlik eden hastalıkların önemini gösteren verileri desteklemektedir. Bu çalışmada multifaktöriyel kalıtım özelliği gösteren aterosklerozda aileden miras gelen genetik yapının önemi gösterilirken diabet ve hipertansiyon tanısı almış olmanın ve yüksek kolesterolün ateroskleroz üzerindeki olumsuz etkileri belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler ışığı altında ileride yapacağımız çalışmalarda Sol Ventrikül Hipertrofisine neden olabilecek aday miRNAların saptanılması amaçlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1) 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.
- 2) Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis .*J Am Coll Cardiol.* 2006;47 (8 Suppl):C7-12.
- 3) Isbir T, Yilmaz H, Agachan B, Karaali ZE. Cholesterol ester transfer protein, apolipoprotein E and lipoprotein lipase genotypes in patients with coronary artery disease in the Turkish population. *Clin Genet.* 2003 Sep;64(3):228-34.
- 4) Saumet A, Mathelier A, Lecellier CH. The potential of microRNAs in personalized medicine against cancers. *Biomed Res Int.* 2014:642916.
- 5) Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics.* 2010; 11(7):537-61.
- 6) Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, Condorelli G. miRNA221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy.*Curr Mol Med.* 2012;12(1):27-33.
- 7) Santovito D, Mezzetti A, Cipollone F. MicroRNAs and atherosclerosis: new actors for an old movie. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012; 22(11):937-43.
- 8) Bazan HA, Hatfield SA, O'Malley CB, Brooks AJ, Lightell D Jr, Woods TC. Acute Loss of miR-221 and miR-222 in the Atherosclerotic Plaque Shoulder Accompanies Plaque Rupture. *Stroke,* 2015; 46(11):3285-7.
- 9) Liu X, Cheng Y, Yang J, Xu L, Zhang C. Cell-specific effects of miR-221/22 in vessels: Molecular mechanism and therapeutic application. *J Mol Cell Cardio* 2012; 57: 245-255.
- 10) Xue Y, Wei Z, Ding H, Wang Q, Zhou Z, Zheng S, Zhang Y, Hou D, Liu Y, Zen K, Zhang CY, Li J, Wang D, Jiang X. MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1 α in the progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis,* 2015; 241(2):671-81
- 11) Kothapalli D, Castagnino P, Rader DJ, Phillips MC, Lund-Katz S, Assoian RK. Apolipoprotein E-mediated cell cycle arrest linked to p27 and the Cox2-dependent repression of miRNA221/22. *Atherosclerosis* 2013; 227: 65-71.

- 12) Liu X, Cheng Y, Yang J, Qin S, Chen X, Tang X, Zhou X, Krall TJ, Zhang C. Flank sequences of miR-145/143 and their aberrant expression in vascular disease: mechanism and therapeutic application. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(6):e000407.
- 13) Wen P, Song D, Ye H, Wu X, Jiang L, Tang B, Zhou Y, Fang L, Cao H, He W, Yang Y, Dai C, Yang J. Circulating MiR-133a as a biomarker predicts cardiac hypertrophy in chronic hemodialysis patients. *PLoS One.* 2014 Oct 14;9(10):e103079.
- 14) Fernández-Hernando C, Moore KJ. MicroRNA modulation of cholesterol homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(11):2378-82.
- 15) Vickers KC, Remaley AT. MicroRNAs in Atherosclerosis and Lipoprotein Metabolism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17(2): 150-155.
- 16) Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2008 Sep 1;79(4):581-8.
- 17) Paç M, Akçevin A, Aka SA, Büket, S, Sarıoğlu T. *Kalp ve Damar Cerrahisi.* İstanbul: MN Medikal & Nobel Tıp Kitabevi; 2004: 1-77.
- 18) Erdil F. Elbaş NÖ. *Cerrahi Hastalıkları Hemşireliği.* Ankara: Aydoğdu Kitabevi; 2001: 297-342.
- 19) Sarıoğlu T. Kardiyak anatominin sistematik segmental analizi. *GKD Cer. Dergisi* 1991;1:42-48.
- 20) Wilcox BR, Anderson RH. Analytic description of congenitally malformed hearts. *Surgical Anatomy of the Heart.* Raven Press, New York, 1985;5: 1-14.
- 21) Wilcox BR, Anderson RH. *Surgical anatomy of the heart.* In: *Glenn's Thoracic and Cardiovascular Surgery [ed. By Baue AE et al.]*, USA: Preutice-Hall International Inc, 1996:1535-1548.
- 22) Mesut R. *Kardiyovasküler anatomi. Kalp ve Damar Cerrahisi Cilt 1 [ed. Duran E.], Türkiye: Çapa Tıp Kitabevi, 2004:37-54.*
- 23) Mill MR, Wilcox BR, Anderson RH. Surgical anatomy of the heart. In: *Cardiac Surgery in the Adult [ed. By Edmunds LH]* NY etc: McGraw-Hill, 1997:35-57.
- 24) Smith EE, Guyton AC, Manning RD, White RJ. Integrated mechanisms of cardiovascular response and control during exercise in the normal human. *Prog Cardiovasc Dis* 1976;18:421.

- 25) Sonnenblick EH, Braunwald E, Morrow AG. The contractile properties of human heart muscle: Studies on myocardial mechanics of surgically excised papillary muscles. *J Clin Invest* 1965;44: 966-977.
- 26) Yorgancıoğlu AC, Tokmakoğlu H. Kardiyovasküler fonksiyon ve fizyoloji. *Kalp ve Damar Cerrahisi [ed. Paç M ve ark.]*, Türkiye: MN Medikal ve Nobel, 2004: 21-32.
- 27) Lorell BH, Carabello AB. Left ventricular hypertrophy. Pathogenesis, detection and prognosis. *Circulation* 2000;102:470-479.
- 28) Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999;79:216-261.
- 29) Borg TK, Burgess ML. Holding it all together: organization and functions of the extracellular matrix of the heart. *Heart Failure* 1993;8:230-238.
- 30) Kuppuswamy D, Kerr C, Narishige T, et al. Fourth association of tyrosine-phosphorylated c-Src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium. *J Biol Chem.* 1997;272:4500–4508.
- 31) Sadoshima JI, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. *Circ Res.* 1993;73:413– 423.
- 32) Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick hearts cells. *Am J Physiol.* 1990;258:H610–H618.
- 33) Kuster DW, Mulders J, Ten CAte FJ, Michels M, Ros Remedios CG, da Costa Martins PA, Van der Velden J, Oudejans CB. MicroRNA transcriptome profiling in cardiac tissue of hypertrophic cardiomyopathy patients with MYBPC3 mutations. *J Mol Cell Cardiol* 2013;65:59-66.
- 34) Liao XH, Wang N, Zhao DW, Zheng DL, Zheng L, Xing WJ, Zhou H, Cao DS and Zhang TC. NF- κ B (p65) negatively regulates myocardin-induced cardiomyocyte hypertrophy through multiple mechanisms. *Cell Signal* 2014;26:2738-2748.
- 35) Drawnel FM, Archer CR, Roderick HL. The role of the paracrine/autocrine mediator endothelin-1 in regulation of cardiac contractility and growth. *Br J Pharmacol.* 2013 168(2):296-317
- 36) Lorenz CH, Walker ES, Morgan VL, Normal human right and left ventricular mass, systolic function, and gender differences by cine magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Res.* 1999;1:7–21.

- 37) 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;57:450-458.
- 38) Levy D, Murabito JM, Anderson KM, et al. Echocardiographic left ventricular hypertrophy: clinical characteristics: the Framingham Heart Study. *Clin Exp Hypertens*. 1992;14:85–97.
- 39) Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, et al. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:1454 –1459.
- 40) Gerszten Re, Rosenzweig A. Coronary Atherosclerosis In: *Principles Of Molecular Medicine*. Chicago: Humanna Press Edited By Jamesson JI; 1998.
- 41) Wang T, Palucci D, Law K, Yanagawa B, Yam J, And Butany J. Atherosclerosis: Pathogenesis And Pathology. *Diag Histopathol*. 2012;18:461-467.
- 42) Bonetti Po, Lerman Lo, Lerman A. Endothelial Dysfunction: A Marker Of Atherosclerotic Risk. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:168-175.
- 43) Stevens T, Rosenberg R, Aird W, Et Al. Nhlbi Workshop Report: Endothelial Cell Phenotypes In Heart, Lung And Blood Disease. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 281:1422.
- 44) Seidman Ma, Mitchell Rn, Stone Jr. Pathophysiology Of Atherosclerosis Chapter 12, 221-237, In *Cellular And Molecular Pathobiology Of Cardiovascular Disease*, Elsevier. 2014.
- 45) Weber C, And Noels H. Atherosclerosis: Current Pathogenesis And Therapeutic Options. *Nat Med*. 2011; 17: 1410-1422.
- 46) Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook Of Cardiovascular Medicine*. 2005: 925-1050
- 47) Libby P. Inflammation In Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 2045-2051.
- 48) Zengin H. Ateroskleroz Patogenezi. *J Exp Clin Med*. 2012;29:101-106.
- 49) Van den Borne P, Quax PH, Hofer IE, Pasterkamp G. The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease. *Biomed Res Int*. 2014;2014:893106.
- 50) Fuster V, Fayad AZ, Badimon JJ. Acute Coronary Sendromes: Biology. *Lancet*, 1999; 353: 5-9.
- 51) Koeng W. Atherosclerosis invoves more than lipid: Focus on inflammation. *Eur Heart J*, 1999; 19-26.

- 52) Erol Ç. *Klinik Kardiyoloji (Nobel Tıp)*, 2004; 3: 9-15.
- 53) Farugi RM, DiCorleto PE. Mechanisms of Monocyte Recruitment and Accumulation. *Bri Heart J*, 1993; 69: 19-29.
- 54) Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 1994;89(5):2462-78.
- 55) Hasson GK Inflammation, Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685.
- 56) Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002 ;105(9):1135-43.
- 57) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362(6423):801-809.
- 58) Wexler L, Brundage B, Crouse J, Detrano R, Fuster V, Maddahi J, Rumberger J, Stanford W, White R, Taubert K. Coronary artery calcification: pathophysiology, epidemiology, imaging methods, and clinical implications. A statement for health professionals from the American Heart Association. Writing Group. *Circulation*, 1996; 94(5):1175-92.
- 59) Dominiczak MH, Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem*. 2011; (Pt 6):498-515.
- 60) Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med*. 2014; 52(12):1695-727.
- 61) Eberlé D, Luk FS, Kim RY, Olivas VR, Kumar N, Posada JM, Li K, Gaudreault N, Rapp JH, Raffai RL Inducible ApoE gene repair in hypomorphic ApoE mice deficient in the low-density lipoprotein receptor promotes atheroma stabilization with a human-like lipoprotein profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(8):1759-67.
- 62) Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984;25(12):1277-94.
- 63) Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res*. 2009; 50 Suppl:S183-8.

- 64) McLean JW, Elshourbagy NA, Chang DJ, Mahley RW, Taylor JM. Human apolipoprotein E mRNA. cDNA cloning and nucleotide sequencing of a new variant. *J Biol Chem.* 1984 25;259(10):6498-504.
- 65) Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci* 1985 ; 82(10):3445-9.
- 66) Reardon CA, Paik YK, Chang DJ, Davies GE, Mahley RW, Lau YF, Taylor JM. Cloning and expression of the human apolipoprotein E gene. *Methods Enzymol.* 1986;128:811-23.
- 67) Giau VV, Bagyinszky E, An SS, Kim SY. Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015;11:1723-37.
- 68) Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 1988;8(1):1-21.
- 69) Lenzen HJ, Assmann G, Buchwalsky R, Schulte H. Association of apolipoprotein E polymorphism, low-density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease. *Clin Chem.* 1986; 32(5):778-81.
- 70) Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004; 16;431(7006):350-5.
- 71) Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;23;116(2):281-97.
- 72) Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 2005; 17;433(7027):769-73.
- 73) Benjamin P. Lewis, I-hung Shih, Matthew W. Jones-Rhoades, David P. Bartel, Christopher B. Burg. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, 2003; 115:7:787-798.
- 74) Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res.* 2011; 717(1-2):85-90.
- 75) Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci.* 2010 ;101(11):2309-15.
- 76) Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004; 10(12):1957-66.

- 77) Barca-Mayo O, Lu QR. Fine-Tuning Oligodendrocyte Development by microRNAs. *Front Neurosci.* 2012; 6: 6-13.
- 78) Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003 ;25;425(6956):415-9.
- 79) Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004; 303(5654):95-8
- 80) Krol J, Krzyzosiak WJ. Structural aspects of microRNA biogenesis IUBMB Life, 2004; 56(2):95-100.
- 81) Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 2005; 123(4):631-40
- 82) Wang Z. MicroRNA: A matter of life or death. *World J Biol Chem.* 2010; 1(4):41-54.
- 83) Karginov FV, Conaco C, Xuan Z, Schmidt BH, Parker JS, Mandel G, Hannon GJ. A biochemical approach to identifying microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci.* 2007; 104(49):19291-6.
- 84) Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003; 115(7):787-98.
- 85) Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103(11):4034-9.
- 86) Nissan T, Parker R. Computational analysis of miRNA-mediated repression of translation: implications for models of translation initiation inhibition. *RNA* 2008; 14(8):1480-91.
- 87) Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM, Peschle C. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102(50):18081-6
- 88) <http://www.genecards.org/>
- 89) Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Human miR-221/222 in Physiological and Atherosclerotic Vascular Remodeling. *Biomed Res Int.* 2015:354517.
- 90) <http://www.mirbase.org/>

- 91) <http://www.ensembl.org/>
- 92) <http://www.mirdb.org/>
- 93) Rangrez AY, Massy ZA, Metzinger-Le Meuth V, Metzinger L. miR-143 and miR-145: molecular keys to switch the phenotype of vascular smooth muscle cells. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011; (2):197-205.)
- 94) Wen P, Song D, Ye H, Wu X, Jiang L, Tang B, Zhou Y, Fang L, Cao H, He W, Yang Y, Dai C, Yang J. Circulating MiR-133a as a biomarker predicts cardiac hypertrophy in chronic hemodialysis patients. *PLoS One*. 2014;9(10):e103079.
- 95) Witt S, Neumann J, Zierdt H, Gebel G, 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):539-457
- 96) Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J, Zhu L, Wu G. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem*. 2014;451:18-24.
- 97) Page K, Guttery DS, Zahra N, Primrose L, Elshaw SR, Pringle JH, Blighe K, Marchese SD, Hills A, Woodley L, Stebbing J, Coombes RC, Shaw JA. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *Plos One*, 2013; 8(10):e77963.
- 98) Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J, Zhu L, Wu G. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem*. 2014; 451:18-24
- 99) Li X, Ben-Dov IZ, Mauro M, Williams Z. Lowering the quantification limit of the Qubit™ RNA HS assay using RNA spike-in. *BMC Mol Biol*. 2015;6:16-19
- 100) Ballerini S, Bellincampi L, Bernardini S, Casciani S, Motti C, Cortese C, Federici G. Apolipoprotein E Genotyping: a comparative study between restriction endonuclease mapping and allelic discrimination with the LightCycler. *Clin Chim Acta*, 2002; 317:71-76
- 101) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001;25(4):402-408.
- 102) Moret I, Sánchez-Izquierdo D, Iborra M, Tortosa L, Navarro-Puche A, Nos P, Cervera J, Beltrán B. Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *Plos One*, 2013; 8(12): e82753.

- 103) Bury J, Vercaemst R, Rosseneu M, Belpaire F. Apolipoprotein E quantified by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*. 1986 Feb;32(2):265-70.
- 104) Hoefner D, Hodel Msd, Brien Jf, Branum El, Sun D, Meissner I and McConnell. Development of rapid quantitative method for LDL subfraction with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin Chemisrty*, 2001 47;2: 266-274.
- 105) Folsom Ar, Eckfeldt Jh, Weitzman S, Ma J, Chambless Le, Barnes Rw, Cram Kb, Hutchinson Rg. Relation Of Carotid Artery Wall Thickness To Diabetes Mellitus, Fasting Glucose And Insulin, Body Size, And Physical Activity. Atherosclerosis Risk In Communities (Aric) Study Investigators. *Stroke*, 1994;25(1):66-73.
- 106) Grundy Sm, Benjamin Ij, Burke Gl, Chait A, Eckel Rh, Howard Bv, Mitch W, Smith Sc Jr, Sowers Jr. Diabetes And Cardiovascular Disease: A Statement For Healthcare Professionals From The American Heart Association. *Circulation*, 1999; 100(10):1134-46.
- 107) Castelli WP. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis*, 1996 Jul;124 Suppl:S1-9. Review.
- 108) Guidelines Subcommittee of the World Health Organization: World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hypertens* 1999; 17:151-83.
- 109) Lotufo PA, Pereira AC, Vasconcellos PS, Santos IS, Mill JG, Bensenor IM. Resistant hypertension: risk factors, subclinical atherosclerosis, and comorbidities among adults-the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2015; 17(1):74-80.
- 110) Finn AV, Kolodgie FD, Virmani R. Correlation between carotid intimal/medial thickness and atherosclerosis: a point of view from pathology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30(2):177-81.
- 111) MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stamler J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990; 335(8692):765-74.
- 112) Mahley RW, Palaoğlu KE, Atak Z, Dawson-Pepin J, Langlois AM, Cheung V, Onat H, Fulks P, Mahley LL, Vakar F. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J Lipid Res*. 1995; 36(4):839-59.

- 113) Castelli WP, Abbott RD, McNamara PM. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation*, 1983 ;67(4):730-4.
- 114) Wei L, Ebrahim S, Bartlett C, Davey PD, Sullivan FM, MacDonald TM. Statin use in the secondary prevention of coronary heart disease in primary care: cohort study and comparison of inclusion and outcome with patients in randomised trials. *BMJ*. 2005;330(7495):821.
- 115) Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Münster study. *Am J Cardiol*. 1992; 70(7):733-7.
- 116) Winkleby MA, Jatulis DE, Frank E, Fortmann SP. Socioeconomic status and health: how education, income, and occupation contribute to risk factors for cardiovascular disease. *Am J Public Health*. 1992;82(6):816-20.
- 117) Griffin B1, Freeman DJ, Tait GW, Thomson J, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. 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):241-53.
- 118) Hirayama S, Miida T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2012; 414:215-24.
- 119) Anber V, Griffin BA, McConnell M, Packard CJ, Shepherd J. Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis*. 1996;124(2):261-71.
- 120) Griffin BA. Lipoprotein atherogenicity: an overview of current mechanisms. *Proc Nutr Soc*. 1999 Feb;58(1):163-9.
- 121) Goulinet S, Chapman MJ. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17(4):786-96.
- 122) Tiozzo E, Gardener H, Hudson BI, Dong C, Della-Morte D, Crisby M, Goldberg RB, Elkind MS, Cheung YK, Wright CB, Sacco RL, Rundek T. High-density lipoprotein subfractions and carotid plaque: the Northern Manhattan Study..*Atherosclerosis*, 2014; 237(1):163-8.
- 123) Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert

- potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(10):1881-8.
- 124) Shuhei N, Söderlund S, Jauhiainen M, Taskinen MR. Effect of HDL composition and particle size on the resistance of HDL to the oxidation. *Lipids Health Dis.* 2010;9:104.
- 125) Parlesak A, Eckoldt J, Winkler K, Bode CJ, Schäfer C Intercorrelations of lipoprotein subfractions and their covariation with lifestyle factors in healthy men.. *J Clin Biochem Nutr.* 2014; 54(3):174-80.
- 126) Wood RJ, Volek JS, Liu Y, Shachter NS, Contois JH, Fernandez ML. Carbohydrate restriction alters lipoprotein metabolism by modifying VLDL, LDL, and HDL subfraction distribution and size in overweight men. *J Nutr.* 2006; 136(2):384-9.
- 127) Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Császár A, Utermann G. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet.* 1991;49(2):338-49.
- 128) Lenzen HJ, Assmann G, Buchwalsky R, Schulte H. Association of apolipoprotein E polymorphism, low-density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease. *Clin Chem.* 1986; 32(5):778-81.
- 129) Rall SC Jr, Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(15):4696-700
- 130) Schiele F, De Bacquer D, Vincent-Viry M, Beisiegel U, Ehnholm C, Evans A, Kafatos A, Martins MC, Sans S, Sass C, Visvikis S, De Backer G, Siest G. Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis.* 2000;152(2):475-88
- 131) Mannila MN, Mahdessian H, Franco-Cereceda A, Eggertsen G, de Faire U, Syvänen AC, Eriksson P, Hamsten A, van 't Hooft FM. Identification of a functional apolipoprotein E promoter polymorphism regulating plasma apolipoprotein E concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(5):1063-9
- 132) Weggemans RM, Zock PL, Ordovas JM, Pedro-Botet J, Katan MB. Apoprotein E genotype and the response of serum cholesterol to dietary fat, cholesterol and cafestol. *Atherosclerosis.* 2001;154(3):547-55.

- 133) Dong CQ, Luo YG, Dong K, Chen C, Liu Q, Yang TQ. Relationship between apolipoprotein E gene polymorphism with triglyceride level in patients with renal diseases. *Ren Fail.* 2013;35(10):1449-54.
- 134) Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci.* 2006; 31(8):445-54.
- 135) Boer JM, Feskens EJ, Schouten EG, Havekes LM, Seidell JC, Kromhout D. Lipid profiles reflecting high and low risk for coronary heart disease: contribution of apolipoprotein E polymorphism and lifestyle. *Atherosclerosis.* 1998;136(2):395-402.
- 136) Kolovou G, Damaskos D, Anagnostopoulou K, Cokkinos DV. Apolipoprotein E gene polymorphism and gender. *Ann Clin Lab Sci.* 2009; 39(2):120-33. Review.
- 137) Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet.* 1996; 14(1):55-61
- 138) Lehrer S. Possible relationship of the apolipoprotein E (ApoE) epsilon4 allele to prostate cancer. *Br J Cancer.* 1998;78(10):1398.
- 139) Cibeira GH, Giacomazzi J, Aguiar E, Schneider S, Ettrich B, DE Souza CI, Camey S, Caleffi M, Weber B, Ashton-Prolla P, Moriguchi EH. Apolipoprotein E genetic polymorphism, serum lipoprotein levels and breast cancer risk: A case-control study. *Mol Clin Oncol.* 2014;2(6):1009-1015.
- 140) Yencilek F, Yilmaz SG, Yildirim A, Gormus U, Altinkilic EM, Dalan AB, Bastug Y, Turkmen S, Turkan S, Isbir T. Apolipoprotein E Genotypes in Patients with Prostate Cancer. *Anticancer Res.* 2016;36(2):707-11.
- 141) Yaylim I, Bozkurt N, Yilmaz H, Isbir T, Isik N, Arikan S. The apolipoprotein E epsilon 4 allele is not a risk factor for Turkish breast cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;146(1):86-7.
- 142) Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2999-3004
- 143) Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci.* 2008; 105(30):10513-8.

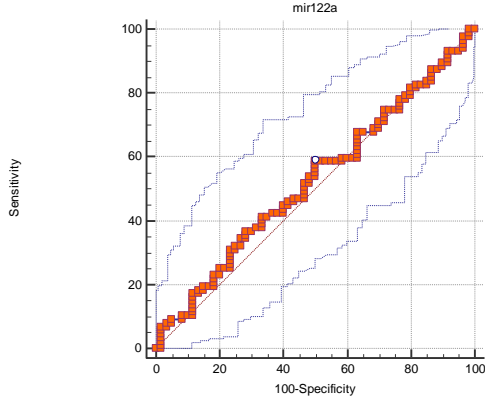
- 144) Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G. MicroRNA and cardiac pathologies. *Physiol Genomics*, 2008; 15;34(3):239-42.
- 145) Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, Mercatanti A, Hammond S, Rainaldi G. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*, 2006;108(9):3068-71
- 146) Chen Y, Banda M, Speyer CL, Smith JS, Rabson AB, Gorski DH. Regulation of the expression and activity of the antiangiogenic homeobox gene GAX/MEOX2 by ZEB2 and microRNA-221. *Mol Cell Biol*. 2010; 30(15):3902-13.
- 147) Dentelli P, Rosso A, Orso F, Olgasi C, Taverna D, Brizzi MF. microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30(8):1562-8.
- 148) le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, Anile C, Maira G, Mercatelli N, Ciafrè SA, Farace MG, Agami R. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J*. 2007 Aug 8;26(15):3699-708.
- 149) Mineta H, Miura K, Suzuki I, Takebayashi S, Amano H, Araki K, Harada H, Ichimura K, Wennerberg JP, Dictor MR. Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer*,1999 Mar 1;85(5):1011-7.
- 150) Togliatto G, Trombetta A, Dentelli P, Rosso A, Brizzi MF. MIRNA221/MIRNA222-driven post-transcriptional regulation of P27KIP1 and P57KIP2 is crucial for high-glucose- and AGE-mediated vascular cell damage. *Diabetologia*, 2011; 54(7):1930-40
- 151) Coleman CB, Lightell DJ Jr, Moss SC, Bates M, Parrino PE, Woods TC. Elevation of miR-221 and -222 in the internal mammary arteries of diabetic subjects and normalization with metformin. *Mol Cell Endocrinol*, 2013; 374(1-2):125-9.
- 152) Rippe C, Blimline M, Magerko KA, Lawson BR, LaRocca TJ, Donato AJ, Seals DR MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation. *Exp Gerontol*, 2012; 47(1):45-51.
- 153) Ishigami M, Swertfeger DK, Hui MS, Granholm NA, Hui DY. Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(4):1020-6.

- 154) Metz CE ROC analysis in medical imaging: a tutorial review of the literature. *Radiol Phys Technol.* 2008;1(1):2-12.
- 155) Min PK, Chan SY. The biology of circulating microRNAs in cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest.* 2015; 45(8):860-74
- 156) Zhang YY, Zhou X, Ji WJ, Shi R, Lu RY, Li JL, Yang GH, Luo T, Zhang JQ, Zhao JH, Jiang TM, Li YM. Decreased circulating microRNA-223 level predicts high on-treatment platelet reactivity in patients with troponin-negative non-ST elevation acute coronary syndrome. *J Thromb Thrombolysis.* 2014; 38(1):65-72
- 157) Pilbrow AP, Cordeddu L, Cameron VA, Frampton CM, Troughton RW, Doughty RN, Whalley GA, Ellis CJ, Yandle TG, Richards AM, Foo RS. Circulating miR-323-3p and miR-652: candidate markers for the presence and progression of acute coronary syndromes. *Int J Cardiol.* 2014;176(2):375-85.
- 158) Girard M1, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol.* 2008;48(4):648-56.
- 159) Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 2006; 3(2):87-98.
- 160) Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA, Huo Y, Delphin ES, Zhang C. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res.* 2009; 17;105(2):158-66.
- 161) Zhang MJ, Zhou Y, Chen L, Wang YQ, Wang X, Pi Y, Gao CY, Li JC, Zhang LL. An overview of potential molecular mechanisms involved in VSMC phenotypic modulation. *Histochem Cell Biol.* 2016;145(2):119-30
- 162) Wei Y, Nazari-Jahantigh M, Neth P, Weber C, Schober A. MicroRNA-126, -145, and -155: a therapeutic triad in atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;3 3(3):449-54.
- 163) Torella D, Iaconetti C, Catalucci D, Ellison GM, Leone A, Waring CD, Boichichio A, Vicinanza C, Aquila I, Curcio A, Condorelli G, Indolfi C. MicroRNA-133 controls vascular smooth muscle cell phenotypic switch in vitro and vascular remodeling in vivo. *Circ Res.* 2011; 109(8):880-93.
- 164) McCarthy JJ, Esser KA. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 2007 ;102(1):306-13.

- 165) Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res.* 2010 ;107(5):677-84.
- 166) Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. Eur Heart J. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J.* 2010; 31(6):659-66.
- 167) Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 2010; 56(7):1183-5.
- 168) Chua SK, Wang BW, Lien LM, Lo HM, Chiu CZ, Shyu KG. Mechanical Stretch Inhibits MicroRNA499 via p53 to Regulate Calcineurin-A Expression in Rat Cardiomyocytes. *PLoS One.* 2016; 11(2):e0148683.
- 169) Welten SM, Bastiaansen AJ, de Jong RC, de Vries MR, Peters EA, Boonstra MC, Sheikh SP, La Monica N, Kandimalla ER, Quax PH, Nossent AY. Inhibition of 14q32 MicroRNAs miR-329, miR-487b, miR-494, and miR-495 increases neovascularization and blood flow recovery after ischemia. *Circ Res.* 2014; 115(8):696-708.

HAM VERİLER

Roc analizleri fold



Variable	miRNA122a	
Classification variable	grup	
Sample size		147
Positive group ^a		87 (59,18%)
Negative group ^b		60 (40,82%)
^a grup = 1		
^b grup = 0		
Disease prevalence (%)		59,2

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,524
Standard Error ^a	0,0484
95% Confidence interval ^b	0,440 to 0,607
z statistic	0,491
Significance level P (Area=0.5)	0,6233

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,08621
95% Confidence interval ^a	0,07126 to 0,08621
Associated criterion	≤0,083177662
95% Confidence interval ^a	≤-1,159972593 to ≤2,220975558
Sensitivity	58,62
Specificity	50,00

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

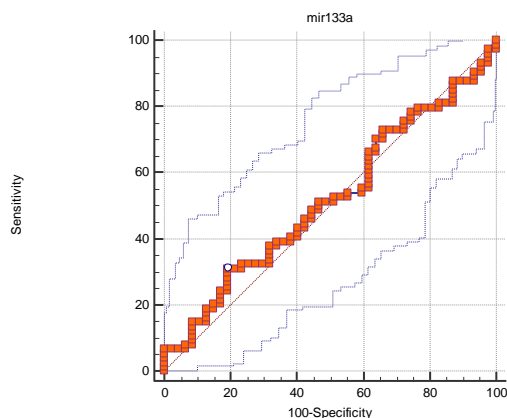
Optimal criterion ^a	≤3,535050621
95% Confidence interval ^b	≤2,876560799 to ≤3,535050621
Sensitivity	100,00
Specificity	1,67

^a Taking into account disease prevalence (59,2%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA133a	
Classification variable	grup	
Sample size		121
Positive group ^a		74 (61,16%)
Negative group ^b		47 (38,84%)
^a grup = 1		
^b grup = 0		
Disease prevalence (%)		61,2

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,518
Standard Error ^a	0,0535
95% Confidence interval ^b	0,425 to 0,610
z statistic	0,338
Significance level P (Area=0.5)	0,7350

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1193
95% Confidence interval ^a	0,08137 to 0,1386
Associated criterion	$\leq -1,039720771$
95% Confidence interval ^a	$\leq -2,41908366$ to $\leq 0,589175103$
Sensitivity	31,08
Specificity	80,85

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

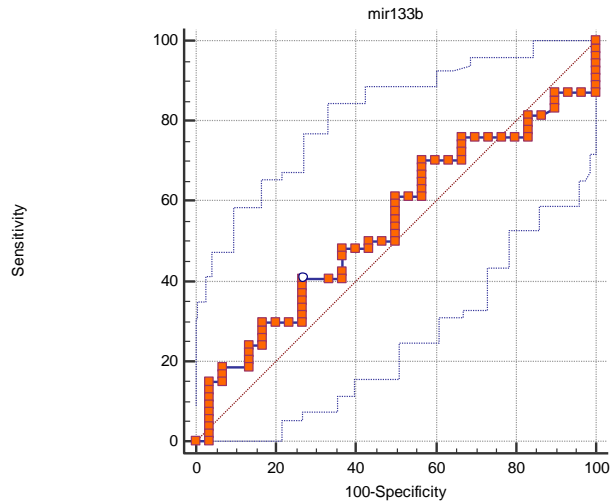
Optimal criterion ^a	$\leq 2,938944046$
95% Confidence interval ^b	$\leq 2,654753702$ to $\leq 2,938944046$
Sensitivity	100,00
Specificity	0,00

^a Taking into account disease prevalence (61,2%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA133b	
Classification variable	grup	
Sample size	84	
Positive group ^a	54 (64,29%)	
Negative group ^b	30 (35,71%)	
^a grup = 1		
^b grup = 0		
Disease prevalence (%)	64,3	

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,540
Standard Error ^a	0,0644
95% Confidence interval ^b	0,428 to 0,650
z statistic	0,627
Significance level P (Area=0.5)	0,5304

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1407
95% Confidence interval ^a	0,1074 to 0,1407
Associated criterion	>0,519860385
95% Confidence interval ^a	>-0,741667483 to >2,606233399
Sensitivity	40,74
Specificity	73,33

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

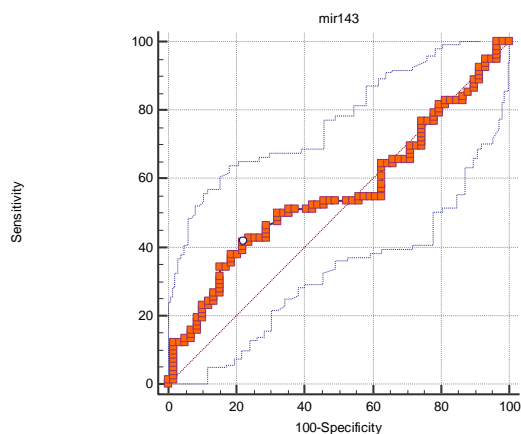
Optimal criterion ^a	≥-3,985596288
95% Confidence interval ^b	≥-3,985596288 to >-3,680611529
Sensitivity	100,00
Specificity	0,00

^a Taking into account disease prevalence (64,3%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA143
Classification variable	grup
Sample size	141
Positive group ^a	82 (58,16%)
Negative group ^b	59 (41,84%)
^a grup = 1	
^b grup = 0	
Disease prevalence (%)	58,2

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,556
Standard Error ^a	0,0487
95% Confidence interval ^b	0,470 to 0,640
z statistic	1,151
Significance level P (Area=0.5)	0,2498

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1943
95% Confidence interval ^a	0,09198 to 0,2704
Associated criterion	$\leq -0,596106575$
95% Confidence interval ^a	$\leq -1,213007566$ to $\leq 0,457477139$
Sensitivity	41,46
Specificity	77,97

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

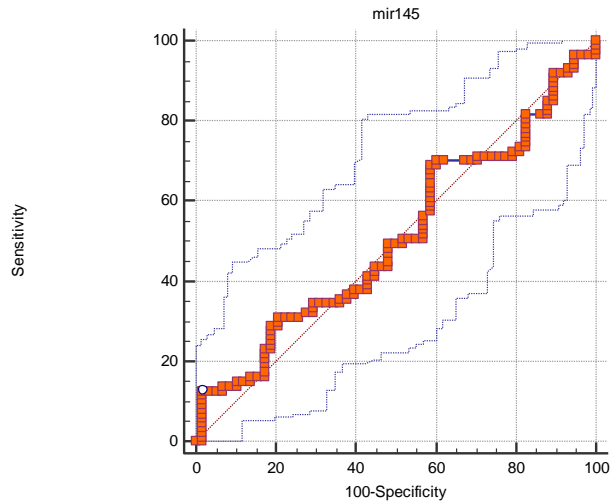
Optimal criterion ^a	$\leq 3,015190235$
95% Confidence interval ^b	$\leq 2,640890758$ to $\leq 3,015190235$
Sensitivity	100,00
Specificity	3,39

^a Taking into account disease prevalence (58,2%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA145	
Classification variable	grup	
Sample size	145	
Positive group ^a	87 (60,00%)	
Negative group ^b	58 (40,00%)	
^a grup = 1		
^b grup = 0		
Disease prevalence (%)	60,0	

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,508
Standard Error ^a	0,0488
95% Confidence interval ^b	0,424 to 0,592
z statistic	0,167
Significance level P (Area=0.5)	0,8678

^a DeLong et al., 1988
^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1092
95% Confidence interval ^a	0,08621 to 0,1092
Associated criterion	≤-1,64969029
95% Confidence interval ^a	≤-1,746730895 to ≤-1,34470553
Sensitivity	12,64
Specificity	98,28

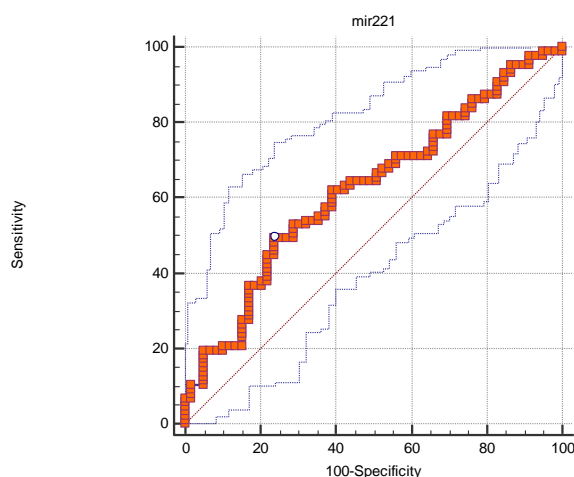
^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

Optimal criterion ^a	≤2,280454224
95% Confidence interval ^b	≤0,554517744 to ≤3,673680057
Sensitivity	96,55
Specificity	5,17

^a Taking into account disease prevalence (60,0%) and estimated costs:
cost False Positive: 1; cost False Negative: 1
cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA221	
Classification variable	grup	
Sample size	146	
Positive group ^a	87 (59,59%)	
Negative group ^b	59 (40,41%)	
^a grup = 1		
^b grup = 0		
Disease prevalence (%)	59,6	

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,623
Standard Error ^a	0,0468
95% Confidence interval ^b	0,539 to 0,702
z statistic	2,629
Significance level P (Area=0.5)	0,0086

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,2570
95% Confidence interval ^a	0,1119 to 0,3808
Associated criterion	$\leq -0,783256314$
95% Confidence interval ^a	$\leq -1,181752537$ to $\leq 0,216779232$
Sensitivity	49,43
Specificity	76,27

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

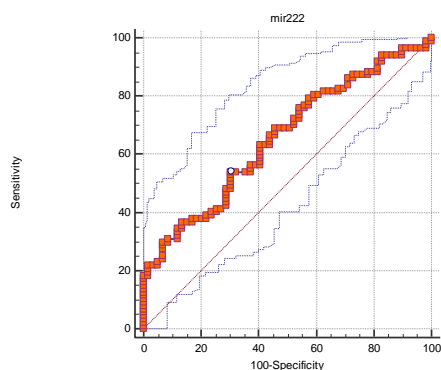
Optimal criterion ^a	$\leq 1,414020248$
95% Confidence interval ^b	$\leq 0,131697964$ to $\leq 4,997591172$
Sensitivity	95,40
Specificity	13,56

^a Taking into account disease prevalence (59,6%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA222	
Classification variable	grup	
Sample size	146	
Positive group ^a	87 (59,59%)	
Negative group ^b	59 (40,41%)	
^a grup = 1		
^b grup = 0		
Disease prevalence (%)	59,6	

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,654
Standard Error ^a	0,0452
95% Confidence interval ^b	0,571 to 0,731
z statistic	3,421
Significance level P (Area=0.5)	0,0006

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,2351
95% Confidence interval ^a	0,1222 to 0,3000
Associated criterion	≤-0,471340083
95% Confidence interval ^a	≤-1,899223275 to ≤0,471340083
Sensitivity	54,02
Specificity	69,49

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

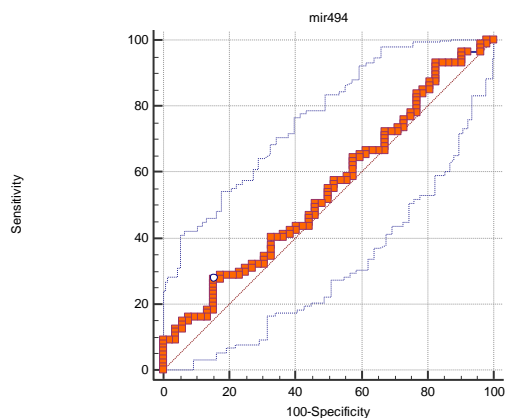
Optimal criterion ^a	≤0,374299478
95% Confidence interval ^b	≤-0,485203026 to ≤1,011994884
Sensitivity	79,31
Specificity	42,37

^a Taking into account disease prevalence (59,6%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA494
Classification variable	grup
Sample size	139
Positive group ^a	87 (62,59%)
Negative group ^b	52 (37,41%)
^a grup = 1	
^b grup = 0	
Disease prevalence (%)	62,6

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,545
Standard Error ^a	0,0504
95% Confidence interval ^b	0,459 to 0,630
z statistic	0,899
Significance level P (Area=0.5)	0,3688

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1220
95% Confidence interval ^a	0,08024 to 0,1425
Associated criterion	>1,164487263
95% Confidence interval ^a	>0,429751252 to >2,155687732
Sensitivity	27,59
Specificity	84,62

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

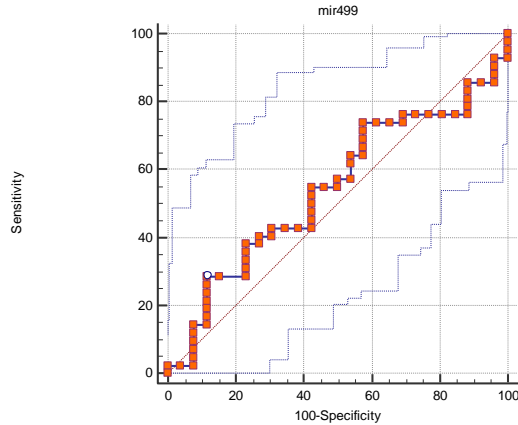
Optimal criterion ^a	>-1,365499946
95% Confidence interval ^b	>-1,705142064 to >0,117835021
Sensitivity	93,10
Specificity	17,31

^a Taking into account disease prevalence (62,6%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA499a
Classification variable	grup
Sample size	68
Positive group ^a	42 (61,76%)
Negative group ^b	26 (38,24%)
^a grup = 1	
^b grup = 0	
Disease prevalence (%)	61,8

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,542
Standard Error ^a	0,0719
95% Confidence interval ^b	0,417 to 0,664
z statistic	0,586
Significance level P (Area=0.5)	0,5579

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1703
95% Confidence interval ^a	0,1245 to 0,1850
Associated criterion	>0,824845145
95% Confidence interval ^a	>0,644626878 to >1,580375572
Sensitivity	28,57
Specificity	88,46

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

Optimal criterion ^a	>-0,561449216
95% Confidence interval ^b	>-1,878428859 to >0,824845145
Sensitivity	73,81
Specificity	42,31

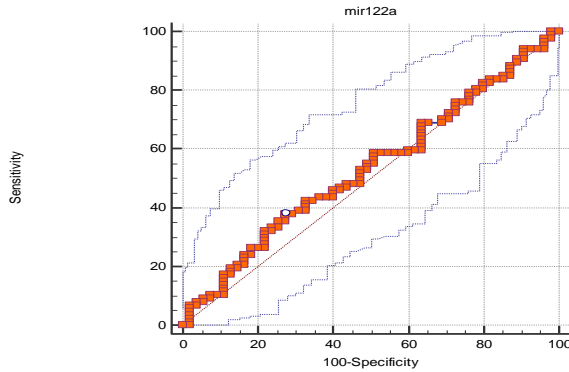
^a Taking into account disease prevalence (61,8%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Roc analizleri ΔCr



ROC curve

Variable	miRNA122a
Classification variable	Grup
Sample size	142
Positive group ^a	87 (61,27%)
Negative group ^b	55 (38,73%)
^a Grup = 1	
^b Grup = 0	
Disease prevalence (%)	61,3

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,534
Standard Error ^a	0,0492
95% Confidence interval ^b	0,448 to 0,618
z statistic	0,688
Significance level P (Area=0.5)	0,4917

^a Hanley & McNeil, 1982

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1066
95% Confidence interval ^a	0,07064 to 0,1258
Associated criterion	>-2,14
95% Confidence interval ^a	>-4,01 to >-0,36
Sensitivity	37,93
Specificity	72,73

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

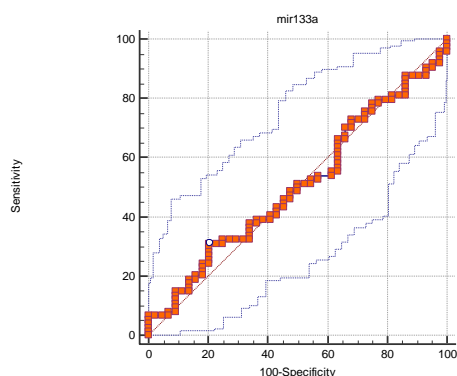
Optimal criterion ^a	>-9,1
95% Confidence interval ^b	>-9,1 to >-7,32
Sensitivity	100,00
Specificity	1,82

^a Taking into account disease prevalence (61,3%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA133a	
Classification variable	Grup	
Sample size		118
Positive group ^a		74 (62,71%)
Negative group ^b		44 (37,29%)
^a Grup = 1		
^b Grup = 0		
Disease prevalence (%)		62,7

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,506
Standard Error ^a	0,0544
95% Confidence interval ^b	0,413 to 0,599
z statistic	0,113
Significance level P (Area=0.5)	0,9101

^a Hanley & McNeil, 1982

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1063
95% Confidence interval ^a	0,07187 to 0,1063
Associated criterion	>2,77
95% Confidence interval ^a	>1,33 to >4,73
Sensitivity	31,08
Specificity	79,55

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

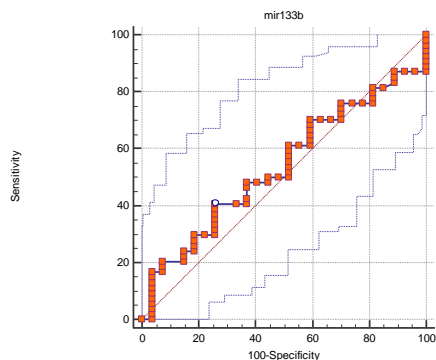
Optimal criterion ^a	≥-2,92
95% Confidence interval ^b	≥-2,92 to >-2,54
Sensitivity	100,00
Specificity	0,00

^a Taking into account disease prevalence (62,7%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA133b
Classification variable	Grup
Sample size	81
Positive group ^a	54 (66,67%)
Negative group ^b	27 (33,33%)
^a Grup = 1	
^b Grup = 0	
Disease prevalence (%)	66,7

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,535
Standard Error ^a	0,0657
95% Confidence interval ^b	0,421 to 0,647
z statistic	0,538
Significance level P (Area=0.5)	0,5908

^a Hanley & McNeil, 1982

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1481
95% Confidence interval ^a	0,09259 to 0,1667
Associated criterion	≤0,58
95% Confidence interval ^a	≤-1,09 to ≤4,76
Sensitivity	40,74
Specificity	74,07

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

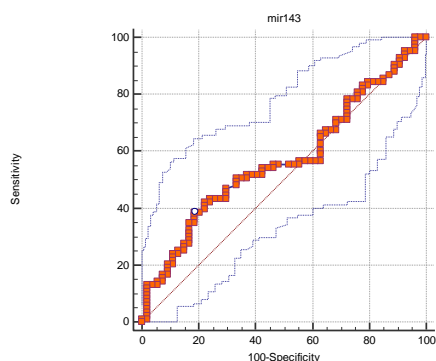
Optimal criterion ^a	≤7,25
95% Confidence interval ^b	≤6,9 to ≤7,25
Sensitivity	100,00
Specificity	0,00

^a Taking into account disease prevalence (66,7%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978)



Variable	miRNA143
Classification variable	Grup
Sample size	137
Positive group ^a	83 (60,58%)
Negative group ^b	54 (39,42%)
^a Grup = 1	
^b Grup = 0	
Disease prevalence (%)	60,6

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,568
Standard Error ^a	0,0492
95% Confidence interval ^b	0,481 to 0,653
z statistic	1,391
Significance level P (Area=0.5)	0,1642

^a Hanley & McNeil, 1982

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,2004
95% Confidence interval ^a	0,08861 to 0,2985
Associated criterion	>0,32
95% Confidence interval ^a	>-0,02 to >2,15
Sensitivity	38,55
Specificity	81,48

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

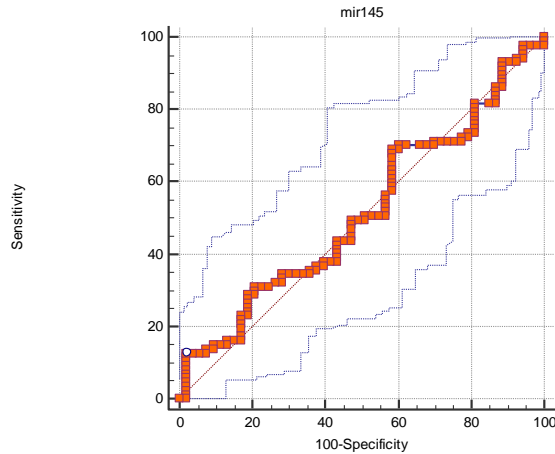
Optimal criterion ^a	>-5,16
95% Confidence interval ^b	>-5,22 to >-0,29
Sensitivity	100,00
Specificity	3,70

^a Taking into account disease prevalence (60,6%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA145	
Classification variable	Grup	
Sample size		140
Positive group ^a		87 (62,14%)
Negative group ^b		53 (37,86%)
^a Grup = 1		
^b Grup = 0		
Disease prevalence (%)		62,1

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,515
Standard Error ^a	0,0500
95% Confidence interval ^b	0,429 to 0,600
z statistic	0,293
Significance level P (Area=0.5)	0,7695

^a Hanley & McNeil, 1982

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1076
95% Confidence interval ^a	0,09130 to 0,1076
Associated criterion	>-0,39
95% Confidence interval ^a	>-0,39 to >-0,39
Sensitivity	12,64
Specificity	98,11

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

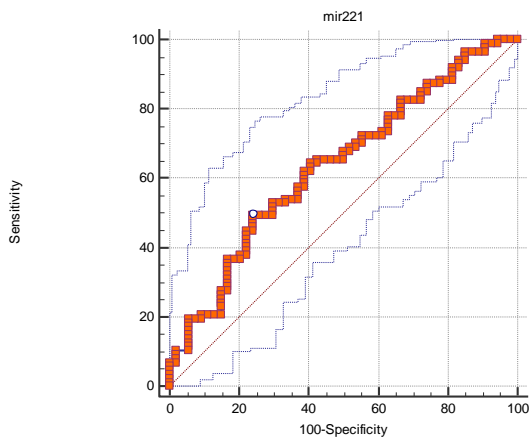
Optimal criterion ^a	>-6,07
95% Confidence interval ^b	>-8,05 to >-3,55
Sensitivity	97,70
Specificity	5,66

^a Taking into account disease prevalence (62,1%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA221	
Classification variable	Grup	
Sample size		141
Positive group ^a		87 (61,70%)
Negative group ^b		54 (38,30%)
^a Grup = 1		
^b Grup = 0		
Disease prevalence (%)		61,7

Area under the ROC curve (AUC)

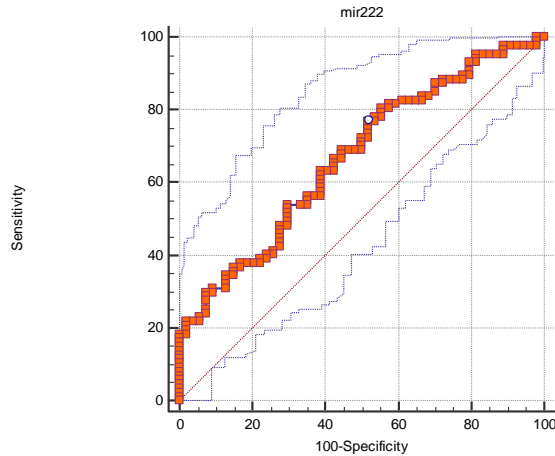
Area under the ROC curve (AUC)	0,636
Standard Error ^a	0,0477
95% Confidence interval ^b	0,551 to 0,715
z statistic	2,849
Significance level P (Area=0.5)	0,0044

^a Hanley & McNeil, 1982

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,2535
95% Confidence interval ^a	0,1107 to 0,3664
Associated criterion	>-2,61
95% Confidence interval ^a	>-3,54 to >-1,34
Sensitivity	49,43
Specificity	75,93



Variable	miRNA222	
Classification variable	Grup	
Sample size		141
Positive group ^a		87 (61,70%)
Negative group ^b		54 (38,30%)
^a Grup = 1		
^b Grup = 0		
Disease prevalence (%)		61,7

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,667
Standard Error ^a	0,0458
95% Confidence interval ^b	0,583 to 0,744
z statistic	3,640
Significance level P (Area=0.5)	0,0003

^a Hanley & McNeil, 1982

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,2516
95% Confidence interval ^a	0,1290 to 0,3326
Associated criterion	>-2,98
95% Confidence interval ^a	>-4,16 to >-0,94
Sensitivity	77,01
Specificity	48,15

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

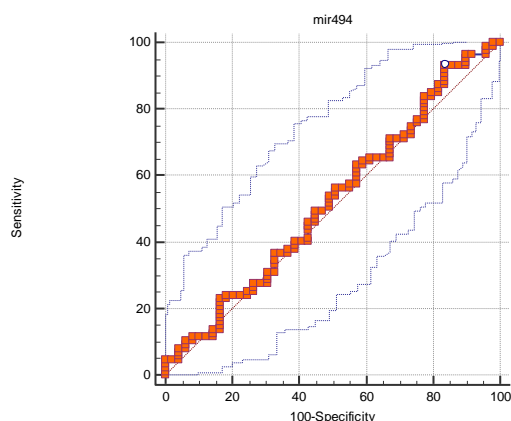
Optimal criterion ^a	>-3,35
95% Confidence interval ^b	>-4,88 to >-2,49
Sensitivity	81,61
Specificity	42,59

^a Taking into account disease prevalence (61,7%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA494
Classification variable	Grup
Sample size	136
Positive group ^a	87 (63,97%)
Negative group ^b	49 (36,03%)
^a Grup = 1	
^b Grup = 0	
Disease prevalence (%)	64,0

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,522
Standard Error ^a	0,0522
95% Confidence interval ^b	0,435 to 0,609
z statistic	0,429
Significance level P (Area=0.5)	0,6676

^a Hanley & McNeil, 1982

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,09430
95% Confidence interval ^a	0,07295 to 0,09430
Associated criterion	≤-2,78
95% Confidence interval ^a	≤-3,3 to ≤-1,92
Sensitivity	93,10
Specificity	16,33

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

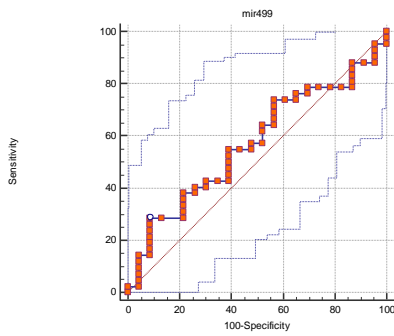
Optimal criterion ^a	≤-2,3
95% Confidence interval ^b	≤-2,96 to ≤-0,15
Sensitivity	96,55
Specificity	10,20

^a Taking into account disease prevalence (64,0%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).



Variable	miRNA499a
Classification variable	Grup
Sample size	65
Positive group ^a	42 (64,62%)
Negative group ^b	23 (35,38%)
^a Grup = 1	
^b Grup = 0	
Disease prevalence (%)	64,6

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,568
Standard Error ^a	0,0727
95% Confidence interval ^b	0,440 to 0,691
z statistic	0,939
Significance level P (Area=0.5)	0,3475

^a Hanley & McNeil, 1982

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1988
95% Confidence interval ^a	0,1139 to 0,2702
Associated criterion	≤0,82
95% Confidence interval ^a	≤-0,29 to ≤1,64
Sensitivity	28,57
Specificity	91,30

^a BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

Optimal criterion

Optimal criterion ^a	≤6,48
95% Confidence interval ^b	≤5,34 to ≤6,48
Sensitivity	100,00
Specificity	0,00

^a Taking into account disease prevalence (64,6%) and estimated costs:

cost False Positive: 1; cost False Negative: 1

cost True Positive: 0; cost True Negative: 0

^b BC_a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).

FORMLAR



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

OLGU RAPOR FORMU

Bu çalışmada Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde atheroskleroz tanısı almış 100 hasta ve 100 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 200 gönüllünün ApoE polimorfizmleri PCR Yöntemi ile miRNA 221/222 ekspresyonları Real Time PCR kullanılarak incelenecektir.

DAHİL ETME KRİTERLERİ

Hasta Grubu:

1. 18-65 yaş arası olmak
2. Atheroskleroz tanısı almış olmak
3. Bilgilendirilmiş onay formunu imzalamış olmak

Kontrol Grubu

1. 18-65 yaş arası olmak
2. Bilgilendirilmiş onay formunu imzalamış olmak

DAHİL ETMEME KRİTERLERİ

Hasta Grubu:

1. Gönüllü olmamak, Bilgilendirilmiş onay formunu imzalamamış olmak
2. Atheroskleroz tanısı almış olmamak

Kontrol Grubu

Gönüllü olmamak, Bilgilendirilmiş onay formunu imzalamamış olmak

OLGU RAPOR FORMU

Hasta Takip Formu

Protokol :
Tarih :
Hasta no :

KORONER ARTER HASTALARI İÇİN ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

Ad – Soyad :
Cinsiyet : Tel :
Yaş :
Boy : Kg : BSA (M²) :

Hipertansiyon Süresi :

Aile Öyküsü :

Kullandığı İlaçlar :

ACE inh :

Ca – kanal blokerleri :

Beta – blokerler :

Diüretikler :

5.1. Loop diüretikleri :

Aldesteron inh. :

5.1.1. Diğer

Hipertansiyon komplikasyonlar

Nefropati Yönünden :

Kreatinin klirensi.

BUN :

Kreatinin :

T.Proteinemi :

Albumin:

Globulin :

Eko :

Sol ventrikül hipertrofisi

Sol ventrikül kütlesi (LVK)=

Sol ventrikül diyastol sonu çapı (LVDSÇ) =

İnterventriküler septum kalınlığı; (İDK) =

Arka duvar kalınlığı (ADK)=

Dilatasyonu :

Diğer

Sigara :

Alkol :

Risk faktörleri :

Evet

Hayır:

Sigara	()	()
Aile Hikayesi	()	()
Hiperkolesterolemi	()	()
Düşük LDL	()	()
Hipertansiyon	()	()
Diabetes Mellitus	()	()

POLİMORFİZM

BİYOKİMYASAL TETKİKLER :

Açlık kan şekeri :

HbAc1c :

Total Kolesterol :

Trigliserid :

HDL – kolesterol :

24 saatlik idrarda mikroalbuminüri :

Renal Ultrason :

EKO :

Tansiyon :

LDL – kolesterol :

VLDL – kolesterol :

HDL – kolesterol :

HDL – LDL Altfraksiyonları :

Hipertansiyon Komplikasyonlarından Sonra Hikayesi :

Ateroskleroz Risk Faktörleri :	Evet	Hayır:
Yaş	()	()
Cinsiyet	()	()
Sigara	()	()
Aile Hikayesi	()	()
Hiperkolesterolemi	()	()
Düşük HDL	()	()
Hipertansiyon	()	()
Gut Hastalığı	()	()
Diabetes Mellitus	()	()

Eğer MI Geçirmişse :

Anjiografi :

Anjioplasti tarihi :

Restenoz :

By pass :

Reinfarkt ve tarihi :

Takip :

Eğer MI Geçirmişse (Farmakolojik stres testi , MIBI vr Talyum pozitif olmalı)

HT : Var Yok

Damar Sayısı :

Kontrol anjiogram tarihi :

Araştırmanın Açık Adı: Ateroskleroz Hastalığında Apolipoprotein E (ApoE) Polimorfizmi ile MikroRNA 221/222 Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Araştırmanın Özeti:

Amaç: Bu çalışmanın amacı Atheroskleroz tanısı almış hastalarda Apolipoprotein E (ApoE) Gen polimorfizmlerinin araştırılması ve genleri regüle ettiği öngörülen miRNA 221/222 arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

Kapsam: Aterosklerosis morbitite ve mortaliteye yol açan, periferik veya santral yerleşimli pek çok vasküler bozukluğun altında yatan temel patolojik tablo olarak tanımlanmaktadır. Patolojik mekanizma tam olarak bilinmese de günümüzde arter duvarında kolesterol birikimi ile ve bunun yarattığı kronik inflamatuvar cevapla birlikte seyreden multifaktöriyel bir hastalık olduğu görüşü hakimdir (1,2). Apolipoprotein E (ApoE), yüksek yoğunluklu ve trigliserid zengin lipoproteinlerin yapısında bulunur ve vücutta lipid hemostasını düzenler. Ayrıca aterosklerosis hastalığından korunmak için önemli bir role sahiptir (3,4).

miRNA yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikli RNA molekülüdür, gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar. miRNA, DNA'da transkripsiyonu yapılan ancak translasyonu yapılmayan genler tarafından kodlanır. miRNA'ların genler ve transkripsiyon üzerindeki etkisinin keşfi ile araştırmalarda odak noktası haline gelmeye başlamıştır. (1,2). miRNA'lar apoptozdan hücre bölünmesine, hücre farklılaşmasına, kanserden kalp hastalığına kadar bir çok hastalığın biyolojik ve fizyopatolojisinin aydınlatılmasına katkıda bulunmaktadır (4,5).

miRNA 221/22 proliferatif genler üzerindeki etkisi nedeniyle özellikle çeşitli kanser türleri üzerinde etkileri incelenmiş ve kanser için biyomaker adayı olabileceği düşünülen miRNA'lardır (4). Ateroskleroz hastalığı ile ilgili yapılmış in vitro çalışmalar, ApoE genin transkripsiyonunu miRNA221/222 üzerine etkili olduğunu (4), ApoE knockout farelerle yapılmış in vivo çalışmalar ApoE geni ve miRNA221/222 regülasyonunu anlamlı şekilde etkilediğini göstermiştir (5). ApoE geninin etkin olması vücutta lipid metabolizmasına pozitif etki gösterdiği gibi, arterlerdeki damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu baskı altında tutarak arterlerdeki intima kalınlaşmasını ve inflamatuvar sikokinlerin salgılanmasını engeller(6,7). Ayrıca ApoE mi221/222 üzerinden dokuya özgü etki göstererek damar endotel hücrelerinin proliferasyonunu artırarak damar içinde endotel bütünlüğünü sağlar. Damar bütünlüğünün korunması makrofajların subendotelial alana geçerek inflamasyonu tetiklemelerini de engeller (8). miRNA 145 dokularda hücre farklılaşmasını düzenlediği belirlenmiş bir miRNA'dır. ApoE knockout farelerde yapılan çalışmalar miRNA 145'in etkisinin azaldığını ve özellikle damar düz kas hücrelerinin farklılaşmasının azaldığını göstermiştir. Damar düz kaslarında farklılaşma damarın etkin kasılması ve kan basıncına yeterli direnç oluşturulması için son derece önemlidir (9). ApoE içeren HDL aterial elastikiyeti artırır ve damar sertliğini de engel oluşturur. Bu etkisini miRNA145 i upregüle ederek gerçekleştirir (9,10).

Son yıllarda miRNA'ların hastalıkların etimolojisinde ve fizyopatolojisinde rolünün araştırılması moleküler çalışmaların odak noktasında yer almaktadır. Yaptığımız literatür taramalarında bir çok çalışmanın hücre kültürü düzeyinde sürdürüldüğü in vivo çalışmaların ise fareler üzerinde yapıldığı görmekteyiz. Bugüne kadar ateroskleroz tanısı almış hastalarda yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ateroskleroz hastalarında ApoE gen mutasyonu ile miRNA221/222 ve miRNA145'in ilişkisinin araştırılmasının moleküler çalışmalar için son derece yararlı olacağı ve bu alanda önemli bir eksikliği gidererek bilim dünyasına özgün bilgiler sunabileceğimizi düşünmekteyiz.

Yöntem : Bu çalışmada Marmara Üniversitesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda takip edilen Ateroskleroz tanısı almış 50 hasta ile 50 sağlıklı kontrolün araştırmamıza dahil edilmesi planlanmaktadır. Toplam 100 gönüllüden önce 'Bilgilendirilmiş Onam Formu' okutulurken imzalatılması ve daha sonra 5ml EDTA'lı ve 10 ml steril düz tüpe kan alınması planlanmaktadır.

ApoE gen mutasyonu tayini için EDTA'lı tüplerden iPrep DNA robotu ile DNA izolasyonu yapılacaktır. DNA örneklerinin saflık tayini NanoDrop cihazı kullanılarak yapılacaktır. Örneklerden ApoE Gen

mutasyonu tayini Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ve Agoroz jel elektroforezi yöntemleri kullanılacaktır.

Steril Düz Tüplerden serum ayırma işlemi yapılarak serumdan Trizolle total RNA izolasyonu yapılacaktır. İzole edilen total RNA örneklerin konsantrasyonları NanoDrop cihazı kullanılarak ölçülerek ve RNA örnekleri çalışma yapılncaya kadar -80 derece derin dondurucuda saklanacaktır. Total RNA'lar eşit konsantrasyonlara getirilerek cDNA eldesi için miRCURY LNA Universal cDNA Synthesis Kit kullanılacak ve PZR yapılacaktır. cDNA'lar RNU1A1 ve U6 genleri ile PZR yapılarak cDNA'lar kontrol edilecektir. Kontrol edilen cDNA'lar Real Time Polimeraz zincir Reaksiyonu (RT PZR) ile Gen Ekspresyon Analizi yapılacaktır. miRNA 221 tespiti için miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR LNA PCR primer set has-miR-221-3p ve miRNA222 tespiti için miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR LNA PCR primer set has-miR-222-3p primerleri kullanılacaktır. Hedef genlerin tespiti için RNU1A1 ve U6 house keeping genleri kullanılacaktır.

İstatiksel Analiz: Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilecek, istatiksel analizler için SPSS 21 programı kullanılacaktır. Korelasyonlar için Pearson veya Spearman korelasyon testi kullanılacaktır. Sürekli ve kategorik değişkenler arası ilişki student t-testi veya Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirilecektir. Kategorik değişkenler arası ilişki Ki-Kare veya Fisher Exact testi ile araştırılacaktır.

İş bu anlaşma ile, biyolojik materyali gönderen araştırmacı ve kurum' **Ateroskleroz Hastalığında Apolipoprotein E (ApoE) Polimorfizmi ile MikroRNA 221/222 Arasındaki İlişkinin Araştırılması'**.. isimli araştırmada kullanılmak üzere gönderilecek10ml.....miktarda vearaştırma amaçla kullanılacak biyolojik materyali **26 Ağustos Yerleşimi Yeditepe Üniversitesi, Kayışdağı / İstanbul** adresindeki**Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalında'ndaki** merkeze göndermeden önce ALICI kurumdan aşağıdaki koşulları kabul etmesi istenmektedir;

1. Gönderilen biyolojik materyaller yalnızca yukarıda yazılı amaç için, ya da gönderici kurumun yeniden yazılı iznini almak koşulu ile ikincil amaç için kullanılabilir.
2. ALICI biyolojik materyali gönderici kurumun yazılı izni olmadan üçüncü şahıslara vermeyecektir. ALICI üçüncü şahıslardan gelebilecek istekleri GÖNDERİCİ'ye bildirecektir.
3. Biyolojik materyaller GÖNDERİCİ tarafından bireyin kimlik bilgileri olmaksızın ALICI'ya gönderilecektir.
4. ALICI biyolojik materyalleri Birleşmiş Milletler İnsan Genomu ve İnsan Hakları Evrensel Beyannamesine uygun olarak kullanacaktır.
5. Biyolojik materyaller ALICI'ya gönderilmeden önce biyolojik materyalin sağlandığı kişilere ait Sağlık Bakanlığı'nın ve Etik Kurul'un onayladığı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun her bir gönüllüden alınmış olması gerekmektedir.
6. Bu anlaşma ile gönderilecek biyolojik materyalin araştırma için kullanılacak olduğu ve biyolojik materyal kullanımının bazı tehlikeli özelliklerinin var olduğu ALICI tarafından kabul edilmektedir. Biyolojik materyali sağlayan kurum bu konuda sorumlu değildir.
7. GÖNDERİCİ ve ALICI yapılacak ortak bir yayımla ya da doğabilecek patent hakkı ve ticari gelişmelerle ilgili haklarını araştırma başlangıcında karşılıklı olarak belirleyecektir.
8. Bu anlaşma aşağıdaki iki maddeden herhangi birinin gerçekleşmesi halinde son bulacaktır.
 - a. Araştırmanın sonlanması durumunda,
 - b. Taraflardan herhangi birinin diğerine gönderdiği yazılı uyarıyı takiben 30 (otuz) gün içinde

Anlaşma kurallarına uymama; patent haklarının ihlali veya sağlık tehdidi oluşturan riskler dışında bu anlaşma 8 (b) koşulunda materyali sağlayan tarafın yazılı uyarısı ile bitirilecek olursa ALICI'nın araştırmasının engellenmemesi için ve ALICI'nın isteği üzerine materyali sağlayan araştırmacı 1 (bir) yıla kadar varan bir süre içinde anlaşmanın sonlanacağı bir tarih belirleyebilir.

9. ALICI bu anlaşmanın bitiminde bütün materyalleri geri vermeyi veya ortadan kaldırmayı ve bunu belgelemeyi kabul eder.
10. GÖNDERİCİ biyolojik materyali toplama, hazırlama ve göndermek için bir ücret talep ediyorsa bu ücret burada belirtilecektir.
11. Bu anlaşmanın yürümesinde ALICI ve GÖNDERİCİ kurum amirleri ile destekleyici sorumludur. Anlaşmazlık halinde ihtilafın çözümü için her iki ülke mahkemeleri de yetkilidir.

BİYOLOJİK MATERYALİ GÖNDEREN ARAŞTIRMACI BİLGİSİ

Adı Soyadı ve Unvanı:	Prof Dr Selim İSBİR
Uzmanlık Alanı:	Kalp Damar Cerrahisi Uzmanı
Kurumu:	Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Adresi:	Marmara Üniversitesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Fevzi Çakmak Mah. Pendik/İstanbul
Telefon:	0216 625 46 00 - 0216 625 45 45 Dahili: 2408
Faks:	
E-posta:	isbir@yahoo.com

BİYOLOJİK MATERYALİ ALAN ALICI BİLGİSİ

Adı Soyadı ve Unvanı:	Msc G. Seda GÜLEÇ YILMAZ
Uzmanlık Alanı:	
Kurumu:	Yeditepe üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı
Adresi:	26 Ağustos yerleşkesi Kayışdağı /İstanbul
Telefon:	0505 485 37 25
Faks:	(0216) 578 00 00
E-posta:	seda0802@yahoo.com

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

	Gönderen Araştırmacı	Gönderen Destekleyici Firma Yetkilisi veya Yasal Temsilcisi	Klinik Şefi / Ana Bilim Dalı Başkanı	Kurum Amiri / Rektör veya Yetkilendirdiği Makam	Alıcı Kurum Yetkilisi
El Yazısı ile Adı Soyadı Unvanı					
Tarih					
İmza					

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 edilir.



**YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME
KOMİTESİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ
OLUR FORMU**

Araştırmanın Adı / Protokol Numarası:

Araştırmanın Konusu: Ateroskleroz Hastalığında Apolipoprotein E (ApoE) Polimorfizmi ile MikroRNA 221/222 Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Araştırmanın Amacı: Ateroskleroz Hastalığında Apolipoprotein E (ApoE) Polimorfizmi ile MikroRNA 221/222 Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Araştırmanın Süresi: 1 yıl

Araştırmaya Katılan Gönüllü Sayısı: 100

Araştırmada İzlenecek Yöntem: DNA izolasyonu, PCR ve RT-PCR

Alternatif Tedavi veya Girişimler: ÇALIŞMA KAPSAMINDA TEDAVİ / GİRİŞİM YOK

Araştırma Sırasında Karşılaşılabilecek Riskler: YOK

Araştırma İlacının Olası Yan Etkileri: -

Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabilecek Kişi Adı / Soyadı / Telefonu: Msc G.

Seda GÜLEÇ YILMAZ / 0505 485 37 25 / 0216 578 00 00 Dahili : 2195

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.

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

ETİK KURUL KARARI

 YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------

KURUL ADI	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ Devlet Yolu Ankara Cad. No: 102-104, 34752 Kozyatağı, İstanbul
TELEFON	0216 578 47 97
E-POSTA	gulin.demir@yeditepe.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ateroskleroz Hastalığında Apolipoprotein E(ApoE) Polimorfizmi ile MikroRNA 221/222 Arasındaki İlişkinin Araştırılması.			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU				
	EUDRACT NUMARASI				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Selim İsbir			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Kalp ve Damar Cerrahisi			
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Msc.Seda Gülsüm Güleç Yılmaz			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	Moleküler Tıp			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ MARMARA ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA HASTANESİ	PENDİK	EĞİTİM	VE
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ MARMARA ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA HASTANESİ	PENDİK	EĞİTİM	VE
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ				
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input checked="" type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 <input type="checkbox"/>	FAZ 2 <input type="checkbox"/>	FAZ 3 <input type="checkbox"/>	FAZ 4 <input type="checkbox"/>
		BE/BY <input type="checkbox"/>	DİĞER <input type="checkbox"/>		
	İLAÇ ARAŞTIRMA <input checked="" type="checkbox"/>	DIŞI <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer ise belirtiniz: Belirtiniz: Genetik çalışma		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>



YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	
SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
İLAN	<input type="checkbox"/>		
YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER	<input type="checkbox"/>		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: <u>428</u>	Tarih: 03.06.2014
	Msc.Seda Gülsüm Güleç Yılmaz Koordinatörlüğünde ve Prof.Dr.Selim İsbir sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik bir sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurulu üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

ETİK KURULU BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kuruluş ve Çalışma Esasları.
---------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. R. Serdar ALPAN
ETİK KURULU ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. R. Serdar Alpan	Farmakoloji	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. M. Reha Cengizlier	Pediyatri	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Serdar Öztezcan	Biyokimya	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Baki Ekçi	Genel Cerrahi	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ferda Özkan	Patoloji	YÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Nural Bekiroğlu	Biyostatistik	MÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Esra Can Say	Diş Has. Ted.	YÜDF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Meriç Köksal	Eczacılık	YÜEF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ali Rıza Okur	Hukuk	YÜHF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Başar Atalay	Beyin Cerrahi	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Nesrin Sarıman	Göğüs Hastalıkları	MÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin Öztürk Işık	Biyomedikal Mühendisi	YÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yakut Gümüşlügil	Sivil Üye		E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* : Araştırma ile ilişki

2 / 3
Karar Formu 21 Nisan 2010 No:3

BAŞH.P.06-F.05 Rev 1, 15.09.2010

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gülsüm Seda	Soyadı	Güleç Yılmaz
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	29.07.1980
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	21736275654
Email	seda0802@yahoo.com	Tel	05054853725

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	2005
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2002
Lise	Beşiktaş Lisesi	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Burslu Doktora Öğrencisi	Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	2013-2016
2.	Satış Tanıtım Sorumlusu	AstraZeneca İlaç	2005-2011

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	61,568	65,064	64,503

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Bilimsel Çalışmaları

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

1	Ticagrelor Attenuates Apoptosis of Lung and Myocardial Cells Induced by Abdominal Aorta Ischemia/Reperfusion. Findik O, Kunt AT, Yazir Y, Yardimoğlu M, Yılmaz SG , Aydın U, Rençber SF, Baris O, Balci C, Isbir T. In Vivo. 2016 05-06;30(3):243-249.
2	Apolipoprotein E Genotypes in Patients with Prostate Cancer. Yencilek F, Yılmaz SG , Yildirim A, Gormus U, Altinkilic EM, Dalan AB, Bastug Y Turkmen S, Turkkan S, Isbir T. Anticancer Research 2016 Feb;36(2):707-11.

3	Investigation of Interleukin-1 β Polymorphisms in Prostate Cancer. Yencilek F, Yildirim A, Yilmaz SG , Altinkilic EM, Dalan AB, Bastug Y, Isbir T Anticancer Research 2015 Nov 35(11):6057-61
4	Polymorphisms of MMP9 and TIMP2 in Patients with Varicose Veins. Kunt AT, Isbir S, Gormus U, Kahraman OT, Arsan S, Yilmaz SG , Isbir T. In Vivo. 2015 Jul-Aug;29(4):461-5.
5	The effects of PON1 gene Q192R variant on the development of uterine leiomyoma in Turkish patients. Attar R, Atasoy H, İnal-Gültekin G, Timirci-Kahraman Ö, Güleç-Yilmaz S , Dalan AB, Yildirim G, Ergen A, Isbir T. In Vivo. 2015 Mar-Apr;29(2):243-6.
6	Lack of influence of the ACE1 gene I/D polymorphism on the formation and growth of benign uterine leiomyoma in Turkish patients. Gultekin GI, Yilmaz SG , Kahraman OT, Atasoy H, Dalan AB, Attar R, Buyukoren A, Ucuoglu N, Isbir T. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(3):1123-7
7	Paraoxonase1 192 (PON1 192) gene polymorphism and serum paraoxonase activity in panic disorder patients. Atasoy H, Güleç-Yilmaz S , Ergen A, Görmüş U, Küçükhüseyin Ö, Dalan B, Ol KK, Ögüt DB, Güleç H, Çetin B, Timirci-Kahraman Ö, Örmeci B, Uçunoğlu N, Gultekin GI, Isbir T. In Vivo. 2015 Jan-Feb;29(1):51-4
8	The relationship between ACE polymorphism and panic disorder. Gulec-Yilmaz S , Gulec H, Dalan AB, Cetin B, Timirci-Kahraman O, Ogut DB, Atasoy H, Dirmen GA, Gultekin GI, Isbir T. In Vivo. 2014 Sep-Oct;28(5):885-9.
9	Association Between FAS and FASL Genetic Variants and Risk of Primary Brain Tumor Dalan AB, Timirci-Kahraman O, Turan S, Kafadar AM, Yaylim I, Ergen A, Gormus U, Gulec-Yilmaz S , Kaspar C, Isbir T. The International Journal of Neuroscience 2014 Jun;124(6):443-9.

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

1	4-7 May 2016, İstanbul-Türkiye / 24th Biennial International Congress on Thrombosis Antithrombotic Agents, Rivaroxaban And Cilostazol, Prevent Lung and Renal Injury Following Abdominal Aorta Ischemia / Reperfusion In A Rat Model Orhan Findik, Ahmet Tugrul Erucar, Atike Tekeli Kunt, Seda Gulec Yilmaz , Selim Isbir, Hakan Parlar, Ozgur Baris, Canan Balci, Emre Murat Altinkilic, Selda Turkmen, Huseyin Kilili, Turgay Isbir
2	4-7 May 2016, İstanbul-Türkiye / 24th Biennial International Congress on Thrombosis An Antiplatelet Agent, Cilostazol, Attenuates Myocardial Damage Induced By Abdominal Aorta Ischemia / Reperfusion In A Rat Model Atike Tekeli Kunt, Orhan Findik, Seda Gulec Yilmaz , Ahmet Tugrul Erucar, Hakan Parlar, Ozgur Baris, Canan Balci, Emre Murat Altinkilic, Selda Turkmen, Altay Burak Dalan, Huseyin Ayhan, Selim Isbir, Turgay Isbir
3	4-7 May 2016, İstanbul-Türkiye / 24th Biennial International Congress on Thrombosis Serum Uric Acid And Albumin Levels Are Associated With Deep Venous Thrombosis Atike Tekeli Kunt, Orhan Findik, Selim Isbir, Seda Gulec Yilmaz , Gokcen Atilboz Alagoz,

	Emre Murat Altinkılıç, Hakan Parlar, Turgay İsbir
4	6-10 Oct 2014, Sithonia, Greece / 9th International Conference of Anticancer Research Rukset Attar, Gazi Yıldırım, Cem Fıçıcıoğlu, Seda Güleç-Yılmaz , Özlem Timirci Kahraman, Hande Atasoy, Özge Kızılkale Yıldırım, Cem İyibozkurt, Ahmet Büyükören, Altay Burak Dalan, İlhan Yaylım, Uzay Görmüş, Turgay İsbir. RRM1 and RRM2 gene polymorphism in patients with primary ovarian cancer.. Anticancer Research, International Journal of Cancer Research and Treatment (<u>Sözlü Bildiri</u>), Anticancer Research International Journal of Cancer Research and Treatment, Volume: 34, Number: 10, Page: 5966- 5967, 2014.
5	6-10 Oct 2014, Sithonia, Greece / 9th International Conference of Anticancer Research Gazi Yıldırım, Rukset Attar, Cem Fıçıcıoğlu, Seda Güleç-Yılmaz , Özlem Timirci Kahraman, Hande Atasoy, Özge Kızılkale Yıldırım, Cem İyibozkurt, Ahmet Büyükören, Altay Burak Dalan, Bedia Çakmakçoğlu, Arzu Ergen, Turgay İsbir. Association Between ERCC2 Gene Polymorphism and Primary Ovarian Cancer.. Anticancer Research, International Journal of Cancer Research and Treatment, (<u>Sözlü Bildiri</u>), Anticancer Research International Journal of Cancer Research and Treatment, Volume: 34, Number: 10, Page: 5966,
6	22-26 June 2014 İstanbul, Turkey / 22 nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine/ I FCCWorldLab FT Akdeniz, Z Akbulut, H Sarı, H Aydın, AB Dalan, D Sit, S Güleç Yılmaz, T İsbir, G Yanıkkaya Demirel Effects of Obesity Parameters on Gestational Diabetes in Human Clin Chem Lab Med 2014;52, Special Suppl pp S1-S1760

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1	18-22 Kasım 2015 / 12. Üroonkoloji Kongresi Prostat Kanserinde İnterlökin 1 beta polimorfizmlerinin erkilerinin araştırılması F Yencilek, Asif Yıldırım, S Güleç-Yılmaz , EM Altinkılıç, AB Dalan, Y Baştuğ, T İsbir
2	18-22 Kasım 2015 / 12. Üroonkoloji Kongresi Prostat Kanserinde Kaspas 9 polimorfizmlerinin erkilerinin araştırılması F Yencilek, Asif Yıldırım, S Güleç-Yılmaz , EM Altinkılıç, S Türkmen, Öykü ;Coşgun, AB Dalan, Y Baştuğ, T İsbir
3	21-24 Ekim 2015 / 41. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya-Türkiye Seda Gulec-Yılmaz , Altay Burak Dalan, Uzay Görmüş, Pınar Yıldız Silahtaroğlu, Baki ekçi, Emre Murat altinkılıç, Özlem Timirci Kahraman, Turgay İsbir. Türk popülasyonunda çoklu gen paneli kullanılarak akciğer ve kolon kanserindeki olası mutasyonların yeni nesil dizileme cihazı ile saptanması. 41. Ulusal Hematoloji Kongresi, Bildiri Kitabı, Sayfa: 132-133, 2015
4	21-24 Ekim 2015 / 41. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya-Türkiye Gazi Yıldırım, Rukset Attar, Emre Murat Altinkılıç, Hande Atasoy, Özlem Timirci Kahraman, Seda Güleç Yılmaz , Özge Kızılkale Yıldırım, Altay Burak Dalan, Elif Kök, Ceren Öztunç, Turgay İsbir. Endometrium Kanseri İle Pon1-55 Polimorfizmi İlişkinin Türk Popülasyonunda Araştırılması.. 40. Ulusal Hematoloji Kongresi, Bildiri Kitabı, Sayfa: 105, 2014
5	21-24 Ekim 2015 / 41. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya-Türkiye

	Rukset Attar, Hande Atasoy, Gazi Yıldırım, Özlem Timirci Kahraman, Seda Güleç Yılmaz , Özge Kızılkale Yıldırım, Altay Burak Dalan, Turgay İsbir. Myoma uteri gelişimi ile pon1 q192r ve l55m polimorfizmleri arasındaki ilişkinin türk popülasyonunda incelenmesi.. 40. Ulusal Hematoloji Kongresi, Bildiri Kitabı, Sayfa: 104, 2014.
6	Uluslararası Katılımlı Kongre&Lab Expo 2014 / İzmir- Türkiye Altay Burak Dalan, Zeynek Akbulut, Tuba Akdeniz, Emre Murat Altınkılıç, Hasan Sarı, Hasan Aydın, Seda Güleç Yılmaz , Hande Atasoy, Melisa Kantar, Elif Kök, Ceren Öztunç, Turgay İsbir. Gestasyonel Diyabet Hastalarında LDL Alt Gruplarının Değerlendirilmesi. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği, KONGRE, Bildiri Kitabı, Sayfa: 250, 2014.
7	3-6 Eylül 2013 / 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir-Türkiye Gülce Sarı, Nazlı Uçunoğlu, Hakan Gürkan, Seda Güleç Yılmaz , Metin Yazar, Altay Burak Dalan, Hande Topçu, Özlem Timirci Kahraman, Turgay İsbir. Kronik lenfositik lösemi olgularında FLT3-ITD mutasyonu ve 17P13 delesyonunun araştırılması.. 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, Türk Biyokimya Dergisi, Cilt: 38, Özel Sayı, 2013.
8	3-6 Eylül 2013 / 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir-Türkiye Seda Güleç-Yılmaz , Hüseyin Güleç, Altay Burak Dalan, Buğra Çetin, Özlem Timirci-Kahraman, Dicle Bilge Ögüt, Hande Topcu, Gözde Kışla, Burcu Uğurel, Turgay İsbir. Panik bozukluk Hastalığı ile ACE I/D Polimorfizmi Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, Türk Biyokimya Dergisi, Cilt: 38, Özel Sayı, 2013.
9	19-23 Aralık 2012 / 10. Tıbbi Genetik Kongresi, Bursa- Türkiye Koroner arter hastalığında Faktör V G1692A varyasyon etkisinin incelenmesi ve Türk toplumundaki dağılımlarının Belirlenmesi.. Özlem Timirci-Kahraman, Burak Dalan, Özlem küçükhüseyin, Güldal İnal gültekin, Seda Güleç-Yılmaz , Arzu Ergen, Selim İsbir, Turgay İsbir.

Yazılan ulusal/uluslararası kitaplardaki bölümler

Advances in DNA Repair, / İngilizce (Bilimsel Kitap).
INTECH, Editör: C Chen, Basım sayısı: 1
Bölüm adı: DNA Repair Based Therapy in Oncology and Neurodegeneration
Sayfa :405-412.
Turgay İsbir, Uzay Görmüş, Özlem Timirci-Kahraman, Arzu Ergen, Altay Burak Dalan, **Seda Gulec-Yılmaz** and Hande Atasoy,

Ödülleri

Best Oral Presentation 1 st Prize
12th International Congress of Update in Cardiology and Cardiovascular Surgery
March, 10 - 13, 2016 / Antalya – Turkey
Ticagrelor Attenuates Apoptosis of Lung and Myocardial Cells Induced by Abdominal Aorta Ischemia/Reperfusion in a Rat Model
O Fındık, **S Güleç Yılmaz**, Y Yazır, M Yardımoğlu, U Aydın, S Furat Rençber, K Kavram, C Balcı, A Tekeli Kunt, T İsbir

Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifikalari/Ödülleri)

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Olgularında Kaspaz 9 Polimorfizmlerinin Rolünün Araştırılması (Etik Kurul Onayı Vardır) Prof. Dr. Sina Ercan, Doç. Dr. Sibel Arınç, Prof. Dr. Turgay İsbir, Doç. Dr. Altay Burak Dalan Msc. Seda Güleç Yılmaz,
Prostat Kanserli Hastalarda Kaspaz9 mutasyonunun Saptanması (Etik Kurul Onayı Vardır) Doç Dr Faruk Yencilek, Doç.Dr. Asıf Yıldırım, Msc. Seda Güleç Yılmaz, Prof Dr Turgay İsbir, Dr. Altay Burak Dalan,
Prostat Kanserli Hastalarda IL-1beta mutasyonunun Saptanması (Etik Kurul Onayı Vardır) Doç Dr Faruk Yencilek, Doç.Dr. Asıf Yıldırım, Msc. Seda Güleç Yılmaz, Prof Dr Turgay İsbir, Dr. Altay Burak Dalan,
Prostat Kanserli Hastalarda P14 ve GSTP1 Genlerindeki Metilasyonların Tanımlanması (Etik Kurul Onayı Vardır) Doç Dr Faruk Yencilek, Doç.Dr. Asıf Yıldırım, Msc. Seda Güleç Yılmaz, Prof Dr Turgay İsbir, Dr. Altay Burak Dalan, Msc. Sema Akyürek,
Dejeneratif Disk Hastalıkları ile ACAN Gen Polimorfizmi ve Serum Proteoglikan Seviyelerinin İlişkisinin Araştırılması Prof Dr Başar Atalay, Prof Dr Turgay İsbir, Uzm Dr Burhan Güdü, Doç Dr Altay Burak Dalan, Msc Seda Güleç Yılmaz