



**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KORONER ARTER HASTALARININ PLAKLARINDA VE
DOLAŞIMLARINDAKİ UZUN KODLAMA YAPMAYAN RNA
İFADE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

Arzu ÖZCAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Sivas

2016



**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KORONER ARTER HASTALARININ PLAKLARINDA VE
DOLAŞIMLARINDAKİ UZUN KODLAMA YAPMAYAN RNA
İFADE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

Arzu ÖZCAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**


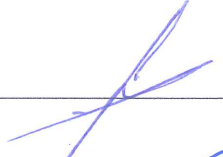

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Nilgün ÇEKİN**

Sivas

2016

ONAY SAYFASI

“Koroner Arter Hastalarının Plaklarında Ve Dolaşımındaki Uzun Kodlama Yapmayan RNA İfade Düzeylerinin İncelenmesi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ	
Üye	Doç. Dr. Serdal ARSLAN	
Üye (Danışman)	Yrd. Doç. Dr. Nilgün ÇEKİN	

ONAY

Bu tez çalışması, ...08.11.2016..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

YÖNERGE BİLDİRİM SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

İTHAF



Bilim İnsanlarına...

ÖZET

KORONER ARTER HASTALARININ PLAKLARINDA VE DOLAŞIMLARINDAKİ UZUN KODLAMA YAPMAYAN RNA İFADE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

Arzu ÖZCAN

Yüksek Lisans Tezi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nilgün ÇEKİN

2016, 54 sayfa

Koronere arter hastalığının en yaygın nedeni koroner arterlerdeki aterosklerozdur. Aterosklerozun ilerlemesiyle gelişen aterosklerotik plaklar, medial dejenerasyon ve intimada lipid, karbonhidrat, kan hücreleri, fibröz doku ve kalsiyum birikimiyle oluşur. Kardiyovasküler hastalıkların gelişimi ve ilerlemesinde epigenetik mekanizmaların önemli etkenler arasında olduğu ileri sürülmektedir. Bu epigenetik mekanizmalardan özellikle kısa ve uzun kodlanmayan RNA moleküllerinin önemi ise son zamanlarda yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır. Kodlama yapmayan RNA aracılı epigenetik mekanizmalar uzun kodlama yapmayan RNA'lar (200 nükleotidden uzun RNA) ve kısa kodlama yapmayan RNA'lar tarafından gerçekleştirilir.

Çalışmamızda lncRNA'lardan FENDRR ve lincRNA-p21'in gen ifadesi plaklı koroner arter ve plaksız İnternal Mammarian Arter (İMA) doku örneklerinde (20 koroner arter, 20 İMA dokusu) ve kan örneklerinde (44 hasta, 44 kontrol) çalışılmıştır. Bu lncRNA'ların ateroskleroz hastalığı ile ilişkisini belirlemek amacıyla qRT-PCR yöntemi ile $\Delta\Delta CT$ metodu kullanıldı. Alınan verilere göre lincRNA-p21 ve FENDRR'in ekspresyon seviyeleri belirlendi. Koroner arter ile İMA dokuları ve kan örneklerinde hasta-kontrol grupları arasındaki bu lncRNA'ların ekspresyonları karşılaştırıldı. Kontrol grubu olan İMA doku örneklerine göre plaklı koroner arter dokularında lncRNA FENDRR ve lincRNAp-21'in ifadelerinin azaldığı gözlenmiştir. FENDRR'in ifadesinin 2.16 kat azaldığı ($p=0.264$), lincRNAp-21'in ifadesinin 6.7 kat azaldığı ($p=0.705$) görülmüştür. İMA dokularına oranla koroner dokularındaki FENDRR ve lincRNAp21'in ekspresyonlarındaki azalma biyolojik olarak anlamlı bulunmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p>0.05$) Hasta ve kontrol bireylerden alınan kan serumlarından elde edilen total RNA'da FENDRR ve lincRNA-p21 ifadesine rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Ateroskleroz, lncRNA, FENDRR, lincRNA-p21

ABSTRACT

EVALUATION OF LONG NONCODING RNA EXPRESSION LEVELS IN THE PLAQUE AND CIRCULATION OF PATIENTS WITH CORONARY ARTERY

Arzu ÖZCAN

MSc Thesis

Department of Medical Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Nilgün ÇEKİN

2016, 54 page

The most common cause of coronary artery disease is atherosclerosis of coronary arteries. The developing atherosclerotic plaque with the progress of atherosclerosis, are formed by medial degeneration and lipid, carbohydrate, blood cells, fibrous tissue and the accumulation of calcium in the intima. Epigenetic mechanisms have been suggested to be important factors in the development and progression of the cardiovascular diseases. The importance of these epigenetic mechanisms, such as long and short non-coding RNA molecules have been shown in recent studies. Epigenetic mechanisms mediated by noncoding RNAs are made by long noncoding RNAs (>200 nt) and short noncoding RNAs.

In our study, the FENDRR and lincRNA-p21 from lncRNA gen expression were performed in the plate coronary artery plaque and nonplate Internal Mammarian Artery (IMA) tissue samples (20 coronary arter, 20 IMA tissue) and blood samples (44 patient, 44 control). In order to determine the relationship between atherosclerosis and these lncRNAs, qRT-PCR with delta delta ct methods were used. The lincRNAp21 and FENDRR gen expression levels according to the received data determined. Expressions these of lncRNAs between patient-control group in the blood samples and coronary arter with IMA were compared. Our data showed that expression level of FENDRR ve lincRNA-p21 reduce in coronary artery plaque tissue according to that IMA tissue. We observed that FENDRR expression 2,16 fold decrease ($p=0.264$), and lincRNA-p21 expression 6,7 fold decrease ($p=0.705$). Reduction of FENDRR and lincRNA-p21 expression in coronary artery according to IMA tissue is significant as biologically but is not significant considering to statisticaly ($p>0.05$).The FENDRR and lincRNA-p21 expression were not observed in total RNA that obtained from blood serum from patient ve control individuals.

Keyword: Atherosclerosis, lncRNA, FENDRR, lincRNA-p21

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının ortaya çıkması için bana fırsat ve destek veren tüm katkılarından dolayı değerli danışman hocam Yrd. Doç Dr. Nilgün ÇEKİN'e,

Büyük saygı duyduğum ve çok şey öğrendiğim Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ergün PINARBAŞI'na,

Her zaman bana aile gibi davranan, bilim dünyama ve manevi hayatıma katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine,

Bu tez çalışması esnasında TÜBİTAK 115S044 proje nolu projeden sağlanan burs ile eğitimim desteklediği için TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na ve proje yürütücüsü Sayın Doç. Dr. Serdal ARSLAN'a,

Tez çalışması için gerekli olan doku ve kan örneklerinin toplanmasında yardımcı olan Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Öcal BERKAN, Yrd. Doç. Dr. Özge KORKMAZ, Yrd. Doç Dr. Sebahattin GÖKSEL'e

Yüksek lisansa başlamamda beni yüreklendiren değerli hocam Doç. Dr. Ahmet ALİM'e,

Tezin laboratuvar çalışmalarına birlikte emek verdiğimiz sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Nil ÖZBİLUM ve Aslıhan Esra BİLDİRİCİ'ye,

Büyük özveri ile beni büyüten, yetiştiren, destek veren değerli annem, babama ve her zaman yanımda olan abime sonsuz teşekkür ederim.

2016

Arzu ÖZCAN

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-643

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
YÖNERGE BİLDİRİM SAYFASI.....	iii
İTHAF.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GENEL BİLGİ.....	1
1.1 Ateroskleroz	1
1.2 Normal Arterin Yapısı.....	3
1.2.1 Normal Arteri Oluşturan Hücre Tipleri	3
1.2.1.1 Endotel Hücreleri.....	3
1.2.1.2. Arteriyal Düz Kas Hücreleri.....	4
1.2.2 Normal Arterin Tabakaları.....	4
1.2.2.1 Tunika İntima.....	4
1.2.2.2 Tunika Media.....	5
1.2.2.3 Tunika Adventisya.....	5
1.3 Aterosklerotik Lezyonların Oluşu.....	6
1.4 Aterosklerozun Patogenezi.....	7
1.4.1 Lezyon Başlangıcı.....	7
1.4.2 İnflamasyon.....	8
1.4.3 Köpük Hücre Oluşumu	10
1.4.4. Fibröz Plaklar	11
1.4.5 İlerlemiş Lezyonlar ve Trombozis	12
1.5 İnternal Mammarian Arter Dokusunun Özellikleri ve Bypass Cerrahisinde Tercih Edilme Sebepleri	13
1.6 Aterosklerozda Risk Faktörleri	14

1.7 Aterosklerozda Epigenetik Faktörlerin Rolü	15
1.7.1 Uzun Kodlanmayan RNA'lar.....	16
1.7.2 Uzun Kodlanmayan RNA'lar ve Ateroskleroz	17
1.7.3 FENDRR.....	18
1.7.4 lincRNA-p21	20
2. MATERYAL METOD	22
2.1 Örneklerin Toplanması ve Saklanması	22
2.1.1 Doku Örneklerinin Toplanması	22
2.1.2 Kan Örneklerinin Toplanması.....	22
2.2. Total RNA İzolasyonu	22
2.2.1 Dokudan RNA İzolasyonu	22
2.2.2 Kandan RNA İzolasyonu	23
2.3. RNA Konsatrasyonu ve Saflığının Ölçülmesi	24
2.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	24
2.5 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	25
3. BULGULAR.....	28
4. TARTIŞMA-SONUÇ.....	33
5. KAYNAKLAR	37
EKLER	47
Ek 1. Bilgilendirilmiş Olur Formu	47
İZİNLER.....	51
Ek 2. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu	51
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Normal Arter Yapısı	5	
Şekil 2: Aterosklerozda Aşamalı Lezyon Oluşumu	7	
Şekil 3: Aterosklerozda İnflamasyonun Rolü	10	
Şekil 4a: Trombus oluşumu	4b: Kalsifikasyon Oluşumu.....	13
Şekil 5: FENDRR'in PRC2 ve Trx/MLL Proteinlerine Bağlanma Mekanizması..	20	
Şekil 6: lincRNA-p21'in MDM2 ve p300 Molekülleri Üzerinden p53 Kontrol Mekanizması	21	
Şekil 7: İMA dokusundaki FENDRR ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.	29	
Şekil 8: İMA dokusundaki lincRNA-p21 ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.	29	
Şekil 9: İMA dokusundaki GAPDH ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.	29	
Şekil 10: Koroner arter dokusundaki FENDRR ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.	30	
Şekil 11: Koroner arter dokusundaki lincRNA-p21 ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.	30	
Şekil 12: Koroner arter dokusundaki GAPDH ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.	30	
Şekil 13: Hasta serumundan elde edilen örneklerde FENDRR ifadesine ait amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.	31	
Şekil 14: FENDRR ve lincRNAp-21'in gen ekspresyon düzeyi, kontrol grubu olarak seçilen İMA dokularına oranla plaklı koroner arter dokularındaki katlı oran değişimi grafiksel şekilde gösterilmiştir.....	32	

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Aterosklerozda Risk Faktörleri.....	15
Tablo 2: cDNA Reaksiyon Bileşenleri.....	24
Tablo 3: cDNA Reaksiyon Bileşenleri.....	25
Tablo 4: qRT-PCR Reaksiyonu Reaktif Miktarları.....	25
Tablo 5: qRT-PCR Kullanım Koşulları.....	26
Tablo 6: Kullanılan Primer Dizileri	26
Tablo 7: Koroner Arter ve İMA Dokularında FENDRR ve lincRNA-p21'in RNA Düzeylerinin Karşılaştırılması	31
Tablo 8: Kontrol (İMA dokusu) ve Hasta (Koroner arter dokusu) Gruplarında Ortalama Ct Değerleri ve Kat artışı.....	32

KISALTMALAR DİZİNİ

Apo-B	: Apolipoprotein B
Apo-E	: Apolipoprotein E
CCR2	: Chemokine Reseptör Type 2 (Kemokin Reseptör Tip 2)
cDNA	: Komplementer DNA
DKH	: Düz Kas Hücresi
EH	: Endotel Hücresi
ELAMs	: Endotelyal Lökosit Adezyon Molekülleri
FENDRR	: Foxf1 Adjacent Non-coding Developmental RNA
ICAM-1	: Intercellular Adhesion Molecule-1 (İntrasellüler Adezyon Molekülü-1)
IFN-γ	: İnterferon- γ
İMA	: İnternal Mammarian Arter
KVH	: Kardiyovasküler Hastalık
LDL	: Low Density Lipoprotein (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)
lincRNA-p21	: Large Intergenic Non-coding RNA-p21
lncRNA	: Uzun Kodlanmayan RNA
MMPs	: Matriks Metalloproteazları
MCP-1	: Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Monosit Kemotaktik Protein-1)
M-CSF	: Macrophage-Colony Stimulating Factor (Makrofaj-Koloni Uyarıcı Faktör)
microRNA	: Kısa Kodlanmayan RNA
ncRNA	: Kodlanmayan RNA
NO	: Nitrik Oksit
PECAM-1	: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (Trombosit Endotel Adezyon Molekülü-1)
PRC2	: Polycomb Baskılayıcı Kompleks 2
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SMase	: Sfingomiyelinaz
SPLA2	: Salgısal Fosfalipaz 2
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü- α

- VCAM-1** : Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1)
- VLA-4** : Very Light Antigen-4
- WHO** : Worl Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)



1. GENEL BİLGİ

1.1 Ateroskleroz

Ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıklar (KVH), ülkeler arasında kardiyovasküler mortalite açısından belirgin farklılıklar göstermesine rağmen bütün Avrupa'da en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık örgütünün 2015 yılında yayınladığı uluslararası KVH istatistiklerine göre; 2012 yılında 17,5 milyon insan KVH nedeniyle ölmüş ve bu durum dünya genelindeki ölümlerin ~%30'unu oluşturmuştur (WHO, 2015).

Aterosklerozun önde gelen sebepleri arasında genetik faktörler, hipertansiyon, diyabet, hiperlipidemi, cinsiyet, sigara kullanımı sayılmaktadır. Popülasyonlar arasında giderek artan şekilde salgın haline gelen ateroskleroz erken dönemde ölüme sebep olabilir. Ekonomik gelişim, kentleşme, kötü beslenme alışkanlıkları (örneğin, doymuş yağları aşırı yemek) ve azalan fiziksel aktivite aterogenez oluşumunu teşvik eder. Bu çevresel faktörler gittikçe yaygınlaşmaktadır, öyle ki gelişmişlik düzeyine ulaşan batı toplumları yaygın bir aterosklerozla karşılaşır (Thompson ve ark., 2013).

20. yüzyıl aterosklerozun patogenezi ile ilgili kavramlarda dikkate değer bir evrime tanıklık etmiştir. Ateroskleroz daha önce damar duvarındaki lipit birikimi sonucu oluşan basit bir lipit depo hastalığı olarak tanımlanırken aslında inflamasyon tepkileri içeren karmaşık bir hastalık olduğu görülmüştür (Thompson ve ark., 2013). Temel bilimlerdeki son gelişmeler, bu hastalığın başlangıcından itibaren ilerlemesi arasındaki bütün aşamalarına aracılık eden inflamasyonun temel bir role sahip olduğunu ve sonuçta aterosklerozun trombotik komplikasyonlarını oluşturduğunu belirlemiştir. Ateroskleroz'u hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, inflamasyon belirtilerinin arter duvarında başlayan lipit birikimi ile beraber oluştuğu görülmüştür (Mayerl ve ark., 2006). Sonuç olarak ateroskleroz arter duvarında lipit birikimi, inflamasyon, hücre apoptozu ve trombozunu içeren bir damar hastalığıdır (Libby ve ark., 2002).

Ateroskleroz büyük ve orta büyüklükteki arterlerin her ikisinde de oluşabilir. Postmortal ve damar içi klinik çalışmaları ateroskleroz hastalarında yaygın bir intimal kalınlaşma olduğunu ortaya çıkarmıştır. Asemptomatik kişilerin çoğu koroner ve karotis arterlerinde hayatın ilk dönemlerinde bile intimal lezyonlara sahiptir. Aynı zamanda, ateroskleroz diğerlerine göre daha fazla sıklıkla etkilenen damarın belirli alanlarında

fokal stenoz üretir. Ateroskleroz lezyonları geliştirmek için belirli alanların tercih edilmesinin biyolojik temeli ortaya çıkmaya başlamıştır (Libby ve ark., 2011).

Zamanla aterosklerozun heterojen bir yapıda olduğu da görüntülenmiştir; bu hastalık hem kronik hem de akut belirtilere sahiptir. Yaşamın ikinci ve üçüncü on yılında Amerikalılar üzerinde yapılan çalışmada arterleri etkilemeye başlayan aterosklerozdan daha uzun bir "inkübasyon" süresine sahip olan az sayıda hastalık görülmüştür. Aslında, birçok genç Amerikalının koroner arter intimalarında anormal kalınlaşma mevcuttur; fakat aterosklerozun belirtileri henüz mevcut değildir, yıllar sonra ortaya çıkmaya başlar. Karakteristik olarak kadınlarda ileriki yaşlarda görülebilir. Bu ağrısız sürece ve klinik olarak etkisiz uzun süreli döneme rağmen, miyokardiyal enfarktüs ve inme gibi aterosklerozun korkulan komplikasyonları genel olarak aniden ve sıklıkla herhangi bir uyarı vermeden meydana gelir (Libby, 2015).

Ateroskleroz nekrotik çekirdek, kalsifiye bölgeler (kireçleşmiş), birikmiş modifiye lipitler, inflamasyonlu düz kas hücreleri (DKH), endotel hücreler (EH), lökositler, monositler olmak üzere birçok moleküler ve hücrel etkileşimin katıldığı aterosklerotik plakların oluşumu ile büyük ve orta boyuttaki arterlerde gelişen KVVH'lara yol açan en yaygın patolojik olaydır. (Ross, 1999) Aterosklerotik plakların bu özellikleri aterosklerozun karmaşık bir hastalık olduğunu göstermektedir ve vasküler, metabolik ve immün sistemin çoğu bileşeni bu sürece katılır. Aterosklerotik lezyonlar bir dizi hücrel ve moleküler yanıtı kapsamaktadır (Hansson ve Libby, 2006).

Lezyon oluşumunun başlangıç yeri endoteldir. Endotel diyabet, hipertansiyon, nikotin, okside düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) gibi risk faktörleri tarafından uyarılır ve endotelin yapısında değişiklikler meydana gelir. Endotelde oluşan hasar ile lipid geçirgenliğinde artış oluşur (Atkins ve ark., 2011). Ateroskleroz, endotelin fonksiyonel bozukluğu ile başlayan, subendotelyal boşlukta okside lipoprotein birikimi sonucu inflamasyonun oluşması ve böylece monositlerin endotele göç etmesiyle ilerleyen bir hastalık sürecidir. İntimaya yerleşen monositler makrofaj hücrelerine farklılaşırlar ve köpük hücrelerini oluştururlar. En erken dönemde lipid yüklü makrofajlar bölünmeye başlar ve inflamatuvar bir lezyon olan "yağlı çizgilenme" adını alır. Bu yağlı çizgilenme çocukluk çağında bile görülebilir. Zaman içinde devam eden kronik inflamasyon sonrasında "subendotelyal fibroz plak" gelişmektedir. İleri dönemde aterosklerotik plağın rüptürüne bağlı olarak trombojenik faktörlerin açığa çıkmasıyla trombüsünde katıldığı "komplike lezyon" gelişir (Libby, 1999).

1.2 Normal Arterin Yapısı

Aterosklerozun patogenezinin anlaşılabilmesi için ilk olarak normal arterin yapısı ve biyolojisinin ve normal artere özgü hücre tiplerinin bilinmesi gerekir.

1.2.1 Normal Arteri Oluşturan Hücre Tipleri

1.2.1.1 Endotel Hücreleri

Arteriyel intimanın EH'leri kan ile önemli bir temas yüzeyi oluşturmaktadır. Arteriyel EH'leri arteriyal hastalıkların patogenezinde damar homeostazında anahtar öneme sahip düzenlenmiş çok sayıda mekanizmaya sahiptir. EH kan damarları ve bileşenleri, tromboz ve inflamasyonun kontrolü için kritik öneme sahiptir (Davies ve ark., 2010). Kan akımı ve çevre dokular arasındaki metabolik alışverişi düzenler. Yüzeyindeki glikoproteinler ile glikozaminoglikanların negatif yük kazandırdığı EH'ler, hücrel ve hormonal moleküllerle etkileşim içinde olduklarından çok sayıda reseptör taşımaktadır. Trombosit agregasyon inhibisyonu, koagülasyon aktivasyonunun inhibisyonu, fibrinolizis fonksiyonları ile pıhtılaşmayı önleyici bir yüzey oluşturmak, ayrıca doku ve dolaşım arasında madde alışverişi, vasküler tonusun düzenlenmesi, lökosit ve trombosit adezyonunun regülasyonu gibi görevleri vardır (Bombeli ve ark, 1997).

EH'leri, bütün kan damarlarının iç yüzeyini kaplayacak şekilde embriyonez sırasında mezodermden oluşturulur. EH'leri ortak bir öncüden oluşmasına rağmen, damar gelişimi sırasında karşılaştıkları sinyaller farklıdır (Regan ve Aird, 2012). Temel kan damarlarının oluşmaya başlaması için, endotel öncülerini çevreleyen hücreler ile etkileşime geçmesi gerekir. Hücreler arasındaki alış-veriş çeşitli uyarılara zamansal ve mekansal olarak geçişlere yol açar ve EH'lerinin üzerindeki reseptörler, yetişkinlerdeki bu hücre tiplerinin farklı olmasına neden olur. EH'lerin heterojenitesi hem çevresel uyarılara hem de gelişim sırasında edinilen epigenetik özelliklere bağlıdır (Yoder, 2012). Endotel çevresel uyarılara yanıt olarak vazokonstriktör ve vazodilatör nitelikte maddeler sentezleyip, salgılayabilen dinamik bir organdır. Sigara, hipertansiyon, diyabet, dislipidemi, obezite gibi bilinen vasküler risk faktörlerinin, mekanik, hemodinamik ve kimyasal etkileri sonucu endotel yapısı bozulur ve endotel disfonksiyonu aterosklerozun önde gelen nedenini oluşturur (Verma ve Anderson, 2002; Yaylalı ve Küçükaslan, 2011).

1.2.1.2. Arteriyal Düz Kas Hücreleri

Normal arter duvarının ikinci önemli hücre tipi, DKH'dir. DKH'leri arter hastalıklarının patogeneğinde ve kardiyovasküler tıp alanında tedavilerin bir hedefi olarak, normal damar homeostazını düzenleyici pek çok önemli fonksiyona sahiptir. Bu hücreler kasılır ve gevşer böylece kas arteriyolları düzeyindeki, çeşitli arteriyal tabakalar boyunca kan akışını kontrol eder. Ateroskleroza katılan arterlerin daha büyük tiplerinde, anormal düz kas kasılması sebebiyle, kan akışı bozulabilir ve aterosklerozun bir komplikasyonu olan vazospazma neden olabilir (Nguyen ve ark., 2013).

DKH'leri normal vasküler homeostazi oluşumunda yer alır ve aterosklerotik lezyonların komplikasyonlarında önemli rol oynayan arteriyel ekstraselüler matriks kompleksinin büyük bir kısmını sentezler. Ayrıca bu hücreler intimal hiperplastik lezyonların oluşumuna katılarak göç ederler ve çoğalırlar. DKH'lerinin yok olması aterom plaklarının destabilizasyonunu teşvik edebilir veya damarlarda ektazik yeniden yapılanmayı destekleyebilir ve sonuçta anevrizma oluşumu gerçekleşir (Gomez ve Owens, 2012).

1.2.2 Normal Arterin Tabakaları

Normal arterler morfolojik olarak intima, media ve adventisya olmak üzere iyi gelişmiş bir trilaminar yapıya sahiptir (Şekil 1).

1.2.2.1 Tunika İntima

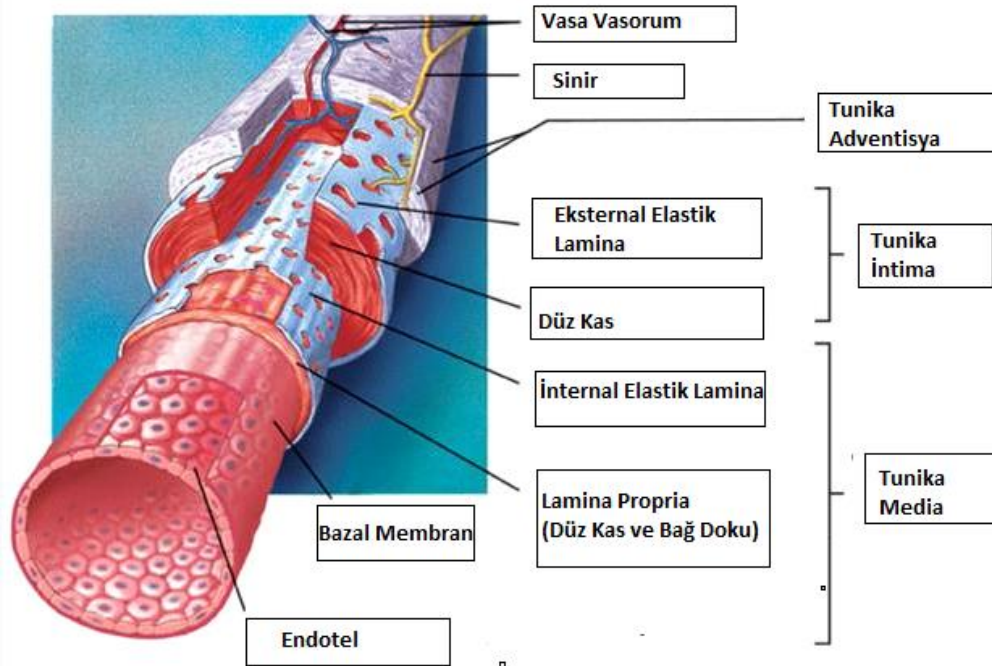
İntima tabakası; EH'ler, subendotelyal matriks ve bazal membrandan oluşmaktadır. İç tabaka olan tunika intima bazal lamina üzerine doğrudan bitişik olan EH'leri ile tek bir tabaka olarak tasvir edilmektedir. Tek tabaka endotel, tip IV kolajen, laminin, fibronektin ve ekstraselüler matriks molekülleri gibi fibriler olmayan kolajen tipleri içeren bazal bir membran üzerinde bulunur. Yaşlanma ile insan arterleri, arteriyel DKH'leri ve dokular arası kolajenin (tip I ve III) fibriler formlarını içeren daha kompleks intima geliştirilmektedir. DKH'lerini arteriyel intimanın bu gibi ekstraselüler bileşenleri üretir. Diffüz intimal kalınlaşma olarak patologlar tarafından bilinen, daha kompleks intima, en çok yetişkin insan arterlerini tanımlamaktadır. Aterosklerozun yokluğunda bile, arteriyel duvardaki bazı yerler diğer bölgelere göre daha kalın bir intima geliştirme eğilimindedir. İnternal elastik membran, tunika intima tabakasını tunika media tabasından ayırır (Libby, 2015).

1.2.2.2 Tunika Media

Tunika media, intima ve internal elastik laminanın altında yer almaktadır. Media tabakası, elastik arterlere ve aort gibi iyi gelişmiş eş merkezli DKH'lerine sahiptir. Elastin açısından zengin ekstraselüler matriks tabakaları ile iç içe geçmiştir. Bu yapı büyük arterlerin duvarları ile sol ventrikül sistol kinetik enerjisinin depolanması için iyi şekilde uyarlanmıştır. Media tabakası, arteriyel duvarın yapısal bütünlüğüne katkıda bulunur. Normal arterde bu tabaka, ekstraselüler matriksin homeostazi durumu üzerinde etkilidir. Normal arterlerdeki DKH'leri nadiren çoğalırlar. DKH'lerinin çoğalması aterosklerotik lezyon oluşumuyla ilişkilidir. Çünkü normal arter yapısında ekstraselüler matriks elemanları birikmez ve arteriyel matriks sentezi ve yok olma oranı genellikle birbirini dengeler. Eksternal elastik lamina, adventisya tabakası ile sınır oluşturarak tunika media abluminalini sınırlamıştır (Libby, 2015).

1.2.2.3 Tunika Adventisya

Tunika adventisya tabakası, intima tabakasına göre daha gevşek bir dizi kolajen fibrilleri içerir. Damarlara oksijen ve besin sağlayan **vaso vasorum** ve sinir uçları arter duvarının en dış tabakası olan adventisyaya yerleşmiştir. Adventisyadaki hücresel popülasyon diğer arter tabakalarına göre daha aralıktır. Bu tabaka serpiştirilmiş fibroblastlar, DKH'leri ile bağ dokusundan meydana gelir (Libby, 2015).



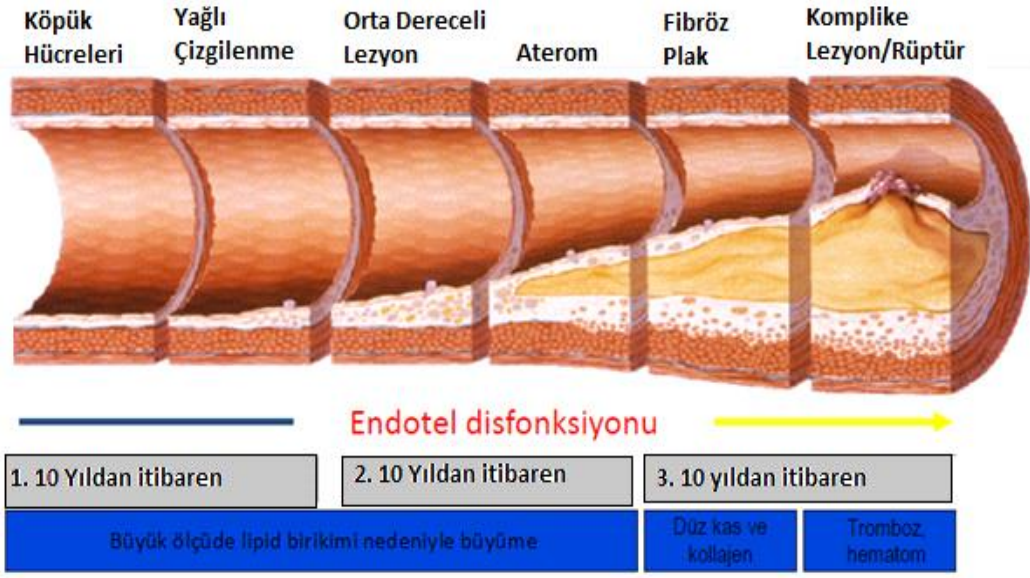
Şekil 1: Normal Arter Yapısı

(http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/Blood_Vessels.html, Erişim tarihi: Eylül 2016)

1.3 Aterosklerotik Lezyonların Oluşu

Ateroskleroz, arterlerde meydana gelen plak olarak adlandırılan lezyonlardan (yapısal bozukluklar) oluşur. Ateroskleroz büyük ve orta boyuttaki arterlerde lipit ve lifli elemanların birikimi yoluyla gelişen bir hastalıktır (Lusis ve ark., 1998). Temel patolojisi damar duvarındaki daralmadır. Ateroskleroza meydana getiren olaylar tavşanları, domuzları, primatları ve kemirgenleri içeren hayvan modelleri çalışmalarıyla büyük oranda açığa kavuşturulmuştur. Apolipoprotein E (apoE-) eksik olarak veya düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörü ile fare modelleri oluşturularak ilerlemiş lezyonlar geliştirilmiş ve fizyolojik ve genetik çalışmalarda kullanılmıştır (Libby ve ark.,2013) Ateroskleroz, aterom plakta meydana gelen hücre proliferasyonu ve apoptoz ile tanımlanmaktadır ve bu iki hücreyel olay özellikle makrofajları ve vasküler düz kas hücrelerini (VDKH) etkilemektedir.

Lezyon oluşumunda ilk aşama, lipoproteinlerin subendotelyal matriksin içine hapsedilmesidir. Kanda akış dinamikleri farklılıkları sebebiyle, arterlerde lezyon oluşumunun tercih edildiği alanlar vardır. İnsanlarda, bu tür 'yağlı çizgi' adı verilen lezyonlar genellikle yaşamın ilk on yılında aortta, sonraki on yılında koroner arterlerde, ve sonraki üçüncü veya dördüncü on yılında serebral arterlerde oluşabilir (Gimbrone, 1999). Yağlı çizgiler klinik açıdan önemli değildir fakat yağlı çizgiler lipid bakımından zengin nekrotik debris ve DKH'lerinin birikimi ile karakterize edilen daha ileri lezyonların öncüleridir (Şekil 2). Bu tür ileri 'lifli lezyonlar' genellikle lipit bakımından zengin bir 'nekrotik çekirdeğin' kuşattığı DKH'leri ve ekstrasellüler matriksi içeren bir 'fibröz başlığa' sahiptir. Plaklar, luminal yüzeyde kalsifikasyon, ülserasyon ve kan damar duvarlarının mediasından lezyonun içine doğru büyüyen küçük damarların kanamasıyla giderek daha karmaşık hale gelebilir. İlerlemiş lezyonlar kan akışını engelleyebilecek kadar büyüyebilir. En önemli klinik komplikasyon tromboz veya kan pıhtısı oluşumu sebebiyle akut bir oklüzyondur, miyokardiyal enfarktüs veya felçle sonuçlanır. Tromboz genellikle lezyonun aşınması ve yırtılmasıyla ilişkilidir (Wu ve Thiagarajan, 1996).



Şekil 2: Aterosklerozda Aşamalı Lezyon Oluşumu (Stary H.C. ve ark.,1995)

1.4 Aterosklerozun Patogenezi

1.4.1 Lezyon Başlangıcı

Patolojik çalışmalar ateroskleroz sırasında damarda belirlenen bir seri değişikliği ortaya çıkarmıştır. Endotel disfonksiyonu aterosklerotik süreçte temel mekanizmalardan biridir. Klasik ve yeni belirlenen risk faktörleri endotelde vazodilatör cevabın azalmasına yol açan kronik hasarlanma yaratır. Böylece endotelde oluşan vazokontrüksiyon, inflamatuvar hücrelerin birikimi, düz kas hücrelerinin migrasyonu, sitokin üretiminin artışı gibi olaylar aterosklerotik plak oluşumuna neden olur (Gimbrone, 1999).

Endotel, hücreler arası sıkı birleşim kompleksleri ile kan ve dokular arasında seçici geçirgen bariyer olarak işlev yapar. EH'leri arasındaki sıkı bağlar normal durumlarda kan hücrelerinin geçişine izin vermez. Ancak damariçi ve damardışı ekstravasküler sıvı dengesinin sürdürülebilmesi için makromoleküllere karşı seçici bir geçirgenlik vardır. İnflamasyon, immun cevap ve yara iyileşmesi gibi olayların başlayabilmesi için hormon, antikor vb. moleküllerin geçişi gereklidir (Goldstein ve ark., 1979).

Endotel duyusal ve yönetici fonksiyonların ikisine de sahiptir ve trombozis, inflamasyon, vasküler tonus ve vasküler yeniden şekillenmenin düzenlendiği efektör

moleküller oluşturabilir. Aterosklerotik süreçte endotelden, çeşitli kemotaktik faktörler, trombotik faktörler, adezyon molekülleri, sitokinler ve büyüme faktörleri salgılanmaktadır (Boren ve ark., 1998).

Normal endotel LDL için bariyerdir. Endotel hasarlandığı zaman damarın permeabilitesi arttığı için, LDL'nin endotelden damar duvarına geçişi kolaylaşmaktadır. Ateroskleroza ilk başlatan olay subendotelyal matriks içinde LDL'nin birikimidir. Dolaşımdaki LDL seviyesi yükseldiği zaman LDL, EH'lerinin birleşim yerleri boyunca pasif bir şekilde yayılır ve apolipoprotein B (apo-B) ve matriks proteoglikonlarını oluşturan LDL arasındaki etkileşimler damar duvarında LDL'nin tutulumuna sebep olur. Lezyon oluşumunu başlatan en önemli olay LDL'nin tutulumu ve diğer apo-B içeren lipoproteinlerin matriks bileşenleriyle etkileşimidir. LDL'ye ek olarak, apo-B içeren diğer proteinler, lipoprotein (a) olmak üzere intimada birikebilir ve ateroskleroz geliştirebilir. Lipoprotein (a), LDL'ye benzeyen bir partiküldür ve bir disülfid köprüsü tarafından apo-B'ye bağlanarak polipeptit içeren apolipoprotein (a) olarak adlandırılır. Lipoprotein (a) fibrinoliz ve düz kas hücre büyümesi üzerine ek etkilere sahiptir (Grainger ve ark., 1994).

Tutulan lipoprotein partikülleri damar duvarının intima tabakasında birikmeye başlar. Yapılan çalışmalarda sıkışmış olan bu LDL'nin oksidasyon, lipoliz ve agregasyonu kapsayan modifikasyonlara uğradığı gösterilmiştir ve bu tür modifikasyonlar hem inflamasyona hem de köpük hücre oluşumuna katkıda bulunur. Erken lezyon oluşumu için en önemli modifikasyonlardan biri vasküler hücrelerin oksidatif atıklara maruz kalması sebebiyle lipit oksidasyonudur. Böyle modifikasyonlar başlangıçta proinflamatuvar aktivitenin sahip olduğu "minimal okside edilmiş" LDL türlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Fakat makrofaj temizleyici reseptörler tarafından tanınması için yeterli derecede okside olmuş olması gerekir (Cyrus ve ark., 1999).

1.4.2 İnflamasyon

Aterosklerozun inflamasyon süreci monosit ve lenfositlerin arter duvarına toplanması şeklinde karakterize edilir. Kandan alınan örnekler inflamatuvar hücrelerin özellikle monosit ve makrofajların önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Vasküler hücrelerde ve monosit/makrofajlarda yapılan doku kültür çalışmaları hastalığın başlangıç ve ilerlemesindeki olası yolları belirlemiştir. Bu çalışmalar inflamasyona aracılık edilmesinde endotelin temel role sahip olduğuna dair kanıtlar da sunmuştur.

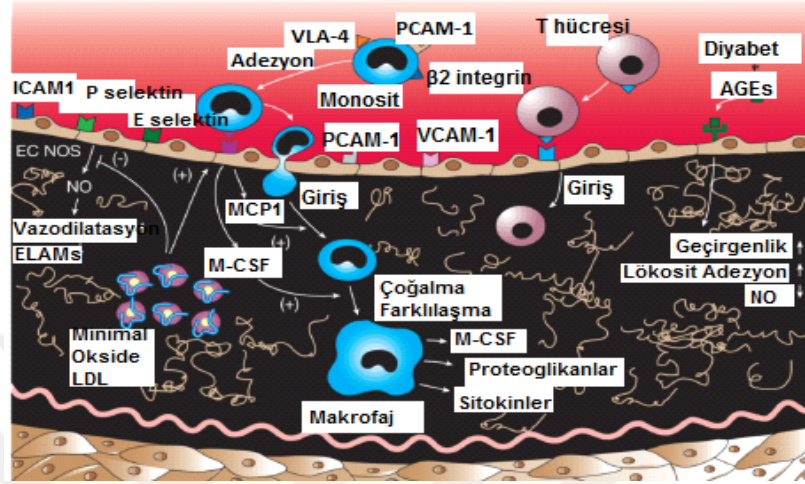
Ayrıca intima içine monosit alımı ve köpük hücre oluşumunda oksidatif modifiye LDL birikiminin önemli ölçüde katkı sağladığı gösterilmiştir (Watson ve ark., 1997).

Minimal düzeyde okside LDL adezyon molekülleri, monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) gibi kemotaktik proteinler ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) gibi büyüme faktörleri üretmek için endotel hücrelerini uyarır ve intima tabakasına monositlerin girişine neden olur. Yeterince okside olan LDL, sitokinlerin salınımını uyarır ve nitrik oksiti (NO) inhibe eder. Okside LDL damar basıncının azalması olmak üzere, birçok anti-aterojenik özellikleriyle kimyasal bir aracı olan NO üretimini de engelleyebilir (Knowles ve ark., 2000). LDL oksitlenmesine ek olarak, hemodinamik kuvvetler, homosistein seviyeleri, cinsiyet hormonları ve enfeksiyon gibi birkaç faktör büyük olasılıkla inflamasyonu modüle etmektedir. Diyabet ile endotel reseptörleri etkileşime geçerek glikozilasyonun ileri düzey son ürünlerinin oluşumuyla kısmen inflamasyonu arttırabilir (Hofmann ve ark., 1999).

Okside LDL, NO üretiminin engellenmesi sağlar ve vazodilatasyonun önemli bir aracıdır. Ayrıca endotelyal lökosit adezyon moleküllerinin (ELAMs) ekspresyonu gibi diğer etkilere sahiptir. Endotelyal hücre adezyon molekülleri arasında intraselüler adezyon molekülü (ICAM-1), P-selektin, E-selektin, trombosit endotel adezyon molekülü-1 (PECAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) lökositlerin girişinde önemli role sahiptir. Monositler üzerindeki önemli adezyon molekülleri ise β 2 integrin, very late antigen-4 (VLA-4) ve PECAM-1'dir. İleri glikozilasyonun son ürünleri diyabette oluşmaktadır ve bunlar EH'leri üzerindeki özgül reseptörler aracılığıyla inflamasyonu teşvik edebilir (Dong ve ark., 1998; Collins ve ark., 2000).

Arter duvarına lökositlerin belirli türlerinin, monositlerin ve T hücrelerinin girişine adezyon molekülleri ve kemotaktik faktörler aracılık etmektedir. Kültüre edilen EH'ler okside LDL'ye maruz bırakıldıktan sonra, monositleri bağlamaktadır. Adezyonda ilk adım, endotel yüzeyi boyunca lökositlerin "yuvarlanması" üzerindeki karbonhidrat ligandlara bağlanabilen selektinlerin aracılığıyla olur. P ve E selektin veya hücre adezyon molekülü ICAM-1'den yoksun farelerde yapılan çalışmalarda, aterosklerozda adezyon moleküllerinin önemli bir rolü olduğunu ortaya çıkarmıştır. Endotele monosit ve T hücrelerinin sıkı bir şekilde yapışmasına endotel üzerindeki VCAM-1 ve fibronektinin her ikisiyle etkileşebilen bu hücrelerin üzerindeki, integrin VLA-4 aracılık edebilir (Şekil 3). *In vitro* ve *in vivo* çalışmaların ikisi de bu etkileşimlerin aterosklerozda bir role sahip olduğunu ileri sürmektedir (Shih ve ark.,

1998). Son olarak, yapılan başka bir çalışmada monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) veya reseptörü olan kemokin reseptör tip-2 (CCR2) yoksun farelerde ateroskleroz lezyonları önemli bir şekilde azalmıştır, MCP-1/CCR2 etkileşimi aterosklerozda monositlerin toplanmasında bir role sahip olduğunu işaret etmektedir (Boring ve ark., 1998; Gu ve ark., 1998).



Şekil 3: Aterosklerozda İnflamasyonun Rolü (Lusis, 2000)

1.4.3 Köpük Hücre Oluşumu

Adezyon molekülleri aracılığı ile monositlerin subendotelyal alana göçü sonrası monositler intimada aktif makrofajlara dönüşür. Dolaşımdaki monositler arter duvarına makrofaj formunda geçer ve okside lipid moleküllerini fagosite ederek arteriyel intima tabakasında köpük hücrelerine dönüşür. Makrofajlar tarafından köpük hücre oluşturulmaya başlamadan önce, LDL'nin "büyük oranda oksitlenmiş" olarak modifiye edilmesi gerekir. Ateromda reaktif oksijen türleri (ROS) ve sfingomiyelinaz (SMase), salgısal fosfolipaz 2 (SPLA2), diğer lipazlar ve miyeloperoksidaz (MPO) etkisiyle büyük ölçüde oksitlenmiş kümelenmiş LDL oluşturulur (Marathe ve ark., 1999). Okside edilmiş toplanan LDL, SR-A, CD36 ve CD68 gibi makrofaj temizleyici reseptörler tarafından tanınmaktadır. Temizleyici reseptörler modifiye edilmiş lipoproteinlerin makrofajların içine alınmasında rol oynar (Suzuki ve ark., 1997; Podrez ve ark., 2000). Bu lipoprotein partiküllerinin makrofaj içine alınması erken aterosklerotik lezyonların karakteristik özelliği olan lipid yüklü makrofajlara veya köpük hücrelerin oluşmasına neden olur. (Febbraio ve ark., 2000). Makrofaj yüzeyindeki reseptörlerde down regülasyon olmadığından depolama işlemi köpük hücrelerinin apoptozuna kadar devam eder (Zengin, 2012). Temizleyici reseptörlerin ekspresyonuna tümör nekroz faktör- α

(TNF- α) ve interferon- γ (IFN- γ) gibi sitokinler aracılık etmektedir (Tontonoz ve ark., 1998).

1.4.4. Fibröz Plaklar

Risk faktörlerinin devam etmesi halinde plaktaki inflamasyon devam eder ve subendotelial birikim giderek artar. Yağlı çizgiden kompleks lezyona doğru ilerleme DKH'lerinin arter duvarının media tabakasından intima tabakasına doğru hareketi ve kolojen sentezlemeleri ile olur. Aktive olmuş endotelial hücreler, T hücreleri ve köpük hücrelerinden MCP-1 gibi sitokinlerin sürekli salınımı aterosklerotik plakları içinde sadece inflamasyon ve lipid birikmesine neden olmaz, aynı zamanda DKH'lerinin aktivitesine neden olur. Mediadan gelen DKH'leri intimada çoğalarak orta ve ileri lezyonların oluşmasına yol açar. Yağlı çizgilenmeler başlangıçta T lenfositleri ile birlikte köpük hücrelerini içerirken, sonradan oluşuma DKH'lerinin katılması ile lezyonu lümeninden ayrılan "fibröz kapsül" oluşmaya başlar ve aterosklerotik plakta büyümeye neden olur (Hermasson ve ark., 2010).

Zaman içinde, kronik inflamasyon sonrasında "subendotelial fibröz plak" gelişmektedir. Fibröz plaklar çoğunlukla kolesterol esterleri, DKH ve DKH'si kaynaklı ekstraselüler matriks birikimi yoluyla gerçekleşen ekstraselüler lipitin artan kitlesi ile tanımlanmaktadır. Makrofajlar tarafından salgılanan sitokinler ve büyüme faktörleri ve T hücreleri etkisiyle DKH'leri göç ederek hem çoğalır hem de ekstraselüler matriks sentezleyerek intimal kalınlaşmaya yol açarlar (Libby ve Theroux, 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalar CD40'ın ligandı CD40L ile etkileşimi ilerlemiş lezyonların gelişimine önemli katkı sağladığı gösterilmiştir. Bu etkileşim T ve B hücrelerini içeren önemli immün reaksiyonlar için gerekli ilk yapı olarak kabul edilmektedir. CD40 ve CD40L'nin katılımı inflamatuvar sitokinlerin, matriks degrade edici proteazların ve adezyon moleküllerinin üretimiyle sonuçlanır. CD40 ve ligandı CD40L'nin etkileşimi T lenfositlerini ve inflamasyonu, DKH büyümesini ve matriks birikimini ve IFN- γ gibi sitokinleri ifade etmek için makrofajları uyarır. İntimal DKH'leri ekstraselüler matriks salgılar ve bir "fibröz başlık" oluşumuna yol açar (Fyfe ve ark., 1994; Schönbeck ve ark., 2000).

Yüksek homosistein, hipertansiyon ve hormonlar gibi çeşitli risk faktörleri fibröz lezyonların gelişimine katkı sağlamaktadır. Yüksek homosistein seviyesi EH'ne zarar verdiği ve vasküler DKH proliferasyonunu uyardığı yapılan çalışmalarda görülmektedir.

Risk faktörlerinden artan homosistein seviyesi ve anjiotensin II (ACE etkisiyle aracılığıyla üretilen anjiotensinin-dönüştürücü enzim) olmak üzere DKH'lerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu uyarır (Negoro ve ark., 1995; Gerhard ve Duell, 1999).

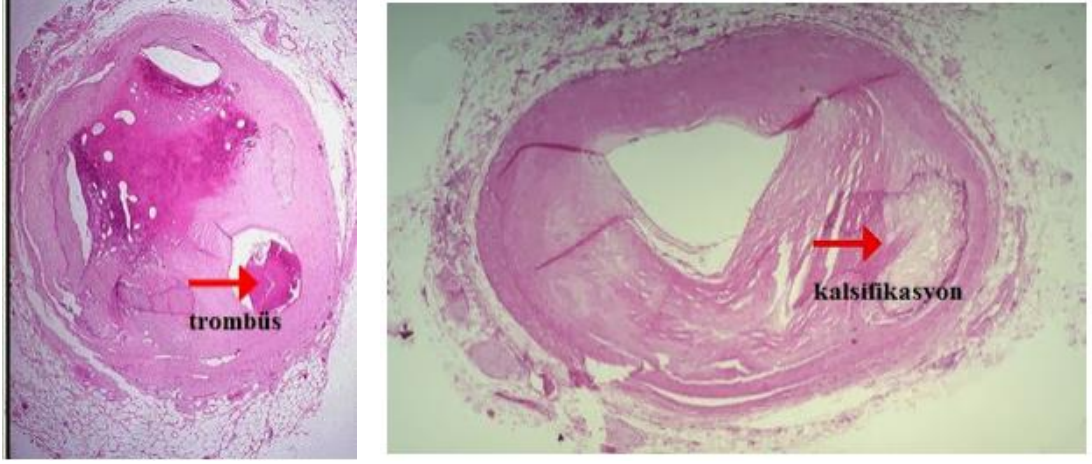
1.4.5 İlerlemiş Lezyonlar ve Trombozis

Aktive olmuş makrofajlardan salınan IL-1 β , TNF α ve T lenfositlerden salınan INF- γ sinerjistik etki göstererek DKH'lerinin ölümüne ve ekstrasellüler matriksin azalmasına neden olur. Bir yandan yıkımın artması diğer yandan yapımın azalması ile fibröz kapsül zayıflar ve en sonunda çatlar. Fibröz başlığı hasarlanmış plakta prokoagülan maddeler kan elemanları ve pıhtılaşma faktörleri ile karşılaşır trombus oluşumunu tetikler. Aterosklerotik plağın kırılıp yırtılması, fibröz kapsüldeki makrofajların artışı, VDKH apoptozundaki artış ve fibröz kapsüldeki VDKH azalışı ile ilişkilidir (Zengin, 2012). Ayrıca DKH'lerinin apoptozisi kapsülü zayıflatmakta ve plak rüptürüne yardımcı olmaktadır (Enar, 2006).

İleri dönemde aterosklerotik plağın fissürü veya reptürüne bağlı olarak trombojenik faktörlerin açığa çıkmasıyla trombusun de katıldığı "komplike lezyon" gelişir. Rüptüre olan plakta endotel devamlılığı bozulunca trombojenik kor ile kan teması geçer, trombus oluşur ve damar tıkanır (Lusis, 2000) Plakta inflamasyon ne kadar fazla ise yıkım o kadar fazladır (Şekil 4a). İnflamatuar hücrelerin saldıdığı çeşitli araçlar, plazminojen ve matriks metalloproteazları (MMP) fibröz çatıyı zayıflatarak rüptüre zemin hazırlar. Bir kere fibröz örtü zayıflayınca plak akut trombotik komplikasyonlara yol açan parçalanmaya duyarlı hale gelir. Son zamanlarda bölgedeki mast hücrelerinin de güçlü proteolitik enzimler saldıdığı belirlenmiştir. Fibröz çatının gücünü kollajen sağlar. MMP'ler 23 farklı proteinazdan oluşur ve temel etkileri kolojen, elastin ve proteoglikanları degrade edip fibröz çatıyı yıkmaktır. MMP'ler aynı zamanda trombositleri de aktive eder (Segers ve ark., 2007; Tokgözoğlu, 2009).

Plaklar luminal yüzeyde kalsifikasyon ve kan damar duvarlarının mediasından lezyonun içine doğru büyüyen küçük damarların kanamasıyla giderek daha karmaşık hale gelebilir. İlerlemiş kararlı aterosklerotik plakların oluşumunun ortak özelliği kalsifikasyon ve neovaskülarizasyondur. İntimal kalsifikasyon, perisit benzeri hücrelerin matriks yapısı salgıladığı daha sonra kireç haline gelen aktif bir işlemdir ve

kemik oluşumuna benzer (Şekil 4b.) Bu işlem oksisteroller ve sitokinler tarafından düzenlenir (Moulton ve Folkman, 1999).



Şekil 4a: Trombus oluşumu **4b:** Kalsifikasyon Oluşumu (Hansson, 2005)

1.5 İnternal Mammarian Arter Dokusunun Özellikleri ve Bypass Cerrahisinde Tercih Edilme Sebepleri

Koroner arter bypass greft cerrahisi ileri koroner arter hastalığı tedavisinde standart olarak uygulanan tedavi yöntemidir (Flohr, 2004). Arteriyel greft ve venöz greft olmak üzere iki ayrı greft tipi bulunmaktadır. En sık kullanılan arteriyel greftler; internal mammarian arter (İMA), radial arter, sağ gastroepiploik arter ve inferior epigastrik arterdir. Arteriyel greftlerin, venöz greftlere oranla plak gelişimine ve oklüzyona daha dirençli olmasına rağmen, venöz greftler daha kolay temin edilebilmesi nedeni ile daha sık olarak kullanılmaktadır. En sık kullanılan venöz greftler ise safen ven greftleridir (Cox ve ark., 1991).

İMA greftleri, aterosklerotik değişikliklere dirençli olmasından dolayı yüksek oranda bypass cerrahisinde kullanıma sahip greftlerdir. Bu greftlerin duvarlarında internal elastik lamina bulunması ve adventisyalarda vazo vazorumların bulunmaması nedeniyle intimal hiperplazi ve sellüler migrasyona karşı dirençlidir (Motwani ve Topol, 1998). Ayrıca media tabakasında daha az oranda musküler hücre bulunması ve bu tabakanın ince olması nedeniyle vazokonstriksiyona eğilim azdır. Endotelium tarafından sentezlenen trombosit inhibitörleri (prostaglandinler) ve vazodilatörler (nitrik oksit) ateroskleroza karşı direnç oluşumuna katkıda bulunurlar. Bu nedenlerden dolayı İMA greftleri, safen ven greftlerine oranla daha avantajlıdır (Douglas, 1994).

Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi Kardiyovasküler Cerrahi Kliniğinde ilk arteriel greft kullanımı 1982 yılında İMA ile gerçekleştirilmiştir. O tarihten itibaren arteriel greft kullanımı giderek artmış ve son 4 yılda %90'ın üzerinde bir değere ulaşmıştır (Tezcaner ve ark., 1992).

Son yıllarda İMA ve diğer greftler üzerinde yapılan histopatolojik, anjiyografik ve Doppler ultrasonografik çeşitli çalışmalar İMA greftlerinin bugün için koroner arter bypass cerrahisinde ideale en yakın greft olduğunu belirlemiştir (Yazıcıoğlu ve ark., 1999). İMA'ların en önemli özelliği insandaki elastik yapılı tek periferik arterdir ve ateroskleroza karşı dayanıklıdır (Van Son ve ark., 1993).

1.6 Ateroskleroza Risk Faktörleri

Son 50 yılda yapılan epidemiyolojik çalışmalar aterosklerozun oluşmasına katkı sağlayan birçok risk faktörünü ortaya çıkarmıştır Tablo 1'de verilen risk faktörlerinin ateroskleroz gelişiminde önemli rolü vardır (Sonel, 2002). Bunlar genetik kaynaklı ve büyük ölçüde çevresel faktörler olarak gruplandırılabilir. Hastalığa götüren nedenler araştırıldığında plazma lipoproteinlerinin farklı miktarları karşılaştırılmış ve hastalığın çoğu formunun ortaya çıkmasında bir ön koşul olarak aterojenik lipoproteinlerin yüksek düzeylerinin birincil öneme sahip olduğu görülmüştür (Mehrabian ve ark., 1998). Cinsiyet ve lipoprotein düzeyi dışında genetik olarak ise, her bir genetik risk faktörü çoklu genleri içerir. Benzer çevresel koşullar altında tutulan hayvanlarda yapılan genetik karşılaştırmalarda bu karmaşıklık açık bir şekilde görülebilir. Örneğin, kemirgenlerde lipoprotein düzeyine vücut yağı ve diğer risk faktörlerinin katıldığı genetik lokus içinde çok sayıda çalışma ortaya çıkarılmıştır. Böylece, sağlıklı bir ortam, genetik yatkınlığın bileşiminden koroner kalp hastalıklarının sık görülen formları ortaya çıkmış ve yaşamımızda artmıştır. Karmaşıklığın diğer bir düzeyi risk faktörleri arasındaki etkileşimi içerir. Örneğin, koroner kalp hastalığı üzerindeki hipertansiyon etkisi kolesterol düzeyi yüksek olduğunda büyük ölçüde artmaktadır (Goldbourt ve Neufeld, 1988; Smithies ve Maeda, 1995; Mehrabian ve ark., 1998).

Tablo 1: Aterosklerozda Risk Faktörleri (Sonel, 2002)

Ateroskleroz Risk Faktörleri	
Sabit Faktörler	Modifiye Edilebilen
Yaş	Sigara
Aile Hikayesi	Hipertansiyon
Etnik Köken	Hiperlipidemi
Cinsiyet	Diyabet
	Obesite
	Stress, Depresyon

1.7 Aterosklerozda Epigenetik Faktörlerin Rolü

Ateroskleroz çeşitli araçların gen ekspresyonunu değiştirdiği inflamasyon olayları ve epigenetik değişiklikleri içeren patolojik mekanizmalar yoluyla oluşan immun-inflamatuar bir hastalıktır (Wierda ve ark., 2010). Nükleer düzeyde DNA ve histonların metilasyon-asetilasyon modifikasyonu değişikliklerini içeren epigenetik olaylar, diyet, çevresel faktörler ve yaşam tarzının gen ifadesinde hatalara nasıl yol açabileceğini açıklar. Genlerin baskılanması ve ifade edilmesi ile ilgili biyolojik olaylar DNA ve histonların sırasıyla metilasyon ve asetilasyon durumlarına dayanmaktadır. Hipermetile bir gen ifade edilemez. Asetillenmiş histonlar ise gen transkripsiyonunu sağlamak için heterokromatinin (yoğun) ökromatine (gevşek veya açık) geçişine izin verir. Epigenetik değişiklikler kişilerin yaşamı boyunca sürebilir ve hatta sonraki nesillere aktarılabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda aterosklerozun başlamasına ve ilerlemesine katılan patofizyolojik olaylar arasında DNA metilasyonunun yanı sıra, epigenetik düzenleyiciler olarak kodlanmayan RNA'lar tanımlanmıştır (Hamilton, 2011).

Son yirmi yıldır RNA'ların protein kodlama görevlerinden daha çok hücrel fonksiyonlar için temel düzenleyici olarak aldıkları görevler önem kazanmıştır. İnsan genom projesinin ortaya çıkardığı verilere göre insan genomunun ~ %2'si protein kodlayan genlerden oluşurken transkripsiyonel aktivitenin ~ %98'i kodlama yapmayan genlerden oluşmaktadır. Protein olarak kodlanmayan bu RNA'ları oluşturan genler kodlanmayan RNA'lar (ncRNA) olarak adlandırılır. ncRNA'lar geniş bir sınıfa sahiptir ve transkript uzunluğuna göre kısa ve uzun kodlanmayan RNA'lar şeklinde sınıflandırılır. (Guttman ve Rinn, 2012). Bu ncRNA'lar genomik DNA boyunca serpiştirilmiştir. ncRNA'lar epigenetik işaretler olarak kabul edilir çünkü ncRNA'lar nükleotid dizisi veya DNA kopya sayısındaki değişiklikleri içermeyen gen ekspresyonunun kontrolüne katılır (Storino ve ark, 2015). ncRNA'lar DNA molekülü üzerinde değişiklikler oluşturmaz, bunlar hedef mRNA'lara bağlanarak post

transkripsiyonel gen ekspresyonunun kontrolünden sorumludur. Bu yolla, ncRNA'lar transkripsiyonu teşvik eder, indirger veya inhibe eder. Böylece pek çok hücrel fonksiyonun kontrolü ncRNA'lara bağlıdır. Ayrıca ncRNA'lar kardiyovasküler sistem de dahil olmak üzere insan patolojisinde önemli oyuncular olarak ortaya çıkmaktadır (Storino ve ark., 2015).

İnsan proteinlerini kodlayan genlerin %60 kadarının transkripsiyonunu yönlendirilen ve mükemmel bir şekilde düzenlenmesinden sorumlu olan en iyi çalışılan ve karakterize edilen kısa kodlanmayan RNA'lardır (mikroRNA). Günümüzde, 5000'den fazla insan mikroRNA'sı tanımlanmıştır. Son yıllarda KVH'larda önemli rol oynayan mikroRNA'lar sadece farklı kardiyovasküler fenotiplerin patogeneziyle ilişkili molekül olarak değil, aynı zamanda akut miyokardiyal enfarktüs, KVH'lar ve kalp yetmezliğinde potansiyel biyomarker olarak belirlenmiştir (Liang ve ark., 2007; Kozomara ve Griffiths, 2011). ncRNA'ların diğer bir sınıfı ise yakın zamanda keşfedilen uzun kodlamayan RNA'lardır (lncRNA).

1.7.1 Uzun Kodlanmayan RNA'lar

lncRNA'lar protein kodlama fonksiyonu olmayan 200 nt den büyük transkriptlerdir (Batista ve Chang, 2013). lncRNA'lar insan gelişiminde ve hastalıklardaki önemli fonksiyonlarıyla epigenetik düzenleyiciler olarak ortaya çıkmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda lncRNA'ların birçok biyolojik işlemde sorumlu olduğu gösterilmiştir. Memeli genomunda yaklaşık 8000 lncRNA tanımlanmıştır (Alberts ve ark, 2014). Çoğu lncRNA RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir ve 5' cap ve poly-A kuyruklarına sahiptir ve birçok durumda kırılmaya uğrarlar (Derrien ve ark, 2012).

lncRNA'ların çeşitli fonksiyonları sayesinde kusursuz şekilde çalışan önemli moleküler mekanizmaları vardır. Wang ve Chang lncRNA'ları moleküler mekanizmalarına bağlı olarak dört kategoride sınıflandırmıştır (Wang ve Chang, 2011).

1-Sinyal lncRNA'lar, lncRNA'ların transkripsiyonu, zamansal ve mekansal kısıtlaması sebebiyle hücrel veya belirli uyarılara bir yanıt olarak moleküler sinyaller şeklinde görev yapar. Bu lncRNA'ların kromatin ve kromatin toplayıcı mekanizmalarla etkileşimi sayesinde çok sayıda genin transkripsiyonel susturulmasına aracılık eder.

2-Decoy (Tuzak) lncRNA'lar proteinlere bağlanarak ve protein uzaklaştırıcı sünger etkisiyle, transkripsiyon faktörleri veya kromatin modifiye edicileri uzaklaştırır, transkriptom içinde büyük değişikliklere neden olur.

3-Guide (Rehber) lncRNA'lar moleküler şaperonlar olarak hareket ederek, belirli kromatin hedeflerine ribonükleoproteinleri yerleştirir. Bu aktivite komşu genlerin *cis*- veya uzakta bulunan genlerin *trans*- ifadelerinde değişikliklere neden olabilir.

4-Scaffold (İskele) lncRNA'lar birçok domaine sahiptir ve böylece bu lncRNA'lar transkripsiyonel aktivasyon veya baskılama gibi fonksiyonları sayesinde kompleks formlar oluşturmak için çeşitli proteinlere bağlanır. Böylece, lncRNA'lar fonksiyonel protein kompleks formu oluşturmak için bir adaptör olarak görev yapar.

lncRNA'lar DNA dahil olmak üzere diğer RNA türleri, proteinler ve hücre içinde mevcut olan makromoleküllerin tümüyle etkileşebilir. lncRNA'lar üzerindeki baz eşleşmesi gerçekleştiren tamamlayıcı alanları, mRNA, mikroRNA ve hatta lncRNA'ları tanıması ve bağlanması için izin verir ve bunların düzenlenmesi için son derece özgül sensörler olarak hareket eder. Protein bağlayıcı alanları ise lncRNA'ların farklı fonksiyonlarıyla ribonükleoprotein partikülleri üreterek proteinler ile etkileşmesine izin verir. Dahası, lncRNA'ların aktivite yeteneği sayesinde konformasyon değiştirmesi için bir dış sinyal tarafından aktive edilerek veya baskılanarak mükemmel düzenleyici makineler haline getirir (Liang ve ark, 2011). lncRNA'ların katlanma kapasiteleri sayesinde, bağlama alanları oluşur ve allosterik değişime uğrama yeteneği sayesinde çift sarmal, saç tokası yapısı, çıkıntı ve pseudoknots gibi termodinamik olarak kararlı ikincil yapılar meydana gelir; bu da kompleks bir yapı oluşturarak üst düzey üçüncül etkileşimler haline dönüşür. lncRNA'ların yüksek katlanma enerjisine sahip olmaları mRNA'lardan ayırt edilmesini sağlar (Guttman ve Rinn, 2012; Mercer ve Mattick, 2013).

1.7.2 Uzun Kodlanmayan RNA'lar ve Ateroskleroz

lncRNA'lar mRNA'lar gibi promotör yapılarına sahiptir ve yaygın bir şekilde genom boyunca ifade edilmiştir. Son zamanlarda lncRNA'lar gen ekspresyonunda önemli düzenleyiciler olarak ortaya çıkmıştır. Örneğin, lncRNA'lar *cis*- oluşumunda komşu genleri düzenleyebilir veya lncRNA'lar ile yakın konumlanmayan genlerin ekspresyonunun düzenlendiği *trans*- hareketin oluşumunda işlev görebilir. lncRNA'lar özellikle KVH'ların başlaması ve gelişiminde önemli rol oynar (Young ve Ponting, 2013). lncRNA'lar transkriptomun epigenetik programını etkileyen ve kromatin modifikasyonu düzenleyen moleküler iskele aracı olarak işlev görerek hastalılarla ilişkili genlerin ekspresyonunu kontrol edebilir (Kaikkonen ve ark., 2011). Hatta, lncRNA'lar gen ekspresyonunun kontrolünde mikroRNA'lar ile etkileşerek endojen

miR süngerler gibi hareket edebilir ve biyolojik işlemlerde aktif bir şekilde yer alabilir. Örneğin, kalp gelişimi sırasında kök hücre farklılaşmasını uyarmak için gen aktivasyonuna veya baskılanmasına neden olan Braveheart adlı lncRNA gösterilmiştir (Klattenhoff ve ark., 2013; Wang ve ark., 2014).

Kardiyogenez, memelilerde mükemmel bir gen ekspresyonu gerektirir ve canlı doğumları arasında en yaygın hata olan yanlış transkripsiyonel düzenlenme doğuştan gelen kalp hastalığının temelini oluşturur (Hao ve ark., 2016). Benzer şekilde, ateroskleroz gibi birçok yetişkin kalp hastalığı transkripsiyonel değişiklikleri içerir ve bazen de gelişimsel temele sahiptir. Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki lncRNA'lar memelilerin kardiyogenez ve genetik kaynaklı kalp hastalıklarında hem de çevresel faktörler aracılığıyla sonradan oluşan kalp hastalıklarının düzenlenmesinde önemli faktörler olarak ortaya çıkmaktadır (Olson, 2006; Matkovich ve ark., 2014).

Birçok lncRNA, kardiyogenez sırasında hücre tipine özgü şekilde ifade olmaktadır. Epigenetik düzenlenme yoluyla gelişim sırasındaki gen ekspresyon profilinde lncRNA Braveheart (Bvht) ve Foxf1 Adjacent Non-coding Development Regulatory RNA (FENDRR) görünürken, kardiyovasküler gelişiminin ayrıntılı tanımlanabilmesi farklı lncRNA'ların da katkı sunduğu düşünülmektedir. lncRNA'ların ifadesi hücre tipine özel olarak düzenlenir ve ateroskleroz gibi kalp hastalıklarının oluşmasıyla ekspresyon değişiklikleri gözlemlenebilir (Viereck ve ark., 2015).

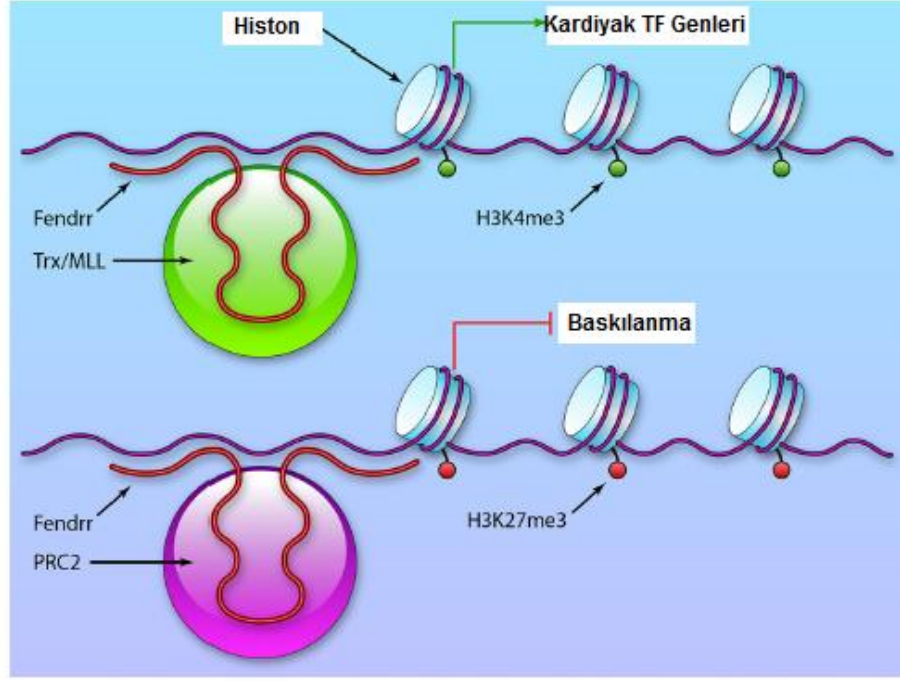
Bu çalışmada plak gelişiminde önemli lncRNA'lar olduğunu düşündüğümüz FENDRR ve Large Intergenic Non-coding RNA-p21 (lincRNA-p21) çalışıldığından bu iki RNA'nın özelliklerinden ayrıntılı bahsedeceğiz.

1.7.3 FENDRR

Memeli kalp gelişimi transkripsiyonel olayların mükemmel şekilde kontrolünü gerektiren sıkı bir düzenlenmedir. Bu yüzden transkripsiyonel işlemlerin bozulması kalp hastalıklarının belli formlarının temelini oluşturur (Srivastava, 2006; Bruneau, 2008). Aynı zamanda kalp gelişimi çeşitli hücre tiplerinin eş zamanlı farklılaşmasına bağlıdır. Bu, kompleks bir yapı içinde organize olmayı gerektirir. (Srivastava, 2006) Uzun kodlamayan transkriptler yüksek seviyede düzenleyici işlemlere katkıda bulunur. Türlerin çoğunda kalbin ilk oluşumu yüksek oranda korunmuş olan çekirdek kardiyak transkripsiyon ağının uyumlu ekspresyonu ile kurulur (Olson, 2006; McCulley ve Black, 2012). Son zamanlarda binlerce lncRNA ve organizmalar arasında dokuya özel ekspresyonlar tanımlanmıştır. Bu transkriptlerin, kardiyak gelişiminde yeni bir

düzenleyici molekül olabileceği gösterilmiştir (Johanna ve Laurie, 2013). lncRNA'ların fonksiyonları önemli farklılıklar gösterir, bu memeli kalp gelişiminde daha kompleks yapıların oluşmasını sağlar. Son zamanlarda lncRNA FENDRR kalbin lateral mezoderm gelişiminde potansiyel bir düzenleyici olarak, tespit edilmiştir. Lateral mezoderm kalp ve ventral vücut duvarı yapılına yol açar. FENDRR, mezodermin başlangıç lateral yüzeyine özgün ifade olur ve bu dokunun kalpte ve vücut duvarında doğru gelişimi için gereklidir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, FENDRR yokluğu fare embriyolarının ölümüyle sonuçlanmış ve embriyolarda açık ventral vücut duvarı hasarı, hipolastik ventriküler ve bozulmuş kalp fonksiyonu görüntülenmiştir (Grote ve ark, 2013).

FENDRR, GATA-6, Nkx2-5, FoxF1, TBX3, IRX3, ve PITX2 gibi önemli transkripsiyon faktörlerinin ifadelerini gen promotörlerinin epigenetik profilini kontrol ederek düzenler. FENDRR, Polycomb baskılayıcı kompleks 2 (PRC2) bileşenleri ile hem de Trithorax grup (Trx6/MLL) kompleksin bir elemanı olan WDR5 ile etkileşim halindedir ve mezoderme özel genleri düzenlemektedir. FENDRR ya PRC2 ya da TrxG/MLL protein kompleksine bağlanarak sırasıyla histon 3'ün lizin 27'de trimetilasyonunu (H3K27me3) ve histon 3'ün lizin 4'de trimetilasyonunu (H3K4me3) indükler (Şekil 5). Bu lncRNA-protein ilişkisi özgül genlerin promotörlerini hedefler. (Grote ve ark, 2013; Papait ve ark, 2013) FENDRR, gelişim sırasında önemli genleri baskılayıcı ve aktive edici işaretler arasındaki dengeyi düzenler. FENDRR genine yakın olan Foxf1a, mezoderm oluşumunda yer alan bir genidir. FENDRR'in insan kalp gelişiminde koruyucu rolü olduğu düşünülmektedir. Birçok kromatin modifikasyon kompleksi ile FENDRR etkileşimi lncRNA biyolojisinde yeni ortaya çıkan bir gelişme olarak görülmektedir (Xu ve ark, 2014).



Şekil 5: FENDRR'ın PRC2 ve Trx/MLL Proteinlerine Bağlanma Mekanizması (Thum ve Condorelli, 2015)

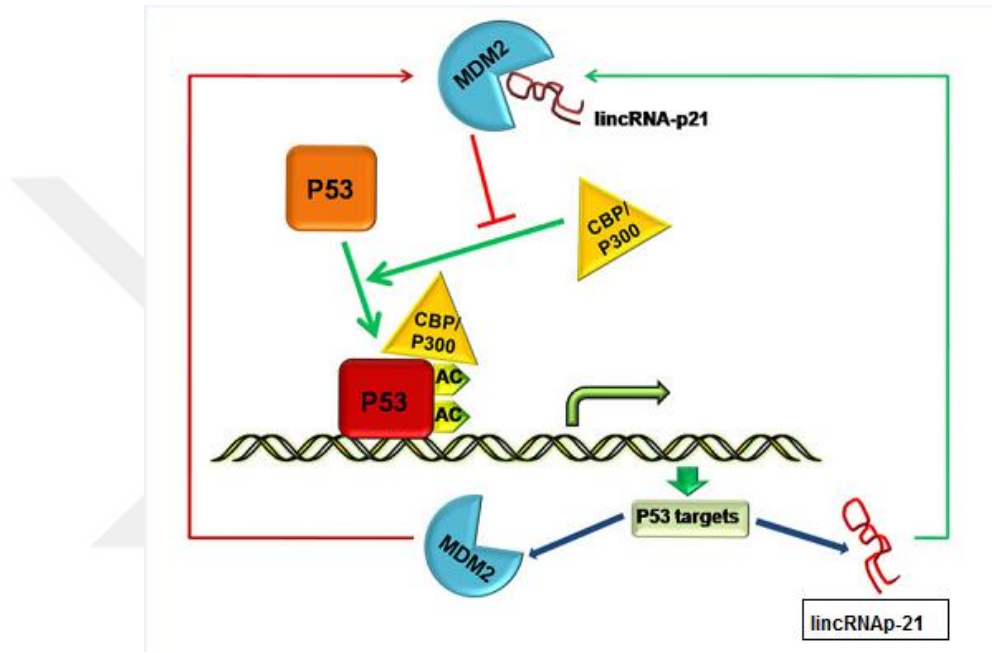
1.7.4 lincRNA-p21

Yaklaşık 3 kb.'lık bir transkript olan lincRNA-p21, hücre döngüsü regülatör geni CDKN1A'nın (p21) yakında yer alır. Başlangıçta lincRNA-p21, p53'ün direkt bir transkripsiyon hedefi olarak tanımlanmıştır. lincRNA-p21 p53 yolağında fonksiyonel bir bileşen olarak görünür ve p53'ün transkripsiyonel yanıtında kritik rol oynar. Fiziksel bir yol ile, p53'ün baskılayıcı bir kompleks ile etkileşimi birçok p53 hedef genini aşağı yönde düzenler (Huarte ve ark., 2010).

p53, hücre döngüsü ve apoptoz kontrolünde gerekli bir moleküldür ve aynı zamanda aterosklerozda önemli bir rol oynar. p53'ün inaktivasyonu ateroskleroz gelişimini harekete geçirir (Mercer ve ark., 2005; Mercer ve Bennett, 2006). p300 ve Mouse double minute 2 (MDM2) içeren bir kompleks ağı p53'ü düzenler. p300, p53 asetilaz aktiviteyi artıran bir asetiltransferazdır (Gu ve Roeder, 1997; Liu ve ark., 1999). MDM2 ise, bir E3 ubiquitin-protein ligazdır ve ubiquitin proteozom yolu aracılığıyla p53'ü degrade eder (Momand ve ark., 1992). MDM2 hem de p300'ün p53 ile etkileşmesini engelleyerek, p53 asetilasyonunu inhibe eder ve p53 aktivitesini düşürür (Şekil 6).

lincRNA-p21 ekspresyonunun koroner arter hastalığı ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için, yapılan bir çalışmada farelerde aterosklerotik lezyon geliştirilmiştir ve

hücrenin çoğalması ve apoptozunda lincRNA-p21 önemli bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır. lincRNA-p21'in ekspresyonu ateroskleroz sebebiyle ApoE^{-/-} (eksik) fare ve insan modelindeki aterosklerotik plaklarda azalmaktadır. Endojen lincRNA-p21 azalması yaralı karotis arterlerde neointima oluşumunu hızlandırmıştır. lincRNA-p21'in doğrudan MDM2'ye bağlandığı, p53-MDM2 etkileşimini azalttığı ve p53-p300 etkileşimini artırdığı bulunmuştur. Sonuç olarak, p53'ün transkripsiyon aktivitesi artmaktadır. Aterosklerotik lezyon gelişiminde ise lincRNA-p21'in ifadesinin azalması p53'ün baskılanmasına neden olur (Wu ve ark., 2014).



Şekil 6: lincRNA-p21'in MDM2 ve p300 Molekülleri Üzerinden p53 Kontrol Mekanizması (Wu ve ark., 2014)

2. MATERYAL METOD

2.1 Örneklerin Toplanması ve Saklanması

2.1.1 Doku Örneklerinin Toplanması

Tez çalışması kapsamında Sivas ili ve çevresinde yaşayan ateroskleroz hastalık teşhisi konmuş ve by pass ameliyatı yapılan hastalardan alınan koroner arter ve İMA dokuları toplandı. Aterosklerotik plak gelişen koroner arter dokusu ve plak gelişmeyen İMA dokusuna ait örnekler ile hasta ve kontrol grubu oluşturuldu. Doku örnekleri 2015 ve 2016 yılı içerisinde Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi'nde alınmıştır. Alınan doku parçaları hemen RNA later (dokuda RNA koruyucu) (Qiagen, Cat No./ID: 76104) içine konulup izolasyon işlemi yapılana kadar -80°C' de saklandı. Proje kapsamında 20 adet koroner arter dokusu, 20 adet İMA dokusu toplandı.

2.1.2 Kan Örneklerinin Toplanması

Tez çalışması kapsamında Sivas ili ve çevresinde yaşayan koroner anjiyografi yapılan anjiyo sonucu damar tıkanıklığı %50 ve altında çıkan kontrol grubunu oluşturan bireylerden (n=44) ve Kalp Damar Cerrahisi-Kardiyoloji Anabilim dalları tarafından ateroskleroz hastalığı kesin tanısı konmuş hasta grubunu oluşturan bireylerden (n=44) kan örnekleri toplandı. Kan örnekleri içinde özel bir sıvı bulunan PAXgene tüplerine (BD, Cat No: 762165) alınıp izolasyon işlemi başlayıncaya kadar -80°C' de saklandı.

2.2. Total RNA İzolasyonu

2.2.1 Dokudan RNA İzolasyonu

Doku örnekleri toplandıktan sonra RNA izolasyon aşamasına geçildi. Dokular RNA later sıvısından uzaklaştırıldıktan sonra steril bisturi ile parçalandı ve 20-30 mg olacak şekilde hassas terazide tartıldı. Tartılan örnekler ilk olarak sıvı azotta parçalandı daha sonra örnek üzerine 700 µl Qiazol Reagent (ThermoFisher, Cat No: 15596026) eklenip oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında dokular homojenize edilmek üzere MagNa Lyser Green Beads (Roche, Cat No: 03358941001) tüplerine alındı. MagNa Lyser (Roche) homojenizatörü kullanılarak 7000 rpm' de 30 saniye boyunca homojenizasyon işlemi yapıldı. Homojenizasyon işlemi dokunun durumuna göre 2-3 kez tekrarlandı. Tekrarlama aşamalarında tüpler homojenizatörden çıkarılıp buz üzerinde en az 1 dakika bekletildi. Tam bir homojenizasyon sağlandıktan sonra

“miRNeasy Mini Kit” (Qiagen, Cat No: 217004) protokolüne uygun olarak dokudan RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. Homojenat içeren tüpe 140 µl kloroform eklenir. Tüp 15 sn çalkalanır (Faz ayrımı gerçekleşir).
2. Homojenat 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
3. Homojenat 12000 g’ de +4C’ de 15 dakika santrifüj edilir. Bu santrifüjden sonra santrifüj sıcaklığı oda sıcaklığına çıkarılır (santrifüjden sonra 3 faz görülür; Üst faz (renksiz faz ve RNA içeren sıvı fazı), ara faz ve organik faz. En üst sıvı faz yaklaşık 350 µl olmalıdır.
4. Yeni bir toplama tüpüne en üst sıvı faz transfer edilir. Üzerine 1.5 hacim (yaklaşık 525 µl) %100 etanol eklenir, şiddetli bir şekilde çalkalanır. Santrifüj edilmez.
5. 700 µl örnek 2 ml’ lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy mini kolona eklenir. 8000g’ de (>10.000 rpm) 15 sn oda sıcaklığında santrifüj edilir. Atık dökülür.
6. Kalan örnek yine aynı kolon eklenir 9. Adımdaki gibi tekrarlanır. Atık dökülür.
7. 700 µl Buffer RWT kolona eklenir. 8000 g’ de 15 sn santrifüj edilir.
8. 500 µl Buffer RPE eklenir. 15 sn 8000 g’ de santrifüj edilir. Atık dökülür.
9. 500 µl Buffer RPE eklenir. 2 dak. 8000g’ de santrifüj edilir.
10. Opsiyonel: RNeasy Mini kolonu yeni bir 2 ml’ lik toplama tüpüne yerleştirilir ve full hızda 1 dak. Santrifüj edilir.
11. RNeasy mini kolonu 1.5ml’ lik toplama tüpüne yerleştirilir ve üzerine 30-50 µl RNaz free su eklenir 1 dakika 8000g’ de santrifüj edilir.

2.2.2 Kandan RNA İzolasyonu

Kandan RNA izolasyonu için modifiye bir izolasyon yöntemi geliştirildi. Öncelikle serum ayırma işlemi gerçekleştirildi. Bunun için PAXgene tüpünde saklanan kan örnekleri aşamalı santrifüj işlemlerinden geçirildi. İlk olarak 1000 µl kan örneği 4500g’ de +4⁰C’ de 10 dakika santrifüj edilip üst faz yeni bir toplama tüpüne alındı, daha sonra 16000g’ de +4⁰C’ de 10 dakika santrifüj edildi ve üst faz yeni bir toplama tüpüne alındı. Çıkan üst faza 1200 µl Qiazol Reagent eklenip 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra “miRNeasy Serum/Plasma Kit” (Qiagen Cat No/ID: 217184) protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Serum ve Qiazol Reagent karışımı üzerine, 400

µl kloroform eklendi 15 sn karıştırıldı. 2 dk oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 12000 g'de 15 dk +4°C'de santrifüj yapıldı. Üst faz yeni bir tüpe alınıp 1,5 hacim %100 etanol eklenip pipetaj yapıldı ve 700 µl örnek 2 ml'lik tüplere yerleştirilmiş miRNeasy mini kolona yüklendi. Oda sıcaklığında 15 sn 11000 g'de santrifüj yapıp atık döküldü. Örneğin artan kısmı için aynı işlem tekrarlandı. Atık döküldükten sonra kolona 700 µl Buffer RWT eklenip oda sıcaklığında 15 sn 11000 g'de santrifüj yapıldı. Atık dökülüp 500 µl Buffer RPE eklendi ve oda sıcaklığında 15 sn 11000 g'de santrifüj yapıldı Atık dökülüp 500 µl %80'lik etanol eklendi ve oda sıcaklığında bu defa 2 dk 11000 g'de santrifüj yapıldı. Toplama tüpü atılıp kolon yeni bir toplama tüpüne alındı. Kapağı açık olarak kurutma amacıyla en yüksek hızda 5 dk santrifüj yapıp toplama tüpü değiştirildi. Yeni 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınan kolana 14 µl RNase içermeyen su eklendi ve 1 dk en yüksek devirde santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen örnekler bir sonraki aşamaya kadar -20°C'de saklandı.

2.3. RNA Konsatrasyonu ve Saflığının Ölçülmesi

İzolasyonu yapılan tüm RNA örneklerinin konsantrasyonu Qubit™ 3.0 Fluorometer ile ölçüldü. 50 ng/ul ve daha üstü çıkan örnekler bir sonraki aşama için -80 °C' de saklandı.

2.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

RNA örneklerinden ters transkripsiyon, "HyperScript First Strand cDNA Synthesis Kit" (GeneAll) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

Örneklerin RNA konsantrasyonları 80 ng/µl eşitlendi ve reaksiyon iki aşamada gerçekleştirildi.

• **1. Aşama:** Aşağıdaki verilen reaksiyon karışımı PCR tüpü içerisinde Tablo 2'ye göre hazırlandı. 65 °C'de 5 dak inkübe edildi. Sonra 1 dak. buz üzerinde bekletildi.

Tablo 2: cDNA Reaksiyon Bileşenleri

Reaktif	Miktarı (µl)
oligo dT + Random hexamer	0,5 µl + 0,5 µl
DNTP	1 µl
RNA	2 µl
RNAaz free su	10 µl

• **2. Aşama:** Birinci aşamadaki reaksiyon bileşenleri üzerine her bir örnek için ayrı ayrı olmak üzere aşağıdaki Tablo 3’de verilen reaksiyon bileşenleri eklendi. 55 °C’de 1 saat, 85 °C’de 5 dak. PCR koşullarına göre reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3: cDNA Reaksiyon Bileşenleri

Reaktif	Miktarı (µl)
10x RTase reaction buffer	2 µl
0,1 M DDT	2 µl
HyperScript™ Reverse Transcriptase (200 U/ µl)	1 µl
ZymAll™ RNase inhibitor	1 µl

2.5 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

lncRNA’ların doku ve kanlardaki ifade seviyeleri gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile analiz edildi. Analiz laboratuarda bulunan “LightCycler 480 RT-PCR” (Roche) cihazı ile “Fast-Plus EvaGreen® Master Mix” (Biotium) kiti kullanılarak Tablo 4’e göre yapıldı. qRT-PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle, RNA miktarını belirleyen bir yöntemdir. qRT-PCR tekniğinde, SYBR green, EvaGreen gibi floresan boyalar veya çeşitli floresan işaretli probalar kullanılarak, çoğaltma işlemi gerçek zamanlı olarak tek bir tüp içerisinde gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada kullanılan EvaGreen floresan boyası amplifikasyonun gerçekleşmesine paralel olarak, çift zincirli DNA’ya bağlanır ve ışığa verir. Verdiği ışığa miktarı, örnekteki spesifik transkriptin ifade seviyesini gösterir. qRT-PCR, Tablo 5’deki kullanım koşullarına göre gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin RNA miktar tayini lncRNA/GAPDH oranı her bir lncRNA’nın hücrelerdeki miktarını normalize etmek için kullanılmıştır ve ortaya çıkan değer her bir lncRNA’nın hücrelerdeki kantitatif değeri olarak kullanılır. qRT-PCR reaksiyonunda, floresan düzeyinin cihaz tarafından ölçülebilen eşik değeri aştığı döngü sayısı Ct değeri olarak adlandırılır. Elde edilen Ct değerine göre, $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplandıktan sonra $2^{\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak gen ekspresyon seviyeleri hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır.

Tablo 4: qRT-PCR Reaksiyonu Reaktif Miktarları

Reaktif	Miktarı (µl)
EvaGreen master mix	10 µl
10 pmol (F+R) primer	1 µl
cDNA	2 µl
RNAaz free su	7 µl

Toplam: 20 µl

Tablo 5: qRT-PCR kullanım koşulları

	Pre-inkübasyon	2'	95 °C
45 döngü	Deaturasyon	5"	95 °C
	Annealing	5"	60 °C
	Uzama	25"	72 °C

• Normalizasyon

RNA miktarının doğru bir şekilde belirlenebilmesi için her bir genin ekspresyonu referans (housekeeping) gen Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ile karşılaştırılarak normalizasyon işlemi yapıldı.

• Deneyde Kullanılan Primerler

FENDRR primeri Primer3 Output ve Primer Blast programları kullanılarak dizayn edilmiştir. Tablo 6'da kullanılan primerlerin dizisi ve amplicon boyu verilmiştir.

Tablo 6: Kullanılan Primer Dizileri

Gen Adı	İleri yönlü primer F (5'-3')	Ters yönlü primer R (5'-3')	Amplicon boyu (bp)
FENDRR	TCTTGTCTTTGTAATCAGGCAG	GGAGGTATTTTCAGTTCTGTCGT	460
lincRNA-p21	CAGGGTGCCAGAAGAGTGAG	AGACTAAAGCTCCTACTTCAGCAG	222
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87

• Verilerin Analizi

Analiz "RT2 Profiller RT-PCR Array Data Analysis version 3.5" yazılımı kullanılarak yapılmıştır. P değeri, kontrol grubu olarak kullanılan İMA doku örneklerine göre hasta grubu koroner arter doku örneklerindeki her bir gen için tekrarlayan $\Delta\Delta CT$ (delta delta ct) değerleri a student's t-testi baz alınarak hesaplanmıştır. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

RT2 Profiller RT-PCR Array Data Analysis version 3.5 yazılımı RT-PCR verilerini "Comparative C_T Metodu ($\Delta\Delta C_T$) ile analiz etmektedir. $\Delta\Delta C_T$ metodu hedef

gen ile kalibratör (Referans) gen arasındaki ekspresyon değişimlerini 2001 yılında Livak ve Schmittgen tarafından geliştirilen formülasyonla belirler. (Livak ve Schmittgen 2001) Plak dokusu ve İMA dokusunda bireylerin FENDRR, lincRNA-p21 ve GAPDH ifadelerinin ortalaması alınarak aşağıdaki formülasyonda ifade farkları hesaplanmıştır.

$$C_T(\text{Hedef gen}) - C_T(\text{Referans gen}) = \Delta C_T$$

$$\Delta C_T(\text{İlgili doku}) - \Delta C_T(\text{Kontrol doku}) = \Delta \Delta C_T$$

$$\text{Göreceli Kat artışı} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

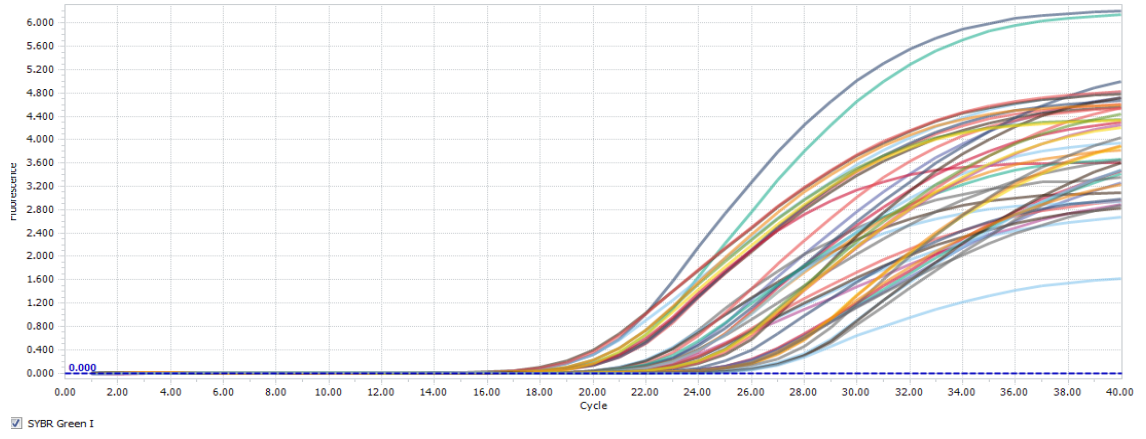


3. BULGULAR

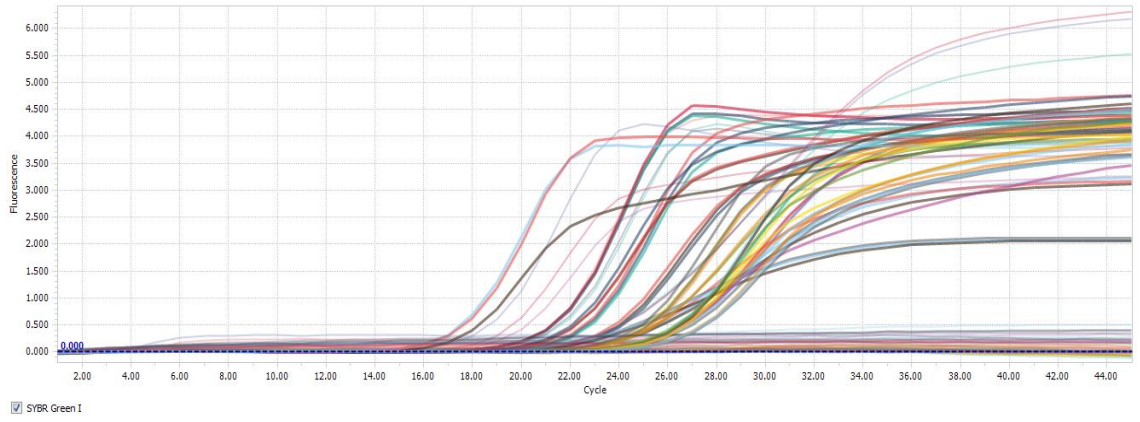
Bu çalışma 31.03.2015 tarih ve 2015-03/63 karar no'lu Etik Kurul izni alındıktan sonra 2015-2016 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız bypass cerrahisi sırasında sağlanan 40 dokuda (plaklı 20 koroner arter, plaksız 20 İMA dokusu) ve koroner anjiyografi sırasında alınan kan örneklerinde (44 hasta, 44 kontrol) gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubu kan ve dokularda hasta ve kontrol olmak üzere iki grup şeklinde oluşturuldu. Plaklı koroner arter dokusu hasta, plak gelişmeyen İMA dokusu kontrol olarak seçildi. Koroner anjiyografi yapılan anjiyo sonucu normal çıkan bireylerden alınan kan ile kontrol grubu ve damarlarının tıkalı olduğu görülen bireyler ile hasta grubu oluşturuldu. Koroner arter ile İMA dokuları ve kan örneklerinde hasta-kontrol grubuna ait lncRNA FENDRR ve lincRNA-p21'in ifade düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu lncRNA'ların ateroskleroz hastalığı ile ilişkisini belirlemek amacıyla ekspresyonuna qRT-PCR yöntemi ve $\Delta\Delta CT$ metodu ile bakıldı (Tablo 8).

Verilerin analizi "RT2 Profiler RT-PCR Array Data Analysis Version 3.5" yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Kontrol grubu olan İMA doku örneklerine göre plaklı koroner arter dokularında lncRNA FENDRR ve lincRNAp-21'in ifadelerinin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 14). FENDRR'in ifadesinin 2.16 kat azaldığı ($p=0.264$), lincRNAp-21'in ifadesinin 6.7 kat azaldığı ($p=0.705$) görülmüştür (Tablo 7). İMA dokularına oranla koroner dokularındaki FENDRR ve lincRNAp21'in ekspresyonlarındaki azalma biyolojik olarak anlamlı bulunmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p>0.05$)

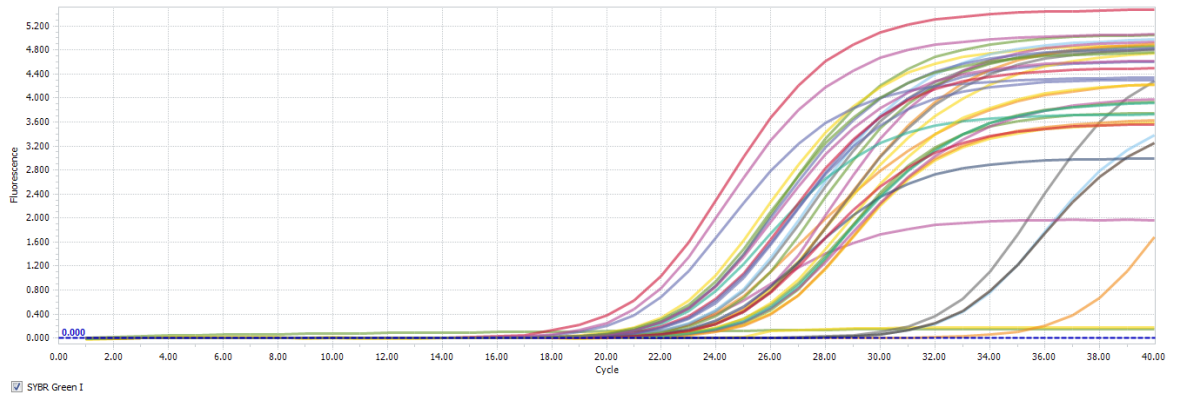
Hasta-kontrol dokuları ve kan serumuna ait amplifikasyon eğrileri FENDRR, lincRNA-p21 ve GAPDH için ayrı ayrı verilmiştir (Şekil 7, Şekil 8, Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11, Şekil 12, Şekil 13).



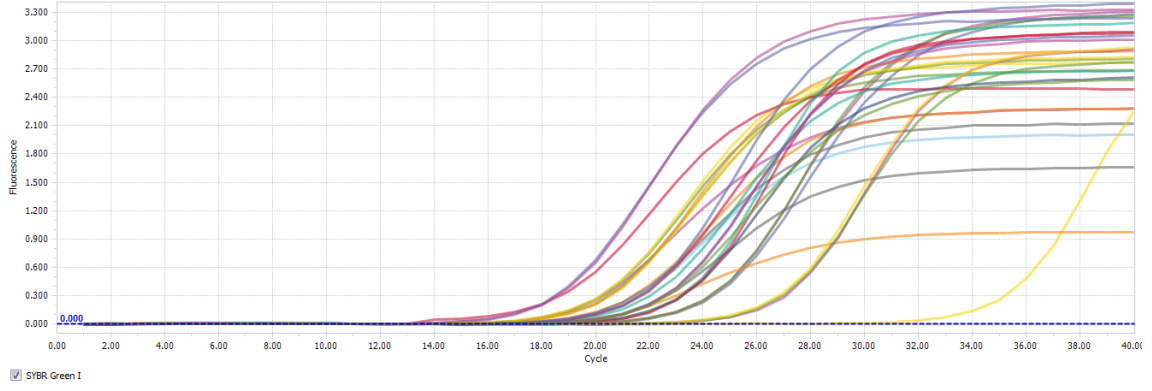
Şekil 7: İMA dokusundaki FENDRR ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.



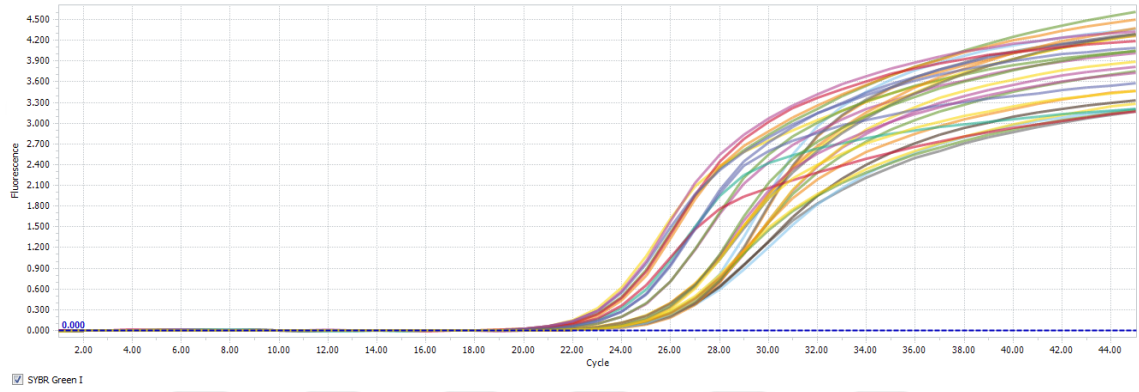
Şekil 8: İMA dokusundaki lincRNA-p21 ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.



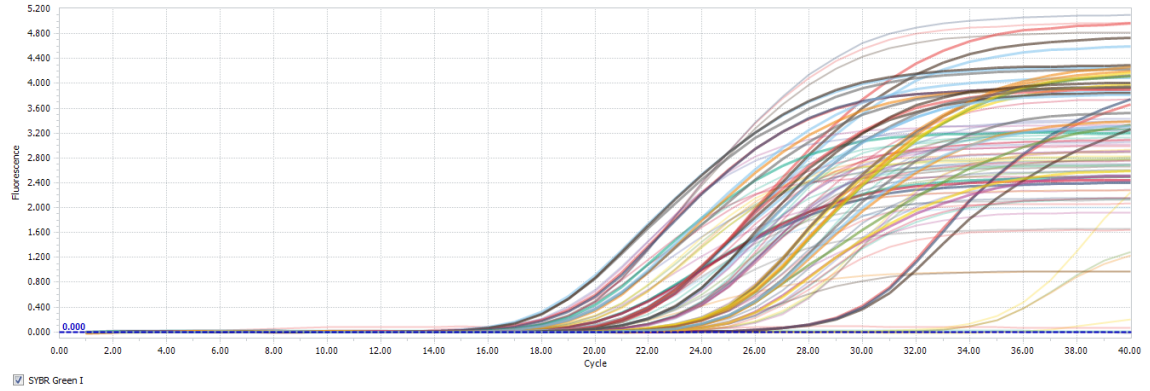
Şekil 9: İMA dokusundaki GAPDH ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.



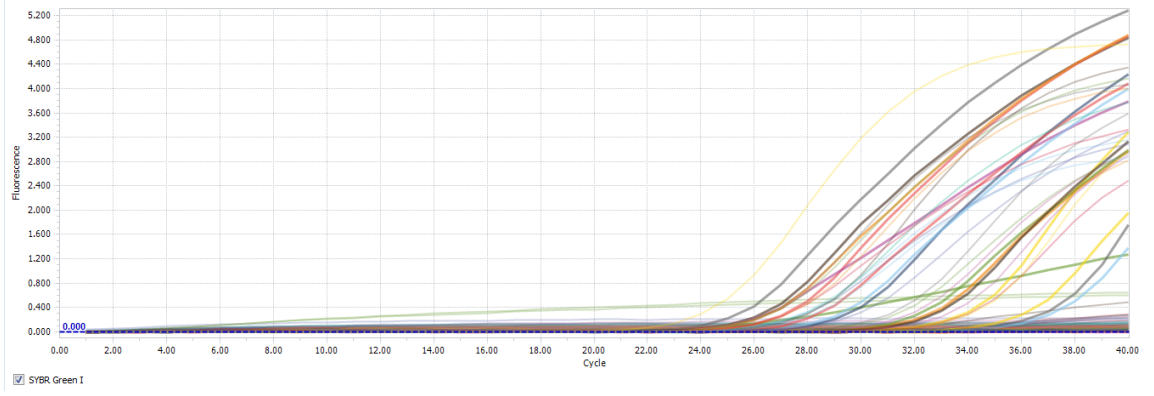
Şekil 10: Koroner arter dokusundaki FENDRR ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.



Şekil 11: Koroner arter dokusundaki lincRNA-p21 ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.



Şekil 12: Koroner arter dokusundaki GAPDH ifadesinin amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.



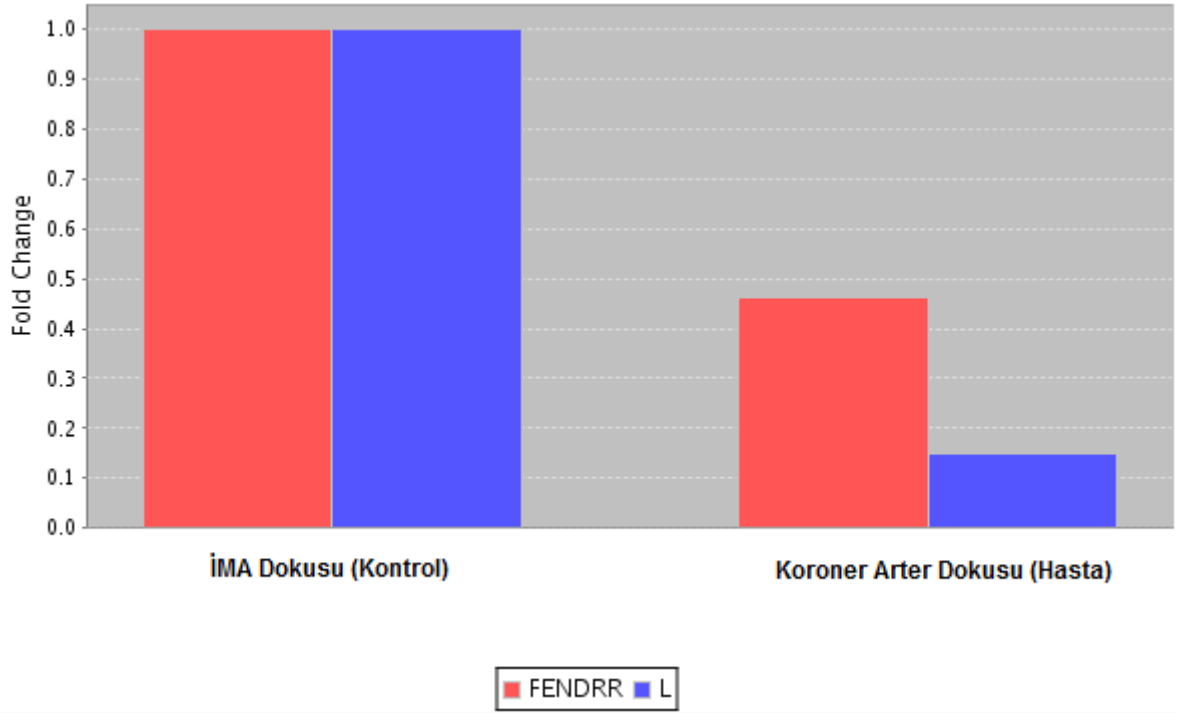
Şekil 13: Hasta serumundan elde edilen örneklerde FENDRR ifadesine ait amplifikasyon eğrisi. Her bir örnek üç reaksiyon tekrarı yapılarak çalışılmıştır.

Tablo 7: Koroner Arter ve İMA dokularında FENDRR ve lincRNA-p21'in RNA Düzeylerinin Karşılaştırılması

Gen Adı	Koroner Arter Dokusu	İMA Dokusu	P Değeri ($p > 0,05$)
	(n= 20) Kat Artışı	(n= 20)	
FENDRR	-2.16	1	0.264
LincRNA-p21	- 6.7	1	0.705
GAPDH	1	1	0

Tablo 8: Kontrol (İMA dokusu) ve Hasta (Koroner arter dokusu) Gruplarında Ortalama Ct Değerleri ve Kat Artışı

	Avg C _T		Kat Artışı	
	Kontrol	Hasta	Koroner Arter Dokusu	
			Kat Artışı	FENDRR ve lincRNA-p21 GAPDH'e göre ifade oranı
FENDRR	23,09	22,82	0,4635	-2,16
lincRNA-p21	22,81	24,18	0,1493	-6,7
GAPDH	23,65	22,27	1	1



Şekil 14: FENDRR ve lincRNAP-21'in gen ekspresyon düzeyi, kontrol grubu olarak seçilen İMA dokularına oranla plaklı koroner arter dokularındaki katlı oran değişimi grafiksel şekilde gösterilmiştir.

Yaptığımız bu çalışmada PAXgene tüpünde saklanan kandan “miRNeasy Serum/Plasma Kit” (Qiagen) kit yöntemiyle kan serumundan izole ettiğimiz total RNA içinden ilgili primerlerle yaptığımız ekspresyon çalışmasında her iki grupta (kontrol ve hasta) kan serumundan elde edilen total RNA’da FENDRR ve lincRNA-p21 ifadesine rastlanmamıştır. Bu sonuç 3099 bp (FENDRR) ve 2882 bp (lincRNA-p21) büyüklüğündeki bu RNA’ların seruma geçiş yapamadıkları için ifadesinin bulunmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4. TARTIŞMA-SONUÇ

Bazı lncRNA'ların mekanizmaları aydınlatılmış ve bu moleküllerin birçoğunun insan KVH'larının farklı tiplerinde ifade düzeylerinin değiştiği belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında, kardiyovasküler gelişim ve hastalıklar ile ilişkilendirilmiş iki önemli lncRNA olan FENDRR ve lincRNA-p21'in plak gelişen ve gelişmeyen dokulardaki ifade farklılıkları araştırıldı.

Bir lncRNA olan FENDRR farelerde kalp ve vücut duvarının doğru gelişimi için gereklidir. Polycomb baskılayıcı kompleks 2 (PRC2) ve Trithorax group/MLL protein kompleks her ikisine de bağlanabilen FENDRR, kromatin yapısının kontrolünde ve gen aktivitesinde önemli rol oynar. Bu lncRNA-protein ilişkisi spesifik genlerin promotorlarını hedefler. Kalp gelişiminde önemli bir lncRNA olan FENDRR'in ekspresyonu ile hücre proliferasyonunun artmasıyla ilerleyen aterosklerotik plak gelişimi arasında bir bağlantı olup olmadığı araştırılmıştır.

Khalil ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada lncRNA FENDRR ilk kez tanımlanmış ve PRC2'ye bağlanma fonksiyonları doğrulanmıştır (Khalil ve ark., 2009). Daha sonra Grote ve ark.'ları tarafından kalp ve vücut duvarının gelişiminde FENDRR'in gerekli bir düzenleyici olduğu bulunmuştur (Grote ve ark., 2013). Son çalışmalar, lncRNA'ların çeşitli patolojik durumlar sırasında düzensizleştirildiğini ortaya çıkarmıştır. Fakat FENDRR'in KVH'lar ile ilişkisi henüz anlaşılammıştır ve şu ana kadar ateroskleroz plak gelişiminde FENDRR'in rolü belirlenememiştir. FENDRR ekspresyonunun ateroskleroz plak gelişiminde değişip değişmediği merak konusu olmuştur. Bu çalışmada ilk kez plak gelişen koroner arter dokusu ve plak gelişmeyen İMA dokusunda FENDRR ifadesi belirlendi. Ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında plak gelişen koroner arter dokularında FENDRR'in ifadesinin İMA dokularına göre 2.16 kat azaldığını gördük. FENDRR, gen promotorlarının epigenetik profillerini kontrol ederek GATA-6, FOXF1, IRX3, NKX2-5, PITX2 ve TBX3 gibi önemli kardiyak transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu düzenler. Kardiyak transkripsiyon faktörlerinin bir alt kümesi olan NKX2-5 ve GATA-6 Ekspresyonu, FENDRR fonksiyon kaybı olan kalplerde doğuştan gelen kalp defektinin nedenidir.

FENDRR'in ekspresyonunda oluşan değişiklikler, genlerin promotorlarındaki histon metilasyon durumundaki değişikliği yansıtmaktadır. Epigenetik olaylardaki değişikliklerin ateroskleroz da dahil olmak üzere KVH patogenezinin katılımı

bilinmektedir. FENDRR'in bozulan ifadesi, ateroskleroza yol açan süreçte damar duvarının yeniden modellenmesine katılan genler üzerinde epigenetik olarak hareket edebileceğini düşündürmektedir. lncRNA'ların değişen ifadesi literatürde bir terapötik hedef olarak değerlendirilmekte ve çalışmalar devam etmektedir.

Kalp patolojisi ile bağlantılı olan FENDRR, PRC2 kompleksine bağlanır ve post-transkripsiyonel histon modifikasyonlarından biri olan transkripsiyonel baskılanma ile bağlantılı Histon3'de Lizin27'nin trimetilasyonunu (H3K27Me3) indükler. İyi araştırılmış post-transkripsiyonel histon modifikasyonu olan H3K27Me3 aynı zamanda transkripsiyonel baskılanma ile de bağlantılıdır. Wierda ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada H3K27Me3 modifikasyonu ve aterosklerotik plak gelişim aşaması arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda gelişmiş aterosklerotik plakların damarlarında H3K27Me3 modifikasyon global seviyesindeki bir azalma olduğu doğrulanmıştır. H3K27Me3'nin kaybı hücre proliferasyonu ile ilişkilidir ve H3K27Me3'nun azalması aterosklerotik plak gelişimini ilerletmektedir (Wierda ve ark., 2015). İmmünohistokimya kullanılarak, Alkemade ve ark.'ları apoE nakavt fare modelinde yaptığı başka bir çalışmada ateroskleroza katkı sağlayan faktörler arasında histon lizin metilasyon işaretleri belirlenmiştir. ApoE^{-/-}'nin vasküler düz kas hücrelerinde histon modifikasyonu ve diyete-bağlı hiperkolesterolemi arasında bir ilişki bulunmuştur. Özellikle VDKH'lerinde global H3K27Me3 seviyesinde önemli bir azalma belirlenmiştir (Alkemade ve ark., 2010). Bu durum genel olarak plak oluşumunda VDKH'lerinin proliferasyonunu tetikleyebilir.

Yapılan bu tez çalışmasında FENDRR'in ifadesinin koroner arter dokularında İMA dokularına oranla 2,16 kat azaldığı belirlenmiştir. Genin H3K27Me3 yoluyla susturulması PRC2 tarafından düzenlenmektedir. PRC2'ye bağlanabilen bir lncRNA olan FENDRR'in, plaklı dokulardaki azalmış ifadesi H3K27Me3'nunun azalmasına yol açarak moleküler olarak patolojik bir durum oluşturabilir. Bu durumda koroner arter dokularında VDKH proliferasyonuna neden olabilir ve aterosklerotik plak gelişim patofizyolojisine katkı sağlayabilir. İleriki çalışmalarda kantitatif analizlerle plak dokularındaki H3K27Me3 metilasyon seviyesinin azalıp azalmadığı araştırılabilir.

Bu çalışmada bypass cerrahisi sırasında ilk kez plaklı koroner arter ve plak gelişmeyen İMA dokularındaki lncRNA-p21 ifadesi araştırılmıştır. Wu ve ark.'larının yaptığı çalışma ile uyumlu olarak koroner arter ve İMA dokularında yapılan qRT-PCR sonucunda, İMA dokularına göre aterosklerotik plak gelişen koroner arter dokularındaki

lincRNA-p21'in ifadesinin 6.70 kat azaldığını gördük. Normal şartlarda, lincRNA-p21 doğrudan MDM2'ye bağlanmaktadır, bu bağlanma MDM2-p53 kompleksinin oluşmasına yol açar ve p53 aktivitesini azaltır. p53, hücre döngüsü ve apoptoz kontrolünde gerekli bir moleküldür, aynı zamanda aterosklerozde VDKH'lerinin apoptoz yolağına girmesini sağlayarak plak gelişimini uyarır. lincRNA-p21'in ifadesinin azalmasıyla plak gelişimi arasındaki bağlantı p53'ün ifadesinin artması üzerinden gelişen olaylarla açıklanabilir. p53 moleküler mekanizması üzerinden VDKH çoğalmasını baskılayarak ve apoptozu uyararak oluşturabilir. lincRNA-p21 doğrudan MDM2'ye bağlanır, p53-MDM2 etkileşimi azalır ve p53-p300 etkileşimi artar. Sonuç olarak, p53'ün transkripsiyon aktivitesi artmakta ve aterosklerozun patogeneğinde etkili olmaktadır. lincRNA-p21 gibi ncRNA'ların aktivitesinin modülasyonu ateroskleroz gibi insan KVH'larının tedavi edilmesi için yeni bir terapötik yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

Wu ve ark.'larının yaptıkları çalışmada lincRNA-p21'in ateroskleroz patojenezindeki fonksiyonel rolü araştırılmıştır. Aterosklerozda yaygın kullanılan bir hayvan modeli olan, ApoE^{-/-} yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin aortik aterosklerotik plaklarındaki lincRNA-p21 ifade seviyesi incelenmiştir. lincRNA-p21 ekspresyonunun ApoE^{-/-} farelerin aortik plakları yabani tip kontrol fareleri ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur ve bu bulguyla lincRNA-p21'in aterosklerozda rol alabileceği fikri ortaya atılmıştır. Daha sonra, hücre çoğalması ve apoptozda lincRNA-p21'in fonksiyonu araştırılmıştır. Fare lincRNA-p21 ve insan lincRNA-p21 ekspresyonunu engellemek için siRNA tasarlanmış lincRNA-p21'in RAW264.7 fare makrofaj hücre hattında ve insan HA-VSMC hücre hattındaki inhibisyonu hücre proliferasyonu ile sonuçlanmıştır. Bu veriler lincRNA-p21'in hücre çoğalmasını baskıladığı ve apoptozu uyardığını göstermektedir (Wu ve ark., 2014).

Moleküler mekanizmasını aydınlatmak için hücre çoğalması, apoptoz ve ateroskleroz üzerine lincRNA-p21 ve p53'ün etkileşimi araştırılmıştır. İnsan VDKH'lerinde p53'ü aşırı ifadesinin lincRNA-p21'in ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir. p53'ün aşırı ifade olması VDKH çoğalmasını ve canlılığını inhibe etmiş, doğrudan hücre sayımında belirgin bir azalma kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar lincRNA-p21'in fonksiyonunun hücre çoğalması ve apoptozunu p53 yolu ile düzenlediğini göstermektedir.

Daha sonra, klasik fare karotis arter yaralanması modeli kullanılarak, *in vivo* neontimanın oluşumunda lincRNA-p21'in katılımı araştırılmıştır. lincRNA-p21 siRNA fare karotid arterlerinin yaralı alanları içine enjekte edilmiştir. Bu fareler 1 ay boyunca yüksek yağlı diyetle beslendikten sonra neontima oluşumu gözlenmiştir. lincRNA-p21 ifadesini baskılamak için yapılan si-lincRNA-p21 enjeksiyonundan sonra yaralı karotid dokularında ifadesi azaldığında intima-medianın kalınlığında önemli bir artış olduğu gösterilmiştir. Son olarak, düzensiz lincRNA-p21 ekspresyonunun koroner arter hastalığı ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için, koroner arter hastalarının koroner arter dokularından ve kontrol hastalarının koroner dokularından total RNA'lar kullanılarak insan lincRNA-p21'in ifadesi incelenmiştir.

Sonuç olarak, yapılan bu tez çalışmasında koroner arterli hastalar kontrol hastalarıyla karşılaştırıldığında lincRNA-p21 ifadesinin 6,7 kat azaldığı bulunmuştur. Bugüne kadar yapılan araştırmalar göstermiştir ki; ateroskleroz ve koroner arter hastalığının gelişimindeki lincRNA-p21 patogenezin oluşumuyla ifadesi azalan bir moleküldür. Yaptığımız bu çalışmanın sonuçları da plak gelişimiyle lincRNA-p21 ifadesinin azaldığını göstererek bu ilişkiyi doğrulamıştır.

Daha çok hastada lincRNA FENDRR ve lincRNA-p21 ekspresyon analizi yapılması, bu lincRNA'lar ve ateroskleroz ve KVH arasındaki ilişkinin tam olarak ortaya konulmasını sağlayacaktır.

Gen ifadenmesinin yeniden düzenlenmesi, kalp hastalıklarının belirli formlarının patolojik temelidir. lincRNA'lar farklı fizyolojik ve patolojik düzenlemelerde giderek artan şekilde önemli gen ekspresyonu modülatörleri olarak kabul edilmiştir. Son çalışmalar kalp hastalıklarında -pek çok hastalıkta olduğu- gibi sadece kalıtsal ya da çevresel faktörlerin değil gen ifadesini düzenleyen epigenetik mekanizmaların araştırılmasına duyulan gereksinimi arttırmıştır. Patofizyolojiyi etkileyen epigenetik mekanizmalar bu ve benzer çalışmalarla açıklanmaya çalışılmaktadır. İfadelerinin plak oluşumuyla azaldığını gösterdiğimiz FENDRR ve lincRNA-p21'in hedef moleküllerinin ifadelerini araştırmak ileri çalışmalar için hipotez oluşturacaktır. Ayrıca bu lincRNA moleküllerinin kandaki ifade değişimlerinin dokudaki ifadeleriyle korele olduğunun gösterilmesi patogenezin açıklanmasına ışık tutmaktadır ve ilaç geliştirme çalışmaları için ileri çalışmalarla desteklenerek tedavi amaçlı kullanılabilir.

5. KAYNAKLAR

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2014). Molecular Biology of THE CELL, Sixth Edition, Garland Science
- Atkins G.B, Jain M.K. Hamik A. (2011). Endothelial differentiation: Molecular mechanisms of specification and heterogeneity. *Arterioscler Thoromb Vasc Biol*, 31:1476.
- Batista P.J., Chang H.Y. (2013). Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell*, 152:1298–1307.
- Bernstein, E. ve Allis, C. D. (2005). RNA meets chromatin. *Genes Development*, 19, 1635-1655.
- Bombeli T., Mueller M., Haeberli A. (1997). Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thoromb Haemost*, 77:408-423.
- Boren J. et al. (1998). Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL reseptor binding. *J. Clin. Invest*, 101:2658-2664.
- Boring L., Gosling J., Cleary M., Charo I.F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394:894-897.
- Bruneau B.G. (2008). The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature*, 451: 943–948.
- Collins R.G. et al. (2000). P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM-1) deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Exp. Med*, 191:189-194.
- Cox J.L., Chiasson D.A., Gotlieb A.I. (1991). Stranger in a strange land: The pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Prog Cardiovasc Dis*, 34: 45-68
- Cyrus T. et al. (1999). Disruption of 12/15-lipoxygenase diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J. Clin. Invest*, 103:1597-1604.

- Davies P.F., Civelek M., Fang Y. et al. (2010). Endothelial heterogeneity associated with regional athero-susceptibility and adaptation to disturbed blood flow in vivo. *Semin Thromb Hemost*, 36:265.
- Derrien T., Johnson R., Bussotti G., Tanzer A., Djebali S., Tilgner H., Guernec G., Martin D., Merkel A., Knowles D.G., Lagarde J., Veeravalli L., Ruan X., Ruan Y., Lassmann T., Carninci P., Brown J.B., Lipovich L., Gonzalez J.M., Thomas M. et al. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 22: 1775–1789.
- Dong Z.M. et al. (1998). The combined role of P- and E- selectins in atherosclerosis. *J. Clin. Invest*, 102:145-152.
- Douglas J.S, Jr. (1994). Percutaneous approaches to recurrent myocardial ischemia in patients with prior surgical revascularization. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 19 6: 98-108.
- Elena Galkina and Klaus Ley (2009). Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*, 27:165-197.
- Enar Rasim (2006). Ateroskleroz-Aterotromboz. *Sempozium Dizisi*, No:52;s.9-27.
- Febbraio M. et al. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerosis lesion development in mice. *J. Clin. Invest*, 105:1049-1056.
- Flohr T, Stierstorfer K, Raupach R, Ulzheimer S, Bruder H. Performance evaluation of a 64-slice CT system. *Rofo* 2004; 176: 1803-10.
- Fyfe A.I., Qiao J.H., Lusis A.J. (1994). Immune deficient mice develop typical atherosclerotic fatty streaks when fed an atherogenic diet. *J. Clin. Invest*, 94:2516-2520.
- Gerhard, G.T., Duell, P.B. (1999). Homocysteine and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol*, 10;417-429.
- Gimbrone, M.A Jr. (1999). Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherosclerosis. *Am. J. Pathol*, 155:1-5.
- Goldbourt,U., Neufeld, H.N. (1988). Genetic aspect of atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 6:357-377.

- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., Brown, M.S. (1979). Binding sites on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 76:333-337.
- Gomez, D., Owens, G.K. (2012). Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 95:156.
- Grainger, D.J., Kemp P.R., Liu A.C., Lawn R.M., Metcalfe J.C. (1994). Activation of transforming growth factor- β is inhibited in transgenic apoprotein (a) mice. *Nature*, 370:460-462.
- Grote, P., Wittler, L., Hendrix, D., Koch, F., Wahrisch, S., Beisaw, A., Macura, K., Blass, G., Kellis, M., Werber, M., Herrmann, B.G. (2013). The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev Cell*, 24:206–214.
- Gu, W., Roeder, R.G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. (1997). *Cell*, 90:595–606.
- Gu, L. et al. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein-deficient mice. *Mol. Cell*, 2:275-281.
- Guttman, M., Rinn J.L., Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. (2012). *Nature*. 482:339–346.
- Gwendalyn, J. Randolph (2014). Mechanisms That Regulate Macrophage Burden in Atherosclerosis. *Circ Res.*, 114:1757-1771.
- Hamilton, J.P. (2011). Epigenetics: principles and practice. *Dig. Dis*, 29(2): 130–135.
- Hansson, G.K. (2005). Inflammation, Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. *N. Engl J Med*, 352:1685-95.
- Hansson, G.K., Libby P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 6:508-19.
- Hao, Li, Hongming, Zhu, Junbo, Ge (2016). Long Noncoding RNA: Recent Updates in Atherosclerosis. *Int. J. Biol. Sci*, 12(7): 898-910.
- Hermansson, A., Ketelhuth, D.F., Strodhoff, D. et al. (2010). Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. *J Exp. Med.*, 207:1081.

- Hofmann, M.A. et al. (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97:889-901.
- Huarte, M., Guttman, M., Feldser D., Garber M., Koziol M.J., Kenzelmann-Broz D., Khalil A.M., Zuk O., Amit I., Rabani M., Attardi L.D., Regev A., Lander E.S., Jacks T., Rinn J.L. (2010). A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*, 142:409–19.
- Johanna, C. and Laurie, A. (2013). Getting to the heart of the matter: long non-coding RNAs in cardiac development and disease. *The Embo Journal*, 3;32(13) :1805-1816.
- Kaikkonen M.U., Lam M.T.Y., Glass C.K. (2011). Noncoding RNAs as regulators of gene expression and epigenetic. *Cardiovasc Res*, 90, 430-440.
- Khalil Ahmad M., Guttman M., Huarte M., Garber M., Raj Arjun, Morales Dianali R., Thomas Kelly, Presser A., E. Bernstein E. B., Oudenaarden A.Van, Regev A., Lander S. Eric, and Rinn L. John (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*; 106, 11667-72.
- Klattenhoff C.A., Scheuerman J.C., Surface L.E., Bradley R.K., Fields P.A., Steinhauser M.L, Ding H., Butty V. L., Torrey L., Haas S. (2013). *Cell*, 152, 570-583.
- Knowles J.W. et al. (2000). Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-) apoE(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J. Clin. Invest*, 105:451-458.
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.*,39:D152–D15.
- Krystal Archer, Zuzana Broskova, Ahmed S. Bayoumi, Jian-peng Teoh, Alec Davila, Yaoliang Tang, Huabo Su and Il-man Kim (2015). *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 23651-23667.
- Liang Y., Ridzon D., Wong L., Chen C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*, 8:166.
- Liang J.C., Bloom R.J., Smolke C.D. (2011). Engineering biological systems with synthetic RNA molecules. *Mol Cell.*, 43:915–926.

- Libby P. (1999). Changing concepts of atherosclerosis. *J. Intern. Med.*, 247:349-358.
- Libby, P. (2001). Current Concepts of the pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation*, 104: 365-372.
- Libby P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420: 868–874.
- Libby P., MD; Paul M. Ridker, MD; Attilio Maseri, MD (2002). Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*, 105:1135-1143.
- Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473:317.
- Libby P., Hansson G.K., Lichtman A.H. (2013). Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: From mice to humans. *Immunity*, 38:1092.
- Libby P. (2015). Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine., Part VI, Chapter 41, 873-877.
- Libby P., Theroux P. (2005). Pathophysiology of coronary arter disease. *Circulation*, 111(25):3481-8.
- Liu L., Scolnick D.M., Trievel R.C., Zhang H.B., Marmorstein R., Halazonetis T.D., Berger S.L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol.*, 19:1202–9.
- Livak K. J., Schmittgen T. D., (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*, 402-8
- Lusis A.J., Weinred A., Drake T.A. (1998). Textbook of Cardiovascular Medicine. Topol E.J. editor. Lippincott-Raven; Philadelphia,p.2389-2413.
- Lusis A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801): 233-241
- Marathe S., Kuriakose G., Williams K.J., Tabas I. (1999). Sphingomyelinase, an enzyme implacated in atherogenesis, is present in atheroslerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol*, 19:2648-2658.
- Matkovich S.J, Edwards J.R., Grossenheider T.C.et al. (2014). Epigenetic coordination of embriyonic heart transcription by dynamically regulated long noncoding RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111:12264-12269.

- Mayerl C., Lukasser M., Sedivy R. et al. (2006). Atherosclerosis research from past to present on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch*, 449:96.
- McCulley D.J., Black B.L. (2012). Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Curr Top Dev Biol*, 100: 253–277.
- Mehrabian M., Wen P.Z., Fislser J., Davis R.C. Lusis A.J. (1998). Genetic loci controlling body fat, lipoprotein metabolism, and insulin levels in multifactorial Mouse model. *J. Clin. Invest*, 101:2485-2496.
- Mercer J., Figg N., Stoneman V., Braganza D., Bennett M.R. (2005). Endogenous p53 protects vascular smooth muscle cells from apoptosis and reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Circ Res.*, 96:667–74.
- Mercer J., Bennett M. (2006). The role of p53 in atherosclerosis. *Cell Cycle.*, 5:1907–9.
- Mercer T. R., Dinger, M. E., Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*, 10, 155–159.
- Mercer T.R., Mattick J.S. (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat Struct Mol Biol.*, 20:300–307.
- Minna U. Kaikkomen, Michael, T. Y. Lam, and Christopher K. Glass (2011). *Cardiovascular Research*, 90, 430-440.
- Mizuno, Y., Jacob, FR. Mason, PR. (2011). Inflammation and development of atherosclerosis: effects of lipid-lowering therapy. *J Atheroscler Thromb*, 8(5):351-8.
- Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D., Levine A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69:1237–45.
- Motwani J.G., Topol E.J. (1998). Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation*, 97: 916-31.
- Moulton K.S., Folkman J. (1999). Molecular Basis of Cardiovascular Disease. Chien, K.R. (Ed.), Saunders; Philadelphia, 393-410.
- Negoro N. et al. (1995). Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J. Clin. Invest*, 95:1140-1150.

- Nguyen A.T., Gomez D. Bell R.D. et al. (2013). Smooth muscle cell plasticity Fact or fiction?. *Circ. Res.*, 112:17.
- Nicole Schonrock, Richard P. Harvey, John S. Mattick (2012). Long Noncoding RNAs in Cardiac Development and Pathophysiology. *Circ Res.*; 111:1349-1362.
- Olson E.N. (2006). Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*, 313: 1922–1927.
- Papait R., Kundurfranco P., Stirparo G.G., Latronico M.V.G., Condorelli G. (2013). Long noncoding RNA: a new player of heart failure? *J. of Cardiovasc. Trans. Res*, 6:876-883.
- Pio Conti, Yazdami Shaik-DasthagirisaeB (2015). Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease mediated by mast cells. *Cent Eur J Immunol*, 40 (3): 380-386.
- Podrez E.A. et al. (2000). Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin. Invest*, 105:1095-1108.
- Regan E.R., Aird W.C. (2012). Dynamical systems approach to endothelial heterogeneity. *Circ Res.*, 111:110.
- Ross R. (1999). Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Eng J Med.*, 340:115–126.
- Samir Ounzain, Frederic Burdet, Mark Ibberson, Thierry Pedrazzini (2015). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 89 (2015) 17-26.
- Schönbeck U., Sukhova G.K., Shimizu K., Mach F., Libby P. (2000). Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97:7458-7463.
- Segers D., HeldermaN F., Cheng C., Van Damme L.C., Tempel D., Boersma E. et al. (2007). Gelatinolytic activity in atherosclerotic plaques is highly localized and is associated with both macrophages and smooth muscle cells *in vivo*. *Circulation*, 115:609-16.
- Shih P.T., et al. (1998). Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ. Res.*, 84:345–351.

- Smithies O., Maeda N. (1995). Gene targeting approaches to complex disease: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:5266-5272.
- Sonel A. (2002). Kardiyoloji. Semih Ofset, Ankara, 4. Baskı, s498.
- Srivastava D. (2006). Genetic regulation of cardiogenesis and congenital heart disease. *Annu Rev Pathol*, 1: 199–213.
- Strydom H.C., Chandler A.B, Dinsmore R.E, Fuster V., Glagov S., Insull W. Jr, Rosenfeld M.E., Schwartz C.J., Wagner W.D., Winsler R.W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 15 (9): 1512-31.
- Storino Farina M., Rojano Rada J., Molina Garrido A., Martínez X., Pulgar A., Paniagua R., Garrido J. (2015). Statins and atherosclerosis: the role of epigenetics. *Medwave*, 15(10):e6324.
- Suzuki H. et al. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386:292-296.
- Taubman, M. B. (2001). Atherosclerosis, thrombosis and coroner artery disease, *Hematology*, 1743-52, Chapter 130.
- Tezcaner Tevfik, Karagöz Y. Haldun, Çatav Zeki, Tokmakoğlu Hilmi, Zorlutuna I. Yaman, Taşdemir Oğuz, Bayazıt Kemal (1992). Koroner Bypass Cerrahisinde Arteriel Graftler. *GKD Cer. Derg.*,1: 80-86.
- Thum, T., Condorelli, G. (2015). Long Noncoding RNA and microRNAs in Cardiovascular Pathophysiology. *Circ Res.*; 116:751-762.
- Thompson R.C, Allam A.H., Lombardi G.P. et al. (2013). Atherosclerosis across 4000 years of human history: The Horus study of four ancient population. *Lanset*, 381:1211.
- Tokgözoğlu Lale (2009). Dislipidemi, ateroskleroz ve hassas plaklar: Atorvastatinin ateroskleroz ve plak yapısına etkisi. *Türk Kardiyol Dern Arş*, 2:11-16.
- Xu, T.P, Huang, M.D, Xias, R, Liu X.X, Sun M, Yin L, Chen W.M, Han L, Zhang, E.B, Kong, R, De W. and Shu Y.Q. (2014). Decreased expression of the long non-

- coding RNA FENDRR is associated with poor prognosis in gastric cancer and FENDRR regulates gastric cancer cell metastasis by affecting fibronectin1 expression. *Journal of Hematology & Oncology*, 7:63.
- Tontonoz P., Nagy L., Alvarez J.L., Thomazy V.A., Evans R.M. (1998). PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93:241-252.
- Van Son J.A.M., Smedts F., De Wilde P.C.M., Pijls NHJ, Wong-Alcala L., Kubat K., Tavilla G., Lacquet L.K. (1993). Histological study of the internal mammary artery with emphasis on its suitability as a coronary artery bypass graft. *Ann Thorac Surg* 55: 106-113.
- Verma S., Anderson T.J. (2002). Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, 105:546-549.
- Viereck, J., Kumarswamy R., Thum T., (2015). Long noncoding RNAs as inducers and terminators of vascular development. *Circulation*, 115.015775.
- Wang K.C., Chang, H.Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 43, 904-14.
- Wang K.C., Liu F., Zhou L.Y., Long B., Yuan S.M., Wang Y., Liu C.Y., Sun T., Zhang X.J., Li P.F. (2014). The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. *Circ Res.*, 114, 1377-1388.
- Watson A.D. et al. (1997). Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence *in vivo*. *J. Biol. Chem*, 272:13597-13607.
- Wierda R.J., Geutskens S.B., Jukema J.W., Quax P.H., van den Elsen P.J. (2010). Epigenetics in atherosclerosis and inflammation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(6A):1225-1240.
- Wierda, R.J., Rietveld I.M, Van Eggermond M.C., Belien J.A, Van Zwet E.W., Lindeman J.H, Van den Elsen P.J. (2015). Global histone H3 lysine 27 triple methylation levels are reduced in vessels with advanced atherosclerotic plaques. *Life Sci*, 15;129:3-9.
- World Health Organization (WHO). (2015). The World Health Report.

- Wu, G., Cai J., Han Y., Chen J., Huang, Z.P., Chen, C., Cai Y., Huang H., Yang, Y. et al. (2014). LincRNA-p21 Regulates Neointima Formation, Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, Apoptosis and Atherosclerosis by Enhancing P53 Activity. *Circulation*; 130: (17) 1452-1465.
- Wu K.K.,Thiagarajan P. (1996). Role of endothelium in trombosis and hemostasis. *Annu Rev. Med.*, 47:315-31.
- Yaylalı Yalın Tolga, Küçükaslan Mete (2011). Endotel disfonksiyonu. *Pam Tıp Derg*, 4(3):152-157.
- Yazıcıoğlu Levent, Aral Atilla, Akalın Hakkı (1999). *GKDC Dergisi*, 7: 195-199.
- Yoder M.C. (2012). Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2:a006692.
- Young R.S., Ponting C.P. (2013). Identification and function of long non-coding RNAs. *Essays Biochem*, 54, 113-126.
- Zengin H. (2012). Ateroskleroz Patogenezi. *J. Exp. Clin. Med.*,29:101-106.

İNTERNET KAYNAKLARI

http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/Blood_Vessels.html, Erişim tarihi: Eylül 2016

EKLER

Ek 1. Bilgilendirilmiş Olur Formu

GENETİK ÇALIŞMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

Ateroskleroza etkileyen hastalıkların genetik (kalıtsal) nedenlerini bulmak üzere yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “Aterosklerozlu Hastaların Koroner Arter Plaklarında ve Dolaşımlarındaki uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) İfade Düzeylerinin İncelenmesi”dir. Bu çalışmadaki temel amaç; Ateroskleroza neden olan genetik mekanizmaların araştırılmasıdır.

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

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni çocuğunuzda/ailenizin bir üyesinde kalp damar hastalığı şikâyetinin bulunması/ tanısının konulmuş olmasıdır. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı’nda bu hastalığın nedenlerini ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirilecektir. Kendinizde bir şikâyet olmasa bile katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir. Araştırmaya katılacak gönüllü sayısı 20’dir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Prof. Dr. Öcal Berkan ve Prof. Dr. Birhan Yılmaz veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından muayeneniz yapılacak ve bulgular kaydedilecektir. Bu kayıtlar ileride tekrar incelenerek doğru tanı konulmasına yardımcı olacaktır. Bu kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmayı yapabilmek için by-pass ameliyatı sırasında alınıp atılacak olan dokularınızı biz çalışmamız için kullanacağız. Bu dokudan genetik materyal RNA elde edilecektir. Bu

çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Yapılacak genetik testin getireceği olası yararlar: Böyle bir analiz ilgili genetik hastalığın nedeninin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Şu anda bu çalışmanın hemen size veya çocuğunuza bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ileride ilgili hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahiptir. Eğer örneğinizin imha edilmesine karar verirsiniz, bu isteğinizden önce üretilmiş her türlü veri ve yapılmış analiz ortadan kaldırılmayacak ama daha fazla analiz yapılmayacaktır. Aksi halde, saklama süresinin sonunda örneğin imha edilmesinden destekleyici/araştırmacı sorumludur.

Doku Örneklerinin Saklanması: Sizden alınan örneklerin kullanımı bu olur formunda tanımlanan araştırma ile sınırlı olacaktır. Eğer bu örnekleri bu olur formunda tanımlanmayan başka test/amaçlar için kullanmak istersek, önce Etik Kurul'a onay verilmesi için başvurulacaktır. Eğer yeni çalışma onaylanacak olursa sizden başka bir bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız istenecektir.

Kan Örneklerinin Saklanması: Sizden alınan örneklerin kullanımı bu olur formunda tanımlanan araştırma ile sınırlı olacaktır. Eğer bu örnekleri bu olur formunda tanımlanmayan başka test/amaçlar için kullanmak istersek, önce Etik Kurul'a onay verilmesi için başvurulacaktır. Eğer yeni çalışma onaylanacak olursa sizden başka bir bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız istenecektir.

Veya

Bu bilimsel araştırma sırasında alınan kan örneklerinin tamamı kullanılmayıp bir bölümü benzeri araştırmalarda kullanılmak üzere saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

() Kan ve DNA örneklerinin sadece bu çalışmayla ilgili olarak kullanılmasını istiyorum. Çalışma bitiminde kalan örneklerin uygun şekilde yok edilmesini istiyorum. İlerde yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

() Kan ve DNA örnekleri bu çalışmada kullanıldığı gibi gelecekteki hastalığımla ilgili diğer bilimsel çalışmalarda kullanılabilir. Ancak kalan örneklerimin hastalığım dışındaki başka bir araştırmada kullanılmasını uygun bulmuyorum.

() Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

() Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

() Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Prof. Dr. Öcal Berkan ve Prof. Dr. Birhan Yılmaz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp-Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Öcal BERKAN 'ı 0532 786 90 21 no.lu telefon ve Tıp Fakültesi Kalp-Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
<i>ADI & SOYADI</i>		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		
VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
<i>ADI & SOYADI</i>		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		
ARAşTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAşTIRMACININ		İMZASI
<i>ADI & SOYADI</i>		
<i>TARİH</i>		
GEREKTIęİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
<i>ADI & SOYADI</i>		
<i>GÖREVİ</i>		
<i>TARİH</i>		

İZİNLER

Ek 2. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Koroner Arter Hastalarının Plaklarında ve Doluşımlarındaki Uzun Kodlama Yapmayan RNA İfade Düzeylerinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Cumhuriyet Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Cumhuriyet Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başhekimlik Girişi TR-58140 Merkez/Sivas
	TELEFON	0 346 258 00 25
	FAKS	0 346 258 00 24
	E-POSTA	cuetikkurul@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Nilgün Çetin			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	--			
	DESTEKLEYİCİ	--			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	--			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	--			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Emin Yener Gültekin
İmza:



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Koroner Arter Hastalarının Plaklarında ve Doluşımlarındaki Uzun Kodlama Yapmayan RNA İfade Düzeylerinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <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 type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	<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: 2015-03/63	Tarih: 31.03.2015				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					
İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Emin Yener Gültekin

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Emin Yener Gültekin	Üroloji	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	<i>[İmza]</i>
Prof. Dr. Kürşat Karadayı	Genel Cerrahi	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	<i>[İmza]</i>
Doç. Dr. Hülya Toket	Periodontoloji	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	<i>[İmza]</i>
Doç. Dr. Ayşe Demirkazık Çançalar	Biyofizik	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	<i>[İmza]</i>
Doç. Dr. Aynur Engin	Enfeksiyon Hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	<i>[İmza]</i>
Doç. Dr. Fatih Kılıçlı	Endokrinoloji	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	<i>[İmza]</i>
Doç. Dr. Fatih Bolat	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	<i>[İmza]</i>
Yrd. Doç. Dr. Ziynet Çınar	Biyoistatistik	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	<i>[İmza]</i>

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Emin Yener Gültekin
İmza:



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Koroner Arter Hastalarının Plaklarında ve Doluşımlarındaki Uzun Kodlama Yapmayan RNA İfade Düzeylerinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

Yrd. Doç. Dr. Gülay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İzirdi
Yrd. Doç. Dr. Ahmet Altun	Tıbbi Farmakoloji	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İzirdi
Uzm. Dr. Levent Sağlam	Aile Hekimi	Sivas Halk Sağlığı Müdürlüğü	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"/>	İzirdi
Uzm. Dr. Hüseyin Saygın	Üroloji	Sivas Devlet Hastanesi	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"/>	İzirdi
Öğr. Gör. Engin Daşlı	Avukat	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	İzirdi
Öğret. Şemsettin Ağaşa	Biyoloji Öğretmeni	Sivas Lisesi	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"/>	İzirdi

*:Toplantıda Bulunma



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Arzu ÖZCAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas-1983
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 58140-Sivas
E-posta Adresi	arzuozcan@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Kongre Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı, 2001
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2007
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İş Tecrübesi

- Gürbüz Sağlık Ürünleri Ltd. Şti. Biyolog (2011-2013)
C Sınıfı İş Güvenliği Uzmanı- İlk Yardım Eğitmeni (2013-)