



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

**ATEROSKLEROZLU HASTALARIN KORONER ARTER PLAKLARINDA VE
DOLAŞIMLARINDAKİ BAZI MİKRORNA'LARIN İFADE DÜZEYLERİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Nil ÖZBİLÜM ŞAHİN
(201292022007)**

Moleküler Biyoloji Ve Genetik Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

SİVAS

2018

NİL ÖZBİLÜM ŞAHİN'in hazırladığı ve “**ATEROSKLEROZLU HASTALARIN KORONER ARTER PLAKLARINDA VE DOLAŞIMLARINDAKİ BAZI MİKRORNA'LARIN İFADE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA
Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi Doç. Dr. Musa SARI
Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi Doç. Dr. Mahir BUDAK
Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Çukurova Üniversitesi

Jüri Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Gonca DÖNMEZ
Ömer Halisdemir Üniversitesi

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. İsmail ÇELİK
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F-456 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.



Bütün hakları saklıdır.
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

©Nil ÖZBİLÜM ŞAHİN, 2018

Çalışmam sırasında kendisinden esin aldığım ve kendime örnek bildiğim tüm bilim insanlarına ve anneme...



ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

27.07.2018

Nil ÖZBİLÜM ŞAHİN

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, hem tezin bu aşamasına gelene kadar bana yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA' ya teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında tecrübelerinden sınırsız faydalandığım, bir danışman kadar bu projede benim için emek harcayan, her sorunda kapısını çekinmeden çaldığım, yüksek lisans danışman hocam Doç. Dr. Serdal ARSLAN' a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu çalışma için gereken doku ve kan örneklerin temin edilmesinde bize hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen Kalp Damar Cerrahisi Anabilim dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Öcal BERKAN, Doç. Dr. Özge KORKMAZ ve Doç. Dr. Sabahattin GÖKSEL' e Kardiyoloji Anabilim dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Osman BETON ve asistanlarına;

Laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Burcu BAYYURT'a, aynı bölümde lisansüstü eğitim yapan Aslıhan Esra BİLDİRİCİ'ye, hayatımın güzel ve kötü zamanlarında hiç yanımdan ayrılmayan, benim için bir hoca, bir arkadaş ve bir abla gibi değerli olan ve çalışmalarımın istatistik analiz kısımlarında bana yardımını esirgemeyen İstatistik Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Eylem İtr AYDEMİR'e dostlukları ile iyi ve kötü zamanlarımda beni hiç yalnız bırakmayan İstatistik bölümü Dr. Öğr. Üyesi Anar HÜSEYİN, İstatistik bölümü Arş. Gör. Dr. Yener ÜNAL, Neslihan BAŞGÖZ ve tüm dostlarıma teşekkür etmeden geçemeyeceğim.

Tabii ki akademik hayatın zorlu yollarında beni hep destekleyen, direncimin kırıldığı anlarda beni ayağa kaldıran, hayatımı paylaşmaktan hiç pişman olmadığım sevgili hayat arkadaşım Enver ŞAHİN'e

Beni her zaman destekleyen, yaşama enerjimi aldığım, her anımda yanımda olan ve her zaman bana güvenen sevgili annem ve babam başta olmak üzere, aileme, eşimin çok değerli ailesine ve küçük tatlı yeğenim Özgür Deniz ÖZBİLÜM'e sonsuz teşekkür ederim...

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından F-456 Nolu proje ve TÜBİTAK SBAG 214S031 Nolu proje tarafından desteklenmiştir.

ÖZET
ATEROSKLEROZLU HASTALARIN KORONER ARTER PLAKLARINDA
VE DOLAŞIMLARINDAKİ BAZI MİKRORNA'LARIN İFADE
DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

Nil ÖZBİLÜM ŞAHİN

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

2018, 95+xiv pages

Ateroskleroz dünya çapında kardiyovasküler morbidite ve ölümlere neden olan inflamatuvar bir hastalıktır. Bu hastalık, endotelial aktivasyon ve disfonksiyonu, lipit birikimi, monosit infiltrasyonu ve farklılaşması, T-hücrelerinin infiltrasyonu ve aktivasyonu, köpük hücre formasyonu ve bu bölgelerde fibröz oluşumu ile karakterize edilen bir hastalıktır. MikroRNA'lar (miRNA), hedef gen ifadesini transkripsiyon sonrası düzenleyen kodlama yapmayan bir RNA sınıfıdır. miRNA'lar kısadır ve kodlama yapmazlar. Hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi pek çok fizyolojik ve patolojik süreçlerde hayati rol oynarlar. Bu çalışmanın amacı aterosklerozlu hastaların koroner arter plaklarında ve dolaşımındaki *mir-10a*, *miR-31*, *miR-130a*, *miR-204* *miR-214* ve *miR-675* nin ifade düzeylerini araştırmaktır. Bunun için 24 aterosklerotik koroner arter ve internal mammarian arter (İMA) dokuları ile 83 hasta ve kontrol bireyin kanlarından total RNA izole edildi. Daha sonra bu miRNA'ların ifade seviyeleri qRT-PZR (kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ile belirlendi. Bu sonuçlara göre koroner arter dokularındaki miR-10a seviyesi İMA dokuları ile karşılaştırıldığında ifade seviyesi istatistik açıdan anlamlı azalırken ($p=0,048$; Kat değişimi, 1,51), miR-204 ($p=0,033$; Kat değişimi, 2,60) ve miR-675 ($p=0,043$; Kat değişimi, 3,50) seviyeleri arttı. Kan da ise miR-10a ve miR-675 seviyelerindeki azalma anlamlı bulundu ($p=0,001$ ve $p=0,048$, sırasıyla; Kat değişimi, 2,86; Kat değişimi, 1,12, sırasıyla). Elde edilen bulgular miR-10a, miR-204 ve miR-675'in plak oluşumu ve arter dokusunun yeniden modellenmesinde rol alan patolojik süreçlerde özgün belirteçler olarak kullanılabileceğini ileri sürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ateroskleroz, MiRNA ifadesi, qRT-PZR

ABSTRACT
INVESTIGATION OF SOME MICRORNA EXPRESSION LEVELS IN
PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS IN CORONARY ARTERY
PLAQUES AND CIRCULATION

Nil ÖZBİLÜM ŞAHİN

PhD Thesis

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

2018, 95+xiv pages

Atherosclerosis is an inflammatory disease, causing cardiovascular morbidity and death worldwide. It is characterized by endothelial activation and dysfunction, lipid accumulation, monocyte infiltration and differentiation, T-cell infiltration and activation, foam cell formation, and fibrosis in the lesion area. MicroRNAs (miRNAs) are a class of noncoding RNAs that regulate target gene expression at the posttranscriptional level. miRNAs are small non-coding RNAs, and play a crucial role in several physiological and pathological processes, including cell proliferation, differentiation, and apoptosis. The aim of this study was to investigate *miR-10a*, *miR-31*, *miR130a*, *miR-204*, *miR214* and *miR-675* expression levels in coronary artery plaques and circulation of patient with atherosclerosis. Therefore total RNA was isolated from 24 atherosclerotic coronary artery tissues and internal mammary arteries (IMA), and 83 blood samples. Expression levels were measured using qRT-PCR (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction). Results obtained indicated a significant decrease in the expression of *miR-10a* in coronary artery plaques, compared to that of the IMA tissue ($p=0,048$; Fold Change, 1,51), and a significant increase in *miR204* ($p=0,033$; Fold Change, 2,60) and *miR-675* levels ($p=0,043$ Fold Change, 3,50). In blood samples the decrease in *miR-10a* and *miR-675* miRNA levels were also found to be statistically significant ($p=0,001$ and $p=0,048$, respectively; Fold Change, 2,86; Fold Change, 1,12; respectively). In conclusion, our findings suggested that three of the miRNAs studied, *miR10a*, *miR-204* and *miR675*, could be used as markers for the detection of coronary artery plaque formation and the pathological processes involved in the remodelling of arterial tissues.

Key Words: Atherosclerosis, MiRNA expression, qRT-PCR

İÇİNDEKİLER

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.1. Araştırmanın Amacı	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ateroskleroz	3
2.2. Ateroskleroz oluşumu	4
2.2.1. Yağ çizgileri oluşum süreci	4
2.2.2. Aterom oluşumu ve plak	7
2.3. Aterosklerozun moleküler temeli	7
2.3.1. Endotelin bozulması	7
2.3.2. LDL birikmesi ve oksidasyonu	9
2.3.3. Kemokinler	11
2.3.4. Düz kas hücrelerini bağlayan proteinler	12
2.3.5. İnflamasyon	12
2.4. Kardiyovasküler Risk Faktörleri	13
2.4.1. Değiştirilebilen risk faktörleri	14
2.4.1.1. Hiperkolesterol ve Yüksek LDL düzeyi	14
2.4.1.2. Hipertansiyon	14
2.4.1.3. Sigara	15
2.4.1.4. Hiperglisemi ve diyabet	15
2.4.1.5. Obezite	16
2.4.2. Değiştirilemeyen risk faktörleri	17
2.4.2.1. Yaş	17
2.4.2.2. Cinsiyet ve aile öyküsü	18
2.5. Epigenetik ve kodlama yapmayan RNA'lar	19
2.5.1. Mikro RNA	20
2.5.2. Mikro RNA'ların isimlendirilmesi	21
2.5.3. Mikro RNA sentezi, işlenmesi ve fonksiyonları	21
2.5.4. Dolaşım mikroRNA'ları	23
2.5.5. MikroRNA'lar ve kardiyovasküler hastalıklar	24

2.5.6. Tez çalışmasında kullanılan mikroRNA'lar	28
2.6. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR)	31
3. MATERYAL- METOT	33
3.1. Örneklerin toplanması ve saklanması.....	33
3.1.1. Doku örneklerinin toplanması	33
3.1.2. Kan örneklerinin toplanması.....	34
3.2. RNA izolasyonu	34
3.2.1. Doku örneklerinden RNA izolasyonu.....	34
3.2.2. Kan örneklerinden RNA izolasyonu.....	35
3.3. RNA konsantrasyonu ve saflığının tayini	36
3.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	36
3.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	38
3.6. İstatistik Analizi	40
4. BULGULAR	41
4.1. Örnek donörlerine ait bazı demografik veriler	41
4.2. Doku Örneklerine Ait MikroRNA RT-PCR analiz sonuçları	43
4.3. Doku donörlerine ait bazı demografik verilere bağlı analiz sonuçları	46
4.4. Kan Örneklerine Ait MikroRNA RT-PCR analiz sonuçları	47
4.5. Kan donörlerine ait demografik verilere bağlı analiz sonuçları	51
5. TARTIŞMA	52
6. KAYNAKÇA	58
7. EKLER	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1:Normal bir arterin yapısı Lulis, 2000).....	4
Şekil 2:Yağ çizgileri oluşum basamakları (Rafieian-Kopaei ve ark., 2014).....	5
Şekil 3:Köpük hücre oluşumu (Libby, 2002).....	6
Şekil 4:Aterom oluşumu (Rafieian ve ark., 2014)	7
Şekil 5: Normal bir arter anatomisi (Matsuzawa ve Lerman, 2014).....	8
Şekil 6: LDL' nin oksidasyonu (Collot-Teixeira ve ark., 2007; Levitan ve ark., 2010).	10
Şekil 7: Mikro RNA biyogenezi (Winter ve ark., 2009).....	22
Şekil 8: Fare kardiyak morfojenезinin şematik bir temsili ve bu işlemde <i>miRNA</i> 'ların rolü (Wojciechowska ve ark., 2015)	26
Şekil 9: <i>MiR-10a</i> 'ya ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	44
Şekil 10: <i>MiR-31</i> 'e ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	44
Şekil 11: <i>MiR-130</i> 'a ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	44
Şekil 12: <i>MiR-204</i> 'e ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	44
Şekil 13: <i>MiR-214</i> 'e ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	44
Şekil 14: <i>MiR-675</i> 'e ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	45
Şekil 15: ACT- β 'ye ait amplifikasyon ve Tm eğrisi.....	45
Şekil 16: Doku örneklerinde seçilen <i>miRNA</i> 'ların kat değişim grafikleri	45
Şekil 17: Koroner arter ve İMA dokuları arasında seçilen <i>miRNA</i> 'ların ifade düzeylerinin farklılığını gösteren grafik	46
Şekil 18: <i>MiR-10a</i> 'ya ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	48
Şekil 19: <i>MiR-31</i> 'e ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	48
Şekil 20: <i>MiR-130</i> 'a ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	49
Şekil 21: <i>miR-204</i> 'e ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	49
Şekil 22: <i>MiR-214</i> 'e ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	49
Şekil 23: <i>MiR-675</i> 'e ait amplifikasyon ve Tm eğrisi	49
Şekil 24: ACT- β 'ya ait amplifikasyon ve Tm eğrisi.....	50
Şekil 25: Seçilen <i>miRNA</i> 'ların kat değişim grafikleri	50
Şekil 26: Kan örneklerinde hasta ve kontrol grubu arasında seçilen <i>miRNA</i> 'ların ifade düzeylerinin farklılığını gösteren grafik	50

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1 Kodlama yapmayan RNA'ların sınıflandırılması (Gangwar ve ark., 2018)	20
Tablo 2 Kararlı ve kararsız aterosklerotik plaklarında <i>miRNA</i> ifadeleri (Koroleva,2017)	27
Tablo 3 cDNA sentezinin ilk aşaması	37
Tablo 4 cDNA sentezinin ikinci aşaması	37
Tablo 5 Komplementer DNA'nın PZR ile çoğaltılması	38
Tablo 6 MikroRNA'lar için primer dizileri	39
Tablo 7 Reaktifler ve miktarları	39
Tablo 8 Kantitatif gerçek zamanlı PZR reaksiyon koşulları	40
Tablo 9 Doku donörlerine ait bazı demografik veriler	41
Tablo 10 Kan donörlerine ait bazı demografik veriler	42
Tablo 11 Koroner arter dokularında ve İMA dokularında <i>miRNA</i> ifade düzeyleri...	43
Tablo 12 Demografik verilere bağlı olarak <i>miR-10a</i> , <i>miR-204</i> ve <i>miR-675</i> 'in ifade düzeylerinin karşılaştırılması	47
Tablo 13 Ateroskleroz hasta ve kontrol grubu kanlarında <i>miRNA</i> ifade düzeylerinin karşılaştırılması	48
Tablo 14 Demografik verilere bağlı olarak <i>miR-10a</i> ve <i>miR-675</i> 'in ifade düzeylerinin karşılaştırılması	51

KISALTMALAR DİZİNİ

apoE	: Apolipoprotein E
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CRP	: C Reaktif Protein
DTT	: Dithiothreitol
eNOS	: Endotel Nitrik Oksit Sentaz
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HUVEC	: İnsan göbek vasküler endotel hücresi
IL	: İnterlökin
İMA	: İnternal Mammarian Arter
KVH	: Kardiyovasküler Hastalıklar
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LDL-C	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol
LncRNA	: Uzun Kodlama Yapmayan Ribonükleik Asit
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
MCP-1	: Monosit Kemokin Protein-1
MI	: Miyokart Enfarktüs
MiRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
NcRNA	: Kodlama Yapmayan Ribonükleik Asit
NF-κB	: Nüklear Faktör Kappa B
NO	: Nitrik Oksit
NYHA	: Konjestif Kalp Yetersizliği Sınıflaması
Ox-LDL	: Okside Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
PASMC	: Pulmoner Arter Düz Kas Hücresi
QRT-PCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	: RNA Kaynaklı Susuturma Kompleksi
SMC	: Düz Kas Hücresi
TGF-β	: Dönüşüm Büyüme Faktörü Beta
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
UTR	: Transkribe edilmeyen bölge
VSMC	: Vasküler Düz Kas Hücresi

1. GİRİŞ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında, mortalite ve morbiditenin ana nedeni olma yolunda gittikçe artan önemli bir rol üstlenmektedir. Kardiyovasküler hastalıklar tüm hastalıklar içerisinde yüzde kırka yakın ölüm oranıyla birinci sırada yer almıştır. Bu hastalığın altında yatan en önemli mekanizma aterosklerozdur. Ateroskleroz, birçok genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile gelişen karmaşık etiyolojiye sahip bir hastalıktır. Temel tıp araştırmalarından sağlanan ve giderek artan kanıtlar aterosklerozun, basitçe, damar duvarındaki bir lipid birikimini simgelemekten öte, inflamatuvar bir hastalık olduğunu düşündürmektedir. Epigenetik mekanizmaların son zamanlarda kardiyovasküler hastalıkların gelişimi ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Kodlama yapmayan RNA aracılı epigenetik düzenlemeler uzun kodlama yapmayan RNA'lar ve kısa kodlama yapmayan RNA'lar tarafından gerçekleştirilir. MikroRNA'lar gen ifadenmesinin epigenetik düzeyden translasyonel düzeyine kadar her adımda düzenlenmesini sağlayan, kodlama yapmayan DNA dizilerinden oluşan RNA'lardır. MiRNA'ların, endotel damar düz kas hücreleri ve kardiyovasküler homeostaz bağlamında ateroskleroz patojenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Plak gelişiminin farklı aşamalarında miRNA'ların farklı tipleri bulunmuştur ve miRNA'lardaki fonksiyon bozukluğunun aterosklerotik plakların kararsız hale gelmesinde ve yırtılmasında oldukça önemli roller oynadığı düşünülmektedir. Aterosklerotik lezyon oluşumunda, özellikle endotel hücrelerinin uyarılması ve bu uyarılara karşı hücrelerin verdiği cevabın önemli olduğu anlaşılmaktadır. MiRNA'lar, normal vasküler gelişimi ve fonksiyonlarını düzenlemede önemli rol oynamaktadır. Koroner arterler gibi bazı arter sistemleri ateroskleroza karşı çok duyarlı iken, internal torasik arter ya da internal mammarian arter gibi bazı arterler de ateroskleroza dirençlidir ve bu farklılığının sebebi tam olarak bilinmemektedir

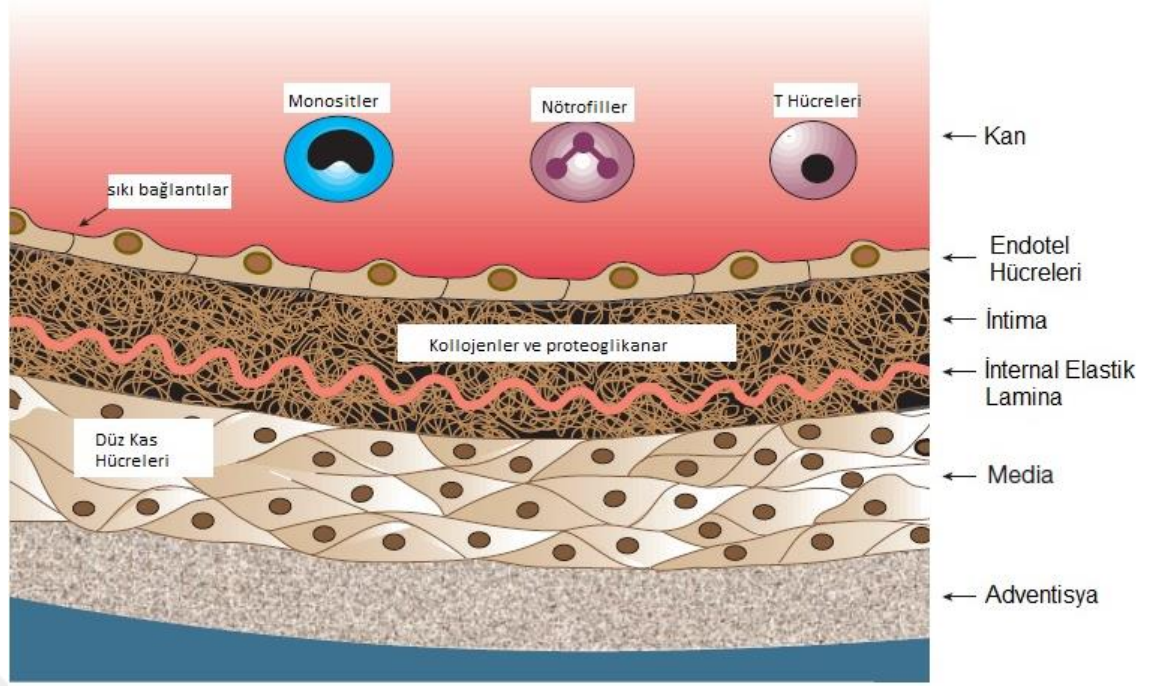
1.1.Araştırmanın Amacı

By-pass cerrahisi, normal olmayan kan dolaşımının yeniden sağlıklı dolaşım sağlamak için kan damarı grefti ile bir veya daha fazla tıkanmış koroner arterlere uygulanan bir yöntemdir. Greft, tıkanan damarların etrafından dolaşarak oksijen zengin kanın kalbe yeniden akması için yeni yollar yaratır. İnternal mamarian arterden (IMA) alınan greftlerin günümüzde koroner arter by-pass cerrahisinde sağlıklı dokuya en yakın dolayısıyla en ideal greft olduğu belirlenmiştir. Koroner endarterektomi, standart koroner arter by-pass yöntemleri uygulanamayan, diffüz yayılım gösteren, koroner arterlerde uygulanır. Çalışmamızda hasta bireylerden koroner endarterektomi sırasında çıkarılan koroner arterin aterosklerotik plağı ve internal mammarian arter materyalinden elde edilen sağlıklı dokularda kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile mikroRNA ifade düzeyleri arasındaki farklar araştırıldı. Buna ilave olarak ateroskleroz hastalığı teşhisi konmuş hasta bireylerin ve ateroskleroz hastalığı ve herhangi metabolik bir hastalığı bulunmayan sağlıklı bireylerin dolaşımındaki *miRNA* ifade düzeyleri arasındaki farklılıklar da araştırıldı. Bu çalışma sonucunda elde edilecek verilerin koroner arterlerde gelişen aterosklerozun patolojik temelinde rol oynayan epigenetik mekanizmaların açıklanmasına önemli katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz ölümcül bir kardiyovasküler hastalıktır. Köpük hücreler olarak adlandırılan, kolesterol ile tıkanmış makrofajların arter duvarının (Şekil 1) endotel altı tabakada birikimi aterosklerozun erken işaretidir. Bu lipit yüklü hücreler, arter duvarında inflamatuvar yanıtları teşvik ederek kanama, delinme ve kalsifikasyon gibi birden fazla patolojik sonuçlara yol açarlar (Arbab-Zadeh ve ark., 2015; Otsuka ve ark., 2014). Lipoprotein metabolizması bozukluğundan kaynaklanan ateroskleroz mekanizmaları ve inflamasyon, araştırmaların odak noktası olmuştur (Lusis, 2000). Bu mekanizmalara bağlı olarak ateroskleroz, geniş arterlerde lipitlerin ve lifli elementlerin birikimi ile karakterize ve zamanla ilerleyen bir hastalıktır. Kan akışı dinamiklerindeki farklılıklar nedeniyle arterlerde lezyon oluşumunda tercih edilen yerler vardır. Bu lezyonlar mikroskop altında yağ çizgileri halinde görülür. Bu yağ çizgileri genellikle hayatın ilk on yılında aortada, ikinci on yılında koroner arterlerde ve üçüncü veya dördüncü on yılda serebral arterlerde bulunur. Yağ çizgileri klinik olarak anlamlı değildir. Ancak, lipit zengini nekrotik atıklar ve düz kas hücreleri (SMC) birikimi ile karakterize edilen daha ileri lezyonların öncüleridir. Bu tür fibröz lezyonlar tipik olarak lipit açısından zengin bir nekrotik çekirdeği kapsayan SMC'lerden ve hücre dışı matrinden oluşan fibröz bir kapağa sahiptir. Plak oluşumu, kalsifikasyon, lümen yüzeyinde ülserasyon ve küçük damarlardan kaynaklanan kanamayla giderek daha karmaşık bir hale gelebilir. Gelişmiş lezyonlar kan akışını tıkayacak büyüklükte olabilir. En önemli klinik komplikasyonlar miyokart enfarktüsü (MI), inme ile sonuçlanan tromboz ve kanın pıhtılaşmasına bağlı akut tıkanıklıktır. Genellikle tromboz, lezyonun delinmesi veya aşınmasıyla ilişkilidir. Aterosklerozun epidemisi tavşan, domuz, primat ve kemirgenleri kapsayan hayvan modellerinde yapılan çalışmalarla büyük ölçüde açıklığa kavuşturulmuştur. Örneğin, yetersiz apolipoprotein E (apoE) veya düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörüne sahip farelerde gelişen ileri lezyonlar, genetik ve fizyolojik araştırmalarda çok sık kullanılmıştır (Tamminen ve ark., 1999).



Şekil 1:Normal bir arterin yapısı. (Lusis, 2000)

Üç tabakadan oluşur (içten dışa doğru): intima, orta tabaka (media) ve adventisya.

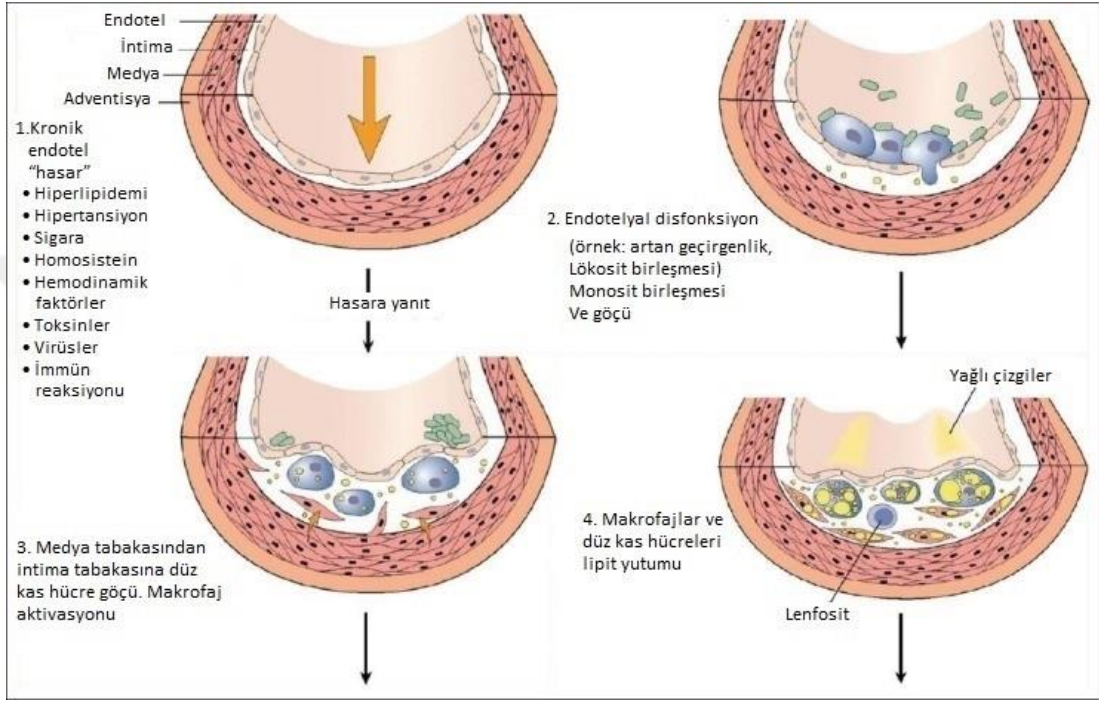
2.2. Ateroskleroz oluşumu

Ateroskleroz sürecinde sırasıyla üç temel yapı oluşur: yağ çizgileri, aterom ve plak.

2.2.1. Yağ çizgileri oluşum süreci

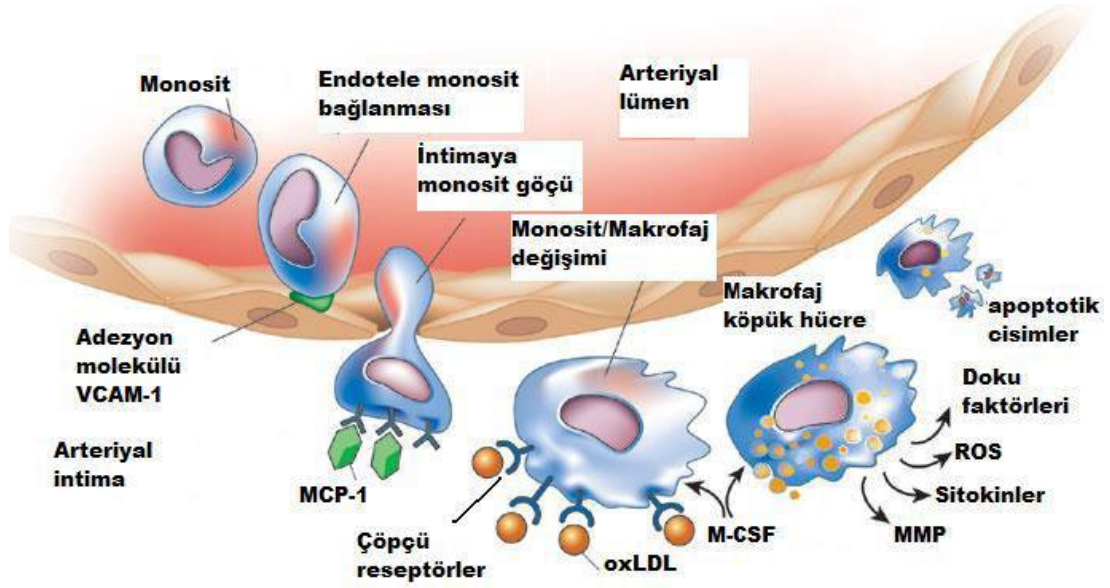
Hem hayvan hem de insan çalışmaları, yağ çizgilerinin aterosklerozun ilk bulgusu olduğunu göstermektedir. İlk lezyonlar genellikle arterlerin intima tabakasında lipoprotein artışına bağlıdır (Tavafi, 2013). Lipoprotein parçacıkları, proteinlerden, fosfolipidlerden ve ayrıca kolesterol ve trigliserit gibi lipidlerden oluşur. En önemli aterojenik lipoproteinlerden biri, kolesterol açısından zengin LDL'dir. Bu lipoprotein, endotele sızma veya proteoglikan gibi hücre dışı matris bileşenlerine yapışma kabiliyeti nedeniyle vasküler intimada birikebilir. Lezyonların bulunduğu yerde, matrisin farklı bileşenleri arasındaki denge bozulabilir. Örneğin, üç ana grupta bulunan proteoglikanlar arasında, heparin sülfat moleküllerinin keratan sülfat ve kondroitin sülfat ile karşılaştırıldığında göreceli olarak artması, lipoproteinlerin yapışmasına neden olabilir ve bu da intima içerisinden çıkma sürecini hızlandıran birikimine yol açarak yavaşlar (Nayer ve Ortega, 2014). Aterom, arter duvarında makrofaj birikmesiyle ortaya çıkan bir yapıdır ve başlangıç evresinde iki yönlü

gelişir. Ateroskleroz damar çapında büyümeye neden olur. Kolesterol birikim plak oluşumuna yol açar ve arter lümeninin esnek tabakasının % 40'ından fazlasını kaplayabilir ve kan akışını tıkar (Weber ve Noels, 2011). Yağ çizgileri oluşum süreçleri dört aşamada gerçekleşir (Şekil 2). Bu aşamalar düşük yoğunluklu lipoprotein-kolesterol (LDL-C), endotel hücrelerin aktivasyonu, lökosit aktivasyonu ve köpük hücre oluşumudur.



Şekil 2: Yağ çizgileri oluşum basamakları (Rafieian-Kopaei ve ark., 2014)

Arter duvarında ilk gözlenebilen değişiklikler yüksek kolesterolü bir diyetten kaynaklanan lipoprotein agregatlarının intima içinde birikerek lezyonlar oluşturmasıdır. Bu lezyonlara yapışan monositler endotel sistem aracılığı ile intima içine göç ederek çoğalır ve makrofajlara farklılaşır. Bu makrofajların lipoprotein biriktirmeleri ile köpük hücreleri oluşur (Şekil 3) (Ross, 1993).



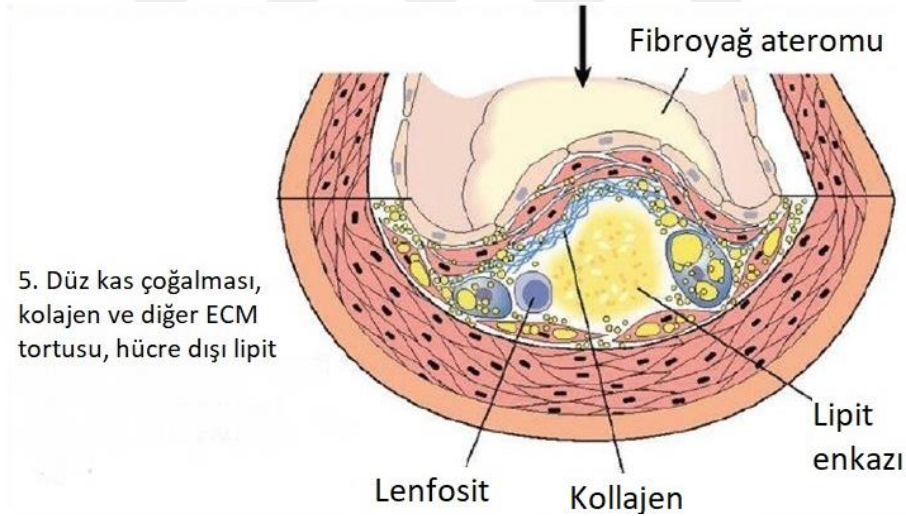
Şekil 3:Köpük hücre oluşumu (Libby, 2002)

Mononükleer fagositler, intima içine yerleştirildikten sonra makrofaja farklılaşır. Fagositler, hücre dışı bölgedeki lipidlerin fagositozu ile aterosklerozun önlenmesine katılabilir. Bazı lipid biriken makrofajlar arteriyel duvarı terk edebilir ve lipidleri atardamardan çıkarabilir. Arter duvarı içine lipid girişi seviyesi çıkışından (fagositler veya başka yollardan) fazla ise, lipid birikimine neden olur ve sonuç olarak aterom oluşturma eğilimi artar. Makrofajlar, köpük hücrelerine dönüştürülecek çöp alıcı reseptörleri tarafından Ox-LDL (okside edilmiş LDL) alımını ve birikimini gerçekleştirir (Steinbrecher ve ark., 1984). Bu reseptörlerin makrofaj, endotel hücreleri, fibroblastlar ve SMC yüzeyinde ifade edildiği gösterilmiştir. (Nayer ve Asif, 2013). Bu çöpçü reseptörlerin ifadesi, sitokinler ve oksitlenmiş lipidler ile monositlerin makrofajlara farklılaşması sırasında artmaktadır. Bunların ekspresyonu makrofaj koloni uyarıcı faktör tarafından da kolaylaştırılır (Steinbrecher ve ark., 1984). Makrofajların toplayıcı reseptörlerine absorbe edilmesine neden olan yüzey Ox-LDL ligandı, Ox-LDL yapısındaki fosfolipidlerdir ve bu ikili konumda oksitlenecek ve ApoB'nin lizin kalıntılarına saldırabilen aldehytler oluşturacaktır (Nayer ve Asif, 2013; Ross, 1993). Bu sarı köpük hücrelerin arteriyel duvarlarda birikmesi lipid çizgileri oluşumuna neden olur (Corsini ve ark., 1996). Gelişmekte olan intimal lezyondaki bazı köpük hücreleri apoptoz ile ölürlür. Bu apoptoz, daha gelişmiş aterosklerotik plakanın merkezinde lipid açısından zengin nekro çekirdeği oluşturur. Köpük hücreleri üretmek dışında monositler, tümör nekroz faktörü (TNF), büyüme faktörü, pre-koagülasyon maddeleri (doku faktörleri dahil) ve serbest

radikaller gibi sitotoksik maddeler üretebilir. Bu maddeler, daha fazla metabolik değişikliklere neden olan, LDL oksidasyonunun yanı sıra endotele daha fazla zarar verebilir (Corsini ve ark., 1996).

2.2.2. Aterom oluşumu ve plak

Bitişik SMC ve endotel hücreleri, sitokinler, interlökin 1 (IL-1) ve TNF gibi küçük peptitleri salgıladığında vasküler dokuda ciddi hasar meydana gelir. Bu faktörler SMC'nin damar duvarının iç yüzüne göç etmesine neden olur (Şekil 4). Bu durumda yumuşak kas hücresi göçer ve ekstraselüler matris fibröz kapağını oluşturur. Makrofajlar ve T lenfositler gelişmiş plakların etrafını sarar; hücre dışı matriksin parçalanmasına katkıda bulunan meta proteinaz salgırlar. T hücreleri SMC'de kolajen sentezini önleyen TNF- α üretir. Bu işlemler oluşan fibröz plağı zayıflatır ve yok edebilir. Parçalanmış fibröz plağın kolajen ve lipit içeriği kana karışarak trombositlerin yapışmasına ve kanın pıhtılaşmasına neden olur (Corsini ve ark., 1996; Nayer ve Ortega,2014; Ross, 1993).



Şekil 4: Aterom oluşumu (Rafieian ve ark., 2014)

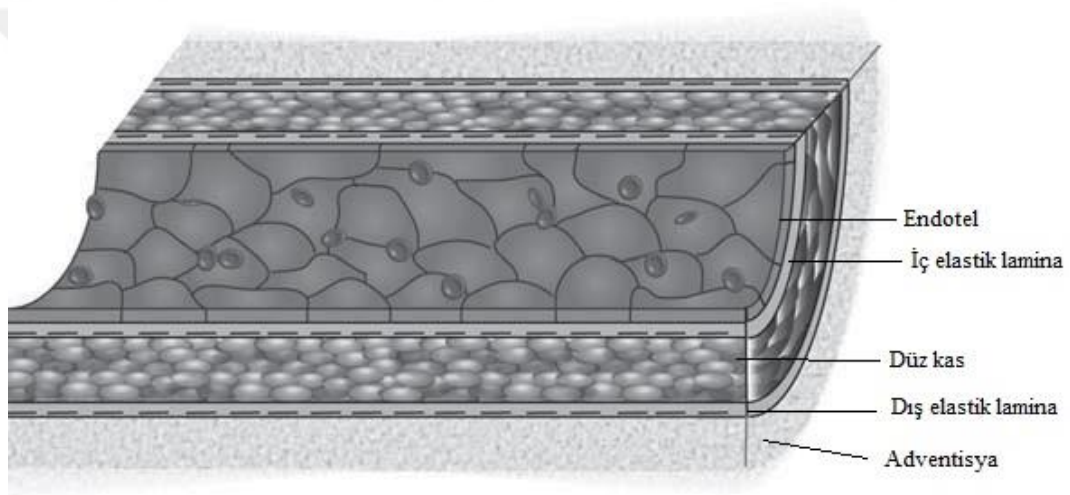
2.3. Aterosklerozun moleküler temeli

2.3.1. Endotelin bozulması

Vasküler endotel, tüm dolaşım sistemini kaplayan, kalpten en küçük kılcal damarlara kadar damar duvarını dolaşımdaki kanından ayıran, damar lümeni ve vasküler düz kas hücreleri arasında bir arayüz oluşturan hücrelerin tek katman hücreleridir (Şekil

5) ve hemen hemen tüm temel biyolojik vasküler fonksiyonlarda önemli bir rol oynar.

Sitokinler ve oksitlenmiş lipitler, aterosklerozun ilk aşamasında endotel hücreleri aktive eder. Bu evrede monosit ve T lenfositler vasküler intima içine sızar (Kume ve ark., 1992). Bu esnada üretilen adezyon molekülleri, LDL oksidasyonu için önemlidir (Blankenberg ve ark., 2003). Monositlerden farklılaşan makrofajlar Ox-LDL' yi emerek köpük hücre oluşumuna neden olur (Burke ve ark., 2002). Bu esnada T hücreleri de aktive olarak makrofajları aktive etmek için sitokinleri salgılar; böylece endotel ve SMC'yi de değiştirir (Kume ve ark., 1992).



Şekil 5: Normal bir arter anatomisi (Matsuzawa ve Lerman, 2014)

Endotel hücrelerin başlıca iki görevi vardır; vasküler geçirgenliği kontrol etmek ve vazoaaktif madde üretmek.

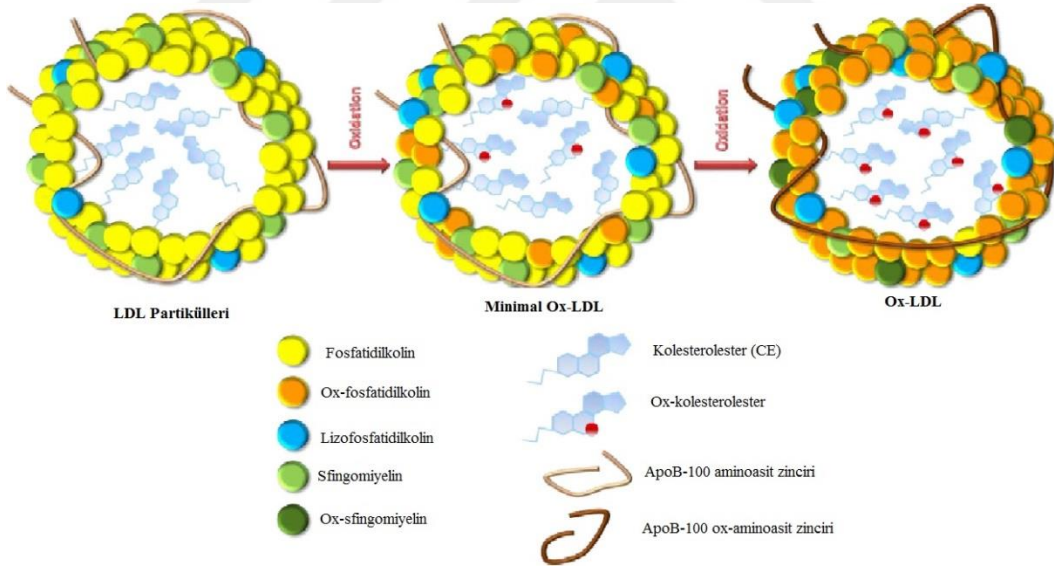
Ateroskleroz, arter ağacının en savunmasız bölgelerde başlar (Wentzel ve ark., 2012). Dolaşımın bozulması, bu bölgelerde mekanik strese karşı farklı mekanik sensörlerle (PCAM-1/VE-kaderin/VEGFR2) reaksiyona girebilen endotel hücrelerde yırtılma gerilimini (shear stress) indükler (Tzima ve ark., 2005). Endotel hücreleri yırtılma gerilimine vazoaaktif bir aracı olan-nitrik oksit (NO) sentezinin artmasıyla karşılık verir. NO, TGF- β 'nın (Transforming growth factor- β) üretilmesi için hücre dışı matriks protein ve matriks metalloproteinazları ile reaksiyona girer (Zaragoza ve ark., 2012). TGF- β , endotel hücrelerin yeniden yapılanması, tamiri, sağ kalımı ve çoğalması için gereklidir. Yırtılma gerilimi hala normalin üzerindeyse inflamasyonu

başlatmak için NF-κB miktarı artırılır. Yüksek NF-κB aktivitesi PCAM-1, ICAM-1, VCAM-1, P-selektin ve E-selektin gibi adezyon moleküllerini, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12 gibi sitokinleri ve büyüme faktörleri G-CSF, M-CSF'yi kodlayan NF-κB bağımlı genlerin sentezlenmesiyle sonuçlanır (Oeckinghaus ve Sankar, 2009; Tzima, 2005). Aterosklerotik lezyon oluşumunda NF-κB' nin yukarıda anlatılan fonksiyonları nakavt fareleri üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Gareus ve ark., 2008). Bu transkripsiyon faktörünün fonksiyonlarının ortaya çıkarılması sonucunda aterosklerozun bir yaşlılık hastalığı olması yanında kronik inflamasyonlara da yol açabileceği anlaşılmıştır.

2.3.2. LDL birikmesi ve oksidasyonu

İnsan vücudundaki LDL, bu kolesterolün vücuttaki transferinde ve metabolizmasında anahtar rol oynar. Hücreler arası boşlukta yağ depolanabilmesi önemlidir bunun içinde bir yağa ihtiyaç vardır. Bu yağ ihtiyacı dolaşımdaki yağlardan karşılanmaktadır ve bu durum özellikle yüksek kolesterol düzeyleri ile ilişkilidir (Wang, 2016). Kolesterol dolaşımında değişik şekilde özellikle lipoproteinler olarak bulunur. Lipoproteinlerin fiziksel ve fizyolojik özelliklere dayanan büyüklük ve yapı bakımından çok heterojen grup parçacıkları olması nedeniyle, LDL'lerin 1,019-1,063 g/ml yoğunluğa sahip parçacıklar olduğu tanımlanmıştır. Daha spesifik olarak, LDL parçacıkları ortalama 22 nm çapa, çekirdeği yaklaşık 170 trigliserit ve 1600 kolesterol esterinden ve yaklaşık 700 molekül fosfolipid içeren bir tek yüzey tabakasından (~% 64 fosfatidilkolin (PC), ~% 11 lizofosfatidilkolin (LPC), ~% 26 sfingomieline) ve bir apoB-100 kopyasından oluşur (Esterbauer ve ark., 1992; Steinberg, 2002). LDL, lipofilik antioksidanlar ve fosfolipitlerle çevrili bir ester kolesterol özünden oluşur. Lipofilik antioksidanlar başlangıçta LDL parçacıklarını deformasyona karşı korurlar, ancak antioksidanlar düşürdükten sonra doymamış yağ asitleri okside olur. Bu nedenle, LDL'nin oksidatif değişiklikleri, LDL'nin lipid ve protein bileşenlerini değiştirir. Aterojenezin ilk evresinde lezyon oluşan yerde lipoproteinler birikir. LDL endotel örtüden transsitozla geçemese bile endositoz yoluyla hücre içine girebilir (Snelting-Havinga ve ark., 1989; Vasile ve ark., 1983). Sağlıklı koşullarda, plazma LDL'si ve hücre içi LDL konsantrasyonu arasında bir denge vardır. Dengede olan plazmada LDL intima içerisinde sıkışır ve burada tutulu kalır. Tutulma süresinin uzaması hem kendiliğinden hem de hücre tarafından oksidasyona izin verir (Tavafi, 2013). LDL damar duvarına girmeden önce reaktif

oksijen türevleri (ROS) tarafından oksitlenir (okside LDL, ox-LDL) (Weber ve Noels, 2011). Oksidasyon sırasında LDL ilk olarak minimal Ox-LDL'ye dönüşür (mmLDL). Ox-LDL, T hücreleri ve makrofajları aktive eder, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarır, makrofajları sarkoplazmik retikuluma çeker ve köpük hücrelerini üretir. Ox-LDL, monosit kemotaksisi, makrofaj hareketinin inhibisyonu, yağ hücrelerinin oluşumu, endotelial adezyon moleküllerinin daha fazla ekspresyonu, büyüme faktörü stimülasyonu, kemokin ekspresyonu, monosit çoğalması, yağ çizgileri oluşumu ve intima kalınlaşması gibi aterosklerozun başlangıç aşamasında etkili olan birçok özelliğe sahiptir (Steinbrecher ve ark., 1990). Makrofajların LDL için reseptörleri vardır. Bu reseptörler, kolesterolün makrofajlarda birikip köpük hücreleri oluşturma biçimini daha güçlü bir şekilde gerçekleştirirler. LDL değişimine neden olan reaksiyonlar, LDL'nin protein kısmı üzerindeki amino asitlerdeki değişikliklerle ilişkilidir (Ross, 1999). mmLDL' nin daha ileri oksidasyonu orta derecede oksitlenmiş LDL'yi (moLDL) ve son derece oksitlenmiş LDL'yi (oxLDL) oluşturmak üzere ilerlemektedir (Şekil 6).



Şekil 6: LDL' nin oksidasyonu (Collot-Teixeira ve ark., 2007; Levitan ve ark., 2010).

LDL'nin oksidasyona bağlı olarak değiştirilmesi, lokal vasküler homeostaz ve kemokin sekresyonu ile karakterize bir inflamatuvar yanıtı tetikleyen endotel hücre sitotoksitesisi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Li ve ark., 1999). Hatta endotel hücreleri tarafından adezyon moleküllerinin daha yüksek ifadesi ve stimülasyon makrofajların ve düz kas hücrelerinin migrasyon ve mitojenezinden de sorumludur (Chisolm ve Steinberg, 2000). Bu modifikasyonlar lipoprotein kümelenmesine ve

lipoprotein tutumunu da artırır. Bunlara ek olarak, oxLDL'nin, endotel nitrik oksit sentazının (eNOS) endojen bir inhibitörü olan artmış asimetrik dimetilarginine (ADMA) yol açan S-adenozimetiyonin bağımlı metiltransferazların aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Mudau ve ark., 2012). eNOS enzimi bahsedildiği gibi vasküler tonusundan sorumlu olan NO biyosentezinden sorumludur. NO aynı zamanda, endotelyal geçirgenliğin (Duran ve ark., 2010), Vasküler düz kas hücre (VSMC) çoğalmasının ve göçünün (Napoli ve ark., 2013), platelet agregasyonu ve adezyonu (Irwin ve ark., 2009) ve lökosit yapışmasının azalmasıyla inflamasyonun önleyici özelliklere sahiptir (Armstead ve ark., 1997).

2.3.3. Kemokinler

Aterosklerozun ilk evrelerinde, monosit ve T hücreleri arter duvarından çıkararak bozulmamış endotele girer. Aterosklerozun ilk basamaklarında inhibitör monosit kemokin proteininin (MCP-1) makrofajlar tarafından belirgin bir şekilde, SMC ve endotel ile daha az miktarda ifade edildiği bilinmektedir (Rafieian-Kopaei, 2014). MCP-1, aterosklerozun tüm basamaklarında eksprese edilir. Adezyon moleküllerinin reseptörleri T-hücreleri, SMC veya vasküler endotel hücreleri üzerinde ifade olur. Kemokinler T-hücre aktivasyonu ve göçünde kilit rol oynamaktadır (Erl ve ark., 1998).

Ayrıca aktif endotel hücreleri, endotele yönlendirilmiş göçü artıran kemoatraktan salgılar (CCL2 ve CCL5) salgılar (Mestas ve Ley, 2008). MCP-1'de (CCL2) veya bunun reseptöründe (CCR2) eksikliği olan, ateroskleroza duyarlı fareler kullanılarak gerçekleştirilen *in vivo*, subendotel monosit birikimini azaltarak lezyon oluşumuna karşı önemli korumaya sahip olduğu gösterildi (Combadiere ve ark., 2008). Adezyon sonrasında, lökositler gevşek hücre içi bağlantılardan yararlanır ve intimaya göç eder. OxLDL'nin varlığını algılayan endotel hücreleri monosit kemoatraktan proteini, MCP-1 (CCL2) salgılar (Harrington, 2000). Endotel hücreleri ayrıca lezyon bölgesine göç eden makrofajların çoğalmasında rol alan makrofaj koloni uyarıcı faktörü (M-CSF) üretmek için endoteli uyarır. Monositler makrofajlara farklılaştıktan sonra çöpçü reseptörleri kullanarak, ox-LDL'yi içeri alır. Daha önce belirtildiği gibi, oksitlenmiş LDL'nin alınması, muhtemelen çöpçü reseptörlerle, özellikle çöpçü reseptör SR-A1, A2, CD36 ve CD68 vasıtasıyla gerçekleşir (Harrington, 2000). İçeri alınan bu yağ molekülleri geç endozomlarda kolesterol ve yağ asitlerine ayrılır

(Maxfield ve Tabas, 2005). Çeşitli metabolik yollarla yeniden ester tepkimelerinde kullanılır (Rothblat ve Michael, 2010).

2.3.4. Düz kas hücrelerini bağlayan proteinler

Alfa-düz kas aktin, miyozin ağır zinciri, SMemb/kas-dışı MHC izoform-B ve retinol vasküler düz kas hücrelerini bağlar ve plastitiste kazandırır (Rensen ve ark., 2007). VSMC damar çapını ayarlar, damarlarda hasar olması durumunda, VSMC'ler normal kontraktilden proinflamatuuar-sentetik fenotipe geçebilir (Gomez ve Owens, 2012). Doku özelliğini yitirmiş bölgeden göç eden VSMC'ler birikmiş makrofajlarla birlikte aterosklerotik lezyonun çekirdeğini oluşturur (Yuan ve ark., 2001).

Burulma ve yırtılma gerilmeleri de dahil olmak üzere lezyon bölgesinde trombozu teşvik eden başlıca etkenlerdir. Aterosklerozun ileri komplikasyonu olan tromboz, plakların patlamasıyla ilişkilidir; boşalan plak içeriği damar tıkanmasına neden olur. İleri lezyonlarda kalsifikasyon ve neovaskülerizasyon aterosklerotik lezyonların ilerlemesinde önemli bir faktördür. İntimal kalsifikasyon perisitleri kireçlendirir. Bu süreçler oksisiterol ve sitokinlerle düzenlenir. (Libby ve ark., 2011)

2.3.5. İnflamasyon

Kronik inflamasyonu takiben plazmada CRP (C- Reaktif protein), IL-6 ve IL-18 ve TNF- α , gibi birçok sitokin miktarı artar (Liuzzo ve ark., 1994). Matriks metalloproteinazlar (MMP-9 veya jelatinaz B), makrofajlar ve diğer inflamatuuar hücreler tarafından salgılanır ve genel inflamasyon, vasküler anevrizmalar, miyokardiyal hasar ve yeniden şekillendirme gibi çeşitli patolojik süreçlerde rol alır (Pasceri ve ark., 2000). Başlangıç MMP-9 seviyeleri ile kardiyovasküler ölüm riski arasında kuvvetli bir ilişki vardır (Devaraj ve ark., 2003; Mosca, 2002). IL-18 ve MMP-9'un aşırı ifadesi, yüksek riskli hasta grubu olarak tanımlanır. Makrofaj ve/veya yağ dokusundan türeyen proinflamatuuar sitokinler, karaciğerde CRP'yi tetikler. CRP aterosklerotik inflamasyonun akut fazında bir belirteç olarak görev yapar ve akut koroner sendromlu hastalarda erken ve geç ölüm zamanını tahmin etmede önemli bir kriterdir. CRP, monosit ve endotel hücreleri üzerindeki etkiler yoluyla inlmasyonu ve aterojenezi tetikler ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1'in (PAI-1) etkinliğini ve konsantrasyonunu artırır (Devaraj ve ark., 2003; Mosca, 2002; Setorki ve ark., 2013). CRP, pentraksin protein ailesinin bir üyesidir. Enfeksiyon, akut yaralanma veya diğer inflamatuuar uyaranlardan sonra salınan bir akut faz

reaktanıdır (Nasri ve ark., 2014; Sarrafzadegan ve ark., 2013; Setorki ve ark., 2012). İnflamasyonun sitokin belirteçlerinin koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğunu gösteren bazı kanıtlar vardır. Örneğin, fibrinojen ve CRP gibi akut faz belirteçleri aterosklerozu takip eden koroner arter hastalıklarına işaret eder (Ross, 1999). Makrofajlar (Nasri ve ark., 2014; Sarrafzadegan ve ark., 2013; Setorki ve ark., 2012) ve adipozitler (Setorki ve ark., 2012) tarafından üretilen IL-6' nın plazmadaki konsantrasyonunun artışı nedeniyle inflamasyon sırasında CRP düzeyleri artar (Nasri ve ark., 2014; Setorki ve ark., 2012).

İnflamatuvar mekanizmalar aterosklerozun tüm basamaklarında önemli bir role sahiptir. CRP, bu aşamaların herhangi birinde kompleman sistem aktivasyonu, emilim, aktivite ve hücrel modülasyon, lipid birikimi ve tromboz gibi efektif direkt süreçler yoluyla bir rol oynar. CRP, endotel hücrelerdeki inhibitör kompleman faktörlerinin ekspresyonunu azaltarak arteriyel endotel hücrelerini doğrudan etkiler (Cushman ve ark., 1999). CRP, damar duvar hasarının ilerlemesinde önemli bir faktör olan vasküler intimada bu hücrelerin birikmesine yol açan vasküler SMC'nin çoğalmasını ve aktivitelerine aracılık eder. CRP, aterosklerotik plaklarda lipoprotein birikimi ve kompleman sistemi aktivitesiyle ilişkili bir faktördür. Aterosklerozun ilk adımlarında özellikle aterosklerotik hasarın gelişimine ve ilerlemesine yol açabilecek kompleman sisteminin aktivitesini artırır (Gharipour ve ark., 2013).

2.4. Kardiyovasküler Risk Faktörleri

Hipertansiyon, tütün kullanımı, yüksek kan şekeri, hareketsizlik, obezite ve yüksek kolesterol seviyeleri ölüm için dünyanın en önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır (Narayan ve ark., 2010). Bu faktörlerin çoğu kardiyovasküler hastalıklar (KVH) ile yakından ilişkilidir (Center for disease control and prevention, 2017; Mozaffarian, 2016; Narayan ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2017). Daha önce mevcut KVH bulunmayan insanlar için, Amerikan Kalp Derneği, ideal kardiyovasküler sağlığına ilişkin bir dizi hedef oluşturmuştur. Kardiyovasküler sağlık ölçütleri ideal sağlık davranışlarını ve ideal biyolojik faktör olarak ikiye ayırmıştır. İdeal sağlık davranışları: sigara kullanmama, normal vücut ağırlığı, fiziksel aktivite, önerilen diyetlere tutarlı olarak uyum sağlamadır. İdeal biyolojik faktörler ise tedavi edilmemiş total kolesterolün 200mg/dL' den düşük olması, kan basıncının 120mmHg ve 80mmHg'den düşük olması ve açlık kan şekerinin 100mg/dL' den düşük olması olarak belirlenmiştir (Benjamin ve ark., 2017; Lloyd-Jones ve ark., 2010). İdeal

kardiyovasküler sağlık ölçütleri KVH riski ile ilişkili olduğu bilimsel olarakta gösterilmiştir (Fang ve ark., 2016). Kardiyovasküler risk faktörleri kendi içinde değiştirilebilen ve değiştirilemeyen risk faktörleri olarak iki sınıfta toplanır.

Değiştirilebilen risk faktörleri; hiperkolesterol/hiperlipidemi, hipertansiyon, sigara, hiperglisemi, obezite olarak sayılırken, değiştirilemeyen risk faktörleri aile öyküsü, yaş ve cinsiyet olarak sayılmaktadır.

2.4.1. Değiştirilebilen risk faktörleri

2.4.1.1.Hiperkolesterol ve Yüksek LDL düzeyi

Kolesterol KVH gelişiminde önemli bir risk faktörüdür (Goldstein ve Brown, 2015). Yüksek kan kolesterol düzeylerinin varlığı koroner arter hastalarında (Czepluch ve ark., 2007), monosit kemotaksisini bozar ve böylece erken monosit/makrofaj akışı azalır bununla birlikte büyüme faktörü tedavisine yanıtın gecikmesine ve engellenmesine neden olur (Tirziu ve ark., 2005). Endotel işlev bozukluğunun başlamasında ve ilerlemesinde görev yapan en önemli aterojenik lipoprotein LDL'dir (Babiak ve Rudel, 1987). Kolesterol LDL aracılığı ile karaciğerden diğer dokulara transfer edilir. Aterom plağı oluşumunda ve bunun ilerlemesinde LDL yüksekliği ilk sıralarda yer alır. Plazmadaki LDL kolesterol aterosklerozda en önemli belirleyicilerden biridir. Özellikle proinflamatuvar bir ajan olduğu içinoluşan lezyon bölgelerinde kronik inflamatuvar yanıtı harekete geçirir (Navab ve ark., 1996).

2.4.1.2.Hipertansiyon

Hipertansiyon, kronik böbrek hastalığı ve diyabete yol açtığı için ölümcül bir risk faktörüdür (Danaei ve ark., 2014). Hipertansiyon çeşitli şekillerde aterojenezi etkileyebilir. Kan basıncının uzun süre yüksek olmasının sonucu olarak damar duvarının sertleşmesi kan damarı duvarındaki gerilmeyi artırır (Zhang ve ark., 2017). Yırtılma gerilimi aterojenizdeki temel faktörlerden biri olduğu için, hipertansiyon aslında kolateral büyümeyi teşvik edebilir. Yırtılma gerilimi arttıka aktif endotel hücreleri endotelial nitrik oksit sentazını (eNOS) fosforile eder ve NO üretir. NO, gen ekspresyonunu, aktivitesini, matriks metalloproteinaz aktivasyonunu ve hücre alımını değiştirerek aterojenizde önemli rol oynayan üründür (Yu ve ark., 2005). Diğer taraftan, hipertansiyon yaygın olarak vasküler disfonksiyon ile ilişkilidir, muhtemelen arteriyel yeniden yapılanmayı azaltmaktadır (Benndorf ve ark., 2003; Kou ve ark., 2007; Cai ve Harrison,2000).

2.4.1.3.Sigara

Sigara içimi KVH için önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Tütün dumanı 4000'den fazla kimyasal bileşik içerir ve bunların hepsi fizyolojik süreçleri etkileyebilir (Sabri ve ark., 1991). Özellikle yirminci yüzyılda akciğer kanseri sıklığında ve kardiyovasküler hastalık nedeni ölümlerde sigaranın önemli bir risk faktörü olduğu sonucunu güçlendirmiştir. Sigara içiminin, iskemik kalp hastalıkları ve inme nedeni ölüm riskini artırdığı gösterilmiştir (Bergmann ve ark., 2006; Ito ve ark., 1997). Sigara içiminin kardiyovasküler sistem üzerindeki ilk patolojik etkilerinden biri, çeşitli sinyal yollarını etkileyerek endotel fonksiyonlarının değişmesidir. Dahası, endotel hücrelerinin sayısı ve fonksiyonu sigara ile azalır ve endotel fonksiyon değişikliğine katkıda bulunur (Michaud ve ark., 2006). Endotel hücrelerdeki değişimlerin yanı sıra, sigara dumanına maruz kalmakta inflamatuvar yanıtı değiştirir. Makrofajlarda vasküler endotel büyüme faktörünün azalması, endotel hücrelerinde pek çok bozulmuş düz kas hücrelerinin aktivasyonuna yol açar (Michaud ve ark., 2006). Sigara kullanımı yabancı cisimlerin ve patojenlerin alveollere ulaşmasını önlemek için doğal immün hücrelerin çevresel patojenlere tepki verdiği immün yanıtları modüle ettiği düşünülmektedir. Aktif sigara içenler arasında ani kalp ölümlerinin üç kat arttığı ve uzun yıllar bağımlı olan içicilerin %38 oranında risk artışına sahip olduğu tespit edilmiştir (Aune ve ark., 2018). Sigaradaki nikotinin, proanjyogenik ve aterosjenik etkilerinin olduğu bilinen bir gerçektir (Heeschen ve ark., 2003). Nikotinin asetilkolin reseptörleri ile örneğin; monositler, makrofajlar ve endotel hücreleri sinyal gönderdiği düşünülmektedir (Davies ve ark., 1982). Nikotin VEGF ve bFGF ile aynı oranda endotelial hücre göçü bağımlı büyüme faktörünün indüklenmesi ile anjiyogeneze neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Ng ve ark., 2007). Kronik yoğun sigara içilmesi, ayrıca, vasküler büyüme süreçlerini potansiyel olarak etkileyen, hemoglobine artan karbon monoksit bağlanması yoluyla kronik hipoksiye yol açabileceği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Gray ve ark., 2007).

2.4.1.4.Hiperglisemi ve diyabet

Birkaç yıldır şeker hastalığı KVH için bir risk faktörü olarak tanımlanmış; periferik arter hastalığı ve karotis arter stenozu için risk faktörü olarak kabul edilmiştir (Haffner ve ark., 1998; Newman ve ark., 2017). Buna karşılık riskin düşük olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Bulugahapitiya ve ark., 2009; Rana ve ark., 2016).

Açlık kan şekeri seviyesinin yüksek olması, damarı duvarında anormallikler oluşturduğunu gösteren kanıtlar vardır (Schofield ve ark., 2002). Hiperglisemi endotel fonksiyonu, vasküler düz kas hücresi çoğalması ve damar duvarıyla dolaşımdaki hücreler arasındaki etkileşime neden olur. Bu konuda yapılan hayvan çalışmaları hipergliseminin KVH ile ilişkisine daha iyi ışık tutmaktadır (van Weel ve ark., 2006). Hiperglisemik [streptozotosin (STZ) ile tedavi edilen C57BL / 6 ve obez olmayan diyabetik (NOD)] ve insüline dirençli (Ob/Ob) farelerde femoral arter oklüzyonundan sonra aterosklerozu incelemiştir. Hem STZ ile muamele edilen (DM tip I) hem de Ob/ob (DM tipi II) farelerde, perfüzyon restorasyonunda bozulma gözlenmemiştir. NOD fareleri hafif ve yüksek hiperglisemi arasında herhangi bir fark göstermediyse de, perfüzyon restorasyonu C57BL/6 farelerindeki kadar anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Waltenberger, hipergliseminin aterosklerozu nasıl etkileyebileceğini olası bir açıklama sağlamıştır (Waltenberger, 2001). Monosit göç deneyleri, diyabetik hastaların monositlerinin, VEGF-A'ya doğru daha az göç etme kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir. Kolateral yeniden modelleme konusundaki merkezi rollerinin bir sonucu olarak, bozulmuş monosit göçü altında DM hastalarında aterosklerotik yanıtın azalmasına neden olabilir (Zhou ve ark., 2006).

2.4.1.5. Obezite

Obezite büyük bir sağlık krizi olarak görülebilir ve tüm dünyada ölüm ve engellilik için önde gelen bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Bhupathiraju ve Hu, 2016). Yüksek vücut kütle indeksinin (VKİ) mortalite yükü 1980'den 2010'a yaklaşık iki katına çıktı ve gelecek yıllarda daha da artması bekleniyor (Bhupathiraju ve Hu, 2016). 2014'te ise 1.9 milyar fazla kilolu yetişkin ve bunun 600 milyondan fazlası obezdi. Buna ek olarak, 2014 yılında 5 yaşın altındaki yaklaşık 41 milyon çocuğun fazla kilolu veya obez olduğu tahmin edilmektedir. Geçmiş tahminlerde, yüksek VKİ ile ilgili ölümlerin üçte ikisinden fazlasının KVH'ye bağlı olduğu düşünülmektedir. Obez hastalarda kardiyovasküler hastalık insidansı oldukça yüksektir (GBD, 2015). Yılmaz ve ark. normal koroner kalp hastalığı olanlara kıyasla, iskemik kalp hastalığı olan obez hastalarda koroner dolaşımın daha yavaş olduğu sonucuna varmışlardır (Sasmaz ve Yılmaz; 2009; Yılmaz ve ark., 2003; Yılmaz ve ark., 2006). Muhtemelen, bu bulguların açıklanması, obez hastaların da, altta yatan bir metabolik sendromu yansıtan lipit profilleri ve muhtemelen insülin direnci değiştirmiş olması gerçeği olabilir. Metabolik sendrom, aşağıdaki durumlardan üç veya daha fazlasına

sahip olarak tanımlanır: (i) abdominal obezite; (ii) yüksek trigliserit seviyeleri (> 150 mg dL-1); (iii) düşük HDL (Yüksek yoğunluklu lipoprotein) kolesterol seviyeleri (erkekler için <40 mg dL-1 ve kadınlarda <50 mg dL-1); (iv) yüksek tansiyon (sistolik> 130 mmHg veya diyastolik> 85 mmHg veya antihipertansif ilaçlar); ve (v) yüksek açlık glikoz konsantrasyonu (> 110 mg dL-1). Sözü edilenlerden, herbirinin aterosklerozde ek bir etkisinin olduğu beklenebilir (Winer ve ark., 2016). Makrofajlar (Lumeng ve ark., 2007), T hücreleri (Winer, 2009), B hücreleri (Winer ve ark., 2011), doğal öldürücü hücreleri (Wensveen ve ark., 2015) ve nötrofiller (Talukdar ve ark., 2012) ile birlikte bir pro-inflamatuar fenotipi içeren doğal ve adaptif immün hücrelerin birikimi antiinflamatuar immün hücrelerde (düzenleyici T hücreleri, M2 benzeri makrofajlar ve eozinofiller) bir azalma gösterilmiştir (Winer ve ark., 2016).

2.4.2. Değiştirilemeyen risk faktörleri

2.4.2.1. Yaş

Küresel olarak, yaşam süresi 1980'de 61,7'den 2015'de 71.8 yıla yükselmiştir (Wang, 2016). Bir iskemik olay (örneğin, miyokard enfarktüsü ve felç) durumunda, yaşlı hastalardaki mortalite, genç hastalardakinden önemli derecede yüksektir (Bao ve ark., 1996; Ford ve ark., 2014). Kardiyovasküler değişiklikler daha sıklıkla yaygınlaşır, daha geniş kapsamlıdır ve beraberindeki morbidite bu hasta grubunu pek çok tedavi seçeneği için daha az uygun hale getirir.

Yaşlanmakta olan hastada, çoğu fizyolojik süreçler değişir gibi gözükmemektedir. Metabolizma yavaşlar, nöronlar daha az çalışır (Disterhoft ve Oh, 2007) ve yaraların iyileşmesi daha uzun sürer (Ashcroft ve ark., 1997), bu kan damarı büyüme kapasitelerinin azaldığını gösterir. Telomerlerin, normal hücrelerin yaşlanması sırasında ve hücrelerin kritik bir azalmasından sonra boyları kısalmaya ve böylelikle bölünmeyi durdurur (Allsopp ve Harley ve ark., 1995). Hücre bölünmesinin yanı sıra diğer hücre fonksiyonları zamanla değişir. Yaşın artmasıyla endotel hücreleri daha az NO üretir (Rivard ve ark., 1999). Yaşlanma kandaki inflammatuar aktivitenin azalmasıyla da ilgilidir ve yaşlanma ile anjiyogenez ve ateroskleroz oluşumu artar (Bruunsgaard ve ark., 2003). Bununla birlikte, akut uyarana verilen yanıt azalmıştır. Yaşlıların, ameliyat tetikleyicilerinde yeterince tepki verme olasılığı daha azdır ve önemli bir arter tıkanması durumunda *in vitro* hücrelerin aktivasyonu için de geçerlidir, bu da dolaşımdaki sitokin düzeylerinde artışa neden olurken vasküler

yeniden yapılanma kapasitesinde azalmaya neden olur. Aslında, klinik öncesi ve klinik çalışmalar, arteriyel oklüzyonu telafi etme kabiliyetinin yaşın artması ile bozulduğunu göstermiştir (Kurotobi ve ark., 2004; Kurotobi ve ark., 2004; Tuttle ve ark., 2002).

2.4.2.2.Cinsiyet ve aile öyküsü

Erkeklerle kadınlar arasındaki bazı önemli biyolojik farklılıklar arterlerin büyüklüğü gibi farklılıklarla ilgilidir. Kadınlarda daha az plaklı küçük karotis arterler (Krejza, Schulz ve Rothwell ve ark., 2001), fakat daha belirgin stenoz (Iemolo ve ark., 2004) ile yeniden şekillenme arasındaki farklarla ilişkili olabilirler. Kadınlarda daha küçük koroner arterler akut koroner sendrom tanısında cinsiyet farklılıklarını açıklayabilir. Bununla birlikte, görünen cinsiyet farklılıkları koroner arterlerin araştırılması ve revaskülarizasyonu ile ilgili kararları etkileyebilir ve belki de cinsiyet farklılıkları revaskülarizasyon sonrası sonuçları etkileyebilir (Pelletier ve ark., 2014). Cinsiyete bağlı değişkenlerin sağlıkla ilişkili cinsiyet farklılıklarını açıklamada yardımcı olabileceğine dair kanıtlar, genç erkeklerde kadınlardan daha yüksek KVH sıklığının olduğunu söyler. Erkeklerin artmış bir risk altında olmasının nedeni, kısmen, sigara içilmesi veya aşırı alkol tüketimi gibi cinsiyete dayalı eğilimler ile açıklanabilir. Ayrıca genç erişkinlerde, özellikle de kadınlarda akut koroner sendromun görülme sıklığının arttığı gözlenmiştir (Izadnegahdar ve ark., 2014). Genç yetişkinlerde akut koroner sendromun insidansının artması, son on yılda aile, sosyal ve kurumsal rollerin ve erkeklerin ve kadınların tutumlarının değişmesi ile ilişkili olabilir (Kawase ve ark., 2013). Önemli ve tartışmalı farklılıklardan biri de, hem erkekler hem de kadınlar için hormonal tedavidir. Hayvan modellerinde östrojenin ateroskleroza karşı koruyucu olduğunu gösteren çok sayıda kanıt vardır (Williams ve ark., 1995). Benzer şekilde, testosteron eksikliğinin aterosklerotik olay riskini artırdığına dair yeterli kanıt vardır (Herring ve ark., 2013).

Kardiyovasküler hastalığı olan ebeveynlerin çocuklarının çoğu zaman bir büyük risk altında oldukları için, ailevi kardiyovasküler hastalık öyküsünün bulunması büyük risk oluşturmaktadır. Birinci derece akrabalığının 55 yaşından önce (erkeklerde) veya 65 yaşında (kadınlar için) KAH olması durumunda risk artar (Fuster ve ark. 2002). Ayrıca, Kafkasyalılara kıyasla, Afrikalı Amerikalılar daha yüksek tansiyonları nedeniyle daha fazla risk altındadır. Son zamanlara kadar aile öyküsü değiştirilmesi mümkün olmayan risk faktörleri arasında yer alıyor olsa da eğer aile de aile öyküsü

geçmiş pozitifse bireyler böylesi durumlarda daha erken yaşlarda taramalardan geçerek kalp damar hastalıklarına yakalanma risklerini düşürebilmekte ve daha erken tedavi olmaları söz konusu olmaktadır.

2.5. Epigenetik ve kodlama yapmayan RNA'lar

Ökaryotik hücrelerde, gen ifadesi, birkaç “oyuncunun”, genlerin transkripsiyonunu ve translasyonunu kontrol etmede birbirleriyle etkileştiği karmaşık bir moleküler ağın sonucudur. Bu oyuncular düzenleyici diziler (promotorlar ve enhansırlar), RNA polimerazlar, transkripsiyon faktörleri ve yardımcı düzenleyici proteinlerdir. Bu etkileşimlerin önemli düzenleyicilerinden biri de epigenetik mekanizmalardır. Bu mekanizma DNA dizisini değiştirmeden gen ifadesini etkileyen, ancak yine de hücre kuşakları arasında iletilebilen bir dizi işlemlerdir. Epigenetik mekanizmalar 4 temel kategoride toplanabilir: (1) Metilasyonlar, (2) kovalent histon modifikasyonları, (3) ATP-bağımlı kromatin yeniden düzenlenmesi ve kodlama yapmayan RNA'lardır (Bernstein ve ark., 2007; Lorenzen ve ark., 2012; Wu ve ark., 2009).

Kardiyovasküler hastalıkların etiyolojisini daha iyi anlamaya yönelik araştırmalarda, kodlama yapmayan RNA'lar (non-coding RNA, ncRNA'lar) geniş çapta çalışılmıştır ve çok çeşitli örneklerde inceleme yapıldığında kardiyovasküler ve metabolik hastalıklarda farklı ifadelere sahip olduğu gösterilmiştir. İnsan genomunda yaklaşık 25.000 protein kodlayan gen vardır bu da genomun sadece yaklaşık %2' lik bir kısmına karşılık gelir (Collins ve Penny, 2009). Genomun gen içermeyen bölgesinin bir kısmı heterojen, fonksiyonel bir RNA grubuna transkribe olur (Carninci ve Hayashizaki, 2007; Claverie, 2005). Buna genellikle ncRNA ya da kodlama yapmayan RNA denir. Kodlama yapmayan RNA'lar büyüklüklerine göre üç sınıfta toplanır: kısa (~19-25 nt), orta (~20-200) ve uzun (200 nt'ten büyük) RNA'lardır (Tablo 1). Bu RNA'lar özellikle gen ifadelenmesinin düzenlenmesinde görevlidir (Cech ve Steitz, 2014).

Tablo 1 Kodlama yapmayan RNA'ların sınıflandırılması (Gangwar ve ark., 2018)

Sınıfı	Büyüklüğü	Lokasyonu
Kısa	<i>MiRNA</i> 'lar (~19-24 nt)	Hücre içi ve hücre dışı
	SiRNA'lar (~21-23nt)	Eksojenler
	PiRNA'lar (~26-31nt)	
Orta	SnoRNA'lar (~20-200nt)	Çekirdekçik içi
	SnRNA'lar	Çekirdek içi
Uzun	>200nt	Çekirdek, stoplazma ve mitokondri

snRNA (small nuclear RNA) ve snoRNA (small nucleolar RNA) ilk tanımlanan RNA'lardır ve mRNA translasyonunda görevli RNA'lar olarak karakterize edilirler. Bu RNA'lar ayrıca nükleotid modifikasyonu ve uç bağlama gibi RNA işleme olaylarında görevlidirler (Cech ve Steitz, 2014; Collins ve Penny, 2009). Daha sonra keşfedilen *lin-4* ve *let-7* iki kodlama yapmayan RNA (Lee ve ark., 1993; Reinhart ve ark., 2000) regülatör fonksiyonları olduğunu ortaya çıkardı.

2.5.1. Mikro RNA

Mikro RNA ailesi gen ifadesinin transkripsiyon sonrasında negatif kontrolünde rol alan ve yaklaşık 19 ile 25 nükleotid uzunluğundaki molekülleri kapsar. Genellikle hedef mRNA'ları bir antisens mekanizması ile bastırırlar. Tipik olarak, hedef mRNA'ların 3' UTR'leri ile (kısmen) komplementer dizilere bağlanarak, translasyonu baskılar ve aynı zamanda mRNA kırılmasını ya da degradasyonunu indükler (Bartel, 2009; Filipowicz ve ark., 2008; Cai ve ark., 2009). *MiRNA*'lar dokuya özgü gen ifadesini kontrol ederler ve genellikle hücre çoğalmasında ve apoptoz gibi süreçlerde embriyonik gelişim, doku ve organ oluşumunda rol alan genlerin ifadelerini düzenlerler (Leonardo ve ark., 2012; Esquela-Kerscher ve Slack, 2006).

2.5.2. Mikro RNA'ların isimlendirilmesi

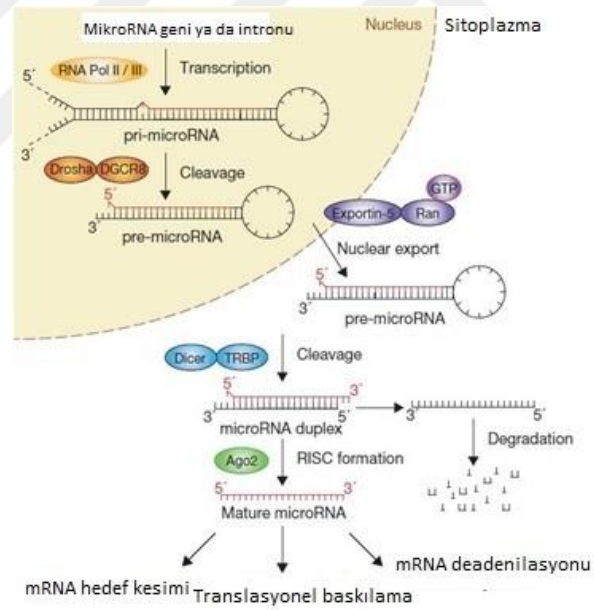
Olgun *miRNA*'lar genellikle *miR* kısaltmasının ardından bir numara ile tanımlanırlar; örneğin, *miR-499*. *miR*'in önüne gelen kısaltma kaynak organizmayı göstermektedir; örneğin *hsa-miR-101*; insan türündeki mikro RNA 101'i ifade etmektedir. Sadece bir veya iki nükleotidinde farklılık gösteren aynı *miRNA* sayının arkasına harfler yazılarak birbirinden ayırt edilir; örneğin *miR-123a* veya *miR-123b* gibi. Genomun farklı bölgelerinde aynı nükleotid içeriğine sahip *miRNA*'lar kopyalanabilir ve bunlarda numaraların arkasına bir tireden sonra numara verilerek ayırt edilir; örneğin; *miR-194-1* veya *miR-194-2* gibi. *MiRNA*'lar genellikle saç tokası şeklindedirler, 3' ya da 5' ucundan çıkıntı yapabilirler ve tek iplikli bu çıkıntılar hedef mRNA'ya buralardan bağlanabilirler. Buna göre adlandırmalar 3' ve 5' bağlanmasına göre adlandırılırlar; örneğin; *miR-17-5p* (5' kol) veya *miR-17-3p* (3' kol). İfade seviyesine göre ise *miR-123* veya olur. Düşük seviyede ifade edilen *miRNA* molekülleri verilen numaraların ardına konulan * ile gösterilir örneğin; *miR-123** düşük seviyede işaret edildiğini gösterir (Bronze-Da-Rocha, 2014).

2.5.3. Mikro RNA sentezi, işlenmesi ve fonksiyonları

Kendileri de dokuya özgü ifade edilen *miRNA* molekülleri genellikle dokuya özgü gen ifadesinin kontrolünü sağlarlar (Leonardo ve ark., 2012). Bu nedenle, çoklu hastalıklarda merkezi rol oynamalarının yanında gelişim ve farklılaşma sırasında gen regülasyonu üzerinde geniş bir etkiye sahiptir (Esquela-Kerscher ve Slack, 2006; Zhao ve Srivastava, 2007).

Bazı mikroRNA'ların dokuya özgü ifadelerinin kontrolünün yine mikroRNA'lar tarafından yapıldığı bilinmektedir. İlk keşfedilen mikroRNA *Caenorhabditis elegans*'ın (*C. elegans*) *lin-4*'ü olan mikroRNA'dır (Lee ve ark., 1993; Wightman ve ark., 1993). *Lin-4*'ün bu organizmanın gelişimindeki fonksiyonu mutasyonlarla açıklığa kavuşturulmuştur. *Lin-4*'ün hedeflediği *lin-14*'ün ekspresyonuna bağlı olarak geç larval evrelerinde anormal yapı, gelişimsel sinyal yollarının düzenlenmesi ve düzensizliği ile sonuçlanmıştır. 2000 yılında Ruvkun laboratuvarında başka bir kodlama yapmayan RNA olan *let-7*'nin *lin-41* genini hedef aldığını ve inhibe ettiğini bildirmiştir (Reinhart ve ark., 2000). Diğer türlerin gen regülasyonunda *miRNA*'ların rolünü anlamaya yönelik çalışmalar, hem fare hem de insan genomlarındaki birkaç *miRNA*'yı tanımlamaya yönelik olmuştur (Lagos-Quintana ve ark., 2001; Lau ve ark., 2001). İzleyen araştırmalar araştırmalarda, çok çeşitli türlerde binlerce farklı *miRNA*

tanımlandı. Bu miRNA'ların biyosentezleri, işlevleri, lokalizasyonu, insan sağlığı ve hastalığındaki rolü daha iyi anlaşıldı. *MiRNA* genleri önce birkaç yüz nükleotit (nt) uzunluğunda, birden fazla gövde-halka (stem-loop) yapıya kopyalanır. Bu birincil *miRNA* veya "pri-*miRNA*", Drosha RNaz ve onun kofaktörü DGCR8 vasıtasıyla 70 nükleotit uzunluğunda başlangıç *miRNA* veya "pre-*miRNA*" yapılarına işlenir (Wightman ve ark., 1993). Pre-*miRNA* çekirdek dışına Exportin 5 vasıtasıyla ve enerji kullanılarak çıkarılır (Han ve ark., 2004; Lee ve ark., 2002; Lund ve ark., 2004). Sitoplazmada iken, pre-*miRNA*'lar 5-RanGTP'den ayrılır ve Dicer tarafından daha kısa çift iplikli RNA parçalarına ayrılır. Bu son işlemten sonra, Dicer-TRBP kompleksi, argonaute 2'yi (Ago2) ve sonuç olarak meydana gelen ds-*miRNA*'yı bağlayan ilave proteinleri, RNA ile indüklenmiş susturucu kompleksinin (RISC) oluşumuna yol açar (Hauptmann ve Meister, 2013). RISC, dsRNA'yı bir rehber zincire ve bir yolcu zincirine ayırır ve rehber zincirin hedef mRNA 3'UTR'ye bağlanmasını kolaylaştırır (Şekil 7).



Şekil 7: Mikro RNA biyogenezi (Winter ve ark., 2009)

Pri-*miRNA*'yı olgun *miRNA*'ya dönüştürmesi bir dizi işlem gerektirir. Pri-*miRNA*, 33 ila 35 baz çiftlik (bp) uzun bir gövdenin bir ucunda halka diğer ucu ise eşleşmemiş nükleotitlerden dolayı tek iplikli segmentlerden oluşur (Ha ve Kim, 2014). Pri-*miRNA*'nın bu gövde-halka yapısı, çekirdekteki "mikroişlemci" tarafından tanınır. Bu mikroişlemci, ana bileşenleri Drosha ve DGCR8 olan bir çoklu protein kompleksidir. Drosha'nın RNaz III aktivitesi, gövde-halka öncü *miRNA*'yı (pre-*miRNA*) serbest

bırakan pri *miRNA*'nın kesilmesi için gereklidir. Başlangıçta intronik *miRNA*'ların önce uçlarının bağlanıp (splays) dallandığı daha sonra Drosha ile kesildiği ileri sürüldü (Ying ve Lin, 2006). Bununla birlikte, daha yeni çalışmalar, kanonik intronik *miRNA*'ların Drosha ile kesilmesinin, sadece splayozom kompleksine transkript eklendikten sonra oluştuğunu göstermişlerdir, ancak önce intron birleşmesi gerçekleşmiştir (Kim ve Kim, 2007).

Mirtronlar işlenmeleri bakımından *miRNA*'lardan bağımsızdır. Mirtronların işlenmesi Drosha'nın RNaz III aktivitesi gerektirmez ancak uç bağlamayı gerektiren bir süreçtir. (Westholm ve Lai, 2011). Diğer *miRNA*'lara kıyasla daha kısa öncül gövdeleri vardır (Ruby ve ark., 2007). Bunun yerine, mirtronların uzantıları, uç bağlama için gerekli konsensüs diziler gövde-halka yapısının 3'ucunda bulunur (Ruby ve ark., 2007; Kim ve Kim, 2007). İntronun kodladığı *miRNA* işlemi sırasında hem splayozom hem de mikroişlemci mekanizmaların birbirinden bağımsız olarak çalıştığı görülmektedir (Havens ve ark., 2012; Miyoshi ve ark., 2010).

İşlenme sürecinden bağımsız olarak üretilen pre-*miRNA*'lar Exportin-5 transport kompleksi tarafından sitoplazmaya aktarılır (Okamura ve ark., 2008; Ruby ve ark., 2007). Sitoplazmada, RNase III endonükleaz Dicer, pre-*miRNA*'yı tanır ve 22nt uzunluğunda olgun *miRNA* dupleksini serbest bırakarak terminal halkasına yakın olarak parçalara ayırır. Dupleks, RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) adı verilen bir efektör kompleksi oluşturmak için bir Ago proteinine yüklenir (Mourelatos ve ark., 2002). *MiRNA*, 5'-ucunda daha az kararlı baz eşleşmesi ile birlikte, Ago proteiniyle etkileşime devam ederken, diğer iplikçik, dupleksten ayrıştırılır (Khvorova ve ark., 2003; Schwarz ve ark., 2003). İlginç bir şekilde, son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, yolcu *miRNA* zincirinin bazı düzenleyici fonksiyonlara sahip olabildiğini göstermiştir (Okamura ve ark., 2008; Yang ve ark., 2011).

2.5.4. Dolaşım mikroRNA'ları

Kan serumunda *miRNA*'ların varlığı ve çoğu RNA'nın aksine, nükleaz aktivitelerine karşı oldukça dirençli olduğu bilinmektedir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, hücreler arası iletişim araçları olarak dolaşım *miRNA*'ların potansiyel rolüne ışık tutmuştur. Eksozomlar içinde kapsüllenmiş hücre dışı *miRNA*'nın hücreler tarafından alınabileceğini ve bu alıcı hücrelerde gen ifadesinde ve fonksiyonlarında değişiklik

yapıldığı gözlemiştir (Valadi ve ark., 2007). Ayrıca, dışardan verilen miR-126'nın damar hasarlı farelerde endotel homeostaziye düzelttiği gösterilmiştir (Jansen ve ark., 2013). Hücrelerin streslere maruz kaldıklarında verdiği tepkiler arasında *miRNA*'salınımı da vardır (Emde ve Hornstein, 2014).

Mikro RNA'lar hem hücreler arasında hem de dokular arasında taşınabilir. Kandaki *miRNA*'ların vezikül bağlantılı olmalarının yanında membran içermeyen *miRNA*'lar da vardır. Vezikül bağlantılı olmayan *miRNA*'lar Ago 2 ve RISC proteinlerinin oluşturduğu protein kompleksleri tarafından kararlı hale getirildiği gösterilmiştir (Arroyo ve ark, 2011; Wang ve ark, 2010). Membrana bağlı *miRNA*'lar apoptotik cisimlerde, eksozomlarda ve mikroveziküllerde bulunur. Dolaşımdaki *miRNA*'lar HDL partiküllerinde de bulunabilir.

Dolaşımdaki bazı mikroRNA'lar, kardiyovasküler hastalıkların potansiyel belirteçleri olarak kabul edilir. Hipertansiyon, koroner arter hastalığı ve miyokart enfarktüsülü hastalarda kan plazmasında *miR-143* ve *miR-145* düzeylerinin değiştiği gösterilmiştir (Parahuleva ve ark., 2017). Dolaşımdaki *miR-133* seviyesinin (*miR-1* ve *miR-208a* ile kombinasyon halinde) koroner arter hastalığı miyokard enfarktüsü teşhisi için umut vaat ettiği gösterilmiştir (Bauters ve ark., 2013). Dolaşımdaki *miR-21* düzeyinin, subklinik ateroskleroz ve miyokard infarktüsüne (her iki koşulda da artış) ve periferik kandaki *miR-221* düzeyine (sadece inmede azalma) çok duyarlı olduğu bulunmuştur (Cengiz, ve ark. 2015). Aortal kandaki *miR-100* düzeyinin lipit hacmi ve fibröz hacim yüzdesi ile pozitif korelasyon gösterdiği gerçeğine dayanarak, bu mikroRNA'nın bir plak hassasiyeti ile ilgili biyobelirteç olduğu öne sürülmüştür (Soeki ve ark., 2015). *MiRNA* ifade modelleri, ateroskleroz ve diğer kardiyovasküler hastalıklar arasında farklılık gösterir. Bu *miRNA*'ların hastalık patojenezinde rol oynayıp oynamadığı veya sadece biyobelirteçler olarak işlev görüp görmediği önemli bir tartışma konusudur.

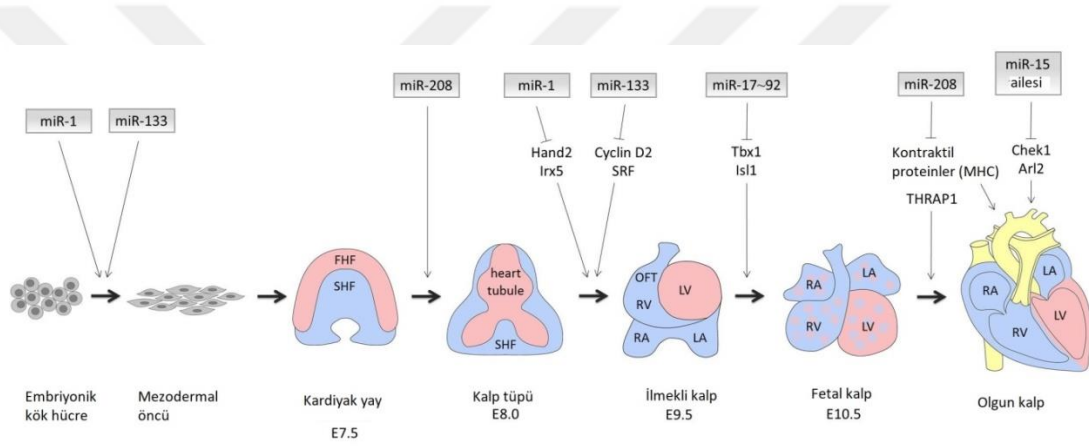
2.5.5. MikroRNA'lar ve kardiyovasküler hastalıklar

Kardiyovasküler sistemdeki tüm *miRNA*'ların ekspresyonlarının bloke edilmesiyle kalp biyolojisinde ne kadar önemli bir yere sahip olduğu anlaşılmıştır (Hata, 2013). Drosha, DGCR8, Ago2 veya Dicer gibi *miRNA* biyogenezini için gerekli olan genlerin dokuya özel olarak delesyona uğradığı anlaşılmıştır. Farelerde bu kritik genlerin silinmesi, kalp ve kan damarlarının ciddi gelişim kusurlarına bağlı olarak erken gebelikte ölümle sonuçlanmıştır. Farklı hücre tipleri, spesifik *miRNA* ifadesi

profiliyle sınıflandırılır. İlginç bir şekilde, sadece 18 *miRNA* ailesi, kardiyak *miRNA*'ların yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır (Small ve Olson, 2011) . Kardiyomiyositler arasında, *miR-1* en bol olanıdır. *MiR-1* ve *miR-133* aynı bisistronik transkriptten kaynaklanır, ancak *miR-133* ifadesi daha düşüktür. *MiR-1* ve *miR-133*, embriyonik kök hücrelerde (ESC'ler) mezoderm farklılaşmasını teşvik eder. Daha sonra gelişimlerinde karşı roller oynarlar: *miR-1* teşvik eder ve *miR-133* mezodermin kardiyomiyositlere farklılaşmasını engeller (Porrello, 2013). *MiR-1*, *Irx5* ve *Hand2* transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu düzenleyerek kardiyojenezi etkiler (Zhao ve Srivastava, 2007). Hedeflenen *miR-1* silinmesi ventriküler septal defektlerle (VSD) sonuçlanır. *Irx5* proteini, potasyum voltajlı kanal alt ailesi D üyesi 2 (*Kcnd2*) gibi potasyum kanal genlerinin ekspresyonunu düzenler ve kalp ventriküler repolarizasyon gradyanını belirler. *MiR-133*, hücre döngüsü ilerlemesinde yer alan transkripsiyon faktörleri olan serum yanıt faktörü (SRF) ve siklin D2'nin aktivitesini etkiler. SRF, kalp kası ve düz kas farklılaşması ve büyümesinden sorumlu genleri düzenler; ayrıca *miR-133/1*'in transkripsiyonunu aktive eder. Siklin D2, hücre döngüsünün G1 fazında retinoblastoma proteinin fosforilasyonuna etki ederek kardiyomiyosit proliferasyonunu kontrol eder (Liu ve ark., 2008). Kasılma proteini ekspresyonu kalp gelişimi sırasında sıkı bir şekilde düzenlenir. Miyozin genlerinin anormal sentezi, patolojik kardiyak yeniden şekillenmeye dayanır. Miyozin genleri, *miR-208a*, *miR-208b* ve *miR-499*'un kontrolü altında kalır ve bunlar sırasıyla *Myh6* (alfa-miyozin ağır zinciri, α -MHC), *Myh7* (beta-miyozin ağır zinciri, β -MHC) ve *Myh7b* tarafından intronlarında kodlanır. Kemirgenlerde, β -MHC (yavaş ATPaz) ekspresyonu embriyonik gelişim sırasında ortaya çıkar, doğumdan sonra α -MHC (hızlı bir ATP-ase) ortaya çıkarken *Myh7b* ifadesi her iki aşamada da ortaya çıkar (Boettger ve Braun., 2012). *miR-208a* ve *miR-208b* özdeş çekirdek dizilerinin olması, farklı gelişim aşamalarında ortak hedef genleri düzenlediklerini gösterir. Yetişkin kalpte, β -MHC sentezi, hipoksi veya hipotiroidizm gibi stres koşulları altında kardiyomiyositlerde yeniden ifade edilir (Porrello, 2013). *miR-208a*'nın silinmesi, hızlı iskelet kası genlerinin ektopik ekspresyonu ve bozulmuş doğum sonrası stres cevabı ile sonuçlanır (Van Rooij ve ark., 2007). *MiR-15* ailesi, özdeş çekirdek dizilerine sahip olan *miR-15a/b*, *miR-16-1/2*, *miR-195* ve *miR-497*'den oluşur. *MiR-195* doğumdan hemen sonra miktarı değişir ve kardiyomiyosit proliferasyonunu durdurur; kontrol noktası kinaz 1 (Chek1) dahil olmak üzere çok sayıda hücre döngüsü genini kontrol eder. *MiR-195*'in

aşırı ekspresyonu VSD'ler ve ventriküler hipoplazi ile sonuçlanır (Porello ve ark., 2011). *MiR-15b*, mitokondrilerde ADP/ATP değiştiricisinin bir bileşeni olan *Arl2*'yi hedefleyerek kardiyomiyositlerde ATP düzeyini kontrol eder (Nishi ve ark., 2010).

MiR-17-92 kümesi, *miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a / b*, *miR-20a* ve *miR-92*'den oluşur. *MiR-17-92* transkripsiyonu, kemik morfojenetik protein (BMP) sinyal yolu ile aktive edilir. *Isl1* ve *Tbx1*'in ifadesinin azalması yoluyla *miR-17-92*, kalp çıkış yolunun gelişimini ve ikinci kalp alanı (SHF) progenitörlerinin sağ ventrikül miyositlerine farklılaşmasını destekler (Fuller ve Qian, 2014). *miR-17-92*'nin silinmesi, VSD'lere akciğer hipoplazisine ve sonuçta lme yol açar. Bu etkiler kısmen, bu *miRNA* kümelenmesinin hedef geni olan *Bim* gibi pro-apoptotik proteinlerin ifadelerinde artışa bağlanır (Fuller ve Qian, 2014) (şekil 8)



şekil 8: Fare kardiyak morfojenезinin şematik bir temsili ve bu işlemde *miRNA*'ların rolü (Wojciechowska ve ark., 2015)

Renkler, farklı nc havuzların şekillendirme odalarına katkısını temsil eder. Kalp mezoderm kökenlidir. Embriyonik gün 7.5 (E7.5) 'de, 2 kalp popülasyonu, ilk kalp alanı (FHS) ve ikinci kalp alanı (SHF) olarak adlandırılan kalp yayını oluşturur. Ardından, hücreler göçer ve doğrusal kalp tüpü E8.0'da oluşturulur. Kısa bir süre sonra, kalp tüpü kendiliğinden kasılmalar başlatır ve gelişmekte olan embriyonun kan akışını destekler. Son olarak, kardiyak döngü ve bir dizi morfolojik değişiklik süreci, E10.5 tarafından dört odacıklı kalbin oluşumuna katkıda bulunur. Atriyumun, ventriküllerin ve ortak çıkış yolunun ilerleyici bölümlenmesi daha sonra gerçekleşir (Wojciechowska ve ark., 2017).

Tüm bunlarla birlikte mikroRNA'lar aterosklerotik plağın instabilitesinin ve eşlik eden koşulların yeni invaziv olmayan biyobelirteçleri olarak kabul edilir. Hastanın

kanındaki bulguları, iskemik inme ve miyokard enfarktüsü gibi aterosklerozun bu tür komplikasyonlarının teşhisi için ümit verici bir araçtır (Madrigal ve ark., 2013; Matrias ve ark., 2015).

Aterosklerozun seyri üzerindeki etkilerine bağlı olarak, mikroRNA'lar proaterojenik, antiaterojenik ve iki rolü de üstlenenler olarak üç gruba ayrılabilir (Kumar ve ark., 2014). İnsan aterosklerotik plak stabilitesinin bozulması sırasında mikroRNA ifadesindeki değişim, ağırlıklı olarak hücre tiplerine ayrılmadan bütün bir plak kullanılarak araştırılmıştır (Tablo 2).

Tablo 2 Kararlı ve kararsız aterosklerotik plaklarında *miRNA* ifadeleri (Koroleva,2017)

Mikro RNA	İfade değişimi	Plak özelliği	Plak lokalizasyonu
<i>miR-21</i>	↑	Kararlı	Karotis arterler
<i>miR-100</i>	↑	Kararsız	Karotis arterler
	↑	İlk evreler	Koroner arterler
<i>miR-127</i>	↑	Kararsız	Karotis arterler
<i>miR-133a</i>	↑	Kararsız	Karotis arterler
<i>miR-133b</i>	↑	Kararsız	Karotis arterler
<i>miR-143</i>	↑	Kararlı	Karotis arterler
<i>miR-145</i>	↑	Kararsız	Karotis arterler
<i>miR-221</i>	↑	Kararlı	Karotis arterler
<i>miR-221/222</i>	↓	Kararsız	Karotis arterler
		Yırtılma anında	
<i>miR-494</i>	↑	Kararsız	Karotis arterler

Çoğu çalışmada, endarterektomi sırasında elde edilen semptomatik stenoz sırasında karotis arterlerden çıkan plaklar araştırılmıştır (Volny ve ark., 2015; Cipollone ve ark., 2011; Matrias ve ark., 2015; Bazan ve ark., 2015; Markus ve ark., 2016), bunlara ek olarak aortobifemoral bypass ameliyatları sırasında elde edilen abdominal

aorta ve femoral arterlerden elde edilen plaklar araştırılmıştır. Yakın zamanda iskemik bozukluklar (geçici iskemik ataklar veya inme) geçiren hastalardan elde edilen plaklar, stabil olmayan plakların klinik bir modeli olarak kullanılırken, tanı konulmamış hastaların aterosklerotik plakları, stabil plakların klinik bir modelini oluşturmuştur (Cipollone ve ark., 2011; Maitrias ve ark., 2015; Bazan ve ark., 2015; Markus ve ark., 2016). Potansiyel olarak ateroskleroz ile ilişkili olan 1 ila 900 mikroRNA'nın ekspresyonu, farklı çalışmalarda araştırılmıştır (Cipollone ve ark., 2011; Maitrias ve ark., 2015; Bazan ve ark., 2015; Markus ve ark., 2016). Çalışmaların çoğunda, *miR-100*, *miR-127*, *miR-133a*, *miR-133b*, *miR-145* ve *miR-494*'ün aşırı ifadesi, stabil olmayan aterosklerotik plaklarda gözlenirken, daha yüksek *miR-21* ifadesi, *miR-143* ve *miR-221*, stabil aterosklerotik plaklar için karakteristiktir. Kararsız plaklar ve etkilenmemiş dokularla karşılaştırmalı olarak stabil plaklar için yukarıda belirtilen çalışmalarda *miR-21* ve *miR-143*'ün aşırı ifade edildiği gösterilmiştir ve stabil olmayan plaklarda (kontrol grubuyla karşılaştırıldığında) stabil olmayan plaklarda diğer tüm mikroRNA'ların aşırı ifade edildiği gözlenmiştir (Cipollone ve ark., 2011; Maitrias ve ark., 2015; Vezel ve ark., 2015). *MiR-100* ifadesi aterosklerotik plak gelişiminin erken aşamalarında zaten arterlerde belirgin olarak artmıştır, ayrıca *miR-100* seviyesi kan damarı hasarıyla ilişkilidir. İfadedeki azalma, stabil olmayan plağın rüptürü sırasında ve takip eden beş günde sadece *miR-221/222* için gösterilmiştir. Stabil plak için *miR-221/222* ekspresyonu seviyesi iki hafta içinde prerupture seviyelerine geri döndüğü belirlenmiştir (Bazan ve ark., 2015).

2.5.6. Tez çalışmasında kullanılan mikroRNA'lar

Memeli *miR-10* (*miR-10a*, *miR-10b*) ailesinin nükleotit dizisi evrim sürecinde çok değişikliğe uğramamıştır. Bu ailenin üyeleri belli bir HOX gen grubu tarafından kodlanır. (Tehler ve ark.,2011; Garzon ve ark., 2006; Weiss ve ark., 2009). HOX genleri gelişim için hayati önem taşıyan evrimsel olarak korunmuş transkripsiyon faktörlerini kodlar. Bu genlerin düzenlenmesinin *miR-10* aile üyeleri tarafından yapıldığına dair pek çok kanıt vardır (Tehler ve ark., 2011). *MiR-10a* ve *miR-10b*'nin gövde bölgesinde sadece bir baz farklılık göstermesi nedeniyle, hedef gen dağarcığının ortak olduğu düşünülmektedir.

Tümör supresor proteinlerden p65 ve TWIST sırasıyla *miR-10a* ve *miR-10b*'nin tek doğrudan regülatörleridir (Huang ve ark., 2010; Ma ve ark., 2007). Bir *in vitro*

çalışma, *miR-10a*'nın endotel hücrelerde yırtılma stresine tepki olarak sentezlendiği gösterilmiştir (Qin ve ark., 2010). *In vivo* bir yaklaşımda ateroskleroza hassas bölgelerde *miR-10a*'nın ifade seviyesinin diğer bölgelere oranla daha düşük olduğunu ortaya koymuştur (Fang ve ark., 2010).

Apoptoz (Ovcharenko ve ark., 2011), protein sentezi (Ørom ve ark., 2008), embriyonik gelişim ve farklılaşması (Tzur ve ark., 2008; Woltering ve Durston, 2008), inflamasyonda (Bai, 2007) ve çeşitli tümör oluşumunda (Agire ve ark., 2008; Garzon ve ark., 2008) *miR-10a*'nın rollerinin olduğu bilinmektedir.

MiR-31'i kodlayan gen dokuzuncu kromozom üzerindedir. *MiR-31*'in kanser hastalığının ilerlemesi (Bandres ve ark., 2006; Motoyama ve ark., 2009; Slaby ve ark., 2008), anjiyojenez (Pedrioli ve ark., 2010; Shen ve ark., 2008), inflamasyon (Suarez ve ark., 2010) gibi birçok alanında önemli rol oynayabileceği bilinmektedir. Spesifik olarak, *miR-31* ekspresyon seviyesi HUVEC'lerde (Human umbilical vein endothelial cell) TNF uyarımı ile artmıştır (Suarez ve ark., 2010). SELE ve ICAM-1, endotel hücrelere nötrofil bağlanmasını düzenleyen, sırasıyla TNF kaynaklı *miR-31*'in hedefleridir.

MiR-130a, öncül endotel hücrelerde ve lösemi hücrelerinde yaygın olarak ifade edilir ve farklı proteinlere etki ederek çeşitli hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alır (Kovaleva ve ark., 2012; Wang ve ark., 2010). Örneğin *GAX* ve *HOXA5*'in ekspresyonunu modüle etmesi sayesinde büyük ölçüde vasküler endotel hücrel anjiyojenezini düzenler (Chen ve Gorski, 2008). *HOXA5* antianjiyojeniktir ve vasküler yapılanmayı düzenler (Rhoads ve ark., 2011). *MiR-130* ayrıca trombosit fizyolojisi için önemli bir protein olan *GPIIB* promoterinin aktivasyonunda yer alan transkripsiyon faktörü *MAFB*'nin tanslasyonunu hedefler (Garzon ve ark., 2006). *miR-130a*'nın kardiyomiyositlerde, vasküler düz kas hücrelerinde ve öncül granülositlerde *FOG-2* (Kim ve ark., 2009), *GAX* (Wu ve ark., 2011) ve *Smad4* (Hager ve ark., 2011) gibi çeşitli genleri hedef alarak hücre fonksiyonlarında önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

MiR-204, arterin yeniden biçimlenmesinde rol alan *miRNA*'lardan biridir. *MiR-204* ifade düzeyi hem pulmoner arteriyel hipertansiyonlu (PAH) deney hayvanlarının akciğerlerinde hem de hasta akciğer örneklerinde ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (Caruso ve ark., 2010; Courboulin ve ark., 2011). Bu azalma PSMC'lerde

(Pulmoner arter düz kas hücresi) proliferasyonun artmasına ve apoptozda azalma ile sonuçlanmıştır (Courboulin ve ark., 2011). Önemli olarak, *miR-204* tedavisi, pulmoner arter ve kan sıvısının kalınlaşmasından kaynaklanan kan basıncının önemli ölçüde düşmesine yol açmıştır. Yukarıda tarif edilen mekanizmaların altında yatan moleküler mekanizmalar muhtemelen STAT3 sinyal iletiminin deregülasyonu sonucudur. Bu negatif düzenleme, *SHP2-Src* sinyali ile STAT3 aktivasyonuna yol açar (Bienertova ve ark., 2015) .

MiR-214 ilk olarak tümör hücre apoptozunda tanımlanmıştır (Cheng ve ark., 2005). *MiR-214*'ün kas hücresi farklılaşması, T hücresi proliferasyonu ve kemik oluşumundaki rollerini tanımlanmıştır (Juan ve ark., 2009; Yang ve ark., 2008). *Mir-214*'ün kanserdeki rolü tartışmalıdır çünkü bazı kanserlerde ifadesi artarken örneğin yumurtalık, mide, pankreas, akciğer ve oral mukozal kanserler ve malign melanomlar (Yang ve ark., 2008; Penna ve ark., 2011; Shih ve ark., 2012) bazı kanser türlerinde örneğin serviks, meme ve hepatoselüler kanser gibi *miR-214*'ün ifadesinin azaldığı görülmüştür (Qiang ve ark., 2011; Duan ve ark., 2012; Shih ve ark., 2012). Farklı kardiyovasküler sistemdeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte renal iskemi ve (Godwin ve ark., 2010) miyokardiyal enfarktüs sonrasında miktarının arttığı bilinmektedir (van Rooij ve ark., 2007). Sinyal iletimi ve apoptoz, Ca^{+2} aşırı yüklenmesine bağlı kardiyomiyosit ölümünü azaltmaktadır (Aurora ve ark., 2012). *miRNA* mikroarray analizi *miR-214* ekspresyonunun toraks aort daralmasında (TAC) ve kalsineurin A ile tetiklenen fare kalp hipertrofisi modellerinde ve idiyopatik son aşamada başarısız olan insan kalplerinde belirgin şekilde ifadesinin arttığı görülmüştür (van Rooij ve ark., 2006; Sayed ve ark., 2007). *MiR-214*'ün, kardiyak gelişim ve hipertrofide önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Lu ve ark., 2013).

MiR-675, H19'un (uzun kodlama yapmayan RNA, *long non-coding RNA*) ilk ekzonunda yer alan bir *miRNA*'dır ve glioma dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde miktarının arttığı tespit edilmiştir (Shi ve ark., 2014). Bu H19'un miktarındaki artış ile glioma hücre invazyonu ve proliferasyonu arasında doğru orantı vardır (Shi ve ark., 2014; Li ve ark., 2015). *MiR-675*, 3'UTR içindeki bağlanma bölgesini doğrudan hedefleyerek cadherin 13'ü (Ca^{2+} bağımlı hücre yapışması) veya sikline bağımlı kinaz 6'yı (CDK6) inhibe eder (Shi ve ark., 2014; Li ve ark., 2015).

2.6. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR)

PZR tekniği termal polimeraz kullanımına dayalı tekrarlı bir reaksiyondur ve en az iki kısa oligo-deoksinükleotit dizisinden belirli bir kalıbın kopyalarını üretebilir (Mullis ve ark., 1986). Kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR) 100 kat daha hassastır ve dokuzdan az olmayan dinamik bir aralığı vardır (Higuchi, ve ark., 1993). Geleneksel PZR'nin aksine qPZR, reaksiyon döngüleri boyunca ürün miktarının ölçümüne imkan sağlar. Bu gerçek zamanlı algılama, floresan sinyalinin DNA konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu üstel faz sırasında gerçekleştirilmektedir. Floresan sinyal üretmek için iki temel kimyasal strateji vardır. Bunlardan biri çift iplikçikli interkalasyon boyasına (SYBR-Green) dayanır; diğeri ise farklı boya etiketli prob sistemlerinin (yani ekzonükleaz bazlı çift işaretli (double labeled) boya oligo-deoksinükleotit, moleküler işaretçiler) kullanımına dayanır (Bustin ve ark., 2004; Ishiguro ve ark., 1995). İnterkalasyon boyasına dayalı qPZR *nonspesifik* olarak tanımlanırken, floresana dayalı olan kalıba özgü olarak kabul edilir (Bustin, 2004; Bonnet ve ark., 1999). SYBR-Green çift zincirli DNA'nın minör oluşuna bağlanarak bir ışımaya verir. Kolay dizayn edilmesi ve maliyetinin pahalı olmamasından dolayı tercih edilir. Ancak SYBR Green tüm çift zincirli DNA'yı tanıyabilir yani diziyeye özgü değildir. Prob kullanımı, spesifikliğı daha da artıran bir yöntemdir; çünkü herhangi bir yanlış eşleşme ya da primer dimeri ürünleri herhangi bir sinyal üretmez. Bunun için en çok TaqMan prob kullanılır. Bunların 5' ucu haberci floresan işaretlidir (6-karboksifloresin, 6-FAM). 3' ucu ise baskılayıcı işaretlidir (6-karboksitetrametil-rodamin, TAMRA). TaqMan problemleri Taq polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile PZR sırasında parçalanır. Bu parçalanma sırasında sinyal oluşur. TaqMan prob genel olarak 2-30 bp uzunluğundadır. Probun 3'ucu kapalı olduğundan bu uçtan sentez gerçekleşmez. Primerlerin uzama safhasında diziyeye komplementer olan prob tek iplikli PZR ürününe bağlanır. Bir diğeri prob yöntemi ise moleküler boncuktur. TaqMan problemlerden geliştirilmiştir. Bu moleküler boncuklar gövde-halka yapısındadır. Gövde kısmındaki dizi hedefe, boyun kısmındaki diziler ise birbirlerine komplementtirler.

qPZR uygulamasında HRM (High resolution melting; yüksek çözünürlüklü erime) adı verilen yeni bir güçlü teknik geliştirilmiştir. Bu teknik, çift iplikli nükleik asit molekülleri üzerindeki mutasyonları, polimorfizmleri ve epigenetik farklılıkları doğru bir şekilde ölçmek için plato safhasında elde edilen verileri kullanan bir post

amplifikasyon analizidir. Çift iplikçiğin erime sıcaklığının küçük farklılıklarını izleyebilen boyaların kullanımına dayanmaktadır. HRM, genetik varyantları taramak için klasik moleküler yöntemlere mükemmel bir alternatiftir. PZR'nin kendi mekanizması gereği uygulama sayısı katlanarak artarken ne deney tasarımında konsensusluk vardır ne de pratikte bir homojenite. Bu nedenle, güvenilir deneyler ve qPZR verilerinin açık bir şekilde yorumlanabilmesi için yakın zamanda birkaç öneri geliştirilmiştir (Bustin ve ark., 2009; Raymaekers, ve ark, 2009; Taylor ve ark., 2010).

Üçüncü jenerasyon PZR, mutlak bir kantitasyona izin veren ve daha yüksek hassasiyet gösteren dijital PZR (dPZR) 'dir. Bu da klasik bir PZR reaksiyonun floresan tabanlı algılama ile birlikte kullanıldığı bir hibrit uygulamadır. Dijital PZR (dPCR), nükleik asitlerin hassas bir şekilde ölçülmesini sağlayan üçüncü bir PZR işlemidir. Bu PZR klasik PZR reaksiyon kinetiğini real-time PZR'de yaygın kullanılan floresan tabanlı stratejilerle birleştirir. dPZR tek bir PZR reaksiyonunun binlerce alt reaksiyonlara ayrıldığı bir reaksiyondur. Bu alt reaksiyonlarda mevcut nükleik asit bulunur ya da hiçbir hedef bulunmaz. Subreaksiyonlar ilgili amplifikasyon için ayrı ayrı analiz edilir. Pozitif alt reaksiyonların negatif alt reaksiyonlara oranı orijinal numune içindeki hedef moleküllerin başlangıç sayısını doğru belirlemek için kullanılabilir. Dijital doğası gereği dPZR bir dış referans eğrisi kullanmadan doğrudan yüksek oranda hassas ve mutlak nükleik asit ölçümü sağlar. dPZR'nin birçok uygulaması vardır. Viral/patojen saptaması ve kantitasyonu, yüksek çözünürlük gen ifade analizleri, kopya sayısı varyasyonu, tek hücre analizi, kontrol kantitasyonu alanlarında uygulamaları vardır (Heredia ve ark., 2012; Dodd ve ark., 2013).

3. MATERYAL- METOT

3.1. Örneklerin toplanması ve saklanması

3.1.1. Doku örneklerinin toplanması

Bu tez projesinde kullanılan doku örnekleri TÜBİTAK tarafından kabul edilen 1001 SBAG 214S031 numaralı ve etik kurul onayı 02.07.2013 tarihli, 2013-07/05 etik kurul kararı çerçevesinde alınmış olan ‘Aterosklerozlu hastalarda koroner arter ve internal mammarian arterlerin yapısal ve patolojik açıdan karşılaştırılması’ isimli proje kapsamında toplanmıştır. Bu kapsamda 24 bireyin hem koroner arteri hem de internal mammarian arterinden doku örnekleri alınmıştır. Örnekler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalında, klinik ve laboratuvar değerlendirmeleri göz önüne alınarak by-pass kararı verilmiş, risk statifikasyonu yapılan hastalardan alınmıştır. Koroner arter by-pass cerrahisinin en önemli amacı hasta arterlerin revaskülarizasyonunu sağlamaktır. Koroner endarterektomi uygulamasının ana amacı ise difüz yayılım gösteren koroner arterlerde mümkün olan optimum revaskülarizasyonu sağlamaktır. Çünkü tam olmayan revaskülarizasyon uzun dönem mortalite ile ilişkilidir. Hastaların ameliyatları rutin standart şekilde kardiyopulmoner by-pass altında kalp durdurularak yapılmıştır. Koroner endarterektomi, koroner damarların tam tıkalı olduğu ve by-pass sırasında endarterektomi yapılmaması durumunda by-pass yapılmasının mümkün olamayacağı dış çapı en az 2,0 mm olan damarlara uygulanmıştır. Rutin by-pass yapmaya elverişli olan koroner damarlara endarterektomi uygulanmamıştır. Distalde plak kalmamasına özellikle dikkat edilmiştir. Genellikle traksiyon tekniği uygulanmaktadır. Endarterektomi işlemi hem proksimal hem de distal damara uygulanmaktadır. Arteriyotomi gerektiği kadar yapılmaktadır. Çıkarılan aterosklerotik plak materyali incelenmiştir. Rezidüel plak kalmasından şüphe edildiği durumlarda ikinci bir arteriyotomi yapılmıştır. Endarterektomi sonrası damarın iç yüzeyi heparinli serum ile yıkanmış, eğer ikinci bir arteriyotomi varsa safen ven ile yama-plasti şeklinde kapatılmıştır. İnternal mamarial arter 10 yıllık açıklık oranı %80-90 olan bir greft olup, yine yapılan çalışmalarda ateroskleroz gelişimi en az olan arterdir. Koroner by-pass esnasında sol internal mamarial arter ksifoid altında iki dala ayrılır ve dolayısı ile çapı azalır. Soldan inen artere bypass yapılmadan önce

ap uyumu sağlamak amacı ile internal mamarial arter arteriyotomi ile uygun çapa ulaşana kadar açılmıştır. Uygun yere anastomoz yapılmıştır. Uygun olmayan distal kısmı ise atılmıştır. Ameliyat sırasında 6x loop'lar kullanılarak media tabakasının ute birlik dış kısmından diseksiyon yapılarak aterosklerotik plak çıkartılmıştır. Koroner arter ve İMA'dan parçalar çıkarıldıktan sonra aterosklerotik plak ve arter tabakaları ameliyat mikroskopuyla değerlendirilmiştir. Koroner arterden alınan aterosklerotik plak ve İMA dokusuna ait parçalar RNA koruyuc özelti (RNA later) içerisine alınmış ve çalışma zamanına kadar -80°C' de saklanmıştır (Qiagen, Cat No./ID: 76104).

3.1.2. Kan rneklerinin toplanması

Bu çalışmada kullanılan kan rnekleri Sivas ili ve çevresinde yaşayan, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Kardiyoloji Anabilim dalında klinik muayeneleri sonucu herhangi bir kalp damar hastalığı ve başka bir hastalığı bulunmayan ve sağlıklı bireylerden oluşan 37 üyeli kontrol grubu ile çalışıldı. rnek grubu ise yine aynı birim tarafından ateroskleroz tanısı konmuş 44 hastadan kan örnekleri alınarak oluşturuldu. Kan rnekleri içinde RNA koruyucu özel bir sıvı bulunan PAXgene Blood RNA (Qiagen; Cat No./ID: 762125) tüplerine alındı. Toplanan kanlar -80°C' de saklandı.

3.2.RNA izolasyonu

3.2.1. Doku rneklerinden RNA izolasyonu

Alınan doku örneklerinden RNA izolasyonu *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen, Cat No: 217004) protokolü modifiye edilerek gerçekleştirildi

I. RNA later içinde -80°C' deki örneklerden 40 mg hassas terazide tartıldı.

II. Doku homojenizasyonu: Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak olan tüm malzemeler steril edildi. Havan, havaneli, spatül gibi malzemeler steril su, %70' lik alkol çözeltisi ve RNase away ile temizlendi (Sigma, Product No: 83931). Daha sonra RNase away'den geirilmış olan streç filmlerle kapatılıp otoklav aletinde steril edildi. Havanlara doku örnekleri alındı sıvı azot içinde parçalama işlemi gerçekleştirdi. Parçalanan doku örnekleri üzerine 700 µl Trizol (ThermoFischer, Cat No: 15596026) eklendi. Doku homojenizasyonu MagNa Lyser Green Beads (Roche, Product No: 03358941001) tüpleri içinde iki kez 7000g' de 30 sn olarak gerçekleştirildi (MagNA Lyser, Roche; Cat. No: 03358976001). Her bir

homojenizasyon işleminden sonra örnekler 5 dk oda sıcaklığında soğutuldu.

III. RNA ekstraksiyonu: Homojenat üzerine 140 µl kloroform eklendi ve 15 sn karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. 12 000g' de 15 dakika +4°C' de santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe alındıktan sonra üzerine üst fazın 1,5 hacmi kadar %95 etanol eklendi. Pipetaj ile karıştırıldı. Bu karışımdan 700 µl alınarak 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş olan *miRNeasy* mini kolona yüklendi ve 9600 g' de, oda sıcaklığında 15 sn santrifüj edildi. Kolondan çıkan sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 700 µl RWT tamponu yüklendi ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Kolona 500 µl RPE tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 15 sn 9600 g' de santrifüj edildi. Çıkan sıvı uzaklaştırıldı. Kolona son olarak 500 µl RPE tamponu eklendi ve 9600g' de, oda sıcaklığında 2 dk santrifüj yapıldı. Çıkan sıvı uzaklaştırıldı. Kolonda kalan sıvıyı tamamen uzaklaştırmak için maksimum hızda 1 dk santrifüj işlemi yapıldı. RNA elüsyonu 50 µl steril su ile ve 9600g' de 1 dk santrifüj ile yapıldı. RNA örnekleri -20°C' de saklandı.

3.2.2. Kan örneklerinden RNA izolasyonu

Kandan RNA izolasyonu Hybrid-R *miRNA* (Gene All Catalog No: 325-150) protokolünde küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. PaxGene tüplerinde bulunan tüm kan örnekleri 5000 g' de, 10 dk +4°C' de santrifüj edildi. Sıvı faz uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi üzerine nükleaz içermeyen steril su (Sigma Cat no: W1503) eklendi, vorteksle karıştırıldı ve 5000 g' de, 10 dk +4°C' de santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı. Her bir örnek üzerine 500 µl TES Tamponu, 40 µl %10'luk SDS ve 40 µl 10mg/ml Proteinaz K eklendi ve 55 °C' de 1 sa inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra her bir örnek üzerine 500 µl RiboEx™ (Gene All; Cat No: 301-001) eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 12000g' de, 10 dk, +4°C' de santrifüj edildi. Sıvı kısım yeni tüplere alınarak üzerine 100 µl kloroform eklendi. Vorteks ile 15 sn karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Örnekler 12 000g' de 15 d, +4°C' de santrifüj edildikten sonra üst faz yeni tüplere alınarak üzerine bir hacim %50 etanol çözeltisi eklendi ve el ile karıştırıldı. Örneklerden RNA ekstraksiyonu mini kolonlar kullanılarak ve santrifüj işlemi ile yapıldı. Bunun için, 700 µl örnek bir mini kolonuna yüklendi (Tip B, kırmızı halka) ve 11000g' de 30 sn oda sıcaklığında santrifüj edildi. Küçük RNA molekülleri kolondan çıkan sıvı içinde büyük RNA molekülleri ise kolon içinde bulunmaktadır. Çıkan sıvıya 1 hacim %100 etanol eklenerek pipetaj ile karıştırıldı. Karışımdan 650 µl alınarak mini kolona

yüklendi (Tip W; mavi halka) ve 11000 g' de 30 sn oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Çıkan sıvı uzaklaştırıldı. Kolonda kalan sıvıyı uzaklaştırmak için santrifüj işlemi tekrarlandı. Kolona 500 µl RBW tamponu yüklenerek 11000 g' de 30 sn, oda sıcaklığında santrifüj işlemi yapıldı. Çıkan sıvı uzaklaştırıldı. Kolona iki kez 500 µl RNW tamponu yüklenerek her seferinde santrifüj işlemi tekrarlandı. Kolonda kalan sıvıyı tamamen uzaklaştırmak için 1 d santrifüj yapıldı. Kolonlar yeni tüplere yerleştirildikten sonra, bağlı RNA'nın elüsyonu 50 µl nükleaz içermeyen su yüklenerek ve 11000g' de 1 d santrifüj işlemi ile yapıldı. RNA örnekleri -80°C' de saklandı.

3.3.RNA konsantrasyonu ve saflığının tayini

Bu işlemler için Qubit kiti kullanıldı (Cat No: Q32880; Thermo Fisher). Oda sıcaklığına getirilen tüm reaktiflerle standart ve örnek ölçüm solüsyonları hazırlandı. Her bir standart için iki tüp ve örnek ölçümleri içinse örnek miktarı kadar tüp hazırlandı. Çalışma solüsyonu hazır tampon 1:200 oranında sulandırılarak elde edildi. Her bir standart ve örnek için 200 µl Çalışma solüsyonu hazırlandı. Standart için deney tüpüne 190 µl Çalışma Solüsyonu ve 10 µl Standart Solüsyon eklendi. Örnekler için çalışmaya göre 1 ila 20 µl kadar ölçülecek RNA eklendi üzeri Çalışma Solüsyonu ile 200 µl' ye tamamlandı. Örneğin, izole edilen RNA'dan 5 µl kullanıldıysa 195 µl çalışma solüsyonu eklendi. Ölçme işleminden önce örnekler 5 sn kadar vorteksle karıştırıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında, önce standart sonra örnek tüpleri sırasıyla florometre yuvasına yerleştirilerek absorbans okundu (Qubit 3.0 Fluorometer®; Thermo Fisher, Cat No:Q33216) .

3.4.Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Her bir sentez işlemi için HyperScript™ First Strand Synthesis kiti (GeneAll; Cat No:601-005) ile 10pmol DNA oligoprimere ve 500 ng kalıp RNA kullanıldı. Sentez koşulları aşağıda görülmektedir (Tablo 3).

Tablo 3 cDNA sentezinin ilk aşaması

Reaktifler	Konsantrasyonu	Miktarı
RNA	~ 500 ng (max)	1-2 µl (konsantrasyona göre ayarlandı)
Oligo dT	50µM	1 µl
Random Hexamer	50ng/ µl	0,5 µl
dNTP	10 µM	1 µl
Nükleazsız dH ₂ O	-	Toplam hacim 14 µl olacak şekilde ayarlandı

PCR tüpünde hazırlanan örnekler önce 65 °C' de 5 d inkübe edilerek primer denatürasyonu sağlandı. Denatürasyondan sonra örnekler buz üzerine alındı ve cDNA sentezinde ikinci aşamaya geçildi (Tablo 4).

Tablo 4 cDNA sentezinin ikinci aşaması

Reaktifler	Miktarı
10 ^x First Strand RTaz Reaksiyon Tamponu	2µl
0,1 M DTT	2µl
HyberScript Revers Transkriptaz Enzimi (200U/ µl)	1µl
ZymAll RNaz inhibitörü	1µl

Ayrı bir tüpte hazırlanan bu karışımdan, buz üzerinde bulunan her bir örneğe üzerine 6'şar µl dağıtıldı. Daha sonra PZR ile çoğaltma işlemi yapıldı (Tablo 5). Amplifikasyon ürünleri, konsantrasyonları nanodrop yöntemi ile (Maestro Nano) ölçüldükten sonra -20°C' de saklandı.

Tablo 5 Komplementer DNA'nın PZR ile çoğaltılması

Sıcaklık	Zaman
16 °C	30 dk
30 °C	30 sn
42 °C	30 sn
50 °C	1 sn
85 °C	5 dk

} 60^x

3.5.Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Seçilen 6 *miRNA* molekülünün (Tablo 6) doku ve kanlardaki ifade seviyeleri gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile analiz edildi. Analiz “LightCyler 480 RT-PCR” (Roche Diagnostics Ltd. Forrenstrasse CH-6343 Rotkreuz,İsviçre) cihazı ile “SYBR Green Master Mix” (Gene All Biyoteknoloji, Kore) kiti kullanılarak (Tablo 7) ve tanımlanmış koşullara göre (Tablo 8) yapıldı. Örneklerin RNA miktar tayini *miRNA/AKTİNβ* oranı her bir *miRNA*'nın hücrelerdeki miktarını normalize etmek için kullanıldı ve ortaya çıkan değer her bir *miRNA*'nın hücrelerdeki kantitatif değeri olarak alındı. qRT-PCR reaksiyonunda, floresan düzeyinin cihaz tarafından ölçülebilen eşik değerini aşan döngü sayısı Ct değeri olarak adlandırılır.

Tablo 6 MikroRNA'lar için primer dizileri

<i>miRNA</i>	Primer Dizisi
<i>hsa-miR-10a-5p</i>	F: CGCTACTCCTCACCTGTAGATCCGAA R: CGGGGACGGTTTTTTTTTTTTTTTCACAA
<i>hsa-miR-31-5p</i>	F: TATGACAGGCAAGATGCTGGCA R:GCGGAGCCTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTA
<i>hsa-miR-130a-3p</i>	F: GCCAGCGGACAGTGCAATGTAAAAG R: CACACGGGGCTTTTTTTTTTTTTTTATGCC
<i>hsa-miR-204-5p</i>	F: AGAGCGTTCCTTTCTCATC R: GCGGCGTTTTTTTTTTTTTTTGATG
<i>hsa-miR-214-3p</i>	F: CAAAGACAGCAGGCACAGACAG R: GGACCGGGTTTTTTTTTTTTTTACTGC
<i>hsa-miR-675-5p</i>	F: TGATGCTATTGGTGCGGAGAGAG R: CGTGCGGCTTTTTTTTTTTTTTTCACTG

Tablo 7 Reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Miktarı
Sybr Green Master Mix	10 µl (konsantrasyona göre ayarlandı)
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
cDNA	2 µl (400 ng)
Nükleazsız dH ₂ O	Toplam hacim su ile 20 µl'ye tamamlandı.

Tablo 8 Kantitatif gerçek zamanlı PZR reaksiyon koşulları

Uygulama	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Başlangıç inkübasyonu	95°C	10 dk.	1
	95°C	10 sn.	
2 adımlı çoğaltma	55 °C	45 sn.	40
	95 °C	10 sn.	
Erime eğrisi analizi	65 °C	1 dk.	1
	97 °C	1 sn.	

3.6.İstatistik Analizi

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu elde edilen Ct değerlerine göre, $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplandıktan sonra $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak gen ekspresyon seviyeleri hesaplandı ve karşılaştırıldı. Bunun için her bir primerden elde edilen Ct değerleri “RT² Profiller PCR Array Data Analysis version 3.5” (<https://www.qiagen.com/es/shop/genes-and-pathways/data-analysis-centeroverview> page/) yazılımına yüklendi ve analiz, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre yapıldı.

4. BULGULAR

4.1.Örnek donörlerine ait bazı demografik veriler

Yapılan bu çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Kalp Damar Cerrahisi uzmanlarınca kesin olarak ateroskleroz teşhisi konulmuş 24 hasta yer aldı (Tablo 9). Koroner arter plakları ve İMA dokuları kullanılarak 6 farklı mikroRNA'nın ekspresyon seviyeleri farklılığı tespit edildi

Tablo 9 Doku donörlerine ait bazı demografik veriler

Hasta Grubu, N	24
Yaş, Ortalama (aralık)	62 (40-84)
Cinsiyet Erkek	18 (75,00)
Sigara Durumu	
Var	20(85,33)
Yok	4(16,67)
Diyabet, n (%)	10 (41,67)
Hiperlipitemi n (%)	22 (91,67)
Hipertansiyon n (%)	19 (79,17)
Miyokardiyal infarktüs	10 (16,67)
NYHA Sınıflaması	
Sınıf 2, n(%)	10 (16,67)
Sınıf 3, n(%)	14 (83,33)
Koroner arter darlık	
Sağ koroner arter, ortalama (Aralık)	% 80 (60-100)
Sol ön inen koroner arter, ortalama (Aralık)	% 80 (40-90)
En az 1 By-pass, n (%)	24 (100)
Total kolesterol	210 (125-280)
LDL kolestrol	157 (82-185)
HDL kolestrol	48 (25-69)
Trigliserit	250 (90-520)

Doku örneklerinin yanı sıra koroner anjiyografi sonucu %50'nin altında olan bireyler ve aterokslerotik plak gelişimi olmayan 37 kontrol grubu ve koroner anjiyografi sonucu %50'nin üzerinde tıkanıklığı bulunan, klinik ve radyolojik sonuçlara göre ateroskleroz tanısı konmuş 46 hasta bireyin kan örneği de kullanıldı (Tablo 10).

Tablo 10 Kan donörlerine ait bazı demografik veriler

	Hasta	Kontrol
Toplam	46 (%100)	37 (%100)
Yaş	48,12	45,20
Cinsiyet		
Erkek	33 (%71.74)	20 (%54,05)
Kadın	13 (%28.26)	17 (%45,95)
Sigara Durumu		
Var	10 (21.74)	14 (%37,84)
Yok	36 (78.26)	23 (62,16)
Hipertansiyon		
Var	31 (67.39)	20 (%54,05)
Yok	15 (32.61)	17 (%45,95)
Diyabet		
Var	11 (23.91)	10 (%27,03)
Yok	35 (76.09)	27 (%72.97)
Hiperlipidemi		
Var	17 (36.96)	21 (%56,76)
Yok	29 (63.04)	16 (43,24)
Aile Hikayesi		
Var	24 (52.17)	17 (%45,95)
Yok	22 (47.83)	20 (%54,05)

miR-10a, *miR-31*, *miR-130a*, *miR-204*, *miR-214* ve *miR-675*' in koroner arter hastalığı ile arasında bir ilişki olup olmadığı qRT-PCR ile belirlendi. Bu

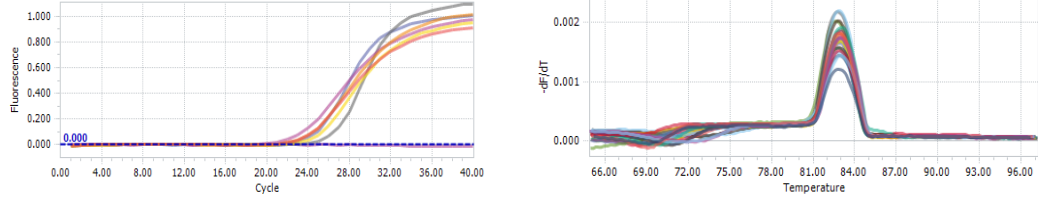
mikroRNA'lar için kontrol geni olarak ACT- β (Aktin Beta) kullanıldı. Her bir mikroRNA'nın ifade düzeyi RT-PCR cihazında $\Delta\Delta Cq$ metodu kullanılarak analiz edildi. Cq değeri 35' in üzerinde çıkan örnekler için deney tekrarlandı. Koroner arter plaklarından elde edilen ekspresyon sonuçları internal mammarian arterden elde edilen ekspresyon sonuçları ile karşılaştırıldı. Verilerin $\Delta\Delta Cq$ metodu ile istatistiksel analizinde "RT² profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5" (<https://www.qiagen.com/es/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>) yazılımı kullanıldı.

4.2.Doku Örneklerine Ait MikroRNA RT-PCR analiz sonuçları

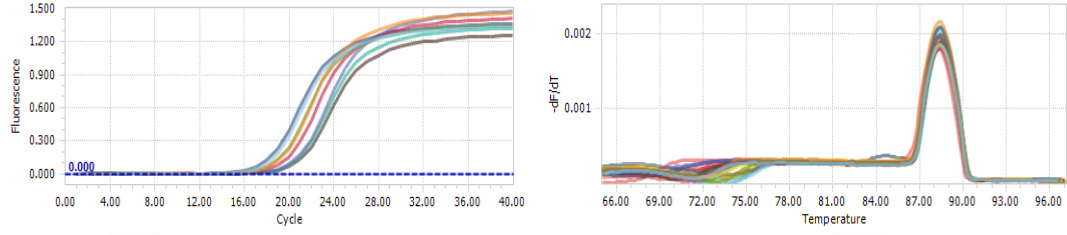
Doku örneklerine ait koroner arter plaklarında ve İMA dokularında ifade farklılıkları saptandı (Tablo 11, Şekil 16-17). Buna göre sadece *miR-10a* (p=0,04829), *miR-204* (p=0,03278) *miR-675*'in (p=0,04320) koroner arter dokularındaki ifade düzeyleri, İMA dokularındakine göre istatistik olarak anlamlı bulundu. *miR-10a*'nın koroner arter dokularındaki ifadesi İMA dokularındakine göre yaklaşık 1.5 kat azaldığı belirlendi. Öte yandan, *miR-204*'ün ifadesi yaklaşık 3 kat, *miR-675*'in ifadesi 3.5 kat artış gösterdi. *miR-31*, *miR-130* ve *miR-214* istatistiksel olarak anlamlı bulunmama ile birlikte *miR-31* ve *miR-130*'da yaklaşık 2 kat azalma ve *miR-214*' ün ifadesinde ise yaklaşık 2 kat artış olduğu tespit edildi (Tablo 11). Herbir *miRNA*'ya ait erime eğrisi ve amplifikasyon eğrileri oluşturuldu (Şekil 9-15).

Tablo 11 Koroner arter dokularında ve İMA dokularında *miRNA* ifade düzeyleri

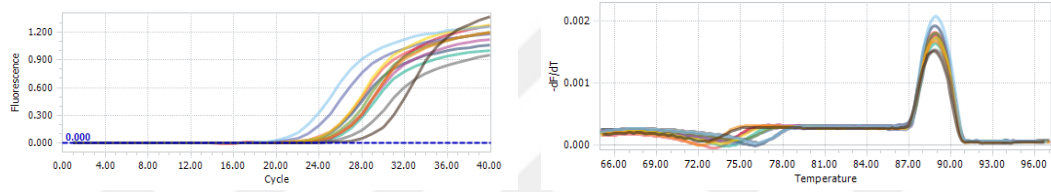
	Kat Değişimi	%95CI	p değeri	Kat düzenlemesi
<i>miR-10a</i>	0,6613	0,00001-1,76	0,04829	-1,5121
<i>miR-31</i>	0,4617	0,00001-1,35	0,27444	-2,1657
<i>miR-130a</i>	0,5816	0,00001-1,03	0,27563	-1,7104
<i>miR-204</i>	2,5988	0,00001-8,46	0,03278	2,5988
<i>miR-214</i>	1,7401	0,00001-5,66	0,13858	1,7401
<i>miR-675</i>	3,5047	0,00001-12,87	0,04320	3,5047



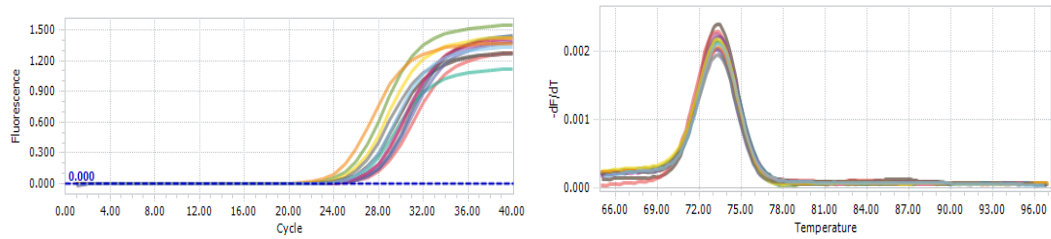
Şekil 9: *MiR-10a*'ya ait amplifikasyon ve T_m eğrisi



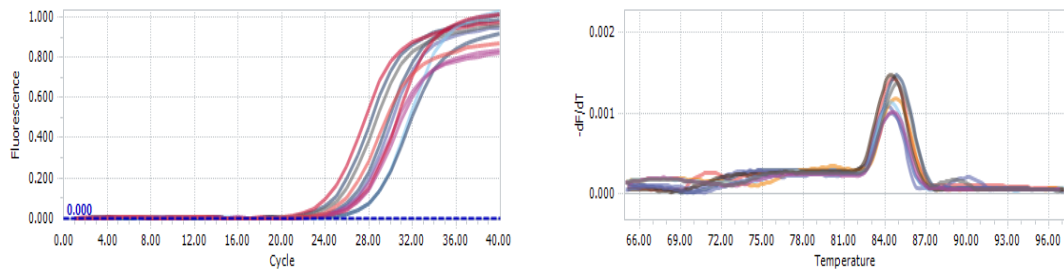
Şekil 10: *MiR-31*'e ait amplifikasyon ve T_m eğrisi



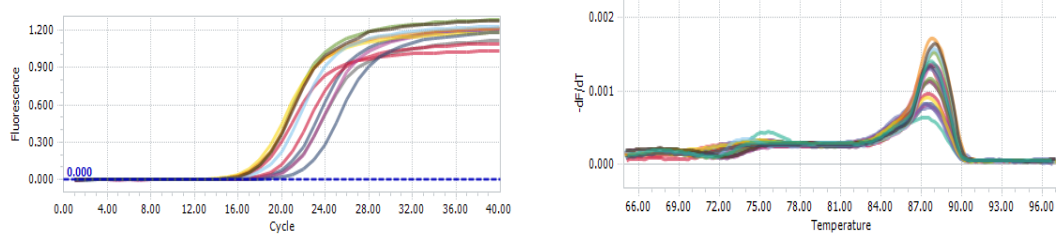
Şekil 11: *MiR-130*'a ait amplifikasyon ve T_m eğrisi



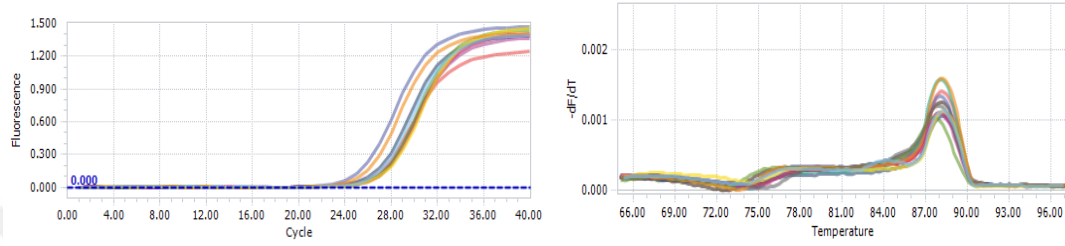
Şekil 12: *MiR-204*'e ait amplifikasyon ve T_m eğrisi



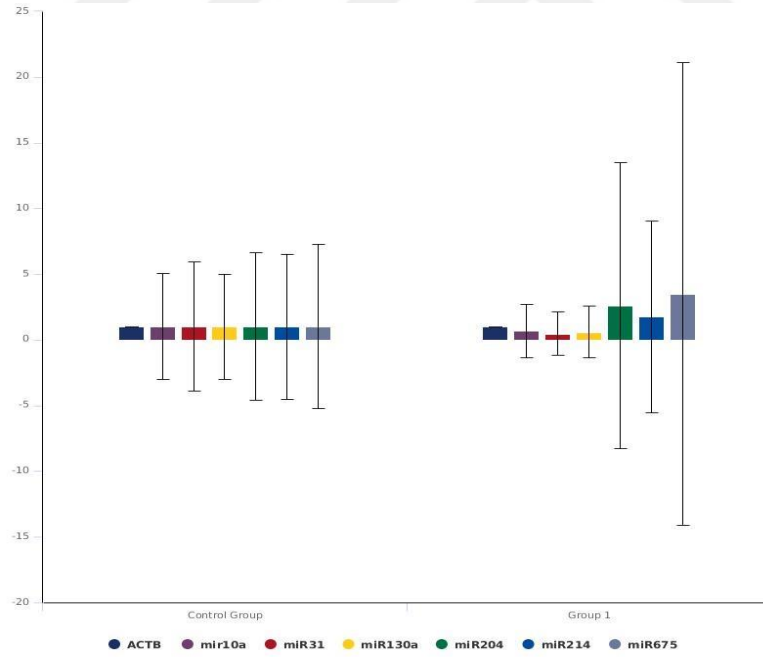
Şekil 13: *MiR-214*'e ait amplifikasyon ve T_m eğrisi



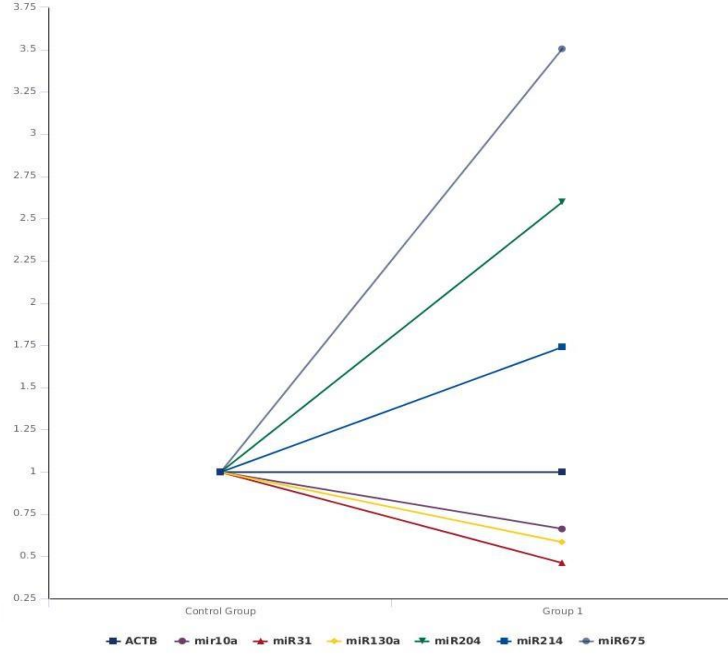
Şekil 14: *MiR-675*'e ait amplifikasyon ve T_m eğrisi



Şekil 15: *ACT-β*'ye ait amplifikasyon ve T_m eğrisi



Şekil 16: Doku örneklerinde seçilen *miRNA*'ların kat değişim grafikleri



Şekil 17: Koroner arter ve İMA dokuları arasında seçilen *miRNA*'ların ifade düzeylerinin farklılığını gösteren grafik

4.3.Doku donörlerine ait bazı demografik verilere bağlı analiz sonuçları

Doku örneklerindeki mikroRNA'ların ifade düzeyleri karşılaştırıldıktan sonra istatistiksel olarak anlamlı çıkan *miRNA*'lar için ayrıca demografik verilerle ilgili alt analizler yapıldı. *miR-10a*, *miR-204* ve *miR-675* için ayrı ayrı demografik veriler kullanılarak $\Delta\Delta Cq$ yöntemi ile ifade düzeyleri arasındaki farklar tespit edildi. Erkek cinsiyete göre kat değişim değerleri ve p değerleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunamadı. Bununla birlikte erkek bireylerin koroner arter dokularında *miR-204*'ün ifade düzeyinin İMA dokularına göre 24 kat arttığı, *miR-675*'in 7 kat arttığı ve *miR-10a*'nın ise 2,6 kat azaldığı saptandı. Aile öyküsüne göre kat değişim değerleri ve p değerleri değerlendirildiğinde koroner arter dokularında *miR-204*'ün ifade düzeyinin İMA dokularına göre 8 kat arttığı, *miR-675*'in 16 kat arttığı ve *miR-10a*'nın ise 1,44 kat azaldığı görüldü. Ancak, p değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Diyabeti olan bireylerde analiz yapıldığında bu üç *miRNA*'nın koroner arter dokularında İMA dokularına göre ifadelerinde artış olduğu belirlendi. Buna göre *miR10a*'nın koroner arter dokularındaki ifade düzeyi İMA grubuna göre 6 kat, *miR-204*'ün 7,5 kat ve *miR-675*'in 1,8 kat artış gösterdiği bulundu; ancak anlamlı bir p değeri elde edilemedi. Geçirilmiş MI için alt analiz yapıldığında *miR-10a*, *miR-204* ve *miR-675* için anlamlı bir p değeri elde edilmezken bu üç *miRNA*'nın ifade düzeylerinde artış olduğu tespit edildi. Buna göre

miR-10a'nın ifadesinin koroner arter dokularında İMA dokularına göre 1,5 kat, *miR-204*'ün 35 kat ve *miR-675*'in 63 kat artış gösterdiği tespit edildi. Hiperlipidemili bireylere bakıldığında koroner arter dokularında İMA dokularına göre üç *miRNA*'da artış saptandı. Buna göre *miR-10a*'nın ifadesi 4,8 kat, *miR-204*'ün ifadesi 9,8 kat, *miR-675*'in ifadesi 43,7 kat artış gösterdi. Sigara içen 20 bireyin koroner arter dokularındaki *miR10a*'nın ifadesi İMA dokularındakne göre 1,37 kat azalırken, *miR-204* 40 kat ve *miR-675* ise 7 kat artış gösterdi. Çalışma grubumuzun 19'u hipertansif bireylerden oluşturuldu; buna göre bu bireylerin koroner arter dokularında *miR-10a*'nın ifadesi İMA dokularındaki ifadesine göre 1,10 kat, *miR-204* 20 kat, *miR-675* 12 kat artış gösterirken, p değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi (Tablo 12).

Tablo 12 Demografik verilere bağlı olarak *miR-10a*, *miR-204* ve *miR-675*'in ifade düzeylerinin karşılaştırılması

	<i>miR-10a</i>		<i>miR-204</i>		<i>miR-675</i>	
	Kat Değişimi	p değeri	Kat Değişimi	p değeri	Kat Değişimi	p değeri
Erkek	0,4192	0,09394	23,9887	0,07734	6,7934	0,77045
Aile öyküsü	0,6921	0,22714	8,1756	0,13244	16,2503	0,19481
Diyabet	6,2210	0,19153	7,5762	0,18494	1,7759	0,25608
Geçirilmiş MI	1,5043	0,20285	35,5297	0,14084	62,9005	0,34336
Hiperlipitemi	4,7642	0,91632	9,8108	0,17594	43,6998	0,16881
Sigara	0,7316	0,10177	40,4689	0,07734	7,3745	0,23221
Hipertansiyon	1,1023	0,119974	20,0539	0,24773	12,0085	0,40581

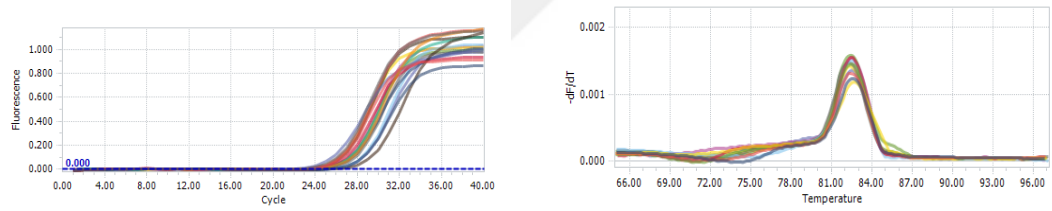
4.4.Kan Örneklerine Ait MikroRNA RT-PCR analiz sonuçları

Kan örneklerine ait hasta ve kontrol grupları arasında bazı ifade farklılıkları bulundu (Tablo 13, Şekil 25-26). Sadece *miR-10a* (p=0,00167) ve *miR-675*'in (p=0,04762) hasta grubu kanlarının ifade düzeyleri kontrol grubu kanlarına göre istatistiksel olarak anlamlıydı. Kontrol grubu örnekleri ile karşılaştırıldığında ateroskleroz hastalarında *miR-10a*'nın ifadesi yaklaşık 3 kat azaldı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,00167). *miR-675*'in ifadesindeki 1.12 kat azalma da istatistiksel

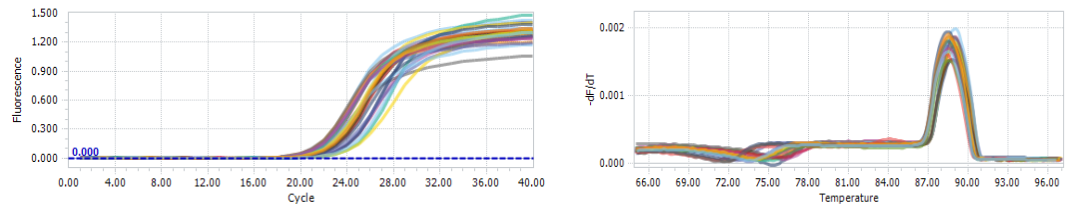
olarak anlamlı bulundu ($p=0,04762$). İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan mikroRNA'lardan *miR-31*, *miR-130* ve *miR-204* ve *miR-214*'ün ifadelerinde 1,4; 1,7; 1,04 ve 2,81 kat azalma olduğu tespit edildi (Tablo 13). qRT-PCR sonucu hasta ve kontrol grubu örneklerinde seçili *miRNA* ve referans gen ACT- β 'ye ait amplifikasyon ve Tm eğrileri Şekil 18-24' te görülmektedir.

Tablo 13 Ateroskleroz hasta ve kontrol grubu kanlarında *miRNA* ifade düzeylerinin karşılaştırılması

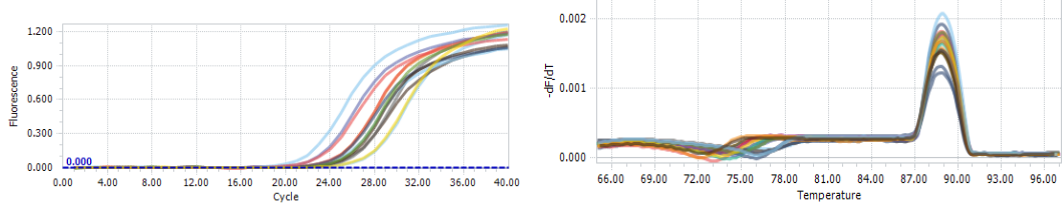
	Kat Değişimi	%95CI	p değeri	Kat düzenlemesi
<i>miR-10a</i>	0,3491	0,12-0,58	0,00167	-2,8644
<i>miR-31</i>	0,6882	0,37-1,01	0,515737	-1,4531
<i>miR130a</i>	0,6041	0,01-1,20	0,642438	-1,6552
<i>miR-204</i>	0,9584	0,00001-2,28	0,279987	-1,0435
<i>miR-214</i>	0,3556	0,00001-0,83	0,30793	-2,812
<i>miR-675</i>	0,8916	0,39-1,40	0,04762	-1,1215



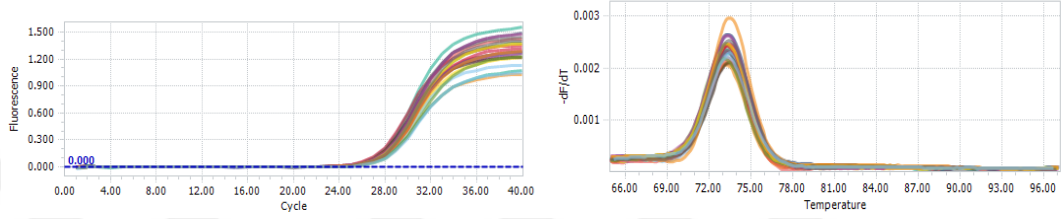
Şekil 18: *MiR-10a*'ya ait amplifikasyon ve Tm eğrisi



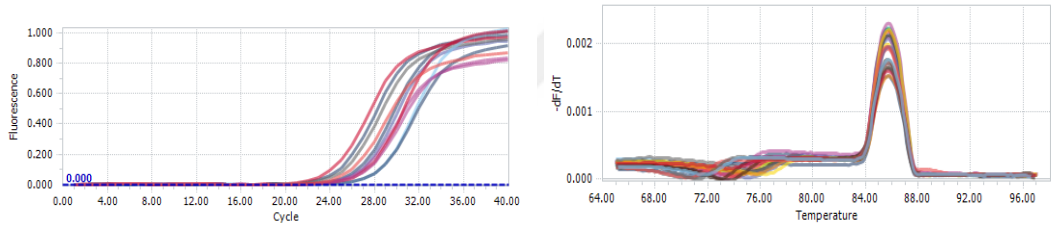
Şekil 19: *MiR-31*'e ait amplifikasyon ve Tm eğrisi



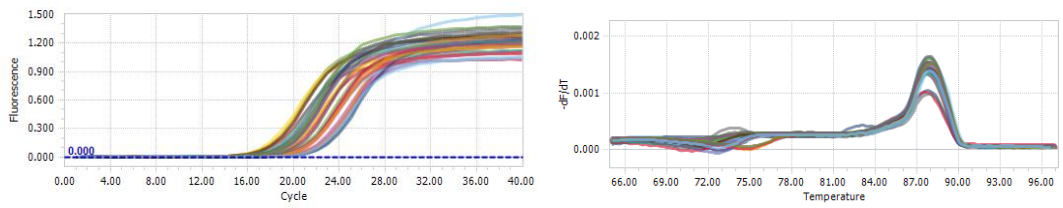
Şekil 20: *MiR-130*'a ait amplifikasyon ve T_m eğrisi



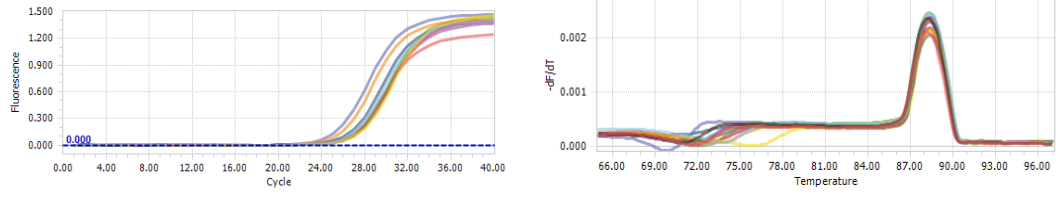
Şekil 21: *miR-204*'e ait amplifikasyon ve T_m eğrisi



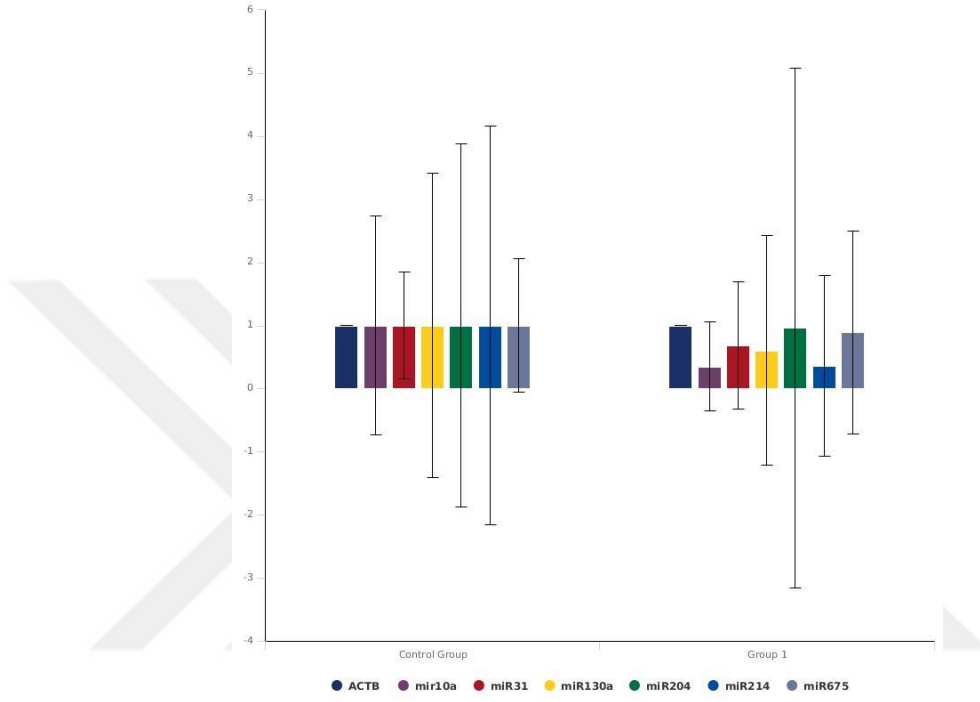
Şekil 22: *MiR-214*'e ait amplifikasyon ve T_m eğrisi



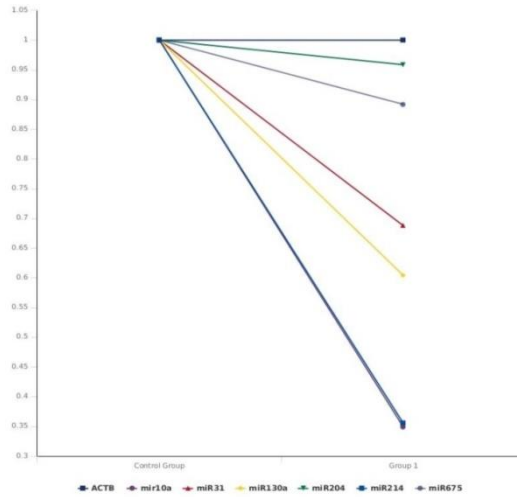
Şekil 23: *MiR-675*'e ait amplifikasyon ve T_m eğrisi



Şekil 24: ACT-β'ya ait amplifikasyon ve Tm eğrisi



Şekil 25: Seçilen miRNA'ların kat değişim grafikleri



Şekil 26: Kan örneklerinde hasta ve kontrol grubu arasında seçilen miRNA'ların ifade düzeylerinin farklılığını gösteren grafik

4.5.Kan donörlerine ait demografik verilere bağlı analiz sonuçları

Kan örneklerindeki mikroRNA'ların ifade düzeyleri karşılaştırıldıktan sonra istatistiksel olarak anlamlı çıkan *miRNA*'lar için ayrıca demografik verilerle ilgili alt analizler yapıldı. *miR-10a* ve *miR-675* için ayrı ayrı demografik veriler kullanılarak $\Delta\Delta Cq$ yöntemi ile ifade düzeyleri arasındaki farklar tespit edildi. Erkek cinsiyete göre kat değişim değerleri ve p değerleri incelendiğinde *miR-675* verileri istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,04653$). Ayrıca, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen erkek bireylerin kanlarında *miR-214*'ün ifadesi kontrol grubu kanlarındakine göre 9 kat azaldı. Kadın hastalarda ise *miR-10a*'nın ifadesi kontrol grubu kadınların kanlarına göre 11 kat artış gösterirken *miR675*'in ifadesi 17 kat azaldı. Aile öyküsüne göre kat değişim değerleri ve p değerleri değerlendirildiğinde *miR-10a*'nın ifadesinin 1,1 kat; *miR-675*'in 1,8 kat azaldığı görüldü. Ancak bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. Diyabeti olan bireylerde analiz yapıldığında, *miR-10a*'nın hasta grubu kanlarında ifade düzeyi kontrol grubuna göre 3,3 kat artarken, *miR-675*'in 2 kat azaldı. Ancak anlamlı bir p değeri elde edilemedi. Hiperlipidemili bireylere bakıldığında hasta grubunda kontrol grubuna göre iki *miRNA*'da artış saptandı. Buna göre *miR10a*'nın ifadesi 5,8 kat, *miR-675*'in 1,6 kat artış gösterdi. Sigara içen hasta bireylerin kanında *miR-10a*'nın ifadesi kontrol grubu kanlarındaki ifadesine göre 3 kat artarken; *miR-675*'te 1,3 kat azaldı. Hipertansif hasta bireylerin kanında *miR-10a*'nın ifadesi kontrol grubundaki ifadesine göre 1,2 kat, *miR-675* 1,8 kat azalış gösterirken istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi (Tablo 14).

Tablo 14 Demografik verilere bağlı olarak *miR-10a* ve *miR-675*'in ifade düzeylerinin karşılaştırılması

	<i>miR-10a</i>		<i>miR-675</i>	
	Kat Değişimi	p değeri	Kat Değişimi	p değeri
Erkek	0,1328	0,64737	0,5574	0,04653
Kadın	11,0426	0,332610	0,06	0,40109
Aile öyküsü	0,9094	0,41597	0,5342	0,63383
Diyabet	3,2732	0,26797	0,5155	0,26008
Hiperlipitemi	5,7654	0,29451	1,6127	0,16595
Sigara	3,2336	0,28221	0,7805	0,177475
Hipertansiyon	1,2067	0,3986	0,5766	0,05810

5. TARTIŞMA

Koroner damarlarda en sık rastlanan hastalık koroner aterosklerozdur. Bu hastalık genellikle kolesterol birikmesi, daralma ve tıkanma ile oluşur; kalp beslenemez ve ritmik hareketlerinde bozukluklar ortaya çıkar (Bazo ve ark., 2011). Ateroskleroz hastalığı, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de, erişkinlerde en başta gelen ölüm nedeni olmaktadır (Onat, 2009). Ateroskleroz çok erken yaşlarda başlayan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalar aterosklerozun öncüsü olduğu düşünülen çizgi halindeki yağ hücresi birikimlerinin daha okul öncesi yaşlardan itibaren ana atardamarlarda oluştuğunu göstermektedir. Sanayi ve bilgi toplumunun bedeli olarak beslenme alışkanlıklarının değişmesi ve daha hareketsiz bir yaşamın benimsenmesi ateroskleroz gibi uzun bir gelişme süreci çocukluk döneminden itibaren başlamasına zemin hazırlamaktadır. Bu nedenle doğru ve dengeli beslenme ile düzenli egzersiz alışkanlığının çocuklara erken yaşlarda kazandırılması çok önemlidir.

Aterosklerotik süreç birbiri ardına sıralanmış pek çok inflamatuvar olaylarla gerçekleşir. Aterosklerotik lezyon oluşum süreci, arterlerin hücre duvarındaki endotel hücreler, düz kas hücrelerinde morfolojik değişiklikler ve lökosit sızması sonucu arter yapı ve fonksiyondaki değişiklikleri içermektedir (Weber ve Noels, 2011). Endotel ve düz kas hücrelerindeki yapı ve fonksiyon değişikliği makrofajların inflamatuvar aktivitesi ile sağlandığı gibi, gen ifadesinin tanskripsiyon sonrası düzenleyen kodlama yapmayan mikro RNA'lar tarafından da düzenlendiği ortaya çıkmıştır (Huntzinger ve Izaurralde, 2011; Small ve Olson, 2011).

Bu çalışmada toplam 107 kişilik bir populyasyonda *miR-10a*, *miR-31*, *miR-130a*, *miR-204*, *miR-214* ve *miR-675* genlerinin ifade düzeyleri kantitatif bir yaklaşımla saptandı. Bu *miRNA*'ların ifade düzeyleri aterosklerotik koroner arterler ile aterosklerotik plak gelişiminin çok nadir görüldüğü internal mamarian arterlerde karşılaştırıldı. Çalışmanın en özgün yanı endarterektomi ile çıkarılan koroner arter doku örneklerinin kullanılmasıdır. Bu amaçla by pass ameliyatına girmiş 24 hastanın hem koroner arter dokuları hem de İMA dokuları alınmıştır. Doku çalışmasına ek olarak sözü geçen *miRNA*'ların hastalık patolojisi sırasında dolaşımdaki varlıklarını da incelemek amacıyla 46 hasta ve 37 sağlıklı kontrol grubu olarak ayrıldı ve bu kan örnekleri çalışıldı.

Epigenetik mekanizmalarda bozulmanın aterosklerozun ortaya çıkmasındaki rolünün anlaşılması hastalık takip ve tedavi stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Kodlama yapmayan RNA'lar epigenetik düzenlemelerde rol oynar. Mikro RNA'lar; hücre büyüme ve gelişmesinde, yağ metabolizmasında, doku farklılaşmalarında, hücre çoğalmasında, organogenez ve apoptozda rol oynar (Esquela-Kerscher ve Slack, 2006). Bu işlevlere ek olarak sinyal iletim sistemlerinde (Cui ve ark., 2006), gen ifadesinin düzenlenmesinde ve transkripsiyon faktörlerinin regülasyonunda (Cui ve ark., 2007) rol aldıkları bilinmektedir. MikroRNA'ların, kanser, otoimmün hastalıklar ve ateroskleroz gibi birçok hastalığın başlamasında ve gelişmesinde kritik rol aldığı gösterilmiştir (Ka hayun ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2015). Yapılan son çalışmalar, dolaşımdaki *miRNA*'ların, bu hastalıkların tanı ve prognozu için yeni biyobelirteçler olarak hareket edebildiğini de göstermiştir (Ka hayun; 2016). Özellikle son zamanlarda, kalp, vasküler ve kas spesifik *miRNA*'lar da dahil olmak üzere giderek artan dolaşımdaki *miRNA*'lar, çoklu kardiyovasküler hastalıklarda yeni biyo-belirteçler olarak bildirilmiştir (Huang ve ark., 2013).

miR-10a'nın aterosklerotik plak oluşumundaki rolü bilinmektedir. Bunu I κ B/NF- κ B sinyal yolağını ateroskleroza duyarlı endotellerde proinflamatuvar fenotipi inhibe ederek yapar (Fang ve ark., 2010). *MiR-10a* geninin susturulması (*knock-down*) insan aort endotel hücrelerinde (HAECs)'lerde NF- κ B sinyal iletiminin aktivasyonuna ve MCP-1, IL-6, IL-8, VCAM-1 ve SELE proinflamatuvar biyobelirteçlerinin artmasına yol açar. *Mir-10a*, I κ B/NF- κ B, sinyal yolağının düzenleyici olması vasıtasıyla, mitojen aktive edici kinaz kinaz kinaz 7 (MAP3K7) ve β -transdüsün tekrar içeren gen (β -TRC, β -tansducin repeat-containing gene)'i baskılar (Fang ve ark., 2009). Bu her iki gen I κ B degradasyonunu teşvik ederek NF- κ B sinyal iletimini aktive eder (Fang ve ark., 2010). MAP3K7 ile aktive edilen IKK2, inflamtuvar uyarıya cevap olarak I κ B' yi fosforlar (Wang ve ark., 2001). Bu cevaplara aracılık eden prototipik transkripsiyon faktörü NF- κ B'dir (Baker ve ark., 2011). NF- κ B'nin protein bileşenleri EC'lerde ifade edilir; ama bir inhibitör proteine bağlanması vasıtasıyla stoplazmada inaktif halde kalırlar. Minimal modifiye edilmiş LDL'yi de içeren inflamtuvar uyarı, hiperglisemiden kaynaklanan glikasyon, son ürünleri aterosklerotik lezyon bölgesinde üretilen inflamtuvar sitokinler ya da sitomegalovirüs veya klamidiya gibi infeksiyöz ajanlar kendilerine özgü reseptörleri vasıtasıyla endotel hücreleri aktive edebilir. Bu da sonunda I κ B kinaz kompleksini (IKK) aktive edecek olan sinyal iletim kaskadını başlatır. Bu kompleks I κ B' nin fosforilasyonuna aracılık

eder. Fosforile olan IκB ubiquitinasyona uğrar ve degrades olur böylece NF-κB'nin aktif formda çekirdeğe transloke olması mümkün olur. NF-κB çekirdekte bir dizi inflamatuvar genin ifadesini aktive eder (de Winther ve ark., 2005). P-selektin, SELE, ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 ve MMP'lerin ifadesi NF-κB'nin yer aldığı mekanizma ile düzenlenir (Savoia ve ark., 2007).

Öte yandan β-TRC, SCFb-TrCP E3 ubiquitin ligazın substratı tanıyan alt birimidir (Winston ve ark., 1999). Ateroduyarlı aortik yay ve aterokorunmuş aşağı uzanan toraks aortasında lokalize endoteli karşılaştırmalı ifade çalışmaları MAP3K7, β-TRC, fosfo-IκB-a ve nükleer p65 ifadesinin önemli ölçüde arttığını belirlemiştir. Ateroduyarlı bölgelerde *in vivo* olarak *miR-10a*'nın diferansiyel ifade edilmesinin proinflamatuvar endotelin düzenlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Fang ve ark., 2010).

Endotel *miR-10a*'nın ifade düzeyinin normal erişkin domuzlarda aterokorunmuş bölgelerden ziyade iç aortik yay ve aorta-renal dalların ateroduyarlı bölgelerinde daha az seviyelerde olduğu gösterilmiştir. (Fang ve ark., 2010). Aterosklerotik plaklarda ve vasküler düz kas hücrelerinde *miR-10a* ifadesinin karşılaştırmalı yapılan analizlerin sonucunda aterosklerotik plak dokularında ve vasküler düz kas hücrelerinde *miR-10a* ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2010; Fang ve ark., 2010). Çalışmamızda benzer bir sonuç elde edildi ve plak içeren koroner arter doku örneklerinde *miR-10a* ifadesi IMA dokusuna göre 1,5 kat azaldı (Tablo 11). Erkek (Kat değişimi, 2,4), aile öyküsü pozitif, (Kat değişimi, 1,44), sigara içen bireylerde (Kat değişimi, 1,4) *miR-10a*'nın azalış gösterdiği tespit edildi (Tablo 12). *miR-10a*'nın aterosklerozlu dokularda nasıl görev aldığı anlaşılmış olmasına rağmen dolaşımdaki ifadeleri ile ilgili çalışmalar yeterli sayıya ulaşmamıştır. Koroner arter hastalığında *miR-10a*'nın düşük ifadesinin ve pro/anti-inflamatuvar sitokinlerle ilişkisi araştırılmış ve *miR-10a*'nın koroner arter hastaları kanlarında kontrol grubuna göre daha az ifade olduğu bulunmuştur (Lu ve ark., 2016). Yine ateroskleroz hastaların kanlarında *miR-10a* ifade seviyesinin kontrol grubuna göre ciddi şekilde azaldığı bulunmuş ve bu aynı zamanda aterosklerozun şiddeti ile de ilişkilendirilmiştir (Lu ve ark., 2016). Bu ilişkilendirme de aterosklerozun şiddeti ile azalan *miR-10a* ifade seviyesi arasında negatif bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Bahsedilen çalışmalarla paralel olarak bu çalışmada da *miR-10a*'nın ifadesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2,8 kat bir azalış olduğu ve bu azalışın istatistik açıdan da anlamlı olduğu bulundu (Tablo 11).

MAPK/ERK, gen ifadesi ve hücre çoğalmasının düzenlenmesi gibi süreçlerde işlev görecektir. Ekstraselüler uyarıları çekirdeğe aktarır (Bornfeldt ve Krebs, 1999). Çoğalabilen VSMC'lerde *miR-31* ifade seviyesinin artması MAPK/ERK yolağını kısmen inhibe eder (Liu ve ark., 2011). MAPK/ERK çoğalabilen VSMC'lerde *miR-31* artışının düzenlenmesinde başlangıç yolağı başlatan bileşenlerdir.

miR-31, TNF- α 'yı doğrudan inhibe ederek endotel hücre aktivasyonunu kontrol etmek için bir negatif *feedback* mekanizması oluşturur. Aterosklerozlu hastaların endotel progenitor hücrelerinde *miR-31* seviyesinin kritik şekilde azaldığı görülmüştür (Wang ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda olduğu gibi inflamatuvar bir hastalık olan sistemik lupus hastalığında da *miR-31*'in ifadesinde azalma olduğu bulunmuştur (Fan ve ark., 2012). Kan damarı endotel hücrelerinde *MiR-31*'in aşırı ifadesinin *in vitro* endotel hücrelerinin hareketliliğini teşvik etmiştir (Tsai ve ark., 2009). *miR-31*'in, endotel hücre göçünü ve invazyonunu indüklemek için hem kan damarı hem de lenf damar endotel hücrelerinde yeni tanımlanmış bir tümör baskılayıcı olan FAT atipik kaderin 4'ü (FAT4) hedeflediği gösterilmiştir (Wu ve ark., 2011). *miR-31* aynı zamanda, bir transkripsiyon faktörü olan PROX1'i (prospero homeobox 1) üzerinden *in vitro* ve damar gelişiminde lenf damarı farklılaşmanın negatif bir düzenleyicisi olarak işlev görür (Pedrioli ve ark., 2010). *miR-31* ifade seviyesinin aterosklerozlu hastaların plazma ve EPC'lerinde düşük olduğu bulundu (Wang ve ark., 2014) Bu çalışmada da *miR-31*'in hasta grubundaki ifadesinin kontrol grubundaki ifadesine göre 1,4 kat azalma olduğu tespit edildi. Bizim yaptığımız çalışmada ise *miR-31*'in koroner arter dokularındaki ifadesinin 2 kat azaldığı, ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (Tablo 11).

MiR-130a damar biyolojisinde proanjyogenik (damar oluşumunu destekleyen) *miRNA* olarak tanımlanmıştır (Urbich ve ark., 2008) ve antianjyogenik (damar oluşumunu önleyen) *homeobox* proteinlerinden GAX (Growth Arrest Homeobox) ve HoxA5'in (Homeobox A5) ifade seviyesini azaltır. GAX'ın, endotel hücre çoğalması ve göçü, HoxA5'in tüp oluşumu üzerindeki inhibitör etkileri *miR-130a* vasıtasıyla antagonize edilir (Chen ve Gorski, 2008). Pro-anjyogenik *miR-130a*'nın HUVEC'lerde de ifadesinin düştüğü tespit edilmiştir (Chen ve Gorski, 2008). Bu tez çalışması sonuçlarında da *miR-130a*'nın koroner arter dokularındaki ifadesi İMA dokularındaki ifadesine göre azaldığı görüldü (Kat değişimi, 1,71, Tablo 11). *miR-*

130a seviyesindeki azalışın antianjiyojenik protein mRNA'larının bloke edilmesinde yetersiz kalabileceği için ateroskleroz oluşum süreci hızlanabilir.

İntima örneklerinde anlamlı değişikliklere sahip 7 *miRNA* arasında sadece 3 *miRNA*'nın, *miR-130a*, *miR-27b* ve *miR-210*, dolaşım biyobelirteci olarak kullanılabilir. Bunun nedeni dokulardaki *miRNA*'ların sadece bazı tiplerinin seruma geçmesinden kaynaklanabilir (Li ve ark., 2011; Jia ve ark., 2017). Bu çalışmada koroner arter hastalarının kanında *miR-130a* ifadesinin kontrol grubununkine göre azaldığı tespit edildi (Kat değişimi,1,6; Tablo 13).

MiR-204, TRPM3 geni tarafından kodlanır. Arter düz kas hücrelerinde ve kardiyovasküler sistem içindeki kardiyomiyositlerde ifade edilir (Paulin ve ark., 2011). *miR-204*'ün pulmoner arter düz kas hücrelerinde (PASMC) SHP2 ifadesini hedeflediği, PASMC'lerin apoptozunu inhibe ettiği ve hücre çoğalmasını stimüle ettiği bilinmektedir (Courboulin ve ark., 2011).

Bu *miRNA* aterosklerozda yeterli çalışılmadığından bilgilerimiz yeterli değildir. Buda çalışmamızı orijinal kılan bir unsurdur. Çalışmamız sonucunda aterosklerotik plak dokularında *miR-204*'ün ifadesinin İMA'dakine göre arttığı bulundu (Kat değişimi, 2,5; Tablo 13). Sigara içme ateroskleroz oluşumunda önemli bir etken. Çalışmamızda sigara içen bireylerin koroner arter dokularındaki *miR-204*'ün ifadesinin İMA dokularındaki ifadesine göre ciddi artış gösterdiği tespit edildi (Kat değişimi, 40; Tablo 13). Koroner arter dokuları İMA ile karşılaştırıldığında toplam MI (Kat değişimi, 35,53), toplam hipertansif (Kat değişimi, 20,05) ve erkek grubunda ciddi artışlar gösterdiği (Kat değişimi, 24,0) tespit edildi (Tablo 13).

miR-214'ün kalp hastalıklarında antianjiyojenik bir mikro RNA olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (Duan ve ark., 2015). Bu mikro RNA'nın ektopik ifadesini HUVEC çoğaltır ve in vitro anjiyojenezi azaltır (Duan ve ark., 2015). Bu tez çalışma sonuçları aterosklerotik doku örneklerinde *miR-214*'ün ifadesinde 1,8 kat artış olduğunu gösterdi. Kalp yetmezliği vakalarında endotel hücrelerde *miR-214* *XBPI*'i (endoplazmik retikulum stres transkripsiyon faktörü) inhibe ederek endotel anjiyojenezini düzenler. Öte yandan *XBPI* ifadesinin artışı endotel hüce çoğalmasını tetikler (Duan ve ark., 2015). Ateroskleroz dışında in vivo ve in vitro çalışmalar *miR-214*'ün retina ve hepatokarsinom hücrelerin anjiyojenezini baskıladığını göstermiştir (van Mil ve ark., 2012).

Çalışmamızda kullanılan kan örneklerinde hasta grubunda kontrol grubuna göre *miR-214*'ün 2,8 kat azaldığı tespit edildi. Benzer bulgular serum çalışmalarında

saptanmıştır (Lu ve ark., 2013). Aterosklerozlu hastaların dolaşımdaki miRNA, hasarlanmış ya da ölmüş kardiyomiysitlerden ya da Ca iyonu (Danowki ve ark., 2013) gibi ajanların stimülasyonundan kaynaklanabilir.

miR-675 birkaç kanser türünde çalışılmış ancak henüz ateroskleroz hastalarında çalışılmamıştır. Bununla birlikte *miR-675*'in ekspresyonundaki artışın NF-κB yolağını aktive ettiği yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (Feng ve ark., 2017). Bu çalışmada *miR-675*'in koroner arter dokularında İMA dokularına göre ifadesinin 3,5 kat arttığı saptandı. Bu sonucu demografik veriler de desteklemektedir. Özellikle geçmişinde MI bulunan bireylerin koroner arter dokularındaki *miR-675* ifadesi İMA grubuna göre 62 kat artış gösterdiği belirlendi. Bununla birlikte hiperlipidemili bireylerin koroner arter dokularındaki *miR-675* ifadesi 43 kat, aile öyküsü pozitif olan bireylerde 16 kat ve hipertansif hastalarda 12 kat artış gösterdi. İleri çalışmalar *miR-675*'in aterosklerozdaki işlevini aydınlatacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması sonuçları ve ilgili literatür bilgileri göz önünde bulundurulduğunda *miRNA*'ların transkripsiyon faktörlerinin translasyonunu inhibe ederek işlev gördükleri söylenebilir. Bu hedef transkripsiyon faktörleri de çoğunlukla iki sinyal yolağı üzerinde bulunmaktadır: NF-κB ve MAPK/ERK. Bu her iki sinyal yolağı hemen her ökaryotik organizmada pek çok genin transkripsiyonunu düzenleyerek çeşitli hücrel süreçleri etkilemektedir. Bu hücrel süreçler, aynı zamanda aterosklerozda da etkili olan, büyüme ve bölünme başta olmak üzere göç, inflamasyon ve apoptozdur. *MiRNA*'lar bu sinyal yolaklarının hedef genlerini düzenleyerek ateroskleroz oluşumuna katkıda bulunabilirler. Özet olarak, bu çalışmada koroner arter by-pass cerrahisi sırasında alınan koroner arter plakları ile İMA dokuları ve hasta-kontrol grubu olarak ayrılan kan örneklerinde bazı mikro RNA'ların ifade seviyelerinin ateroskleroz hastalığı ile ilişkisi incelendi. Altı *miRNA*'dan üçünün, *miR-204* ve *miR675*, anlamlı ölçüde artma gösterdiği ve birinin, *miR-10a*, azaldığı saptandı. İfadeleri değişen mikroRNA'ların koroner arter plak oluşumu, dokunun yeniden modellenmesi gibi hastalık patolojisi süreçlerinde önemli bir etken olabileceği düşünülmektedir. Kan örneklerinde ise bu *miRNA*'ların hasta grubunda, kontrol grubuna göre, azaldığı gözlemlendi.

6. KAYNAKÇA

- Agirre, X., Jiménez-Velasco, A., San José-Enériz, E., Garate, L., Bandrés, E., Cordeu, L., Aparicio, O., Saez, B., Navarro, G., Vilas-Zornoza, A., Pérez-Roger, I., García-Foncillas, J, Torres, A., Heiniger, A., Calasanz, M. J., Fortes, P., Román-Gómez, J, Prósper, F.** (2008). Down-Regulation of Hsa-MiR-10a in Chronic Myeloid Leukemia CD34+ Cells Increases USF2-Mediated Cell Growth. *Molecular Cancer Research*, 6(12), 1830–40.
- Allsopp, R. C., ve Harley C. B.** (1995). Evidence for a Critical Telomere Length in Senescent Human Fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 219, 130–36.
- Arbab-Zadeh, A., Fuster, V.** (2015). The Myth of the ‘Vulnerable Plaque’: Transitioning from a Focus on Individual Lesions to Atherosclerotic Disease Burden for Coronary Artery Disease Risk Assessment. *J Am Coll Cardiol*, 65, 846–55.
- Armstead, V. E., Minchenko, A. G., Schuhl, R. A., Hayward, R., Nossuli, T. O., Lefer, A. M.** (1997). “Regulation of P-Selectin Expression in Human Endothelial Cells by Nitric Oxide.” *Am.J.Physiol*, 273, 740–46.
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F., Tewari, M.** (2011). Argonaute2 Complexes Carry a Population of Circulating MicroRNAs Independent of Vesicles in Human Plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 5003–8.
- Ashcroft, G. S, Herrick, S. E, Tarnuzzer, R. W., Horan, M. A, Schultz, G. S., Ferguson, M. W.** (1997). Human ageing impairs injury-induced in vivo expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)- 1 and -2 proteins and mRNA. *J Pathol*, 183, 169–76.
- Aune, D., Schlesinger, S., Norat, T., Riboli, E.** (2018). Tobacco Smoking and the Risk of Sudden Cardiac Death: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *European Journal of Epidemiology*.

- Aurora, A. B., Mahmoud, A. I., Luo, X., Johnson, B. A., van Rooij, E., Matsuzaki, S., Humphries, K. M., Hill, J. A., Bassel-Duby, R., Sadek, H. A., Olson, E. N.** (2012). MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca²⁺ overload and cell death. *J Clin Invest*, 122, 1222–1232.
- Avogaro, A., Fadini, G. P., Gallo, A., Pagnin, E., de Kreutzenberg, S.** (2006). Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 16 Suppl 1(0), S39-45.
- Babiak, J., Rudel, L.L.** (1987). Lipoproteins and Atherosclerosis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1:515.
- Bai, G., Ambalavanar, R. Wei, D., Dessem, D.** (2007). Downregulation of Selective MicroRNAs in Trigeminal Ganglion Neurons Following Inflammatory Muscle Pain. *Molecular Pain* 3.
- Baker, R. G., Hayden, M. S., Ghosh, S.** (2011). NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 13(1), 11–22
- Bandrés, E., Cubedo, E., Agirre, X., Malumbres, R., Zárate, R., Ramirez, N., Abajo, A., Navarro, A., Moreno, I., Monzó, M., García-Foncillas, J.** (2006). Identification by Real-Time PCR of 13 Mature MicroRNAs Differentially Expressed in Colorectal Cancer and Non-Tumoral Tissues. *Molecular Cancer* 5, 19, 5:29
- Bao, W., Srinivasan S. R., Berenson, G. S.** (1996). Persistent Elevation of Plasma Insulin Levels Is Associated With Increased Cardiovascular Risk in Children and Young Adults : The Bogalusa Heart Study. *Circulation*, 93(1), 54–59.
- Bartel, D. P.** (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136, 215–33.
- Bazan, H. A., Hatfield, S. A., O'Malley, C. B., Brooks, A. J., Lightell, D. Jr., Woods, T. C.** (2015) Acute loss of *miR221* and *miR222* in the atherosclerotic plaque shoulder accompanies plaque rupture, *Stroke*, 46, 3285-3287.
- Bazo, A. P., Salvadori, D. Jr., Salvadori, R. A., Sodr , L. P., da Silva, G. N., de**

Camargo, E. A., Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. (2011). DNA repair gene polymorphism is associated with the genetic basis of atherosclerotic coronary artery disease. *Cardiovasc Pathol*, 20(1), e9-15.

Benjamin, E. J., Blaha, M. J., Chiuve, S. E., Cushman, M., Das, S. R., Deo, R., de Ferranti, S. D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C. R., Jiménez, M. C., Jordan, L. C., Judd, S. E., Lackland, D., Lichtman, J. H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Mackey, R. H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M. E., Nasir, K., Neumar, R. W., Palaniappan, L., Pandey, D. K., Thiagarajan, R. R., Reeves, M. J., Ritchey, M., Rodriguez, C. J., Roth, G. A., Rosamond, W. D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C. W., Turner, M. B., Virani, S. S., Voeks, J. H., Willey, J. Z., Wilkins, J. T., Wu, J. H., Alger, H. M., Wong, S. S., Muntner, P. (2017). Heart Disease and Stroke Statistics'2017 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*, 135(10), e146–603.

Benndorf, R., Böger, R. H., Ergün, S., Steenpass, A., Wieland, T. (2003). Angiotensin II Type 2 Receptor Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Migration and in Vitro Tube Formation of Human Endothelial Cells. *Circulation Research* 93: 438–47.

Bergmann, C. E., Hofer, I. E., Meder, B., Roth, H., van Royen, N., Breit, S. M., Jost, M. M., Aharinejad, S., Hartmann, S., Buschmann, I. R. (2006). Arteriogenesis Depends on Circulating Monocytes and Macrophage Accumulation and Is Severely Depressed in Op/Op Mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 80, 59–65

Bernstein, B. E., Meissner, A., Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* 128:669–681.

Bhupathiraju, S. N., ve Hu F. B. (2016). Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circulation Research* 118: 1723–35.

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

- Blankenberg, S., Barbaux, S., Tiret, L.** (2003). Adhesion Molecules and Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 170, 191–203.
- Boettger, T ve Braun, T.** (2012). A new level of complexity: the role of microRNAs in cardiovascular development. *Circ Res.* 110(7), 1000-13
- Bonnet, G., Tyagi, S., Libchaber, A., Kramer, F. R.** (1999). Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), 6171-6.
- Bornfeldt, K. E., and Krebs, E. G.** (1999). Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal.* 11, 465–477
- Bronze-Da-Rocha, E.** (2014). MicroRNAs Expression Profiles in Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International*, 2014, 985408.
- Bruunsgaard, H., Andersen-Ranberg, K., Hjelmberg, Jv., Pedersen, B. K., Jeune, B.** (2003). Elevated Levels of Tumor Necrosis Factor Alpha and Mortality in Centenarians. *Am J Med*, 115, 278–83.
- Bulugahapitiya, U., Siyambalapitiya, S., Sithole, J., Idris. I.** (2009). Is Diabetes a Coronary Risk Equivalent? Systematic Review and Meta-Analysis. *Diabetic Medicine* 26, 142–48.
- Burke-Gaffney, A., Brooks, A. V., Bogle, R.G.** (2002). Regulation of Chemokine Expression in Atherosclerosis. *Vascular Pharmacology*, 38, 283–92.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T.** (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55(4), 611-22.
- Bustin SA, Nolan T.** (2004). Pitfalls of quantitative real-time reversetranscription polymerase chain reaction. *Biomol Tech* 15, 155–166.
- Cai, H., ve Harrison, D. G.** (2000). Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ Res*, 87, 840–44.

- Cai, Y., Yu, X., Hu, S., Yu, J.** (2009). A Brief Review on the Mechanisms of *miRNA* Regulation. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 7, 147–54.
- Carninci, P, ve Hayashizaki Y.** (2007). Noncoding RNA Transcription beyond Annotated Genes. *Current Opinion in Genetics and Development* 17, 139–44.
- Caruso, P., MacLean, M. R., Khanin, R., McClure, J., Soon, E., Southgate, M., MacDonald, R. A., Greig, J. A., Robertson, K. E., Masson, R., Denby, L., Dempsie, Y., Long, L., Morrell, N. W., Baker, A. H.** (2010). Dynamic Changes in Lung MicroRNA Profiles during the Development of Pulmonary Hypertension Due to Chronic Hypoxia and Monocrotaline. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(4), 716–23.
- Cech, T. R., ve Steitz, J. A.** (2014). The Noncoding RNA Revolution - Trashing Old Rules to Forge New Ones. *Cell*, 157, 77–94.
- Cengiz M, Yavuzer S, Kılıçkiran Avcı B, Yürüyen M, Yavuzer H, Dikici SA, Karataş ÖF, Özen M, Uzun H, Öngen Z.** (2015). Circulating *miR-21* and eNOS in subclinical atherosclerosis in patients with hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 37(8),643-9.
- Centers for Disease Control and Prevention.** (2017). Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Dept of Health and Human Services *National Diabetes Statistics Report*.
- Chan LS, Yue PY, Mak NK, Wong RN.** (2009). Role of microRNA-214 in ginsenoside-Rg1- induced angiogenesis. *Eur J Pharm Sci* 38:370–377.
- Chen, Y., Gorski, D. H.** (2008). Regulation of Angiogenesis through a MicroRNA (*MiR-130a*) That down-Regulates Antiangiogenic Homeobox Genes *GAX* and *HOXA5*. *Blood*, 111(3), 1217–26.
- Cheng, A. M., Byrom, M. W. Shelton, J. Ford, L. P.** (2005). Antisense Inhibition of Human *miRNAs* and Indications for an Involvement of *miRNA* in Cell Growth and Apoptosis. *Nucleic Acids Research* 33(4), 1290–97.
- Chisolm, G. M., ve Steinberg D.** (2000). The Oxidative Modification Hypothesis of Atherogenesis: An Overview. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 1815–26.

- Cipollone, F., Felicioni, L., Sarzani, R., Uchino, S., Spigonardo, F., Mandolini, C., Malatesta, S., Bucci, M., Mammarella, C., Santovito, D., de Lutiis, F., Marchetti, A., Mezzetti, A., Buttitta, F.** (2011) A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans. *Stroke*, 42, 2556-2563.
- Claverie, J.M.** (2005). Fewer Genes, More Noncoding RNA. *Science*, 309, 1529–30.
- Collins, L. J., ve Penny, D.** (2009). The RNA Infrastructure: Dark Matter of the Eukaryotic Cell? *Trends in Genetics* 25, 120–28.
- Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R., McGregor, J. L.** (2007). CD36 and Macrophages in Atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 75, 468–77.
- Combadière, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., Mallat, Z.** (2008). Combined Inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 Abrogates Ly6Chi and Ly6Clo Monocytosis and Almost Abolishes Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Mice. *Circulation*, 117, 1649–57.
- Corsini, A., Bernini, F., Quarato, P., Donetti, E., Bellosa, S., Fumagalli, R., Paoletti, R., Soma, V. M.** (1996). Non-Lipid-Related Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Cardiology*, 87, 458–68.
- Courboulin, A., Paulin, R., Giguère, N. J., Saksouk, N., Perreault, T., Meloche, J., Paquet, E. R., Biardel, S., Provencher, S., Côté, J., Simard, M. J., Bonnet, S.** (2011). Role for *MiR-204* in Human Pulmonary Arterial Hypertension. *J Exp Med*, 208(3), 535–48.
- Cui, Q., Yu, Z., Pan, Y., Purisima, E. O., Wang, E.** (2007). “MicroRNAs Preferentially Target the Genes with High Transcriptional Regulation Complexity.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352(3): 733–38.
- Cui, Q., Yu, Z., Purisima, E. O., Wang, E.** (2006). Principles of MicroRNA Regulation of a Human Cellular Signaling Network. *Mol Syst Biol* 2(46), 1–7.
- Cushman, M., Lemaitre, R. N., Kuller, L. H., Psaty, B.M., Macy, E. M.,**

- Sharrett, A.R, Tracy, R.P.** (1999). Fibrinolytic Activation Markers Predict Myocardial Infarction in the Elderly. The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 493–98.
- Czepluch, F. S., Bergler, A., Waltenberger, J.** (2007). Hypercholesterolaemia Impairs Monocyte Function in CAD Patients. *Journal of Internal Medicine* 261, 201–4
- Danaei, G., Lu, Y., Singh, G. M., Carnahan, E., Stevens, G. A., Cowan, M. J., Farzadfar, F., Lin, J. K., Finucane, M. M., Rao, M., Khang, Y. H., Riley, L. M., Mozaffarian, D., Lim, S. S., Ezzati, M., Aamodt, G., Abdeen, Z., Abdella, N. A., Rahim, H. F., Addo, J., Aekplakorn, W., Afifi, M. M., Agabiti-Rosei, E., Salinas, C. A, Agyemang C., Ali, M. K., Ali, M. M., Al-Nsour, M., Al-Nuaim, A. R., Ambady, R., Di Angelantonio, E.** (2014). Cardiovascular Disease, Chronic Kidney Disease, and Diabetes Mortality Burden of Cardiometabolic Risk Factors from 1980 to 2010: A Comparative Risk Assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 634–47.
- Davies, B. D., Hoss, W., Lin, J. P., Lionetti, F.** (1982). Evidence for a Noncholinergic Nicotine Receptor on Human Phagocytic Leukocytes. *Molecular and cellular biochemistry* 44, 23–31.
- de Winther, M. P., Kanters, E., Kraal, G., Hofker, M. H.** (2005). Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(5), 904–914.
- Devaraj, S., Xu, D. Y., Jialal, I.** (2003). C-Reactive Protein Increases Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression and Activity in Human Aortic Endothelial Cells: Implications for the Metabolic Syndrome and Atherothrombosis. *Circulation*, 107, 398–404.
- Disterhoft, J. F., ve Matthew M. O.** (2007). “Alterations in Intrinsic Neuronal Excitability during Normal Aging.” *Aging Cell* 6(3): 327–36.
- Dodd, D. W., Gagnon, K. T., Corey, D. R.** (2013). Digital quantitation of potential therapeutic target RNAs. *Nucleic Acid Ther.* 23(3):188-94
- Duan, Q., Yang, L., Gong, W., Chaugai, S., Wang, F., Chen, C., Wang, P., Zou,**

- M. H., Wang, D. W.** (2015). MicroRNA-214 Is Upregulated in Heart Failure Patients and Suppresses XBP1-Mediated Endothelial Cells Angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 230(8), 1964–73.
- Durán, W. N., Breslin, J.W., Sánchez, F. A.** (2010). The NO Cascade, ENOS Location, and Microvascular Permeability. *Cardiovascular Research*, 87, 254–61.
- Emde, A. ve Hornstein, E.** (2014). NAs at the Interface of Cellular Stress and Disease. *The EMBO Journal*.
- Erl, W., Weber, P. C., Weber, C.** (1998). Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands. *Atherosclerosis*, 136, 297-303.
- Esquela-Kerscher, A., ve Slack, F. J.** (2006). Oncomirs - MicroRNAs with a Role in Cancer. *Nature Reviews Cancer* 6, 259–69.
- Esterbauer, H., Janusz, G., Herbert, P., ve Günther, J.** (1992). The Role of Lipid Peroxidation and Antioxidants in Oxidative Modification of LDL. *Free Rad. Bio and Med.* 13, 341–90.
- Fan, W., Liang, D., Tang, Y., Qu, B., Cui, H., Luo, X., Huang, X., Chen, S., Higgs, B. W., Jallal, B., Yao, Y., Harley, J. B., Shen, N.** (2012). Identification of MicroRNA-31 as a Novel Regulator Contributing to Impaired Interleukin-2 Production in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 64(11), 3715–25.
- Fang, N., Jiang, M., Fan, Y.** (2016). Ideal Cardiovascular Health Metrics and Risk of Cardiovascular Disease or Mortality: A Meta-Analysis. *International Journal of Cardiology*, 214, 279–83
- Fang, Y., Shi, C., Manduchi, E., Civelek, M., Davies, P. F.** (2010). MicroRNA-10a Regulation of Proinflammatory Phenotype in Athero-Susceptible Endothelium in Vivo and in Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(30), 13450–55.
- Feng, Y., Yang, C., Hu, D., Wang, X., Liu, X.** (2017). *miR-675* promotes disease

progression of non-small cell lung cancer via activating NF- κ B signaling pathway. *Cell Mol Biol.* May 20;63(5):7-10.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of Post-Transcriptional Regulation by MicroRNAs: Are the Answers in Sight? *Nature Reviews Genetics*, 9, 102–14.

Ford, E. S., Maynard, L. M. and Li C. (2014). Trends in Mean Waist Circumference and Abdominal Obesity among US Adults, 1999-2012. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 312, 1151–53.

Fuller, A., ve Qian, L. (2014). *MiRiad* Roles for MicroRNAs in Cardiac Development and Regeneration. *Cells*, 3(3), 724–50.

Fuster, V., Alexander, R.W., O'Rourke, R. (2002). *Hurt's The Heart. And Danışmanlık Eğitim Yayıncılık ve Organizasyon Ltd. ğti.*, 1. Baskı, 1065-1109.

Gangwar, R. S., Rajagopalan, S., Natarajan, R., Deuliis, J. A. (2018). Noncoding RNAs in Cardiovascular Disease: Pathological Relevance and Emerging Role as Biomarkers and Therapeutics. *American Journal of Hypertension*, 31, 150–65.

Gareus, R., Kotsaki, E., Xanthoulea, S., van der Made, I., Gijbels, M. J., Kardakaris, R., Polykratis, A., Kollias, G., de Winther, M. P., Pasparakis, M. (2008). Endothelial Cell-Specific NF-KB Inhibition Protects Mice from Atherosclerosis. *Cell Metabolism*, 8, 372–83.

Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Iuliano, R., Cimmino, A., Aqeilan, R., Volinia, S., Bhatt, D., Alder, H., Marcucci, G., Calin, G. A., Liu, C. G., Bloomfield, C. D., Andreeff, M., Croce, C. M. (2006). MicroRNA Fingerprints during Human Megakaryocytopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 5078–83..

Garzon, R., Volinia, S., Liu, C. G., Fernandez-Cymering, C., Palumbo, T., Pichiorri, F., Fabbri, M., Coombes, K., Alder, H., Nakamura, T., Flomenberg, N., Marcucci, G., Calin, G. A., Kornblau, S. M., Kantarjian, H., Bloomfield, C. D., Andreeff, M., Croce, C. M. (2008). MicroRNA Signatures Associated with Cytogenetics and Prognosis in Acute *Myeloid Leukemia*. *Blood*, 111(6), 3183–89.

- GBD 2015 Obesity Collaborators.** (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *The New England journal of medicine* 377, 13–27.
- Gharipour, M., Ramezani, M. A., Sadeghi, M., Khosravi, A., Masjedi, M., Khosravi-Boroujeni, H., Rafieian-Kopaei, M., Sarrafzadegan, N.** (2013). Sex Based Levels of C-Reactive Protein and White Blood Cell Count in Subjects with Metabolic Syndrome: Isfahan Healthy Heart Program. *J Res Med Sci* 18, 467–72.
- Godwin, J. G., Ge, X., Stephan, K., Jurisch, A., Tullius, S. G., Iacomini, J.** (2010). Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci*, 107,14339–14344
- Goldstein, J. L., ve Brown S. M.** (2015). A Century of Cholesterol and Coronaries: From Plaques to Genes to Statins. *Cell*, 161, 161–72.
- Gomez, D., ve Owens G. K.** (2012). Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching in Atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 95, 156–64.
- Gray, C., Packham, I. M., Wurmser, F., Eastley, N. C., Hellewell, P. G., Ingham, P. W., Crossman, D. C., Chico, T. J.** (2007). Ischemia Is Not Required for Arteriogenesis in Zebrafish Embryos. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 2135–41
- Ha, M., ve Kim, N. V.** (2014). Regulation of MicroRNA Biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(8), 509–24.
- Haffner, S. M., Lehto, S., Rönnemaa, T., Pyörälä, K., Laakso, M.** (1998). Mortality from Coronary Heart Disease in Subjects with Type 2 Diabetes and in Nondiabetic Subjects with and without Prior Myocardial Infarction. *The New England journal of medicine*, 339, 229–34.
- Hager M, Pedersen CC, Larsen MT, Andersen MK, Hother C, Gronbaek K, Jarmer H, Borregaard N, Cowland JB.** (2011). MicroRNA-130a-mediated down-regulation of Smad4 contributes to reduced sensitivity to TGF-beta1 stimulation in granulocytic precursors. *Blood*, 118(25), 6649–6659.

- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., Kim, V. N.** (2004). The Drosha-DGCR8 Complex in Primary MicroRNA Processing. *Genes and Development* 18(24), 3016–27.
- Harrington, J. R.** (2000). The Role of MCP-1 in Atherosclerosis. *Stem Cells*, 18, 65–66.
- Hata A.** (2013). Functions of microRNAs in cardiovascular biology and disease. *Annu Rev Physiol*, 75, 69-93.
- Hauptmann, J., ve Meister, G.** (2013). Argonaute Regulation: Two Roads to the Same Destination. *Developmental Cell*, 25(6), 553–54.
- Havens, M. A., Reich, A. A., Duelli, D. M., Hastings, M. L.** (2012). Biogenesis of Mammalian MicroRNAs by a Non-Canonical Processing Pathway. *Nucleic Acids Research*, 40(10), 4626–40.
- Heeschen, C., Weis, M., Cooke, J. P.** (2003). Nicotine Promotes Arteriogenesis. *Journal of the American College of Cardiology* 41, 489–96.
- Heredia, N. J., Belgrader, P., Wang, S., Koehler, R., Regan, J., Cosman, A. M., Saxonov, S., Hindson, B., Tanner, S. C., Brown, A. S., Karlin-Neumann, G** (2013). Droplet Digital™ PCR quantitation of HER2 expression in FFPE breast cancer samples. *Methods*. 59(1):S20-3.
- Herring, M. J., Oskui, P. M., Hale, S. L., Kloner, R. A.** (2013). Testosterone and the Cardiovascular System: A Comprehensive Review of the Basic Science Literature. *Journal of the American Heart Association* 2(4).
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R.** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 11:1026-30.
- Ho, F. M., Lin, W. W., Chen, B. C., Chao, C. M., Yang, C. R., Lin, L. Y., Lai, C. C., Liu, S. H., Liao, C. S.** (2006). High Glucose-Induced Apoptosis in Human Vascular Endothelial Cells Is Mediated through NF-KappaB and c-Jun NH2-Terminal Kinase Pathway and Prevented by PI3K/Akt/ENOS Pathway. *Cell Signal*, 18(3), 391–99.

- Huang, H., Xie, C., Sun, X., Ritchie, R. P., Zhang, J., Chen, Y. E.** (2010). *MiR-10a* Contributes to Retinoid Acid-Induced Smooth Muscle Cell Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9383–89.
- Huntzinger, E, ve Izaurralde, E.** (2011). Gene Silencing by MicroRNAs: Contributions of Translational Repression and mRNA Decay. *Nature Reviews Genetics* 12(2), 99–110.
- Iemolo, F., Martiniuk, A., Steinman, David Spence D. A.** (2004). Sex Differences in Carotid Plaque and Stenosis. *Stroke* 35, 477–81.
- Irwin, C., Roberts, W., Naseem K. M.** (2009). Nitric Oxide Inhibits Platelet Adhesion to Collagen through CGMP-Dependent and Independent Mechanisms: The Potential Role for S-Nitrosylation. *Platelets*, 20, 478–86.
- Ito, W. D., Arras, M., Winkler, B., Scholz, D., Schaper, J., Schaper, W.** (1997). Monocyte Chemotactic Protein-1 Increases Collateral and Peripheral Conductance after Femoral Artery Occlusion. *Circulation Research* 80, 829–37.
- Ishiguro, T., Saitoh, J., Yawata, H., Yamagishi, H., Iwasaki, S., Mitoma, Y.** (1995) Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Anal Biochem.* 229(2), 207-13.
- Izadnegahdar, M., Singer, J., Lee, M. K., Gao, M., Thompson, C. R., Kopec, J., Humphries, K. H.** (2014). Do Younger Women Fare Worse? Sex Differences in Acute Myocardial Infarction Hospitalization and Early Mortality Rates Over Ten Years. *Journal of Women's Health*, 23, 10–17.
- Jansen, F., Yang, X., Hoelscher, M., Cattelan, A., Schmitz, T., Proebsting, S., Wenzel, D., Vosen, S., Franklin, B. S., Fleischmann, B. K., Nickenig, G., Werner, N.** (2013). Endothelial Microparticle-Mediated Transfer of MicroRNA-126 Promotes Vascular Endothelial Cell Repair via Spred1 and Is Abrogated in Glucose-Damaged Endothelial Microparticles. *Circulation*, 128(18), 2026–38.
- Jia, Q. W., Chen, Z. H., Ding, X. Q., Liu, J. Y., Ge, P. C., An, F. H., Li, L. H., Wang, L. S., Ma, W. Z., Yang, Z. J., Jia, E. Z.** (2017). Predictive Effects of

Circulating *miR-221*, *miR-130a* and *miR-155* for Coronary Heart Disease: A Multi-Ethnic Study in China. *Cell Physiol Biochem*, 42(2), 808-823.

Juan A. H., Kumar, R. M., Marx, J. G., Young, R. A., Sartorelli, V. (2009). *Mir-214*-Dependent Regulation of the Polycomb Protein *Ezh2* in Skeletal Muscle and Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell*, 36(1), 61–74.

Kawase, K., Kwong, A., Yorozuya, K., Tomizawa, Y., Numann, P. J., Sanfey, H. (2013). The Attitude and Perceptions of Work-Life Balance: A Comparison among Women Surgeons in Japan, USA, and Hong Kong China. *World Journal of Surgery* 37, 2–11.

Khvorova, A., Reynolds, Angela., Jayasena, S. D. (2003). Functional SiRNAs and NAs Exhibit Strand Bias. *Cell*, 115(2), 209–16.

Kim, G. H., Samant, S. A., Earley, J. U., Svensson, E. C. (2009). Translational control of FOG-2 expression in cardiomyocytes by microRNA-130a. *PLoS One*, 4(7):e6161.

Kim, Y. K., ve Kim, V. N. (2007). Processing of Intronic MicroRNAs. *EMBO Journal*, 26(3), 775–83.

Koroleva, I. A., Nazarenko, M. S., Kucher, A. N. (2017). Role of microRNA in Development of Instability of Atherosclerotic Plaques. *Biochemistry (Mosc)*. 82(11):1380-1390.

Kou, B., Vatish, M. ve Singer, D. R. (2007). Effects of Angiotensin II on Human Endothelial Cells Survival Signalling Pathways and Its Angiogenic Response. *Vascul Pharmacol*, 47, 199–208

Kovaleva, V., Mora, R., Park, Y. J., Plass, C., Chiramel, A. I., Bartenschlager, R., Döhner, H., Stilgenbauer, S., Pscherer, A., Lichter, P., Seiffert, M. (2012). *miRNA-130a* Targets *ATG2B* and *DICER1* to Inhibit Autophagy and Trigger Killing of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Cancer Research*, 72(7), 1763–72.

Krejza, J., Arkuszewski, M., Kasner, S. E., Weigele, J., Ustymowicz, A., Hurst, R. W., Cucchiara, B. L., Messe, S. R. (2006). Carotid Artery Diameter in Men

and Women and the Relation to Body and Neck Size. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 37, 1103–5.

Kumar, S., Kim, C. W., Simmons, R. D., Jo, H. (2014). Role of flowsensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive atheromiRs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 34, 2206-2216.

Kume, N., Cybulsky, M.I., Gimbrone, M.A. Jr. (1992). Lysophosphatidylcholine, a Component of Atherogenic Lipoproteins, Induces Mononuclear Leukocyte Adhesion Molecules in Cultured Human and Rabbit Arterial Endothelial Cells. *In Journal of Clinical Investigation*, 90, 1138–44.

Kurotobi, T., Sato, H., Kinjo, K., Nakatani, D., Mizuno, H., Shimizu, M., Imai, K., Hirayama, A., Kodama, K., Hori, M.; OACIS Group. (2004). Reduced Collateral Circulation to the Infarct-Related Artery in Elderly Patients with Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 44, 28–34.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for RNAs of Small Expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853–58.

Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., Bartel, D. P. (2001). An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis Elegans*. *Science*, 294(5543), 858–62.

Lee Y, Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., Kim, V. N. (2002). MicroRNA Maturation: Stepwise Processing and Subcellular Localization. *EMBO Journal*, 21(17), 4663–70.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V. (1993). The *C. Elegans* Heterochronic Gene *Lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *Lin-14*. *Cell*, 75, 843–54.

Leonardo, T. R., Schultheisz, H. L., Loring, J. F., Laurent, L, C. (2012). The Functions of MicroRNAs in Pluripotency and Reprogramming. *Nature Cell Biology*, 14, 1114–21.

- Leung, K.W., Pon, Y. L., Wong, R. N., Wong, A. S.** (2006). Ginsenoside-Rg1 induces vascular endothelial growth factor expression through the glucocorticoid receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and beta-catenin/T-cell factor-dependent pathway in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 281, 36280–36288.
- Levitan, I., Suncica, V., Subbaiah P.V.** (2010). Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13, 39–75.
- Li, C., Lei, B., Huang, S., Zheng, M., Liu, Z., Li, Z., Deng, Y.** (2015). H19 Derived MicroRNA-675 Regulates Cell Proliferation and Migration through CDK6 in Glioma.” *Am. J. of Trans. Res*, 7(10), 1747–64.
- Li, D., Yang. B., Philips M. I., Mehta J.L.** (1999). Proapoptotic Effects of ANG II in Human Coronary Artery Endothelial Cells: Role of AT1 Receptor and PKC Activation. *The Am. Jour. of phys*, 276, 786–92.
- Li, T., Cao, H., Zhuang, J., Wan, J., Guan, M., Yu, B., Li, X., Zhang, W.** (2011). Identification of *miR-130a*, *miR-27b* and *miR-210* as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. *Clin Chim Acta*. 412(1-2), 66-70.
- Libby, P., Ridker, P. M, Hansson, G. K.** (2011). Progress and Challenges in Translating the Biology of Atherosclerosis. *Nature*, 473, 317–25.
- Libby, P.** (2002). Inflammation in Atherosclerosis. *Nature*, 420: 868–74.
- Liu, N., Bezprozvannaya, S., Williams, A. H., Qi, X., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Olson, E. N.** (2008). MicroRNA-133a Regulates Cardiomyocyte Proliferation and Suppresses Smooth Muscle Gene Expression in the Heart. *Genes and Development* 22(23), 3242–54.
- Liu, X., Cheng, Y., Chen, X., Yang, J., Xu, L., Zhang, C.** (2011). MicroRNA-31 Regulated by the Extracellular Regulated Kinase Is Involved in Vascular Smooth Muscle Cell Growth via Large Tumor Suppressor Homolog 2. *The Journal of biological chemistry* 286(49), 42371–80.
- Liuzzo, G., Biasucci, L. M., Gallimore, J. R., Grillo, R. L., Rebuzzi, A. G.,**

- Pepys, M. B., Maseri, A.** (1994). The Prognostic Value of C-Reactive Protein and Serum Amyloid a Protein in Severe Unstable Angina. *N Engl J Med*, 331, 417–24.
- Lloyd-Jones, D. M., Hong, Y., Labarthe, D., Mozaffarian, D., Appel, L. J., Van Horn, L., Greenlund, K., Daniels, S., Nichol, G., Tomaselli, G.F., Arnett, D. K., Fonarow, G. C, Ho, P. M, Lauer, M. S., Masoudi, F. A., Robertson, R. M., Roger, V., Schwamm, L. H, Sorlie, P., Yancy, C. W., Rosamond, W.D. American Heart Association Strategic Planning Task Force and Statistics Committee.** (2010). Defining and Setting National Goals for Cardiovascular Health Promotion and Disease Reduction: The American Heart Association’s Strategic Impact Goal through 2020 and Beyond. *Circulation*, 121, 586–613.
- Lorenzen, J. M., Martino, F., Thum, T.** (2012). Epigenetic modifications in cardiovascular disease. *Basic Res Cardiol* 107:245.
- Lu, H. Q., Liang, C., He, Z. Q., Fan, M., Wu, Z. G.** (2013). Circulating *miR*-214 is associated with the severity of coronary artery disease. *J Geriatr Cardiol* 10, 34–38.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. Saltiel A. R.** (2007). Obesity Induces a Phenotypic Switch in Adipose Tissue Macrophage Polarization. *Journal of Clinical Investigation* 117, 175–84.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E, Kutay, U.** (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 303(5654), 95–98.
- Luo, L., Chen, B., Li, S., Wei, X., Liu, T., Huang, Y., Lin, X.** (2016). Plasma *miR*-10a: A Potential Biomarker for Coronary Artery Disease. *Dis Markers*, 2016, 3841927.
- Lusis, A. J.** (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233–41.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Weinberg, R. A.** (2007). Tumour Invasion and Metastasis Initiated by MicroRNA-10b in Breast Cancer. *Nature*, 449(7163), 682–88.
- Madrigal, M. J., Rotllan, N., Aranda, J. F., and FernandezH. C.** (2013)

MicroRNAs and atherosclerosis, *Curr. Atheroscler. Rep*, 15, 322.

Maitrias, P., MetzingerLe Meuth, V., Massy, Z. A., M'BayaMoutoula, E., Reix, T., Caus, T., Metzinger, L. (2015) MicroRNA deregulation in symptomatic carotid plaque, *J. Vasc. Surg.*, 62, 1245-1250.

Markus, B., Grote, K., Worsch, M., Parviz, B., Boening, A., Schieffer, B., Parahuleva, M. S. (2016) Differential expression of microRNAs in endarterectomy specimens taken from patients with asymptomatic and symptomatic carotid plaques, *PLoS One*, 11, e0161632.

Matsuzawa, Y. ve Lerman, A. (2014). Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment. *Coron Artery Dis*, 25, 713-24.

Maxfield, F.R. ve Tabas I. (2005). Role of Cholesterol and Lipid Organization in Disease. *Nature*, 438, 612–21.

Mestas, J., ve Ley, K. (2008). Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 18, 228–32.

Michaud, S. E., Dussault, S., Haddad, P., Groleau, J., Rivard, A. (2006). Circulating Endothelial Progenitor Cells from Healthy Smokers Exhibit Impaired Functional Activities. *Atherosclerosis*, 187, 423–32.

Miyoshi, K., Miyoshi, T., Siomi, H. (2010). Many Ways to Generate MicroRNA-like Small RNAs: Non-Canonical Pathways for MicroRNA Production. *Molecular Genetics and Genomics*, 284(2), 95–103.

Mosca, L. (2002). C-Reactive Protein--to Screen or Not to Screen? *The New England journal of medicine*, 347, 1615–17.

Motoyama, K., Inoue, H., Takatsuno, Y., Tanaka, F., Mimori, K., Uetake, H., Sugihara, K., Mori, M. (2009). Over- and under-Expressed MicroRNAs in Human Colorectal Cancer. *Int J Oncol*, 34(4), 1069–75.

Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., Dreyfuss, G. (2002). *MiRNPs*: A Novel Class of Ribonucleoproteins Containing Numerous MicroRNAs. *Genes and*

Development 16(6), 720–28.

Mozaffarian, D. (2016). Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity: A Comprehensive Review. *Circulation*, 133, 187–225.

Mudau, M., Genis, A., Lochner A., Strijdom H. (2012). Endothelial Dysfunction : The Early Predictor of Atherosclerosis. *Cardiovascular Journal of Africa*, 23, 222–31.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1, 263-73.

Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommese, L. Infante T, Ignarro LJ. (2013). Effects of Nitric Oxide on Cell Proliferation: Novel Insights. *J Am Coll Cardiol*, 62, 89–95.

Narayan, K. M., Ali, M. K., Koplan, J. P. (2010). Global Noncommunicable Diseases--Where Worlds Meet. *The New England journal of medicine* 363, 1196–98.

Nasri, H., Behradmanesh, S., Ahmadi, A., Baradaran, A., Nasri, P., Rafieian-Kopaei, M. (2014). Association of Serum Lipids with Level of Blood Pressure in Type 2 Diabetic Patients. *J Renal Inj Prev.* 3, 43–46.

Navab, M., Berliner, J.A., Watson, A.D., Hama, S.Y., Territo, M.C., Lusis, A.J., Shih, D.M., Van Lenten, B.J., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Fogelman, A.M. (1996). The Yin and Yang of Oxidation in The Development of The Fatty Streak: A Review Based on The 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 16:831.

Nayer, A., Asif, A. (2013). Idiopathic membranous nephropathy and anti-phospholipase A2 receptor antibodies. *J Nephropathol*, 2,214–6.

Nayer, A., ve Ortega, M. (2014). Catastrophic Antiphospholipid Syndrome: A Clinical. *Journal of nephropathology* 3(1), 9–17.

Newman, J. D., Rockman, C. B., Kosiborod, M., Guo, Y., Zhong, H., Weintraub, H. S., Schwartzbard, A. Z., Adelman, M. A., Berger, J. S.

(2017). Diabetes Mellitus Is a Coronary Heart Disease Risk Equivalent for Peripheral Vascular Disease. *American Heart Journal*, 184, 114-120

Ng, M. K., Wu, J., Chang, E., Wang, B. Y., Katzenberg-Clark, R., Ishii-Watabe, A., Cooke, J. P. (2007). A Central Role for Nicotinic Cholinergic Regulation of Growth Factor-Induced Endothelial Cell Migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 106–12.

Nishi, H., Ono, K., Iwanaga, Y., Horie, T., Nagao, K., Takemura, G., Kinoshita, M., Kuwabara, Y., Mori, R. T., Hasegawa, K., Kita, T., Kimura, T. (2010). MicroRNA-15b Modulates Cellular ATP Levels and Degenerates Mitochondria via Arl2 in Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(7), 4920–30.

Oeckinghaus, A., ve Sankar, G. (2009). The NF-KappaB Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(4).

Okamura, K., Phillips, M. D., Tyler, D. M., Duan, H., Chou, Y. T., Lai, E. C. (2008). The Regulatory Activity of MicroRNA* Species Has Substantial Influence on MicroRNA and 3' UTR Evolution.” *Nature Structural and Molecular Biology* 15(4): 354–63.

Onat, A. (2009). Erişkinlerimizde Kalp Hastalıkları Prevalansı, Yeni Koroner Olaylar ve Kalpten Ölüm Sıklığı. Erişim: <http://tekharf.org/> Erişim tarihi 05.06.2018

Ørom, U. A., Nielsen F. C., Lund, A. H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*, 30(4), 460-71.

Otsuka, F., Sakakura K., Yahagi K., Joner M., ve Virmani R. (2014). No TitleHas Our Understanding of Calcification in Human Coronary Atherosclerosis Progressed?*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34, 724–36.

Ovcharenko, D., Stölzel, F., Poitz, D., Fierro, F., Schaich, M., Neubauer, A., Kelnar, K., Davison, T., Müller-Tidow, C., Thiede, C., Bornhäuser, M., Ehninger, G., Brown, D., Illmer, T. (2011) *miR-10a* overexpression is associated with NPM1 mutations and MDM4 downregulation in intermediate-

risk acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*, 39(10),1030-1042

- Parahuleva, M. S., Euler, G., Mardini, A., Parviz, B., Schieffer, B., Schulz, R., Aslam, M.** (2017). Identification of microRNAs as potential cellular monocytic biomarkers in the early phase of myocardial infarction: a pilot study. *Sci Rep*, 7(1), 15974
- Pasceri, V., Willerson, J.T., Yeh E. T.** (2000). Direct Proinflammatory Effect of C-Reactive Protein on Human Endothelial Cells. *Circulation*, 102, 2165–68.
- Paulin, R., Couboulin, A., Barrier, M., Bonnet, S.** (2011). From oncoproteins/tumor suppressors to microRNAs, the newest therapeutic targets for pulmonary arterial hypertension. *J Mol Med (Berl)* 89, 1089–1101.
- Pedrioli, D. M., Karpanen, T., Dabouras, V., Jurisic, G., van de Hoek, G., Shin, J. W., Marino, D., Kälin, R. E., Leidel, S., Cinelli, P., Schulte-Merker, S., Brändli, A. W., Detmar, M.** (2010). *MiR-31* Functions as a Negative Regulator of Lymphatic Vascular Lineage-Specific Differentiation In Vitro and Vascular Development In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 30(14), 3620–34.
- Pedrioli, D. M., Karpanen, T., Dabouras, V., Jurisic, G., van de Hoek, G., Shin, J. W., Marino, D., Kälin, R. E., Leidel, S., Cinelli, P., Schulte-Merker, S., Brändli, A. W., Detmar, M.** (2010). *miR-31* functions as a negative regulator of lymphatic vascular lineage-specific differentiation in vitro and vascular development in vivo. *Mol Cell Biol*, 30, 3620–3634.
- Pelletier, R., Humphries, K. H., Shimony, A., Bacon, S. L, Lavoie, K. L., Rabi, D., Karp, I., Tsadok, M. A., Pilote, L.** (2014). GENESIS-PRAXY Investigators. Sex-Related Differences in Access to Care among Patients with Premature Acute Coronary Syndrome. *Canadian Medical Association. Journal*, 186, 497–504.
- Penna, E., Orso, F., Cimino, D., Tenaglia, E., Lembo, A., Quaglino, E., Polisenio, L., Haimovic, A., Osella-Abate, S., De Pitta, C., Pinatel, E., Stadler, M. B., Provero, P., Bernengo, M. G., Osman, I., Taverna, D.** (2011). microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *EMBO J*, 30, 1990–2007

- Porrello, E. R.** (2013). MicroRNAs in Cardiac Development and Regeneration. *Clin Sci*, 125(4), 151–66.
- Porrello, E. R., Johnson, B. A., Aurora, A. B., Simpson, E., Nam, Y. J., Matkovich, S. J., Dorn, G. W. 2nd, van Rooij, E., Olson, E. N.** (2011). *MiR-15* Family Regulates Postnatal Mitotic Arrest of Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 109(6), 670–79.
- Qiang, R., Wang, F., Shi, L. Y., Liu, M., Chen, S., Wan, H. Y., Li, Y. X., Li, X., Gao, S. Y., Sun, B. C., Tang, H.** (2011). Plexin-B1 Is a Target of *MiR-214* in Cervical Cancer and Promotes the Growth and Invasion of HeLa Cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(4), 632–41.
- Qin, X., Wang, X., Wang, Y., Tang, Z., Cui, Q., Xi, J., Li, Y. S., Chien, S., Wang, N.** (2010). MicroRNA-19a Mediates the Suppressive Effect of Laminar Flow on Cyclin D1 Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(7), 3240-44
- Qing, S, Yuan, S., Yun, C., Hui, H., Mao, P., Wen, F., Ding, Y., Liu, Q.** (2014). Serum *miRNA* Biomarkers Serve as a Fingerprint for Proliferative Diabetic Retinopathy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(5), 1733–40.
- Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A., Nasri, H.** (2014). Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*, 5(8), 927-46.
- Rana, J. S., Liu, J. Y., Moffet, H. H., Jaffe, M., Karter, A. J.** (2016). Diabetes and Prior Coronary Heart Disease Are Not Necessarily Risk Equivalent for Future Coronary Heart Disease Events. *Journal of General Internal Medicine*, 31, 387–93.
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B., Cartuyvels, R.** (2009). Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal*, 23(3), 145-51.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., Ruvkun, G.** (2000). The 21-Nucleotide *Let-7* RNA Regulates Developmental Timing in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature*, 403,

901–6.

- Rensen, S. S., Doevendans P. A., van Eys, G. J.** (2007). Regulation and Characteristics of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Diversity. *Neth Heart J*, 15, 100–108.
- Rhoads, K., Arderiu, G., Charboneau, A., Hansen, S. L., Hoffman, W., Boudreau, N.** (2005) A role for Hox A5 in regulating angiogenesis and vascular patterning. *Lymphat Res Biol*, 3(4), 240-52.
- Ridker, P. M., Revkin, J., Amarenco, P., Brunell, R., Curto, M., Civeira, F., Flather, M., Glynn, R. J., Gregoire, J., Jukema, J. W., Karpov, Y., Kastelein, J. J. P., Koenig, W., Lorenzatti, A., Manga, P., Masiukiewicz, U., Miller, M., Mosterd, A., Murin, J., Nicolau, J.C., Nissen, S., Ponikowski, P., Santos, R. D., Schwartz, P. F., Soran, H., White, H., Wright, R. S., Vrablik, M., Yunis, C., Shear, C. L., Tardif, J. C.** SPIRE Cardiovascular Outcome Investigators. (2017). Cardiovascular Efficacy and Safety of Bococizumab in High-Risk Patients. *New England Journal of Medicine*, 376, 1527–39.
- Rivard, A., Fabre, J. E., Silver, M., Chen, D., Murohara, T., Kearney, M., Magner, M., Asahara, T., Isner, J. M.** (1999). Age-Dependent Impairment of Angiogenesis. *Circulation* 99, 111–20.
- Ross, R.** (1993). The Pathogenesis of Atherosclerosis: A Perspective for the 1990s. *Nature*, 362(6423), 801–9.
- Ross, R.** (1999). Atherosclerosis--an Inflammatory Disease. *The New England journal of medicine*, 340, 115–26.
- Rothblat, G. H., ve Michael C. P.** (2010). High-Density Lipoprotein Heterogeneity and Function in Reverse Cholesterol Transport. *Current Opinion in Lipidology*, 21, 229–38.
- Ruby, J. G., Jan, C. H. Ve Bartel, D. P.** (2007). Intronic MicroRNA Precursors That Bypass Drosha Processing. *Nature*, 448(7149), 83–86.
- Sabri, M. N., Di Sciascio, G., Cowley, M. J., Alpert, D., Vetrovec, G.W.** (1991). Coronary Collateral Recruitment: Functional Significance and Relation to Rate

of Vessel Closure. *American Heart Journal*, 121, 876–80.

Sarrafadegan, N., Khosravi-Boroujeni, H., Esmailzadeh, A., Sadeghi, M., Rafieian-Kopaei, M., Asgary, S. (2013). The Association between Hypertriglyceridemic Waist Phenotype, Menopause, and Cardiovascular Risk Factors. *Archives of Iranian Medicine* 16, 161–66.

Sasmaz, H., ve Yilmaz, M. B. (2009). Coronary Collaterals in Obese Patients: Impact of Metabolic Syndrome. *Angiology*, 60, 164–68.

Savoia, C., Schiffrin, E. L. (2007). Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci*, 112(7), 375–384.

Sayed, D., Hong, C., Chen, I. Y., Lypowy, J., Abdellatif, M. (2007). MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 100, 416–424.

Schofield, I., Malik, R., Izzard, A., Austin, C., Heagerty, A. (2002). Vascular Structural and Functional Changes in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation*, 106, 3037-3043.

Schulz, U. G., Rothwell, P. M. (2001). Sex Differences in Carotid Bifurcation Anatomy and the Distribution of Atherosclerotic Plaque. *Stroke* 32, 1525–31.

Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*, 115(2), 199–208.

Setorki, M., Hahinfar, N. S., Ansari, R., Forouzandeh V., Asgharzadeh, S., Rafieyan, M. (2013). Comparison between the Effects of Hydroalcoholic Extract of Dill and Statins on Lipid Profile. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 20, 158–68.

Setorki, M., Rafieian, M., Heidarian, E., Ghatreh, K., Shahinfard, N., Ansari, R., Forouzandeh, Z. (2012). Effect of Rhus Coriaria Consumption with High Cholesterol Food on Some Atherosclerosis Risk Factors in Rabbit. *Journal of Babol University of Medical Sciences* 14, 38–45.

- Shen, J., Yang, X., Xie, B., Chen, Y., Swaim, M., Hackett, S. F., Campochiaro, P. A.** (2008). MicroRNAs Regulate Ocular Neovascularization. *Molecular Therapy*, 16(7), 1208–16.
- Shi, Y., Wang, Y., Luan, W., Wang, P., Tao, T., Zhang, J., Qian, J., Liu, N., You, Y.** (2014). Long Non-Coding RNA H19 Promotes Glioma Cell Invasion by Deriving *MiR-675*. *PLoS ONE* 9(1).
- Shih, T. C., Tien, Y. J., Wen, C. J., Yeh, T. S., Yu, M. C., Huang, C. H., Lee, Y. S., Yen, T. C., Hsieh, S. Y.** (2012). MicroRNA-214 downregulation contributes to tumor angiogenesis by inducing secretion of the hepatoma-derived growth factor in human hepatoma. *J Hepatol*, 57, 584–591.
- Slaby, O., Svoboda, M., Fabian, P., Smerdova, T., Knoflickova, D., Bednarikova, M., Nenutil, R., Vyzula, R.** (2008). Altered Expression of *MiR-21*, *MiR-31*, *MiR-143* and *MiR-145* Is Related to Clinicopathologic Features of Colorectal Cancer.” *Oncology* 72(5–6), 397–402.
- Small, E. M., ve Olson, E. N.** (2011). Pervasive Roles of MicroRNAs in Cardiovascular Biology. *Nature* 469(7330), 336–42.
- Snelting-Havinga I., Mommaas M., Van Hinsbergh V. W., Daha M. R., Daems W. T., Vermeer B. J.** (1989). Immunoelectron Microscopic Visualization of the Transcytosis of Low Density Lipoproteins in Perfused Rat Arteries. *Europ j of cell bio*, 48(1), 27–36.
- Soeki, T., Yamaguchi, K., Niki, T., Uematsu, E., Bando, S., Matsuura, T., Ise, T., Kusunose, K., Hotchi, J., Tobiume, T., Yagi, S., Fukuda, D., Taketani, Y., Iwase, T., Yamada, H., Wakatsuki, T., Shimabukuro, M., Sata, M.** (2015). Plasma microRNA-100 is associated with coronary plaque vulnerability. *Circ J*. 79(2):413-8.
- Steinberg, D.** (2002). Atherogenesis in Perspective: Hypercholesterolemia and Inflammation as Partners in Crime. *Nature Medicine*, 8: 1211–17.
- Steinbrecher, U. P., Zhang, H., and Lougheed, M.** (1990). Role of Oxidatively Modified LDL in Atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 155–68.

- Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D. S, Witztum, J. L, Steinberg, D.** (1984). Modification of Low Density Lipoprotein by Endothelial Cells Involves Lipid Peroxidation and Degradation of Low Density Lipoprotein Phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 3883–87.
- Suárez, Y., Wang, C, Manes, T. D. Pober, J. S.** (2010). Cutting Edge: TNF-Induced MicroRNAs Regulate TNF-Induced Expression of E-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 on Human Endothelial Cells: Feedback Control of Inflammation. *The Journal of Immunology*, 184(1), 21 LP-25.
- Talukdar, S., Oh, D. Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P., Yan, Q., Zhu, Y., Ofrecio, J., Lin, M., Brenner, M.B., Olefsky, J. M.** (2012). Neutrophils Mediate Insulin Resistance in Mice Fed a High-Fat Diet through Secreted Elastase. *Nature Medicine*, 18, 1407–12.
- Tamminen, M., Mottino, G., Qiao, J. H., Breslow, J. L., Frank, J. S.** (1999). Ultrastructure of Early Lipid Accumulation in ApoE-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19, 847–53.
- Tavafi, M.** (2013). Complexity of Diabetic Nephropathy Pathogenesis and Design of Investigations. *J Renal Inj Prev*, 2, 59-62.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., Nguyen, M.** (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. 50(4):S1-5.
- Tehler, D., Høyland-Kroghsbo, N. M., Lund, A. H.** (2011). The *MiR-10* MicroRNA Precursor Family. *RNA Biology*, 8(5), 728–34.
- Tirziu, D., Moodie, K.L., Zhuang, Z. W., Singer, K., Helisch, A., Dunn, J. F., Li, W., Singh, J., Simons, M.** (2005). Delayed Arteriogenesis in Hypercholesterolemic Mice. *Circulation*, 112, 2501–9.
- Tsai, Y. H., Wu, M. F., Wu, Y. H., Chang, S. J., Lin, S. F., Sharp, T. V., Wang, H. W.** (2009). The M type K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus regulates microRNA expression via its SH2-binding motif to induce cell migration and invasion. *J Virol*, 83, 622–632.

- Tuttle, J. L., Hahn, T. L., Sanders, B. M., Witzmann, F. A., Miller, S. J., Dalsing, M. C., Unthank, J. L.** (2002). Impaired Collateral Development in Mature Rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, 146-55.
- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Dejana, E., Schultz, D. A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., Schwartz, M. A.** (2005). A Mechanosensory Complex That Mediates the Endothelial Cell Response to Fluid Shear Stress. *Nature*, 437, 426–31.
- Tzur, G., Levy, A., Meiri, E., Barad, O., Spector, Y., Bentwich, Z., Mizrahi, L., Katzenellenbogen, M., Ben-Shushan, E., Reubinoff, B. E., Galun, E.** (2008). “MicroRNA Expression Patterns and Function in Endodermal Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* 3(11), e3726.
- Urbich, C., Kuehbacher, A., Dimmeler, S.** (2008). Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 79(4), 581-8.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., Lötvall, J. O.** (2007). Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–59.
- van Rooij, E., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J., Olson, E. N.** (2007). Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by a MicroRNA. *Science*, 316(5824), 575–79.
- van Weel, V., de Vries, M., Voshol, P. J., Verloop, R. E., Eilers, P. H., van Hinsbergh, V. W., van Bockel, J. H., Quax, P. H.** (2006). Hypercholesterolemia Reduces Collateral Artery Growth More Dominantly than Hyperglycemia or Insulin Resistance in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26, 1383–90.
- Vasile, E., Simionescu, M., Simionescu, N.** (1983). Visualization of the Binding, Endocytosis, and Transcytosis of Low-Density Lipoprotein in the Arterial Endothelium in Situ. *Journal of Cell Biology*, 96, 1677–89.
- Volny, O., Kasickova, L., Coufalova, D., Cimflova, P., Novak, J.** (2015) MicroRNAs in cerebrovascular disease, *Adv. Exp. Med. Biol*, 888, 155-195.

- Waltenberger, J.** (2001). Impaired Collateral Vessel Development in Diabetes: Potential Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cardiovascular Research* 49(3): 554–60.
- Wang, C., Deng, L., Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ.** (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412(6844), 346–351.
- Wang, H.** (2016). Global, Regional, and National Life Expectancy, All-Cause Mortality, and Cause-Specific Mortality for 249 Causes of Death, 1980-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388, 1459–1544.
- Wang, H. W., Huang, T. S., Lo, H. H., Huang, P. H., Lin, C. C., Chang, S. J., Liao, K. H., Tsai, C. H., Chan, C. H., Tsai, C. F., Cheng, Y. C, Chiu, Y. L., Tsai, T. N., Cheng, C. C., Cheng, S. M.** (2014). Deficiency of the microRNA-31-microRNA-720 pathway in the plasma and endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease.
- Wang, X. C., Tian, L. L., Wu, H. L., Jiang, X. Y., Du, L. Q., Zhang, H., Wang, Y. Y., Wu, H. Y., Li, D. G., She, Y, Liu, Q. F., Fan, F. Y., Meng, A. M.** (2010). Expression of NA-130a in Nonsmall Cell Lung Cancer. *The American journal of the medical sciences* 340(5), 385–88.
- Weber, C., ve Noels, H.** (2011). Atherosclerosis: Current Pathogenesis and Therapeutic Options. *Nature Medicine*, 17: 1410–22.
- Weiss, F.U., Marques, I. J., Woltering, J. M., Vlecken, D. H., Aghdassi, A., Partecke, L. I., Heidecke, C. D., Lerch, M. M., Bagowski, C. P.** (2009). Retinoic Acid Receptor Antagonists Inhibit *MiR*-10a Expression and Block Metastatic Behavior of Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 137(6), 2136-45.
- Wensveen, F. Valentić S., Wensveen, T., Theurich, S., Glasner, A., Mendrila, D., Štimac, D., Wunderlich, F., Brüning, J., Mandelboim, O., Polić, B.** (2015). NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nature Immunology*, 16, 376-385.
- Wentzel, J. J, Chatzizisis, Y. S, Gijzen, F. J, Giannoglou, G. D., Feldman, C. L., Stone, P. H.** (2012). Endothelial Shear Stress in the Evolution of Coronary

Atherosclerotic Plaque and Vascular Remodelling: Current Understanding and Remaining Questions. *Cardiovascular Research*, 96, 234–43.

Westholm, J. O., ve Lai, E. C. (2011). *Mirtrons: MicroRNA Biogenesis via Splicing*. *Biochimie*, 93(11), 1897–1904.

Wezel, A., Welten, S. M., Razawy, W., Lagraauw, H. M., De Vries, M. R., Goossens, E. A., Boonstra, M. C., Hamming, J. F., Kandimalla, E. R., Kuiper, J., Quax, P. H., Nossent, A. Y., and Bot, I. (2015) Inhibition of microRNA494 reduces carotid artery atherosclerotic lesion development and increases plaque stability. *Ann. Surg*, 262, 841-847.

Wightman, B, Ha, I., Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene Lin-14 by Lin- 4 Mediates Temporal Pattern Formation in *C. Elegans*. *Cell*, 75(5), 855–62.

Williams, J. K., Anthony, M. S., Honoré, E. K., Herrington, D. M., Morgan, T. M., Register, T. C., Clarkson, T. B. (1995). Regression of Atherosclerosis in Female Monkeys. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15, 827–36.

Winer, D. A., Luck, H., Tsai, S., Winer S. (2016). The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metabolism* 23, 413–26.

Winer, D. A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P. P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M. G, Alonso, M. N., Leong, H. X., Glassford, A., Caimol, M., Kenkel, J. A., Tedder, T. F., McLaughlin, T., Miklos, D. B., Dosch, H. M., Engleman, E. G. (2011). “B Cells Promote Insulin Resistance through Modulation of T Cells and Production of Pathogenic IgG Antibodies.” *Nature Medicine* 17(5): 610–17.

Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F., Maezawa, Y., Drucker, D. J., Engleman, E., Winer, D., Dosch, H. M. (2009). “Normalization of Obesity-Associated Insulin Resistance through Immunotherapy.” *Nature Medicine*, 15, 921–29.

Winston, J. T., Strack, P., Beer-Romero, P., Chu, C. Y., Elledge, S. J., Harper,

- J. W.** (1999). The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev*, 13(3), 270–283.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., Diederichs, S.** (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 11(3):228-34.
- Wojciechowska, A, Osiak, A., Kozar-Kamińska, K.** (2017). MicroRNA in Cardiovascular Biology and Disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(5), 868–74.
- Woltering, J. M. ve Durston, A. J.** (2008). *MiR-10* Represses HoxB1a and HoxB3a in Zebrafish. *PLoS ONE*, 3(1).
- Wu, J. I., Lessard, J., Crabtree, G. R.** (2009). Understanding the words of chromatin regulation. *Cell*, 136, 200–206.
- Wu, W. H., Hu, C. P., Chen, X. P., Zhang, W. F., Li, X. W., Xiong, X. M., Li, Y. J.** (2011). MicroRNA- 130a mediates proliferation of vascular smooth muscle cells in hypertension. *Am J Hypertens*, 24(10), 1087
- Wu, Y. H., Hu, T. F., Chen, Y. C., Tsai, Y. N., Tsai, Y. H., Cheng, C. C., Wang, H. W.** (2011). The manipulation of *miRNA*-gene regulatory networks by KSHV induces endothelial cell motility. *Blood*. 118, 2896–2905.
- Xiao, J., Zhu, X., He, B., Zhang, Y., Kang, B., Wang, Z., Ni, X.** (2011). *MiR-204* regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia-reperfusion through LC3-II. *J Biomed Sci*, 18:35.
- Yang, H., Kong, W., He, L., Zhao, J. J., O'Donnell, J. D., Wang, J., Wenham, R. M., Coppola, D., Kruk, P. A., Nicosia, S. V., Cheng, J. Q.** (2008). MicroRNA Expression Profiling in Human Ovarian Cancer: *MiR-214* Induces Cell Survival and Cisplatin Resistance by Targeting PTEN. *Cancer research*, 68(2), 425–33.
- Yang, J. S., Phillips, M. D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A. C., Chen, K. C., Lai, E. C.** (2011). Widespread Regulatory Activity of Vertebrate

MicroRNA* Species. *RNA* 17(2), 312–26.

- Ye, M., Li, D., Yang, J., Xie, J., Yu, F., Ma, Y., Zhu, X., Zhao, J., Lv, Z.** (2015). MicroRNA-130a Targets MAP3K12 to Modulate Diabetic Endothelial Progenitor Cell Function. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(2), 712–26.
- Yilmaz, M. B., Biyikoglu, S. F., Akin, Y., Guray, U., Kisacik, H.L, Korkmaz, S.** (2003). Obesity Is Associated with Impaired Coronary Collateral Vessel Development. *International Journal of Obesity* 27(12): 1541–45.
- Yilmaz, M. B., Caldir, V., Guray, Y., Guray, U., Altay, H., Demirkan, B., Cay, S., Kisacik, H. L., Korkmaz, S.** (2006). Relation of Coronary Collateral Vessel Development in Patients with a Totally Occluded Right Coronary Artery to the Metabolic Syndrome. *American Journal of Cardiology* 97, 636–39.
- Ying, S. Y., ve Lin S. L.** (2006). Current Perspectives in Intronic Micro RNAs (NAs). *Journal of Biomedical Science*, 13(1), 5–15.
- Yu, J., deMuinck, E. D., Zhuang, Z., Drinane, M., Kauser, K., Rubanyi, G. M., Qian, H. S., Murata, T., Escalante, B., Sessa, W. C.** (2005). Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Critical for Ischemic Remodeling, Mural Cell Recruitment, and Blood Flow Reserve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10999–4.
- Yuan, C., Mitsumori, L. M., Ferguson, M. S., Polissar, N. L, Echelard, D., Ortiz, G., Small, R., Davies, J. W., Kerwin, W. S., Hatsukami, T. S.** (2001). In Vivo Accuracy of Multispectral Magnetic Resonance Imaging for Identifying Lipid-Rich Necrotic Cores and Intraplaque Hemorrhage in Advanced Human Carotid Plaques. *Circulation*, 104, 2051–56
- Zaragoza, C., Susana, Márquez., Marta, Saura.** (2012). Endothelial Mechanosensors of Shear Stress as Regulators of Atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*, 23, 446–52.
- Zhang, X., Devlin, H. M., Smith, B., Imperatore, G., Thomas, W., Lobelo, F., Ali M. K., Norris, K., Gruss, S., Bardenheier, B., Cho, P., Garcia de Quevedo I., Mudaliar, U., Jones, C. D., Durthaler, J. M., Saaddine, J., Geiss, L. S., Gregg, E. W.** (2017). Effect of Lifestyle Interventions on

Cardiovascular Risk Factors among Adults without Impaired Glucose Tolerance or Diabetes: A Systematic Review and Metaanalysis. *PLoS ONE*, 12(5).

Zhao, Y., Ransom, J. F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A. N., Tsuchihashi, T., McManus, M. T., Schwartz, R. J., Srivastava, D. (2007). Dysregulation of Cardiogenesis, Cardiac Conduction, and Cell Cycle in Mice Lacking *NA-1-2*. *Cell*, 129(2), 303–17.

Zhao, Y., ve Srivastava D. (2007). A Developmental View of MicroRNA Function. *Trends in Biochemical Sciences* 32, 189–97

Zhou, B., Bi, Y.Y., Han, Z.B, Ren, H, Fang, Z.H., Yu, X. F., Poon, M. C., Han, Z. C. (2006). G-CSF-Mobilized Peripheral Blood Mononuclear Cells from Diabetic Patients Augment Neovascularization in Ischemic Limbs but with Impaired Capability. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4, 993–1002.

7. EKLER

EK 1. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Aterosklerozlu Hastaların Koroner Arter Plaklarında ve Doluşımlarındaki Bazı mikroRNA'ların 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, Tıp Fakültesi Ek Derslik Binası (Acil Karşısı), Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 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	Prof. Dr. Ali Fazlı Yenidünya		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi Fen 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	Aterosklerozlu Hastaların Koroner Arter Plaklarında ve Dolaşımındaki Bazı mikroRNA'ların İfade Düzeylerinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input 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 MATERYEL 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: 2015-05/07	Tarih: 12.05.2015		
	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"/>		
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 type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı	
Doç. Dr. Hülya Toker	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"/>		
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"/>		
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"/>		
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"/>		
Yrd. Doç. Dr. Ziynet Çınar	Biyostatistik	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"/>		
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 checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>		
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 checked="" type="checkbox"/>	H <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 atmaldır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Aterosklerozlu Hastaların Koroner Arter Plaklarında ve Dolaşımındaki Bazı mikroRNA'ların İfade Düzeylerinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

Yrd. Doç. Dr. Ali Şahin	Romatoloji	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"/>	
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"/>	
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"/>	
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"/>	
Öğret. Melih Arslan	Sınıf Öğretmeni	Reşit Akif Paşa İlkokulu	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"/>	

*:Toplantıda Bulunma

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

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Nil ÖZBİLÜM ŞAHİN
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 20.03.1986
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce (İyi); Fransızca (Başlangıç)
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Biyoloji Bölümü 58140 Sivas
E-posta Adresi	ozbilumnil@hotmail.com



Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Kongre Lisesi, 2004
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2009
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2012

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Görevlisi, 2011

Yayınlar

Ulusal

1. Beton Osman, Berkan Öcal, Özbilüm Nil, Arslan Serdal (2016). The association between ABCA1 R219K and ABCB1 C1236T gene polymorphisms and coronary artery disease in a Turkish population. Medical Journal of İzmir Hospital, 20(2), 53-62.

Uluslararası

1. Kızıldağ Sibel, ARSLAN SERDAL, ÖZBİLÜM ŞAHİN NİL, ENGİN AYNUR,BAKIR MEHMET Effect of TLR10 (2322A/G, 720A/C, and 992T/A) polymorphisms on the pathogenesis of Crimean Congo hemorrhagic fever disease. Journal of Medical Virology, 90(1), 19-25., Doi: 10.1002/jmv.24924
2. ARSLAN SERDAL,BERKAN ÖCAL,lalem torkia,ÖZBİLÜM ŞAHİN NİL,GÖKSEL SABAHATTİN,KORKMAZ ÖZGE,ÇEKİN NİLGÜN,devaux yvan (2017). Long non-coding RNAs in the atherosclerotic plaque. Atherosclerosis, 266, 176-181., Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.012

3. ARSLAN SERDAL, BERKAN ÖCAL, TÜZEMEN BAYYURT ELİF BURCU, BETON OSMAN, ÖZBİLÜM ŞAHİN NİL, AYDEMİR EYLEM İTİR (2017). Effects of MPO-463G/A and -129G/A polymorphisms on coronary artery disease risk and patient survival in a Turkish population. *biomedical reports*, 7(6), 547-552., Doi: 10.3892/br.2017.995
4. ENGİN AYNUR, ARSLAN SERDAL, ÖZBİLÜM NİL, BAKIR MEHMET (2016). Is there any relationship between Toll like receptor 3 c 1377C T and 7C A polymorphisms and susceptibility to Crimean Congo hemorrhagic fever. *Journal of Medical Virology*, 88(10), 1690-1696., Doi: 10.1002/jmv.24519
5. BETON OSMAN, ARSLAN SERDAL, ACAR BURAK, ÖZBİLÜM NİL, BERKAN ÖCAL (2016). Association between MMP 3 and MMP 9 polymorphisms and coronary artery disease. *Biomedical Reports*, 5(6), 709-714., Doi: 10.3892/br.2016.782
6. ARSLAN SERDAL, KORKMAZ ÖZGE, ÖZBİLÜM NİL, BERKAN ÖCAL (2015). Association between NF-κBI and NFκBIA polymorphisms and coronary artery disease. *Biomedical Reports*, 3(5), 736-740., Doi: 10.3892/br.2015.499
7. ARSLAN SERDAL, ENGİN AYNUR, ÖZBİLÜM NİL, BAKIR MEHMET (2015). Toll like receptor 7 Gln111Leu c 4 151A G and 1817G T polymorphisms in Crimean Congo hemorrhagic fever. *Journal of Medical Virology*, 87(7), 1090-1095., Doi: 10.1002/jmv.24174
8. ATAHAN ERHAN, ARSLAN SERDAL, ÖZBİLÜM NİL, BERKAN ÖCAL (2014). Ateroskleroz ile il 1 interleukin 1 889 c t gen polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırılması. *Cumhuriyet Medical Journal*, 36(2), 231-240., Doi: 10.7197/1305-0028.12436 (Yayın No: 1784920)
9. ÖZBİLÜM NİL, ARSLAN SERDAL, BERKAN ÖCAL, YANARTAŞ MEHMED, AYDEMİR EYLEM İTİR (2013). The role of NFκB1A promoter polymorphisms on coronary artery disease risk. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 113(3), 187-192., Doi: 10.1111/bcpt.12085

Kongreler ve Bildiriler

Ulusal

1. ARSLAN SERDAL, BERKAN ÖCAL, ÖZBİLÜM ŞAHİN NİL, KORKMAZ ÖZGE, ÇEKİN NİLGÜN, GÖKSEL SABAHATTİN (2017).

Koroner arter plaklarında ve internal mamarian arterde mikroarray yöntemi ile mikroRNA ifade düzeylerinin araştırılması. 18. Ulusal Vasküler ve Endovasküler Cerrahi Kongresi, 26, 44 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3977282)

2. ARSLAN SERDAL, BERKAN ÖCAL, ÖZBİLÜM NİL, KORKMAZ ÖZGE, GÖKSEL SABAHATTİN, ÇEKİN NİLGÜN (2016). Ateroskleroz hastalarının Koroner Arter plaklarında uzun kodlama yapmayan RNA ların lncRNAs ifade düzeylerinin araştırılması. türk kalp damar cerrahisi derneği 14. kongresi

3. ENGİN AYNUR, ARSLAN SERDAL, ÖZBİLÜM NİL, BAKIR MEHMET (2016). kırım kongo kanamalı ateş hastalarında Toll Like reseptör 3 C 1377 C T ve tlr 3 7C A polimorfizm sıklığı ve hastalık ciddiyeti ile ilişkisi. klinik 30. yıl kurultayı

4. ARSLAN SERDAL, ÖZBİLÜM NİL, BULUT OKAY (2015). DİZ OSTEOARTRİTİ İLE MANNOZ BAĞLAYICI LECTIN 2 GEN KODON 54 POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI. 25. Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi (Özet Bildiri/)

5. ARSLAN SERDAL, ÖZBİLÜM NİL, BULUT OKAY (2014). Gonartroz hastalığı ile MBL 2 genetik polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırılması. 13.tıbbi biyoloji kongresi

6. ARSLAN SERDAL, ÖZBİLÜM NİL, BERKAN ÖCAL (2014). Demografik Parametrelere Bağlı Olarak XRCC1 Polimorfizminde Koroner Arter Hastalığı Riski. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi

7. Özbilüm Nil, Arslan Serdal, Berkan Öcal (2012). Koroner Arter Hastalığı İle NF B1 ve NF B1A Genetik Polimorfizmi Arasındaki İlişkinin Araştırılması. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi

8. Özbilüm Nil, Arslan Serdal, Berkan Öcal (2012). Ateroskleroz hastalığı ile NF B1A Genetik polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırılması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, 3-7 Eylül, 1444

Uluslararası

1. ÖZBİLÜM ŞAHİN NİL, ARSLAN SERDAL, AYDEMİR EYLEM İTİR, BETON OSMAN, YENİDÜNYA ALİ FAZIL (2017). Investigation of Circulating Expression Levels *miR31* and *miR204* In Coronary Artery

- Disease. VI. International Congress of Molecular Medicine (Özet Bildiri/Poster)
2. Bildirici Aslıhan, ARSLAN SERDAL, ÖZBİLÜM ŞAHİN NİL, BERKAN ÖCAL, GÖKSEL SABAHATTİN, YILMAZ MEHMET BİRHAN (2017). Evaluation of microRNA-221/222 Expression Levels in Patients with Coronary Artery in Atherosclerotic Plaque and Circulation. VI. International Congress of Molecular Medicine (Özet Bildiri/Poster)
 3. ARSLAN SERDAL, ENGİN AYNUR, ÖZBİLÜM ŞAHİN NİL, SARI İSMAİL, BAKIR MEHMET (2017). The preliminary results of microRNA gene expression in patients with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever.. 4. International congress on Infection Diseases, 5(02), 8-9., Doi: 10.4172/2332-0877-C1-024

Ödüller, Teşvikler ve Üyelikler

1. Sözel bildiri üçüncülük ödülü, KLİMİK, 2016
2. Poster dalında birincilik ödülü, türk kalp damar cerrahisi derneği, 2016
3. sözlü bildiri dalında birincilik ödülü, TOTBID Kongre Bilimsel Ödülleri, 2015

Projeler

1. Aterosklerozlu Hastaların Koroner Arter Plaklarında ve Dolaşımlarındaki Bazı mikroRNA ların İfade Düzeylerinin İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 23/10/2015 (ULUSAL)
2. Aterosklerozlu hastalarda koroner arter ve İnternal mamarian arterlerin yapısal ve patolojik açıdan karşılaştırılması, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 2015 (ULUSAL)
3. Ateroskleroz ile bazı inflamatuvar genetik belirteçler arasındaki ilişkinin araştırılması, bap, araştırmacı, 2010-2013 (ulusal)