T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PERİFERİK ARTER HASTALIĞINDA PELATON GENİ İLE RNA HASARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilaver KILIÇ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Burcu BAYOĞLU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

Haziran, 2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Dilaver Kılıç tarafından, **Doç. Dr. Burcu Bayoğlu** danışmanlığında hazırlanan **" Periferik Arter Hastalığında PELATON Geni ile RNA Hasarı Arasındaki İlişkinin Araştırılması "** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **27/06/2024** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	**Sonuç**
DANIŞMAN	Doç. Dr. Burcu BAYOĞLU İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Tuğba SOYDAŞ İstanbul Aydın Üniversitesi Tıbbi BiyolojiAnabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Dilaver KILIÇ

(İmza)

Aileme ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

Tez Adını Giriniz

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TYL-2023-36833

TEŞEKKÜR

Danışmanım olduğu ilk günden beri kendisiyle çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, her konuda beni destekleyen, yanımda olan çok kıymetli hocam Doç. Dr. Burcu BAYOĞLU'na

Destekleri için Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın değerli ve saygıdeğer öğretim üyelerine,

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için gerekli örneklerin temininde emeği geçen Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Gökhan İPEK, Dr.Öğr.Üyesi Berk ARAPİ ve Öğr. Gör. Dr. Çiğdem TEL ÜSTÜNIŞIK ekibine,

Her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Uğur KAYA, Hüseyin Can SELVİ ve Mustafa GEDİK'e,

Yüksek lisans ve çalışmalarım sırasında her türlü desteklerini gördüğüm kıymetli çalışma arkadaşlarım MSc Afsoon GHOREISHIZADE, İrem DURAN, MSc. Efruz İrem AKKUŞ, MSc. Aysun DADASHLI, Aydan ISMAYILZADE, Ferdi MAHMUDZADE, MSc Javidan ASADOV, Sarah NASREDDINE ve Mahsa HOSEİNİ'ye

Hayatımın her anında koşulsuz desteklerini hissettiğim sevgili ANNEM ve BABAM'a,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER…

Haziran 2024 **Dilaver KILIÇ**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. GİRİŞ 1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE 4
2.1. ATEROSKLEROZ 4
2.1.1. Aterosklerozun Patogenezi ve İlerlemesi 4
2.1.2. Ateroskleroz Risk Faktörleri 9
2.2. PERİFERİK ARTER HASTALIĞI 10
2.2.1. PAH Epidemiyolojisi ve Sınıflandırması 12
2.2.2. PAH Tedavisi 13
2.3. UZUN KODLANMAYAN RNA'LAR 14
2.4. LNC RNA-PELATON 19
2.5. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ENDOTEL HASARI İLE İLİŞKİSİ 21
2.6. GERÇEK ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (qRT-PCR) 22
2.7. ELISA (Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi) 23
3. YÖNTEM 24
3.1. ÇALIŞMA GRUBU 24
3.2. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME 24
3.3. YÖNTEMLER 27
3.3.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu 27
3.3.2. Lenfosit Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu 28
3.3.3. Örneklerin RNA Miktarlarının ve Saflığının Ölçülmesi 29
3.3.4. cDNA Sentezi 29
3.3.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) 31
3.3.6. Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA) 34
3.4. İstatistiksel Analiz 36
4. BULGULAR 36
5. TARTIŞMA 43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 47

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2-1: Yağlı çizgiler oluşumunun aşamaları 6
Şekil 2-2: Aterosklerozun klinik belirtileri..... 10
Şekil 2-3: Alt ekstremitedeki arterlerde oluşan tıkanma 11
Şekil 2-4: LncRNA'ların belli görevleri..... 14
Şekil 2-5: Aterosklerozda uzun kodlamayan RNA'lar (LncRNA'lar) 20
Şekil 2-6: Genomik konumda PELATON Geni..... 20
Şekil 2-7: qRT-PCR aşamaları.. 23
Şekil 3-1: ELISA DNA/RNA Oksidatif Hasar Standartlarının hazırlanması..... 34
Şekil 3-2: Plate Formatı. 35
Şekil 4-1: Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet dağılımları 37
Şekil 4-2: PAH ve kontrol gruplarında *PELATON* genine ait amplifikasyon eğrileri 38
Şekil 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında *PELATON* genine ait kat değişimi..... 39
Şekil 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında oksidatif DNA/RNA hasar miktarı 40

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2-1: PAH risk faktörleri (50) 11

Tablo 2-2: Periferik Arter Hastalığının Sınıflandırılması 12

Tablo 3-1: RNA izolasyon kiti (PureLink™ RNA Mini Kit, Life Technologies) içeriği ve hazırlanışı 26

Tablo 3-2: Kullanılan Kalıp RNA ve Primer Karışımının İçeriği 30

Tablo 3-3: RT reaksiyonunda kullanılan maddelerin konsantrasyonları 30

Tablo 3-4: Deneyde kullanılan qRT-PCR primer özellikleri 32

Tablo 3-5: PCR Karışımının hazırlanması 32

Tablo 3-6: LightCycler® qRT-PCR Programları 33

Tablo 3-7: LightCycler® qRT-PCR Sıcaklık Döngüleri 33

Tablo 4-1: PAH ve kontrol gruplarının biyokimyasal ve demografik özellikleri açısından karşılaştırılması 37

Tablo 4-2: Hasta ve Kontrol gruplarının *PELATON* gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması 38

Tablo 4-3: Hasta ve kontrol gruplarının DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri açısından karşılaştırılması 39

Tablo 4-4: Hasta ve Kontrol gruplarında *PELATON* ekspresyonunun cinsiyet açısından karşılaştırılması 40

Tablo 4-5: Hasta ve kontrol gruplarında DNA/RNA oksidatif hasar düzeylerinin cinsiyet açısından karşılaştırılması 40

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
µ	: Mikron
p	: Değişken
mL	: Mililitre

Kısaltmalar	Açıklama
ABI	: Ayak Bileği-Brakiyal İndeksi
ACI	: Akut Serebral Enfarktüs
AKS	: Akut Koroner Sendrom
AP	: Alkalin Fosfataz
ApoB	: Apolipoprotein B
BH4	: Tetrahidrobiopterin
BT (CT)	**:** Bilgisayarlı Tomografi
CAPRIE	:İskemik Olay Riski Altındaki Hastalarda Klopidogrel ve Aspirin Karşılaştırması
CI	: Claudicatio Intermittens (Aralıklı Topallama)
CLI	**:** Kritik Uzuv İskemisi
CRP	: C-Reaktif Protein
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
DMPK	: Miyotonik Distrofi Protein Kinaz
EC	: Endotel Hücresi
ELISA	: Enzime Bağlı Immünosorbent Testi
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentez
FFR	: Fraksiyonel Akış Rezervi
FMD	: Akış Aracılı Genişleme
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HOTAIR	: HOX Transkript Antisens RNA
HPR	**:** Yaban turbu Peroksidaz
IFNγ	: İnterferon Gamma

IGF2R : Insülin Benzeri Büyüme Faktörü 2 Reseptörü
IL-1β : Interleukin-1 beta
IL-6 : Interleukin-6
KAH : Koroner Arter Hastalığı
LDL : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LncRNA : Uzun Kodlamayan RNA
MACE : Miyokard Enfarktüsü, İnme ve Kardiyovasküler Ölüm
MI : Miyokard Enfarktüsü
MMP : Matriks Metalloproteinaz
MRI : Manyetik Rezonans Görüntüleme
NF-κB : Nükleer Faktör Kappa B
NLPR3 : Nod-Like Receptor Pyrin Domain-Containing 3
NMD : Anlamsız Aracılı mRNA Bozunması
NO : Nitrik Oksit
NOS : Nitrik Oksit Sentaz
ORF : Açık Okuma Çerçevesi
ox-LDL : LDL'nin okside formu
PAH : Periferik Arter Hastalığı
pCRP : Pentamerik C-Reaktif Protein
PCSK 9 : Proprotein Konvertaz Subtilisin/Keksin Tip 9
PET : Pozitron Emisyon Tomografi
SGLT 2 : Sodyum-Glukoz Kotransporter 2
SMC : Düz Kas Hücresi
SR : Çöpçü Reseptörleri
TASC : Toplumlar Arası Konsensüs
TBI : Ayak Parmağı-Brakiyal İndeksi
TERC : Telomeraz RNA
Th1 : T Yardımcı Hücre 1
TIA : Geçici İskemik Atak
TNF : Tümör Nekroz Faktörü
TNFα : Tümör Nekröz Faktörü Alfa
TP : Ayak Basıncı
VEC : Vasküler Endotel Hücre
VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VLDL : Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

XIST : X İnaktive Spesifik Transkript

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PERİFERİK ARTER HASTALIĞINDA PELATON GENİ İLE RNA HASARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilaver KILIÇ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

Danışman : Doç. Dr. Burcu BAYOĞLU

Ateroskleroz; kronik inflamasyon, oksidatif stres, epigenetik ve metabolik disfonksiyonu içeren immüno-metabolik bir hastalıktır. Periferik arter hastalıkları (PAH), koroner arterler ve aort dışındaki arter hastalıklarını ifade etmektedir. PAH'ın ana nedenleri arasında ateroskleroz, vasküler darlık, inflamasyon ve endotelyal fonksiyon bozukluğu bulunmaktadır. Son yıllarda, uzun kodlanmayan RNA (lncRNA)'ların kardiyovasküler hastalıklardaki rolleri önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda, bir lncRNA olan PELATON ekspresyonunun aterosklerotik plakların nekrotik, inflamatuvar ve makrofajdan zengin bölgelerinde konumlandığı gösterilmiştir. PELATON'un in vitro olarak makrofajlarda yıkımı sonucu, hücrenin fagositoz

gerçekleştirme yeteneğinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Lipoproteinlerin veya eritrositlerin fagositozu, aterom plak ilerlemesinin ayrılmaz bir parçasıdır ve plak instabilitesinin gelişimi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. PELATON gibi fagositozu pozitif olarak düzenleyen bir lncRNA, bu hızı ve plak ilerlemesini azaltmada potansiyel bir hedef olabilir. Çalışmamızın amacı, PAH ve sağlıklı kontrollerde PELATON geninin ekspresyon düzeyini belirlemek ve DNA/RNA'nın oksidatif hasarında rol oynayan belirteçlerden 8-Hidroksi-2′-deoksiguanozin (8-OHdG), 8-hidroksiguanozin (8-OHG) ve 8-hidroksiguaninin plazma düzeylerini tespit etmektedir. Çalışmamızda PAH tanısı alan 100 hasta ve 100 sağlıklı kontrolde gen ekspresyonu düzeyleri Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR), DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Çalışmamızda, lncRNA PELATON ekspresyon düzeyi, PAH grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmedi (p=0.119). 8-OHG, 8-OHdG ve 8-hidroksiguanin düzeyleri iki grup arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmedi (p = 0.31). PAH grubunda PELATON gen ekspresyonu ile CRP (r=0.024, p=0.83), total kolesterol (r=0.014, p=0.91), LDL kolesterol (r=0.117, p=0.36), kreatin kinaz MB (r= 0.273, p=0.391) düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon saptandı, ancak sonuçlarımız istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmadı. Bu durum sınırlı hasta sayısından kaynaklı olabilir. Çalışmamız, PAH hastalarında PELATON ekspresyonunun gerçekleştirildiği ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Sonuç olarak, PELATON ekspresyonunun PAH hasta grubunda yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmaması, PELATON geni ile PAH patogenezi arasında kuvvetli bir ilişki bulunmadığını düşündürmektedir.

Haziran 2024 , 80 sayfa.

Anahtar kelimeler: Periferik arter hastalığı, PELATON, DNA/RNA oksidatif hasarı, 8-OHG, 8-OHdG ve 8-hidroksiguanin

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN PELATON GENE AND RNA DAMAGE IN PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE

Dilaver KILIÇ

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Medical Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Burcu BAYOĞLU

Atherosclerosis is an immuno-metabolic disease involving chronic inflammation, oxidative stress, epigenetic and metabolic dysfunction. Peripheral arterial disease (PAD) refers to diseases of arteries other than coronary arteries and aorta. The main causes of PAD include atherosclerosis, vascular stenosis, inflammation and endothelial dysfunction. Recently, role of long non-coding RNAs (lncRNAs) in cardiovascular diseases has gained importance. Studies have shown that expression of PELATON, an lncRNA, is localized in necrotic, inflammatory and macrophage-rich regions of atherosclerotic plaques. PELATON degradation in macrophages in vitro causes reduced ability of the cell to perform phagocytosis. Phagocytosis of lipoproteins or erythrocytes is an integral part of atheroma plaque progression and is strongly associated with the development of plaque instability. An lncRNA that positively regulates phagocytosis, such as PELATON, may be a potential target in reducing this rate and plaque progression. The aim of our study was to determine the expression level of the PELATON gene in PAD and healthy controls and to determine the plasma levels of 8-Hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OHdG), 8-hydroxyguanosine (8-OHG) and 8-hydroxyguanine, which are

markers involved in oxidative damage of DNA/RNA. In our study, gene expression levels were determined by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) and DNA/RNA oxidative damage levels were determined by ELISA method in 100 patients diagnosed with PAD and 100 healthy controls. In our study, no significant difference was observed in PELATON expression levels between the PAD group and healthy control group (p=0.119). When 8-OHG, 8-OHdG and 8-hydroxyguanine levels were compared between the two groups, no significant difference was detected (p=0.31). There was a positive correlation between PELATON gene expression and CRP (r=0.024, p=0.83), total cholesterol (r=0.014, p=0.91), LDL cholesterol (r=0.117, p=0.36), creatine kinase MB (r=0.273, p=0.391) levels in the PAD group, but our results did not reach statistical significance. This may be due to the limited number of patients. Our study is the first study of PELATON expression in PAD patients. In conclusion, although PELATON expression was found to be high in the PAD patient group, it did not reach statistical significance, suggesting that there is no strong relationship between the PELATON gene and PAH pathogenesis.

June 2024, 81 pages.

Keywords: Peripheral arterial disease, PELATON, DNA/RNA oxidative damage, 8-OHG, 8-OHdG and 8-hydroxyguanine

1. GİRİŞ

Ateroskleroz, lipid ve hücre bakımından zengin plakların orta ve büyük ölçekli arterlerde birikmesiyle oluşan bir hastalıktır. Ateroskleroz, miyokard enfarktüsüne (MI) neden olan koroner arter hastalığı, inmeye neden olan serebrovasküler hastalık ve uzuv kaybına neden olan periferik arter hastalığı gibi çok sayıda kardiyovasküler hastalığın patolojisinin en büyük nedenlerinden biridir. MI ve inme birlikte %31 ölüm oranı ile dünya çapında en yaygın ölüm nedenidir. Endotelden sızan lökositler ile vasküler inflamasyon tetiklenerek plak büyümesi, kalsifikasyonu, instabilite, plak yırtılması veya erozyonu gelişerek, etkilenen arter tamamen veya kısmen tıkanmakta ve klinik belirtilere yol açan katastrofik arteriyel tromboz oluşmaktadır (1). Ateroskleroz, çeşitli moleküler ve hücresel aktivitelerin bozulmasından dolayı meydana gelen kademeli bir yapısal ve fonksiyonel kayıp sonucu oluşan ilerleyici bir hastalıktır. Özellikle endotelyal fonksiyon kaybı aterosklerotik lezyonların gelişimi ile yakından ilişkilendirilmiştir. Ateroskleroz, erken aşamasında monositlerin endotele geçişini artıran vasküler adezyon moleküllerinin ve kemoatraktanların ifadelerinin artmasıyla karakterize edilmiştir. Adezyon gerçekleştikten sonra, monositler damar duvarının intimal tabakasına göç etmekte ve yağlı çizgilerin gelişmesiyle tanımlanan erken aterogenezde önemli bir başlatıcı faktör olan makrofajlara farklılaşmaktadır (2).

Periferik arter hastalığı (PAH), alt ekstremite arterlerinde görülen ateroskleroz kaynaklı daralma veya tıkanıklık olarak tanımlanmaktadır. PAH, yüksek morbidite ve mortalite ile sonuçlanan ve genellikle serebrovasküler hastalık ve koroner arter hastalığı gibi multivasküler hastalıkların bir parçasıdır. PAH görülme oranı 55 yaşında %10 ile %20 arasında değişirken 80 yaşından sonra bu oran %80'e yükselmektedir. Total kolesterol yüksekliği, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol düzeylerinin azalması, plazma lipoprotein (a), apolipoprotein B ve trigliserit düzeyleri aterosklerozun ilerlemesiyle yüksek oranda ilişkilidir. Ayrıca, sistolik hipertansiyon PAH riskini yükselten etkenlerden biridir (3). Aynı zamanda, sigara, kullanımı, diyabet, hipertansiyon, dislipidemi, total kolesterol gibi önemli risk faktörlerinin çoğu PAH ile de ilişkilendirilmiştir. Yüksek görülme oranına rağmen, PAH genellikle ihmal edilmekte ve yetersiz Tanı almaktadır. Yürüme bozukluğu, klasik aralıklı topallama ve kritik uzuv iskemisi gibi klinik belirtileri ve bunlarla ilişkili olumsuz kardiyovasküler olaylar ve uzuv sonuçları

hakkında yeterli farkındalık bulunmamaktadır (4). Başlangıç ateroskleroz lezyonlarının gelişimi, endotel hücrelerinin ve vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC) LDL kolesterolün okside olmuş formuna (ox-LDL) maruz kalmasıyla başlamaktadır. Bu ilk olay, ox-LDL molekülleri oldukça kemo-çekici maddeler olduğundan ve doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık sisteminin farklı hücrelerinin damar duvarına yapışmasını uyardığından dolayı çok sayıda inflamatuvar süreci ateşlemektedir (3).

Oksidatif stres, PAH komplikasyonlarında ve hastalığın ilerlemesinde oldukça kritik öneme sahiptir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi, yürüme mesafesinin azalması ve yaşam kalitesinin düşmesi gibi PAH ile ilişkili patofizyolojik durumlara katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, oksidatif stres endotel fonksiyon bozukluğu ve vasküler inflamasyonun önemli bir belirleyicisi olarak kabul edilmektedir (5). Nükleotid oksidasyonunun meydana gelmesi, uzun vadeli patofizyolojik sonuçlar açısından büyük bir potansiyele sahiptir; çünkü nükleotid mutasyonları, hücrenin ömrü boyunca tekrarlanan çok sayıda proteinin yanlış sentezine neden olabilmektedir. Örneğin, 8-hidroksiguanin (8-OHG), adenin ile hatalı bir şekilde baz çifti oluşturabilmekte ve DNA sentezi sırasında mutasyonlara neden olabilmektedir (6).

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA), 200nt uzunluğunda ve protein kodlamayan bir RNA çeşididir. LncRNA'lar; mRNA, DNA, protein ve miRNA'lar ile etkileşime girerek çeşitli yollarla epigenetik, transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel düzeylerde gen ifadesini düzenlemektedirler. Kromatin yeniden şekillenmesi, transkripsiyonel aktivasyon, transkripsiyonel girişim, RNA işlenmesi ve mRNA çevirisi gibi biyolojik süreçlerde önemli roller oynarlar (7). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile lncRNA'ların aterom plak gelişiminde önemli rollere sahip oldukları gösterilmiştir. Wu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, lncRNA-p21'in VSMC'lerde p53 transkripsiyonel aktivitesini artırarak hücre çoğalmasını baskılayabildiği ve böylece apoptozu uyarabildiği gösterilmiştir (8). Bir başka çalışmada, stabil karotis plakları ile stabil olmayan rüptüre eğilimli karotis plakları lncRNA ekspresyonları açısından karşılaştırıldığında lncRNA PELATON'un (plaque enriched lncRNA in atherosclerotic and inflammatory bowel macrophage regulation) (LINC01272) anlamlı derecede yüksek eksprese olduğu gösterilmiştir. Bunun yanısıra, PELATON ekspresyonunun aterosklerotik plakların nekrotik, inflamatuvar ve makrofajdan zengin bölgelerinde ve hücre nukleusunda konumlandığı gösterilmiştir (9). Lipoproteinlerin veya eritrositlerin fagositozu, aterom plak ilerlemesinin ayrılmaz bir parçasıdır ve plak instabilitesinin gelişimi ile güçlü bir

şekilde ilişkilidir. PELATON'un in vitro olarak makrofajlarda tükenmesi (knock-downu), hücrenin fagositoz gerçekleştirme yeteneğini önemli ölçüde azaltmaktadır (9). Aterom plak oluşumu ve ilerlemesinde fagositozun önemli bir yeri bulunmaktadır. Makrofajlar, apoptotik hücreleri fagosite ederek lezyon boyutunu küçültmekte ve erken plak ortamında faydalı bir etkiye sahip olabilmektedir. Lezyon ilerledikçe, potansiyel olarak yararlı olan ölü hücre uzaklaştırma süreci, eritrositlerin, trombositlerin ve modifiye edilmiş lipoproteinlerin toplanması ile negatif yönde şekillenebilmektedir. Bu nedenle, plak oluşum hızını azaltmak için bu işlemin herhangi bir modülasyonunun sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, PELATON'un kesin etki yöntemini ve bu yolları nasıl etkilediğini anlamak önemlidir. Ölü hücreler ve LDL'nin farklı formları (oxLDL, asetile LDL, kümelenmiş LDL), CD36, CD68, SRA (scavenger receptor class A) ve LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) reseptörleri tarafından tanınmaktadır (9).

Lnc PELATON gibi fagositozu düzenleyen bir lncRNA hedeflenerek plak ilerlemesi engellenebilir. Bundan dolayı PELATON'un makrofaj davranışlarını nasıl düzenlediğini anlamak bu noktada oldukça önem kazanmaktadır. PELATON'un susturulmasıyla yapılan çalışmalarda, CD36 mRNA düzeylerinin azalması, PELATON'un makrofaj fonksiyonunda anahtar reseptörleri düzenleyebileceğini göstermiştir. PELATON, vasküler hücre tipleri arasında yüksek oranda monosit ve makrofaj spesifiktir ve hücresel konumda neredeyse tamamen çekirdekte konumlanmaktadır (9).

Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, periferik arter hastalarında ve sağlıklı kontrollerde lncRNA PELATON geninin ekspresyon düzeylerinin qRT-PCR yöntemi ile belirlenmesi ve RNA'nın oksidatif hasarında bir belirteç olan 8-hidroksiguanozin (8-OHG)'in plazma düzeylerinin ELISA yöntemi ile tepit edilmesi planlanmıştır. Bu tez çalışmasında PAH olgularında, PELATON geninin hastalık gelişimindeki rolünün aydınlatılması ve RNA'nın oksidatif hasarındaki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Araştırmamızın sonucu elde ettiğimiz verilerin PAH oluşumuna neden olabilecek RNA temelli biyobelirteçlerin tanımlanmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. ATEROSKLEROZ

Ateroskleroz, çoğu kardiyovasküler hastalığın altında yatan önemli bir hastalıktır ve dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (10). İnsan sağlığı üzerinde oldukça zararlı etkileri olan ateroskleroz, özellikle yaşlılar arasında görülen kronik bir hastalıktır. Ateroskleroz, iskemik kalp hastalığı ve inme gibi kardiyovasküler hastalıkların en önemli nedenlerinden biri olup kompleks ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Lipid birikimi, büyük ve orta ölçekli arterlerin duvarlarında düşük dereceli inflamasyon ve endotel fonksiyon bozukluğu gibi karakteristik özellikler gösteren ilerleyici bir patolojiye sahiptir. Aterosklerozun ilerlemesindeki en önemli iki faktör kolesterol birikimi ve kronik inflamasyondur. Ek olarak, aterosklerozda makrofajlar ve kolesterol arasında önemli bir bağlantı bulunmaktadır (11).

Lipoprotein partikülleri, proteinler, fosfolipitler, trigliserit ve kolesterolden oluşmaktadır. En önemli aterojenik lipoproteinlerden biri, kolesterol bakımından zengin olan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesteroldür. LDL kolesterol, endotele sızma ya da proteoglikan gibi ekstraselüler matriks bileşenlerine bağlanma yeteneklerinden dolayı vasküler intimada birikebilmektedir (12), özellikle okside formu (ox-LDL), endotel hücre fonksiyon bozukluğu, monosit kaynaklı makrofajların uyarılması ve kronik inflamasyonun artışına neden olarak aterosklerozun başlatılmasında ve gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır (13).

Aterosklerotik plakların daha ileri dönemdeki erozyonu ya da yırtılması, hayati olabilecek trombotik olayları tetiklemektedir. Yapılan araştırmalar, aterosklerozun arter duvarında lipid birikimi ve kronik inflamasyon olmak üzere karışık bir patogeneze sahip olduğunu göstermiştir. Klasik olarak ateroskleroz, bozulan lipid metabolizması ve hiperkolesterolemi ile ilişkilidir. Modifiye LDL kolesterol sirkülasyonu, kardiyovasküler hastalıkların risk faktörleri arasında bulunmaktadır. Hastalık patogenezi, lipid metabolizmasındaki değişimlerin yanısıra kompleks moleküler süreçleri de içermektedir (14).

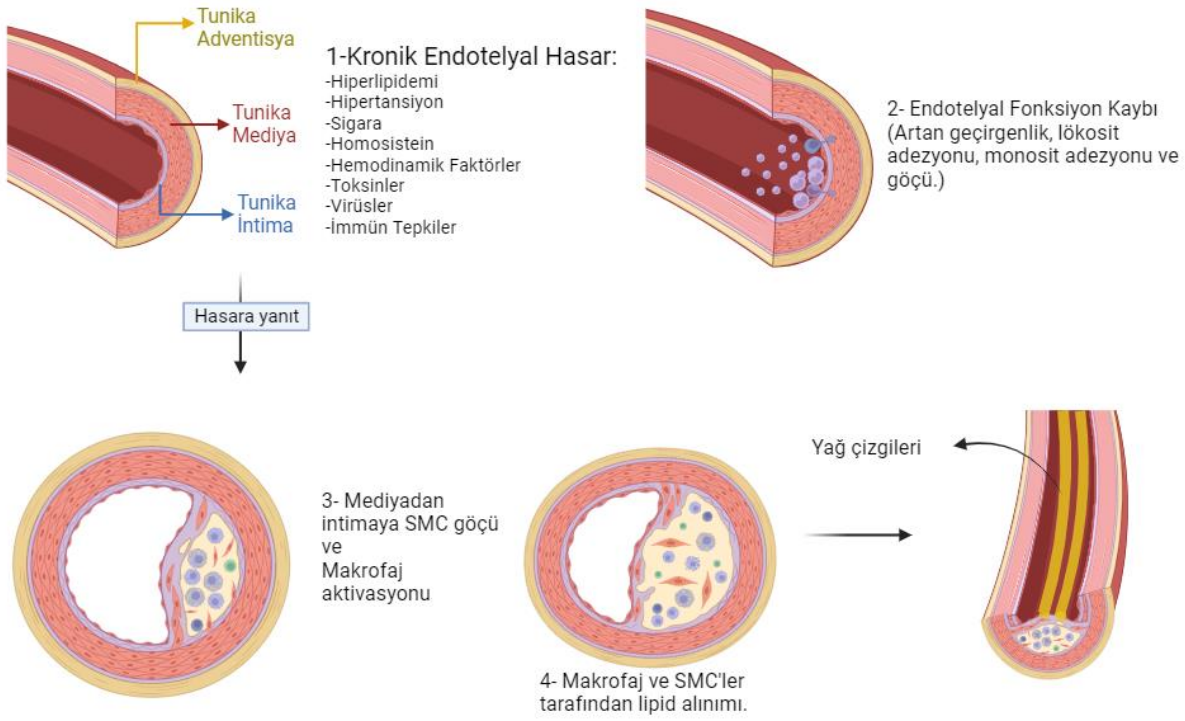
2.1.1. Aterosklerozun Patogenezi ve İlerlemesi

Ateroskleroz gelişimine neden olan olaylar dizisi, arter kıvrımlarının veya çatallanma bölgelerinin yakınında meydana gelen kan akışı türbülansının neden olduğu endotelyal

fonksiyon bozukluğu sonucu başladığını düşündürmektedir. Kan damarı endoteli, sonradan dolaşımdaki bağışıklık hücrelerinin toplanmasına neden olan aktivasyon ile mekanik strese cevap oluşturmaktadır. Dolaşımdaki monositler arter duvarında hasarlı alana bağlanarak içeriye geçerek makrofajlara farklılaşmaktadır. Makrofajlar da fagositoz ile lipid alımına katılmakta ve aterosklerotik plak içinde bulunan köpük hücrelerine dönüşmektedir (15).

Aterosklerozdaki lezyonlar, küçük kolesterol moleküllerinin intima ve onun altındaki düz kas tabakasında birikimi, düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve fibröz matriks ile birlikte yavaş yavaş büyüyerek oluşmaya başlamaktadır. Fibroblastlar tarafından lezyon içinde bağ doku üretimi ve kalsiyum birikmesi arter sertleşmesine yol açmaktadır. Sonuç olarak, arterlerin düzensiz yüzeyi, pıhtı oluşmasına ve tromboza neden olmaktadır. Bu da kan akışının aniden kesilmesine öncülük etmektedir. Aterosklerotik sürecin tüm aşamalarında inflamasyon önemli bir rol aldığı için, ateroskleroz genellikle kronik inflamatuar bir hastalık olarak düşünülmektedir (16,17).

Aterom plak oluşumunun başlangıç aşamasında, genellikle plakların damarın zıt yönüne doğru büyüdüğü görülmektedir. Aterosklerotik damarlar enine büyüme gösterme eğilimindedirler. Oluşmaya başlayan bir plak, damarın iç elastik tabakasının %40'tan fazlasını kapladığı zaman, arter kanalının tıkandığı kabul edilmektedir. Plak oluşumunun son aşamalarında ise kan akışı büyük oranda engellenmiş olmaktadır. Yapılan çalışmalar aterosklerozun, monositler, düz kas hücresi (SMC) ve lenfositler dahil bazı hücresel yanıtların ve intima hasarının bir sonucu olarak oluştuğunu göstermektedir. İlk yumuşak lezyon, köpük hücreleri, hücre dışı yağ birikintileri ve küçük bir trombosit grubundan oluşmaktadır. Sürecin ilerlemesi boyunca, SMC çoğalmakta ve son adımlarda plak içine kanamayı yoğunlaştırmaktadır (Şekil 2-1) (17,18).



Şekil 2-1: Yağlı çizgiler oluşumunun aşamaları

Lezyon bölgesinde lipoproteinlerin birikmesi, ateroskleroz oluşumundaki ilk aşamadır. Normal koşullarda plazma LDL konsantrasyonu ile arter duvarlarının hücre içindeki LDL kolesterol konsantrasyonu arasında bir denge bulunmaktadır. Plazma lipidlerindeki artışla birlikte yüksek LDL kolesterol afinitesine sahip ekstraselüler proteoglikanlar nedeniyle bu partiküllerin çoğu intimada birikmeye başlamaktadır. İntima içinde LDL kolesterolün birikmesi aynı zamanda LDL kolesterolün lezyon içinde daha uzun süre kalmasına ve böylece oksidasyona neden olmaktadır (17). Sitokinler ve okside lipidler, endotel hücrelerinin aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Aterosklerozun erken aşamalarında, monositler ve T lenfositler vasküler intimaya sızmaktadır. Monosit-makrofaj dönüşümü, okside LDL (ox-LDL) kolesterol gibi okside olmuş lipidleri almasını sağlayarak köpük hücrelerinin oluşmasına neden olmaktadır. Ox-LDL, T hücre aktivasyonunda önemli bir rol oynamakta ve T hücreleri için bir antijen olarak çalışmaktadır (19,20).

Aterosklerozun başlangıç aşamaları boyunca, mononükleer lökositler, monositler ve T hücreleri vasküler duvar aracılığıyla bozulmamış endotele girmektedir. Bu işlem, transkripsiyonun NF-κB faktörü tarafından gerçekleştirildiği lökosit ve kemokin adezyon moleküllerinin ekspresyonuna ihtiyaç duymaktadır. Lökosit adezyon molekülleri,

aterosklerozun birincil aşamalarında bulunmaktadır. Endotel hücreleri, lökositler üzerinde adezyon molekülleri üretmek için önemli kaynaklardır. Adezyon moleküllerinin reseptörleri, spesifik lökositler, SMC ya da vasküler endotel hücreleri üzerinde ifade edilmektedir. Adezyon moleküllerinin uyarıcı moleküllerin veya kemokinlerin üretiminde ve salınmasında önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (21). Çalışmalar, aterosklerozun ilk aşamalarında inhibitör monosit kemokin proteininin (MCP 1) önemli ölçüde makrofajlar tarafından ve daha az miktarda SMC ve endotel tarafından eksprese edildiğini göstermiştir. Bu artış, yükselen diyet kolesterolünden kaynaklanmakta ve monositlerin vasküler duvarlara doğru hareket etmesine ve lezyona sızmasına neden olmaktadır. MCP-1 aterosklerozun tüm aşamalarında ifade edilmektedir (22). Mononükleer fagositler, intimaya geçtikten sonra makrofajlara farklılaşmaktadır. Fagositler, hücre dışı ortamdan lipidleri fagositoz ile uzaklaştırarak aterosklerozu önleyebilmektedir. Fagositoz ile lipid biriktirmiş bazı makrofajlar, arter duvarını terk ederek lipidleri arterden bu şekilde uzaklaştırabilmektedir. Eğer arter duvarına giren lipid miktarı çıkan lipid miktarından daha fazla olursa bu durum lipid birikimine yol açmakta ve sonuç olarak ateroskleroz gelişimi olasılığı artmaktadır. Makrofajlar, köpük hücrelerine dönüştürülecek olan çöpçü reseptörleri tarafından OxLDL kolesterolün alımını ve birikimini gerçekleştirir. Bu çöpçü reseptörlerin ekspresyonu, monositlerin sitokinler ve oksitlenmiş lipidler tarafından makrofajlara farklılaşması sırasında artmaktadır. Ekspresyonları makrofaj koloni uyarıcı faktör tarafından da kolaylaştırılmaktadır (23).

Makrofajların çöpçü reseptörlerine emilimine neden olan yüzey Ox-LDL ligandı, Ox-LDL kolesterolün yapısındaki fosfolipitler olup, bunlar ikinci konumda oksitlenmekte ve ApoB'nin lizin kalıntılarına saldırabilen aldehitler oluşturmaktadır. Bu sarı köpük hücrelerinin arter duvarlarında birikmesi, yağ çizgilerinin oluşmasına öncülük etmektedir (24–26). Bazı köpük hücreleri, intimal lezyon gelişmesinde apoptoz aracılığıyla ölmektedir. Bu apoptoz, daha gelişmiş aterosklerotik plağın merkezinde lipitten zengin nekroz edici bir çekirdek oluşturmaktadır. Monositler köpük hücreleri üretmenin yanı sıra tümör nekroz faktörü (TNF), büyüme faktörü, pıhtılaşma öncesi maddeler (doku faktörleri dahil) ve serbest radikaller gibi sitotoksik maddeler üretebilir. Bu maddeler, daha fazla endotel hasarına ek olarak daha fazla LDL kolesterol oksidasyonu ve böylece daha fazla metabolik değişimlere neden olabilmektedir (24).

Aterosklerotik plaklar oluştuktan sonra, lipid ve lipid dolu hücrelerin birikmesi sonucu sürekli olarak ilerlemeye devam etmektedir. Uzun yıllar boyunca çoğu araştırmacı kan

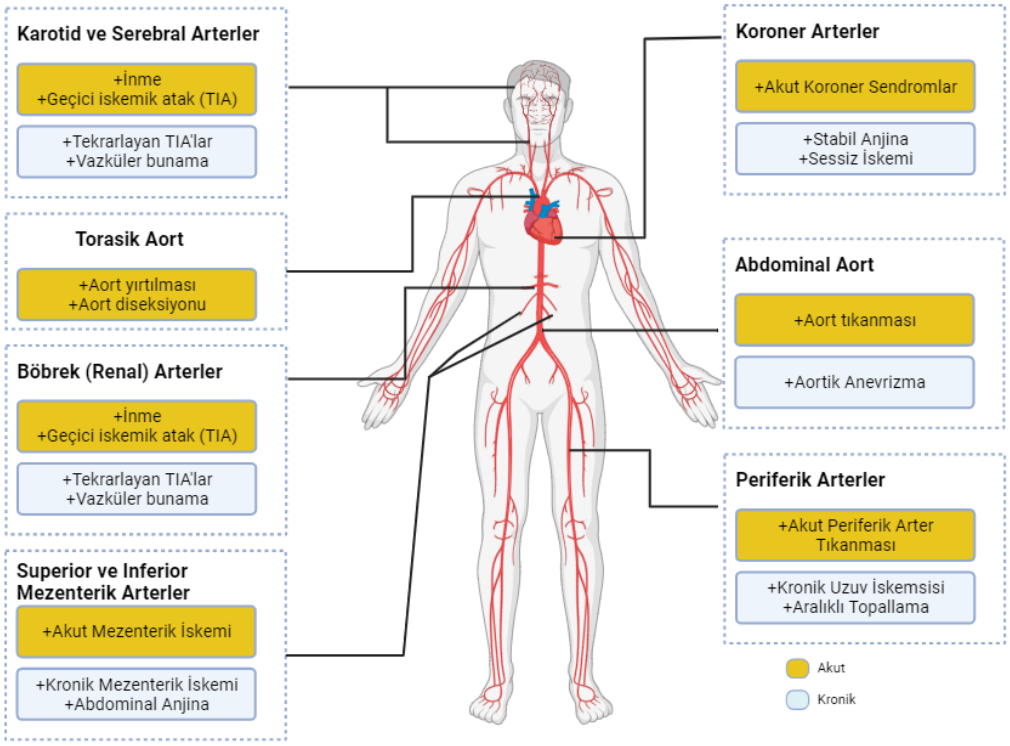
monositlerinden türeyen makrofajları ateromlardaki lipid yüklü köpük hücrelerinin öncüleri olarak kabul etmiştir. Son deneysel veriler, düz kas hücrelerinin metaplazisinin de makrofajlara benzeyen köpük hücrelerine yol açabileceğini göstermektedir. İnsan intiması, özellikle ateromaların gelişmeye eğimli olduğu bölgelerde yerleşik düz kas hücreleri içermektedir. Medyadan intimaya doğru gerçekleşen düz kas hücresi göçü, büyüyen aterosklerotik plakta düz kas hücrelerinin birikmesine neden olmaktadır. Bu hücreler yıllarca çoğalabilmekte ve yerleşik bir aterosklerotik plağın büyük bir kısmını oluşturan ekstraselüler matriks makromoleküllerinin artmasına neden olmaktadır. Bu makromoleküller (interstisyel kolajen ve elastinin yanı sıra proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar) intimal tabakanın kalınlaşmasına katkıda bulunmaktadır (27). Bununla birlikte, IFNγ gibi T hücre aracıları SMC'nin interstisyel kolajen sentezleme kabiliyetini bozabilmekte ve böylece bu hücrelerin nekrotik çekirdeği örten fibröz başlığı onarma ve koruma kabiliyetini azaltabilmektedir. Ayrıca, aktive olmuş makrofajlar, fibröz başlığa güç veren interstisyel kolajeni bozan matriks metalloproteinaz (MMP) ailesi enzimlerinin üretiminde artış göstermektedir. Fibröz kapağın incelmesi ve yapısal olarak zayıflaması plağın yırtılmaya yatkınlığını artırmaktadır. Gelişen lezyondaki SMC'ler ve makrofajlar bölünebilmektedir. SMC'ler ve mononükleer fagositler de bir metaplazi süreci yoluyla birbirlerinin yerine geçebilmektedir. Lezyon ilerledikçe, SMC'ler ve makrofajlar apoptoz da dahil olmak üzere hücre ölümüne uğrayabilmektedir. Ölü ve ölmekte olan hücrelerden gelen döküntüler birikerek ateromun nekrotik, lipitten zengin çekirdeğini oluşturmaktadır. Bozulmuş efferositoz (ölü hücrelerin temizlenmesi) nekrotik çekirdeğin oluşumuna katkıda bulunabilmektedir (28).

İlerlemeleri sırasında birçok aterosklerotik plakta kalsifikasyon bölgeleri gelişmektedir. Pasif bir dejeneratif süreçten ziyade, ateromlarda kalsiyum minerali birikimi, birikimin düzensizliği ve bozulmuş klirens (Birim zamanda temizlenen plazma hacmi) nedeniyle ortaya çıkmaktadır (29). Aterosklerotik plaklardaki mineralizasyon sürecinin çoğu, kemik oluşumundaki biyolojik süreçleri tekrarlar. Mikroskobik veya noktasal kalsifikasyon, plakların mekanik dengesizliği ile ilişkilidir, yırtılma ve trombozu tetikleme eğilimini artırabilir. Daha büyük kalsiyum birikimleri, trombotik bir olayı tetikleme olasılığının daha düşük olmasıyla ilişkilendirilebilir. $Na^{18}F$ ile PET görüntüleme, insan aterosklerotik plaklarındaki kalsifikasyona bir pencere açabilir ve insan aterosklerozunda kalsifikasyonun patofizyolojisine yönelik araştırmalar için yeni bir araç sağlamayı vaat etmektedir (30–32).

Aterosklerotik plakların yırtılması, miyokard enfarktüsüne neden olan koroner arterlerin akut trombozunun en yaygın tetikleyicisidir. Yırtılmış olan aterosklerotik plaklar genellikle ince bir fibröz kapakla (<60μm) kaplı büyük lipid çekirdeklerine sahiptir. Bu özelliklere sahip lezyonlar genellikle 'savunmasız plaklar' olarak adlandırılmaktadır (33,34). Buna karşın, sınırlı lipid birikimine ve daha kalın fibröz kapağa sahip plaklar genellikle 'stabil plaklar' olarak adlandırılmaktadır. Bu sınıflandırma, aterosklerotik plak destabilizasyonu mekanizmalarının karmaşıklığını önemli ölçüde basitleştirmektedir (35,36), aynı zamanda akut koroner sendromların patofizyolojisine ilişkin birçok düşünce için de bir çerçeve sağlamaktadır. Bir aterosklerotik plağın yırtılması ile plak içindeki içerik kana karışmaktadır. Plağın merkezinde bulunan trombojenik materyal, özellikle makrofajlar ve düz kas hücreleri tarafından üretilen doku faktörü, aterosklerozun en tehlikeli komplikasyonu olan trombozu tetikleyebilmektedir (28). Lüminal endotelin lokal olarak bozulmuş homeostatik fonksiyonuyla birlikte, kalıcı ve tıkayıcı trombüsler akut koroner sendromlar ve inme gibi iskemik olaylara neden olabilmektedir. Tromboz oluşumu ayrıca alt ekstremitelerde kritik iskemiye katkıda bulunabilir ve periferik arter hastalığını karmaşık hale getirebilir. Aterosklerotik plakları karmaşık hale getiren arteriyel tromboz, fibrinojenden trombin aracılı fibrin oluşumundan kaynaklanmaktadır (37). Lipid düşürücü tedavi, hipertansiyon ve sigara bırakma tedavisi gibi etkili anti-aterosklerotik tedaviler, aterosklerozun trombotik komplikasyonlarının substratını değiştirmiştir. Aterosklerotik plaklar böylece daha az iltihaplı, lipid yüklü ve daha lifli yapıya gelmiştir. Bundan dolayı plak yırtılmasına olan yatkınlığı daha azdır (35,38). Bu koşullar altında, ateromun trombotik komplikasyonlarının bir diğer mekanizması, akut koroner sendromlarının artan oranından sorumlu olabilir. Plak erozyonu adı verilen bu alternatif trombotik mekanizma, tipik yırtılmış plaktan oldukça farklı bir morfolojiye sahip lezyonlardan ortaya çıkıyor gibi görünmektedir. Erozyonla karmaşık olan lezyonlar ince, gevrek bir fibröz başlık olmaksızın zengin bir ekstraselüler matrikse, az sayıda inflamatuvar lökositte ve az miktarda lipide sahip olma eğilimindedir (39).

2.1.2. Ateroskleroz Risk Faktörleri

Aterosklerozun nedenleri ve risk faktörleri arasında LDL kolesterol yüksekliği, HDL kolesterol düşüklüğü, hipertansiyon, sigara, diabetes mellitus, obezite, inaktive hayat tarzı gibi nedenler bulunmaktadır. Bu nedenler, kontrol edilebilir nedenler arasında bulunmaktadır. Genetik yatkınlık, yaş gibi faktörler kontrol edilemeyen nedenler arasında bulunmaktadır (26,40,41).

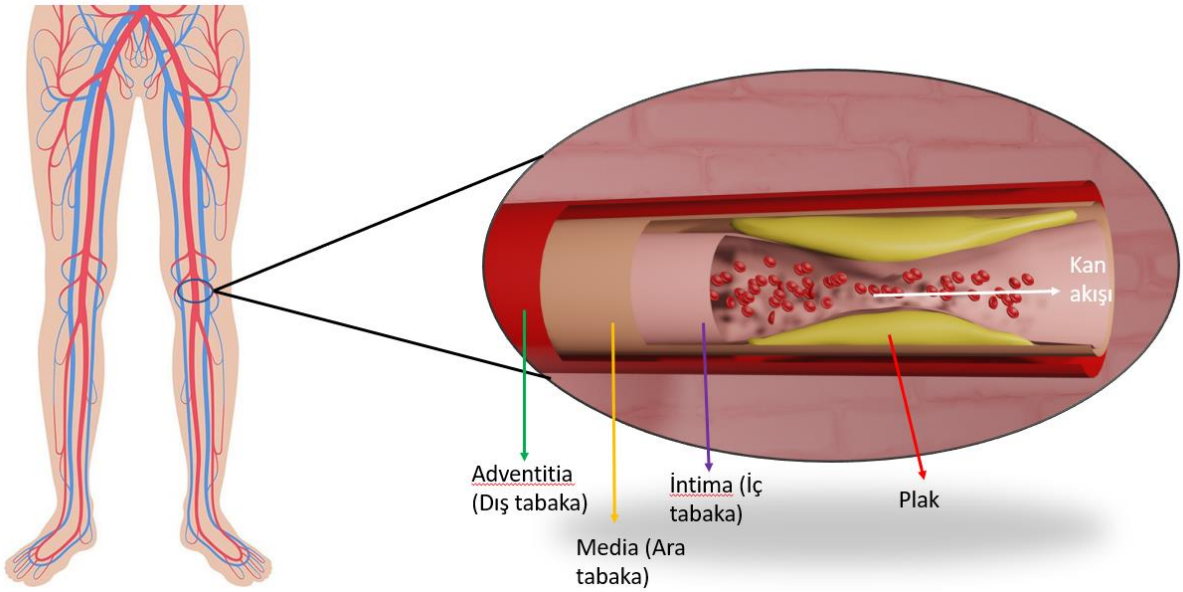


Şekil 2-2: Aterosklerozun klinik belirtileri (54)

2.2. PERİFERİK ARTER HASTALIĞI

Periferik arter hastalığı (PAH), periferik vaskülatürün kronik, aterosklerotik bir hastalığıdır ve aralıklı topallama, iskemik istirahat ağrısı, iskemik ülser, kangren ve fonksiyonel bozukluk gibi uzuvla ilişkili komplikasyonlara neden olmaktadır. Ampütasyon gerektiren işlev bozuklukları 1 yılda ≤%50 mortalite taşımaktadır (42). Uzuv komplikasyonlarının kendileri zararlı olsa da PAH genellikle serebral ve koroner vaskülatür de dahil olmak üzere başka yerlerdeki obstrüktif aterosklerotik hastalığın habercisidir. PAH hastalarında iskemik inme, MI ve kardiyovasküler ölüm oranı artmaktadır (43–45). Bir diğer önemli nokta ise PAH, hayat kalitesi ve finansal açıdan hastalar için oldukça büyük bir yüktür (46). PAH, dünya çapında 220 milyon insanın etkilenmesi ve yüksek görülme sıklığından dolayı nispeten yaygın bir hastalıktır (47). PAH, kalbi veya beyni besleyen büyük veya orta büyüklükteki arterlerden ziyade alt ekstremitedeki arterlerde oluşan tıkanmalar ile karakterize ilerleyici bir hastalıktır (Şekil 2.3). PAH, alt ekstremiteleri üst ekstremite damarlarından daha sık etkilemekte ve alt ekstremite

PAH'ın en tanınmış semptomatik alt kümesi olan claudicatio intermittens (aralıklı topallama) olarak bilinen tekrarlayan yorgunluk, kramp hissi veya ağrıya yol açabilmektedir (48). PAH, fonksiyonel kapasitede azalma ve kardiyovasküler morbidite ve mortalite riskinde artış ile ilişkilidir. Yaygın prevalansına, mortalite ve morbidite ile ilişkisine ve yaşam kalitesini düşürmesine rağmen, PAH genel olarak yetersiz tanı ve tedavi görmeye devam etmektedir (49–51).



Şekil 2-3: Alt ekstremitedeki arterlerde oluşan tıkanma

Tablo 2-1: PAH risk faktörleri (50)

PAH riski yaşla birlikte önemli ölçüde artar.
PAH hastalarının >%50'si asemptomatiktir.
PAH varlığı kalp yetmezliği prevalansında 2 kat artış ile ilişkilidir.
PAH'lı bireylerin %20-30'unda diabetes mellitus vardır.
Diyabetik hastalarda PAH, KAH ve iskemik inme gelişme riski 2-4 kat daha fazladır.
Sigara içenlerde PAH gelişme riski 2,5 kat daha fazladır.
Ateroskleroz, PAH vakalarının %90'ından fazlasını oluşturur.
Semptomatik PAH hastalarının %80-90'ında femoral ve popliteal arterler etkilenir.
PAH hastalarında amputasyon prevalansı %3-4'tür

Yaşam tarzını sınırlayan topallama semptomlarına neden olmanın yanı sıra, kontrol altına alınmayan hastalık kritik uzuv iskemisine (CLI) ilerleyebilmektedir. PAH spektrumu içinde CLI, PAH'ın son aşamasını temsil etmekte ve tanı, hasta mortalitesiyle birlikte yüksek oranda uzuv kaybına işaret etmektedir. Aterosklerotik PAH nedeniyle bacak amputasyonu, yaklaşık %30 akut mortalite oranına ve %30'dan daha az 5 yıllık sağkalım oranına yol açmaktadır (52,53). Yönetim ikileminin yanı sıra, PAH prevalansı da dramatik bir şekilde

artmaktadır. Sağlık hizmetlerinin artan maliyeti göz önüne alındığında, PAH ve CLI'nin ekonomik ve toplumsal yükünün ilerleyen zamanlarda daha fazla artacağı düşünülmektedir (54).

2.2.1. PAH Epidemiyolojisi ve Sınıflandırması

PAH, dünya çapında 230 milyondan fazla insanı etkileyen, kardiyovasküler ölümün ve sağkalımın önemli bir nedeni olarak ilgi gören bir hastalıktır. İleri yaş, sigara ve diyabet gibi genel olarak kabul gören kardiyovasküler risk faktörleri, PAH oluşma riskinin artmasıyla da yakından ilişkilidir. Tarihsel olarak bakıldığı zaman PAH, koroner arter hastalığı ve inme kadar ilgi görmemiştir. Son yıllarda PAH'ın ilgi çekmesiyle birlikte yapılan çalışmalar tromboz, inflamasyon, dislipidemi ve mikrovasküler hastalık alanında epidemiyolojik olarak yeni gelişmelerin olmasına aracılık etmiştir (55).

Yapılan bir çalışmada, Türkiye'de PAH görülme sıklığının, 50-69 yaş aralığında %20, 70 ve üzeri yaş grubunda ise %30 olduğu bildirilmiştir (56). CLI prevalansı yaklaşık %1,3'tür. Erkeklerin PAH görlme sıklığı kadınlardan daha fazladır ve prevalans yaşa bağlıdır, 70 yaş ve üstü yetişkinlerin yaklaşık %20'si PAH tanısı almaktadır (57). Yıllık PAH insidansı yaklaşık %2,4 olarak bildirilirken CLI %0,4 olarak bildirilmektedir. PAH'ın klinik sunumu, semptom olmamasından aralıklı topallama (IC), atipik bacak ağrısı, istirahat ağrısı, iskemik ülserler veya kangrene kadar farklı şekillerde olabilmektedir. PAH ilk olarak geniş bir şekilde asemptomatik PAH ve semptomatik PAH olarak sınıflandırılır. Semptomatik PAH grubu içinde hastalar ayrıca IC ve CLI olarak ikiye ayrılmaktadır. Hastalığın prognozu ve doğal seyri asemptomatik PAH, IC ve CLI hastaları arasında farklıdır, bu nedenle bu hastaların uzun vadeli yönetimi açısından ayrım önemlidir (52,53).

Tablo 2-2: Periferik Arter Hastalığının Sınıflandırılması: Fontaine ve Rutherford-Becker (58)

Fontaine	**Rutherford-Becker Sınıf kategori**		**Tanım**	**Ayak Bileği-Brakiyal İndeksi (ABI)/Ayak Basıncı (TP)**
Aşama I	0	0	Asemptomatik	ABI > 0.95
Aşama IIa	I	1	Hafif topallama	ABI > 0.80
Aşama IIb	I	2/3	Orta-şiddetli topallama	ABI > 0.40
III	II	4	iskemik dinlenme ağrısı	ABI < 0.40
IV	III	5/6	Doku kaybı (minör [5] /majör [6])	TP < 30 mm Hg

PAH seviyesini belirlemek için en yaygın kullanılan sınıflandırma şemaları Fontaine ve Rutherford-Becker derecelendirme sistemleridir (Tablo 2.3) ve bunlardan ikincisi en yaygın olanıdır. Rutherford sınıf I, asemptomatik hastaları veya yüksek düzeyde aktivite sırasında semptomları olan hastaları ifade eder. Rutherford sınıf II hastalarında semptomlar, orta düzeyde aktivitede gelişir. Rutherford sınıf III hastalarında düşük aktivite düzeyinde semptomlar gelişir ve yaşam tarzları kısıtlanır. Aynı zamanda bu hastalarda sakatlayıcı klodikasyon görülebilir. CLI'nın klinik semptomları, 2 haftadan uzun süre devam eden ve Rutherford sınıf IV'e giren, istirahat halinde inatçı ayak ve ayak bileği ağrısı olarak tanımlanan "istirahat ağrısı" ile başlar. Rutherford sınıf V hastalarda iskemik doku kaybı görülür ve genellikle ayak ülserleri şeklinde ortaya çıkar. Rutherford sınıf VI hastalarında doku nekrozu ve kangren görülür. CLI, her zaman bu sınıflandırma sistemlerinin çeşitli aşamalarında ilerlemez ve bazı hastalarda CLI başlangıcından önce PAH semptomları bile olmayabilir (58).

Hastalığın varlığını doğrulamak için basit, ofis tabanlı bir ayak bileği-brakiyal sistolik basınç indeksi (ABI) muayenesi kullanılmaktadır. İstirahat ABI değerinin <0,9 olması anormal kabul edilir ve PAH'nın objektif tanımıdır. ABI değeri 0,7-0,9 arasında olan hastalar hafif PAH'lı olarak sınıflandırılır. ABI değeri 0,4-0,69 aralığında olan hastalar orta şiddette hastalığa, 0,4'ün altında olan hastalar ise şiddetli PAH'a sahip olarak değerlendirilir (53,59,60). Hastalar asemptomatikse sigarayı bırakma, obezite, kan şekeri kontrolü ve egzersiz gibi yaşam tarzı ile ilgili risk faktörlerinin değiştirilmesi önerilmektedir. Asemptomatik PAH prevalansı öncelikle noninvaziv bir yöntem olan ABI testi ile tarama yapılarak incelenmektedir. Semptomatik-asemptomatik PAH oranı 1:3 ila 1:4 arasında değişmektedir (61).

2.2.2. PAH Tedavisi

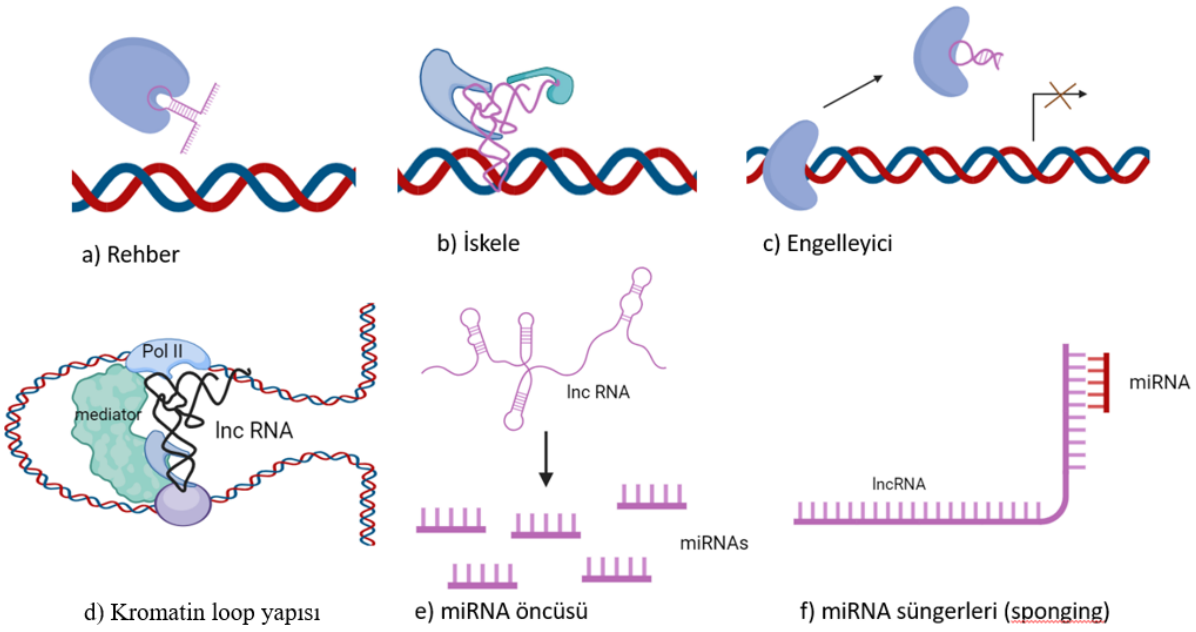
PAH ile ilişkili olumsuz kardiyovasküler rahatsızlıkların oranlarını azaltmayı amaçlayan tedavi seçenekleri arasında günlük egzersizin teşvik edilmesi, aterojenik olmayan bir diyetin benimsenmesi, hipertansiyon, sigara, dislipidemi ve diyabet dahil olmak üzere aterosklerotik risk faktörlerinin değiştirilmesi veya ortadan kaldırılması yer almaktadır. Kan basıncı, plazma glukozu ve LDL kolesterol (<100 mg/dl, çok yüksek riskli hastalarda <70 mg/dl) hedef düzeylerine ulaşılamadığında farmakoterapi gereklidir (48).

Antiagregan tedavi (aspirin 75-162 mg/gün veya klopidogrel 75 mg/gün) diyabetli ve aterosklerotik kardiyovasküler hastalık öyküsü olan hastalarda ikincil korunma stratejisi olarak önerilmektedir (50,51).

2.3. UZUN KODLANMAYAN RNA'LAR

Genomik dizi, çeşitli protein kodlayan RNA'lara ve kodlamayan RNA'lara (ncRNA'lar) dönüştürüldüğünden, tüm organizmaların transkripsiyonel görünüşü oldukça karmaşık bir yapıdadır (62,63). Hem genomun hem de transkriptomun bu karmaşık ve geniş görünümünde, genetik elementler kataloğumuz artık belirgin bir şekilde protein kodlama rolü olmayan uzun RNA transkriptlerinin sınıflandırılmış bir grubuyla doludur (64,65). LncRNA'lar hayatın her dalında bulunur ve organizmanın karmaşıklığı, protein kodlayan genlerinkinden çok kodlayıcı olmayan RNA ifade repertuarlarının çeşitliliği ve boyutuyla daha yakın ilişkilidir (66)

200 nt'den uzun olan lncRNA'lar genomik lokusların baskılanması, kromozom konformasyonunun şekillendirilmesi ve enzimatik aktivitenin allosterik olarak düzenlenmesi gibi çok sayıda önemli biyolojik olayda rol oynamaktadır (67,68)(Şekil 2.4). LncRNA genlerinin aşırı ekspresyonu, eksikliği veya mutasyonu, çok sayıda hastalığa neden olmaktadır (69).



Şekil 2-4: LncRNA'ların belli görevleri

X inaktive spesifik transkript (*XIST*; kromozom inaktivasyonu), *HOX* transkript antisens RNA (*HOTAIR*; konumsal kimlik) ve telomeraz RNA bileşeni (*TERC*; telomer uzaması) gibi bazı lncRNA'ların fonksiyonel rolleri ve mekanizmaları iyi bir şekilde anlaşılmıştır. İskeleler,

tuzaklar veya sinyaller olarak hareket eden ve genomik hedefleme, cis veya trans düzenleme ve antisens girişim yoluyla hareket edebilen lncRNA'lar da dahil olmak üzere işlevsel mekanizmaları çeşitlidir (Şekil 2.4) (70,71).

Birçok durumda lncRNA'lar ve mRNA'lar, biyogenezleri ve formları açısından çok benzerlik göstermektedirler. Bu kategorik benzerliğe rağmen, bireysel lncRNA'ları veya lncRNA gruplarını mRNA'lardan ayırmayı sağlayan birçok özellik bulunmaktadır. Ayrıca çok sayıda lncRNA'da bulunan cis-düzenleyici kapasite, güçlü bir şekilde çevrilmiş açık okuma çerçevelerinin (ORF) olmaması, özel 3′-terminal işleme, nükleik asit polimerizasyonu veya montajının kalıplanması gibi özellikler mRNA'larda bulunmamaktadır (72)

Fare beyninde yapılan öncü lncRNA ekspresyon çalışmaları, spesifik dokularda, hücre tiplerinde ve hücre altı bölmelerde kesin ekspresyon modellerini ortaya çıkarmıştır (73). Ayrıca, lncRNA ifade kalıpları genellikle hem cis hem de trans mRNA ifade kalıplarıyla ilişkilidir, bu da bazı lncRNA'ların ifade ağlarında birlikte düzenlenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu özgüllük, lncRNA ifadesinin protein kodlayan genlerinkinden bile daha sıkı bir şekilde düzenlendiğinin kanıtı olarak kullanılmış ve böylece lncRNA'ların hücre durumunu belirlemedeki temel rolü savunulmuştur (74).

Kromatin durumu açısından bakıldığında, lncRNA'ların protein kodlayan genlerle benzerlikler gösterdiği görülmektedir (65). Yani, ifade edilen lncRNA promotörleri, protein kodlayan genlerdeki promotörlere benzer şekilde zenginleştirilmiş aktif histon modifikasyonları (örneğin, H3K4me3, H3K9ac ve H3K27ac) göstermektedir. Bundan dolayı histon modifikasyon modelleri lncRNA'ları tanımlamak için kullanılabilmektedir (65,74). Bununla birlikte, son çalışmalar bazı transkripsiyon faktörlerinin ve kromatin yeniden modelleme enzimlerinin lncRNA ifadesini düzenlediğini ortaya koymuştur (72).

Mayadaki genetik RNA interference taramasından, mekanik olarak farklı dört kromatin yeniden modelleme kompleksi (Swr1, Isw2, Rsc ve Ino80), ncRNA transkripsiyonunun, özellikle de protein kodlayan genlerle örtüşen lncRNA'ların genel baskılayıcıları olarak tanımlanmıştır. Bu komplekslerin bozulması, antisens lncRNA'ların baskılanmasını azaltabilmekte ve üst üste binen mRNA düzeylerinde belirgin bir düşüşe neden olabilmektedir (75).

Olgun formlarına ulaşmak için, yeni oluşan RNA transkriptleri 5′-şapka ekleme, splicing, poliadenilasyon ve kimyasal baz modifikasyonu gibi kapsamlı ko-transkripsiyonel ve post transkripsiyonel işlenme olaylarından geçmektedir. Bir RNA'nın yaşamındaki bu etkilenebilir dönemde, bazı lncRNA'larda, onları diğer transkriptlerden ayıran alternatif işlenme biçimleri görülmektedir (76,77).

Çoğu lncRNA'nın çok iyi tanımlanmış hücre altı lokalizasyonları bulunmaktadır; (*XIST* (etkin olmayan X üzerinde), Gomafu (*MIAT* olarak da bilinir; alt nükleer alanlar), BORG (çekirdeğe sınırlı), ve *GAS5* (sitoplazmaya gönderilir) (72). mRNA'lar ile kıyaslandığında lncRNA'lar, daha çok çekirdek içinde bulunmaktadırlar ve çekirdek içinde de kromatin fraksiyonu üzerinde konumlanmaktadırlar (65). Bu durum lncRNA'ların epigenetik düzenlemede görev aldıkları görüşünü desteklemektedir (78,79). LncRNA'lar, mRNA'lara kıyasla daha çok nükleer lokalizasyon modeline sahip olsalar da transkript numarasına göre sitoplazmada çekirdekte olduğundan daha fazla lncRNA mevcuttur (71). RNA'ların ribozoma bağlı sitozolik, serbest sitozolik ve nükleer havuzlara ayrılarak yapılan bir sekanslama çalışmasında, lncRNA'ların her hücre altı bölümde bulunduğu ancak özellikle sitoplazmada çekirdeğe kıyasla daha yoğun olduğu tespit edilmiştir (80).

Farelerde 800 lncRNA'nın geniş bir araştırması, ortalama olarak lncRNA'ların yarı ömürlerinin mRNA'larınkinden biraz daha kısa olmasına rağmen, lncRNA'ların ve mRNA'ların karşılaştırılabilir stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir; stabilitedeki bu eğilim, lncRNA'lar ve mRNA'lar arasındaki genel benzerliği daha da vurgulamaktadır. Klasik anlamsız aracılı bozunma (NMD) dahil olmak üzere çeşitli bozunma mekanizmaları, lncRNA'ların mRNA'lardan farklı şekilde etkilendiğini göstermektedir (81).

Bazı genler epigenetik olarak baskılanmıştır, yani karşılıklı olarak birbirini dışlayan, ebeveyn kökenli, alele özgü bir modelle ifade edilmektedirler (örneğin, anneden kalıtılan alel ifade edilirken babadan alınan alel bastırılmaktadır) (82). Baskılanmış gen kümelerinin zengin kodlamayan transkripsiyon bölgeleri olduğu uzun zamandır bilinmektedir. İmprinted gen *H19,* tanımlanan ilk lncRNA lokuslarındandır (83). İmprinted lncRNA-mRNA gen kümelerinin başlıca örneği, baba tarafından ifade edilen lncRNA *Air*'dir. Air, farelerde ve diğer memelilerde baskılanmış, maternal olarak ifade edilen protein kodlayan genler (*Igf2r, Slc22a2* ve *Slc22a3*) kümesinde insülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptör (*Igf2r*) genine antisens olarak kodlanmaktadır. *Air* promotörü, maternal allel üzerinde hipermetile olan bir CpG adasında

bulunmaktadır. Hipermetilasyon, *Air*'in maternal lokustan transkripsiyonunu baskılamakta, böylece yan protein kodlayan genlerin ekspresyonuna izin vermektedir. Tersine, paternal alel metillenmez, öyle ki *Air* baba tarafından kopyalanır ve böylece imprinted lokusu susturmaktadır (84).

Doz telafisi- yani, cinsiyet kromozomu çapında düzenleme- aynı nükleer bağlamdaki iki allelin farklı şekilde düzenlenmesi gerektiğinden, imprinting ile bazı olgusal ortaklıkları da paylaşmaktadır. Doz telafisinde, cinsiyet kromozomlarından gen ekspresyonu, bir lncRNA'ya bağlı epigenetik süreç tarafından modüle edilmektedir; örneğin, dişi eutherian memelilerde (XX), iki X kromozomundan biri *XIST* lncRNA tarafından epigenetik olarak susturulmakta ve böylece çıktıları erkeklerdeki tek X'inkiyle (XY) eşitlenmektedir (85).

Antisens lncRNA'lar protein kodlayan bir genle örtüştüğünde, antisens transkripsiyon, cis'te doğrudan Polimeraz II transkripsiyonel müdahale yoluyla protein kodlayan genin sens transkripsiyonuna müdahale edebilmektedir (86). Cis-düzenleyici antisens lncRNA'lar, yaygın bir şekilde bulunmaktadırlar ve çok farklı şekilde hareket edebilirler. Örneğin, *Air* antisens lncRNA, transkripsiyonel makinenin *Igf2r* promotörüne alınmasına müdahale ederek örtüşen sens geni *Igf2r*'yi susturmaktadır. Bu bastırma biçiminin, sens ve antisens yönlerde transkripsiyon yapan Polimeraz II kompleksleri birbiriyle çarpıştığında meydana geldiği düşünülmektedir (87).

Biyolojik sistemler, kararlı bir şekilde iki fazlı durumlar üretmek için bir strateji olarak genellikle "kapalı" ve "açık" olacak şekilde oto regülasyon kullanmaktadır. Pek çok protein kodlayan genin sıklıkla kendi transkripsiyonunu düzenleyen proteinler üretmesi gibi, oto regülasyonun da lncRNA'lar tarafından kullanılan bir düzenleyici mekanizma olduğu gösterilmiştir. Bazı durumlarda, *FMR1* (frajil X mental retardasyon 1), DHFR ve DMPK örneklerinde olduğu gibi, bozulmuş oto regülasyon döngüleri patolojik durumlara yol açabilmektedir; bunlar kendi lokuslarını baskılayan, ayrılabilir kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan rollere (iki işlevli RNA'lar) sahip RNA'lardır (88). *FMR1*, normal bilişsel gelişim için gerekli olan bir proteini kodlasa da *FMR1* transkripti, kodlama rolünden tamamen ayrılabilen, dikkat çekici derecede lncRNA benzeri bir süreçle meşgul olmaktadır. FMR1 RNA'sının RNA saflaştırması (ChIRP) ile kromatin izolasyonu kullanılarak, yeni oluşan *FMR1* mRNA'sının promotöründeki önemli bir CGG trinükleotid tekrarında bir RNA-DNA dubleksi oluşturduğu ve böylece kendi lokusunun epigenetik susturulmasını sağladığı keşfedilmiştir (89).

Proteinlerin biyokimyasal rolleri, diğer herhangi bir biyomolekül tarafından çeşitlilik açısından rakipsizdir. Bununla birlikte, bir protein tarafından basitçe yerine getirilemeyecek bazı işlevler bulunmaktadır (veya en azından, henüz böyle bir protein keşfedilmemiştir). Bu tür bir örnek olan TERC, telomerleri uzatmak için TERT (telomeraz ters transkriptaz) enzimi tarafından gerçekleştirilen RNA'ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesi (ters transkripsiyon) için bir şablon görevi görmektedir. Böylece DNA replikasyonu sonucunda oluşan kromozom uçlarının kısalmasıyla mücadele etmektedir (90).

Uzun kodlamayan RNA'ların, karsiyojenez ve kronik hastalıklar gibi birçok biyolojik ve patolojik süreçlere katıldığı yapılan çalışmalar sonucu gösterilmiştir (91,92). LncRNA'lar, çok farklı sinyal yolaklarına katılarak transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede epigenetik olarak gen ekspresyonunu düzenleyebilmektedir (68). Son dönemde yapılan çalışmalar, lncRNA'ların ateroskleroz düzenlenmesinde çok önemli olduğunu göstermiştir. Wu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada lncRNA p21'in ApoE-/- farelerde vasküler düz kas hücrelerinde *p53* transkripsiyonel aktivitesini yükselterek hücre çoğalmasını baskılayabildiği ve apoptozu uyarabildiği gösterilmiştir (93). Yapılan bir diğer çalışmada da lncRNA SMILR'in vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmasını düzenleyebildiği ve stabil olmayan aterosklerotik plaklarda yüksek seviyelerde eksprese edildiği bulunmuştur (94). Huang ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, lncRNA HOXC-AS1'in aterosklerozda ekspresyonunun azaldığını ve bunun HOXC6 ekspresyonunu teşvik ederek THP-1 makrofajlarında ox-LDL kaynaklı kolesterol birikimini baskılayabildiğini bildirmiştir. Bu sonuç, lncRNA HOXC-AS1'in ateroskleroz tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmüştür (95).

PAH ve CLI, diyabetik koşullar altında yüksek oranda bozulmuş anjiyojenik yanıtlarla tanımlanmaktadır. Anjiyogenezi iyileştirmek amacıyla PAH için birçok büyüme faktörü tedavisi denenmiştir, ancak hiçbiri, muhtemelen "anjiyojenik direnç" teriminin ortaya çıkmasına neden olan kusurlu aşağı akış sinyal yollarından dolayı klinik çalışmalarda başarılı olarak sonuçlanmamıştır (96–100). PAH hastaları VEGF ve anjiyopoietin-2 gibi proanjiyogenik sinyal yolu ligandlarını daha yüksek ekspresyonunu sergilemektedir, ancak iskemiden dolayı bozulmuş anjiyojenik tepkileri sürdürmektedir (96).

LncRNA'lar gen ekspresyonu, protein döngüsü ve protein fonksiyonu için önemli düzenleyiciler olarak tanımlanmaktadır. MALAT-1, MEG3 ve ANRIL dahil birkaç lncRNA, anjiyogenezin önemli düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır. Çekirdekteki lncRNA'ların cis ve trans eylemi için RNA eklemeyi, protein yapı iskelesini ve enhansır-benzeri fonksiyonları

etkileyen paradigmalar mevcuttur. Anjiyogenez üzerinde lncRNA etkisinin giderek artmasına rağmen, lncRNA'ların bu bağlamda vasküler yaşlanmadaki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir (101).

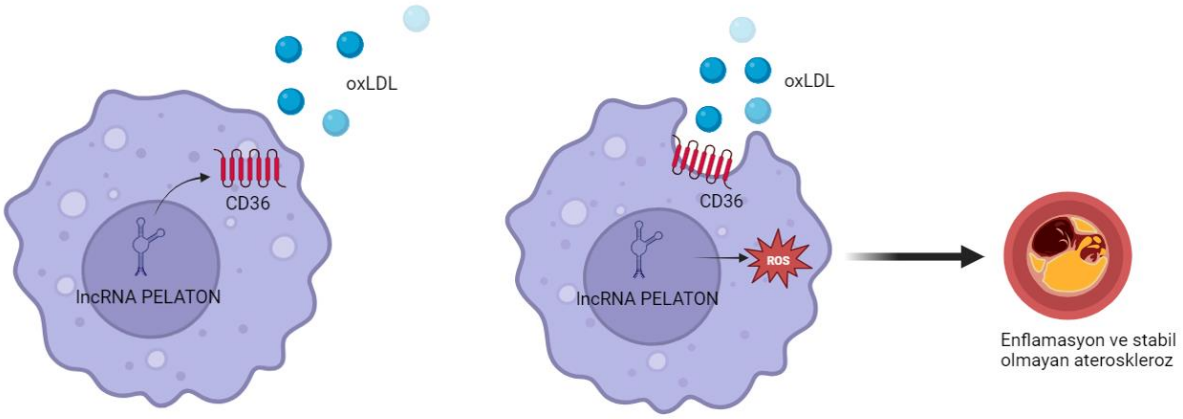
Bozulmuş anjiyogenez, PAH için bir belirteçtir. Çeşitli lncRNA'ların hipoksiye, yüksek glukoz koşullarına, laminer olmayan akışa ve EC farklılaşmasına yanıt olarak endotel hücrelerinde (EC'ler) düzensiz olduğu tespit edilmiştir. LncRNA'lar ayrıca VEGF'ye yanıt veren mikroRNA'ların ekspresyonunu baskılamayı, siklinleri ve hücre döngüsü ilerlemesini düzenlemeyi, kromatin yeniden modellemesini etkilemeyi ve proanjiyojenik mRNA seviyelerini modüle etmeyi içeren mekanizmalarla anjiyogenezde önemli roller oynamaktadır. David A. Gross ve ekibi yakın zamanda *SNHG12*'yi vasküler yaşlanmanın önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlamıştır (101). *SNHG12* ekspresyonunun azalması ile, *p21* ve *p16* ekspresyonunun artışı, DNA hasarı belirteci γH2AX'in artışına ve fenotip yaşlanmasına yol açtığı gösterilmiştir (102).

2.4. LNC RNA-PELATON

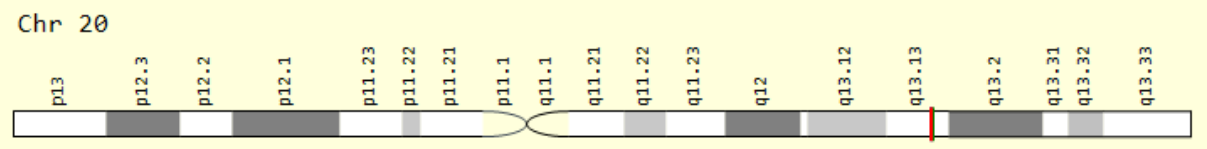
Son yıllarda, lncRNA'ların kardiyovasküler hastalıklardaki rolleri önem kazanmıştır. Bir çalışmada, stabil karotis plakları ile stabil olmayan rüptüre eğilimli karotis plakları lncRNA ekspresyonları açsından karşılaştırıldığında lncRNA PELATON'un (plaque enriched lncRNA in atherosclerotic and inflammatory bowel macrophage regulation) (LINC01272) rüptüre eğilimli karotis plaklarında stabil plaklara kıyasla anlamlı derecede yüksek eksprese olduğu bildirilmiştir (103). Bunun yanısıra, PELATON ekspresyonunun aterosklerotik plakların nekrotik, inflamatuvar ve makrofajdan zengin bölgelerinde ve hücre nukleusunda konumlandığı gösterilmiştir. Nukleusta eksprese olan ve monosit, makrofaj spesifik lncRNA PELATON'un aterosklerotik plaklarda makrofaj düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmiştir. Kromozom 20q13.13 bölgesinde lokalize olan PELATON, 539 nt uzunluğunda olup 3 ekzon bölgesi içermektedir (9) (Şekil 2-6). Daha önceki çalışmalarda, RP11-290F20.3, LINC01272, GCRL1 (mide kanseri ile ilişkili lncRNA 1) ve SMIM-25 (küçük zar integral proteini 25) olarak da bilinmektedir (104). Hung ve ark. PELATON'un monosit-makrofaj hücre hatlarında spesifik olarak ifade edildiğini ve endotel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde veya fibroblastlarda tespit edilemediğini bildirmiştir (9). LncRNA PELATON, makrofajların fagositik kapasitesini ve makrofaj zarında CD36 ifadesini artırarak reaktif oksijen türlerinin üretimini artırabilmektedir (Şekil 2.5) (9) ancak bu mekanizmanın daha fazla araştırılması gerekmektedir. Büyük bir

makrofaj köpük hücresi birikimine sahip kronik bir hastalık olarak ateroskleroz, akut koroner sendrom hastalıklarının (AKS) ana kaynağıdır. Aterosklerozun oluşum mekanizması incelendiğinde, köpük hücrelerine dönüşen makrofajların çok büyük etkisi olduğu görülmektedir. Bundan dolayı lncRNA PELATON, ateroskleroz için önemli bir faktör olmaktadır.

Hung ve ark. yaptıkları çalışma ile PELATON'un yakındaki genleri düzenlemek için cis'te hareket etmediğini ve lncRNA'larla ilişkili yaygın olarak bulunan bir mikropeptit-2 işlevini kodlamadığını göstermiştir. Ayrıca PELATON'un devre dışı bırakılmasının işlevsel olarak etkisini yüksek içerikli bir görüntüleme platformu kullanarak, makrofaj davranışını sistematik olarak incelemişledir. Bu incelemenin sonucunda, modifiye lipoproteinlerin ve apoptotik hücrelerin makrofaj fagositik alımının büyük ölçüde bozulduğu gösterilmiştir (9). PELATON, ANRIL, SENCR ve MALAT1 de dahil olmak üzere aterosklerozda rol oynadığı bilinen diğer lncRNA'ların arasına katılmaktadır (103).



Şekil 2-5: Aterosklerozda uzun kodlamayan RNA'lar (LncRNA'lar). PELATON lncRNA, CD36'nın ekspresyonunu, lipoproteinlerin alımını ve reaktif oksijen türlerinin üretimini teşvik ederek kararsız aterosklerotik plakta inflamasyona katkıda bulunur



Şekil 2-6: Genomik konumda PELATON Geni (https://cdn.genecards.org/genomic-location-v5-17/PELATON-gene.png)

2.5. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ENDOTEL HASARI İLE İLİŞKİSİ

Endotel, damar sisteminin yüzeyini kaplayan tek bir epitel tabakasıdır ve kan ile damar duvarı arasında damar içi homeostazın korunmasında önemli bir rol oynayan fiziksel bir bariyeri temsil etmektedir. Bununla birlikte, endotel fonksiyon bozukluğu veya endotel hücre ölümü, ateroskleroz, hipertansiyon, koroner aterosklerotik kalp hastalığı, iskemik inme gibi çeşitli hastalıkların ilerlemesiyle yakından ilişkili olan vasküler bariyer bozulmasına, vazokonstriksiyona ve diyastolik fonksiyon bozukluğuna, vasküler düz kas hücresi proliferasyonu ve göçüne, inflamatuar yanıtlara ve tromboza neden olabilmektedir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) çok fazla üretilmesi oksidatif strese neden olmaktadır. Bu da endotel hücre ölümünün en önemli nedenlerinden biridir. Yapılan çalışmalar, ROS'un piroptoz, parthanatos ve ferroptoz dahil olmak üzere çeşitli şekillerde endotel hücre ölümünü tetikleyebileceğini göstermektedir. Endotel hücrelerindeki (EC) ROS, temel olarak mitokondri, NADPH oksidaz (NOXs), eNOS ayrışması ve ksantin oksidazdan (XO) türetilmektedir (105).

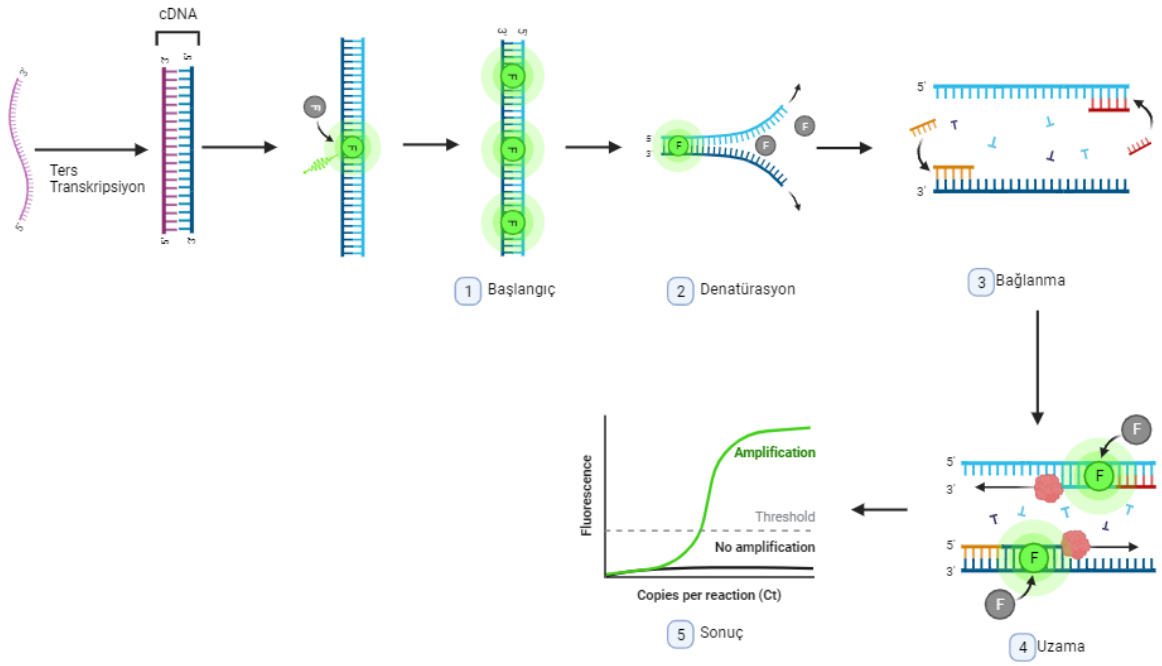
Hücre içi ROS esas olarak süperoksit anyonları ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerinden (OH•) oluşmaktadır. O_2 bir elektron yakalayarak $O_2^{\bullet -}$ oluşturur ve bu da diğer ROS'ların oluşmasına yol açmaktadır. $O_2^{\bullet -}$ kısa yarılanma ömrü nedeniyle sulu çözeltilerde kararsızdır; bu nedenle, hücre içi $O_2^{\bullet -}$ hızla temizlenmektedir veya diğer ROS formlarına dönüştürülmektedir (106). Hiperlipidemi, hiperglisemi, nikotin ve hipertansiyon, EC'de NO sentezinin bozulmasına, proinflamatuar sitokinlerin ve hücreler arası adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artmasına ve EC ölümüne neden olan ortak patojenik faktörlerdir. ROS, bu patolojik aktivitelerin oluşmasında görülen ortak mekanizma olabilmektedir (105). ROS, eNOS ayrılma mekanizması yoluyla NO sentezinde bozulmaya neden olarak vazomotor disfonksiyona yol açabilir (107). ROS, endotel hücrelerinde IL1b, IL-18, ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi monosit-endotel adezyonuna katılan, vasküler geçirgenliği artıran ve makrofaj farklılaşmasına katılan pro-inflamatuar ve hücre içi adezyon faktörlerinin ifadesini yükseltmektedir (108).

RNA'nın transkripsiyon sonrası modifikasyonları, çeşitli biyolojik düzenleme süreçlerinde hayati roller oynamaktadır ve son yıllarda bu alanda oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Şu ana kadar RNA'da 160'tan fazla farklı tipte modifikasyon keşfedilmiştir ve RNA'nın fonksiyonları bu modifikasyonlara göre gerçekleşmektedir (109). RNA moleküllerine saldıran reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif RNA hasarı, en yaygın modifikasyonlardan biridir. Bu lezyonlar arasında 8-hidroksiguanozin (8-OHG) baskın

oksidatif üründür (110). Yapılan çalışmalarla 8-OHG düzeyinin yaşlanma, tip 2 diyabet, kalp-damar hastalıkları ve kanserle de ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle 8-OHG, yalnızca endojen oksidatif RNA hasarının bir göstergesi değil aynı zamanda hastalıkların erken tespiti için de faydalıdır (111).

2.6. GERÇEK ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (qRT-PCR)

qRT-PCR, DNA amplifikasyon süreci gerçekleşirken sürekli olarak izlenmesini sağlamakta ve floresan raportör boyalar kullanılarak amplifikasyon ve tespit adımlarını birleştirmektedir. Bu yöntem, her PCR döngüsü sırasında üretilen DNA miktarına karşılık gelen floresan sinyalindeki artışın ölçülmesine dayanmaktadır. Tek bir PCR reaksiyonu, floresanın ilk olarak eşik (threshold) arka plan seviyelerinin üzerine çıktığı PCR döngüsü ile karakterize edilmektedir (eşik döngüsü, Ct). Dolayısıyla, bir hedef genin mesajcı RNA (mRNA) konsantrasyonu ne kadar yüksekse, Ct değeri o kadar düşük olur. qRT-PCR süreci, RNA'nın cDNA'ya ters transkriptaz tabanlı dönüşümü, cDNA'nın PCR ile amplifikasyonu ve amplikon olarak adlandırılan amplifiye ürünlerin tespiti ve kantifikasyonu olmak üzere üç temel adımdan oluşmaktadır. Sonuçlar şablon RNA'nın miktarına ve kalitesine bağlı olduğundan tutarlılıkla ilgili çeşitli endişeler mevcuttur. Tutarsızlıkları en aza indirmek ve tekrarlanabilirliği en üst düzeye çıkarmak için qRT-PCR testinin her bir bileşeninin kalite kontrolünün yapılması tavsiye edilmektedir. İyi tasarlanmış gene özgü primerler, ekspresyonun başarılı bir şekilde analiz edilmesi için gereklidir. SYBR®Green kullanılarak yapılan qRT-PCR için primerlerin tasarımı 30-80 G/C içeriği, 50 ila 150 baz arasında amplikon uzunluğu, Tm 58-60 °C, minimum 18 baz uzunluğu, 3′-kararsızlık (son 3′-baz içinde maksimum 2 (Gs/Cs)) gibi önemli parametreleri karşılamalıdır. Primerler, Applied Biosystems'den Primer Express 2.0 veya Primer 3 (The Whitehead Institute, http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) gibi mevcut birçok araçtan biri kullanılarak tasarlanabilir. En önemlisi, kontamine edici genomik DNA'nın amplifikasyonunu önlemek için ileri ve geri primerler bir intron/ekzon sınırını kapsamalıdır (112).



Şekil 2-7: qRT-PCR aşamaları. qRT-PCR, PCR süreci boyunca veri toplama tekniğidir, böylece amplifikasyon ve tespiti tek bir adımda birleştirir. Bu, üretilen PCR ürünü sayısıyla doğru orantılı olarak artan floresan sinyali veren floresan boyaların kullanılmasıdır. Gerçek zamanlı PCR'da kullanılan floresan raportörler arasında çift sarmallı DNA (dsDNA) bağlayıcı boyalar veya amplifikasyon sırasında PCR ürünü ile hibridize olan PCR primerlerine veya problarına bağlı boya molekülleri bulunur. Bu değer genellikle floresan yoğunluğunun arka plan floresanından daha fazla olduğu zaman olan döngü eşiği (cycle threshold) (Ct) olarak adlandırılır. Örnekteki hedef DNA miktarı arttıkça, floresan sinyallerinde daha önce önemli bir artış olacak ve daha düşük bir Ct elde edilecektir.

2.7. ELISA (Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi)

Enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), en yaygın olarak 96 oyuklu veya 384 oyuklu polistiren plakalar olmak üzere katı bir yüzeye immobilize edilmiş bir antijeni tespit edebilen enzim etiketli antikora dayanan bir tekniktir. Bu yüksek verimli analiz, bağlanmamış materyallerin aşama aşama yıkanmasına dayanmaktadır ve antijene bağlı enzim etiketli antikorun saptanmasına olanak tanımaktadır. En yaygın kullanılan enzimler alkalin fosfataz (AP) ve yaban turbu peroksidazdır (HRP). HRP genellikle daha düşük tespit limiti nedeniyle tercih edilmektedir. Tüm immünoassaylerde olduğu gibi ELISA'da da anahtar nokta antikordur. Antikor bağlılığı ve aviditesi testin hassasiyetini ve spesifikliğini belirlemektedir. Antikor, bir ELISA testinde çeşitli şekillerde kullanılabilmektedir. Doğrudan ELISA olarak bilinen bir form olan plate-immobilize antijeni tespit etmek için doğrudan bir enzime konjuge edilebilmektedir.

Alternatif olarak, dolaylı ELISA olarak da bilinen antijene bağlı birincil antikorun sinyalini yükseltmek için ikincil bir antikor kullanılabilmektedir. Üçüncü bir yöntem, solüsyondaki bir antijeni yakalamak için antikoru bir plaka üzerinde immobilize etmek ve ardından aynı antijenin farklı bir epitopunu tanıyan başka bir enzimle konjuge edilmiş antikorla tespit yapmaktır. Sandviç ELISA olarak da bilinen bu yöntem, karmaşık bir numunede belirli bir antijenin saptanmasında en yüksek hassasiyeti sağlamaktadır. Rekabetçi ELISA olarak da bilinen dördüncü formatta, plakaya immobilize edilmiş antijenlerle etkileşime girmek için sıvı fazda antikor-antijen ve serbest antikor karışımı kullanılmaktadır (113).

3. YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

Periferik arter hastaları (PAH), Şubat 2023-Ekim 2023 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Ana Bilim Dalı'nda revaskülarizasyon operasyonu geçiren hastalar arasından seçildi. ABI, BT Anjiografi, MR Anjiografi fizik muayene, Dubleks Doppler US ve DSA kullanılarak PAH tanısı konuldu. Çalışmamıza dahil edilmek üzere PAH tanısı almış 100 hasta ve kontrol grubu olarak Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'ne rutin analizler için başvuran (kalp hastalığı, diyabeti ve hipertansiyonu olmadığı tespit edilen) 100 sağlıklı kişi seçildi. Alınan periferik kan örneklerinden gen ifadesi deneyi gerçekleştirildi.

Çalışmaya dahil edilen tüm hasta ve kontroller farklı bölgelerden gelmekte ve bireyler arasında akrabalık derecesi bulunmamaktadır. Çalışmaya dahil edilen kişilere çalışmanın amacı belirtilerek yazılı izinleri alınmıştır. Deneysel çalışmalar, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D. laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol gruplarının venöz kan örneklerinden biyokimyasal parametreler (total-kolesterol, HDL, LDL, trigliserid, açlık kan glukoz düzeyi, hematokrit, üre, kreatinin, ALT, AST) Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda ölçüldü.

Kullanılan Kimyasallar:

Etanol, Merck

İzopropanol, Merck

NaCl, Sigma

KCl, Sigma

Na2HPO4, Merck

KH2PO4, Merck

Ficoll 1077, Sigma

B-Merkaptoetanol, Gibco

Proteinaz K, Roche

MgCl2, Roche

LightCycler®

SyberGreen® Master, Roche

Revers Transkriptaz Reaksiyon Tamponu, Roche

Koruyucu RNaz İnhibitörü, Roche

Deoksinükleotid Karışımı, Roche

DTT, Roche

Revers Transkriptaz Enzimi, Roche

Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar:

Lenfosit İzolasyonu ve RNA Eldesinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler:

Fosfat Tuz Tamponu (PBS) (pH: 7,2-7,4)

NaCl 8 g

KCl 0.2 g

Na_2HPO_4 1.44 g

KH_2PO_4 0.24 g

Distile su 1000 ml

Tablo 3-1: RNA izolasyon kiti (PureLink™ RNA Mini Kit, Life Technologies) içeriği ve hazırlanışı

İÇERİK	HAZIRLANIŞI	SAKLAMA KOŞULLARI	KULLANIM AMACI
LİZİS TAMPONU	%1 oranında 2-merkaptoetanol eklenir, karıştırılır.	+15°C-+25°C arası saklanır.	Hücre zarının parçalanması amacıyla kullanılmaktadır.
YIKAMA TAMPONU II	60 ml absolü etanol eklenir, karıştırılır.	+15°C-+25°C arası saklanır.	Hücre parçalarının uzaklaştırılmasında kullanılır.

RNA izolasyon kitinde kullanılan tampon ve çözeltiler

Lizis Tamponu (%1 oranında 2-merkaptoetanol ile)

Yıkama Tamponu I

Yıkama Tamponu II

RNaz içermeyen su

Kullanılan Cihazlar

Çalkalamalı Su Banyosu, Kottermann

Çeker Ocak, Termal

Hassas Terazi, CHYO

Mikropipetler, Socorex

Manyetik karıştırıcı, Ühromag

Vorteks, Velp

Santrifüj, Hettich

Soğutmalı Santrifüj, Hettich

Nanodrop, Thermo Scientific

Ph Metre, WTW

Buzdolabı ve Derin Dondurucu (+4 ºC ve -20 ºC), Arçelik

Ultra Derin Dondurucu (-80 ºC), New Brunswick Scientific, Sanyo

Etüv, Memmert

Otoklav, Hirayama

Termal Döngü Cihazı, Applied Biosystems

LightCycler® 1.5, Roche

Saf su cihazı, Millipore Elix 3

3.3. YÖNTEMLER

3.3.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen periferik kan örnekleri 10 ml'lik heparinli steril tüplere alınarak aşağıda gösterilen protokole uygun şekilde lenfosit izolasyonu gerçekleştirildi.

1. Heparinli tüplere alınan periferik kan örnekleri 1:1 oranında PBS ile sulandırıldı.

2. 15 ml'lik falkon tüplere 3 ml Ficoll 1077 eklendi.

3. PBS ile sulandırılan kan Ficoll 1077 üzerine eklendi.

4. Tüpler 35 dk. 1600 rpm'de santrifüj edildi.

5. Santrifüj sonunda elde edilen lenfosit fraksiyonu yeni bir falkon tüpe alındı.

6. Üzerine 1:1 oranında PBS eklendi.

7. Tüpler 12 dk. 1600 rpm'de santrifüj edildi.

8. Süpernatant atıldı, RNA izolasyonu yapılana kadar pellette bulunan lenfosit

fraksiyonu -80°C'de saklandı.

3.3.2. Lenfosit Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

Heparinli kan örneklerinden lenfositler izole edildikten sonra, lenfositler buz üzerinde lizis tamponu uygulanarak homojenize edildi. Total RNA, aşağıda verilen protokol izlenerek ticari bir RNA izolasyon kiti (PureLink^{TM} RNA Mini Kit, Life Technologies) kullanılarak gerçekleştirildi.

1. Donmuş hücre pelleti üzerine 0.6 mL lizis buffer (%1 merkaptoetanollu) eklenerek vorteks ile hücre pelleti çözdürüldü.

2. Çözdürülen pellet 20 dakika oda sıcaklığında bekletilerek hücreler homojenize edildi.

3. Her bir hücre homojenatına 1:1 oranında %70'lik etanol eklenerek vortex ile karıştırıldı.

4. Toplama tüpü içine yerleştirilmiş filtre tüpüne 700 µl örnek aktarıldı.

5. Örnekler 12,000 x g, 15 saniye, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve filtre tüpü aynı toplama tüpüne yerleştirildi.

6. Tüm örnekler kullanılana kadar 4 ve 5. adımlar tekrarlandı.

7. 700 µl yıkama tamponu I filtre tüpüne eklendi. Örnekler 12,000 x g, 15 saniye, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü içindeki sıvıyla birlikte atıldı. Filtre tüpü yeni toplama tüpüne yerleştirildi.

8. 500 µl yıkama tamponu II (etanol eklenmiş) filtre tüpüne eklendi. Örnekler 12,000 x g, 15 saniye, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve filtre tüpü aynı toplama tüpüne yerleştirildi.

9. 8.adım tekrarlandı.

10. RNA bağlanmış membranın kuruması için tüpler 12,000 x g, 2 dakika, oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Toplama tüpü, içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı ve filtre tüpü 1,5 ml'lik steril eppendorf tüp içerisine yerleştirildi.

11. 50 µl RNase-free su filtre tüpünün merkezine eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

12. Membranda bulunan RNA'nın eppendorf tüpe geçmesi için örnekler 12,000 x g, 2 dakika, oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.

13. Çözünmüş olan RNA, cDNA yapılana kadar -80°C'de saklandı.

3.3.3. Örneklerin RNA Miktarlarının ve Saflığının Ölçülmesi

Nanodrop (Thermo Scientific) cihazına 1 µl RNA örneği yüklenerek 260 nm'deki optik yoğunluğundan (OD) RNA konsantrasyonları, 260 nm/ 280 nm'deki OD değerinden de RNA saflığı ölçümleri gerçekleştirildi. RNA konsantrasyonu ve saflığını belirlemek için kullanılan formüller aşağıda verilmiştir.

RNA konsantrasyonu (ng/µl)= OD 260 nm x seyreltme faktörü x 40

RNA saflığı= OD 260/ OD 280= 2

Normalizasyon

Her bir hasta ve kontrolden elde edilen RNA örneklerinden eşit miktarda (400 ng) total RNA kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

3.3.4. cDNA Sentezi

cDNA sentez kiti (Transcriptor First Standart cDNA Synthesis kit, Roche. Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, Almanya) kullanılarak cDNA sentezi aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1. 13 µl kalıp RNA ile primerler ince PCR tüpü içerisinde karıştırılarak Tablo 3.2'deki gibi hazırlandı.

Tablo 3-2: Kullanılan Kalıp RNA ve Primer Karışımının İçeriği

Bileşen	**Hacim**	**Son konsantrasyon**
Total RNA	400 ng	
Random Hexamer Primer, 600 pmol / µl	2 µl	60 µM
dH_2O	Değişken	Toplam hacim 13 µl'ye tamamlanır.
Toplam hacim	13 µl	

2. Kalıp RNA-primer karışımına 65°C, 10 dk ve 4°C, 1 dk sıcaklık döngüsü uygulanarak kalıp RNA ikincil yapısı denatüre edildi.

3. Daha sonra Tablo 3.3'te gösterildiği gibi buz üzerinde ters transkriptaz (RT) reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3-3: RT reaksiyonunda kullanılan maddelerin konsantrasyonları

İçerik	**Hacim**	**Son Konsantrasyon**
Transkriptör Ters Transkriptaz Reaksiyon Tamponu, 5X kons.	4 µl	1X (8 mM MgCl2)
Koruyucu RNaz inhibitörü (40 U/µl)	0.5 µl	20 U
dNTP karışımı, her biri 10 mM	2 µl	1 mM her biri
Transkriptör Ters Transkriptaz	0.5 µl	10 U
Son hacim	20 µl	

4. Tüpün içinde bir araya getirilen reaksiyon karışımı dikkatlice karıştırıldı ve santrifüjlendi.

5. RT reaksiyonu aşağıdaki sıcaklık döngülerine göre gerçekleştirildi.

Sıcaklık	**Süre**
25°C	10 dk
55°C	30 dk
85°C	5 dk
+4°C	∞

6. Reaksiyon tamamlandıktan sonra tüpler -20°C'de saklandı.

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

Hasta ve kontrol gruplarının RNA'ları cDNA'ya dönüştürüldükten sonra qRT-PCR tekniğiyle hedef gene ait lncRNA ifade seviyesi tespit edildi. cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra qRT-PCR tekniğiyle hedef genin lncRNA düzeyindeki değişimler belirlendi. qRT-PCR tekniği, Roche LightCycler® 1.5 (Roche Applied Biosystems™ , California, USA) cihazında, LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kullanılarak gerçekleştirildi. LncRNA miktarının doğru şekilde belirlenebilmesi için referans (housekeeping) gen kullanılarak normalizasyon (ikinci normalizasyon) gerçekleştirildi. Housekeeping genler her dokuda ifade edildiği bilinen genler olduğu için referans olarak kullanıldı. Kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek amacıyla kalıp cDNA içermeyen bir örnek negatif kontrol olarak belirlendi. Bu reaksiyonlar 20 µl'lik cam kapillerlerde gerçekleştirildi.

Normalizasyon (İkinci Normalizasyon)

İkinci normalizasyon aşamasında çalışılan hedef genin ekspresyon düzeyleri GAPDH housekeeping geni ile karşılaştırılarak belirlendi.

Tablo 3-4: Deneyde kullanılan qRT-PCR primer özellikleri

	Konum	Dizi	Uzunluk
İleri Primer	1185-1204	CAAAGATGAGACGCAGGCTC	20
Geri Primer	1363-1344	GGAACACACAGTCCTCAGGA	20
Ürün Uzunluğu	179		

qRT-PCR Reaksiyon karışımının hazırlanması

cDNA işlemi gerçekleştirildikten sonra hedef genin ifadesine bakmak için qRT-PCR, LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kiti ile Roche LightCycler® 1.5 (Roche Applied BiosystemsTM , California, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için aşağıdaki protokol takip edildi.

1. Donmuş şekilde saklanan Reaction Mix (Vial 1b) eritilerek ışıktan korundu.
2. Enzyme (Vial 1a) ve Reaction mix (Vial 1b) kısa santrifüj yapıldıktan sonra buz üzerine alındı.
3. Vial 1a'dan 10 µl alınarak Vial 1b'ye eklendi ve nazik bir şekilde pipetaj yapıldı.
4. Elde edilen karışım yeniden etiketlendi (Vial 1: LC FastStart DNA Master SYBR Green I, 10x Konsantrasyon).
5. İçeriği Tablo 3.4'te verildiği gibi PCR karışımı hazırlandı.

Tablo 3-5: PCR Karışımının hazırlanması

İçerik	**Volüm [µl]**	**Son Kons.**
H_2O (Vial 3)	5,8	-
$MgCl_2$, 25 mM (Vial 2)	1,2	-

PCR Primer Mix, 10x Kons.	1	0,5 µM
LC FastStart DNA Master SYBR Green I, 10x kons. (Vial 1)	1	1x
Toplam Hacim	9	

Tablo 3-6: LightCycler® qRT-PCR Programları

Program adı	**Döngü Sayısı**	**Analiz Modu**
Pre-İnkübasyon	1	None
Amplifikasyon	45	Quantification
Melting Curve	1	Melting Curve
Soğutma	1	None

Tablo 3-7: LightCycler® qRT-PCR Sıcaklık Döngüleri

	Hedef Sıcaklık	**Durma Süresi [hh:mm:ss]**	**Ramp Oranı [ºC/s]**	**Acquisition Modu [per ºC**
Pre-İnkübasyon	95 ºC	00:10:00	20	None
Amplifikasyon	95 ºC	00:00:10	20	None
	62 ºC	00:00:07	20	None
	72 ºC	00:00:10	20	Single
Melting Curve	95 ºC	00:00:00	20	None
	65 ºC	00:00:15	20	None

	95 °C	00:00:00	20	Continuous
Soğutma	40 °C	00:00:30	20	None

3.3.6. Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA)

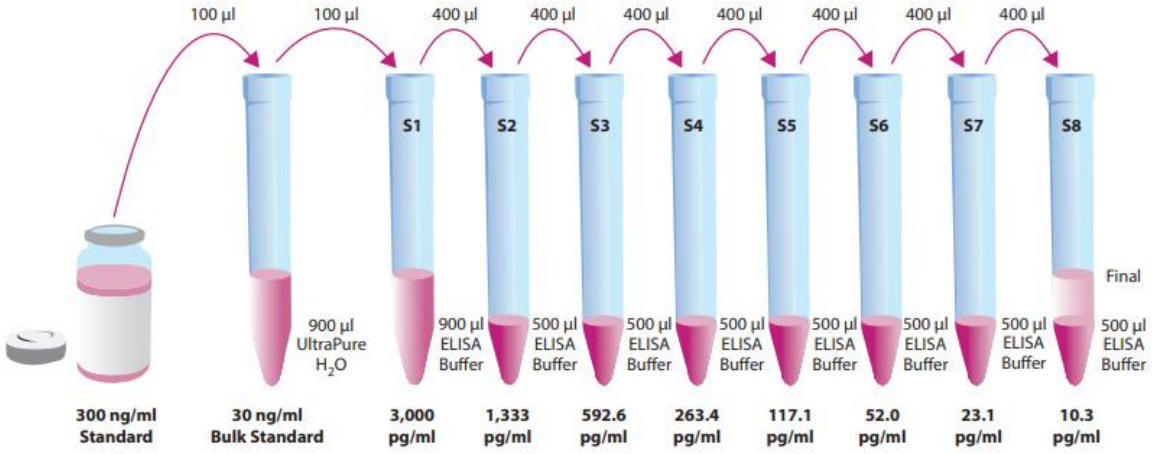
Cayman's DNA/RNA Oxidative Damage (High Sensitivity) ELISA Kit (Item No. 589320) kullanılarak plazmadan bir RNA hasar belirteci olan 8-hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) seviyesi tespit edildi.

1. **ELISA Tampon Hazırlanması:** Konstantrasyonu 10X olan ELISA tamponu (Item No. 400060) 90 ml ultra saf su ile seyreltildi.

2. **Yıkama Tamponu Hazırlanması:** Konsantrasyonu 400X olan 5 ml yıkama tamponu 2 Litre ultra saf su ile seyreltildi ve 1 ml Polysorbate 20 (Item No. 400035) eklendi.

3. **Örnek Hazırlanması:** Hasta ve kontrol plazma örnekleri 1:100 oranında seyreltildi.

4. **ELISA Standartlarının Hazırlanması:** 100 µl DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Standard (Item No. 10012603) yeni bir tüpe alındı ve 900 µl ultra saf su ile seyreltildi. 8 tane temiz tüp alınarak 1'den 8'e kadar numaralandırıldı. 1 numaraları tüpe 900 µl ve geri kalan tüplere 500 µl ELISA tamponu eklendi. 100 µl Bulk Standard (30 ng/ml) 1 numaralı tüpe eklenerek karıştırıldı. Şekil 3-1'de gösterildiği gibi sırasıyla bir tüpten 400 µl alınarak bir sonraki tüpe eklenerek seyreltme işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 3-1: ELISA DNA/RNA Oksidatif Hasar Standartlarının hazırlanması

5. **DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Monoklonal Antikor Hazırlanması:** 100 dtn DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Monoklonal Antikor (96-well kit; Item No. 10012602), 6 ml ELISA tamponu ile çözdürüldü.

6. 100 µl ELISA tamponu NSB kuyucuğuna ve 50 µl B0 kuyucuğuna aklendi.

7. 8 numaralı tüpten 50 µl alınarak S8 kuyucuğuna eklendi, 7 numaralı tüpten 50 µl S7 kuyucuğuna eklendi. Bu prosedür tüm standartlar eklenene kadar devam ettirildi.

8. 50 µl örnekten alınarak kuyucuklara eklendi.

9. 50 µl DNA/RNA Oxidative Damage AChE Tracer TA ve Blk kuyucuklarına eklendi.

10. 50 µl DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Monoklonal antikor TA, NSB, Blk kuyucuklarına eklendi.

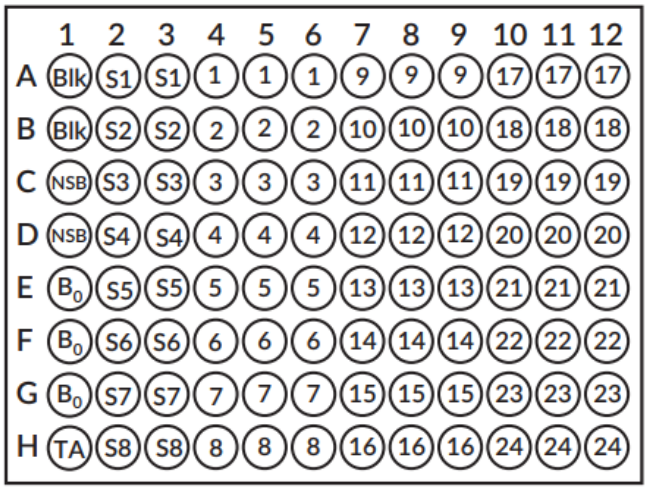
11. Kuyucuklar boşaltıldı ve yıkama tamponu ile durulandı.

12. Her bir kuyucuğa 200 µl Ellman's Reagent eklendi.

13. 5 µl Tracer TA kuyucuğuna yüklendi.

14. Plate plastik film ile kapatıldı ve karanlık ortamda 90-120 dk karıştırıcı üzerinde bekletildi.

15. Plate 405 ve 420 nm dalga boyunda okundu.



Şekil 3-2: Plate Formatı.

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 23.0 software programı kullanılarak yapıldı. Nicel özelliklerde normallik analizleri tüm alt gruplarda Kolmogorov Smirnov testi ile yapıldı. Normal dağılım sağlanamadığı için gruplararası kıyaslamalarda Mann Whitney U testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama ± standart sapma (SD) olarak ve kategorik değerler gözlem sayısı (n) ve/veya yüzde (%) ile ifade edildi. Çalışma ve kontrol grubundaki kategorik değişkenler ki-kare ($\chi 2$) veya Fisher's exact test ile karşılaştırıldı. qRT-PCR deneylerinden elde edilen Ct değerleri, göreceli ekspresyon düzeylerini belirlemek üzere $2^{-\Delta Ct}$ ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formüllerine göre hesaplandı. Gen ekspresyonu düzeyleri ile serum kan değerleri Spearman's korelasyon testi ile karşılaştırıldı. Anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

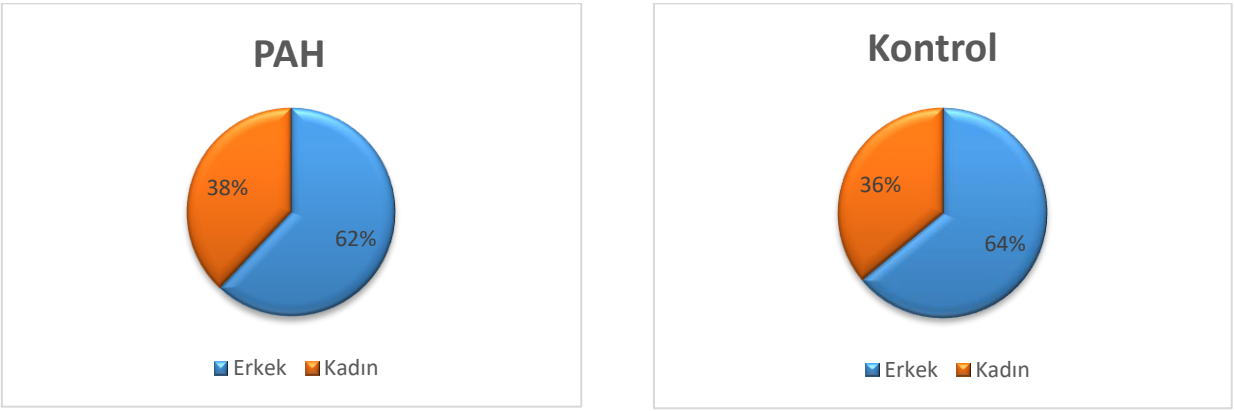
Periferik arter oklüzyonlu hastalarda, lncRNA *PELATON* ekspresyonu ve DNA/RNA oksidatif hasarı üzerine yaptığımız çalışmamız hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki gruptan oluşturulmuştur. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi Polikliniğine başvuran, PAH tanısı alan 100 hastadan ve 100 sağlıklı kontrolden alınan periferik kan örnekleri kullanılarak tez çalışmamız gerçekleştirildi. Hasta grubu 34-84 yaş aralığında 62 erkek, 38 kadın, kontrol grubu ise 25-80 yaş aralığında 64 erkek, 36 kadın bireyden oluşturuldu.

Hasta ve kontrol grubunun biyokimyasal ve demografik özellikleri açısından karşılaştırılması Tablo 4-1'de verilmiştir. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet özellikleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Açlık kan şekeri, kreatinin, albümin, CRP ve LDL kolesterol düzeyleri hasta ve kontrol gruplarının arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0.05$). (Tablo 4-1) (Şekil 4-1).

Tablo 4-1: PAH ve kontrol gruplarının biyokimyasal ve demografik özellikleri açısından karşılaştırılması

Parametre	Hasta Grubu (n=100)	Kontrol Grubu (n=100)	p
Yaş (Ort ± SD)	61.40 ± 9.97	59.86 ± 12.48	0.945
Cinsiyet (E/K)	62/38	64/36	0.770
Açlık kan şekeri (mg/dL)	128.59 ± 59.42	95.27 ± 26.48	<0.001
Üre (mg/dL)	41.77 ± 20.05	35.27 ± 11.14	0.123
Kreatinin (mg/dL)	1.24 ± 1.15	0.89 ± 0.74	<0.001
Total Protein (g/dl)	10.91 ± 22.31	7.28 ± 0.38	0.972
Albümin (g/dl)	4.21 ± 0.61	4.59 ± 0.27	0.018
ALT (IU/L)	23.85 ± 24.50	19.81 ± 10.38	0.853
AST (IU/L)	23.31 ± 18.16	19.08 ± 7.40	0.353
LDH (U/L)	205.90 ± 88.34	200.80 ± 46.61	0.758
CRP (mg/L)	34.49 ± 59.56	6.94 ± 6.92	0.002
Total Kolestrol (mg/dL)	184.13 ± 39.40	187.43 ± 35.08	0.791
Trigliserid (mg/dL)	159.30 ± 61.15	162.01 ± 63.63	0.924
HDL Kolestrol (mg/dL)	42.92 ± 13.56	44.20 ± 10.77	0.433
LDL Kolestrol (mg/dL)	112.62 ± 36.07	126.75 ± 35.32	0.021
Magnezyum (mg/dL)	1.94 ± 0.24	2.13 ± 0.24	0.058
CK (U/L)	190.27 ± 241.91	115.80 ± 59.95	0.600
CK-MB (U/L)	23.29 ± 16.28	13.92 ± 11.20	0.773
Ürik Asit (mg/dL)	5.32 ± 1.40	5.38 ± 1.48	0.946
HbA1C (mmol/mol)	27.90 ± 32.84	35.63 ± 5.22	0.151

Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.



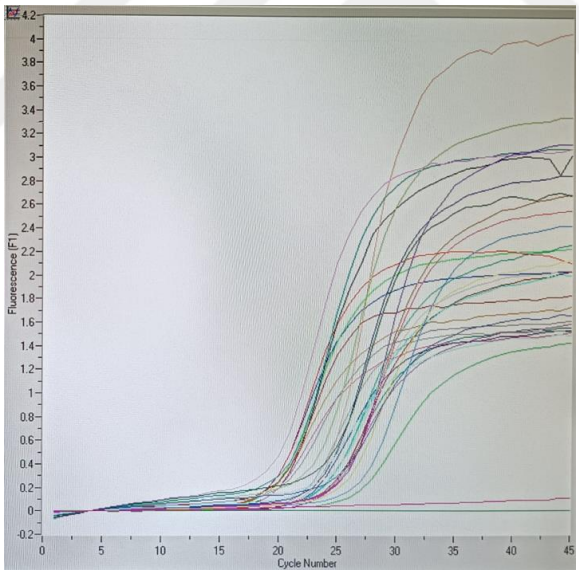
Şekil 4-1: Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet dağılımları

PELATON geninin lncRNA ekspresyon düzeyi, PAH grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (p=0.119) (Tablo 4-2) (Şekil 4-2), (Şekil 4-3).

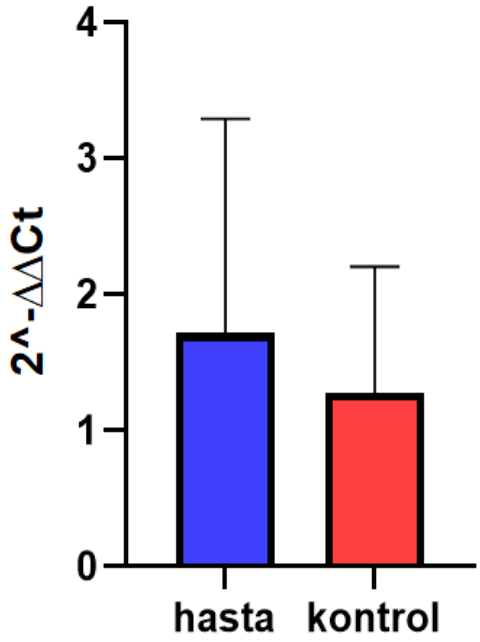
Tablo 4-2: Hasta ve Kontrol gruplarının *PELATON* gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması

LncRNA Ekspresyonu	**PAH (n=100)**	**Kontrol (n=100)**	**p**
PELATON ($2^{-\Delta Ct}$)	0.08 ± 0.07	0.06 ± 0.04	0.119
PELATON ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	1.71 ± 1.58	1.27 ± 0.93	0.119

Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.



Şekil 4-2: PAH ve kontrol gruplarında *PELATON* genine ait amplifikasyon eğrileri



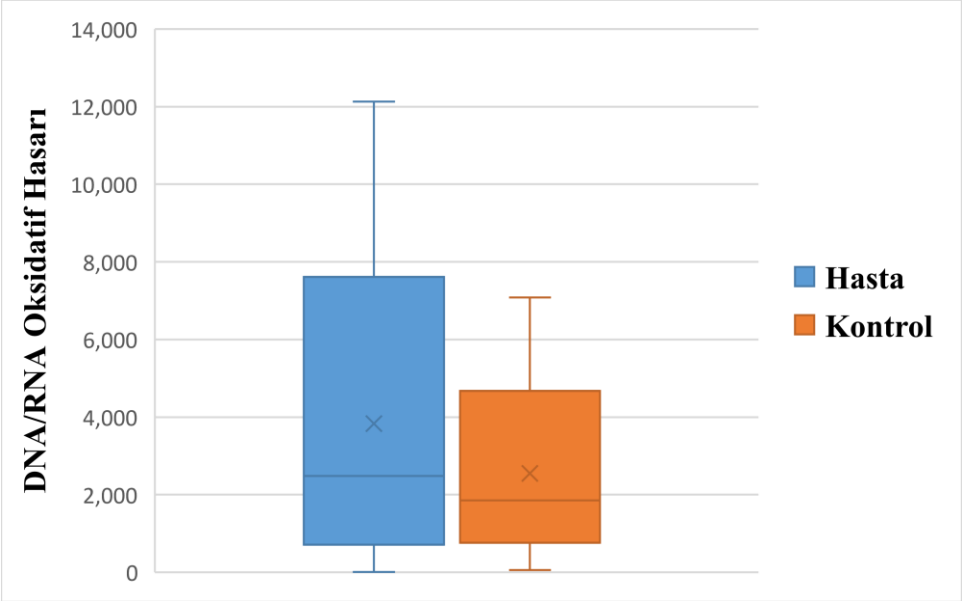
Şekil 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında *PELATON* genine ait kat değişimi

PAH ve kontrol grupların arasında, oksidatif hasar belirteci olan 8-OHG, 8-OHdG ve 8-hidroksiguanin ELISA düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmedi (p = 0.31) (Tablo 4-3) (Şekil 4-4).

Tablo 4-3: Hasta ve kontrol gruplarının DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri açısından karşılaştırılması

	PAH (n=35)	**Kontrol (n=34)**	p
8-OHG, 8-OHdG, 8-hidroksiguanin (ng/ml)	2485.15 ± 3097.82	2280.35 ± 1853.74	0.310

Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir



Şekil 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında oksidatif DNA/RNA hasar miktarı

PELATON geni ekspresyon düzeyleri hasta ve kontrol gruplarında cinsiyet açısından karşılaştırıldığında, her iki grupta da anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$) (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Hasta ve Kontrol gruplarında *PELATON* ekspresyonunun cinsiyet açısından karşılaştırılması

	Cinsiyet	PELATON lncRNA Ekspresyonu ($2^{-\Delta Ct}$)	PELATON lncRNA Ekspresyonu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	p
PAH	Erkek (n=62)	0.08 ± 0.09	1.78 ± 1.80	0.994
	Kadın (n=38)	0.08 ± 0.05	1.60 ± 1.15	
Kontrol	Erkek (n=64)	0.06 ± 0.05	1.35 ± 1.07	0.554
	Kadın (n=36)	0.05 ± 0.03	1.13 ± 0.62	

Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.

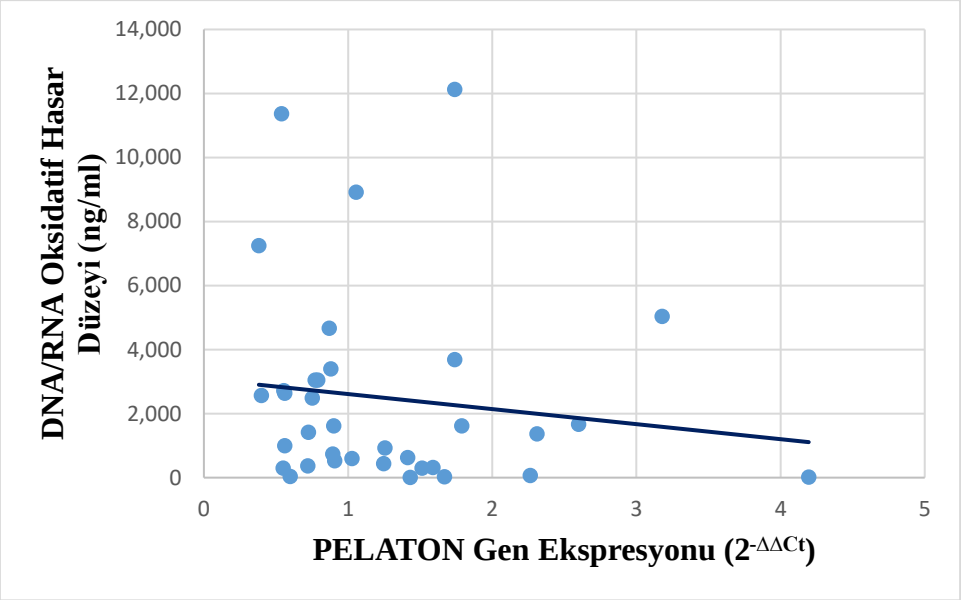
8-OHG, 8-OHdG ve 8-hidroksiguanin düzeylerinin PAH ve kontrol gruplarında cinsiyet açısından değerlendirilmesi yapıldığında, PAH ve kontrol gruplarında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Hasta ve kontrol gruplarında DNA/RNA oksidatif hasar düzeylerinin cinsiyet açısından karşılaştırılması

	Cinsiyet	8-OHG, 8-OHdG, 8-hidroksiguanin (ng/ml)	p
PAH	Erkek (n=62)	2478.09 ± 3280.19	0.766
	Kadın (n=38)	2491.10 ± 3026.59	
Kontrol	Erkek (n=64)	2532.34 ± 2135.89	0.431
	Kadın (n=36)	2103.96 ± 1663.57	

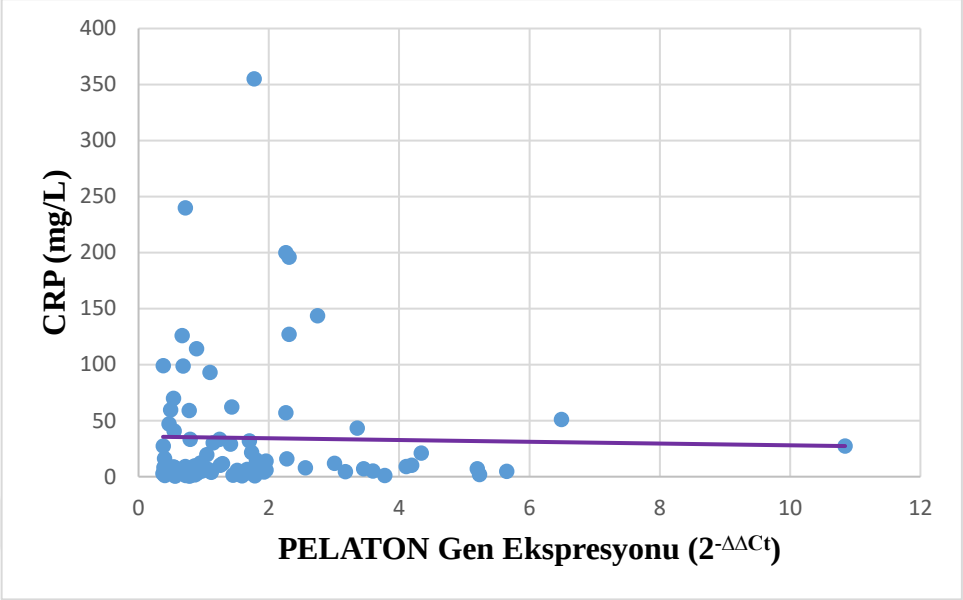
Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir

PELATON gen ekspresyonu düzeyi ile DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri Spearman's korelasyon testi ile karşılaştırıldı. PAH grubunda *PELATON* gen ekspresyonu düzeyi ile DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri arasında negatif yönde bir korelasyon gözlendi (r=-0.232, p=0.181), ancak sonuçlarımız istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmadı (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: PAH grubunda PELATON gen ekspresyonu ile oksidatif DNA/RNA hasar düzeyleri arasındaki korelasyon

PELATON gen ekspresyonu düzeyi ile biyokimyasal parametreler, korelasyon testi ile karşılaştırıldığında, PAH grubunda *PELATON* gen ekspresyonu ile CRP (r=0.024, p=0.83), total kolesterol (r=0.014, p=0.91), LDL kolesterol (r=0.117, p=0.36), kreatin kinaz MB (r= 0.273, p=0.391) düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon saptandı, ancak sonuçlarımız istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmadı (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: PAH grubunda PELATON gen ekspresyonu ile serum CRP düzeyleri arasındaki korelasyon

5. TARTIŞMA

Periferik arter hastalığı (PAH) tipik olarak alt ekstremite arterlerinin aterosklerotik stenozunun neden olduğu alt ekstremite damar iskemisini ifade etmektedir. Alt ekstremite arterlerindeki sistemik ateroskleroz, kronik tıkanıklığın önde gelen nedenidir. PAH, aterosklerotik bir vasküler hastalık olup yürüme bozukluğu, klasik aralıklı topallama ve kritik uzuv iskemisi de dahil olmak üzere klinik belirtileri olan bir hastalıktır. PAH risk faktörleri arasında, hipertansiyon, hiperlipidemi, diabetes mellitus, homosistein düzeyleri, obezite, sigara kullanımı ve ailesel yatkınlık gibi faktörler bulunmaktadır (114). Toplumda PAH ilişkili olumsuz kardiyovasküler olaylar ve uzuv sonuçları hakkında yeterli farkındalık bulunmamaktadır. Alt ekstremite PAH, tüm büyük ateroskleroz risk faktörleri ile ilişkilidir. Sigaranın ateroskleroz oluşma riskini 2 ile 4 kat artırdığı tahmin edilmektedir. Benzer şekilde diyabetin de PAH riskini benzer oranlarda yükselttiği görülmektedir. Yüksek total kolestrol PAH oluşma riskini artırırken, yüksek HDL bu riski düşürmektedir (4).

Ateroskleroz; endotelyal fonksiyon kaybı, lipid birikimi gibi komplikasyonlarla iskemik kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların oluşmasını teşvik eden kronik inflamatuar bir hastalıktır (13). Aorttan koroner arterlere kadar tüm damar sistemini tutulabildiği ve intimal plaklarla karakterize bir damar intima hastalığıdır. Lipid, fibröz bir yapı ile kaplanmış şekilde plağın merkezinde konumlanmaktadır (12). Aterosklerozun patogenezi, pro-inflamatuar sinyal yollarının aktivasyonunu, sitokin/kemokin ekspresyonunu ve oksidatif stres artışını içermektedir. Oksidatif stres, ROS üretiminin artması veya vücudun doğuştan gelen anti-oksidan savunma sistemlerinin azalması lehine olan dengesizliktir. Endotelde meydana gelen bir hasarla ateroskleroz oluşumu tetiklenmektedir. Daha sonra LDL kolesterol, subendotelyal alana sızmaya ve birikmeye başlamaktadır. Burada biriken LDL oksitlenerek okside LDL (ox-LDL) formuna dönüşmektedir.

Oksidatif stresin hayat kalitesini azaltan komplikasyonlara katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Oksidatif strese neden olan ROS'ların PAH'daki olumsuz etkileri göz önüne alındığında, endotel fonksiyon kaybı ve vasküler inflamasyon için önemli belirteç olarak kabul edilmektedirler (5). ROS düzeyinin yüksekliği, NO'nun hızlı bir şekilde inaktivasyonuna neden

olarak peroksinitrit oluşmasına neden olabilmektedir. Peroksinitrit, aterogeneze katkıda bulunan güçlü bir oksidant moleküldür. Ayrıca, peroksinitrit eNOS'u ayrıştırıp süperoksit miktarını artırarak NO üretimini azaltmaktadır. Bu nedenle, oksidatif stresin azalmış NO biyoaktivitesi yoluyla PAH'da gözlenen arteriyel fonksiyon bozukluğunu indüklediğine dair güçlü bir gerekçe bulunmaktadır.

Uzun kodlama yapmayan RNA'lar, 200 nükleotitden uzun RNA molekülleridir. Hücre çoğalması, otofaji ve apoptoz gibi olaylarda önemli düzenleyicilerdir. Bundan dolayı lncRNA ekspresyonlarındaki anomaliler vasküler hücrelerde fonksiyon kaybına yol açabilmektedir. LncRNA'lar ayrıca endotel hücre fonksiyonunu ve vasküler inflamasyonu düzenlemede kritik rol oynamaktadır. Dolayısıyla lncRNA molekülleri aterosklerozun gelişiminde önemli düzenleyiciler olarak dikkat çekmektedir (115). Bazı lncRNA'lar endotel hücre disfonksiyonunu, VSMC çoğalmasını ve göçünü, lipid metabolizması ile ilgili hastalıkları ve inflamatuvar yanıtları artırarak ateroskleroz oluşumunu hızlandırabilmektedir (116).

Kromozom 20q13.13 üzerinde bulunan ve toplam uzunluğu 539 nt olan 3 ekzon bölgesi içeren LncRNA PELATON, makrofaj çekirdeğinde bulunan spesifik bir lncRNA'dır (9). Stabil olmayan hastalardan alınan aterosklerotik karotis arterler ile stabil hastalığı olanların plaklarının lncRNA ekspresyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, lncRNA PELATON, çok sayıda transkript içinde stabil olmayan plaklarda yüksek derecede ekspresyon gösteren lncRNA tanımlanmıştır (103). Hung ve ark. lncRNA PELATON'un spesifik olarak monosit-makrofaj hücre hatlarında ifade edildiğini ve endotel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde veya fibroblastlarda tespit edilemediğini bildirmişlerdir. Ayrıca, lncRNA PELATON'un, makrofajların fagositik kapasitesini artırabileceği ve makrofaj membranında CD36 ekspresyonunu artırarak ROS üretimini artırabileceği bildirilmiştir (9). Ancak bildirilmiş olan mevcut mekanizmaların daha fazla araştırılması gerekmektedir. Ateroskleroz, makrofaj köpük hücrelerinin büyük ölçüde biriktiği kronik bir hastalık olarak PAH'ın ana nedenleri arasında bulunmaktadır. Monositlerin, makrofajların ve köpük hücrelerinin ateroskleroz oluşumundaki önemli rolü göz önüne alındığında, lncRNA PELATON'un PAH hastalığı için önemli bir faktör olabilir. Biz de çalışmamızda, PAH hastalığında periferik kan mononükleer hücrelerde (PBMC) lncRNA PELATON'un ekspresyon düzeylerini ve DNA/RNA oksidatif hasar belirteci olan plazma 8-OHG, 8-OHdG, 8-hidroksiguanin düzeylerini araştırdık. Çalışmamızda, PAH grubu ve sağlıklı kontrollerde lncRNA PELATON ekspresyon düzeyi incelenmiş ve gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Önceki çalışmalarda PELATON'un ateroskleroz gelişimi ile

olan ilişkisinin vurgulanmış olmasına karşın çalışmamızda anlamlı bir fark bulunmayışı, hasta ve kontrol örnek sayımızın sınırlı sayıda olmasından kaynaklanabilir.

Chen ve ark., akut koroner sendromda lncRNA PELATON'un serum düzeylerini araştırmış ve sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulmuştur. Ayrıca PELATON ekspresyonu ile C-reaktif protein (hs-CRP), kardiak troponin ve kreatin kinaz MB ile pozitif yönde korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanısıra, yüksek PELATON ekspresyonu gösteren akut koroner sendromlu hastalarda PELATON ekspresyonu azalmış hastalara oranla majör kardiyovasküler olayların arttığını bildirmişlerdir. Ancak bu tablonun mortaliteye etki etmediği ifade edilmiştir (117). Biz de çalışmamızda, PBMC'de PELATON ekspresyonu düzeyi ile biyokimyasal parametreler, korelasyon testi ile karşılaştırıldığında, PAH grubunda PELATON gen ekspresyonu ile CRP, total kolesterol, LDL kolesterol, kreatin kinaz MB düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon saptandı, ancak sonuçlarımız istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmadı. Çalışmamızda korelasyon testleri arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamasına rağmen bulgularımız Chen ve arkadaşlarının bulguları ile uyumluluk göstermektedir.

LncRNA PELATON'un, insan aterom plaklarının nekrotik çekirdeği bölgesinde lokalize olduğu ve plak inflamasyon alanlarında ekspresyonunun arttığı, hücrelerin nükleer bölgesinde eksprese olduğu ve monosit ve makrofaj spesifik bir lncRNA olduğu bildirilmiştir. Fagositoz, lipid alımı ve/veya ROS üretimi gibi plak ilerlemesiyle ilişkili hücresel işlevleri düzenlemektedir (9,103).

Çalışmalar, oksidatif stresin PAH hastalarında akım aracılı dilatasyonu (FMD) azalttığını göstermiştir. Örneğin, PAH hastalarının kontrollerle karşılaştırıldığında, DNA'nın ROS tarafından oksidatif hasarı ile üretilen bir bileşik olan oksidatif stres belirteci 8-Hidroksi-2-deoksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) serum düzeylerinin yükseldiği, nitrit ve nitrat (NOx) serum düzeylerinin azaldığı ve FMD'nin düştüğü gösterilmiştir. NOx'in hem FMD hem de 8-OHdG ile korele olması, oksidatif stresin NO biyoyararlanımını ve dolayısıyla arteriyel fonksiyon bozukluğunu azaltmada rol oynayabileceğini düşündürmektedir (118). ROS oluşumunun aterosklerozda hücre proliferasyonunu, hipertrofiyi, büyümenin durmasını, apoptozisi ve LDL oksidasyonunu teşvik ettiği iyi bilinmektedir. 8-OHdG'ye karşı artmış immünoreaktivite Martinet ve arkadaşları (119) tarafından karotid arter plaklarında komşu iç medya ve aterosklerotik olmayan meme arterlerine kıyasla bulunmuştur. Martinet ve

arkadaşları ayrıca makrofajlar, düz kas hücreleri ve endotel hücreleri dahil olmak üzere plağın tüm hücre tiplerinde güçlü 8-OHdG immünoreaktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Verileri ayrıca DNA onarım enzimlerinin aşırı ekspresyonunun yüksek düzeyde çoğalan hücre nükleer antijeni ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Biz de yaptığımız çalışmada PAH hastalarında DNA/RNA oksidatif hasarını ELISA yöntemi lie belirledik. Kullandığımız ELISA kiti, 8-OHdG, 8-OHG ve 8-hidroksiguanin düzeylerini toplam olarak ölçmektedir. PAH ve kontrol grupların arasında, DNA/RNA oksidatif hasarı karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Bunun nedeni, çalışmamızda hasta ve kontrol sayımızın sınırlı sayıda olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca, PELATON gen ekspresyonu düzeyi ile DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri korelasyon testi ile karşılaştırıldığında, PAH grubunda PELATON ekspresyon düzeyi ile DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri arasında negatif yönde bir korelasyon gözlenmiş, ancak sonuçlarımız istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmamıştır. Hasta grubumuzun büyük çoğunluğu uzun yıllar sigara kullanmış ve hastalık tanısı konulduktan sonra hastaların tamamına yakını sigara içimini bırakmıştır. Bu durumun da uzun süreli bir oksidatif hasar oluşturabileceği, ancak zamanla azalabileceği ve sonuçlarımızı etkileyebileceği düşünülmektedir. Sigara dumanı içeren bileşikler endotelyal NADPH oksidazı aktif hale getirme ve mitokondriyal oksidatif stresi uyarma potansiyeline sahiptir. Süperoksit ve peroksinitrit üretiminin artması vasküler inflamasyona, DNA hasarına ve vasküler yaşlanmaya yol açmaktadır. Ayrıca, sigara dumanındaki bileşikler de LDL'nin pro-oksidatif aktivitesini güçlendiren LDL'nin oksidatif modifikasyonlarını indüklemektedir. oxLDL, NADPH oksidazı aktive etmede doğal LDL'den daha güçlüdür. Sigara içenlerde BH4 eksikliği ve eNOS ayrışması gösterilmiştir. BH4 takviyesi eNOS ayrışmasını tersine çevirebilmekte ve sigara içenlerde endotel fonksiyon bozukluğunda iyileşme sağlayabilmektedir (120–122).

PAH hastalığında, hastaların büyük çoğunluğu erkektir (114). Çalışmamızda hasta grubumuzun PELATON gen ekspresyonu ve DNA/RNA oksidatif hasar düzeylerini cinsiyet dağılımı açısından değerlendirdiğimizde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç tespit edilmedi. Bu durum gerek kadın hasta sayımızın erkek hasta sayısına oranla azlığı ve gerekse kadınların sigara kullanma alışkanlığının artışı ile ilişkilendirilebilir.

Arter intiması doku ve kan arasında meydana gelen madde alışverişi için önemli bir bariyer görevi görmektedir. Yapılan bir çalışmada AK136714'ün susturulması ile bu bariyerin korunabileceği ve dolayısıyla endotel hücrelerinde meydana gelebilecek hasarlar engellenerek aterosklerotik plak oluşumunun inhibe edilebileceği gösterilmiştir. Ateroskleroz sadece damar

duvarında lipid birikmesiyle ilgili bir hastalık değil aynı zamanda kronik inflamasyon ve oksidatif stres gibi süreçlerde içermektedir. Ateroskleroz ilerledikçe, Ox-LDL'yi fagosite eden inflamatuar hücreler ve makrofajlar artar ve aterosklerozu daha da kötüleştiren tümör nekroz faktörü-α (TNF-α), interlökin-8 (IL-8), interlökin-1 (IL-1) ve diğer önemli enflamatuar faktörleri salınır. Bu çalışmada ayrıca Ak136714'ün susturulmasıyla TNF-α, IL-8 ve IL-6 gibi faktörlerin salınmasını inhibe edebildiği gösterilmiştir (123). Yapılan bir çalışmada, bir onko-lncRNA olarak tanımlanan PELATON'un mutant p53 tarafından yönlendirilen ferroptozu hafiflettiği ve mutant p53 aracılı glioblastoma proliferasyonunu desteklediği bildirilmiştir. Ayrıca PELATON'un, mutant P53'ün ROS-ferroptoz yoluna aracılık etmesiyle ferroptoz inhibitörü olarak işlev gören, ROS üretimini inhibe eden, iki değerlikli demir iyonlarının düzeyini azaltan, SLC7A11 ekspresyonunu destekleyen ve ACSL4 ve COX2 ekspresyonunu inhibe eden yeni bir ferroptoz baskılayıcı lncRNA olduğu tespit edilmiştir (124). Aterosklerozdaki hücre ölümü şekilleri ve mekanizmaları yakın zamanda aydınlatılmıştır. Bunlar arasında, fosfolipidlerin oksidatif hasarı ile karakterize, demire bağlı bir nekroz şekli olan ferroptoz, lipid peroksidasyonunda endotelyal disfonksiyonu hızlandırarak aterosklerozu teşvik etmektedir (125). Oksidatif stres, ROS'un hücre içi düzeylerini artırarak lipid, protein ve nükleik asitlere hasar vermektedir. Makrofajlar ve köpük hücreleri oksidatif stres sonucu oluşan ROS'un ana üreticileridir, ayrıca proinflamatuar sitokinler ve MMP'ler (matriks metalloproteinazlar) de ek olarak inflamatuvar kaskadı harekete geçirmektedirler (126). PELATON gibi fagositozu pozitif olarak düzenleyen bir lncRNA, bu hızı ve plak ilerlemesini azaltmada potansiyel bir hedef olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ateroskleroz, oldukça karmaşık bir etiyolojiye sahip olup genetik ve çevresel faktörler tarafından tetiklenen kompleks bir kalıtım modeli göstermektedir. Çalışmamızda ateroskleroz etiyolojisinde yer alan aday genlerden lncRNA PELATON ekspresyonunun, plazma DNA/RNA oksidatif hasar düzeyi ile birlikte etkisi PAH gelişiminde incelenmiştir. Araştırmamız sonucunda PAH grubunda PELATON gen ekspresyonu düzeyi serum CRP, total kolesterol, LDL kolesterol ve kreatin kinaz MB düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon saptanmış ancak istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşamamıştır. Bu durum sınırlı hasta

sayısından kaynaklı olabilmektedir. Çalışmamız, PAH hastalarında PELATON ekspresyonunun gerçekleştirildiği ilk çalışma özelliğini taşıdığından dolayı literatüre katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Gelecekte hasta sayıları artırılarak aterom plak gelişiminde rolü olduğu düşünülen fagositoz ilişkili lncRNA belirteçlerinin araştırılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Williams JW, Winkels H, Durant CP, Zaitsev K, Ghosheh Y, Ley K. Single Cell RNA Sequencing in Atherosclerosis Research. Circ Res. 2020;1112–26.
2. Di Pietro N, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. Vol. 84, Vascular Pharmacology. Elsevier Inc.; 2016. p. 1–7.
3. Tsigkou V, Siasos G, Rovos K, Tripyla N, Tousoulis D. Peripheral artery disease and antiplatelet treatment. Vol. 39, Current Opinion in Pharmacology. Elsevier Ltd; 2018. p. 43–52.
4. Campia U, Gerhard-Herman M, Piazza G, Goldhaber SZ. Peripheral Artery Disease: Past, Present, and Future. Vol. 132, American Journal of Medicine. Elsevier Inc.; 2019. p. 1133–41.
5. Ismaeel A, Brumberg R, Kirk J, Papoutsi E, Farmer P, Bohannon W, et al. Oxidative Stress and Arterial Dysfunction in Peripheral Artery Disease. Antioxidants. 2018 Oct 19;7(10):145.
6. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. The Lancet. 1996 Feb;347(8999):444–5.
7. Zhang X, Wang W, Zhu W, Dong J, Cheng Y, Yin Z, et al. Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels. Vol. 20, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2019.
8. Pan JX. LncRNA H19 promotes atherosclerosis by regulating MAPK and NF-kB signaling pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017 Jan;21(2):322–8.
9. Hung J, Scanlon JP, Mahmoud AD, Rodor J, Ballantyne M, Fontaine MAC, et al. Novel Plaque Enriched Long Noncoding RNA in Atherosclerotic Macrophage Regulation (PELATON). Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020 Mar 1;40(3):697–713.
10. Johnson JL. Metalloproteinases in atherosclerosis. Eur J Pharmacol. 2017 Dec 5;816:93–106.
11. Malekmohammad K, Bezsonov EE, Rafieian-Kopaei M. Role of lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis: Focus on molecular and cellular mechanisms. Vol. 8, Frontiers in Cardiovascular Medicine. Frontiers Media S.A.; 2021.
12. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes [Internet]. Vol. 5, International Journal of Preventive Medicine. 2014. Available from: www.ijpm.ir
13. Yan Y, Song D, Wu J, Wang J. Long Non-Coding RNAs Link Oxidized Low-Density Lipoprotein With the Inflammatory Response of Macrophages in Atherogenesis. Vol. 11, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2020.
14. Poznyak A, Grechko A V., Poggio P, Myasoedova VA, Alfieri V, Orekhov AN. The diabetes mellitus–atherosclerosis connection: The role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020.

15. Cheng F, Torzewski M, Degreif A, Rossmann H, Canisius A, Lackner KJ. Impact of Glutathione Peroxidase-1 Deficiency on Macrophage Foam Cell Formation and Proliferation: Implications for Atherogenesis. PLoS One. 2013 Aug 22;8(8).

16. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Vol. 473, Nature. 2011. p. 317–25.

17. Tavafi M. Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. J Renal Inj Prev [Internet]. 2013;2(2):59–62. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25340129

18. Nasri H. Association of Ca×PO4 product with levels of serum C-reactive protein in regular hemodialysis patients. Journal of Renal Injury Prevention J Renal Inj Prev [Internet]. 2012;1(2):55–9. Available from: http://journalrip.com

19. Burke-Gaffney A, Brooks AVS, Bogle RG. Regulation of chemokine expression in atherosclerosis [Internet]. Available from: www.elsevier.com/locate/vph

20. Kume N, Cybulsky M 1, Gimbrone MA. Rapid Publication Lysophosphatidylcholine, a Component of Atherogenic Lipoproteins, Induces Mononuclear Leukocyte Adhesion Molecules in Cultured Human and Rabbit Arterial Endothelial Cells.

21. Erl W, Weber PC, Weber C. Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands. Vol. 136, Atherosclerosis. 1998.

22. Rafieian-Kopaei M, Baradaran A. Combination of metformin with other antioxidants may increase its renoprotective efficacy. J Renal Inj Prev [Internet]. 2013;2(2):35–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25340122

23. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Medical Sciences Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids (macrophage/atherosclerosis/free radical/metal ion/phospholipase). Vol. 81. 1984.

24. Corsini A, Bernini F, Quarato P, Donetti E, Bellosta S, Fumagalli R, et al. Non-Lipid-Related Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. Cardiology. 1996;87(6):458–68.

25. Nayer A, Asif A. Idiopathic membranous nephropathy and anti-phospholipase A2 receptor antibodies. Vol. 2, Journal of Nephropathology. Society of Diabetic Nephropathy Prevention; 2013. p. 214–6.

26. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature. 1993 Apr;362(6423):801–9.

27. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. Circ Res. 2016 Feb 19;118(4):692–702.

28. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. Nat Rev Dis Primers. 2019 Aug 16;5(1):56.

29. Ruiz JL, Hutcheson JD, Aikawa E. Cardiovascular calcification: current controversies and novel concepts. Cardiovascular Pathology. 2015 Jul;24(4):207–12.

30. Irkle A, Vesey AT, Lewis DY, Skepper JN, Bird JLE, Dweck MR, et al. Identifying active vascular microcalcification by 18F-sodium fluoride positron emission tomography. Nat Commun. 2015 Jul 7;6(1):7495.

31. Huang H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT. The Impact of Calcification on the Biomechanical Stability of Atherosclerotic Plaques. Circulation. 2001 Feb 27;103(8):1051–6.

32. Ruiz JL, Weinbaum S, Aikawa E, Hutcheson JD. Zooming in on the genesis of atherosclerotic plaque microcalcifications. J Physiol. 2016 Jun 1;594(11):2915–27.

33. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. Circ Res. 2014 Jun 6;114(12):1852–66.

34. Libby P. Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. New England Journal of Medicine. 2013 May 23;368(21):2004–13.

35. Pasterkamp G, den Ruijter HM, Libby P. Temporal shifts in clinical presentation and underlying mechanisms of atherosclerotic disease. Nat Rev Cardiol. 2017 Jan 20;14(1):21–9.

36. Libby P, Pasterkamp G. Requiem for the 'vulnerable plaque.' Eur Heart J. 2015 Jul 22;ehv349.

37. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. Blood. 2014 May 1;123(18):2768–76.

38. van Lammeren GW, den Ruijter HM, Vrijenhoek JEP, van der Laan SW, Velema E, de Vries JPPM, et al. Time-Dependent Changes in Atherosclerotic Plaque Composition in Patients Undergoing Carotid Surgery. Circulation. 2014 Jun 3;129(22):2269–76.

39. Quillard T, Franck G, Mawson T, Folco E, Libby P. Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques. Curr Opin Lipidol. 2017 Oct;28(5):434–41.

40. Owen DRJ, Lindsay AC, Choudhury RP, Fayad ZA. Imaging of Atherosclerosis. Annu Rev Med. 2011 Feb 18;62(1):25–40.

41. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. Nat Med. 2011 Nov 7;17(11):1410–22.

42. Jones WS, Patel MR, Dai D, Vemulapalli S, Subherwal S, Stafford J, et al. High mortality risks after major lower extremity amputation in Medicare patients with peripheral artery disease. Am Heart J. 2013 May;165(5):809-815.e1.

43. Murabito JM, Evans JC, Larson MG, Nieto K, Levy D, Wilson PWF. The Ankle-Brachial Index in the Elderly and Risk of Stroke, Coronary Disease, and Death. Arch Intern Med. 2003 Sep 8;163(16):1939.

44. F G R Fowkes, G D Murray, I Butcher. Ankle Brachial Index Combined With Framingham Risk Score to Predict Cardiovascular Events and Mortality. JAMA. 2008 Jul 9;300(2):197.

45. Ohman EM, Bhatt DL, Steg PG, Goto S, Hirsch AT, Liau CS, et al. The REduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry: An international, prospective, observational investigation in subjects at risk for atherothrombotic events-study design. Am Heart J. 2006 Apr;151(4):786.e1-786.e10.

46. Marrett E, DiBonaventura M daCosta, Zhang Q. Burden of peripheral arterial disease in Europe and the United States: a patient survey. Health Qual Life Outcomes. 2013 Dec 22;11(1):175.

47. Fowkes FGR, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. The Lancet. 2013 Oct;382(9901):1329–40.

48. Shu J, Santulli G. Update on peripheral artery disease: Epidemiology and evidence-based facts. Atherosclerosis. 2018 Aug;275:379–81.

49. Hiatt WR, Fowkes FGR, Heizer G, Berger JS, Baumgartner I, Held P, et al. Ticagrelor versus Clopidogrel in Symptomatic Peripheral Artery Disease. New England Journal of Medicine. 2017 Jan 5;376(1):32–40.

50. Gnatiuc L, Herrington W, Halsey J, Tuomilehto J, Fang X, Kim H, et al. Sex-specific relevance of diabetes to occlusive vascular and other mortality: a collaborative meta-analysis of individual data from 980 793 adults from 68 prospective studies. Lancet Diabetes Endocrinol. 2018 Jul;6(7):538–46.

51. Anahita Dua, Cheong J Lee. 9. Cardiovascular Disease and Risk Management: *Standards of Medical Care in Diabetes—2018*. Diabetes Care. 2018 Jan 1;41(Supplement_1):S86–104.

52. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). J Vasc Surg. 2007 Jan;45(1):S5–67.

53. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzer NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic). Circulation. 2006 Mar 21;113(11).

54. Teraa M, Conte MS, Moll FL, Verhaar MC. Critical Limb Ischemia: Current Trends and Future Directions. J Am Heart Assoc. 2016 Feb 23;5(2).

55. Aday AW, Matsushita K. Epidemiology of Peripheral Artery Disease and Polyvascular Disease. Circ Res. 2021 Jun 11;128(12):1818–32.

56. Bozkurt AK, Tasci I, Tabak O, Gumus M, Kaplan Y. Peripheral artery disease assessed by ankle-brachial index in patients with established cardiovascular disease or at least one risk factor for atherothrombosis - CAREFUL Study: A national, multi-center, cross-sectional observational study. BMC Cardiovasc Disord. 2011 Dec 19;11(1):4.

57. Hirsch AT. Peripheral Arterial Disease Detection, Awareness, and Treatment in Primary Care. JAMA. 2001 Sep 19;286(11):1317.

58. Rutherford RB. Acute limb ischemia: Clinical assessment and standards for reporting. Semin Vasc Surg [Internet]. 1992 [cited 2023 Mar 29];5(1):4–10. Available from: https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0026587863&partnerID=40&md5=a65d54ccb3bb65941b28275dc08f752

59. Antoniou GA, Ibrahim R, Ahmad N, Torella F. Commentary: TASC II Anatomic Classification for Infrapopliteal Arterial Disease. Journal of Endovascular Therapy. 2015 Oct 3;22(5):678–80.

60. Jaff MR, White CJ, Hiatt WR, Fowkes GR, Dormandy J, Razavi M, et al. An update on methods for revascularization and expansion of the TASC lesion classification to include below-the-knee arteries: A supplement to the inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II): The TASC steering commi. Catheterization and Cardiovascular Interventions. 2015 Oct;86(4):611–25.

61. Collins TC, Suarez-Almazor M, Bush RL, Petersen NJ. Gender and Peripheral Arterial Disease. The Journal of the American Board of Family Medicine. 2006 Mar 1;19(2):132–40.

62. Berretta J, Morillon A. Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. EMBO Rep. 2009 Sep 14;10(9):973–82.

63. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. Nature. 2012 Sep 5;489(7414):101–8.

64. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, et al. The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. Science (1979). 2005 Sep 2;309(5740):1559–63.

65. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. Genome Res. 2012 Sep 5;22(9):1775–89.

66. Mattick JS, Taft RJ, Faulkner GJ. A global view of genomic information – moving beyond the gene and the master regulator. Trends in Genetics. 2010 Jan;26(1):21–8.

67. Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. Cell. 2009 Feb;136(4):629–41.

68. Rinn JL, Chang HY. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. Annu Rev Biochem. 2012 Jul 7;81(1):145–66.

69. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet. 2011 Dec 18;12(12):861–74.

70. Geisler S, Coller J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Nov 9;14(11):699–712.

71. Ulitsky I, Bartel DP. lincRNAs: Genomics, Evolution, and Mechanisms. Cell. 2013 Jul;154(1):26–46.

72. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. Nat Rev Genet. 2016 Jan 15;17(1):47–62.

73. Mercer TR, Dinger ME, Sunkin SM, Mehler MF, Mattick JS. Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008 Jan 15;105(2):716–21.

74. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. Nature. 2009 Mar 1;458(7235):223–7.

75. Alcid EA, Tsukiyama T. ATP-dependent chromatin remodeling shapes the long noncoding RNA landscape. Genes Dev. 2014 Nov 1;28(21):2348–60.

76. Wilusz JE. Long noncoding RNAs: Re-writing dogmas of RNA processing and stability. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms. 2016 Jan;1859(1):128–38.

77. Zhang Y, Yang L, Chen LL. Life without A tail: New formats of long noncoding RNAs. Int J Biochem Cell Biol. 2014 Sep;54:338–49.

78. Mondal T, Rasmussen M, Pandey GK, Isaksson A, Kanduri C. Characterization of the RNA content of chromatin. Genome Res. 2010 Jul;20(7):899–907.

79. Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009 Jul 14;106(28):11667–72.

80. van Heesch S, van Iterson M, Jacobi J, Boymans S, Essers PB, de Bruijn E, et al. Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes. Genome Biol. 2014;15(1):R6.

81. Clark MB, Johnston RL, Inostroza-Ponta M, Fox AH, Fortini E, Moscato P, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. Genome Res. 2012 May;22(5):885–98.

82. Barlow DP, Bartolomei MS. Genomic Imprinting in Mammals. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014 Feb 1;6(2):a018382–a018382.

83. Zhang Y, Tycko B. Monoallelic expression of the human H19 gene. Nat Genet. 1992 Apr;1(1):40–4.

84. Sleutels F, Zwart R, Barlow DP. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. Nature. 2002 Feb;415(6873):810–3.

85. Lee JT. Epigenetic Regulation by Long Noncoding RNAs. Science (1979). 2012 Dec 14;338(6113):1435–9.

86. Pelechano V, Steinmetz LM. Gene regulation by antisense transcription. Nat Rev Genet. 2013 Dec 12;14(12):880–93.

87. Latos PA, Pauler FM, Koerner M V., Şenergin HB, Hudson QJ, Stocsits RR, et al. *Airn* Transcriptional Overlap, But Not Its lncRNA Products, Induces Imprinted *Igf2r* Silencing. Science (1979). 2012 Dec 14;338(6113):1469–72.

88. Ulveling D, Francastel C, Hubé F. When one is better than two: RNA with dual functions. Biochimie. 2011 Apr;93(4):633–44.

89. Colak D, Zaninovic N, Cohen MS, Rosenwaks Z, Yang WY, Gerhardt J, et al. Promoter-Bound Trinucleotide Repeat mRNA Drives Epigenetic Silencing in Fragile X Syndrome. Science (1979). 2014 Feb 28;343(6174):1002–5.

90. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA Component of Human Telomerase. Science (1979). 1995 Sep;269(5228):1236–41.

91. Lorenzen JM, Thum T. Long noncoding RNAs in kidney and cardiovascular diseases. Nat Rev Nephrol. 2016 Jun 3;12(6):360–73.

92. Wang KC, Chang HY. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. Mol Cell. 2011 Sep;43(6):904–14.

93. Ning Y, Yong F, Haibin Z, Hui S, Nan Z, Guangshun Y. LincRNA-p21 activates endoplasmic reticulum stress and inhibits hepatocellular carcinoma. Oncotarget. 2015 Sep 29;6(29):28151–63.

94. Ballantyne MD, Pinel K, Dakin R, Vesey AT, Diver L, Mackenzie R, et al. Smooth Muscle Enriched Long Noncoding RNA (*SMILR*) Regulates Cell Proliferation. Circulation. 2016 May 24;133(21):2050–65.

95. Huang C, Hu YW, Zhao JJ, Ma X, Zhang Y, Guo FX, et al. Long Noncoding RNA *HOXC-AS1* Suppresses Ox-LDL-Induced Cholesterol Accumulation Through Promoting *HOXC6* Expression in THP-1 Macrophages. DNA Cell Biol. 2016 Nov;35(11):722–9.

96. Findley CM, Mitchell RG, Duscha BD, Annex BH, Kontos CD. Plasma Levels of Soluble Tie2 and Vascular Endothelial Growth Factor Distinguish Critical Limb Ischemia From Intermittent Claudication in Patients With Peripheral Arterial Disease. J Am Coll Cardiol. 2008 Jul;52(5):387–93.

97. Pérez-Cremades D, Cheng HS, Feinberg MW. Noncoding RNAs in Critical Limb Ischemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020 Mar;40(3):523–33.

98. Hazarika S, Dokun AO, Li Y, Popel AS, Kontos CD, Annex BH. Impaired Angiogenesis After Hindlimb Ischemia in Type 2 Diabetes Mellitus. Circ Res. 2007 Oct 26;101(9):948–56.

99. Iyer SR, Annex BH. Therapeutic Angiogenesis for Peripheral Artery Disease. JACC Basic Transl Sci. 2017 Oct;2(5):503–12.

100. Abu Dabrh AM, Steffen MW, Undavalli C, Asi N, Wang Z, Elamin MB, et al. The natural history of untreated severe or critical limb ischemia. J Vasc Surg. 2015 Dec;62(6):1642-1651.e3.

101. Gross DA, Cheng HS, Zhuang R, Mccoy MG, Pérez-Cremades D, Salyers Z, et al. Deficiency of lncRNA SNHG12 impairs ischemic limb neovascularization by altering an endothelial cell cycle pathway. 2022; Available from: https://doi.org/10.1172/jci.

102. Haemmig S, Yang D, Sun X, Das D, Ghaffari S, Molinaro R, et al. Long noncoding RNA *SNHG12* integrates a DNA-PK–mediated DNA damage response and vascular senescence. Sci Transl Med. 2020 Feb 19;12(531).

103. Rayner KJ. Leading the Long Noncoding RNA Pack: PELATON in Human Atherosclerosis. Vol. 40, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 495–7.

104. Lin Z, Zhou Z, Guo H, He Y, Pang X, Zhang X, et al. Long noncoding RNA gastric cancer-related lncRNA1 mediates gastric malignancy through miRNA-885-3p and cyclin-dependent kinase 4. Cell Death Dis. 2018 May 22;9(6):607.

105. Zheng D, Liu J, Piao H, Zhu Z, Wei R, Liu K. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: Focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis. Front Immunol. 2022 Nov 1;13.

106. Mittler R. ROS Are Good. Trends Plant Sci. 2017 Jan;22(1):11–9.

107. Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guilland JC, Lorgis L, Cottin Y, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? Pharmacol Ther. 2013 Dec;140(3):239–57.

108. Chen W, Zhao M, Zhao S, Lu Q, Ni L, Zou C, et al. Activation of the TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway contributes to inflammation in diabetic retinopathy: a novel inhibitory effect of minocycline. Inflammation Research. 2017 Feb 26;66(2):157–66.

109. Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, Piątkowski P, Bagiński B, Wirecki TK, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. Nucleic Acids Res. 2018 Jan 4;46(D1):D303–7.

110. Radak Z, Boldogh I. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: Links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2010 Aug 15;49(4):587–96.

111. Guo C, Chen Q, Chen J, Yu J, Hu Y, Zhang S, et al. 8-Hydroxyguanosine as a possible RNA oxidative modification marker in urine from colorectal cancer patients: Evaluation by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 2020 Jan;1136:121931.

112. Jozefczuk J, Adjaye J. Quantitative Real-Time PCR-Based Analysis of Gene Expression. In 2011. p. 99–109.

113. Lin A V. Direct ELISA. In 2015. p. 61–7.

114. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and Risk Factors for Peripheral Arterial Disease in the United States. Circulation. 2004 Aug 10;110(6):738–43.

115. Bian W, Jing X, Yang Z, Shi Z, Chen R, Xu A, et al. Downregulation of LncRNA NORAD promotes Ox-LDL-induced vascular endothelial cell injury and atherosclerosis. Aging. 2020 Apr 8;12(7):6385–400.

116. Meng F, Yan J, Ma Q, Jiao Y, Han L, Xu J, et al. Expression status and clinical significance of lncRNA *APPAT* in the progression of atherosclerosis. PeerJ. 2018 Jan 17;6:e4246.

117. Chen L, Huang Y. High expression of lncRNA PELATON serves as a risk factor for the incidence and prognosis of acute coronary syndrome. Sci Rep. 2022 May 16;12(1):8030.

118. Loffredo L, Marcoccia A, Pignatelli P, Andreozzi P, Borgia MC, Cangemi R, et al. Oxidative-stress-mediated arterial dysfunction in patients with peripheral arterial disease. Eur Heart J. 2006 Nov 28;28(5):608–12.

119. Martinet W, Knaapen MWM, De Meyer GRY, Herman AG, Kockx MM. Elevated Levels of Oxidative DNA Damage and DNA Repair Enzymes in Human Atherosclerotic Plaques. Circulation. 2002 Aug 20;106(8):927–32.

120. Steffen Y, Vuillaume G, Stolle K, Roewer K, Lietz M, Schueller J, et al. Cigarette smoke and LDL cooperate in reducing nitric oxide bioavailability in endothelial cells via effects on both eNOS and NADPH oxidase. Nitric Oxide. 2012 Oct;27(3):176–84.

121. Csiszar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2009 Jul;297(1):H13–20.

122. Jaimes EA, DeMaster EG, Tian RX, Raij L. Stable Compounds of Cigarette Smoke Induce Endothelial Superoxide Anion Production via NADPH Oxidase Activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Jun;24(6):1031–6.

123. Bai J, Liu J, Fu Z, Feng Y, Wang B, Wu W, et al. Silencing lncRNA AK136714 reduces endothelial cell damage and inhibits atherosclerosis. Aging. 2021 May 31;13(10):14159–69.

124. Fu H, Zhang Z, Li D, Lv Q, Chen S, Zhang Z, et al. LncRNA PELATON, a Ferroptosis Suppressor and Prognositic Signature for GBM. Front Oncol. 2022 Apr 28;12.

125. Ouyang S, You J, Zhi C, Li P, Lin X, Tan X, et al. Ferroptosis: the potential value target in atherosclerosis. Cell Death Dis. 2021 Aug 10;12(8):782.

126. Nowak WN, Deng J, Ruan XZ, Xu Q. Reactive Oxygen Species Generation and Atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017 May;37(5).

EKLER

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

01) Davet edildiğiniz çalışma "Periferik Arter Hastalığında PELATON Geni ile RNA Hasarı Arasındaki İlişkinin Araştırılması" başlıklı akademik amaçlı araştırma projesidir. Bu araştırmada PELATON gen ifadesi ve oksidatif RNA hasarı periferik arterlerinde tıkanıklık bulunan bireylerde araştırılacak ve kardiyovasküler hastalık oluşma riski incelenecektir. Alınan sonuçların ileride yapılacak olan koruyucu tedavi yöntemlerine yol gösterici olması hedeflenmektedir. Bu çalışma bir genetik araştırmadır ve bu nedenle sizden alınacak örnek ile genetik yapınız incelenecektir.

02) Bu çalışmanın amacı periferik arterlerinde tıkanıklık gözlenen bireylerde PELATON geninin rolünü araştırmaktır. Periferik arter tıkanıklıkları çok sayıda gen ve çevresel faktörün etkisi sonucu oluşan kompleks bir hastalıktır. Genetik faktörler aterosklerotik periferik arter hastalığı riski için önemli rol oynamaktadır.

03) Bu çalışmada hasta ve kontrol grubu olmak üzere 2 örnek grubu kullanılacaktır. Kontrol grubunu kalp-damar hastalığı bulunmayan sağlıklı 100 örnek oluşturacaktır. Hasta grubunun aterosklerotik periferik arter hastalığı bulunan 100 bireyden oluşması planlanmıştır. Kontrol grubundan ve periferik arter hastalığı bulunan bireylerden moleküler analizi yapılmak üzere kan örneği alınacaktır.

04) Eğer araştırmayı kabul ederseniz görevli hekim tarafından muayene edileceksiniz ve bulgularınız kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız. İzniniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için sizden kan örneği alınacak ve periferik arter hastaları için rutin olarak yapılan kan testi sonuçları kullanılacaktır.

05) Çalışmaya 100 periferik arter hastası ve 100 sağlıklı gönüllünün katılımıyla, çalışmanın 24 ay içinde tamamlanması planlanmaktadır. Bu araştırma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. Laboratuvarında yürütülecektir.

06) Araştırmaya katılımınız sizin isteğinize bağlıdır. İstediğiniz zaman herhangi bir cezaya ve yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilirsiniz. Aynı şekilde, araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı bırakılabileceksiniz.

07) Bu araştırmanın size veya ailenize bir yarar getirip getirmeyeceğini şimdiden söylemek mümkün değildir, size bu konuda söz verilemez.

08) Size bu çalışmada herhangi bir madde verilmeyecektir.

09) Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret talep edilmemektedir. Bunun yanı sıra size de bir ödeme yapılmayacaktır. Bağlı bulunduğunuz Sosyal Güvenlik Kurumundan (SGK) herhangi bir ücret alınmayacaktır.

10) Sizinle ilgili tüm klinik bilgiler, klinik bulgular ve elde edilecek genetik bulgular gizli kalacak ve kimseyle paylaşılmayacaktır. Araştırma sonuçlarının yayınlanmasında dahi kimlik bilgileriniz kimseyle paylaşılmayacaktır.

11) Araştırma konusuyla ilgili ve araştırmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler edinildiğinde gönüllü veya yasal temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir. Araştırma hakkında ve araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği telefon numarası: Dr. Öğr. Üyesi Berk Arapi

12) Sizden bir defaya mahsus olmak üzere kolunuzdan 10 ml kan alınacaktır.

13) Toplanan örnekler yurt dışına analiz amacı ile gönderilmeyecektir.

14) Çalışmaya katılmaya karar verirseniz kimliğinizin gizli kalması koşuluyla bu araştırmadan elde edilecek bilgi ve bulguların istendiğinde ilgili resmi makamlara verilebileceğini ve bilimsel amaçla yayınlanabileceğini kabul etmiş olursunuz.

15) Bu araştırma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, CerrahpaşaTıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. Laboratuvarında yürütülecektir.

16) Bu formu imzalamadan önce, kendi haklarınız ile ilgili sorularınız varsa lütfen sorun. Daha sonra bu konularla ilgili sorunuz olursa, ya da herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi almak isterseniz proje yürütücüsü Moleküler Biyolog Dilaver Kılıç ve Dr. Öğr. Üyesi Berk Arapi ile 24 saat irtibata geçebilirsiniz.

Dilaver Kılıç: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. Telefon:

Dr. Öğr. Üyesi Berk Arapi: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi A.D. Telefon:

(Bu yazının bir kopyası da size verilecektir)

Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi

isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

"Periferik Arter Hastalığında PELATON Geni ile RNA Hasarı Arasındaki İlişkinin Araştırılması" isimli çalışma kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan)

□ Sadece bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum

□ İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum

□ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum

Gönüllünün
Adı ve Soyadı:
İmzası:
Tarih:
Tel:

Araştırmacı
Adı ve Soyadı:
İmzası:
Tarih:
Tel:

Gerekiyorsa Olur İşlemine Tanık olan kişinin
Adı ve Soyadı:
İmzası:
Tarih:
Tel:

Gerekiyorsa Yasal Temsilcinin
Adı ve Soyadı:
İmzası:
Tarih:
Tel:

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

PERİFERİK ARTER HASTALIĞINDA PELATON GENİ İLE RNA HASARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%12	%11	%5	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%7
2	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	9lib.net İnternet Kaynağı	<%1
5	KESKİN, Havva, TİMUR, Özge, KAYA, Yasemin, UTLU, Mustafa, YILDIZ, Faruk, ADEMOĞLU, Esra, KADI, Melek, BUDAK, Mehmet Emin, GÖZCÜ, Hakan, SEVİMLİ, Hakan, ARIKAN, Şenay, ÇARLIOĞLU, Ayşe and KAMALAK, Zeynep. "Polikistik over sendromlu hastalarda artmış ürik asit düzeyleri ve", DNT Ortadoğu Yayıncılık AŞ, 2016. Yayın	<%1
6	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1

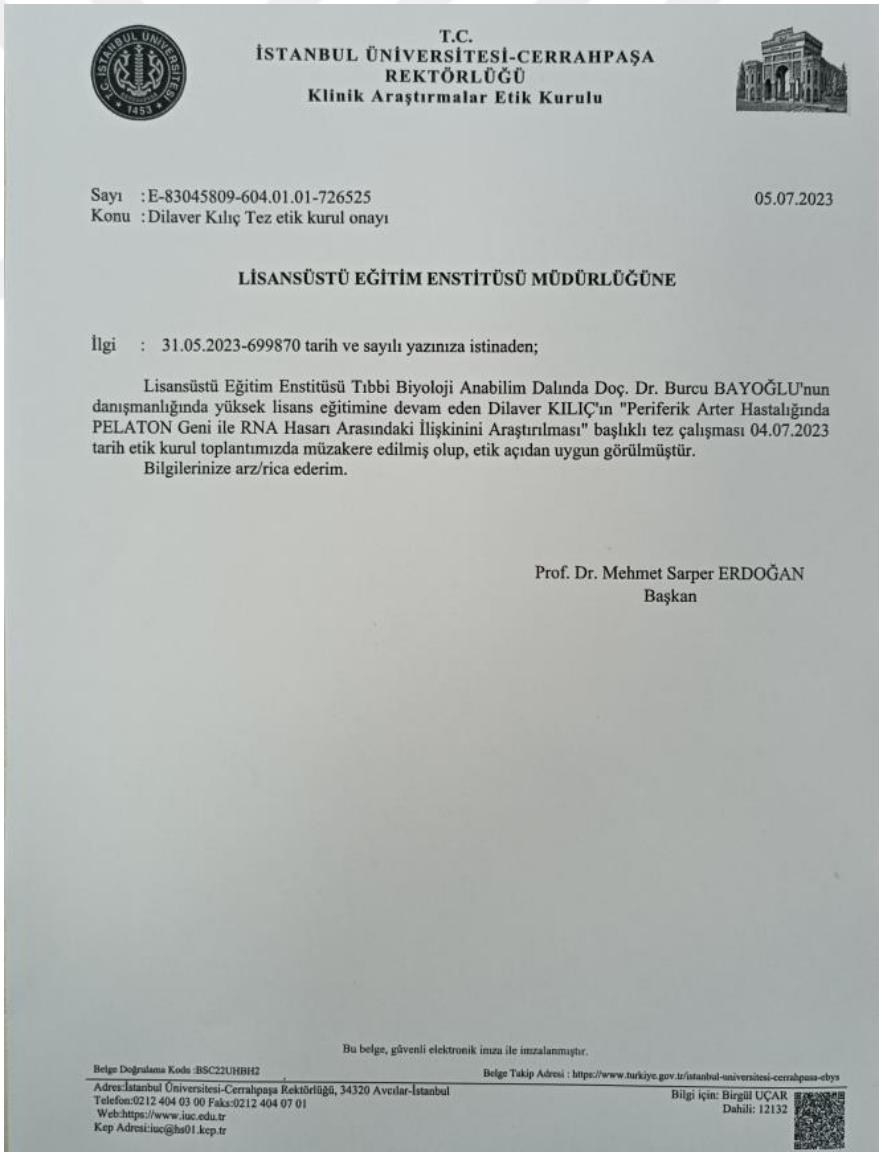
ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☒ **Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☐ **Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

Dilaver KILIÇ
(İmza)



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-83045809-604.01.01-726525 05.07.2023
Konu : Dilaver Kılıç Tez etik kurul onayı

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 31.05.2023-699870 tarih ve sayılı yazınıza istinaden;

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Doç. Dr. Burcu BAYOĞLU'nun danışmanlığında yüksek lisans eğitimine devam eden Dilaver KILIÇ'ın "Periferik Arter Hastalığında PELATON Geni ile RNA Hasarı Arasındaki İlişkinini Araştırılması" başlıklı tez çalışması 04.07.2023 tarih etik kurul toplantımızda müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun görülmüştür.
Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof. Dr. Mehmet Sarper ERDOĞAN
Başkan

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu :BSC22UHBH2 Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/istanbul-universitesi-cerrahpasa-ebys
Adres:İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Rektörlüğü, 34320 Avcılar-İstanbul
Telefon:0212 404 03 00 Faks:0212 404 07 01
Web:https://www.iuc.edu.tr
Kep Adresi:iuc@hs01.kep.tr
Bilgi için: Birgül UÇAR
Dahili: 12132

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☐ **Kurum izni gerekmektedir.**

☒ **Kurum izni gerekmemektedir.**

Dilaver KILIÇ
(İmza)