T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Aorta-İliak ve Femoro - Popliteal Arter Oklüzyonlu Hastalarda HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 Gen Ekspresyonu Düzeylerinin Oksidatif RNA Hasarı ile İlişkisinin Araştırılması

Afsoon GHORISHIZADEH

DANIŞMAN
Doç. Dr. Burcu BAYOĞLU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Doktora Programı

Haziran, 2026

TEZ KABUL VE ONAYI

Afsoon GHORISHIZADEH tarafından, **Doç. Dr. Burcu BAYOĞLU** danışmanlığında hazırlanan " **Aorta-İliak ve Femoro-Popliteal Arter Oklüzyonlu Hastalarda HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 Gen Ekspresyonu Düzeylerinin Oksidatif RNA Hasarı ile İlişkisinin Araştırılması** " başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **01/06/2026** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Doç. Dr. Burcu BAYOĞLU İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi BiyolojiAnabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Emrah YÜCESAN İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Nörogenetik Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Dr. öğr. Üyesi Sonay Temurhan İstanbul Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi.Tuğba SOYDAŞ İstanbul Aydın Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret

Sevgili Annem, Babam, Kardeşim ve her adımda yanımda olan kıymetli Eşime ithaf ediyorum ...

BÜTÇE DESTEKLERİ

Aorta-İliak ve Femoro - Popliteal Arter Oklüzyonlu Hastalarda HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 Gen Ekspresyonu Düzeylerinin Oksidatif RNA Hasarı ile İlişkisinin Araştırılması

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 36834

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. GİRİŞ 1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE 3
2.1. Ateroskleroz 3
2.2. Aterosklerozun Patogenezi ve İlerlemesi 5
2.3. Periferal arter hastalığı (PAH) 8
2.4. Tanımlar ve sınıflandırmalar 9
2.5. Epidemiyoloji 10
2.6. Risk faktörleri 11
2.6.1. PAH için değiştirilemez risk faktörleri (Non-modifiable risk factors) 12
2.6.2. PAH için değiştirilebilir risk faktörleri (Modifiable risk factors) 12
2.7. Tanı 15
2.7.1. Dolaşımdaki vasküler biyobelirteçler 16
2.8. Periferik arter hastalığı için tedaviler 16
2.8.1. Tıbbi tedavi 16
2.8.2. Gözetimli egzersiz terapisi 17
2.8.3. Endovasküler ve açık cerrahi revaskülarizasyon 17
2.8.4. Negatif basınç ile tedavi 18
2.8.5. FlowOx cihazı 18
2.9. Oksidatif RNA Hasarı 19
2.9.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri 19
2.9.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Hücre Hasarı 20

2.9.3. RNA Oksidasyonu 21
2.10. LncRNA'lar 21
2.10.1. HIF1A-AS1 24
2.10.2. HIF1A-AS2 27
2.11. GERÇEK ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (qRT-PCR) 31
2.12. ELISA (Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi) 32
3. YÖNTEM 34
3.1. ÇALIŞMA GRUBU 34
3.2. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME 34
3.2.1. Kullanılan Kimyasallar: 35
3.2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar: 35
3.2.3. RNA izolasyon kitinde kullanılan tampon ve çözeltiler 36
3.2.4. Kullanılan Cihazlar 36
3.3. YÖNTEMLER 37
3.3.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu 37
3.3.2. Total RNA İzolasyon Protokolü 37
3.3.3. RNA Konsantrasyonu ve Saflığının Analizi 38
3.3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) 40
3.3.5. Normalizasyon 40
3.3.6. qRT-PCR Reaksiyon karışımının hazırlanması 41
3.3.7. Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA) 43
3.4. İstatistiksel Analiz 45
4. BULGULAR 46
5. TARTIŞMA 62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 73

KAYNAKLAR 80

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Sağlıklı bir orta ila büyük arterin kesiti 4
Şekil 2.2: Sağlıklı bir arterden plak rüptürüne kadar aterom plağı oluşumunun şematik gösterimi 6
Şekil 2.3: RNA'da bulunan ana oksidatif lezyonlar ……..…….…19
Şekil 2.4: Hipoksi ve HIF-1α, makrofajlarda lipid metabolizmasının düzenlenmesindeki rolu 26
Şekil 2.5: Kolesterol ve lipid mikroçevresi, HIF-1α'nın düzenlenmesindeki rolu ……..... ……29
Şekil 2.6: Aterosklerozda lncRNA HIF1A-AS2 aracılı inflamasy onla ilişkili mekanizmaları gösterenşema ……..…….....….....…….....……30
Şekil 2.7: HIF1a-AS2 Kromozom 14'te lokasiyonu …….……31
Şekil 3-1: ELISA DNA/RNA Oksidatif Hasar Standartlarının hazırlanması 44
Şekil 3-2: Plate Formatı 44
Şekil 4-1: Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet dağılımları 47
Şekil 4-2: PAH ve kontrol gruplarında HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 genlerine ait amplifikasyon eğrileri 48
Şekil 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında HIF1A-AS1genine ait kat değişimi 49
Şekil 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında HIF1A-AS2genine ait kat değişimi 50
Şekil 4-5: Hasta ve kontrol gruplarındaoksidatif DNA/RNA hasar miktarı 51
Şekil 4-6: PAH grubunda HIF1A-AS1 gen ekspresyonu ile oksidatif DNA/RNA hasar düzeyi arasındaki korelasyon 53

Şekil 4-7: PAH grubunda HIF1A-AS2 gen ekspresyonu ile oksidatif DNA/RNA hasar düzeyi arasındaki korelasyon 54

Şekil 4-8: PAH grubunda HIF1A-AS1 gen ekspresyonu ile serum CRP düzeyleri arasındaki korelasyon 55

Şekil 4-9: PAH grubunda HIF1A-AS2 gen ekspresyonu ile serum CRP düzeyleri arasındaki korelasyon 56

Şekil 4-10: PAH grubunda HIF1A-AS1 gen ekspresyonu ile serum Total Kolesterol düzeyleri arasındaki korelasyon 57

Şekil 4-11: PAH grubunda HIF1A-AS2 gen ekspresyonu ile açlık kan şekeri düzeyleri arasındaki korelasyon 58

Şekil 4-12: Protein–Protein Etkileşim Ağı 61

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Periferik arter hastalıklarının Periferik arter hastalıklarının Fontaine'in evrelerine ve Rutherford'un kategorilerine göre sınıflandırılması 10

Tablo 3-1: RNA İzolasyon Kiti: PureLink™ RNA Mini Kit İçeriği ve Kullanım Öncesi Hazırlıklar 35

Tablo 3-2: Kullanılan Kalıp RNA ve Primer Karışımının İçeriği 39

Tablo 3-3: RT reaksiyonunda kullanılan maddelerin konsantrasyonları 39

Tablo 3-4: cDNA reaksiyon döngüleri 40

Tablo 3-5: Deneyde kullanılan qRT-PCR primer özellikleri 41

Tablo 3-6: PCR Karışımının hazırlanması 42

Tablo 3-7: LightCycler® qRT-PCR Programları 42

Tablo 3-8: LightCycler®qRT-PCR Sıcaklık Döngüleri 43

Tablo 4-1: PAH ve kontrol gruplarının biyokimyasal ve demografik özellikleri açısından karşılaştırılması 47

Tablo 4-2: Hasta ve Kontrol Gruplarının HIF1A-AS1 Gen Ekspresyonu açısından Karşılaştırılması 48

Tablo 4-3: Hasta ve Kontrol Gruplarının HIF1A-AS2 Gen Ekspresyon açısından Karşılaştırılması 49

Tablo 4-4: Hasta ve kontrol gruplarının DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri açısından karşılaştırılması 50

Tablo 4-5: Hasta ve Kontrol gruplarında HIF1-AS1 ekspresyonunun cinsiyet açısından karşılaştırılması 51

Tablo 4-6: Hasta ve Kontrol gruplarında HIF1-AS2 ekspresyonunun cinsiyet açısından karşılaştırılması 52
Tablo 4-7: Hasta ve kontrol gruplarında DNA/RNA oksidatif hasar düzeylerinin cinsiyet açısından karşılaştırılması 52
Tablo 4-8: Hasta grubunda HIF1A-AS1 kat değişimi ile biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması 57

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

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)

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

DOKTORA TEZİ

Aorta-İliak ve Femoro - Popliteal Arter Oklüzyonlu Hastalarda HIF1A-AS1 ve HIF1AAS2 Gen Ekspresyonu Düzeylerinin Oksidatif RNA Hasarı ile İlişkisinin Araştırılması

Afsoon GHORISHIZADEH

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Doktora Programı

Danışman: Doç. Dr. Burcu BAYOĞLU

Ateroskleroz; kronik inflamasyon, oksidatif stres ve metabolik fonksiyon bozukluğunu içeren karmaşık bir patofizyolojiye sahiptir. Periferik arter hastalıkları (PAH), aorta ve koroner arterler dışındaki vasküler yapıların darlık veya oklüzyonu ile karakterize olup, patogenezinde hipoksi ve endotelyal fonksiyon bozukluğu temel rol oynamaktadır. Son yıllarda, uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNA) hipoksiye karşı hücresel yanıtta ve vasküler hastalıkların gelişiminde oynadıkları roller önem kazanmaktadır. Özellikle hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1α) ile ilişkili lncRNA'ların (HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2), aterosklerotik süreçte gen düzenleyici roller üstlendiği bilinmektedir.

Çalışmamızın amacı, aorta-iliak ve femoro-popliteal arter oklüzyonu olan PAH tanılı hastalarda HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 gen ekspresyon düzeylerini belirlemek ve bu düzeylerin oksidatif DNA/RNA hasarı belirteçleri olan 8-hidroksiguanozin (8-OHG), 8-Hidroksi-2′-deoksiguanozin (8-OHdG) ve 8-hidroksiguanin plazma düzeyleri ile ilişkilerini araştırmaktır. Çalışmamıza 143 PAH hastası ve 141 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Gen ekspresyonu analizleri qRT-PCR, oksidatif DNA/RNA hasar düzeyleri ise ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir.

PAH hastalarında HIF1A-AS1 gen ekspresyonu düzeyi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$). HIF1A-AS2 gen ekspresyonu PAH grubunda yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel anlamlılık sınırına erişememiştir ($p=0,28$). DNA/RNA hasar belirteçleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,76$). HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 ekspresyonları ile DNA/RNA hasar belirteçleri arasında negatif yönde korelasyon tespit edilmiş ancak istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmamıştır ($p>0,05$). HIF1AAS1 ekspresyonu ile total kolesterol ($r=0,229$, $p=0,026$), HIF1A-AS2 ekspresyonu ile açlık kan şekeri düzeyleri ($r=0,204$, $p=0,023$) arasında pozitif yönlü anlamlı ilişki saptanmıştır. Çalışmamız, PAH hastalarında HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 genlerinin rollerinin araştırıldığı ve oksidatif hasarın birlikte incelendiği ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Sonuç olarak, HIF1A-AS1 ekspresyonundaki belirgin azalma, HIF1A-AS1'in PAH patogenezinde potansiyel bir biyobelirteç veya terapötik hedef olarak değerlendirile bileceğini düşündürmektedir.

Haziran 2026, 109 sayfa.

Anahtar kelimeler: Periferik arter hastalığı, HIF1A-AS1, HIF1A-AS2, lncRNA, Oksidatif RNA hasarı, 8-OHG, 8-OHdG.

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

Investigation of the Relationship Between HIF1A-AS1 and HIF1A-AS2 Gene Expression Levels and Oxidative RNA Damage in Patients with Aortoiliac and Femoropopliteal Arterial Occlusion

Afsoon GHORISHIZADEH

İstanbul University-Cerrahpaşa Institute

of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Burcu BAYOĞLU

Atherosclerosis has a complex pathophysiology involving chronic inflammation, oxidative stress, and metabolic dysfunction. Peripheral arterial disease (PAD) is characterized by stenosis or occlusion of vascular structures other than the aorta and coronary arteries, and hypoxia and endothelial dysfunction play central roles in its pathogenesis. In recent years, long non-coding RNAs (lncRNAs) have gained increasing attention due to their roles in cellular responses to hypoxia and in the development of vascular diseases. In particular, lncRNAs associated with hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1α), such as HIF1A-AS1 and HIF1A-AS2, are known to exert gene-regulatory functions in the atherosclerotic process.

The aim of this study was to determine the expression levels of HIF1A-AS1 and HIF1A-AS2 in patients diagnosed with PAD presenting with aorto-iliac and femoro-popliteal artery occlusion, and to investigate the associations between these expression levels and plasma concentrations of oxidative DNA/RNA damage markers, including 8-hydroxyguanosine (8OHG), 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OHdG), and 8-hydroxyguanine. A total of 143

patients with PAD and 141 healthy controls were included in the study. Gene expression analyses were performed using quantitative real-time PCR (qRT-PCR), while oxidative DNA/RNA damage levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

HIF1A-AS1 gene expression levels were significantly lower in patients with PAD compared to the control group ($p < 0.001$). Although HIF1A-AS2 gene expression levels were higher in the PAD group, this increase did not reach statistical significance ($p = 0.28$). No statistically significant differences were observed between the groups with respect to DNA/RNA damage markers ($p = 0.76$). Negative correlations were shown between HIF1A-AS1 and HIF1A-AS2 expression levels and DNA/RNA damage markers; however, these correlations did not reach statistical significance ($p > 0.05$). A significant positive correlation was seen between HIF1AAS1 expression and total cholesterol levels ($r = 0.229$, $p = 0.026$), as well as between HIF1AAS2 expression and fasting blood glucose levels ($r = 0.204$, $p = 0.023$).

This study is the first to investigate the roles of HIF1A-AS1 and HIF1A-AS2 genes in patients with PAD while simultaneously evaluating oxidative damage markers. In conclusion, the marked reduction in HIF1A-AS1 expression suggests that HIF1A-AS1 may serve as a potential biomarker or therapeutic target in the pathogenesis of PAD.

Jun 2026, 109 pages.

Keywords: Peripheral arterial disease, HIF1A-AS1, HIF1A-AS2, lncRNA, oxidative RNA damage, 8-OHG, 8-OHdG.

1. GİRİŞ

Periferik arter hastalığı (PAH), sistemik aterosklerotik hastalığın alt ekstremitelerdeki yansımasıdır. PAH başlangıçta aralıklı topallama (intermittent claudication) belirtileriyle ortaya çıkabilirken, hastalığın son evresi olan kronik uzuv tehdit eden iskemi (chronic limb threatening ischaemia, CLTI), istirahat ağrısı veya doku kaybı ile kendini göstermektedir. PAH, yaşla artan sıklık gösteren bir hastalık olup yüksek gelirli ülkelerde 65 yaş ve üzerindeki bireylerin %10'undan fazlasında görülmektedir. PAH ve CLTI'nin tanımı, tanısı ve evrelendirilmesine ilişkin kılavuzlar, diyabetin artan prevalansına bağlı olarak değişen hastalık paternleri ve klinik görünümleri yansıtacak biçimde güncellenmiştir [1, 2]. PAH patogenezinin merkezinde yer alan ateroskleroz, endotel disfonksiyonu, inflamasyon, lipid birikimi ve oksidatif stresin etkileşimiyle ilerleyen kronik bir süreçtir. Başlıca risk faktörleri arasında hipertansiyon, diyabet, sigara kullanımı ve hiperkolesterolemi sayılabilir. Bu faktörler, hastalığa yakalanma riskini artırmaktadır [3].

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu dengesizlik, yalnızca DNA ve proteinlerde değil, aynı zamanda RNA moleküllerinde de hasara yol açmaktadır. Özellikle 8-okso-7,8dihidroguanozin (8-oxoG) gibi oksidatif RNA modifikasyonları, hücresel metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rol oynayan gen ekspresyon süreçlerini bozarak aterosklerotik süreçlerin hızlanmasına katkıda bulunabilmektedir [4].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA), gen düzenlemesi ve hücresel stres yanıtları üzerindeki etkisini ortaya koymuştur. LncRNA'lar protein kodlamamakla birlikte, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunu düzenleyerek hücresel homeostazın korunmasında kritik roller üstlenmektedir [5]. Özellikle hipoksi ile ilişkili faktör 1 alfa (HIF1A) geninin antisens transkriptleri olan HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2, hipoksik koşullarda endotel hücrelerinin adaptasyonunda görev alarak anjiyogenez, oksidatif stres yanıtı ve hücre ölüm süreçlerinde önemli düzenleyici moleküller olarak öne çıkmıştır [6].

Hipoksi, periferik arter hastalığının ilerlemiş evrelerinde görülen doku iskemisinin temel nedenidir ve HIF1A sinyal yolağı bu patofizyolojik yanıtın merkezinde yer almaktadır. HIF1AAS1 ve HIF1A-AS2 ekspresyonunun değişimi, oksidatif stresin artışıyla paralel seyredebilir ve bu moleküllerin RNA düzeyinde meydana gelen oksidatif hasar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [7]. Dolayısıyla, HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2'nin ekspresyon

düzeylerinin oksidatif RNA hasarı ile ilişkisini değerlendirmek, aterosklerotik süreçlerin moleküler dinamiklerini anlamada yeni bir bakış açısı sağlayabilir.

Bu tez çalışmasının amacı, aorta-iliak ve femoro-popliteal arter oklüzyonlu periferik arter hastalarında HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 gen ekspresyon düzeylerini inceleyerek bu düzeylerin oksidatif RNA hasarıyla ilişkisini araştırmaktır. Bu doğrultuda, aterosklerotik vasküler oklüzyonlarda lncRNA'ların potansiyel biyobelirteç rolü değerlendirilecek ve oksidatif stresin gen düzenleyici ağlar üzerindeki etkileri daha kapsamlı biçimde ortaya konulacaktır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

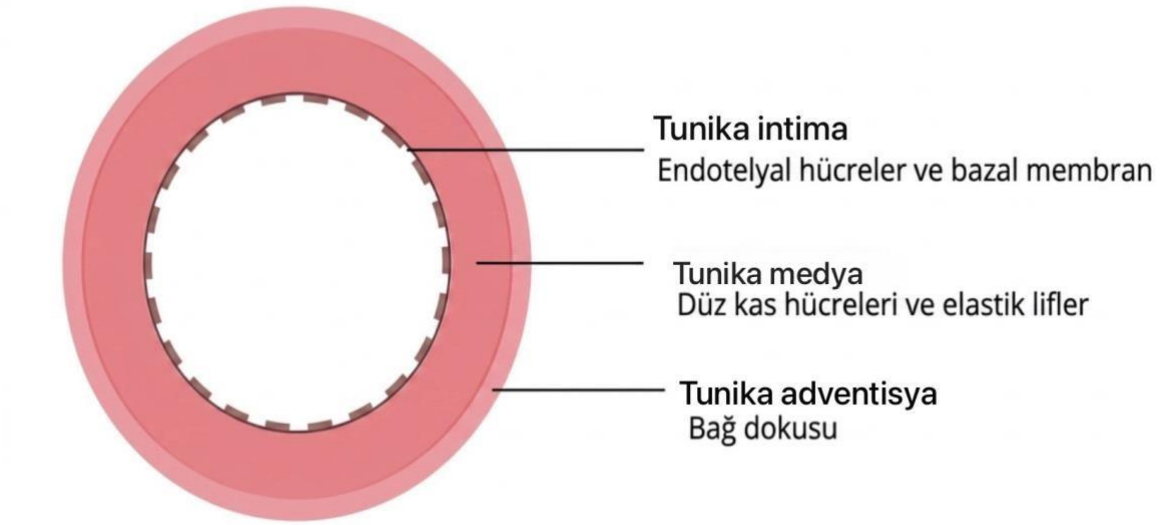
2.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz, pek çok kardiyovasküler hastalığın temelinde yer alan önemli bir sağlık sorunu olup, dünya genelinde başlıca ölüm nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir [8]. İnsan sağlığı üzerinde ciddi olumsuz etkileri bulunan ateroskleroz, özellikle yaşlı bireylerde sıkça görülen kronik bir hastalık olarak öne çıkmaktadır. Bu durum, iskemik kalp hastalıkları ve inme gibi kardiyovasküler hastalıkların başlıca nedenlerinden biri olup, karmaşık ve çok faktörlü bir yapıya sahiptir. Lipid birikimi, orta ve büyük çaplı arterlerin duvarlarında düşük düzeyli inflamasyon ve endotel işlev bozukluğu gibi özelliklerle kendini gösteren ilerleyici bir patoloji olarak tanımlanmaktadır. Aterosklerozun ilerlemesinde en önemli iki etken ise kolesterol birikimi ve kronik inflamasyondur [9].

Aterosklerozun ilk tanımlarından biri Leonardo DaVinci (1452-1519) zamanına dayanmaktadır; DaVinci yaşlı bir adamın otopsisini yaptıktan sonra ölümün "kanın ve kalbi besleyen arterin yetmezliğinden" kaynaklandığını belirtmiştir [10, 11]. Ateroskleroz sürecine ilişkin modern kavram, 1858 yılında aterosklerotik plağın inflamatuar doğasını tanımlayan ve aterosklerozu aktif bir doku reaksiyonu süreci olarak kabul eden Rudolf Virchow tarafından ortaya konulmuştur [12]. 1908 yılında Ehrlich ve Mechnikov adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık tepkileri üzerine yaptıkları çalışmalarla Nobel ödülü almışlardır [13], ancak bu kavramların ateroskleroz bağlamında anlaşılması neredeyse bir yüzyıl sonrasına kadar benimsenmemiştir. 20. yüzyılın büyük bölümünde ateroskleroz, arter duvarında kolesterol ve hücresel artıkların toplanmasıyla karakterize bir kolesterol depolama hastalığı olarak kabul ediliyordu [14]. 1970'lerde aterosklerotik plakların oluşumunda düz kas hücrelerinin proliferasyonuna giderek daha fazla odaklanılmış [15, 16] ve aterosklerotik sürecin arteriyel endotelin mekanik, immünolojik veya kimyasal yaralanmasıyla başlatılabileceğinin gözlemlenmesi yaralanmaya yanıt hipotezini oluşturmuştur [17, 18]. Bununla birlikte, aterosklerozun inflamatuar bir hastalık olduğu ancak son 30 yıldır kabul görmektedir [19].

Aterosklerotik lezyonlar genellikle büyük ve orta büyüklükteki arterlerde görülmektedir. Vücuttaki sağlıklı bir orta ila büyük arter histolojik olarak üç farklı katmandan oluşmaktadır: tunika intima, tunika media ve tunika adventisya (Şekil 2.1). Tunika intima, değişken kalınlıkta elastik bir kolajen tabaka tarafından desteklenen sürekli bir endotelyal hücre tabakasından oluşmaktadır. Tunika media, değişken oranlarda düz kas hücreleri ve elastik bileşenlerden oluşan bir tabakadan oluşmaktadır. Tunika adventisya, daha büyük arterlerde damar duvarına

kan akışını sağlayan vasa vasorum içerebilen kolajen bir tabakadır [20]. Endotel hücreleri, kan akışı ve çevre dokular arasındaki alışverişi düzenlemekte ve vasküler tonusu, hücresel yapışmayı, tromborezistansı, düz kas hücre proliferasyonunu ve damar duvarı inflamasyonunu etkileyen faktörlerin salınımı yoluyla fiziksel ve kimyasal uyaranlara yanıt verebilmektedir [21]. Olağan koşullar altında endotel, kandaki inflamatuar bileşenlerin yapışmasına karşı direnç göstermektedir. Bununla birlikte, endotel aterojenik veya proinflamatuar bir uyaranla aktive olduğunda, adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki bir artış, arter duvarına yapışan monositlerin ve T lenfositlerin toplanmasını teşvik etmektedir [22].



Şekil 2.1: Sağlıklı bir orta ila büyük arterin kesiti. [25].

Aterosklerozun erken evresinde endotel hücreleri, monositleri ve Tlenfositleri uyaran kemoatraktan sitokinleri salgılayarak endotel hücreleri arasındaki bağlantılardan diapedez olarak bilinen bir süreçle intimaya girmelerini sağlamaktadır [23]. İntima içinde, monositler lipoproteinleri içselleştirmek için reseptörler ifade eden makrofajlara dönüşmektedir. Köpük hücreleri olarak bilinen lipid yüklü makrofajlar intima içinde çoğalmakta ve ateromatöz lezyonun ilerlemesine neden olan lokal inflamatuar yanıtı güçlendiren proinflamatuar sitokinler ve reaktif oksijen türleri salgılamaktadır [24]. Histolojik olarak, aterosklerozun ilk tanınabilir

belirtisi, intima içinde lipitten zengin makrofajların ve T lenfositlerin bir araya gelmesiyle oluşan yağlı çizgilenmelerdir. Yağlı çizgilenmeler erken yaş dönemlerinde ortaya çıkabilmekte olup, bebekler ve küçük çocuklara ait otopsi materyallerinde de tanımlanmıştır. Aterosklerotik süreç ilerledikçe, yağlı çizgilenmeler aterosklerotik plaklara dönüşerek arter duvarının daralmasına neden olmaktadır. Arter duvarının daralması, bölgedeki kan akışını alt dokularda iskemi oluşturacak kadar etkilediğinde, bu durum önemli bir darlık olarak adlandırılmaktadır [25].

Aktive olmuş fagositler tarafından salgılanan matriks metalloproteinazlar, aterosklerotik plağın ekstraselüler matriks yapısını bozarak plak destabilizasyonuna ve trombotik komplikasyonların gelişimine katkıda bulunmaktadır. Fibröz plağın destabilizasyonu, özellikle plak kenarlarında yırtılma veya çatlak oluşumuna yol açabilmekte; dolaşımdaki kanın, makrofajlar tarafından üretilen plak içi pro-pıhtılaştırıcı proteinlerle teması sonucunda ise plak içinde kanama, tromboz ve arteriyel tıkanıklık gelişebilmektedir. Bu bölgedeki makrofajların hücre ölümü, aterosklerotik lezyonda sıklıkla gözlenen nekrotik çekirdeği oluşturmaktadır [25].

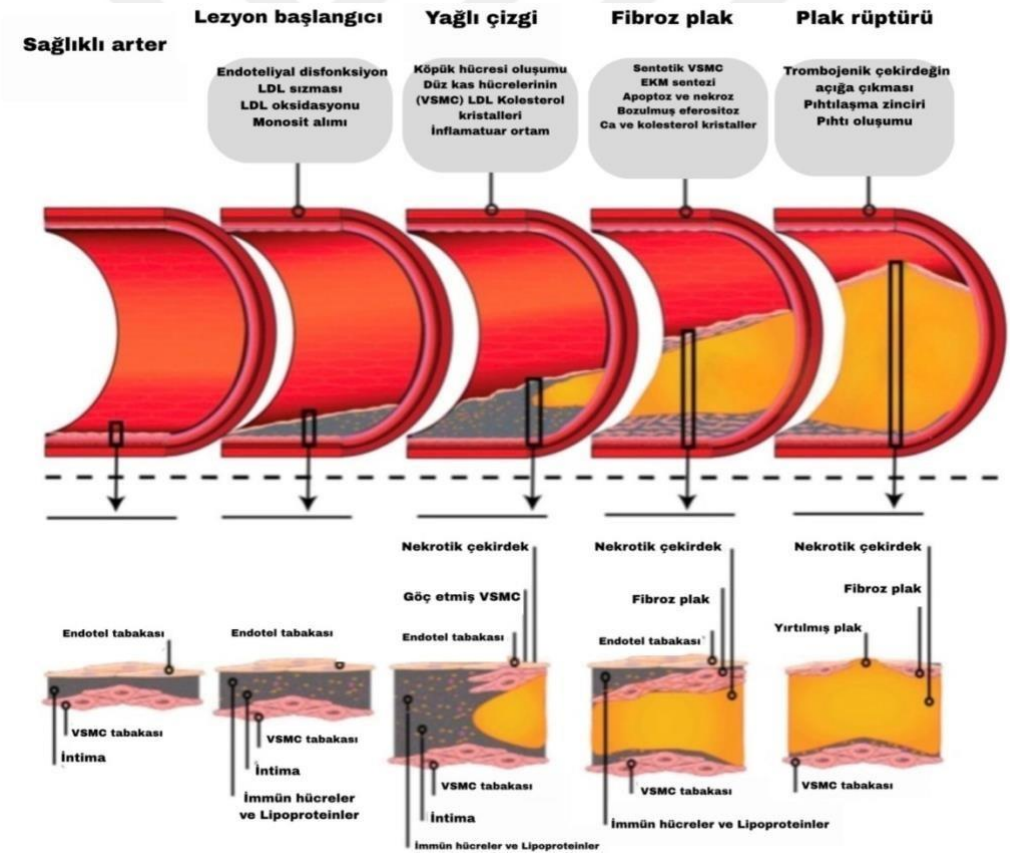
2.2. Aterosklerozun Patogenezi ve İlerlemesi

Ateroskleroz, büyük arterlerde lipidlerin, fibröz yapıların ve kalsiyum birikiminin oluşmasıyla karakterize edilen bir hastalıktır. Bu süreç, endotel aktivasyonu ile başlayarak, damar daralmasına ve inflamatuar yolların aktive edilmesine yol açan bir dizi olayı tetikleyerek aterom plak oluşumuna neden olmaktadır [26]. Tüm bu süreçler, dünya genelinde önde gelen ölüm nedeni olmaya devam eden kardiyovasküler komplikasyonlara yol açmaktadır. Aterosklerotik süreç, erken evrelerde belirti vermeksizin ilerleyebilmekte ve zamanla arter lümenini daraltarak iskemik kalp hastalığı, inme ve periferik arter hastalığı gibi ciddi kardiyovasküler komplikasyonlara neden olabilmektedir.

Aterosklerozun başlangıcı, genellikle endotel hücrelerinin oksidatif stres, hiperlipidemi, hipertansiyon veya diyabet gibi risk faktörlerine maruz kalması ile ilişkilidir. Bu faktörler, endotel hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna yol açarak damar geçirgenliğini artırmakta ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) damar duvarına girmesine neden olmaktadır [27]. LDL partikülleri burada oksidasyona uğramakta ve inflamatuar süreçleri tetiklemektedir. Monositler ve T-lenfositler, damar duvarındaki inflamasyon bölgesine çekilmekte ve monositler makrofajlara farklılaşarak okside LDL'yi fagosite etmektedir. Bu süreçte oluşan köpük hücreleri, aterosklerotik plakların temelini oluşturmaktadır [28].

Kronik inflamasyon, aterosklerozun ilerlemesinde kritik bir rol oynamaktadır. Makrofajlar ve T-hücreleri, sitokinler ve kemokinler salgılayarak inflamasyonu sürdürmektedir. Bu durum, vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC) proliferasyonu ve intima tabakasına göç etmesine yol açmaktadır [29]. Düz kas hücreleri, ekstraselüler matriks proteinleri salgılayarak fibröz bir kapsül oluşturmaktadır. Ancak bu kapsül, plakların stabilitesini sağlayamıyorsa, plaklar yırtılabilmekte ve tromboz riskini artırabilmektedir [30].

Fibröz plak gelişimi sırasında aterom plakları, yağlı çizgilenmeden intimal büyüme aşamasına geçiş yapmaktadır. Bu aşama, hücresiz ve lipid açısından zengin bir bölge olan nekrotik çekirdeğin varlığıyla karakterizedir. Plakların stabilizasyonu için nekrotik çekirdek, fibröz bir kapak ile örtülmekte ve bu süreç fibröz kapağın oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Nekrotik çekirdek ve fibröz kapak, ileri evre aterosklerozun ayırt edici özelliklerini oluşturmaktadır [31].



Şekil 2.2: Sağlıklı bir arterden plak yırtılmasına kadar aterom plağı oluşumunun şematik gösterimi, her aşamada gelişimine katkıda bulunan en önemli olayların altını çizmektedir [31].

Aterom plağı kalsifikasyonu, ileri evre aterosklerozun bir diğer ayırt edici özelliğidir. Kalsifikasyon, plaktaki kemik benzeri bir oluşum olarak bulunmakta ve inflamatuar bölgelerde kolajen liflerinin yerel olarak azalmasıyla başlamaktadır. Makrofajların ve sentetik VSMC'nin ölümü sırasında matriks veziküllerinin salınımı, plak kalsifikasyon sürecini başlatmaktadır. Bu süreçte nükleasyon bölgelerinde biriken kalsiyum ortofosfat, amorf kalsiyum fosfata ve nihayetinde kristal yapılarına dönüşmektedir [32, 33].

Ayrıca, mineralizasyon inhibitörlerinin azalması veya osteojenik transdiferansiyasyonun artması gibi diğer faktörler de kalsifikasyon sürecine katkıda bulunmaktadır. Özellikle perisitler ve VSMC'ler, ateroskleroz gelişimi sırasında osteoblast benzeri fenotiplere dönüşerek mineralize bir matriks oluşturma kapasitesi kazanmakta ve bu da kemik dokusunda olduğu gibi kalsiyum birikimlerine yol açmaktadır [34].

Bu süreç, intima ve media tabakalarında vasküler kalsifikasyonun erken evresi olan mikrokalsifikasyonlara katkıda bulunmaktadır. Mikrokalsifikasyonlar zamanla büyüyerek nekrotik çekirdeğin tabanından çevresindeki matrikse doğru genişleyen daha büyük kalsifikasyonlara dönüşmektedir. Ancak, kalsifikasyon ileri evre aterosklerozun bir göstergesi olmasına rağmen, kalsiyum birikimlerinin miktarı ve boyutu plak kırılganlığı ile doğrudan ilişkili değildir. Bunun yerine, plak kırılganlığı daha çok kalsifikasyonun tipi, konumu veya çevresel faktörlerle ilişkilidir [35, 36].

Aterosklerotik plakların yırtılması, koroner arterlerde akut trombozun en yaygın tetikleyicisi olup, miyokard enfarktüsüne neden olmaktadır. Yırtılan aterosklerotik plaklar genellikle ince fibröz bir kapakla (<60 μm) kaplanmış ve büyük bir lipid çekirdeği içermektedir. Bu özellikleri taşıyan lezyonlar genellikle "savunmasız plaklar" olarak adlandırılırken, daha kalın fibröz kapağa ve daha az lipid birikimine sahip plaklar ise "stabil plaklar" olarak tanımlanmaktadır. Her ne kadar bu sınıflandırma plak destabilizasyonunun karmaşık mekanizmalarını basitleştirse de, akut koroner sendromların patofizyolojisinin anlaşılması açısından önemli bir kavramsal çerçeve sunmaktadır [37, 38].

Bir aterosklerotik plaktaki yırtılma, plak içeriğinin kana karışmasına yol açmaktadır. Özellikle trombojenik materyaller, makrofajlar ve düz kas hücreleri tarafından üretilen doku faktörü gibi maddeler, trombozu tetikleyerek aterosklerozun en ciddi komplikasyonlarına neden olmaktadır. Bu süreç, lüminal endotelin bozulmuş homeostatik fonksiyonuyla birleştiğinde, kalıcı ve tıkayıcı trombüsler oluşturarak akut koroner sendromlara ve iskemik inmeye yol açabilmektedir [38, 39]. Tromboz, ayrıca alt ekstremitelerde kritik iskemiye neden olabilmekte ve periferik

arter hastalığını daha karmaşık hale getirebilmektedir. Arteriyel tromboz, fibrinojenin trombin aracılığıyla fibrine dönüşümünü içeren bir mekanizma ile ortaya çıkmaktadır [40].

Etkili anti-aterosklerotik tedaviler, örneğin lipid düşürücü tedaviler, hipertansiyon kontrolü ve sigarayı bırakma, plakların yapısında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Bu tedaviler sayesinde aterosklerotik plaklar daha az inflamatuvar, lipid açısından daha fakir ve daha lifli hale gelmektedir. Bu durum, plakların yırtılma riskini önemli ölçüde azaltmaktadır [41, 42]. Bununla birlikte, bu koşullar altında akut koroner sendromların başka bir mekanizması ön plana çıkabilmektedir. Plak erozyonu olarak adlandırılan bu alternatif mekanizma, tipik plak yırtılmasından farklı bir morfolojiye sahiptir. Plak erozyonu ile ilişkili lezyonlar genellikle ince bir fibröz kapak yerine zengin bir ekstraselüler matriks yapısına, az sayıda inflamatuvar hücreye ve düşük miktarda lipide sahiptir [43].

Bu bilgiler ışığında, aterosklerozun patofizyolojisini anlamak ve tedavi stratejilerini optimize etmek, hem plak yırtılmasının hem de plak erozyonunun neden olduğu komplikasyonların yönetimi açısından kritik öneme sahiptir.

2.3. Periferal arter hastalığı (PAH)

Periferik Arter Hastalığı (PAH) bir kardiyovasküler hastalıktır (CVD), periferik arterlerin daralması (stenoz) veya tıkanması ile karakterize edilmektedir. Bu da yapı ve işlev bozukluğuna yol açmaktadır [44]. PAH'ın ana nedeni aterosklerozdur ve genellikle alt uzuvlara kan akışının azalması şeklinde kendini göstermektedir. Ateroskleroz, vasküler risk faktörlerinin yol açtığı başlangıç arteriyel hasarı takiben; oksidatif stres, inflamatuvar yanıt ve endotel fonksiyon bozukluğu gibi süreçlerin katkısıyla aterosklerotik plak gelişimine uzanan karmaşık bir patofizyolojik olaylar dizisini içermektedir [44, 45]. Stenoz, periferik arteriyel sistem boyunca herhangi bir bölgede gelişebilmekte olup, buna bağlı kronik kan akımı kısıtlanması; iskemik istirahat ağrısı, iyileşmeyen yara veya ülserler, enfeksiyon, gangren ve hatta ekstremite kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Bu klinik tablo, Kronik Uzuv Tehdit Eden İskemi (Chronic LimbThreatening Ischemia, CLTI) olarak tanımlanmaktadır [46].

Semptomatik PAH, PAH'ın en yaygın belirtisi olan aralıklı topallama (IC) olarak da ortaya çıkabilmektedir [47]. Bu durum, fiziksel aktivite sırasında iskemi nedeni ile bacak ağrısı olarak kendini göstermektedir [48]. IC'li hastaların yalnızca yüzde yirmi ila yirmi beşinin revaskülarizasyona ihtiyaç duyacağı tahmin edilmektedir ve bu nedenle büyük ölçüde konservatif olarak yönetilmektedir [49]. Femoral ve popliteal arterler, IC'li bireyler arasında

darlık veya oklüzyonun en sık görüldüğü anatomik bölgelerdir; bunları tibial ve peroneal arterler ve iliak arterler takip etmektedir [50]. PAH'ın ilerlemesi doğrusal değildir; CLTI gelişen birçok hastada daha önce IC öyküsü bulunmamakta, IC mevcut olan hastaların ise yalnızca yaklaşık %5-10'unda CLTI gelişmektedir. PAH ayrıca bireylerin çoğunluğu için asemptomatik olabilmektedir [51].

2.4. Tanımlar ve sınıflandırmalar

PAH'ın klinik tablosu önemli ölçüde değişkenlik göstermekte olup, asemptomatik, akut ve kronik formlar şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Hastaları klinik, prognostik veya araştırma amacıyla objektif olarak sınıflandırmak için çok sayıda şema geliştirilmiştir. Sınıflandırma şemaları genel olarak hasta sunumu veya semptomatolojisine, hastalığın anatomik dağılımına veya yara ve enfeksiyon varlığı gibi klinik faktörlerin bir kombinasyonuna dayalı sınıflandırmaya ayrılabilmektedir. Tekrarlanabilir sınıflandırma sistemleri tıbbi, cerrahi ve endovasküler tedavi paradigmalarının karşılaştırıldığı araştırmalarda da önemlidir [3].

Ateroskleroz PAH'ın en yaygın nedenidir, ancak fibromüsküler displazi, farklı vaskülit formları, arteriyel tuzaklanma, radyasyon hasarı ve travma dahil olmak üzere aterosklerotik olmayan çeşitli tıkayıcı bozukluklar da PAH'a neden olabilmektedir. PAH asemptomatik seyredebilmekte ya da IC, atipik ekstremite ağrısı, kritik uzuv iskemisi (CLI) veya akut uzuv iskemisi semptomları ile klinik olarak ortaya çıkabilmektedir [52].

"Claudication" kelimesi, topallamak anlamına gelen Latince "claudicare" kelimesinden türetilmiştir. Bu terim, erken yaşta geçirdiği hastalık nedeniyle kısa bir mesafe yürüyen, sonra durup tekrar yürümeye başlamadan önce ayakta durmasına neden olan fiziksel bozukluktan muzdarip Roma imparatoru Claudius'a atıfta bulunmaktadır [53].

Aralıklı topallama (Intermittent claudication) (IC): IC, PAH hastalarında sık görülen bir semptom olup, egzersizle tetiklenen ve istirahatle rahatlayan alt ekstremite kas rahatsızlığı ile karakterizedir ve ilk olarak 1831 yılında Fransız veteriner cerrah Bouley tarafından arka ekstremite femoral arterlerinin oklüzyonundan muzdarip topallayan bir atta tanımlanmıştır. Fransız nörolog Charcot 1858 yılında bu sendromu insanlarda tanımlamış ve IC terimini ortaya atmıştır. IC, 60 yaşın üzerindeki erkeklerin %5'inde ve kadınların %2,5'inde görülmektedir [3, 54].

PAH için ilk sınıflandırma sistemi 1954 yılında Fontaine ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Fontaine sınıflandırma sistemi hastalığı dört evrede derecelendirmekte ve ek

tanısal testler olmaksızın yalnızca klinik sunuma dayanmaktadır (Tablo 2.1) [55]. PAH için yaygın olarak kullanılan bir başka sınıflandırma sistemi de Rutherford sınıflandırmasıdır. Kronik PAH için Rutherford sınıflandırması, semptomatik hastalığı klinik tabloya ve koşu bandı testleri, ayak bileği basıncı, ayak parmağı basıncı ve nabız hacmi kaydı (PVR) gibi objektif ölçümlere dayalı olarak altı kategoriye ayırmaktadır. Her iki sınıflandırma sistemi de yaygın olarak araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

Tablo 2.1: Periferik arter hastalıklarının Fontaine'in evrelerine ve Rutherford'un kategorilerine göre sınıflandırılması, Periferik Arter Hastalığının Yönetimi için Toplumlararası Konsensüs'ten (TASC II) uyarlanmıştır [55].

Fontaine		Rutherford		
Evre	Klinik	Derece	Kategori	Klinik
I	Asemptomatik	0	0	Asemptomatik
IIa	Hafif kladikasyon	I	1	Hafif kladikasyon
IIb	Orta ile şiddetli kladikasyon	I	2	Orta kladikasyon
		I	3	Şiddetli kladikasyon
III	İskemik istirahat ağrısı	II	4	İskemik istirahat ağrısı
IV	Ülserasyon veya kangren	III	5	Minör doku kaybı
		III	6	Majör doku kaybı

2.5. Epidemiyoloji

PAH prevalansı zaman içerisinde artış eğilimi göstermektedir. PAH dünya çapında 235 milyondan fazla insanı etkilemektedir ve koroner kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalıktan sonra kardiyovasküler morbiditenin üçüncü önde gelen nedenidir [56]. 70 yaş üstü bireylerde PAH prevalansı %15-20 aralığında olup, diyabetli kişilerde bu oran %26'ya kadar çıkmaktadır [57, 58]. Spesifik olarak, 50 yaş üstü kişilerde CLTI %1 oranında görülmekle birlikte, bu oran yüksek risk gruplarında (şeker hastaları, sigara içenler) %12'ye kadar çıkabilmektedir [2]. PAH,

sırasıyla koroner arter hastalığı ve iskemik inme ile eşit ekonomik maliyetlerle ilişkilidir, büyük bir finansal faktör PAH'ın bir sonucu olarak amputasyonun cerrahi maliyetidir; PAH, yüksek gelirli ülkelerde alt ekstremite amputasyonunun baskın nedenidir [59]. 2015 yılı itibariyle, düşük ve orta gelirli ülkeler yüksek gelirli ülkelere kıyasla daha düşük PAH oranlarına sahiptir [48, 60]. Bununla birlikte, 1990 ve 2010 yılları arasında, düşük ve orta gelirli ülkelerdeki PAH yükündeki göreceli artış, yüksek gelirli ülkelerdeki artışları aşmış ve bu da dünya çapında sağlık sistemleri için artan endişe nedenini yansıtmıştır [60]. Türkiye'de yapılan bir araştırmaya göre, PAH 50-69 yaş grubunda yaklaşık %20 oranında görülürken, bu oran 70 yaş ve üzerindeki bireylerde %30'a kadar çıkmaktadır [61]. CLI prevalansı ise %1,3 civarındadır. PAH, erkeklerde kadınlara kıyasla daha sık görülmekte ve prevalansı yaşla birlikte artış göstermektedir. Örneğin, 70 yaş ve üzerindeki yetişkinlerin yaklaşık %20'sine PAH tanısı konulmaktadır. Yıllık PAH insidansı %2,4 civarındayken, CLI insidansı %0,4 olarak rapor edilmiştir.

PAH'ın klinik belirtileri oldukça geniş bir yelpazede değişiklik gösterebilir. Hastalık, semptomların hiç bulunmadığı durumdan aralıklı topallama (IC), atipik bacak ağrıları, istirahat ağrısı, iskemik yaralar veya kangren gibi ciddi komplikasyonlara kadar ilerleyebilir. PAH, genellikle asemptomatik ve semptomatik olmak üzere iki ana kategoriye ayrılarak sınıflandırılmaktadır.

Bununla birlikte, PAH'dan etkilenen bireylerin yaklaşık %20-50'si asemptomatik seyretmektedir. Diyabeti olan PAH hastalarında ise, medial arteriyel kalsinozis ayak bileği-kol indeksi (ABPI) değerlerinin yanlışlıkla yüksek ölçülmesine yol açarak tanının gözden kaçmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle PAH'ın, mevcut istatistiklerin gösterdiğinden daha yaygın olduğu düşünülmektedir [2, 62, 63].

2.6. Risk faktörleri

Ateroskleroz PAH için ana etiyoloji olduğundan, başlıca risk faktörleri diğer kardiyovasküler hastalıklara benzerdir ve sigara, diyabet, hipertansiyon ve dislipidemiyi içermektedir. Bununla birlikte, her bir risk faktörünün etkisi arteriyel bölgeye göre farklılık göstermektedir [64]. PAH'a ilişkin risk faktörlerinin ayrıntılı değerlendirmesi literatürde kapsamlı biçimde ele alınmış olmakla birlikte, bu bölümde söz konusu değiştirilemeyen ve değiştirilebilir risk faktörlerinden bazıları kısaca incelenecektir.

2.6.1. PAH için değiştirilemez risk faktörleri (non-modifiable risk factors)

2.6.1.1. Yaş

PAH olasılığı ve prevalansı yaşla birlikte artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2003 ve 2008 yılları arasında, cinsiyet, ırk/etnik köken, vücut kitle indeksi (VKİ), ailede KVH öyküsü, sigara kullanımı, diyabet, hipertansiyon, egzersiz ve hiperkolesterolemi için ayarlama yapıldıktan sonra, PAH olasılığının yaşamın her on yılında artmış olduğu gözlenmiştir. 45-49 ve 85-89 yaş aralığındaki bireylerin sırasıyla %5,4 ve %18,6'sının PAH'den etkilendiği tahmin edilmektedir [60, 65].

2.6.1.2. Cinsiyet

45-89 yaş arası kadınlarda PAH prevalansı yüksek gelirli ülkelerde %2,7 ila %24,2 arasında, düşük ve orta gelirli ülkelerde ise %3,96 ila %18,65 arasında değişmektedir. 45-89 yaş arası erkeklerde prevalans, yüksek gelirli ülkelerde %2,76 ile %24,77 arasında, düşük-orta gelirli ülkelerde ise %1,21 ile %21,5 arasında değişmektedir [64]. Ancak kadınlarda asemptomatik PAH ve atipik semptomların görülme olasılığı daha yüksektir ve bu da sıklıkla tanının gecikmesine neden olmaktadır. Bu durum, PAH tanısı koymak için birden fazla araç kullanmanın önemini vurgulamaktadır [64, 66].

2.6.1.3. Etnik köken

Afrika-Amerika kökenli siyah bireyler her iki cinsiyette de en yüksek PAH prevalansına sahiptir ve bu durum PAH için geleneksel risk faktörleriyle tam olarak açıklanamamaktadır [67]. İlginç olarak, hastane temelli bir çalışmada diyabet ve diğer kardiyovasküler risk faktörleri için düzeltme yapıldıktan sonra, aterosklerotik dağılımın siyah bireylerde daha distal yerleşim gösterdiği saptanmış; bu durumun genetik yatkınlık ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [68, 69].

2.6.2. PAH için değiştirilebilir risk faktörleri (Modifiable risk factors)

2.6.2.1. Diyabet

Diyabetle bağlantılı birden fazla yol, arterleri ateroskleroza ve dolayısıyla PAH'a yatkın hale getirmektedir [70]. Tip 2 diyabet (T2D), hızlandırılmış aterosklerozu teşvik eden prokoagülan bir durumla karakterizedir. Ayrıca diyabet, yırtılmaya eğilimli plakların gelişimi ile ilişkilidir [71]. Özellikle T2D, dislipidemi ve hipertansiyon gibi diğer metabolik kardiyovasküler risk faktörleriyle de sıklıkla bir arada bulunmaktadır. Framingham kalp çalışmasından elde edilen

veriler, diyabetli hastalarda PAH gelişme riskinin erkekler ve kadınlar arasında sırasıyla 3,5 ve 8,6 kat fazla olduğunu göstermiştir. PAH riski yaş, diyabet süresi ve periferik nöropati varlığı ile artmaktadır [72, 73]. Buna ek olarak, çalışmalar aralıklı topallama bulunan bireylerin yaklaşık %20'sinde eşzamanlı olarak diyabet varlığının da bulunduğunu ve diyabeti olan kişilerde aralıklı topallama gelişme olasılığının 2,6 kat arttığını göstermektedir (%95 CI: 2,03,4) [74]. Diyabet ve PAH birlikteliği bulunan bireylerde ise kronik yara enfeksiyonuna ilerleme riskinin arttığı, diyabeti bulunmayan ancak şiddetli PAH'a sahip bireylere kıyasla ampütasyonsuz sağkalım süresinin daha kısa olduğu ve 5 yıllık ölüm oranının %30 düzeyine ulaştığı bildirilmiştir [75, 76].

2.6.2.2. Kolesterol

Total kolesterolün PAH riski üzerindeki etkisi uzun süredir araştırılmaktadır. Kolesterol birikimi, aterogenez sürecinde merkezi bir rol oynamakta olup, özellikle PAH ile ilişkili aortik çatallanma noktası ile iliak, ortak femoral ve yüzeyel femoral arterlerde belirgin etkiler göstermektedir [77]. Framingham kalp çalışması verilerinden elde edilen bulgular, total kolesterol düzeyinin 270 mg/100mL'nin üzerinde olması durumunda PAH riskinin iki kat arttığını ortaya koymuştur [78]. Buna karşın, 240 mg/100mL'lik total kolesterol eşiğinin bu ilişkiyi zayıflattığı bildirilmiştir. Söz konusu ilişki, yüksek yoğunluklu lipoproteinin (HDL) koruyucu etkisi ile ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolün yağlı çizgi oluşumu ve aterosklerotik süreçteki belirgin rolü ile açıklanmaktadır [60].

2.6.2.3. Sigara kullanımı

Tütün kullanımı, PAH için önde gelen değiştirilebilir risk faktörü olarak kabul edilmektedir [79]. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir meta-analizde, mevcut sigara kullanımı ile PAH arasındaki ilişki için havuzlanmış olasılık oranı 2,71 olarak bildirmiş olup, ilişkinin hem genel popülasyonda hem de hastalık bulunan birylerde istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir [80]. İngiltere'de, 90 yaşına gelindiğinde, yaşam boyu sigara içmeyenler için PAH riski %2,6 ve sigara içen bireylerde %8.9 oranında bildirilmiştir [81]. Ayrıca, sigara içenlerin semptomatik PAH, özellikle de IC geliştirme riskinin daha fazla olduğu ve sigara içmeyenlere göre semptomları 10 yıl daha erken yaşadıkları bildirilmektedir [82]. Ayrıca, sigara içmek greft açıklığını ve yara iyileşmesini etkileyerek revaskülarizasyon ameliyatı geçiren hastaları etkilemektedir [59].

2.6.2.4. Hipertansiyon

Framingham kalp çalışması, hipertansiyonun erkeklerde 2,5 ve kadınlarda 4,0 olasılık oranıyla PAH için yaygın bir risk faktörü olduğunu bildirmiştir [78]. Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Araştırması (1999-2004) kapsamında yapılan kesitsel bir incelemede, ayak bileğibrakiyal indeksi, serum total bilirubin düzeyi ve PAH risk faktörleri mevcut olan 7075 yetişkin analiz edilmiştir. Sonuçlar, bilirubin düzeyindeki 0,1 mg/dl'lik bir artışın PAH olasılığında %6'lık bir azalmayla ilişkili olduğunu ve bu ilişkinin erkeklerde kadınlara göre daha etkili olduğunu göstermiştir [83]. Edinburgh Arter Çalışması kapsamında yapılan değerlendirmelerde, sistolik kan basıncındaki her 10 mmHg'lik artışın, IC varlığı açısından 1,1–1,2 arasında değişen bir olasılık oranı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [84].

2.6.2.5. Obezite

Obezite, olumsuz sağlık sonuçlarına yol açabilecek düzeyde aşırı yağ dokusu birikimiile karakterize bir durum olarak tanımlanmakta olup, T2D ile birlikte PAH gelişimi açısından da önemli bir risk faktörüdür [85]. Özellikle bel-kalça oranı ile değerlendirilen vücut yağ dağılımının, obezite ile ilişkili T2D'nin öngörülmesinde VKİ'ye kıyasla daha güçlü bir belirteç olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, merkezi yağlanma ile PAH riski arasında da benzer bir ilişkinin olabileceği öne sürülmektedir [86]. Çalışmalar yüksek bel-kalça oranının artmış PAH riski ile ilişkili olduğunu gösterirken, kesitsel analizlerde yüksek VKİ'nin daha düşük PAH riski ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Bu bulgunun olası açıklamalarından biri, yaşlanma ile birlikte yağsız vücut kütlesinde azalma ve buna eşlik eden yağlanma artışının VKİ'yi sabit tutması veya azaltmasına karşın, vücut yağ yüzdesinin ve özellikle merkezi yağlanmanın artmaya devam etmesidir [76, 87].

2.6.2.6. Fiziksel aktivite

Önerilen fiziksel aktivite düzeyine ulaşılması, düşük fiziksel aktivite düzeyine sahip bireylere kıyasla daha düşük PAH riski ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık, fiziksel hareketsizlik PAH gelişme olasılığını yaklaşık %40 artırmaktadır. Ayrıca CLTI ve IC gibi PAH semptomları fiziksel aktiviteyi kısıtlayarak hareketsiz davranışların artmasına yol açmaktadır [88-90].

2.7. Tanı

ABI, PAH tanısında kullanılan basit, non-invaziv ve düşük maliyetli bir değerlendirme yöntemidir. Tıbbi öykü ve fizik muayeneye ek olarak ABI'nin, PAH açısından ilk basamak tanı testi olarak kullanılması önerilmektedir. Ayrıca, bazı olgularda tanının konulması ve tedavinin başlatılması için tek başına yeterli olabileceği bildirilmektedir [50].

ABI, dorsalis pedis arter ve tibialis posterior arterde ultrason Doppler ile ölçülen yüksek sistolik basıncın, brakiyal arterde ölçülen sol ve sağ kol sistolik basınçlarından yüksek olanına bölünmesiyle hesaplanmaktadır [46].

PAH tanısında kullanılan ABI eşik değeri ≤0,9 olarak kabul edilmektedir. Bu eşik değer, ilk kez 1960'lı yıllarda gerçekleştirilen ve konvansiyonel anjiyografi ile karşılaştırıldığında ABI'nin PAH'yi saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğünün %90'ın üzerinde olduğunu gösteren çalışmalara dayanmaktadır [91, 92].

Bununla birlikte, daha güncel bir sistematik derlemede ABI'nin özgüllüğünün %83–99 arasında olduğu doğrulanırken, duyarlılığının %15–79 arasında değiştiği ve özellikle yaşlı ile diyabetik hastalarda daha düşük olduğu bildirilmiştir [93].

ABI, genel ateroskleroz ve kardiyovasküler riskin güçlü bir belirtecidir ve ABI ≤ 0,9, kardiyovasküler ölüm riskinde 2-3 kat artış ile ilişkilidir [94].

ABI ≥1,4, tunika medyanın kalsifikasyonuna bağlı olarak sert bacak arterlerini temsil etmektedir. Bu durum en sık yaşlı ve diyabetik hastalarda görülmektedir ve aynı zamanda artmış kardiyovasküler mortalite riski ile ilişkilidir [94].

İstirahat ABI değeri normal veya sınırda olan semptomatik hastalarda egzersiz sonrası ABI ölçümü, hemodinamik açıdan anlamlı darlığın değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir. Egzersiz sırasında sağlıklı bireylerde ABI'de hafif ve kısa süreli bir düşüş görülürken, PAH hastalarında ayak bileği basıncı daha belirgin azalmakta ve toparlanma süresi uzamaktadır [95]. Yürüme egzersizi sonrasında ABI'de ≥%20 oranında düşüş olması PAH açısından tanısal kabul edilmektedir [96].

Klinik uygulamada daha seyrek kullanılmakla birlikte, PVR'nin ABI ile birlikte değerlendirilmesi PAH tanısal doğruluğunu artırabilmektedir. Hava pletismografi manşeti ile ölçülen PVR'de, sağlıklı bireylerde kardiyak döngüye bağlı hacim değişiklikleri izlenirken,

PAH hastalarında dalga formunda sönümlenme ve tepe noktasında gecikme veya azalma görülmektedir [97].

Aterosklerotik lezyonların anatomik değerlendirmesi, genellikle semptomatik PAH hastalarında revaskülarizasyon planlaması veya takip amacıyla yapılmaktadır. Dupleks ultrason lezyonların yerini ve şiddetini değerlendirmede kullanılırken, BT anjiyografi ve MRA arteriyel yapının anatomik görüntülenmesini sağlamaktadır. BT anjiyografi ise kısa inceleme süresi ve yaygın erişilebilirliği nedeniyle avantajlıdır.

2.7.1. Dolaşımdaki vasküler biyobelirteçler

Biyobelirteçler, normal biyolojik süreçlerin, patolojik durumların veya tedaviye verilen yanıtların objektif olarak ölçülebilen göstergeleri olarak tanımlanmaktadır [98]. linik uygulama ve araştırmalarda tanı, prognoz ve tedavi yanıtının izlenmesinde yaygın olarak kullanılmakta; ayrıca hastalıkların patofizyolojisine ilişkin önemli bilgiler sağlamaktadır. PAH'da aterosklerotik aktivite; vasküler inflamasyon, endotel hasarı, endotel disfonksiyonu ve plak instabilitesi ile ilişkili dolaşımdaki biyobelirteç düzeylerindeki değişikliklerle ilişkilidir [13, 99].

2.8. Periferik arter hastalığı için tedaviler

2.8.1. Tıbbi tedavi

Uzun yıllar boyunca, PAH tedavisi esas olarak semptomatik rahatlama ve fonksiyonel durumu iyileştirmeye odaklanmıştır [100]. Ancak 1950'lerde, semptomatik PAH'li hastaların mortalite riskinde önemli bir artış olduğuna giderek daha fazla dikkat çekilmiştir [101]. 1990'lardan itibaren, ileriye dönük çalışmalar hastaların yalnızca küçük bir kısmında hastalığın IC'den uzuv kaybına ilerlediğini, ancak semptomatik veya asemptomatik PAH varlığının koroner kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalık için önemli bir belirleyici olduğunu göstermiştir [102, 103].

PAH tedavisi; kardiyovasküler risk faktörlerinin kontrolü ve bacak semptomlarının yönetimini kapsamaktadır. Tüm hastalara sigara bırakma, yaşam tarzı değişiklikleri ve farmakolojik ikincil korunmayı içeren optimal medikal tedavi uygulanmalıdır [94]. Kontrendikasyon yoksa lipid düşürücü tedavi, özellikle statinler önerilmekte; statinlerin mortalite ve kardiyovasküler olayları azalttığı, ayrıca plak stabilizasyonu, inflamasyonun azaltılması ve yürüme mesafesinin artırılması gibi ek yararlar sağladığı bildirilmektedir [104, 105].

Antiplatelet ajanlar, PAH hastalarında kardiyovasküler ve ekstremiteye bağlı olayların önlenmesinde önerilmektedir [94]. İlk basamak tedavi olarak aspirin veya klopidogrel ile tekli antiplatelet tedavi tercih edilirken, ikili antiplatelet tedavi artmış kanama riski nedeniyle sınırlı süreli kullanılabilmektedir [94]. Antikoagülanlar rutin ilk basamak tedavide yer almamakla birlikte, COMPASS Trial sonuçları düşük doz rivaroksaban ve aspirin kombinasyonunun majör kardiyovasküler ve ekstremite olaylarını azalttığını göstermiştir; ancak majör kanama riskinde artış bildirilmiştir [106].

2.8.2. Gözetimli egzersiz terapisi

Gözetimli egzersiz terapisi (SET), yürüme kapasitesi, fonksiyonel durum ve yaşam kalitesini artırdığı için IC'li hastalarda önerilmektedir [107, 108]. Haftada en az üç saat, eğitmen eşliğinde maksimal veya submaksimal yürüyüşe dayalı SET programları, ev temelli veya yapılandırılmamış egzersizlere göre daha etkilidir [109]. Ancak etkinliğine rağmen SET'in kullanım oranı düşüktür; Avrupa'da yapılan bir anket, damar cerrahlarının yalnızca %30'unun bu yöntemin erişilebilir olduğunu bildirdiğini göstermiştir [110]. Ayrıca hasta uyumu ve katılımında çeşitli güçlükler nedeniyle IC'li hastaların yalnızca yaklaşık üçte birinin SET'e uygun ve istekli olduğu belirtilmiştir [111].

2.8.3. Endovasküler ve açık cerrahi revaskülarizasyon

Uzun yıllar semptomatik PAH'da konservatif tedavi başarısız olduğunda açık cerrahi revaskülarizasyon (tromboendarterektomi, bypass) temel yaklaşım olmuştur. 1980'lerden itibaren ise stentli/stentsiz perkütan transluminal anjiyoplasti gibi endovasküler yöntemler daha az invaziv seçenekler olarak yaygınlaşmıştır. Uygun strateji; hastanın komorbiditeleri, lezyon anatomisi, kaynaklar ve klinisyen tercihlerine göre belirlenmektedir [112, 113]. Açık ve endovasküler yöntemleri karşılaştıran çalışmalar hasta seçimi ve merkez deneyimi nedeniyle sınırlı olmakla birlikte, popülasyon bazlı veriler endovasküler tedavinin uzun dönem amputasyonsuz sağkalım sağladığını, ancak ek girişim gereksinimini artırabileceğini göstermiştir [114]. Her iki yöntem de IC hastalarında semptom ve fonksiyonu iyileştirmektedir [115]. Güncel kılavuzlar revaskülarizasyonu, konservatif tedaviye yanıt vermeyen ve yaşam kalitesini belirgin etkileyen hastalarla sınırlandırmaktadır [94]. Kritik ekstremite iskemisinde (CLI) ise amaç uzuv kaybını önlemek, ağrıyı azaltmak ve fonksiyonu iyileştirmektir; hastaların büyük kısmında revaskülarizasyon uygulanırken, uygun olmayan olgularda primer amputasyon tercih edilebilmektedir [12].

2.8.4. Negatif basınç ile tedavi

Hacamat, cilt bölgelerine negatif basınç uygulanmasına dayanan ve kökeni M.Ö. 1500'lere uzanan en eski tedavi yöntemlerinden biridir; Hipokrat da yaralardan toksik maddelerin uzaklaştırılması amacıyla bu yöntemi kullanmıştır [116]. 19. yüzyılda negatif basınçla tedaviye yönelik bilimsel yaklaşımlar gelişmiş; Murray ve Clanny gibi araştırmacılar atmosferik basıncın modifikasyonunun terapötik potansiyelini tartışmış, Bier ise vakum uygulamasıyla hiperemi oluşturarak doku iyileşmesini hedeflemiştir [117-120]. 20. yüzyılda yapılan çalışmalarda aralıklı negatif ve pozitif basıncın periferik dolaşım ve yara iyileşmesi üzerindeki etkileri gösterilmiş, Smyth ve sonraki araştırmalar bu yaklaşımın yürüme mesafesi ve iskemi bulgularını iyileştirebileceğini bildirmiştir [20-22]. Daha yakın dönemde INP (intermittan negatif basınç) uygulamaları sağlıklı bireylerde ve PAH hastalarında arteriyel ve deri kan akımını artırmış, bazı çalışmalarda yara iyileşmesi ve yürüme kapasitesinde iyileşme bildirilmiştir [121-123]. Bununla birlikte, randomize kontrollü çalışmalar (Vacusac, Vacumed) INP'nin IC hastalarında yürüme kapasitesine ek klinik fayda sağlamadığını göstermiştir [124,125].

2.8.5. FlowOx cihazı

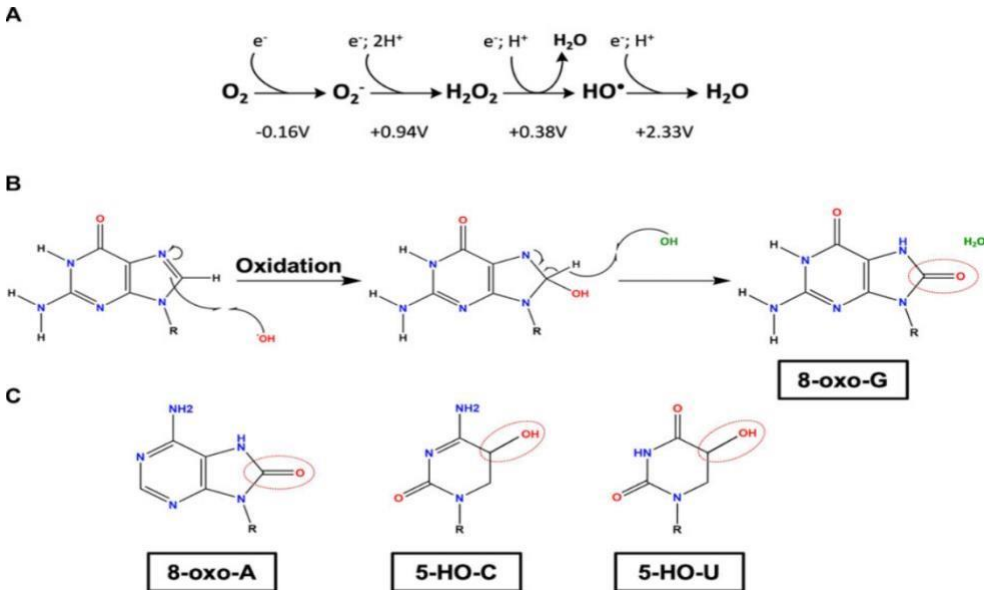
FlowOx 2.0, arteriyel ve cilt kan akışını iyileştirmek için ekstremitelere INP uygulamak üzere tasarlanmış CE işaretli bir tıbbi cihazdır. Ayak ve alt bacak sert Polietilen Plastikten yapılmış bir basınç odasında tedavi edilmektedir. Basınç odasının alt kısmında, ayak kemeri, basınç odasının içindeki alt bacak açısını ayarlamak için hareket edebilen bir konumlandırıcı üzerinde durmaktadır.

INP uygulamasında, basınç odası ile alt bacak arasındaki dolgu şişirilerek sistem oluşturulur ve odacık diz altı seviyesinde termoplastik elastomer bir conta ile kapatılır. Kontrol ünitesi, hava pompası aracılığıyla havayı uzaklaştırarak yaklaşık -40 mmHg basınç üretir ve sistemi 10 saniye negatif basınç, 7 saniye atmosferik basınç döngüleriyle çalıştırır. Kullanım süresi ve olası basınç oluşturamama (hava kaçağı gibi) durumları cihaz tarafından kaydedilir. Hafif yapısı sayesinde cihaz çoğu hastada ev ortamında kullanılabilir.

2.9. Oksidatif RNA Hasarı

2.9.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri

Oksijen, birçok yaşam formu için hayati öneme sahip bir elementtir. Bununla birlikte, yüksek reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açarak RNA, DNA, proteinler ve lipidler gibi temel makromoleküllerde oksidatif hasara neden olabilen bir risk faktörü de taşımaktadır [126]. ROS oluşumu sonucu makromoleküllerin yapısı ve dolayısıyla işlevi etkilenebilmekte ve genellikle hücre toksisitesi ile sonuçlanabilmektedir. Bakterilerde ve diğer organizmalarda ROS, aerobik metabolizmanın bir yan ürünü olarak hücre içinde üretilebildiği gibi, artmış oksidatif ajanlara lokal maruziyet sonucu dış çevreden de kaynaklanabilmektedir [127]. Hücreler, oksidasyona karşı çeşitli savunma mekanizmalarına sahip olup düşük düzeyde ROS'u tolere edebilmektedir. Aslında, düşük ROS düzeyleri, çekirdek algılama, biyofilm oluşumu ve bakteriyel otoliz gibi farklı hücresel süreçlerde sinyal molekülleri olarak rol oyanabilmektedir. Ancak, ROS üretimi ile bunların elimine edilme kapasitesi arasındaki dengenin bozulması durumunda hücreler oksidatif strese maruz kalmaktadır. Doğal olarak oluşan başlıca ROS türleri olan süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (HO^-), farklı reaktivite düzeyleri sergileyerek aerobik ortamlarda ve oksidatif stress süreçlerinde önemli rol oynamaktadır [128, 129] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: RNA'da bulunan ana oksidatif lezyonlar. (A) Moleküler oksijenin redoks durumu. Soldan sağa: moleküler oksijen (O2), süperoksit anyonu (O2-), hidrojen peroksit (H2O2), hidroksil radikali (HO-) ve su (H2O). İndirgeme potansiyelleri, pH 7'de 1M olacak şekilde

standart O2 konsantrasyonu dikkate alınarak gösterilmiştir. (B) Bir guanozinin bir hidroksil radikali ile reaksiyonu, 8-okso-7,8-dihidroguanozin (8-okso-G) verir. (C) Üç modifiye. RNA nükleobazı: oksitlenmiş adenozin 8-okso-7,8-dihidroadenozin (8-okso-A), oksitlenmiş sitozin 5-hidroksisitozin (5-HO-C) ve oksitlenmiş üridin 5-hidroksiüridin (5-HO-U). Oksidasyon bölgeleri kesikli daireler olarak işaretlenmiştir.

2.9.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Hücre Hasarı

ROS türlerindeki artış, proteinler, lipidler ve nükleik asitler (DNA ve RNA) gibi tüm biyomolekülleri içeren çeşitli hedeflerde kapsamlı bir hasara neden olduğundan hücre için tehlikelidir. Oksidasyonun bir sonucu olarak, bu makromoleküllerin yapısı ve işlevi etkilenmekte ve sonuçta hücre ölümüyle sonuçlanabilecek potansiyel olarak toksik sonuçlar doğurmaktadır. Protein oksidatif modifikasyonlarının çoğu, tiyollerin oksidasyonu ve protein yapısını, konformasyonunu ve işlevini etkileyen karbonil gruplarının oluşumu gibi amino asitlerin yan zincirlerinde meydana gelmektedir [129, 130]. Sistein ve metiyonin, reaktif sülfür atomları içerdikleri için oksidasyona en duyarlı amino asitlerdir. İnsanlarda, oksitlenmiş proteinlerin çoğu elimine edilmekte, ancak bazıları birikebilmekte ve çeşitli hastalıklarla ilişkili hasara katkıda bulunabilmektedir. ROS lipidlere saldırdığında, bu oksidasyonun ürünleri çoğunlukla çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyen lipid peroksitlerdir [129, 131]. Sonuç olarak, lipid peroksitlerin birikmesi membran geçirgenliği ve akışkanlığında değişikliklere neden olmakta ve iyon kanallarını etkileyebilmektedir, membran taşıma proteinlerini etkisiz hale getirebilmekte, homeostazı bozabilmekte ve sinyal yollarını etkileyebilmektedir [132].

Nükleik asitler, nükleobazların nitrojen ve oksijen atomlarının reaktivitesi göz önüne alındığında kimyasal hasara karşı çok hassastır. Dört DNA nükleobazı arasında guanin, düşük indirgeme potansiyeli nedeniyle oksidasyona en yatkın olanıdır ve oksidasyonu, transkripsiyon ve replikasyon gibi DNA metabolizmasına müdahale edebilmektedir [133, 134]. Diğer makromoleküllerin aksine, hasarlı DNA değiştirilemez, bu nedenle canlı kalabilmesi için onarılması gerekmektedir. Oksidatif stresin neden olduğu küçük DNA lezyonlarını düzeltmek için ana onarım mekanizması baz eksizyon onarımıdır. DNA'nın aksine, hücresel homeostazın korunmasında zorluk oluşturan oksitlenmiş RNA için henüz tanımlanmış bir onarım mekanizması bulunmamaktadır. RNA'nın oksidatif hasara DNA'ya kıyasla daha duyarlı olması bu durumu daha da önemli hale getirmektedir [126, 133].

2.9.3. RNA Oksidasyonu

RNA, toplam nükleik asitlerin %80-90'ını oluşturmaktadır ve gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesini etkilemektedir [4]. ROS, RNA'ya abazik bölge oluşumu, iplik kırılmaları veya baz ve şeker kısımlarının modifikasyonları yoluyla farklı şekillerde saldırabilmektedir [135]. DNA ile kıyaslandığında, RNA molekülleri çeşitli nedenlerden dolayı oksidasyona daha yatkındır: 1) Çoğunlukla tek sarmallı olan RNA moleküllerinin nükleobazları ROS'a daha fazla maruz kalmaktadır; 2) RNA, DNA'ya kıyasla proteinlerle daha az ilişkilidir ve bu da onu daha savunmasız hale getirmektedir; 3) Fizyolojik koşullarda ribonükleotid konsantrasyonu deoksiribonükleotidlerden çok daha yüksektir; bu nedenle modifikasyonların DNA'ya kıyasla RNA'ya dahil olma olasılığı daha yüksektir ve 4) RNA, DNA'da olanın aksine onarım mekanizmalarından yoksundur [129, 136, 137]. RNA molekülleri, C-H bağlarından hidrojeni ayırarak Fenton reaksiyonundan elde edilen HO- ile oksitlenebilmekte ve bu da çeşitli oksidasyon eklentileri ile sonuçlanmaktadır: 8-oxo -7,8- dihidroguanozin (8-oxo -G), 8-okso7,8-dihidroadenozin (8-oxo -A), 5-hidroksiüridin (5-HO-U) ve 5-hidrositozin (5-HO-C) [137]. Dört nükleobazın tümü ROS'tan etkilenmesine rağmen, guanozin en düşük indirgenme potansiyeline sahip baz olduğu için hücrelerde en sık rastlanan oksidasyon lezyonu 8-oksoG'dir. Fizyolojik koşullar altında, 8-okso-G sıklığı yaklaşık olarak modifiye olmamış guanozinlerin 100.000'de 1'i kadardır. Bu modifikasyon, gen ifadesinde değişikliklere ve anormal proteinlerin gelişimine yol açan açık okuma çerçevesinde mutasyonlara neden olma konusunda yüksek bir eğilime sahiptir. Ayrıca, 8-okso-G peptit bağı oluşum oranını önemli ölçüde azaltarak protein sentezini güçlü bir şekilde bozabilmektedir [138-140].

DNA ile karşılaştırıldığında, oksidasyon yoluyla RNA hasarının incelenmesi ihmal edilmiştir ve bunun başlıca nedeni RNA'ların zararlı etkilere neden olmadan önce hızlı bir devir nedeniyle kısa bir yarı ömre sahip olma eğiliminde olduğu varsayımıdır [135, 141]. Bu ihmal, RNA oksidasyonunun hücreler üzerindeki toksik etkisinin hafife alınmasıyla sonuçlanmıştır [4].

2.10. LncRNA’lar

RNA, genomdaki DNA’dan transkripsiyon yoluyla sentezlenen doğrudan biyokimyasal ürünlerdir. DNA genellikle yaşam için bir plan olarak düşünülse de, herhangi bir işlevsel birim üretmek için genomdaki bilginin RNA'da dönüştürülmesi gerekmektedir. Şu anda bilinen RNA'ların çoğu protein oluşturmak için dizi şablonları olarak kullanılmaktadır. Bu, bir RNA molekülünün dizisinin amino asit zincirlerine dönüştürülmesi ve daha sonra protein olarak

bilinen 3 boyutlu yapılara katlanmasıyla gerçekleşmektedir. Mesajcı RNA (mRNA) olarak adlandırılan bu RNA'lar en yakından incelenen RNA sınıfıdır. Bununla birlikte, henüz tam olarak aydınlatılamamış, büyük bir keşfedilmemiş RNA sınıfı mevcuttur. Hem sayısal çeşitlilik hem de fonksiyonel önem açısından en yüksek keşif potansiyeline sahip RNA grubu, uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) olarak kabul edilmektedir [142].

Kodlayıcı olmayan RNA'lar (ncRNA'lar) boyut ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılmaktadır. NcRNA'lar, insan transkriptlerinin büyük çoğunluğunu oluşturmakta ve uzunluklarına ve işlevlerine göre farklı sınıflara ayrılmaktadırlar [143]. MikroRNA'lar 20-22 nükleotid uzunluğunda olup karakteristik bir saç tokası yapısına sahiptirler ve işlevleri mRNA'nın posttranskripsiyonel olarak sessizleştirilmesi esasına dayanmaktadır. LncRNA'lar, 200'den fazla nükleotid uzunluğuna sahip işlevsel RNA molekülleridir. LncRNA'lar, kompleks ikincil yapılara sahiptirler ve kılavuz, sünger veya tuzak olarak hareket ederek gen düzenlemesini etkileyebilecek bir dizi görevi üstlenmektedirler [144].

Sıralama amacıyla, ncRNA sınıfları ilk olarak boyuta göre sınıflandırılmıştır; burada lncRNA genellikle 200 nükleotitten (n.t.) büyüktür, ancak uzunlukları binlerce nükleotide kadar değişebilmektedir. LncRNA'nın daha ileri sınıflandırılması, mRNA ile aralarında paralellikler kurmaktadır: her ikisi de nükleobaz modifikasyonları, poliadenilasyon ve ekleme olayları gibi transkripsiyon sonrası modifikasyonlara uğramaktadır [145]. Ek olarak, her iki RNA sınıfı da RNA polimeraz II tarafından kopyalanmakta ve hücre döngüsü ve tipine bağlı olarak spatiotemporal düzenleme sergilemektedir. Tanım gereği, lncRNA ve mRNA arasındaki en önemli fark kodlama potansiyelinin olmamasıdır. LncRNA'nın yaklaşık %40'ı küçük peptidleri (<50 amino asit) kodlasa da, işlevleri hala araştırılmaktadır [146].

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar), genomda protein kodlamayan ancak gen ekspresyonunun düzenlenmesi, RNA işlenmesi ve hücresel organizasyon gibi çok çeşitli biyolojik süreçlerde kritik roller üstlenen RNA moleküllerini kapsayan geniş ve heterojen bir sınıftır. Bu sınıf; ribozomal RNA'lar arasında yer alan 5S rRNA'lar, adaptör fonksiyon gören tRNA'lar, spliceozom bileşenleri olan snRNA'lar ve nükleolar ribonükleoprotein komplekslerinin temel bileşenlerini oluşturan snoRNA'ların yanı sıra, post-transkripsiyonel gen regülasyonunda görev alan miRNA'lar, siRNA'lar ve piRNA'ları da içermektedir. Bununla birlikte bu geniş tanım, belirli kısa ve fonksiyonel ncRNA alt sınıflarını kapsam dışında bırakmaktadır. Örneğin primatlara özgü snaR RNA'ları (~80–120 nt), ribonükleoprotein (RNP) kompleksleri için iskele görevi üstlenen Y RNA'lar (~100 nt), hücre dışı uyaranların hücre içi sinyallere aktarılmasında rol oynayan kasa RNA'ları (88–140 nt), ayrıca transkripsiyon sonrası işleme ile oluşan promotör

ilişkili RNA'lar ve kanonik olmayan küçük RNA türleri bu kapsamın dışında değerlendirilmektedir [147, 148].

LncRNA'lar ise genellikle 200 nükleotidden uzun transkriptler olarak tanımlanmakta olup, önemli bir kısmı poliadenile edilmiş yapıları nedeniyle "mRNA-benzeri" özellikler sergiler. Bununla birlikte, tüm lncRNA'lar bu özellikleri taşımaz; bazıları poliadenilasyon içermeyebilir veya RNA polimeraz I (Pol I) tarafından transkribe edilen 5.8S, 28S ve 18S rRNA'larda olduğu gibi 7-metilguanozin kapak yapısı taşıyan transkriptlerden ya da RNA polimeraz III (Pol III) promotörlerinden ifade edilebilir. Ayrıca lncRNA'lar, intronik bölgelerden veya tekrarlayan genetik elementlerden türeyen öncül transkriptlerin işlenmesi yoluyla da oluşabilmektedir [149].

Daha da önemlisi, lncRNA sınıfı yalnızca doğrusal transkriptleri değil, aynı zamanda ekzonların geri eklenmesi (back-splicing) yoluyla oluşan ve fonksiyonel düzenleyici rollere sahip olduğu gösterilen dairesel RNA'ları (circRNA'lar) ve klasik olarak mRNA'ların 3′ çevrilmemiş bölgelerinden türeyen, ancak trans-etkili düzenleyici kapasite gösteren RNA türlerini de kapsamaktadır. Bu çeşitlilik, ncRNA biyolojisinin yapısal ve fonksiyonel heterojenliğini ortaya koymakta ve bu moleküllerin genetik düzenleme ağlarındaki merkezi rolünü vurgulamaktadır. LncRNA'lar'ın işlevleri arasında, mRNA transkriptlerini stabilize etmek, translasyonlarını bloke etmek, proteinlere bağlanarak aktivitelerini değiştirmek, kromatin ve DNA ile etkileşime girmek ve hatta mikroRNA'lar için sünger görevi üstlenmek yer almaktadır [150, 151].

Transkriptomik ve çip teknolojisinin gelişmesiyle kanser ve kardiyovasküler hastalık gibi çeşitli alanlarda rolleri olduğu gösterilmiştir. Çok sayıda kanıt, lncRNA'ların belirli bozuklukların oluşumunu ve gelişimini düzenleyebildiğini göstermiştir. Örneğin, aterosklerotik hastalarda lncRNA H19'un ekspresyon düzeyinin arttığı rapor edilmiştir; miRNA'lara veya proteinlere sinyal göndererek, VSMC apoptozu, inflamasyon aktivasyonu ve miyokardiyal hücre nekrozu gibi çoklu süreçlere katılabilmekte, böylece aterosklerozun ilerlemesini ve iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarını artırabilmektedirler [152-154]. LncRNA'lar, kardiyovasküler hastalıklarda tanısal biyobelirteçler olarak hizmet etmenin yanısıra, aynı zamanda terapötik uygulamalar için potansiyeller sergilemiştir [155]. Son yıllarda lncRNA'ların kardiyovasküler hastalıklar (CVD'ler) dahil olmak üzere fizyolojik ve patofizyolojik mekanizmalardaki ağların düzenlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Son dönem yapılan çalışmalar, HIF1A (Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha) geni ile aynı genomik lokus üzerinden transkribe edilen üç farklı uzun kodlamayan RNA (lncRNA)

tanımlamıştır. Bu transkriptler, HIF1A antisens RNA 1 (HIF1A-AS1), HIF1A antisens RNA 2 (HIF1A-AS2) ve HIF1A antisens RNA 3 (HIF1A-AS3) olarak adlandırılmaktadır. Söz konusu lncRNA'ların, HIF1A gen bölgesiyle antisens yönde konumlanmaları nedeniyle transkripsiyonel ve/veya post-transkripsiyonel düzeyde HIF1A ekspresyonunun düzenlenmesinde potansiyel rol oynayabilecekleri öne sürülmektedir. Bu durum, hipoksi yanıt yolaklarında merkezi bir transkripsiyon faktörü olan HIF1A'nın, yalnızca protein kodlayan transkriptler üzerinden değil, aynı genomik lokustan türeyen kodlamayan RNA'lar aracılığıyla da çok katmanlı bir düzenleyici ağ içinde kontrol edilebileceğini düşündürmektedir.

2.10.1. HIF1A-AS1

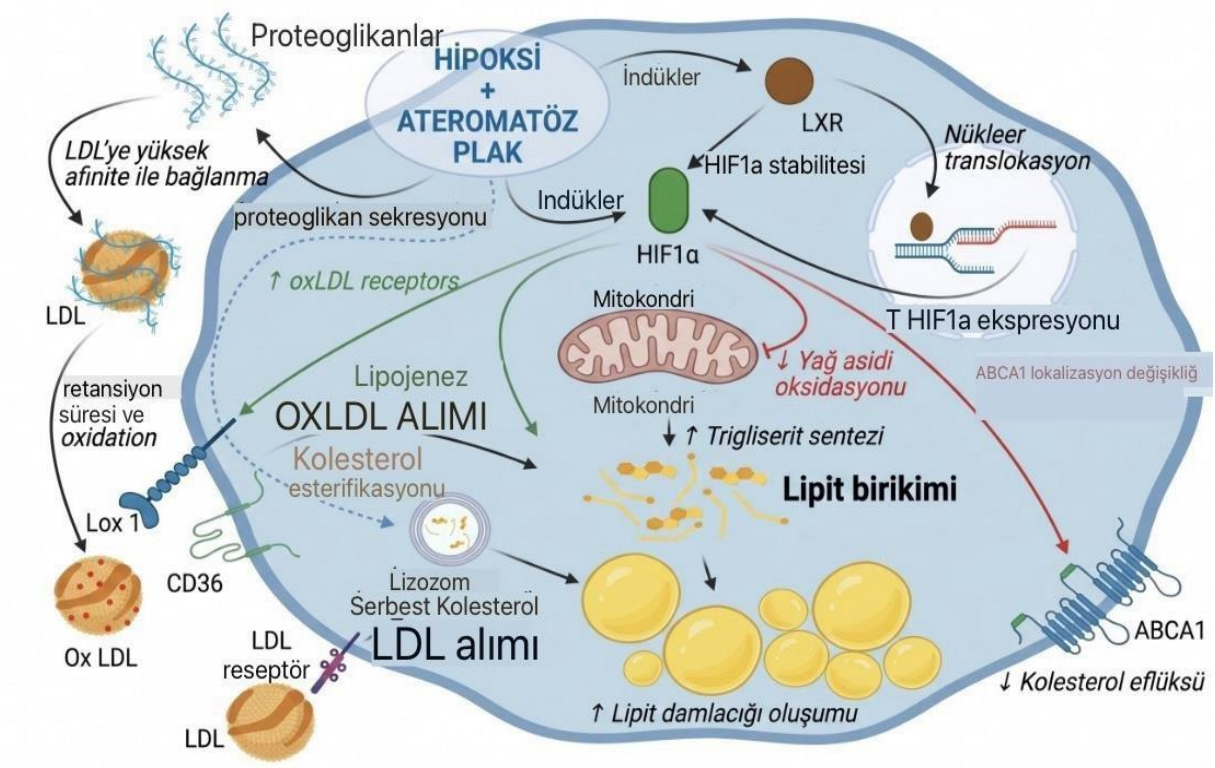
Hipoksi, organizmanın tamamında veya belirli doku/bölgesinde, hücresel metabolik gereksinimleri karşılamaya yetecek düzeyde oksijenin sağlanamaması ile karakterize edilen fizyolojik ya da patolojik bir durum olarak tanımlanabilir. Bu durum, oksijen sunumundaki azalmaya (örneğin yetersiz vaskülerizasyon veya damar yapısındaki fonksiyonel/yapısal bozukluklar) ya da oksijen tüketimindeki artışa (örneğin hızlı hücresel proliferasyon veya artmış metabolik aktivite) bağlı olarak gelişebilir.

Moleküler düzeyde hipoksi yanıtı, başlıca hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) kompleksinin stabilizasyonu ile ilişkilidir. HIF-1, heterodimerik bir nükleer transkripsiyon faktörü olup, oksijen homeostazının temel düzenleyicilerinden biri olan HIF-1α alt birimini içermektedir. Normoksik koşullarda hızlı şekilde degradasyona uğrayan HIF-1α, hipoksik koşullarda stabil hale gelerek hedef gen ekspresyonunu düzenlemekte ve hücresel adaptif yanıtları başlatmaktadır.

Son çalışmalar, HIF1A'nın hipoksiye yanıt mekanizmasının yalnızca protein kodlayan düzeyde değil, aynı zamanda kodlamayan RNA aracılı bir düzenleyici ağ ile de kontrol edildiğini göstermektedir. Bu bağlamda, HIF1A ile aynı genomik lokustan transkribe edilen lncRNA'lar olan HIF1A antisens RNA 1 (HIF1A-AS1) ve HIF1A antisens RNA 2 (HIF1A-AS2)'nin ekspresyonunun hipoksik koşullar altında HIF1A tarafından indüklenebildiği bildirilmiştir. HIF1A-AS1, HIF1A'nın negatif bir düzenleyicisi olarak tanımlanırken, HIF1A-AS3 ekspresyonunun HIF1A tarafından negatif yönde regüle edildiği rapor edilmiştir. Bu karşılıklı düzenleyici etkileşimler, hipoksi yanıtının genomik ve epigenetik düzeyde oldukça karmaşık ve çift yönlü bir kontrol mekanizmasına sahip olduğunu ortaya koymaktadır [156, 157].

Aterosklerotik plak içerisinde, özellikle plak progresyonu ile birlikte belirginleşen ciddi hipoksik bölgelerin varlığına ilişkin güçlü deneysel ve klinik kanıtlar bulunmaktadır. Bu hipoksik mikroçevre, gelişmekte olan plakta yer alan endotel hücreleri, makrofajlar ve VSMC dahil olmak üzere çok sayıda hücre tipinin fonksiyonel durumunu, metabolik adaptasyonunu ve inflamatuvar yanıtlarını derin biçimde etkilemektedir. Söz konusu hücresel yeniden programlanma, plak stabilitesinin korunması ya da instabil (yırtılmaya eğilimli) fenotipe geçişi açısından belirleyici bir rol oynamaktadır.

Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) ekspresyonunun, aterosklerotik lezyonların özellikle nekrotik çekirdeğe komşu perivasküler bölgelerinde, inflamatuvar makrofajlarda ve VSMC'de lokalize olduğu gösterilmiştir. HIF-1 aktivasyonu, hipoksik mikroçevreye adaptif yanıtın merkezi bir bileşeni olarak, vasküler fonksiyon açısından kritik öneme sahip çok sayıda genin transkripsiyonel düzenlenmesini kontrol etmektedir. Bu hedef genler arasında vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), nitrik oksit sentaz (NOS), endotelin-1 ve eritropoietin gibi moleküller yer almakta olup, bunlar sırasıyla anjiyogenez, vasküler tonus regülasyonu ve eritropoez gibi temel fizyolojik süreçlerde görev almaktadır. Bu nedenle HIF-1 aracılı hipoksi yanıtı, aterosklerotik plak biyolojisinin hem yapısal hem de fonksiyonel dinamiklerinin şekillenmesinde merkezi bir düzenleyici eksen oluşturmaktadır [157] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Hipoksi ve HIF-1α, makrofajlarda lipid metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. HIF-1α'ya bağımlı sinyal yollarının aktivasyonu, lipogenez ve kolesterol biyosentezinin artışı ile birlikte yağ asidi oksidasyonunun baskılanması sonucunda makrofajlarda trigliserid ve kolesterol birikimini artırmaktadır. Ayrıca hipoksi ve HIF-1α, proteoglikan bileşiminin yeniden düzenlenmesi ve çeşitli çöpçü reseptörlerinin ekspresyon düzeylerinin yükselmesi yoluyla LDL tutulmasını ve okside LDL alımını desteklemektedir. Bununla birlikte, murin makrofajlarda hipoksi/HIF-1α aktivasyonu, ABCA1 taşıyıcısının hücre içi lokalizasyonunu değiştirerek kolesterol dışa akışını olumsuz yönde etkilemektedir [158].

HIF1A-AS1, HIF-1α'nın antisens transkripti olarak tanımlanan bir lncRNA olup, antisens yönelimli transkripsiyonel düzenleyici RNA'lar sınıfında yer almaktadır. Bu lncRNA, HIF1A gen lokusuna antisens yönde konumlanmış olup, HIF-1α ile ilişkili transkripsiyonel ağların düzenlenmesinde potansiyel rol oynadığı gösterilmiştir.

HIF1A-AS1 geni, insan genomunda 14. kromozom üzerinde lokalize olup, yaklaşık 61,677,634 ile 61,695,841 baz çiftleri arasında yer almaktadır. Genin transkripti yaklaşık 652 baz çifti (bp)

uzunluğunda olup, bu yapısal özellikleriyle kısa-orta uzunlukta lncRNA kategorisi içinde değerlendirilmektedir. Bu genomik organizasyon, HIF1A lokusu ile olan yakın konumsal ilişkisi nedeniyle, özellikle hipoksi yanıt mekanizmaları kapsamında fonksiyonel etkileşim potansiyelini desteklemektedir [159].

Bu lncRNA, diğer organların yanı sıra kemik iliği, apendiks ve safra kesesinde yaygın olarak dağılmıştır. Ayrıca, HIF1A-AS1'in ekspresyonu normal insan dokularında heterojen bir uzamsal dağılımı paylaşır. HIF1A-AS1, miR-138'i hedefleyerek Coxsackievirus B3 kaynaklı miyokarditte pro-apoptotik ve pro-inflamatuar rollere sahiptir [160].

Hipoksi, aterosklerotik plaklarda sıklıkla gözlenen patofizyolojik bir durum olup, hipoksi ile indüklenebilir faktör-1α (HIF-1α) ekspresyonundaki artışın inflamatuvar yanıtların ve anjiyogenez süreçlerinin aktivasyonunda kritik rol oynadığı bilinmektedir. Bu bağlamda HIF1A-AS1'in HIF-1α ile olan fonksiyonel etkileşimi, söz konusu hipoksi aracılı biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir düzenleyici mekanizma olarak değerlendirilmektedir [161].

Ateroskleroz patogenezinde makrofajlar merkezi efektör hücreler arasında yer almakta olup, HIF1A-AS1'in makrofaj polarizasyonu ve inflamatuvar yanıtlar üzerindeki düzenleyici etkilerinin, aterosklerotik lezyon gelişiminde belirleyici olabileceği öne sürülmektedir [178]. Buna ek olarak, HIF1A-AS1'in VSMC proliferasyon ve migrasyon kapasiteleri üzerinde etkili olabileceği, bu hücrelerin fenotipik dönüşüm süreçlerini modüle ederek damar duvarı kalınlaşması ve plak oluşumuna katkıda bulunabileceği bildirilmektedir [162]. Ayrıca HIF1AAS1'in TGF-β1 ekspresyonunu yukarı yönde düzenleyerek VSMC proliferasyonunu baskılama yönünde rol oynadığı da gösterilmiştir [163].

Bununla uyumlu olarak, yapılan çalışmalar aterosklerozda eksosomal lncRNA HIF1A-AS1'in aşırı eksprese olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle VSMC'de HIF1A-AS1 aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonunu inhibe edici etki gösterebileceği rapor edilmiştir [164].

2.10.2. HIF1A-AS2

HIF1A-AS2 (HIF1A antisens RNA 2), hipoksi ile indüklenebilir faktör-1α'nın (HIF-1α) endojen antisens transkripti olup, HIF1A gen lokusuna antisens yönde transkribe edilen uzun kodlamayan RNA'lar arasında yer almaktadır. Bu transkript, 14q23.2 kromozomal bölgesinde lokalize olup yaklaşık 2.052 nükleotid uzunluğundadır (Şekil 2.7) [165]. HIF1A-AS2 ilk olarak 1999 yılında Thrash-Bingham ve Tartof tarafından berrak hücreli renal karsinom örneklerinde

anormal ekspresyon paterni göstermesi üzerine tanımlanmıştır. Bu çalışmada bu gen transkripti, HIF1A mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesine (3' untranslated region; 3'UTR) tamamlayıcı olarak bağlanabilen endojen bir antisens RNA olarak karakterize edilmiş ve bu bağlanmış form "aHIF" olarak adlandırılmıştır [166].

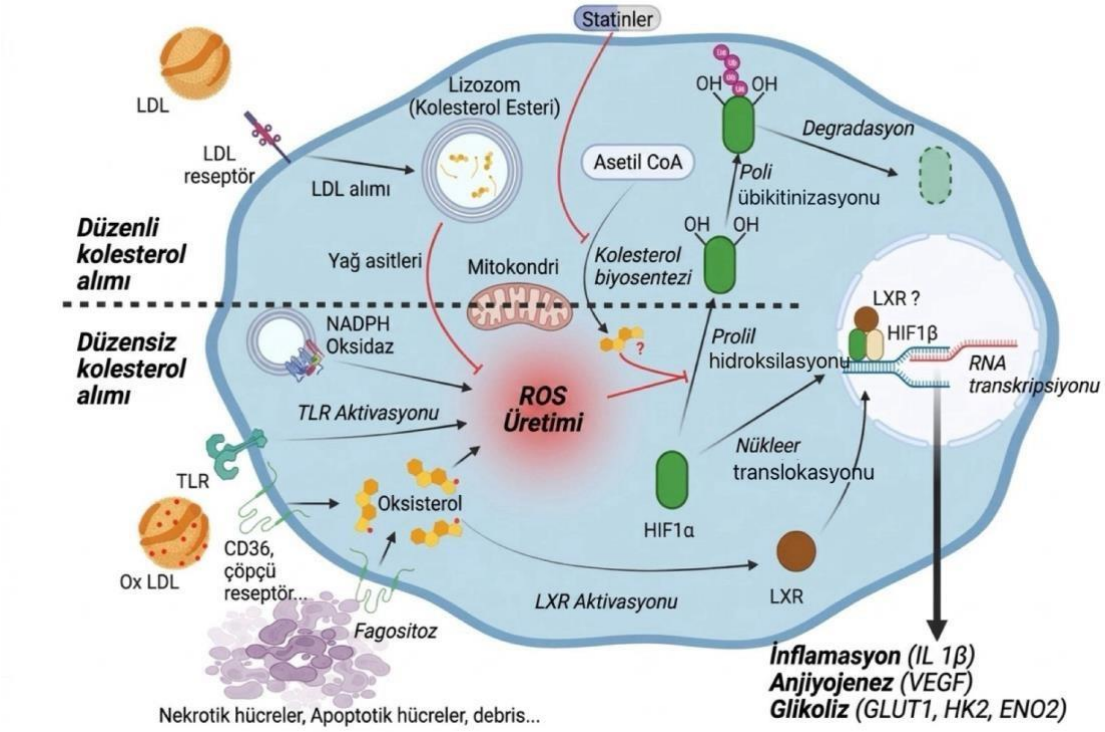
HIF1A-AS2'nin ekspresyonunun yalnızca tümör dokularıyla sınırlı olmadığı, aynı zamanda fetal gelişim döneminde ve yetişkin organizmada çeşitli normal insan dokularında da saptanabildiği gösterilmiştir [9]. Bu durum, söz konusu lncRNA'nın yalnızca patolojik süreçlerde değil, fizyolojik koşullarda da belirli biyolojik işlevlere sahip olabileceğini düşündürmektedir. HIF1A-AS2'nin, kanser biyolojisinde HIF-1α sinyal yolu ile ilişkili olarak tümör gelişimi ve progresyonunda dinamik bir düzenleyici rol oynadığı bildirilmiştir [26]. Ayrıca bu lncRNA'nın, glikoliz metabolizmasının pozitif geri besleme döngülerine dahil olduğu ve hücresel metabolik süreçlerin yeniden programlanmasında rol üstlendiği öne sürülmektedir (Şekil 2.5) [27]. Bu bağlamda HIF1A-AS2'nin, tümör hücrelerinin metabolik adaptasyonunu destekleyen hipoksi ile ilişkili mekanizmaların önemli bir bileşeni olabileceği değerlendirilmektedir.

Moleküler düzeyde ise HIF1A-AS2'nin, miR-153-3p için bir "moleküler sünger" (competitive endogenous RNA; ceRNA) olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. Bu etkileşim, miR-153-3p aracılı HIF1A baskılanmasının zayıflamasına yol açarak HIF1A ekspresyonunun dolaylı olarak artmasına neden olabilmektedir. Bu düzenleyici eksen, özellikle endotel hücre fonksiyonlarının modülasyonu açısından önemli olup, vasküler biyoloji ve tümör mikroçevresi arasındaki ilişkide kritik bir kontrol noktası olarak değerlendirilmektedir (Şekil 2.6) [28].

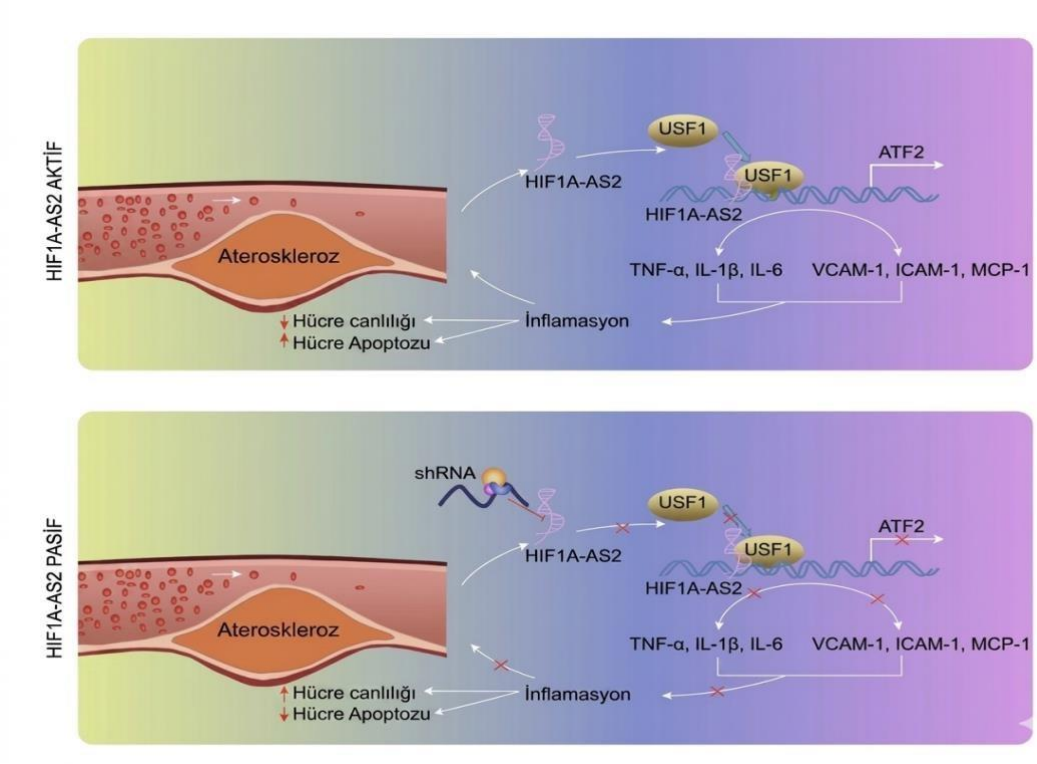
HIF1A-AS2, hipoksiye yanıt süreçlerinde HIF-1α ekseni ile etkileşim göstererek düzenleyici bir lncRNA olarak işlev görmektedir. Bu etkileşim, hipoksiye duyarlı genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu artırarak anjiyogenez, inflamatuvar yanıt ve hücresel metabolik adaptasyon gibi temel biyolojik süreçler üzerinde belirleyici etkiler oluşturabilmektedir [167].

PAH'ın erken evrelerinde yaygın olarak gözlenen endotel hücre disfonksiyonu bağlamında, HIF1A-AS2'nin endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO) sentezinin düzenlenmesinde rol oynayabileceği bildirilmiştir. Bu mekanizma, vasküler tonusun kontrolü, damar dilatasyonu ve lokal kan akımının düzenlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. HIF1A-AS2 ekspresyonundaki bozulmaların ise endotel hücre sağkalımını ve fonksiyonel bütünlüğünü olumsuz yönde etkileyebileceği öne sürülmektedir [168].

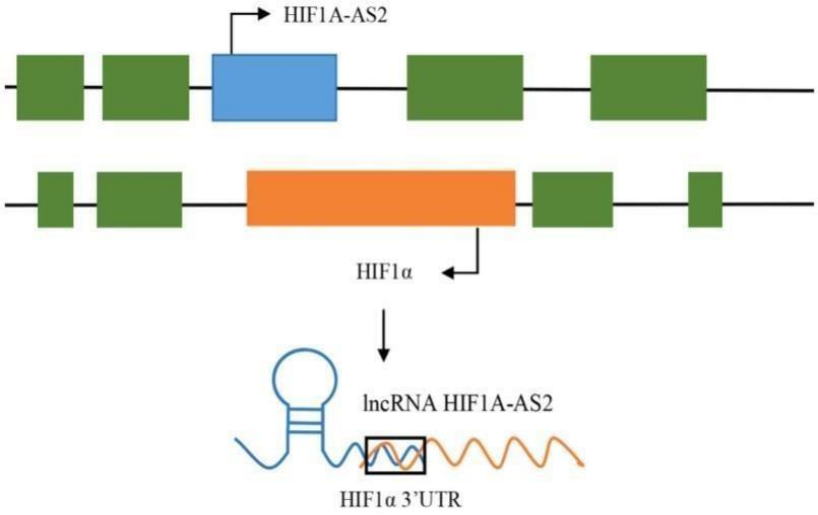
Buna ek olarak, HIF1A-AS2'nin hipoksi ile aktive olan makrofajların polarizasyon süreçlerini etkileyebileceği gösterilmiştir. Bu düzenleyici etki, pro-inflamatuvar M1 makrofaj fenotipi ile anti-inflamatuvar M2 fenotipi arasındaki dengenin kontrol edilmesine katkıda bulunabilmektedir. Söz konusu immün dengenin, aterosklerotik plak stabilitesi ve vasküler inflamasyonun şiddeti üzerinde belirleyici bir rol oynadığı bilinmektedir [169].



Şekil 2.5: Kolesterol ve lipid mikroçevresi, HIF-1α'nın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. LDL, LDL reseptörü ile endositoz yoluyla hücre içine alınır. Lizozomal kolesteryl ester hidrolizi sonucu açığa çıkan yağ asitleri, mitokondriyal ROS üretimini inhibe ederek HIF-1α stabilitesini azaltmaktadır. Ayrıca kolesterol biyosentezi sırasında oluşan izoprenoidler, G-proteinlerinin izoprenilasyonu yoluyla HIF-1α'ya bağımlı sinyal yollarını etkileyebilir. Aterom gelişimi bağlamında, makrofajlar okside lipoproteinleri ve oksisterol açısından zengin hücresel döküntüleri fagosite eder; bu süreç ROS üretimini artırarak HIF-1α stabilitesini yükseltir. Bunun yanı sıra, oksisterol birikimi karaciğer X reseptörünü (LXR) aktive eder. LXR'nin HIF-1α ile doğrudan etkileşime girebileceği öne sürülmektedir. Genel olarak HIF-1α aktivasyonu, inflamasyonda (interlökin-1β), anjiyogenezde (vasküler endotelyal büyüme faktörü, VEGF) ve glikolizde (glukoz taşıyıcısı 1 (GLUT1), hekzokinaz 2 (HK2), enolaz 2 (ENO2)) görevli genlerin ekspresyonunu artırmaktadır [158].



Şekil 2.6: Aterosklerozda lncRNA HIF1A-AS2 aracılı inflamasyonla ilişkili mekanizmaları gösteren şema. Üst panel, lncRNA HIF1A-AS2'nin USF1 ile bir kompleks oluşturduğunu ve bu kompleksin ATF2 promotör bölgesine bağlanarak ATF2 ekspresyonunu artırdığını, böylece aterosklerotik inflamasyonun gelişimini desteklediğini göstermektedir. Alt panel ise lncRNA HIF1A-AS2'nin aşağı regülasyonunun, USF1'in ATF2 promotör bölgelerine bağlanmasını azaltarak ATF2 ekspresyonunu düşürdüğünü ve böylece aterosklerotik inflamasyonu inhibe ettiğini göstermektedir. Bu durum, serumda inflamatuvar faktörler TNF-α, IL-1β ve IL-6 düzeylerinin ve adezyon molekülleri VCAM-1, ICAM-1 ve MCP-1'in protein düzeylerinin azalmasıyla; ayrıca EC'ler, SMC'ler ve HCAEC'lerde oxLDL ile indüklenen inflamasyonda hücre canlılığının artması ve apoptozun azalması ile ilişkilidir [170].



Şekil 2.7: HIF1A-AS2 14. Kromozomda yerleşimi.[165]

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

qRT-PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction), gen ekspresyon analizi ve genotip belirleme gibi moleküler biyoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılan hassas bir kantitatif yöntemdir. Bu teknik, DNA amplifikasyon sürecini gerçek zamanlı olarak izlemeye olanak tanımakta ve floresan raportör boyalar aracılığıyla amplifikasyon ile tespit aşamalarını birleştirmektedir [171]. Yöntem, her PCR döngüsü sırasında üretilen DNA miktarına karşılık gelen floresan sinyalindeki artışı ölçmeye dayanmaktadır. Bir qRT-PCR reaksiyonu, floresansın eşik (threshold) arka plan seviyelerini aştığı PCR döngüsü (eşik döngüsü, Ct) ile karakterize edilmektedir. Hedef genin mRNA konsantrasyonu arttıkça Ct değeri azalmakta; bu durum, gen ekspresyon düzeylerinin hassas bir şekilde ölçülmesini sağlamaktadır [172, 173].

qRT-PCR yöntemi üç temel adımdan oluşmaktadır: RNA'nın ters transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmesi, cDNA'nın PCR yoluyla çoğaltılması ve amplifiye edilen ürünlerin floresan sinyaliyle tespit edilip kantitatif olarak analiz edilmesi. Ancak sonuçlar, şablon RNA'nın miktar ve kalitesine bağlıdır; bu nedenle tutarsızlıkları önlemek için tüm bileşenlerin kalite kontrolü kritik öneme sahiptir [172].

Başarılı bir qRT-PCR analizi için primer tasarımı büyük bir öneme sahiptir. SYBR Green kullanılarak yapılan qRT-PCR için primerlerin %30-80 arasında G/C içeriğine, 50-150 baz uzunluğundaki amplikonlara, 58-60 °C aralığında bir erime sıcaklığına (Tm) ve minimum 18 baz uzunluğuna sahip olması gerekmektedir. Ayrıca primerlerin 3′-uç kararlılığına dikkat

edilmeli, son üç baz içerisinde en fazla iki G veya C bulunmalıdır. Genomik DNA kontaminasyonunu önlemek için ileri ve geri primerlerin intron/ekzon sınırlarını kapsayacak şekilde tasarlanması önerilmektedir. Primer tasarımı için Primer Express 2.0 veya Primer3 gibi araçlar kullanılabilmektedir [174].

qRT-PCR, lncRNA'ların hücresel düzeylerinin belirlenmesinde de kullanılan etkili bir yöntemdir. Bu süreç genellikle hücre fraksiyonasyonu ve qRT-PCR kombinasyonuyla gerçekleştirilmektedir. Hücre lizisi sırasında kullanılan deterjanlar, sitoplazmik ve nükleer transkriptlerin ayrılmasını sağlamaktadır. Ayrılan RNA'lar, cDNA'ya dönüştürülerek qRTPCR ile kantitatif olarak analiz edilmektedir. Örneğin, Kanduri ve ekibi, bu yöntemi kullanarak MEG3 lncRNA'nın nükleer fraksiyonda yoğunlaştığını göstermiştir [175, 176].

qRT-PCR, spesifik gen hedeflerine yönelik yüksek hassasiyet sunarken dizileme yöntemleri kadar kapsamlı değildir. Bununla birlikte düşük miktardaki örneklerde bile güvenilir sonuçlar verebilmesi önemli bir avantajdır. Yöntemin doğruluğunu artırmak için tüm adımların dikkatle optimize edilmesi gereklidir. Genetik analizlerde geniş bir uygulama alanı sunan bu yöntem, hem temel bilimlerde hem de klinik araştırmalarda vazgeçilmezdir [177, 178].

2.12. ELISA (Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi)

Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Analizi (ELISA), antijen ve antikorların özgül etkileşimlerine dayanan, hastalıkların tanısında ve biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir immünolojik testtir. İlk olarak 1971 yılında Eva Engvall ve Peter Perlmann tarafından tanımlanan bu yöntem, katı fazlı bir enzim immünoassay türüdür. ELISA, antijen veya antikorun katı bir yüzeye (genellikle polistiren mikrotitre plakaları) immobilize edilmesi ve ardından enzimle işaretlenmiş bir karşıt antikor veya antijenin kullanılarak hedef molekülün tespit edilmesine dayanmaktadır. Süreç, hedef molekülün miktarını kantitatif olarak ölçmek için floresan veya renkli bir ürün oluşturan enzimatik reaksiyonu içermektedir [179].

ELISA genel olarak şu adımları takip etmektedir: İlk olarak, mikrotitre plakası hedef antijen veya antikor ile kaplanır ve bağlanmamış yüzeyler, spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için bloklama maddesiyle kapatılır. Ardından, özgül antikor veya antijen eklenerek inkübasyon yapılır ve bağlanmamış bileşenler yıkama adımları ile uzaklaştırılır. Daha sonra, enzimle konjüge edilmiş bir sekonder antikor eklenir ve bu, substrat eklenmesiyle renk değişimine neden olan enzimatik reaksiyonu başlatır. Renk değişimi, spektrofotometrik olarak ölçülerek numunedeki antijen veya antikorun miktarı belirlenir [180].

ELISA'nın farklı formatları bulunmaktadır: Doğrudan ELISA, hedef molekülün doğrudan işaretlenmiş bir antikorla tespit edilmesini sağlamaktadır. Dolaylı ELISA'da, hedef molekül primer antikor ve ardından enzimle konjüge edilmiş sekonder antikorla saptanmaktadır. Sandviç ELISA'da, hedef molekül "capture" ve "detection" antikorları arasında sıkışmaktadır. Kompetitif ELISA ise sınırlı miktarda işaretli antijenin, numunedeki antijen ile rekabet ettiği bir format sunmaktadır [180].

ELISA, yüksek özgüllük ve hassasiyeti nedeniyle infeksiyon hastalıklarının (örneğin, HIV, hepatit ve COVID-19), hormonların ve çeşitli proteinlerin tespiti gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Aynı anda çok sayıda numuneyi analiz etme kapasitesi, yöntemin avantajlarından biridir. Ancak sonuçların doğruluğu, kullanılan antikorların kalitesine ve protokolün dikkatlice uygulanmasına bağlıdır. Yanlış pozitif veya negatif sonuçlar, çapraz reaksiyonlar veya yetersiz yıkama nedeniyle ortaya çıkabilmektedir [181].

3. YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

Kontrol ve çalışma grubumuzdaki vaka sayıları Med, Calc (Version 13.0) programı kullanarak hesaplanmıştır. “The severity of internal carotid artery stenosis is associated with the cyclindependent kinase inhibitor 2A gene expression” (https://doi.org/10.5551/jat.21774) başlıklı makale baz alınarak 0,3 birimlik bir fark önem atfedilerek 0,6 birimlik standart sapma öngördüğümüzde %95 güven düzeyi ve %80 güç için her bir gruba 64 vaka gerektiği hesaplanmıştır. Sonucu etkileyebileceğini düşündüğümüz bir alt katman için ~%10’luk bir artışa gidilmiş; çalışma grubumuz 75 aorta-iliak oklüzyonu ile 75 femoro-popliteal arter oklüzyonu bulunan toplam 150 vakadan ve 150 sağlıklı kontrolden oluşturulmuştur. ŞubatEkim 2023 dönemleri arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı bünyesinde revaskülarizasyon cerrahisi uygulanan periferik arter hastaları (PAH) çalışma kapsamına alınmıştır. Hastalığın tanısı; fiziksel muayene, ABI, BT/MR Anjiyografi, Dubleks Doppler Ultrason ve DSA tetkikleriyle kesinleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak ise diyabet, hipertansiyon veya kalp hastalığı öyküsü bulunmayan 150 sağlıklı birey seçilmiştir. Katılımcıların tamamı farklı bölgelerden gelmekte olup aralarında genetik bir bağ bulunmamaktadır. Gönüllülerin yazılı onayları alınarak yürütülen çalışmada, periferik kan örnekleri üzerinden gerçekleştirilen gen ekspresyon analizleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında tamamlanmıştır.

3.2. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Total kolesterol, trigliserid, açlık kan şekeri, ALT, AST, LDL, HDL, hematokrit, üre ve kreatinin gibi biyokimyasal parametrelerin ölçümü, çalışmaya katılan bireylerden elde edilen venöz kan örnekleri kullanılarak Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı’nda tamamlanmıştır.

3.2.1. Kullanılan Kimyasallar:

Çalışma kapsamında kullanılan temel kimyasallar ve reaktifler, ilgili ticari firmalardan yüksek saflık derecesinde temin edilmiştir. Bu bağlamda; KCl, NaCl ve Ficoll 1077 Sigma firmasından; Na2HPO4, KH2PO4, Etanol ve İzopropanol ise Merck'ten tedarik edilmiştir. Moleküler analizler ve gerçek zamanlı PCR süreçlerinde kullanılan LightCycler® sistemi ile birlikte MgCl2, Proteinaz K, Reverse Transkriptaz enzimi, reaksiyon tamponu, DTT, dNTP karışımı, SyberGreen® Master ve RNaz inhibitörü Roche markadır. β-Merkaptoetanol ise Gibco firmasından sağlanmıştır.

3.2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar:

Lenfositlerin Ayrıştırılması ve RNA Ekstraksiyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler:

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

NaCl 8 g

Distile su 1000 ml

Na_2HPO_4 1.44 g

KCl 0.2 g

KH_2PO_4 0.24 g

Tablo 3-1: RNA İzolasyon Kiti: PureLink™ RNA Mini Kit İçeriği ve Kullanım Öncesi Hazırlıklar

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.

3.2.3. RNA izolasyon kitinde kullanılan tampon ve çözeltiler

RNaz içermeyen su

Lizis Tamponu (%1 oranında 2-merkaptoetanol ile)

Yıkama Tamponu I

Yıkama Tamponu II

3.2.4. Kullanılan Cihazlar

Hassas Terazi, CHYO

Vorteks, Velp

Santrifüj, Hettich

Soğutmalı Santrifüj, Hettich

Etüv, Memmert

Ph Metre, WTW

Çalkalamalı Su Banyosu, Kottermann

Çeker Ocak, Termal

Mikropipetler, Socorex

Manyetik karıştırıcı, Ühromag

LightCycler® 1.5, Roche

Nanodrop, Thermo Scientific

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

Saf su cihazı, Millipore Elix 3

Otoklav, Hirayama

Termal Döngü Cihazı, Applied Biosystems

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

3.3. YÖNTEMLER

3.3.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarından 10 ml'lik heparinli steril tüplere alınan periferik kan örneklerinden lenfosit ayrıştırılması amacıyla yoğunluk gradyanı santrifüj yöntemi uygulanmıştır. Bu süreçte, kan örnekleri öncelikle PBS ile 1:1 oranında dilüe edilmiş; ardından 15 ml'lik falkon tüplerine 3 ml Ficoll 1077 eklenmiştir. PBS ile sulandırılan kan örnekleri, tüplerdeki Ficoll 1077 fazının üzerine fazlar birbirine karışmayacak şekilde dikkatlice eklenerek tabakalandırılmıştır. Hazırlanan bu gradyanlar 1600 rpm hızda 35 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj neticesinde orta fazda oluşan lenfosit fraksiyonu (buffy coat) titizlikle yeni bir falkon tüpüne aktarılmış ve üzerine yıkama amacıyla 1:1 oranında PBS ilave edilmiştir. 12 dakika süren ikinci bir santrifüj (1600 rpm) aşamasından sonra süpernatant uzaklaştırılmış; elde edilen lenfosit pelletleri RNA izolasyon aşamasına kadar 80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.2. Total RNA İzolasyon Protokolü

Lenfosit hücrelerinden total RNA izolasyonu, PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies) kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, dondurulmuş hücre pelletleri üzerine %1 β-merkaptoetanol içeren 0.6 mL lizis tamponu eklenmiş ve pelletin tamamen çözülmesi amacıyla numuneler vortex ile karıştırılmıştır. Homojenizasyonun sağlanması için oda sıcaklığında 20 dakika bekletilen her bir numuneye, 1:1 oranında %70'lik etanol ilave edilerek karışım tekrar vortexlenmiştir. Hazırlanan 700 µl'lik numuneler toplama tüplerinin içine yerleştirilen filtre tüplerine aktarılmış ve oda sıcaklığında 12,000 x g hızında 15 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplama tüplerinde biriken sıvı uzaklaştırılarak filtre tüpleri aynı toplama tüplerine yerleştirilmiş ve bu işlem tüm numune hacmi bitene kadar tekrarlanmıştır.

Saflaştırma sürecinde, filtre tüplerine 700 µl Wash Buffer I eklenerek 12,000 x g hızında 15 saniye santrifüj yapılmış; ardından filtre tüpleri yeni toplama tüplerine alınmıştır. Yıkama işlemi 500 µl Wash Buffer II (etanol katkılı) eklenerek aynı hız ve sürede iki kez tekrarlanmıştır. Membran yüzeyinin tamamen kurutulması amacıyla filtre tüpleri 12,000 x g'de 2 dakika boyunca boş olarak santrifüj edilmiştir. Son aşamada, filtre tüpleri steril 1.5 mL'lik eppendorf tüplerine yerleştirilerek membran merkezine 50 µl RNase-free su eklenmiş ve 1 dakikalık inkübasyonun ardından 12,000 x g'de 2 dakika santrifüj edilerek RNA elüsyonu

tamamlanmıştır. Elde edilen total RNA örnekleri, cDNA sentezi aşamasına kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.3. RNA Konsantrasyonu ve Saflığının Analizi

İzole edilen toplam RNA örneklerinin miktar ve saflık dereceleri Nanodrop (Thermo Scientific) spektrofotometre cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Her bir numuneden 1 µl alınarak cihaza yüklenmiş, 260 nm dalga boyundaki optik yoğunluk (OD) değerleri üzerinden konsantrasyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Numunelerin saflık düzeyleri ise 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki OD değerlerinin birbirine oranlanması (260/280) ile saptanmıştır. RNA miktar ve saflık analizlerinde aşağıda sunulan standart formüllerden yararlanılmıştır.

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

RNA saflığı= OD 260/ OD 280= 2

3.3.3.1. cDNA Sentezi

Örneklerden elde edilen total RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi amacıyla Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılmıştır. Protokolün ilk aşamasında, 13 µl kalıp RNA ile uygun primerler ince duvarlı PCR tüplerinde bir araya getirilerek Tablo 3.2'de belirtilen karışım hazırlanmıştır. Kalıp RNA'nın sahip olabileceği ikincil yapıları denatüre etmek amacıyla bu karışım, 65°C'de 10 dakika ve ardından 4°C'de 1 dakika süren sıcaklık döngüsüne tabi tutulmuştur. Denatürasyon işleminin ardından, buz üzerinde Tablo 3.3'te detaylandırılan ters transkriptaz (RT) reaksiyon bileşenleri tüplere ilave edilmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımı dikkatlice homojenize edilip kısa süreli santrifüjlendikten sonra, Tablo 3.4'te sunulan termal döngü koşulları altında ters transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun tamamlanmasını takiben elde edilen cDNA örnekleri, sonraki analizlere kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

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	

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	

Tablo 3-4: cDNA reaksiyon döngüleri

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

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

Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen RNA örneklerinin cDNA'ya dönüştürülmesini takiben hedef genlere özgü lncRNA ifade seviyeleri qRT-PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. lncRNA düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi amacıyla, Roche LightCycler® 1.5 (Roche Applied Biosystems™, California, USA) sistemi ve LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kiti kullanılarak kantitatif ölçümler gerçekleştirilmiştir. Hedef gen ifadelerinin doğru ve güvenilir bir şekilde saptanabilmesi için her dokuda stabil olarak ifade edildiği bilinen referans (housekeeping) genler aracılığıyla normalizasyon işlemi yapılmıştır. Deneysel süreçte olası kontaminasyonların takibi amacıyla kalıp cDNA içermeyen (NTC) örnekler negatif kontrol olarak reaksiyona dahil edilmiştir. Analizlerin tümü termal iletkenliği optimize etmek amacıyla 20 µl hacimli özel cam kapillerler içerisinde tamamlanmıştır.

3.3.5. Normalizasyon

Hedef genlerin ekspresyon seviyelerindeki olası varyasyonları standardize etmek amacıyla normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda her bir numuneye ait hedef gen ifade düzeyleri, kararlı bir şekilde ifade edilen GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) referans (housekeeping) geninin ekspresyon seviyeleri ile oranlanarak karşılaştırılmıştır. Bu yöntemle, hücreler arası miktar farklılıkları ve deneysel süreçlerden kaynaklanabilecek sapmalar elimine edilerek verilerin doğruluğu güvence altına alınmıştır.

Tablo 3-5: Deneyde kullanılan qRT-PCR primer özellikleri

	Konum	Dizi	Uzunluk	Ürün Uzunluğu
İleri PrimerHIF1A-AS1	61681-61695	GTGGGCATCCATAGACAT	18	117
Geri Primer HIF1A-AS1	61681	TCCCTAGTGGACCAACAT	18	117
İleri PrimerHIF1A-AS2	61667.412-61667.433	TCTGTGGCTCAGTTCCTTTTGT	22	115
Geri Primer HIF1A-AS2	61667.507-61667.526	ATGTAGGAAGTGCCAGAGCC	20	115
İleri Primer GAPDH	6536.276-6536.296	GGACCAATACGACCAAATCCG	21	120
Geri Primer GAPDH	6536.377-6536.395	AGCCACATCGCTCAGACAC	19	120

3.3.6. qRT-PCR Reaksiyon karışımının hazırlanması

cDNA sentezinin tamamlanmasının ardından, hedef genlerin ifade düzeylerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen qRT-PCR analizi, LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kiti kullanılarak Roche LightCycler® 1.5 (Roche Applied Biosystems™, California, USA) cihazında yürütülmüştür. Reaksiyon karışımının hazırlanması sürecinde, ilk olarak donmuş halde bulunan Reaction Mix (Vial 1b) çözündürülmüş ve bileşenlerin stabilitesini korumak amacıyla ışık almayacak şekilde muhafaza edilmiştir. Ardından, Enzyme (Vial 1a) ve Reaction Mix (Vial 1b) kısa süreli santrifüj işlemine tabi tutularak buz üzerinde bekletilmiştir. Hazırlık aşamasında, Vial 1a'dan alınan 10 µl'lik hacim Vial 1b'ye aktarılmış ve elde edilen karışım

pipetleme yöntemiyle dikkatlice homojenize edilmiştir. Hazırlanan bu yeni karışım, 'Vial 1: LC FastStart DNA Master SYBR Green I, 10x Konsantrasyon' olarak yeniden etiketlenmiş; nihai PCR reaksiyonu ise Tablo 3.6'da ayrıntıları verilen bileşenler doğrultusunda kurulmuştur.

Tablo 3-6: 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 3-7: 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 3-8: LightCycler®qRT-PCR Sıcaklık Döngüleri

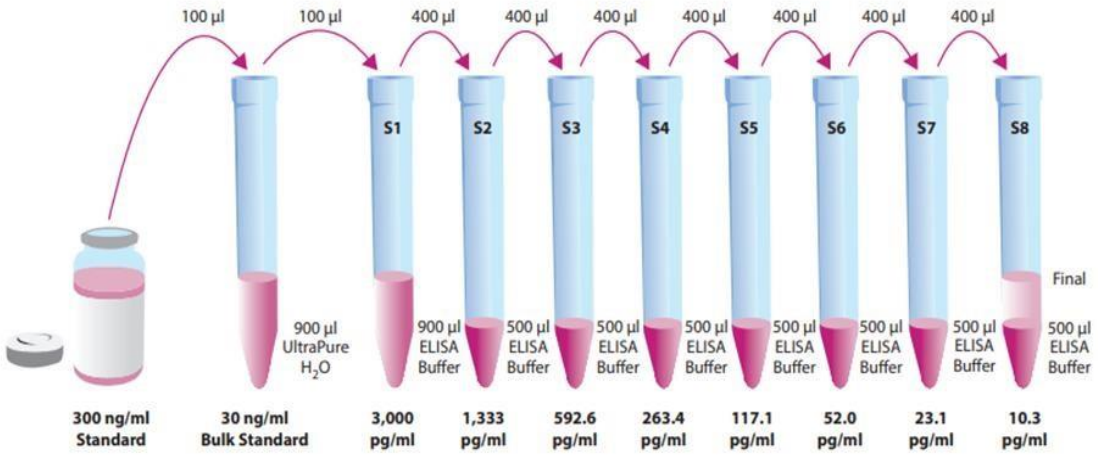
	Hedef Sıcaklık	Durma Süresi (hh:mm: ss)	Ramp Oranı (ºC/s)	Acquisition Modu (per ºC
Pre-İnkübasyon	95 ºC	00:10:00	20	None
Amplifikasyon	95 ºC	00:00:10	20	None
	62 ºC	00:00:07	20	None
	72 ºC	00:00:10	20	Single
Melting Curve	95 ºC	00:00:00	20	None
	65 ºC	00:00:15	20	None
	95 ºC	00:00:00	20	Continuous
Soğutma	40 ºC	00:00:30	20	None

3.3.7. Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA)

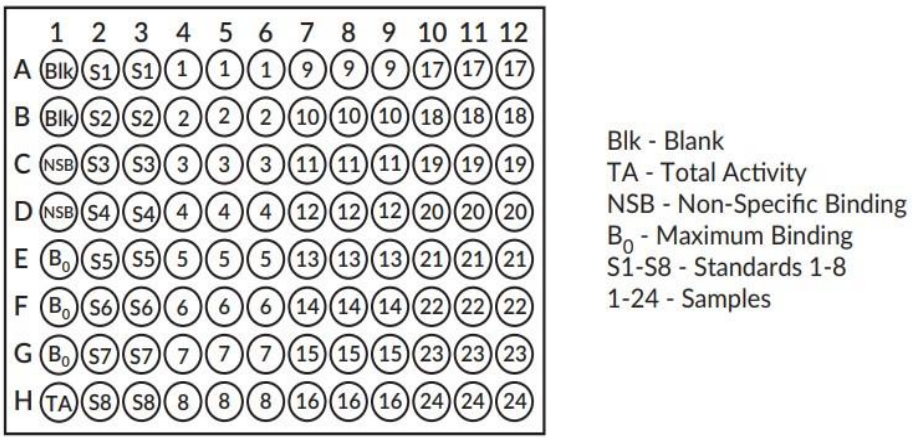
Plazma örneklerindeki RNA hasar belirteci olan 8-hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) seviyeleri, Cayman's DNA/RNA Oxidative Damage (High Sensitivity) ELISA Kit (Ürün No: 589320) kullanılarak analiz edilmiştir. Protokolün hazırlık aşamasında, 10X konsantrasyondaki ELISA tamponu (Ürün No: 400060) 90 mL ultra saf su ile, 400X konsantrasyonlu 5 mL yıkama tamponu ise 2 litre ultra saf su ve 1 mL Polysorbate 20 (Ürün No: 400035) ilavesiyle seyreltilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarına ait plazma numuneleri 1:100 oranında dilüe edilerek analize hazır hale getirilmiştir. Standartların hazırlanması için 100 µL DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Standardı (Ürün No: 10012603), 900 µL ultra saf su ile karıştırılmış؛ ardından seri seyreltme yöntemiyle 30 ng/mL'lik Bulk Standard kullanılarak 8 farklı konsantrasyon basamağı oluşturulmuştur. Eş zamanlı olarak 100 dtn monoklonal antikor (Ürün No: 10012602), 6 mL ELISA tamponu içerisinde çözündürülmüştür.

Uygulama aşamasında, 96 kuyucuklu plaka üzerinde NSB kuyucuğuna 100 µL, B_0 kuyucuğuna ise 50 µL ELISA tamponu eklenmiş; ardından hazırlanan standartlar (S1-S8) ve plazma

örnekleri 50'şer µL hacminde ilgili kuyucuklara aktarılmıştır. Reaksiyonun devamında TA ve Blk kuyucuklarına 50 µL AChE Tracer, ardından TA, NSB ve Blk dahil tüm kuyucuklara 50 µL monoklonal antikor ilave edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklar boşaltılıp yıkama tamponu ile durulanmış ve her birine 200 µL Ellman's Reaktif eklenmiştir. TA kuyucuğuna yapılan 5 µL Tracer ilavesinden sonra plaka plastik film ile kapatılarak karanlık ortamda, karıştırıcı üzerinde 90-120 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Son aşamada, plaka 405 ve 420 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak analiz edilerek 8-OHdG düzeyleri tayin edilmiştir.



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



Şekil 3-2: Plate Formatı.

3.4. İstatistiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri SPSS 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) yazılım paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğu tüm alt gruplarda Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edilmiştir. Parametrik test varsayımları (normal dağılım şartları) karşılanamadığı için bağımsız iki grup arasındaki karşılaştırmalarda parametrik olmayan bir yöntem olan Mann-Whitney U testi tercih edilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler; sürekli değişkenler için ortalama ± standart sapma (SD) kategorik değişkenler için ise gözlem sayısı (n) ve yüzde (%) değerleri olarak sunulmuştur.

Gruplar arasındaki kategorik verilerin analizi, Ki-kare (χ^2) veya örneklem büyüklüğüne göre Fisher'ın kesin (Fisher's exact) testi ile gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR verilerinden elde edilen döngü eşik Ct değerleri kullanılarak genlerin göreceli ekspresyon düzeyleri $2^{\wedge-\Delta Ct}$ ve $2^{\wedge-\Delta\Delta Ct}$ metotlarına göre hesaplanmıştır. Değişkenler arasındaki olası ilişkiler Spearman korelasyon katsayısı ile test edilmiş tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Periferik arter (femoro-popliteal ve aorta-iliak) oklüzyonlu hastalarda, lncRNA HIF1AAS1 ve HIF1A-AS2 ekspresyonu ve DNA/RNA oksidatif hasarı üzerine yaptığımız çalışmamız hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki gruptan oluşturulmuştur. İstanbul ÜniversitesiCerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi Polikliniğine başvuran, PAH tanısı alan 150 hastadan ve 150 sağlıklı kontrolden alınan periferik kan örnekleri kullanılarak tez çalışmamız gerçekleştirildi. Hasta grubu 34-85 yaş aralığında 115 erkek, 35 kadın, kontrol grubu ise 25-85 yaş aralığında 101 erkek, 49 kadın bireyden oluşturuldu. Yapılan qRT-PCR analizlerinde Ct değeri 40 ve üzeri olan örneklerin çalışma dışı bırakılması sonrası, PAH grubunda 143 ve kontrol grubunda 141 birey üzerinden çalışmamız gerçekleştirilmiştir.

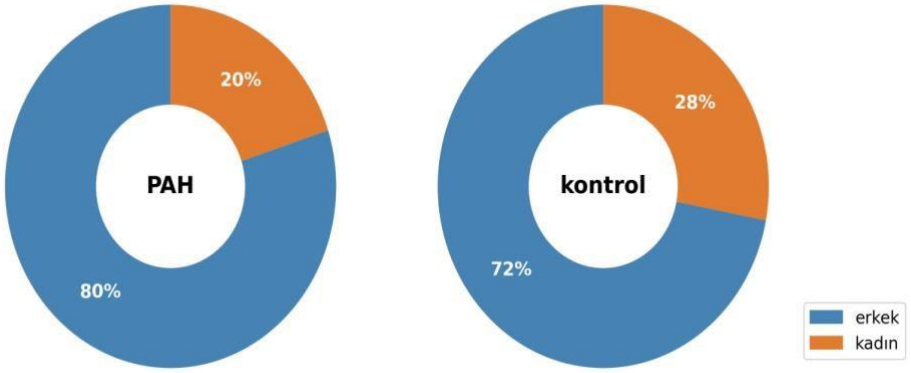
Hasta ve kontrol gruplarının demografik ve biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması Tablo 4-1'de sunulmuştur. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Biyokimyasal parametreler incelendiğinde; açlık kan şekeri, üre, kreatinin, C-reaktif protein (CRP), HDL-kolesterol ve hematokrit düzeylerinin PAH grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Total kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid, AST, ALT, albümin ve total protein düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Cinsiyet dağılımları Şekil 4-1'de gösterilmiştir.

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

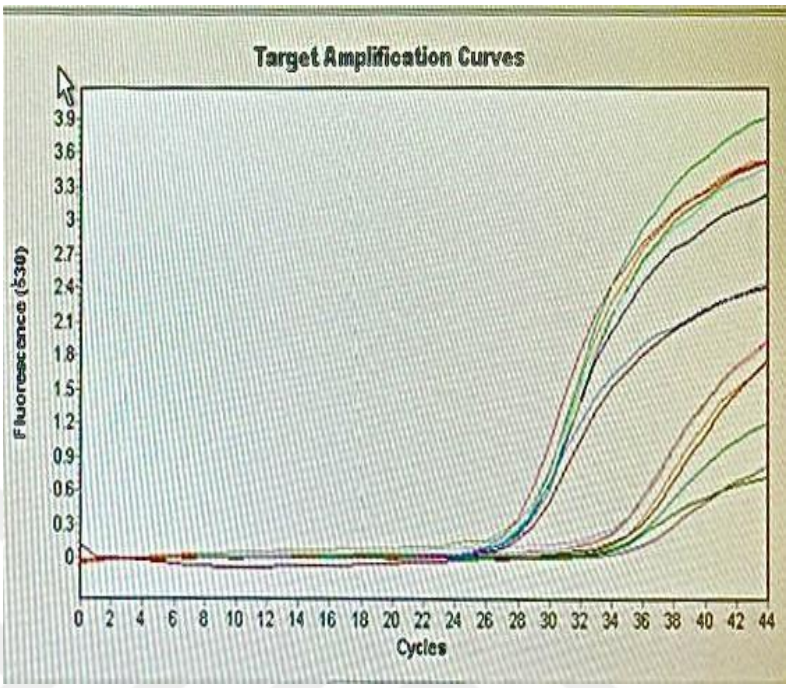
Parametre	Hasta Grubu (n=144)	Kontrol Grubu (n=141)	p
Yaş (Ort ± SD)	61,22±10,69	59,55± 11,33	0,301
Cinsiyet (E/K)	115/29	101/40	0,105
Açlık kan şekeri (mg/dL)	132,48 ± 61,90	93,79 ± 27,74	<0,001
Üre (mg/dL)	43,06 ± 24,15	32,83 ± 10,04	0,001
Kreatinin (mg/dL)	1,27 ± 1,19	0,90 ± 0,070	<0,001
Total Protein (g/dl)	10,75 ± 21,71	7,24 ± 0,36	0,450
Albümin (g/dl)	4,25 ± 0,66	4,59 ± 0,28	0,079
ALT (IU/L)	22,02 ± 21,61	20,82 ± 9,66	0,051
AST (IU/L)	21,69 ± 12,84	19,04 ± 5,19	0,980
LDH (U/L)	203,57 ± 70,05	203,53 ± 46,22	0,648
CRP (mg/L)	38,69 ± 61,35	5,05 ± 5,66	<0,001
Total Kolestrol (mg/dL)	180,85 ±43,25	182,27 ± 40,59	0,810
Trigliserid (mg/dL)	172,49 ± 184,82	147,95 ± 70,68	0,355
HDL Kolestrol (mg/dL)	42,071 ± 15,0136	47,248 ± 14,327	0,018
LDL Kolestrol (mg/dL)	124,388 ± 83,7902	121,794 ± 31,461	0,313
Hematokrit (%)	36,06 ± 6,66	40,88 ± 4,53	<0,001

Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.



Şekil 4-1: Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet dağılımları

Her iki gruba ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4-2'de, HIF1A-AS1 genine ait kat değişimleri ise Şekil 4-3'te sunulmuştur.



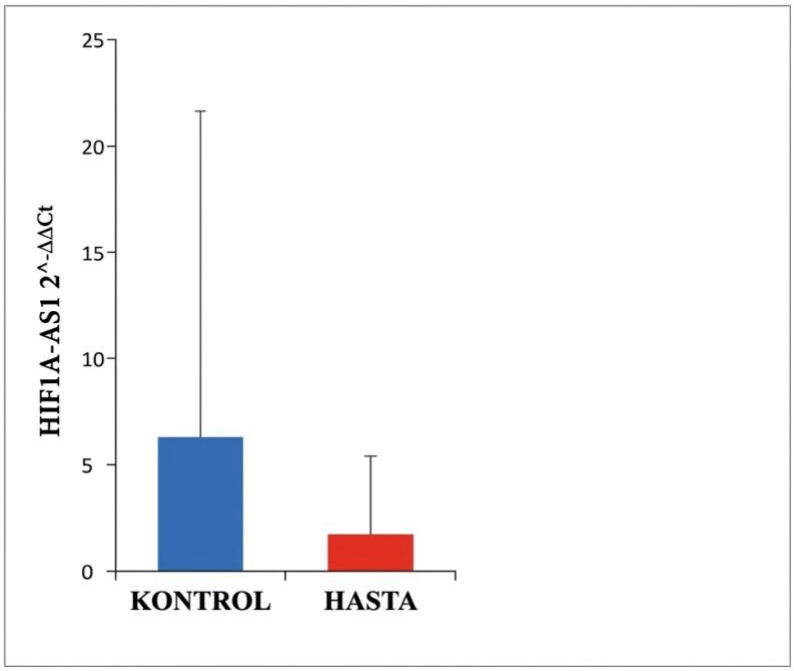
Şekil 4-2: PAH ve kontrol gruplarında HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 genlerine ait amplifikasyon eğrileri

HIF1A-AS1 geninin lncRNA ekspresyon düzeyleri PAH ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,001$). PAH grubunda HIF1A-AS1 gen ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Hasta ve Kontrol Gruplarının HIF1A-AS1 Gen Ekspresyonu açısından Karşılaştırılması

LncRNA Ekspresyonu	PAH (n=144)	Kontrol (n=141)	p
HIF1A-AS1 ($2^{-\Delta Ct}$)	0,15 ± 0,47	0,55 ± 1,91	< 0,001
HIF1A-AS1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	1,71 ± 5,37	6,28 ± 21,57	< 0,001

Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.



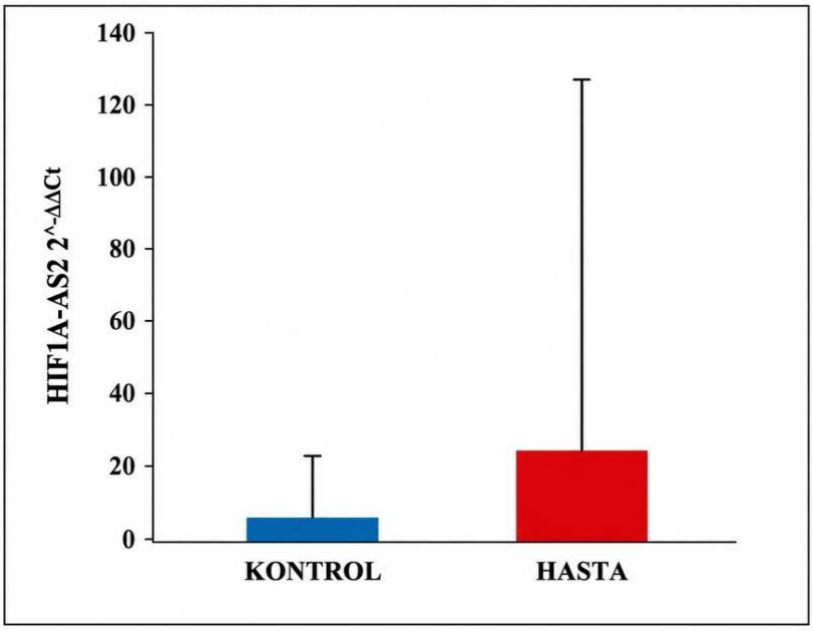
Şekil 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında HIF1A-AS1 genine ait kat değişimi

HIF1A-AS2 geninin lncRNA ekspresyon düzeyleri PAH ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında, hasta grubunda yüksek bulunmuş ancak istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmamıştır (p=0,28) (Tablo 4-3). HIF1A-AS2 genine ait kat değişimleri Şekil 4-4'te gösterilmiştir.

Tablo 4-3: Hasta ve Kontrol Gruplarının HIF1A-AS2 Gen Ekspresyon açısından Karşılaştırılması

LncRNA Ekspresyonu	PAH (n=144)	Kontrol (n=141)	p
HIF1A-AS2 ($2^{-\Delta Ct}$)	4,26 ± 22,83	1,17 ± 4,03	0,28
HIF1A-AS2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	23,69 ± 126,80	6,52 ± 22,41	0,28

Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.



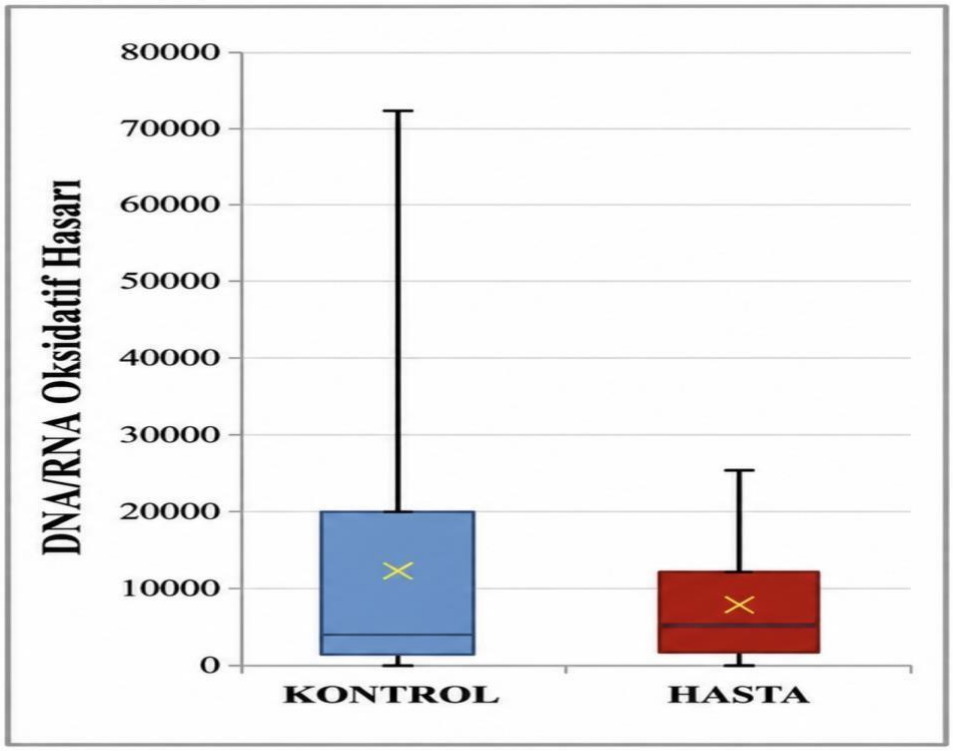
Şekil 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında HIF1A-AS2 genine ait kat değişimi

DNA/RNA oksidatif hasar belirteçleri olan 8-OHG, 8-OHdG ve 8-hidroksiguanin düzeyleri, PAH ve sağlıklı kontrol gruplarında ölçülmüştür. Hasta ve kontrol grupları arasında oksidatif hasar düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,764) (Tablo 4-4), (Şekil 4-5).

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

	PAH (n=42)	Kontrol (n=41)	p
8-OHG, 8-OHdG, 8-hidroksiguanin(ng/ml)	8550,07 ± 9589,19	13281,01 ± 20245,56	0,764

Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.



Şekil 4-5: Hasta ve kontrol gruplarında oksidatif DNA/RNA hasar miktarı

HIF1A-AS1 gen ekspresyon düzeyleri cinsiyet açısından değerlendirildiğinde, hem PAH hem de kontrol grubunda kadın ve erkek bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Hasta ve Kontrol gruplarında HIF1-AS1 ekspresyonunun cinsiyet açısından karşılaştırılması

	Cinsiyet	HIF1-AS1 lncRNA Ekspresyonu ($2^{-\Delta Ct}$)	HIF1-AS1 lncRNA Ekspresyonu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	p
PAH	Erkek (n=113)	0,16 ± 0,50	1,81 ± 5,70	0,479
	Kadın (n=29)	0,12 ± 0,34	1,36 ± 3,89	
Kontrol	Erkek (n=101)	0,68 ± 2,23	7,70 ± 25,24	0,072
	Kadın (n=40)	0,23 ± 0,37	2,69 ± 4,28	

Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.

Benzer şekilde, HIF1A-AS2 gen ekspresyon düzeyleri açısından da her iki grupta cinsiyete bağlı anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p>0,05) (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Hasta ve Kontrol gruplarında HIF1-AS2 ekspresyonunun cinsiyet açısından karşılaştırılması

	Cinsiyet	HIF1-AS2 lncRNA Ekspresyonu ($2^{-\Delta Ct}$)	HIF1-AS2 lncRNA Ekspresyonu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	p
PAH	Erkek (n=114)	5,02 ± 25,50	27,90 ± 141,63	0,714
	Kadın (n=29)	1,28 ± 2,73	7,16 ± 15,16	
Kontrol	Erkek (n=101)	0,43 ± 0,76	2,43 ± 4,22	0,088
	Kadın (n=40)	3,02 ± 7,21	16,82 ± 40,06	

Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.

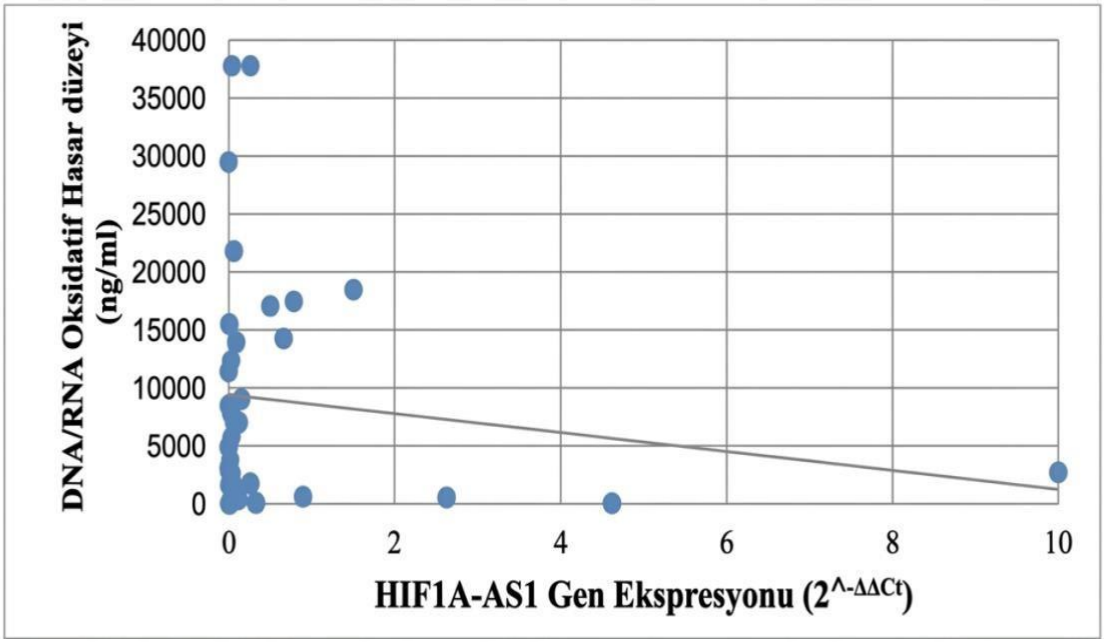
DNA/RNA oksidatif hasar belirteçlerinin cinsiyete göre değerlendirilmesinde, PAH grubunda kadın ve erkek bireyler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0,05). Kontrol grubunda ise oksidatif hasar düzeylerinin erkek bireylerde kadın bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (p=0,035) (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: 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=32)	8390,41 ± 10063,94	0,658
	Kadın (n=10)	9060,97 ± 8345,69	
Kontrol	Erkek (n=21)	16072,27 ± 18842,14	0,035
	Kadın (n=20)	10350,17 ± 21715,10	

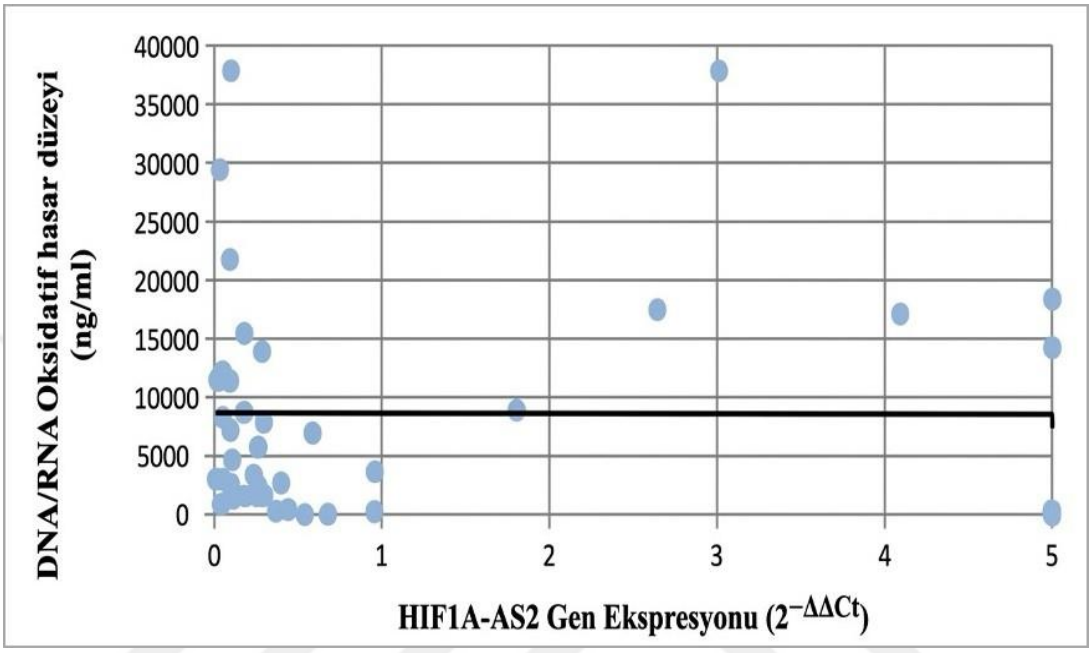
Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.

PAH grubunda HIF1A-AS1 gen ekspresyon düzeyi ile DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. HIF1A-AS1 gen ekspresyonu ile DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri arasında negatif yönde zayıf bir korelasyon gözlenmiştir ancak bu ilişki istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır (r=0,148, p = 0,36) (Şekil 4-6).



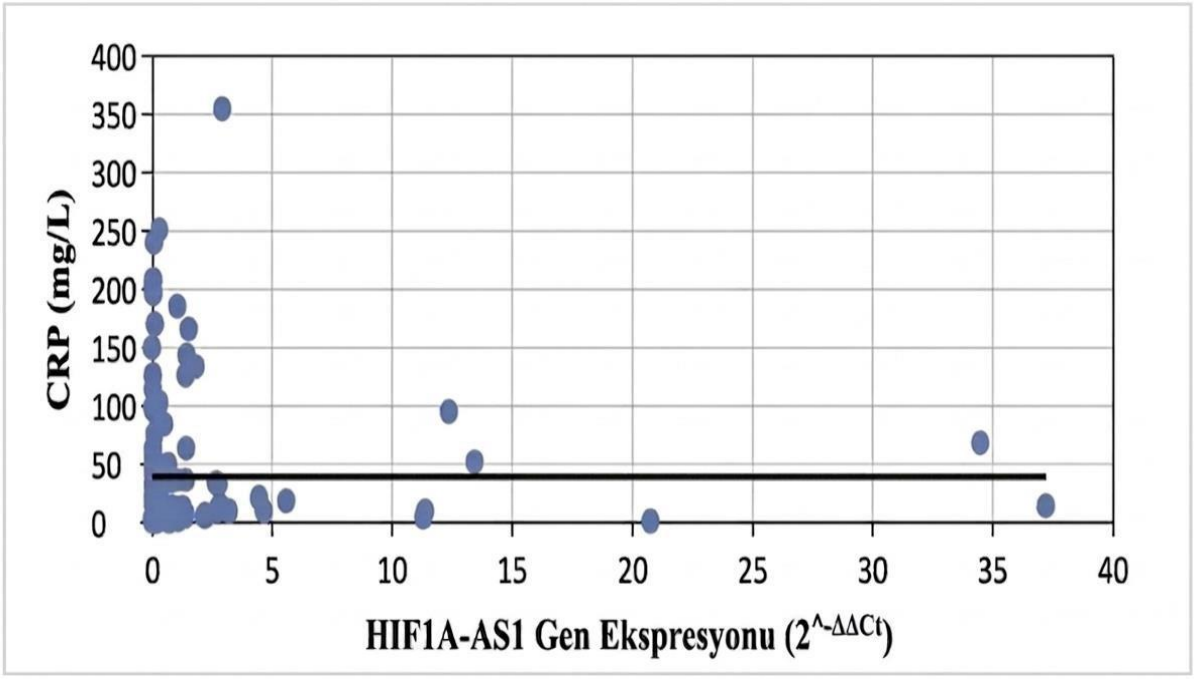
Şekil 4-6: PAH grubunda HIF1A-AS1 gen ekspresyonu ile oksidatif DNA/RNA hasar düzeyi arasındaki korelasyon

HIF1A-AS2 gen ekspresyonu düzeyi ile DNA/RNA oksidatif hasar belirteçleri arasında da negatif yönde ve zayıf bir korelasyon saptanmıştır, ancak bu ilişki istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmamıştır (r=-0,041, p=0,80) (Şekil 4-7).



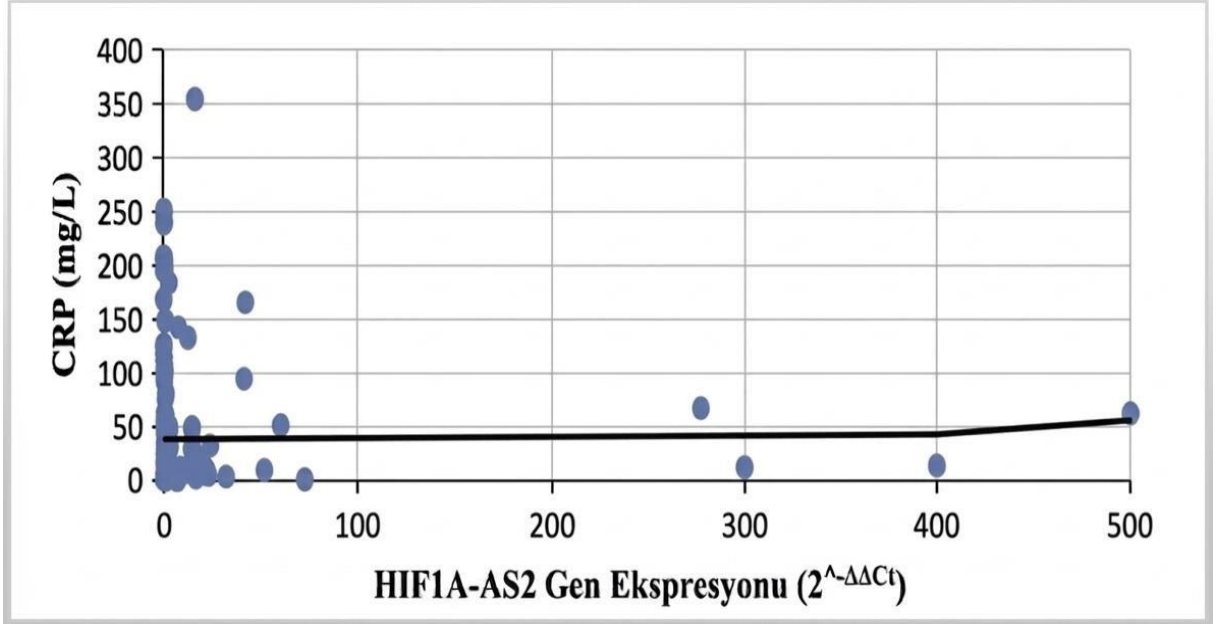
Şekil 4-7: PAH grubunda HIF1A-AS2 gen ekspresyonu ile oksidatif DNA/RNA hasar düzeyi arasındaki korelasyon

HIF1A-AS1 gen ekspresyon düzeyi ile biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyon analizi sonuçlarına göre; PAH grubunda HIF1A-AS1 ekspresyonu ile total kolesterol (r=0,229, p=0,026) arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Öte yandan, CRP (r=-0,007, p=0,938), LDL kolesterol (r=0,052, p=0,654) ve kreatinin (r=-0,078, p=0,387) düzeyleri ile HIF1A-AS1 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (Şekil 4-8).



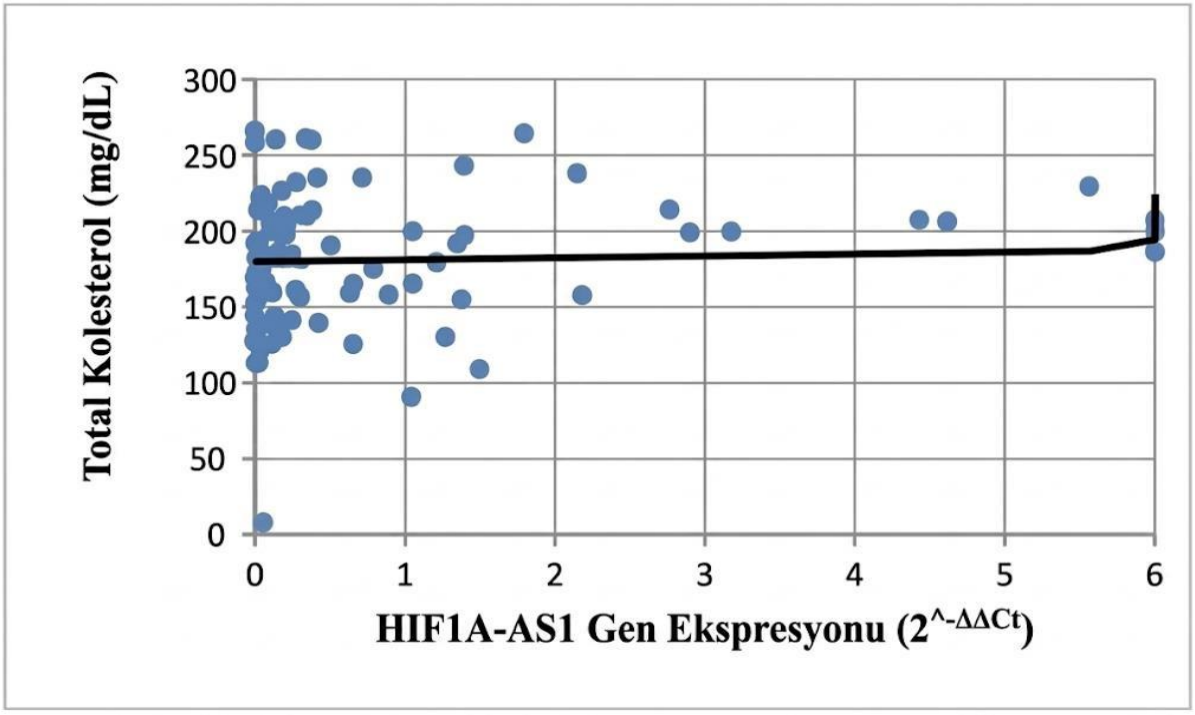
Şekil 4-8: PAH grubunda HIF1A-AS1 gen ekspresyonu ile serum CRP düzeyleri arasındaki korelasyon

HIF1A-AS2 gen ekspresyon düzeyi ile biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyon analizi sonuçlarına göre; PAH grubunda HIF1A-AS2 ekspresyonu ile total kolesterol (r=0,010, p=0,921), CRP (r=0,023, p=0,801), LDL kolesterol (r=0,000, p=1,00) ve kreatinin (r=-0,018, p=0,845) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (Şekil 49).



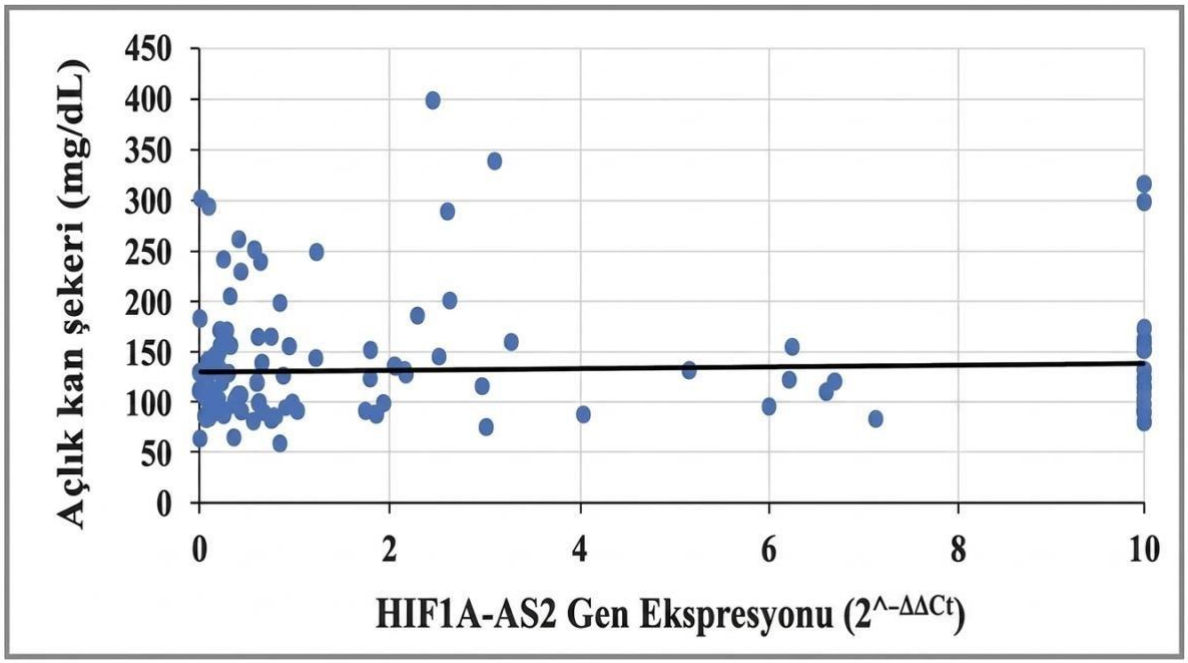
Şekil 4-9: PAH grubunda HIF1A-AS2 gen ekspresyonu ile serum CRP düzeyleri arasındaki korelasyon

PAH grubundaki bireylerde HIF1A-AS1 ekspresyonu ile total kolesterol düzeyleri arasında pozitif yönlü, istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (r=0,229, p=0,026) (Şekil 4-10). HIF1A-AS2 ekspresyonu ile total kolesterol düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (p>0,05).



Şekil 4-10: PAH grubunda HIF1A-AS1 gen ekspresyonu ile serum Total Kolesterol düzeyleri arasındaki korelasyon

HIF1A-AS2 gen ekspresyonu ile açlık kan şekeri düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (r= 0,204, p=0,023) (Şekil 4-11).



Şekil 4-11: PAH grubunda HIF1A-AS2 gen ekspresyonu ile açlık kan şekeri düzeyleri arasındaki korelasyon

PAH ve kontrol gruplarında HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 gen ekspresyon kat değişimi (fold change) biyokimyasal parametreler veDNA/RNA hasar düzeyi açısından karşılaştırılmıştır. HIF1A-AS1 geninin ekspresyon kat değişimi DNA/RNA hasar düzeyi açısından değerlendirildiğinde, hasta grubunda ekspresyonu artan ve azalan bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,76). Bununla birlikte, HIF1A-AS1 gen ekspresyonu artış gösteren hastalarda serum CRP (p=0,05), total kolesterol (p=0,039) ve LDL kolesterol (p=0,036) düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir. HIF1A-AS1 gen ekspresyonu artış ve azalış gösteren hastalar arasında açlık kan şekeri düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır(p=0,07) (Tablo 4-8). Öte yandan, HIF1A-AS2 gen ekspresyonu açısından yapılan karşılaştırmalarda, gen ekspresyonu artış ve azalış gösteren hastalar arasında biyokimyasal parametreler bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 4-8: Hasta grubunda HIF1A-AS1 kat değişimi ile biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

	HIF1A-AS1 Gen Ekspresyonu		
	Azalan (Ort ± SD)	Artan (Ort ± SD)	p
8-OHG, 8-OHdG, 8-hidroksiguanin (ng/ml)	7929,49 ± 8615,79 (n=36)	12273,50 ± 14662,12 (n=6)	0,76
Açlık kan şekeri (mg/dL)	127,59 ± 58,31 (n=96)	148,12 ± 71,60 (n=31)	0,07
CRP (mg/L)	34,20 ± 55,76 (n=96)	49,17 ± 73,45 (n=31)	0,05
Total Kolestrol (mg/dL)	175,25 ± 44,12 (n=73)	198,01 ± 37,19 (n=24)	0,039
LDL Kolestrol (mg/dL)	121,34 ± 95,97 (n=60)	134,21 ± 30,68 (n=19)	0,036

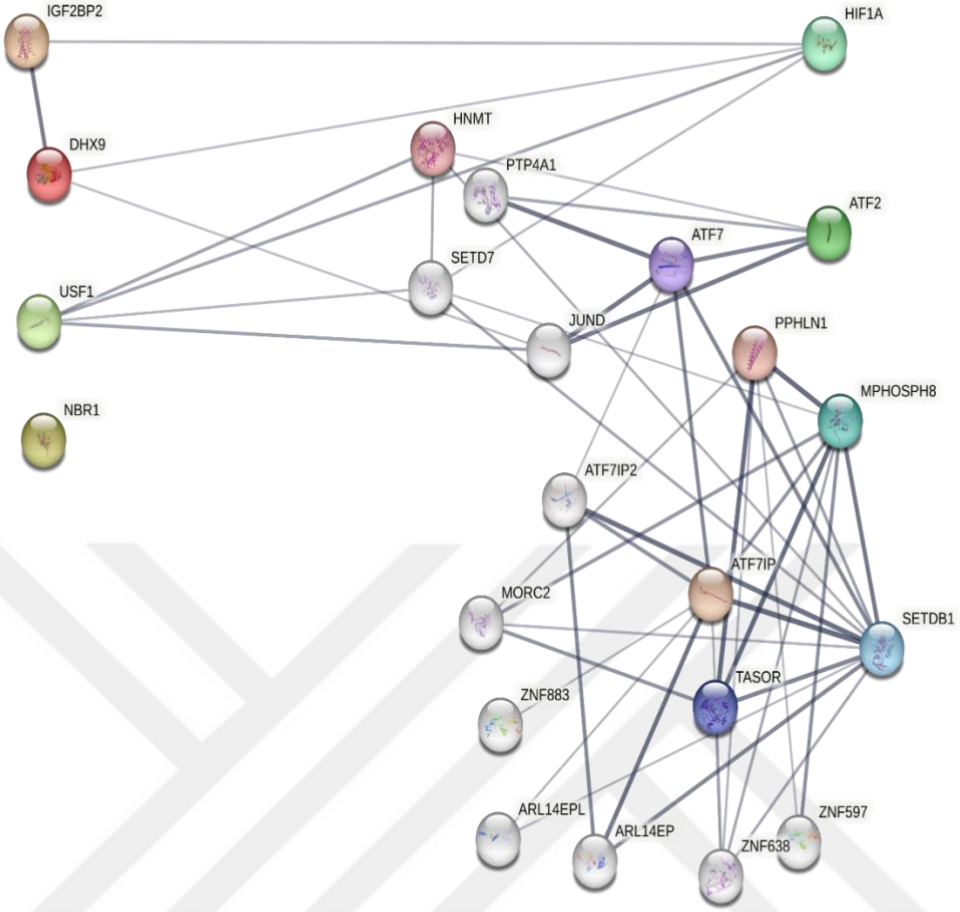
Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.

Bu çalışmada, aorta-iliak ve femoro-popliteal arter oklüzyonu bulunan PAH hastalarında HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 gen ekspresyonu ile ilişkili olabilecek moleküler mekanizmaları değerlendirmek amacıyla STRING veri tabanı kullanılarak protein–protein etkileşim ağı analizi yapılmıştır.Yapılan literatür taraması ve STRING protein-protein etkileşim ağı analizleri sonucunda, HIF1A-AS1 ile ilişkili HIF1A, ATF2 ve MPHOSPH8 (M-fazıfosfoprotein 8) proteinlerinin birinci kabukta yoğun etkileşim içinde olduğu gözlenmiştir. Bu proteinlerin, epigenetik düzenleme, transkripsiyonel kontrol, hücresel stres yanıtı ve kromatin modifikasyonu süreçlerinde ortak işlevlere sahip olduğu bilinmektedir. Öte yandan, HIF1AAS2 ile ilişkili IGF2BP2, DHX9, USF1 ve NBR1 proteinleri de birbirleriyle belirli düzeyde etkileşim göstermekte olup, daha çok RNA bağlayıcı proteinler ve transkripsiyon faktörleri olarak RNA metabolizması ve düzenlenmesi süreçlerinde görev aldıkları bilinmektedir.

Ağda dikkat çeken en yoğun etkileşim kümesi, SETDB1, ATF7IP, TASOR, MPHOSPH8 ve PPHLN1 proteinlerinden oluşmaktadır. Bu proteinlerin, HUSH (Human Silencing Hub) kompleksi ile ilişkili olduğu ve H3K9 histon metilasyonu yoluyla gen susturulmasında görev

aldığı bilinmektedir. Bu bulgu, kronik iskemi ve hipoksi koşullarında HIF1A-AS1 ve HIF1AAS2 ekspresyonunun epigenetik mekanizmalar aracılığıyla düzenlenebileceğini düşündürmektedir. Bunun yanı sıra, ağda yer alan ATF2, ATF7 ve JUND gibi transkripsiyon faktörlerinin, HIF1A ile bağlantılı olduğu gözlenmiştir. Bu proteinler hücresel stres, inflamasyon ve oksidatif yanıt süreçlerinde rol oynamakta olup, hipoksiye bağlı sinyal yollarının transkripsiyonel düzeyde aktive edildiğini göstermektedir. Özellikle kronik alt ekstremite iskemi koşullarında bu yolakların aktive olması, oksidatif stresin artışı ile uyumludur.

Ağda ayrıca DHX9 ve IGF2BP2 gibi RNA bağlayıcı proteinlerin bulunması, hipoksik ortamda yalnızca DNA düzeyinde değil, RNA stabilitesi ve RNA metabolizması düzeyinde de düzenleyici mekanizmaların devreye girdiğini göstermektedir. Bu durum, çalışmada değerlendirilen oksidatif RNA hasarı ile HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 ekspresyonu arasındaki ilişkinin biyolojik temelini desteklemektedir.Sonuç olarak, protein–protein etkileşim ağı analizi; aorta-iliak ve femoro-popliteal arter oklüzyonu bulunan hastalarda gelişen kronik hipoksi koşullarında, HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 genlerinin epigenetik düzenleme, transkripsiyonel aktivasyon ve RNA metabolizması ile ilişkili kompleks bir moleküler ağ içerisinde kritik süreçlerde yer aldığını ve tamamlayıcı roller üstlendiğini ortaya koymuştur. Bu ağın, artmış oksidatif RNA hasarı ile ilişkili olabileceği ve hastalığın patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: Protein–Protein Etkileşim Ağı (STRING veri tabanı ile çizilmiştir)

5. TARTIŞMA

Periferik arter hastalığı (PAH), aterosklerotik süreçlerin alt ekstremite arterlerini etkilemesi sonucu gelişen kronik bir vasküler hastalıktır ve dünya genelinde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bu çalışmada, PAH patogenezinde hipoksi ile ilişkili uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA) ve oksidatif hasarın rolünü araştırmak amacıyla, 144 PAH hastası ve 141 sağlıklı kontrolde HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 gen ekspresyon düzeyleri ile DNA/RNA oksidatif hasar belirteçleri değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, periferik arteriyel hastalık tanısı alan hastalar ile sağlıklı kontrol grubu yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş olup, bu durum sonraki karşılaştırmaların güvenilirliğini artırmaktadır. Hasta ve kontrol grubu, biyokimyasal parametreler açısından karşılaştırıldığında hasta grubunda açlık kan şekeri, üre, kreatinin ve C-reaktif protein (CRP) düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek, hematokrit ve HDL-kolesterol düzeyleri ise anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bunun yanı sıra total kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid düzeyleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu durumun, hasta grubunda statin grubu ilaçların kullanımı ile lipid parametrelerinin regüle edilmiş olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bulgularımız, biyokimyasal parametreler açısından değerlendirildiğinde literatürdeki çalışmalarla paralellik göstermektedir [182].

CRP'nin sistemik inflamasyon belirteci olarak yükselmesi, PAH'ın en güçlü risk faktörlerinden biridir ve majör kardiyovasküler olaylar, kritik ekstremite iskemisi gelişimi ve tekrar girişim ihtiyacını artırmaktadır [183-185]. HDL-kolesterol düşüklüğü de PAH için bağımsız bir risk faktörü olup endotel fonksiyon bozukluğu ve kolesterol dışa atılım kapasitesinin azalması ile ilişkilendirilmiştir [186]. Yüksek kan şekerive kronik hiperglisemi oksidatif stres, inflamasyon ve endotel hasarını artırarak PAH oluşumuna zemin hazırlamaktadır [187]. Üre ve kreatinin artışı, PAH'da sık görülen sistemik ateroskleroz nedeniyle hafif böbrek fonksiyon bozukluğunu işaret edebilmektedir [188]. Bu farklılıklar, PAH'ın yalnızca lokal vasküler bir hastalık değil, sistemik inflamasyon-metabolik sendromun bir parçası olduğunu vurgulamaktadır.

Çalışmamızda, biyokimyasal bulgulara ek olarak, moleküler düzeyde de belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Çalışma grubumuzu oluşturan aorta-iliak ve femoro-popliteal arterlerinde darlık bulunan PAH hastalarının ve sağlıklı kontrol grubunun periferik kan mononükleer hücrelerinde HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 lncRNA ekspresyon düzeylerini araştırdık. PAH hastalarında HIF1A-AS1 ekspresyon düzeyinin sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olduğu gözlendi. HIF1A-AS1, hipoksiye yanıtın ana düzenleyicilerinden biri

olan HIF1A geninin antisens uzun kodlamayan RNA'sı olup, HIF-1α sinyal yolunun transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde ince ayarını sağlayan epigenetik mekanizmalarla ilişkilidir [189-191]. Uzun kodlamayan RNA'ların ifade düzeylerinin düzenlenmesinde; kromatin yeniden şekillenmesi, transkripsiyonel aktivitenin düzenlenmesi, RNA stabilitesinin kontrolü ve mikroRNA'larınsüngerlenmesi gibi çok katmanlı süreçlerin rol aldığı bilinmektedir [192].

LncRNA'ların kardiyovasküler hastalıklardaki rolü son yıllarda yoğun araştırma konusu olmuştur. Bununla birlikte, PAH'da HIF1A-AS1 ekspresyonunu değerlendiren çalışmalar son derece sınırlıdır. Yundung ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, diyabet hastalığı bulunan ve bulunmayan PAH hastalarının vasküler düz kas hücrelerinde (VSMC)gerçekleştirdikleri transkriptomik analiz ile 28 lncRNA'nın ekspresyon değişikliklerini incelemişlerdir. Bulguları arasında HIF1A-AS3 ekspresyonunun düz kas hücre fonksiyonu ve fenotipik geçişleri ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir [193]. Bir başka araştırmada, ekzosomallncRNA HIF1AAS1'in aterosklerotik hastalarda dolaşımda yükseldiği ve potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir [6]. HIF1A-AS1 ekspresyonunda gözlenen belirgin azalmanın ortaya çıkmasında rol oynayan mekanizmalar çok yönlü olabilir. PAH hastalığında erken evrede lipid birikimi ön planla olup ileri evrede hipoksi ve vasküler yeniden şekilleme daha belirgin hale gelmektedir. Literatürde ekzozomal HIF1A-AS1 düzeylerinin aterosklerotik hastalarda arttığı bildirilmiş olmakla birlikte, çalışmamızda PBMC'lerde anlamlı bir azalma saptanmıştır. Bu farklılık, analiz edilen biyolojik kompartmanların farklılığından kaynaklanabilir. Ekzozomal RNA'ların hücrelerden aktif olarak salgılanması, hücre içi düzeylerin azalmasına karşın dolaşımda artmış olarak saptanmasına yol açabilir. Ayrıca aterosklerozun çok hücreli yapısı göz önüne alındığında, dolaşımdaki ekzozomal HIF1AAS1'in vasküler hücre kökenli olması, PBMC'lerde gözlenen ekspresyon paterninden farklılık göstermesini açıklayabilir. Bunun yanı sıra hastalık evresi, hipoksiye bağlı yanıtlar ve metodolojik farklılıklar da bu uyumsuzluğa katkıda bulunmuş olabilir. Akut hipokside HIF-1α ve ilişkili lncRNA'ların ekspresyonu artmaktadır [189]. Ancak kronik hipokside, hücrelerin yeniden programlama geçirdiği ve bazı hipoksi-yanıt genlerinin baskılandığı bilinmektedir [194]. PAH hastalığında uzun süreli iskemi, HIF1A-AS1 promoter bölgesinde DNA metilasyonu veya histon modifikasyonlarına yol açmış olabilir. Aynı zamanda HIF1A-AS1'in, HIF-1α aşırı aktivasyonunu sınırlayan negatif geri bildirim döngüsünün bir parçası olduğu düşünülmektedir [195]. PAH hastalığında bu düzenleyici mekanizmanın bozulması, HIF-1α sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonuna ve vasküler yeniden şekillenmenin kronikleşmesine

katkıda bulunabilir. Diğer taraftan, Militello G ve arkadaşları, bazı mikroRNA'ların (miR-20a, miR-17-5p gibi) lncRNA'ları hedefleyebildiğini göstermişlerdir [196]. PAH hastalığında değişen mikroRNA profili, HIF1A-AS1'in stabilitesini azaltmış olabilir. Çalışmamızda, PAH patogenezinde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin belirli miRNA'ları indükleyerek, bu miRNA'lar aracılığıyla HIF1A-AS1'in hedeflenmesine ve stabilitesinin azalmasına yol açmış olabileceği düşünülmektedir.

HIF-1α, hücresel oksijen homeostazının korunmasında merkezi bir rol oynamaktadır [197]. Normoksik koşullarda, prolin hidroksilazlar (PHD) tarafından hidroksillenerekvonHippelLindau (VHL) proteini aracılığıyla yıkıma uğramaktadır. Hipoksik koşullarda ise HIF-1α, oksijene bağımlı hidroksilasyonunun engellenmesi nedeniyle proteazomal yıkımdan kaçarak stabilize olmakta ve transkripsiyonel aktivite kazanmaktadır. HIF-1β ile heterodimer oluşturarak anjiyogenez, glikoliz ve hücre sağ kalımı ile ilgili hedef genleri aktive etmektedir [198]. VSMC'de HIF-1α, proliferasyonu ve migrasyonu uyararak damar duvarının kalınlaşmasına yol açmaktadır [199]. Endotel hücrelerinde ise anjiyogenez ve permeabiliteyi artırmaktadır [200]. Makrofajlarda HIF-1α, glikolizi artırarak pro-inflamatuvar fenotip kazandırmaktadır [201]. Bu çalışmada HIF1A-AS1 ekspresyonunun PAH hastalarında kontrol grubuna kıyasla azaldığı gösterilmiştir. Literatürde, HIF-1α'nın vasküler yeniden şekillenme, inflamasyon ve hücresel metabolizma üzerinde belirleyici rol oynadığı bilinmektedir. Preklinik çalışmalar, HIF-1α'nınVSMC'lerde anjiyotensin II'ye bağlı yeniden şekillenmeye, CCL7 ekspresyonunu artırarak katkıda bulunabileceğini göstermektedir [202]. Ayrıca, miyeloid hücrelerde HIF-1α delesyonunun, LDLR knockout (Ldlr−/−) fare modelinde ateroskleroz gelişimini belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir [203]. Bununla birlikte, bu çalışmada HIF-1α düzeyleri değerlendirilmemiştir. Bu nedenle, HIF1A-AS1 ekspresyonundaki azalmanın HIF1α sinyal yolu üzerindeki etkisi doğrudan gösterilememekle birlikte, mevcut bulgular HIF-1α ile ilişkili patofizyolojik süreçlerle dolaylı bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda, HIF1A-AS1'in aksine HIF1A-AS2'nin farklı bir ekspresyon paterni sergilediği gözlenmiştir. HIF1A-AS2 ekspresyon düzeyleri açısından PAH ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu bulgu, ilk bakışta beklenenin dışında gibi değerlendirilse de, PAH'ın kendine özgü moleküler heterojenitesini yansıtıyor olabilir. Öte yandan, yüksek standart sapma değerleri gruplar içinde belirgin bireyler arası varyasyon bulunduğuna işaret etmektedir. Bu durum, HIF1A-AS2 ekspresyonunun hastalık şiddeti, eşlik eden komorbid durumlar veya bireysel genetik farklılıklar gibi çeşitli faktörlerden etkilenebileceğini düşündürmektedir.

Yapılan bir çalışmada, iskemik inmede hipoksiye bağlı anjiyogenezde HIF1A-AS2/miR-1533p/HIF-1α ekseninin düzenleyici rolü incelenmiştir [204]. Invivo modelde anjiyogenez artarken miR-153-3p düzeylerinin azaldığı; buna karşılık HIF-1α, VEGFA ve Notch1 ekspresyonlarının yükseldiği gösterilmiştir. In vitro hipoksi modelinde ise HIF1A-AS2'nin artarak miR-153-3p'yi baskıladığı ve HIF-1α üzerindeki inhibitör etkisini azalttığı saptanmıştır. Çalışmada, HIF1α/VEGFA/Notch1 yolunun aktivasyonu ile endotel hücre fonksiyonlarının ve anjiyogenezin arttığı bildirilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, söz konusu eksenin hipoksiye bağlı anjiyogenezde kritik bir düzenleyici rol oynadığı ileri sürülmüştür.PAH, ateroskleroz ve buna eşlik eden inflamatuvar süreçlerin ön planda olduğu bir vasküler hastalık olarak tanımlanmaktadır [12]. PAH'dainflamatuvar yanıt, farklı hücresel ve moleküler mekanizmalar aracılığıyla heterojen bir özellik göstermekle birlikte, hastalık patogenezinde önemli bir yer tutmaktadır. HIF1A-AS2, ateroskleroz modellerinde inflamatuvar yanıtlarla da ilişkilendirilmiştir. Bir başka çalışmada, aterosklerotik $ApoE^{-/-}$ farelerde HIF1A-AS2 ve ATF2'nin yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir. In vitro ve in vivo modellerde HIF1A-AS2'nin baskılanması, pro-inflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-1β, IL-6) ve adezyon moleküllerinin (VCAM-1, ICAM-1, MCP-1) düzeylerini azaltarak inflamasyonu inhibe etmiştir. Mekanizma olarak HIF1A-AS2'nin USF1 aracılığıyla ATF2 ekspresyonunu artırdığı ve böylece inflamasyonu güçlendirdiği belirlenmiştir. Çalışma bulgularına göre, HIF1AAS2'nin aterosklerotik inflamasyonda kritik bir düzenleyici rol oynadığı ve potansiyel bir terapötik hedef olabileceği öne sürülmektedir [170]. Bizim çalışmamızda ise, HIF1A-AS2 gen ekspresyon düzeyleri PAH ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında hasta grubunda artış gözlenmiş, ancak bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Buna rağmen, HIF1A-AS2 ekspresyonunun açlık kan şekeri düzeyleri ile anlamlı bir korelasyon göstermesi, HIF1AAS2'nin metabolik parametreler ve inflamatuvar süreçler ile potansiyel bir bağlantısı olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, literatürde bildirilen inflamatuvar rol ile uyumlu olup, HIF1A-AS2'nin PAH patogenezinde dolaylı ancak anlamlı bir katkısı olabileceğini desteklemektedir.

Bu moleküler ilişkilere daha geniş bir perspektiften bakmak amacıyla gerçekleştirilen protein–protein etkileşim (interaktom) analizleri, elde edilen bulguların biyolojik altyapısını destekler niteliktedir. STRING analizleri sonucunda, HIF1A-AS1 ile ilişkili HIF1A, ATF2 ve MPHOSPH8 proteinlerinin birinci kabukta yoğun etkileşim içinde olduğu gözlenmiştir. Bu proteinlerin epigenetik düzenleme, transkripsiyonel kontrol, hücresel stres yanıtı ve kromatin modifikasyonu süreçlerinde ortak işlevlere sahip olması, hipoksiye bağlı gen ekspresyon

değişikliklerinin çok katmanlı bir düzenleme ile gerçekleştiğini göstermektedir. Öte yandan, HIF1A-AS2 ile ilişkili IGF2BP2, DHX9, USF1 ve NBR1 proteinlerinin daha çok RNA bağlayıcı proteinler ve transkripsiyon faktörleri olarak RNA metabolizması ve düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Bu durum, HIF1A-AS2'nin yalnızca transkripsiyonel düzeyde değil, aynı zamanda post-transkripsiyonel mekanizmalar üzerinden de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle çalışmamızda gözlenen metabolik parametrelerle olan ilişki, bu RNA düzenleyici ağın metabolik stres koşullarında aktif rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Ağ analizinde dikkat çeken en yoğun etkileşim kümesinin SETDB1, ATF7IP, TASOR, MPHOSPH8 ve PPHLN1 proteinlerinden oluşması, bu proteinlerin HUSH (Human SilencingHub) kompleksi ile ilişkili epigenetik baskılama mekanizmalarında rol oynadığını göstermektedir. Bu kompleksin H3K9 histon metilasyonu yoluyla gen susturulmasını sağlaması, kronik iskemi ve hipoksi koşullarında HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 ekspresyonunun epigenetik düzeyde kontrol edilebileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, PAH'da gözlenen kronik hipoksik ortamın yalnızca gen ekspresyonunu artıran değil, aynı zamanda seçici gen susturulmasını da içeren çift yönlü bir düzenleyici etki oluşturabileceği söylenebilir.Bunun yanı sıra, ağda yer alan ATF2, ATF7 ve JUND gibi transkripsiyon faktörlerinin HIF1A ile bağlantılı olması, hipoksiye yanıt olarak aktive olan sinyal yolaklarının inflamasyon ve oksidatif stres süreçleriyle entegre bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Özellikle kronik alt ekstremite iskemi koşullarında bu yolakların aktive olması, artmış oksidatif stres ve buna bağlı doku hasarı ile uyumludur.

Son olarak, ağda DHX9 ve IGF2BP2 gibi RNA bağlayıcı proteinlerin bulunması, hipoksik ortamda yalnızca DNA düzeyinde değil, RNA stabilitesi ve metabolizması düzeyinde de önemli düzenleyici mekanizmaların devreye girdiğini göstermektedir. Bu durum, çalışmamızda değerlendirilen oksidatif RNA hasarı ile HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 ekspresyonu arasındaki ilişkinin moleküler temelini desteklemektedir.Sonuç olarak, interaktom analizi; aorta-iliak ve femoro-popliteal arter oklüzyonu bulunan hastalarda gelişen kronik hipoksi koşullarında, HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 genlerinin epigenetik düzenleme, transkripsiyonel aktivasyon ve RNA metabolizmasını kapsayan çok katmanlı bir moleküler ağ içerisinde yer aldığını ve bu süreçlerde tamamlayıcı roller üstlendiğini ortaya koymaktadır. Bu kompleks etkileşim ağının, artmış oksidatif RNA hasarı ile ilişkili olabileceği ve PAH patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Bu noktada, elde edilen interaktom verilerinin özellikle hipoksiye yanıtla ilişkili moleküler ağları ortaya koyması, bulgularımızın akut ve kronik hipoksi modelleri bağlamında değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır. İnme ve iskemi-reperfüzyon gibi akut hipoksi modellerinde, HIF-1α'nın ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir [205]. Benzer şekilde, in vitro hipoksi modellerinde HIF1A-AS2'nin de ekspresyonunun yükseldiği bildirilmiştir [206]. Bu bulgular, her iki molekülün de hipoksi yanıtına bağlı olarak regüle edilebileceğini ve potansiyel olarak birbirini etkileyebileceğini düşündürmektedir. Oysa PAH, kronik hipoksi ile karakterizedir ve kronik hipoksik koşullarda adaptif yanıtların zamanla duyarsızlaştığı, yani başlangıçtaki tepki gücünün azaldığı bilinmektedir. Bu bağlamda, HIF1AAS2'nin kronik PAH sürecinde stabilize olmuş veya baskılanmış bir ekspresyon profili sergileyebileceği düşünülmektedir; bu nedenle akut ve kronik hipoksi modellerindeki moleküler yanıtlar arasında farklılık olması beklenebilir. HIF1A-AS1'in hasta grubunda azalması ve HIF1A-AS2'nin değişmemesi, PAH'da HIF-1α ilişkili antisens RNA'ların bağlama özgü düzenleme sergileyebileceğini düşündürmektedir. Bu durum, PAH moleküler patogenezinin klasik ateroskleroz modellerinden bazı açılardan farklı özellikler taşıyabileceğine işaret etmektedir.

Moleküler bulgularımıza rağmen, oksidatif stres belirteçleri farklı bir tablo ortaya koymuştur; çalışmamızda 8-OHG, 8-OHdG ve 8-hidroksiguanin (8-oxoG) düzeyleri açısından PAH ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu bulgu, aterosklerozda oksidatif stresin arttığını ortaya koyan mevcut literatür verileriyle tam olarak uyum göstermemektedir. Klinik çalışmalarda, 8-OHdG düzeylerinin koroner darlık derecesi ve DNA hasar şiddeti ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [206, 207], ve oksidatif stresin DNA üzerinde çeşitli etkiler gösterdiği insan lökositlerinde de rapor edilmiştir [208]. Ayrıca, literatürde hemodiyaliz hastalarında 8-OHdG/dG oranının karotidintima-media kalınlığı ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir [209]. Deneysel modellerde ise 8-oxoG'nin esas olarak plak yüzey tabakasındaki makrofaj kökenli köpük hücrelerinde lokalize olduğu ve lipid düşürücü müdahalelerle azaltılabildiği gösterilmiştir [210]. Bu durum, çalışmaya dahil edilen PAH hastalarının statin ve vazodilatör tedavisi alıyor olmaları ile ilişkili olabilir. Literatürde statinlerin oksidatif stres belirteçlerini azaltıcı ve DNA hasarını sınırlayıcı etkileri bildirilmiştir [211]. Çalışmamızda gözlenen oksidatif hasar düzeylerindeki azalmanın, statinlerin oksidatif stres ve inflamasyon üzerindeki pleiotropik etkilerine bağlı olarak baskılanmış olabileceği düşünülmektedir. Öte yandan inflamasyon, farmakolojik tedavilere rağmen devam edebilen daha karmaşık bir süreçtir; nitekim CRP düzeylerinin PAH grubunda belirgin yüksek olması

bunu desteklemektedir. Bu bulgular, PAH patogenezinde oksidatif stres ve inflamasyonun farklı dinamikler sergileyebileceğini ve tedaviye yanıtlarının ayrışabileceğini göstermektedir. Oksidatif hasarın daha çok lokal, inflamasyonun ise daha sistemik bir karakter sergilemesi bu bulguları açıklayabilir. Periferik dolaşımdan elde edilen oksidatif stres belirteçleri, damar duvarındaki lokal oksidatif yükü tam olarak yansıtmada yetersiz kalabilmektedir. Bu durum, PAH'ta oksidatif stresin sistemik dolaşıma belirgin şekilde yansımak yerine aterosklerotik plak, endotel tabakası ve vasküler mikroçevre gibi sınırlı alanlarda yoğunlaşabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, oksidatif hasarın saptanamamış olmasında metodolojik faktörler de rol oynamış olabilir. Özellikle küçük örneklem büyüklüğü ve yüksek standart sapma, istatistiksel gücü azaltmış olabilir. Ayrıca, oksidatif hasarın aterosklerozun erken evrelerinde daha belirgin olduğu [212], ileri evrelerde ise hücresel adaptasyon mekanizmaları ve DNA onarım sistemlerinin aktivasyonu ile bu düzeylerin normalize olabileceği bildirilmiştir [213]. Bu bağlamda, çalışmamıza dahil edilen hastaların hastalık süreleri ve klinik evrelerinin (örneğin Fontaine sınıflaması) detaylı olarak kaydedilmemiş olması önemli bir sınırlılık oluşturmaktadır.

Çalışmamızda HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 ekspresyon düzeyleri hasta ve kontrol gruplarında cinsiyet açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Buna karşın, DNA/RNA oksidatif hasar belirteçleri değerlendirildiğinde, kontrol grubunda erkek cinsiyette istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek oksidatif hasar gözlenmiştir. Erkeklerde daha yüksek oksidatif hasar düzeyleri, östrojenin antioksidan etkileri ile ilişkili olabilir [213]. PAH grubunda ise cinsiyete bağlı farklılığın izlenmemesi, hastalığa bağlı sistemik oksidatif stres artışının cinsiyet farklılıklarını maskeleyebileceğini düşündürmektedir.

Çalışma grubumuzu oluşturan hasta ve kontrol gruplarında HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 gen ekspresyon düzeyleri ile DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri ve biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. PAH grubundaki bireylerde HIF1AAS1 ekspresyon düzeyleri ile total kolesterol düzeyleri arasında pozitif yönlü zayıf ancak istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. Elde edilen bu bulgu, değişkenler arasında zayıf-orta şiddette bir ilişki olduğunu gösterse de, belirleyicilik katsayısına göre total kolesteroldeki varyansın yaklaşık %5,2'sinin HIF1A-AS1 ekspresyonu ile açıklanabildiği görülmektedir. Bu durum, PAH patofizyolojisinde vasküler tıkanıklığa bağlı moleküler süreçler ile sistemik lipid metabolizması arasında bir etkileşim olduğunu, ancak bu etkileşimin çok faktörlü bir regülasyon ağının parçası olarak değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Patofizyolojik mekanizmalar incelendiğinde, hipoksi ile aktive olan HIF-1 sinyal yolunun lipid homeostazını düzenleyici rolü ön plana çıkmaktadır. Literatürde, hipoksi koşullarının HIF-1α aktivasyonunu tetiklediği ve bunun yağ dokusunda lipid metabolizmasını düzenleyen Angptl4 protein ekspresyonunu artırarak lipoprotein lipaz (LPL) aktivitesini dolaylı olarak baskıladığı bildirilmiştir [214]. Bu bağlamda, HIF1A-AS1 ekspresyonundaki azalmanın hipoksiye yanıt mekanizmalarında bozulmaya işaret edebileceği ve bu durumun lipid metabolizması ile ilişkili süreçleri dolaylı olarak etkileyebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, HIF1A-AS1 düzeyleri ile total kolesterol arasındaki ilişkinin zayıf olması, bu etkileşimin sınırlı olduğunu ve çok faktörlü mekanizmalar tarafından şekillendiğini düşündürmektedir. Ayrıca, yüksek kolesterol düzeylerinin tetiklediği oksidatif stres ve inflamatuar yanıtın, epigenetik mekanizmalar üzerinden HIF1A-AS1 ekspresyonunu baskılayabileceği de bu korelasyonun olası açıklamalarından biri olabilir. Ancak bu mekanizmanın doğrulanması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Klinik açıdan değerlendirildiğinde, bu bulgular HIF1A-AS1'in yalnızca hipoksiye verilen hücresel bir yanıtın ötesinde, PAH hastalarında metabolik süreçlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Periferik vasküler hastalıklarda aterosklerotik yükün bir göstergesi olan lipid profili ile epigenetik bir belirteç olan HIF1A-AS1'in birlikte değerlendirilmesi, hastalığın progresyonu ve doku düzeyindeki iskemik hasarın öngörülmesinde potansiyel bir yaklaşım sunabilir. Sonuç olarak, saptanan bu ilişki, PAH'ın moleküler düzeyde daha iyi anlaşılmasında epigenetik ve metabolik parametrelerin birlikte ele alınmasının önemine işaret etmektedir.

Çalışmamızda HIF1A-AS1 ekspresyon düzeyleri ile sistemik inflamasyonun temel belirteçlerinden biri olan CRP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır.CRP'nin; akut enfeksiyonlar, doku hasarı, obezite ve metabolik sendrom gibi çok sayıda fizyopatolojik durumdan etkilenmesi, bu belirtecin sistemik inflamasyonu yansıtmakla birlikte hastalığa özgü biyolojik süreçleri ayırt etme gücünü sınırlandırmaktadır.

Buna karşın HIF1A-AS1'in, özellikle hücresel hipoksi yanıtı ve vasküler stres ile ilişkili daha özgül moleküler mekanizmalarla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bu bulgular, PAH patogenezinde HIF1A-AS1 aracılı epigenetik düzenleyici süreçler ile CRP üzerinden izlenen sistemik inflamatuvar yanıtın, paralel ancak kısmen bağımsız biyolojik yolaklar üzerinden ilerleyebileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, iki değişken arasındaki ilişkinin tek yönlü olmaması olasılığı, kullanılan Spearman korelasyon analizinin saptayamayacağı daha karmaşık etkileşimlerin varlığını düşündürmektedir. Bu bağlamda, ilişkinin doğasının daha kapsamlı biçimde ortaya konabilmesi için regresyon modelleri, genelleştirilmiştoplamsal (additive)

modeller ve çok değişkenli analiz yaklaşımları gibi ileri istatistiksel yöntemlerle yapılacak değerlendirmelerin yararlı olacağı değerlendirilmektedir.

Bunun yanı sıra, gerçekleştirilen alt grup analizinde PAH ve kontrol gruplarında HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 gen ekspresyon düzeyleri biyokimyasal parametreler açısından karşılaştırılmıştır. Gen ekspresyon düzeyleri, kat değişimi (foldchange, FC) değeri 1.1 eşik alınarak sınıflandırılmış; FC > 1.1 olan olgular "ekspresyon artışı," FC ≤ 1.1 olan olgular ise "ekspresyon artışı göstermeyen grup" olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, HIF1AAS1 ekspresyonunda artış saptanan hastalarda serum CRP, total kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, HIF1A-AS1 ekspresyonundaki değişimlerin sistemik inflamasyon ve lipid metabolizması ile ilişkili biyokimyasal parametrelerle birlikte değişebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, korelasyon analizinde anlamlı bir ilişki saptanmamış olması, bu ilişkinin doğrusal olmayabileceğini veya farklı alt gruplara özgü heterojen bir yapı gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, alt grup analizinden elde edilen bulgular hipotez üretici nitelikte olup ileri çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir. Bu durumun, çalışmadaki örneklem büyüklüğünün sınırlı olmasına bağlı olarak istatistiksel gücün yetersiz kalmasından kaynaklanabileceği dikkate alınmalıdır. Ayrıca, hasta grubunda lipid parametrelerinin farmakolojik tedavilerle regüle edilmiş olması, bu parametrelerin hastalığın doğal seyrini tam olarak yansıtmasını sınırlayabilir ve gözlenen ilişkilerin yorumlanmasını etkileyebilecek önemli bir karıştırıcı faktör olarak değerlendirilebilir.

Literatürle karşılaştırıldığında, bazı çalışmalarda HIF-1α ekspresyonunun inflamatuvar plak fenotipi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir [215]. Bununla birlikte, bir antisens lncRNA olan HIF1A-AS1 ile kodlayıcı hedefi olan HIF-1α proteini arasındaki düzenleyici ilişkinin çok katmanlı ve bağlama bağımlı olduğu, bu nedenle her zaman doğrusal bir paralellik göstermeyebileceği öne sürülmektedir. Ayrıca, farklı kardiyovasküler risk gruplarında yapılan çalışmalarda HIF1A gen ekspresyonu ile Lp-PLA2 (lipoprotein ilişkili fosfolipaz A2) düzeyleri arasında anlamlı ve pozitif korelasyonlar bildirilmiş olsa da [216], lncRNA düzeyinde benzer bir ilişkinin tutarlı biçimde gösterilemediği görülmektedir. Bu durum, HIF-1α protein düzeyleri ile inflamasyon arasındaki ilişkinin, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde görev yapan lncRNA'lar için her zaman birebir geçerli olmayabileceğini düşündürmektedir.

Elde edilen bulgular, PAH'tainflamatuvar süreçler ile hipoksiye yanıt sinyal yolaklarının farklı zaman dilimlerinde, farklı hücresel kompartmanlarda veya farklı düzenleyici katmanlarda aktive olabileceğine işaret etmektedir. Sistemik inflamasyonun yaygın bir göstergesi olan

CRP'nin, daha çok lokal doku hipoksisi, iskemi ve hücresel adaptasyon süreçleri ile ilişkili olduğu düşünülen HIF1A-AS1 ile korelasyon göstermemesi, hastalığın moleküler profilinin değerlendirilmesinde tek bir biyobelirteçten ziyade çok boyutlu (multi-omik) yaklaşımların gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu çerçevede, HIF1A-AS1'in sistemik inflamatuvar yükten ziyade, doku düzeyindeki hipoksik stres, iskemik hasar ve endotel disfonksiyonu gibi daha özgül patofizyolojik süreçlerin bir yansıtıcısı olabileceği yönündeki hipotez desteklenmektedir.

HIF1A-AS2 gen ekspresyonu ile açlık kan şekeri düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. Bu bulgu, HIF1A-AS2'nin metabolik süreçlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, HIF1A-AS2 ekspresyonu ile total kolesterol, LDL-kolesterol ve CRP düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyonun bulunmaması, bu molekülün lipid metabolizması ve sistemik inflamasyon ile olan ilişkisinin sınırlı olabileceğine işaret etmektedir. CK-MB parametresine ait verilerin ise tüm hastalar için mevcut olmaması ve sınırlı sayıda olgudan elde edilmiş olması, bu değişken ile yapılan analizlerin istatistiksel gücünü kısıtlamış olabilir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, HIF1A-AS2'nin PAH patogenezindeki rolünün, HIF1A-AS1'e kıyasla daha özgül ve potansiyel olarak metabolik eksenle ilişkili, ancak daha sınırlı bir biyolojik etki alanına sahip olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, PAH hastalarında HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 ekspresyon düzeyleri ile oksidatif hasar parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. HIF1A-AS1 ekspresyon artışı ile oksidatif hasarın azalması yönünde zayıf bir negatif ilişki gözlenmiş olmakla birlikte, bu eğilim istatistiksel anlamlılık sınırları içerisinde doğrulanamamıştır. Bu bulgu, PAH patogenezinde lncRNA'lar ile oksidatif stres arasındaki etkileşimin doğrudan bir ilişki yerine, HIF-1α aracılığıyla tetiklenen çok basamaklı sinyal yolakları veya diyetsel faktörler, sigara kullanımı ve farmakolojik tedaviler gibi karıştırıcı değişkenlerin etkisiyle dolaylı olarak gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, anlamlılık saptanamamasının temel nedenlerinden biri örneklem büyüklüğüne bağlı sınırlı istatistiksel güçolabilir. Mevcut çalışmadaki örneklem sayısı, söz konusu ilişkiyi güvenilir biçimde test etmek için yeterli olmayabilir ve bu durum Tip II hata (var olan bir ilişkinin saptanamaması) riskini artırmaktadır.Her ne kadar literatürde lncRNA'ların Nrf2 sinyal yolu, antioksidan enzim ekspresyonu ve mitokondriyal fonksiyon modülasyonu aracılığıyla oksidatif stresi düzenlediği bildirilmiş olsa da [217], HIF1A-AS1'in PAH patogenezindeki spesifik rolünün daha geniş hasta gruplarında kontrollü deneysel modeller kullanılarak yapılacak ileri çalışmalarla aydınlatılması gerekmektedir. Bu yaklaşım,

HIF1A-AS1'in oksidatif stres yanıtındaki potansiyel katkısını ve PAH patofizyolojisi içindeki konumunu daha net ortaya koyacaktır.

Çalışmamızda hem PAH hem de kontrol gruplarında HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2 ekspresyon düzeylerinin cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği saptanmıştır. Bu bulgu, söz konusu lncRNA'ların ekspresyon profillerinin cinsiyet hormonlarından bağımsız olarak düzenlendiğini ve PAH patogenezinde rol oynayan HIF1A-AS1 azalmasının erkek ve kadınlarda benzer moleküler mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğini düşündürmektedir. Klinik açıdan bu sonuç, HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2'nin birer biyobelirteç olarak kullanım potansiyeli değerlendirilirken, cinsiyete özgü farklı eşik (cut-off) değerlerine ihtiyaç duyulmadan standardize bir yaklaşım sergileyebileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

Buna karşın, oksidatif hasar parametreleri incelendiğinde, sağlıklı kontrol grubundaki erkeklerde hasar düzeyinin kadınlara oranla anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Literatürde östrojenin antioksidan koruyucu etkisiyle açıklanan bu durumun, PAH grubunda ortadan kalkması ve cinsiyetler arasında anlamlı bir farkın kalmaması dikkat çekicidir. Bu bulgu, periferik arter hastalığının oluşturduğu iskemik ve metabolik stresin, östrojenin sağladığı fizyolojik koruma mekanizmalarını baskılayacak kadar dominant bir patolojik süreç haline geldiğine işaret edebilir. Ayrıca, çalışmadaki kadın hastaların yaşlarının ileri olması nedeniyle östrojen düzeylerinin doğal olarak düşük olabileceği ve bunun cinsiyetler arasındaki farkı daha da azaltmış olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Alternatif bir açıklama olarak, PAH hastalarının kullandığı statinler gibi farmakolojik ajanların oksidatif stres düzeylerini modüle ederek gruplar arasındaki doğal cinsiyet farklarını maskeleyebileceği de dikkate alınmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, PAH patogenezinde lncRNA HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2'nin sistematik şekilde incelendiği ilk araştırma olma özelliğini taşımaktadır. Bulgular, PAH'ın moleküler imzasının klasik ateroskleroz paradigmasından farklı olduğunu ve epigenetik düzeyde özgün değişiklikler içerdiğini göstermektedir. PAH hastalarında HIF1A-AS1 ekspresyonundaki belirgin azalma, hipoksiye verilen epigenetik yanıtın bozulduğunu ve HIF-1α sinyal yolundaki düzenleyici mekanizmaların kaybını işaret ederek, hastalık için yeni bir moleküler hedefin tanımlanmasını sağlamaktadır. Buna karşın HIF1A-AS2 ekspresyonunda anlamlı bir değişim gözlenmemesi, HIF1A-AS1 azalışının hastalığa özgü ve spesifik bir bulgu olduğunu doğrulamakta ve lncRNA'ların vasküler yeniden şekillenme süreçlerinde duruma özgü roller üstlendiğini vurgulamaktadır.

Sistemik inflamasyon göstergesi olan CRP'nin yüksek olmasına rağmen oksidatif DNA hasarı parametrelerinde anlamlı bir değişiklik görülmemesi, PAH patofizyolojisinde inflamasyon ve oksidatif stres süreçlerinin her zaman paralel seyretmediğini ve lokal iskemik süreçler ile sistemik yanıtlar arasında karmaşık bir dengesizlik olduğunu ortaya koymaktadır. HIF1A-AS1 ile total kolesterol arasındaki pozitif korelasyon, bu lncRNA'nın yalnızca hipoksi yanıtında değil, lipid metabolizması ve metabolik homeostazın sürdürülmesinde de merkezi bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, çalışmada yer alan kadın hastaların ileri yaş grubunda bulunması nedeniyle östrojen düzeylerinin doğal olarak düşük olabileceği ve bunun cinsiyetler arası biyobelirteç farklılıklarını sınırlayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Bununla birlikte, çalışmanın bazı önemli sınırlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle, çalışmanın kesitsel tasarımı, nedensellik ilişkilerinin ortaya konmasına olanak vermemekte, yalnızca gözlenen ilişkilerin tanımlanması ile sınırlı kalmaktadır. Örneklem büyüklüğünün Elisa testinde nispeten düşük olması, ve alt grup analizlerinde istatistiksel gücü sınırlamış olması nedeniyle bazı biyolojik olarak anlamlı olabilecek farklılıkların istatistiksel anlamlılığa ulaşamamasına neden olmuş olabilir. Çalışmada gen ekspresyon analizlerinin periferik kan örnekleri üzerinden yapılmış olması, damar duvarına özgü lokal moleküler değişikliklerin tam olarak yansıtılamamasına yol açabilecek bir diğer önemli kısıttır. Ayrıca, elde edilen bulguların fonksiyonel düzeyde doğrulanmasına yönelik in vitro veya in vivo deneysel modellerin kullanılmamış olması, HIF1A-AS1 ve HIF1A-AS2'nin mekanistik rollerinin doğrudan ortaya konmasını sınırlamaktadır.

Bunun yanı sıra, biyoinformatik analizler kapsamında elde edilen protein–protein etkileşim ağı verileri öngörüsel nitelikte olup deneysel doğrulama gerektirmektedir. Hastaların klinik heterojenitesi, eşlik eden komorbiditeler ve kullanılan medikal tedavilerin gen ekspresyonu üzerindeki potansiyel etkileri de tamamen dışlanamamış olup, bu durum sonuçların genellenebilirliğini kısmen sınırlayabilir.

Buna karşın, çalışma temel moleküler biyoloji ile klinik tıp arasında bir translasyonel köprü kurmakta, HIF1A-AS1'in PAH için non-invaziv ve hastalığa özgü bir biyobelirteç olma potansiyelini ortaya koymakta ve RNA-bazlı terapötik stratejiler ile kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları için güçlü bir zemin hazırlamaktadır. Bulgular, HIF-1α ekseninin yalnızca protein düzeyinde aşırı aktivasyonla değil, aynı zamanda düzenleyici RNA mekanizmalarının kaybıyla da karakterize olduğunu göstermekte; bu, hem hastalığın moleküler etiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına hem de yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Gelecek çok merkezli, geniş örneklemli ve fonksiyonel doğrulama içeren çalışmalar, bu bulguları destekleyerekPAH'ın epigenetik profili ve RNA-bazlı tedavilerin klinik uygulanabilirliğini daha net ortaya koymak açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Houghton JS, Saratzis AN, et al. new horizons in peripheral artery disease. Age and Ageing. 2024;53(6): afae114.
2. Hirsch AT, Criqui MH, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. Jama. 2001;286(11):1317-24.
3. Shamaki GR, Markson F, et al. Peripheral artery disease: a comprehensive updated review. Current Problems in Cardiology. 2022;47(11):101082.
4. Li Z, Chen X, et al. Recent advances: molecular mechanism of RNA oxidation and its role in various diseases. Frontiers in molecular biosciences. 2020; 7:184.
5. Gao Z, Luan X, et al. DNA damage response-related ncRNAs as regulators of therapy resistance in cancer. Frontiers in Pharmacology. 2024; 15:1390300.
6. Cao M, Luo H, et al. Research advances on circulating long noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular diseases. International journal of cardiology. 2022; 353:109-17.
7. Atef MM, Shafik NM, et al. The evolving role of long noncoding RNA HIF1A-AS2 in diabetic retinopathy: a cross-link axis between hypoxia, oxidative stress, and angiogenesis via MAPK/VEGF-dependent pathway. Redox Report. 2022;27(1):70-8.
8. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. Nature reviews Disease primers. 2019;5(1):56.
9. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. Circulation. 2021;144(11):918-32.
10. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature. 1993;362(6423):801-9.
11. Aris A. Leonardo da Vinci: the first cardiovascular scientist. Annals of thoracic surgery. 1997;64(4):1192-5.
12. Norgren L, Hiatt WR, et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). Journal of vascular surgery. 2007;45(1): S5-S67.
13. Soeki T, Sata M. Inflammatory biomarkers and atherosclerosis. International heart journal. 2016;57(2):134-9.
14. Koenig W, Khuseyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2007;27(1):15-26.
15. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2007;27(11):2292-301.
16. Hansson GK, Robertson A-KL, et al. Inflammation and atherosclerosis. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2006; 1:297-329.
17. Boring L, Gosling J, et al. Decreased lesion formation in CCR2−/− mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. Nature. 1998;394(6696):894-7.
18. Saetre T, Enoksen E, et al. Supervised exercise training reduces plasma levels of the endothelial inflammatory markers E-selectin and ICAM-1 in patients with peripheral arterial disease. Angiology. 2011;62(4):301-5.
19. Oresanya L, Mazzei M, et al. Systematic review, and meta-analysis of high-pressure intermittent limb compression for the treatment of intermittent claudication. Journal of vascular surgery. 2018;67(2):620-8. e2.
20. Smyth C. Effect of suction on blood-flow in ischaemic limbs. The Lancet. 1969;294(7622):657-9.
21. Himmelstrup H, Himmelstrup B, et al. Effects of vacusac in intermittent claudication: a controlled cross-over study. Clinical physiology. 1991;11(3):263-9.

22. Mehlsen J, Himmelstrup H, et al. Beneficial effects of intermittent suction and pressure treatment in intermittent claudication. Angiology. 1993;44(1):16-20.
23. Herrmann LG, Reid MR. The conservative treatment of arteriosclerotic peripheral vascular diseases: passive vascular exercises (pavaex therapy). Annals of surgery. 1934;100(4):750.
24. Herrmann LG. Nonoperative treatment of inadequate peripheral distribution of blood: Passive vascular exercises and local hyperthermia. Journal of the American Medical Association. 1935;105(16):1256-62.
25. Hoel H. Effects of treatment with lower extremity intermittent negative pressure for peripheral artery disease. 2022.
26. Bertozzi D, Iurlaro R, et al. Characterization of novel antisense HIF-1α transcripts in human cancers. Cell cycle. 2011;10(18):3189-97.
27. Zheng F, Chen J, et al. The HIF-1α antisense long non-coding RNA drives a positive feedback loop of HIF-1α mediated transactivation and glycolysis. Nature communications. 2021;12(1):1341.
28. Zhou L. The long noncoding RNA HIF1a-AS1 regulates endothelial cell function and is increased in patients with aortic valve disease and coronary artery disease: Universitäts- und Landesbibliothek Bonn; 2023.
29. Conti P, Shaik-Dasthagirisaeb Y. Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease mediated by mast cells. Central European journal of immunology. 2015;40(3):380-6.
30. Yurdagul Jr A. Crosstalk between macrophages and vascular smooth muscle cells in atherosclerotic plaque stability. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2022;42(4):372-80.
31. Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, et al. Pathophysiology of atherosclerosis. International journal of molecular sciences. 2022;23(6):3346.
32. Chistiakov DA, Myasoedova VA, et al. Calcifying matrix vesicles and atherosclerosis. BioMed research international. 2017;2017(1):7463590.
33. Zazzeroni L, Faggioli G, et al. Mechanisms of arterial calcification: the role of matrix vesicles. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2018;55(3):425-32.
34. Ortega MA, De Leon-Oliva D, et al. Vascular calcification: molecular networking, pathological implications, and translational opportunities. Biomolecules. 2024;14(3):275.
35. Cardoso L, Weinbaum S. Microcalcifications, their genesis, growth, and biomechanical stability in fibrous cap rupture. Molecular, Cellular, and Tissue Engineering of the Vascular System. 2018:129-55.
36. Nakahara T, Dweck MR, et al. Coronary artery calcification: from mechanism to molecular imaging. JACC: Cardiovascular Imaging. 2017;10(5):582-93.
37. Finn AV, Nakano M, et al. Concept of vulnerable/unstable plaque. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2010;30(7):1282-92.
38. Młynarska E, Czarnik W, et al. From atherosclerotic plaque to myocardial infarction—The leading cause of coronary artery occlusion. International journal of molecular sciences. 2024;25(13):7295.
39. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. Journal of internal medicine. 2014;276(6):618-32.
40. Jerjes-Sánchez C. Mechanisms of thrombosis. Thrombolysis in pulmonary embolism. 2015:1-17.
41. Biccire FG, Gatto L, et al. Effects of lipid lowering therapies on vulnerable plaque features: an updated narrative review of the literature. Journal of cardiovascular development and disease. 2023;10(6):260.

42. Hetherington I, Totary-Jain H. Anti-atherosclerotic therapies: milestones, challenges, and emerging innovations. Molecular Therapy. 2022;30(10):3106-17.
43. Quillard T, Franck G, et al. Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques. Current opinion in lipidology. 2017;28(5):434-41.
44. Cecchini AL, Biscetti F, et al. Dietary risk factors and eating behaviors in peripheral arterial disease (PAD). International journal of molecular sciences. 2022;23(18):10814.
45. Rezvani F, Heider D, et al. Telephone health coaching with exercise monitoring using wearable activity trackers (TeGeCoach) for improving walking impairment in peripheral artery disease: study protocol for a randomised controlled trial and economic evaluation. BMJ open. 2020;10(6): e032146.
46. Shu J, Santulli G. Update on peripheral artery disease: Epidemiology and evidence-based facts. Atherosclerosis. 2018; 275:379-81.
47. Tew GA, Harwood AE, et al. The bases expert statement on exercise training for people with intermittent claudication due to peripheral arterial disease. The Sport and Exercise Scientist. 2018.
48. Horváth L, Németh N, et al. Epidemiology of peripheral artery disease: narrative review. Life. 2022;12(7):1041.
49. Cassar K. Intermittent claudication. Bmj. 2006;333(7576):1002-5.
50. Gerhard-Herman MD, Gornik HL, et al. 2016 AHA/ACC guideline on the management of patients with lower extremity peripheral artery disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. Circulation. 2017;135(12): e686-e725.
51. Porras CP, Bots ML, et al. Differences in symptom presentation in women and men with confirmed lower limb peripheral artery disease: a systematic review and metaanalysis. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2022;63(4):602-12.
52. Monteiro-Soares M, Hamilton EJ, et al. Guidelines on the classification of foot ulcers in people with diabetes (IWGDF 2023 update). Diabetes/Metabolism Research and Reviews. 2023: e3648.
53. Hoel H, Høiseth LØ, et al. The acute effects of different levels of intermittent negative pressure on peripheral circulation in patients with peripheral artery disease. Physiological Reports. 2019;7(20): e14241.
54. Salisbury DL, Brown RJ, et al. Measurement of peripheral blood flow in patients with peripheral artery disease: Methods and considerations. Vascular Medicine. 2018;23(2):163-71.
55. Lareyre F, Behrendt C-A, et al. Applications of artificial intelligence for patients with peripheral artery disease. Journal of vascular surgery. 2023;77(2):650-8. e1.
56. Al-Naher A, Downing J, et al. Factors affecting patient and physician engagement in remote health care for heart failure: systematic review. JMIR cardio. 2022;6(1): e33366.
57. Formosa C, Gatt A, et al. Diabetic foot complications in Malta: prevalence of risk factors. The Foot. 2012;22(4):294-7.
58. Thiruvoipati T, Kielhorn CE, et al. Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes. World journal of diabetes. 2015;6(7):961.
59. Bhattacharya V, Stansby G. Postgraduate Vascular Surgery: A Candidate's Guide to the FRCS and Board Exams: World Scientific Publishing Company; 2018.
60. Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. Circulation research. 2015;116(9):1509-26.

61. Bozkurt AK, Tasci I, et al. 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 cardiovascular disorders. 2011;11(1):4.
62. McDermott MM, Fried L, et al. Asymptomatic peripheral arterial disease is independently associated with impaired lower extremity functioning: the women's health and aging study. Circulation. 2000;101(9):1007-12.
63. McDermott MM, Greenland P, et al. Leg symptoms in peripheral arterial disease: associated clinical characteristics and functional impairment. Jama. 2001;286(13):1599-606.
64. Lin J, Chen Y, et al. Burden of peripheral artery disease and its attributable risk factors in 204 countries and territories from 1990 to 2019. Frontiers in Cardiovascular Medicine. 2022; 9:868370.
65. Pabon M, Cheng S, et al. Sex differences in peripheral artery disease. Circulation research. 2022;130(4):496-511.
66. McDermott MM, Greenland P, et al. Sex differences in peripheral arterial disease: leg symptoms and physical functioning. Journal of the American Geriatrics Society. 2003;51(2):222-8.
67. Ix JH, Allison MA, et al. Novel cardiovascular risk factors do not completely explain the higher prevalence of peripheral arterial disease among African Americans: The San Diego Population Study. Journal of the American College of Cardiology. 2008;51(24):2347-54.
68. Hobbs S, Wilmink A, et al. Ethnicity and peripheral arterial disease. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2003;25(6):505-12.
69. Leggetter S, Chaturvedi N, et al. Ethnicity and risk of diabetes-related lower extremity amputation: a population-based, case-control study of African Caribbeans and Europeans in the United Kingdom. Archives of internal medicine. 2002;162(1):73-8.
70. Chuter V, Schaper N, et al. Effectiveness of bedside investigations to diagnose peripheral artery disease among people with diabetes mellitus: a systematic review. Diabetes/Metabolism Research and Reviews. 2023: e3683.
71. Achim A, Stanek A, et al. Approaches to peripheral artery disease in diabetes: Are there any differences? International Journal of Environmental Research and Public Health. 2022;19(16):9801.
72. Association AD. Peripheral arterial disease in people with diabetes. Journal of the American Podiatric Medical Association. 2005;95(3):3333.
73. Chuter V, Schaper N, et al. Effectiveness of revascularisation for the ulcerated foot in patients with diabetes and peripheral artery disease: A systematic review. Diabetes/Metabolism Research and Reviews. 2023: e3700.
74. Murabito JM, D'Agostino RB, et al. Intermittent claudication: a risk profile from the Framingham Heart Study. Circulation. 1997;96(1):44-9.
75. Faglia E, Clerici G, et al. Early and five-year amputation and survival rate of diabetic patients with critical limb ischemia: data of a cohort study of 564 patients. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2006;32(5):484-90.
76. Malmstedt J, Leander K, et al. Outcome after leg bypass surgery for critical limb ischemia is poor in patients with diabetes: a population-based cohort study. Diabetes care. 2008;31(5):887-92.

77. Wadström BN, Wulff AB, et al. Elevated remnant cholesterol increases the risk of peripheral artery disease, myocardial infarction, and ischaemic stroke: a cohort-based study. European heart journal. 2022;43(34):3258-69.
78. Kannel W, McGee D. Update on some epidemiologic features of intermittent claudication:
the Framingham Study. Journal of the American Geriatrics Society. 1985;33(1):13-8.
79. Thanigaimani S, Drovandi A, et al. A meta-analysis of randomized controlled trials evaluating the efficacy of smoking cessation interventions in people with peripheral artery disease. Journal of vascular surgery. 2022;75(2):721-9. e7.
80. Lu L, Mackay D, et al. Meta-analysis of the association between cigarette smoking and peripheral arterial disease. Heart. 2014;100(5):414-23.
81. Pujades-Rodriguez M, George J, et al. Heterogeneous associations between smoking and a wide range of initial presentations of cardiovascular disease in 1 937 360 people in England: lifetime risks and implications for risk prediction. International journal of epidemiology. 2015;44(1):129-41.
82. Schmieder FA, Comerota AJ. Intermittent claudication: magnitude of the problem, patient evaluation, and therapeutic strategies. The American journal of cardiology. 2001;87(12):3-13.
83. Shi Y, Zhou W, et al. Association of plasma bilirubin levels with peripheral arterial disease in chinese hypertensive patients: new insight on sex differences. Frontiers in Physiology. 2022; 13:867418.
84. Gerald R. Fowkes F, Housley E, et al. Smoking, lipids, glucose intolerance, and blood pressure as risk factors for peripheral atherosclerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh Artery Study. American journal of epidemiology. 1992;135(4):331-40.
85. Lin DS-H, Lo H-Y, et al. Mortality risk in patients with underweight or obesity with peripheral artery disease: a meta-analysis including 5,735,578 individuals. International Journal of Obesity. 2022;46(8):1425-34.
86. Wan D, Li V, et al. Diet and nutrition in peripheral artery disease: a systematic review. Canadian Journal of Cardiology. 2022;38(5):672-80.
87. Douketis JD, Sharma AM, editors. Obesity and cardiovascular disease: pathogenic mechanisms and potential benefits of weight reduction. Seminars in vascular medicine; 2005: Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ….
88. Fowler B, Jamrozik K, et al. Prevalence of peripheral arterial disease: persistence of excess risk in former smokers. Australian and New Zealand journal of public health. 2002;26(3):219-24.
89. Gardner AW, Montgomery PS, et al. Patterns of ambulatory activity in subjects with and without intermittent claudication. Journal of vascular surgery. 2007;46(6):1208-14.
90. Lu Y, Ballew SH, et al. Physical activity, and subsequent risk of hospitalization with peripheral artery disease and critical limb ischemia in the ARIC study. Journal of the American Heart Association. 2019;8(21): e013534.
91. Barroso WKS, Rodrigues CIS, et al. Brazilian guidelines of hypertension–2020. Arquivos brasileiros de cardiologia. 2021; 116:516-658.
92. Carter SA. Indirect systolic pressures and pulse waves in arterial occlusive disease of the lower extremities. Circulation. 1968;37(4):624-37.
93. Xu D, Li J, et al. Sensitivity and specificity of the ankle—brachial index to diagnose peripheral artery disease: a structured review. Vascular Medicine. 2010;15(5):361-9.

94. Aboyans V, Ricco J-B, et al. 2017 ESC guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). Kardiologia Polska (Polish Heart Journal). 2017;75(11):1065-160.
95. Aboyans V, Criqui MH, et al. Measurement and interpretation of the ankle-brachial index:
a scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 2012;126(24):2890-909.
96. Timmis A, Vardas P, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. European heart journal. 2022;43(8):716-99.
97. Hashimoto T, Ichihashi S, et al. Combination of pulse volume recording (PVR) parameters and ankle–brachial index (ABI) improves diagnostic accuracy for peripheral arterial disease compared with ABI alone. Hypertension Research. 2016;39(6):430-4.
98. Castiglione V, Aimo A, et al. Biomarkers for the diagnosis and management of heart failure. Heart failure reviews. 2022:1-19.
99. Gardner AW, Parker DE, et al. Changes in vascular and inflammatory biomarkers after exercise rehabilitation in patients with symptomatic peripheral artery disease. Journal of vascular surgery. 2019;70(4):1280-90.
100. Han J, Luo L, et al. Therapeutic angiogenesis-based strategy for peripheral artery disease. Theranostics. 2022;12(11):5015.
101. Stammers F. Peripheral arterial disease: some points of common interest to general and orthopaedic surgery. The Journal of Bone and Joint Surgery British Volume. 1954;36(2):209-17.
102. Criqui MH, Matsushita K, et al. Lower extremity peripheral artery disease: contemporary epidemiology, management gaps, and future directions: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 2021;144(9): e171-e91.
103. O'Riordain D, O'Donnell J. Realistic expectations for the patient with intermittent claudication. Journal of British Surgery. 1991;78(7):861-3.
104. Golia E, Limongelli G, et al. Inflammation and cardiovascular disease: from pathogenesis to therapeutic target. Current atherosclerosis reports. 2014; 16:1-7.
105. Sagris M, Katsaros I, et al. Statins and statin intensity in peripheral artery disease. Vasa. 2022.
106. Anand SS, Bosch J, et al. Rivaroxaban with or without aspirin in patients with stable peripheral or carotid artery disease: an international, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. The Lancet. 2018;391(10117):219-29.
107. Ehrman JK, Gardner AW, et al. Supervised Exercise Therapy for Symptomatic Peripheral Artery Disease: A review of current experience and practice-based recommendations. Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention. 2023;43(1):15-21.
108. Fakhry F, Fokkenrood HJ, et al. Endovascular revascularisation versus conservative management for intermittent claudication. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2018(3).
109. Lanzi S, Belch J, et al. Supervised exercise training in patients with lower extremity peripheral artery disease. Vasa. 2022.
110. Makris G, Lattimer C, et al. Availability of supervised exercise programs and the role of structured home-based exercise in peripheral arterial disease. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2012;44(6):569-75.
111. Harwood A-E, Smith GE, et al. A systematic review of the uptake and adherence rates to supervised exercise programs in patients with intermittent claudication. Annals of vascular surgery. 2016; 34:280-9.

112. Behrendt C-A. Higher long-term mortality after endovascular vs. open-surgical revascularization of peripheral artery disease in Australia and New Zealand? European heart journal. 2022;43(1):41-3.
113. Parvar SL, Ngo L, et al. Long-term outcomes following endovascular and surgical revascularization for peripheral artery disease: a propensity score-matched analysis. European heart journal. 2022;43(1):32-40.
114. Wiseman JT, Fernandes-Taylor S, et al. Endovascular vs. open revascularization for peripheral arterial disease. Annals of surgery. 2017;265(2):424.
115. Malgor RD, Alalahdab F, et al. A systematic review of treatment of intermittent claudication in the lower extremities. Journal of vascular surgery. 2015;61(3):54S73S.
116. Coxe JR. The writings of Hippocrates and Galen: Lindsay and Blakiston; 1846.
117. Murray J. Nature and treatment of cholera–new method proposed. Lond Med Surg J. 1832; 1:749-52.
118. Murray J, Hart J, et alType equation here.. on the local and general influence on the body, of increased and diminished atmospheric pressure. The Lancet. 1835;23(604):909-17.
119. Bluck E. Improved means or appliances for promoting or modifying the circulation of the blood in a living body. London, Darling, and Sons. 1888.
120. Bier A. Ueber einige Verbesserungen hyperämisierender Apparate. Münch Med Wochenschrift. 1904; 6:241-6.
121. Sundby OH, Høoiseth AD, Mathiesen I, Weedon-Fekjær H, Hisdal J. The effects of intermittent negative pressure on the lower limb blood flow and walking capacity in patients with peripheral artery disease. Journal of vascular surgery. 2018;67(4):115262.
122. Sundby ØH, Høiseth LØ, et al. The acute effects of lower limb intermittent negative pressure on foot macro-and microcirculation in patients with peripheral arterial disease. PLoS One. 2017;12(6): e0179001.
123. Nilsen RK, Sundby OH, Hisdal J. The effect of intermittent negative pressure on chronic lower limb wound healing: a systematic review and meta-analysis. Journal of wound care. 2021;30(Sup5): S4-S12.
124. Afzelius P, Molsted S, et al. Intermittent vacuum treatment with VacuMed does not improve peripheral artery disease or walking capacity in patients with intermittent claudication. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2018;78(6):456-63.
125. Hageman D, Fokkenrood HJ, et al. Randomized controlled trial of vacuum therapy for intermittent claudication. Journal of vascular surgery. 2020;71(5):1692-701. e1.
126. Markkanen E. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. DNA repair. 2017; 59:82-105.
127. Fasnacht M, Polacek N. Oxidative stress in bacteria and the central dogma of molecular biology. Frontiers in molecular biosciences. 2021; 8:671037.
128. Dryden MS, Cooke J, et al. Reactive oxygen: a novel antimicrobial mechanism for targeting biofilm-associated infection. Journal of global antimicrobial resistance. 2017; 8:186-91.
129. Seixas AF, Quendera AP, et al. Bacterial response to oxidative stress and RNA oxidation. Frontiers in Genetics. 2022; 12:821535.
130. Hahm JY, Park J, et al. 8-Oxoguanine: From oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification. Experimental & Molecular Medicine. 2022;54(10):1626-42.

131. Billah MM, Khatiwada S, et al. Ameliorating high-fat diet-induced sperm and testicular oxidative damage by micronutrient-based antioxidant intervention in rats. European Journal of Nutrition. 2022;61(7):3741-53.
132. Su L-J, Zhang J-H, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. Oxidative medicine and cellular longevity. 2019;2019.
133. Lee T-H, Kang T-H. DNA oxidation and excision repair pathways. International journal of molecular sciences. 2019;20(23):6092.
134. Simms CL, Zaher HS. Quality control of chemically damaged RNA. Cellular and Molecular Life Sciences. 2016; 73:3639-53.
135. Tanaka M, Chock PB. Oxidative modifications of RNA and its potential roles in biosystem. Frontiers in molecular biosciences. 2021; 8:685331.
136. Cobley JN, Fiorello ML, et al. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. Redox biology. 2018; 15:490-503.
137. Yan LL, Zaher HS. How do cells cope with RNA damage and its consequences? Journal of Biological Chemistry. 2019;294(41):15158-71.
138. Estevez M, Valesyan S, et al. Oxidative damage to RNA is altered by the presence of interacting proteins or modified nucleosides. Frontiers in molecular biosciences. 2021; 8:697149.
139. Ishii T, Sekiguchi M. Two ways of escaping from oxidative RNA damage: Selective degradation and cell death. DNA repair. 2019; 81:102666.
140. Thomas EN, Simms CL, et al. Insights into the base-pairing preferences of 8oxoguanosine on the ribosome. Nucleic acids research. 2019;47(18):9857-70.
141. Malla S, Kwakye A. RNA oxidation: role of polynucleotide phosphorylase in the quality control of oxidized RNA. J Life Sci. 2021;3(2):43-60.
142. Arafat M, Sperling R. Crosstalk between Long Non-Coding RNA and Spliceosomal microRNA as a Novel Biomarker for Cancer. Non-coding RNA. 2023;9(4):42.
143. Djebali S, Davis CA, et al. Landscape of transcription in human cells. Nature. 2012;489(7414):101-8.
144. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. Nature Reviews Genetics. 2015;16(7):421-33.
145. Mattick JS, Amaral PP, et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges, and recommendations. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2023;24(6):430-47.
146. Ruiz-Orera J, Messeguer X, et al. Long non-coding RNAs as a source of new peptides. elife. 2014;3: e03523.
147. Hahne JC, Lampis A, et al. Vault RNAs: hidden gems in RNA and protein regulation. Cellular and Molecular Life Sciences. 2021; 78:1487-99.
148. Täuber H, Hüttelmaier S, et al. POLIII-derived non-coding RNAs acting as scaffolds and decoys. Journal of Molecular Cell Biology. 2019;11(10):880-5.
149. Wu H, Yin Q-F, et al. unusual processing generates SPA LncRNAs that sequester multiple RNA binding proteins. Molecular cell. 2016;64(3):534-48.
150. Mattick JS. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. EMBO reports. 2001;2(11):986-91.
151. Mercer TR, Dinger ME, et al. Long non-coding RNAs: insights into functions. Nature Reviews Genetics. 2009;10(3):155-9.
152. Han Y, Ma J, et al. Silencing of H19 inhibits the adipogenesis and inflammation response in ox-LDL-treated Raw264. 7 cells by up-regulating miR-130b. Molecular immunology. 2018; 93:107-14.

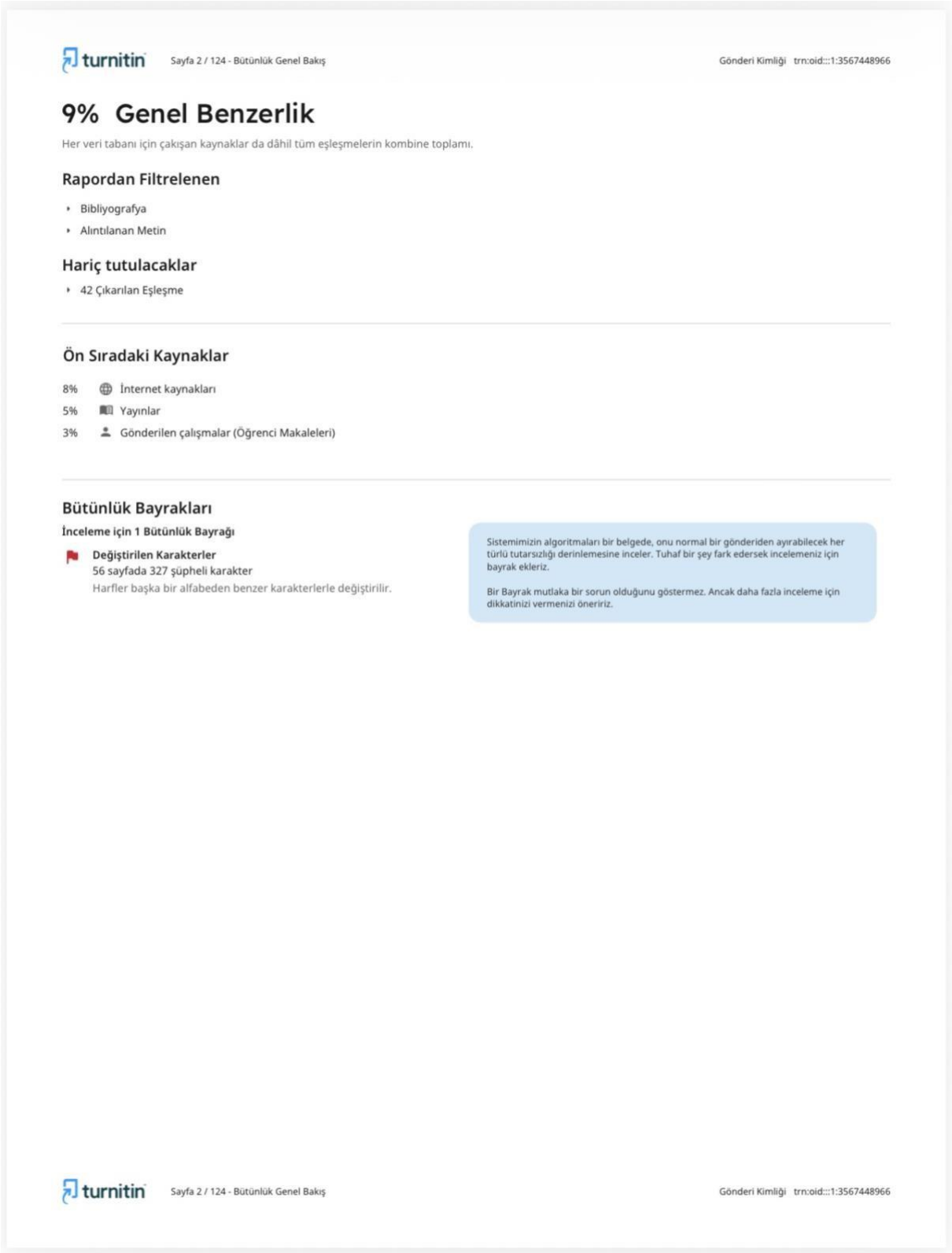
153. Huang Y, Wang L, et al. Long noncoding RNA-H19 contributes to atherosclerosis and induces ischemic stroke via the upregulation of acid phosphatase 5. Frontiers in neurology. 2019; 10:32.
154. Zhang L, Cheng H, et al. H19 knockdown suppresses proliferation and induces apoptosis by regulating miR-148b/WNT/β-catenin in ox-LDL-stimulated vascular smooth muscle cells. Journal of Biomedical Science. 2018;25(1):1-12.
155. Meng F, Yan J, et al. Expression status and clinical significance of lncRNA APPAT in the progression of atherosclerosis. PeerJ. 2018;6: e4246.
156. Ferns GA, Heikal L. Hypoxia in atherogenesis. Angiology. 2017;68(6):472-93.
157. Kuschel A, Simon P, et al. Functional regulation of HIF-1α under normoxia—is there more than post-translational regulation? Journal of cellular physiology. 2012;227(2):514-24.
158. Thomas C, Leleu D, et al. Cholesterol and HIF-1α: dangerous liaisons in atherosclerosis. Frontiers in immunology. 2022; 13:868958.
159. Yang J, Gong Z, et al. Transcriptomics provides novel insights into the regulatory mechanism of lncRNA HIF1 A-AS1 on vascular smooth muscle cells. Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery. 2023;38(06): e20220260.
160. Gong Z, Yang J, et al. LncRNA HIF1A-AS1 Regulates the Cellular Function of HUVECs by Globally Regulating mRNA and miRNA Expression. Frontiers in Bioscience-Landmark. 2022;27(12):330.
161. Xu F, Huang M, et al. LncRNA HIF1A-AS1 promotes gemcitabine resistance of pancreatic cancer by enhancing glycolysis through modulating the AKT/YB1/HIF1α pathway. Cancer research. 2021;81(22):5678-91.
162. BAYOĞLU B, CENGİZ M. Kalp ve Damar Hastalıklarında Uzun Kodlanmayan RNA Transkriptlerinin Rolleri. Bezmialem Science. 2017;5(2).
163. Xu J, Zhang Y, et al. Long non-coding RNA HIF1A-AS1 is upregulated in intracranial aneurysms and participates in the regulation of proliferation of vascular smooth muscle cells by upregulating TGF-β1. Experimental and therapeutic medicine. 2019;17(3):1797-801.
164. Wang Y, Liang J, et al. Circulating exosomes and exosomal lncRNA HIF1A-AS1 in atherosclerosis. International journal of clinical and experimental pathology. 2017;10(8):8383.
165. Liu Y, Zhang Y, et al. lncRNA HIF1A-AS2: A potential oncogene in human cancers. Biomedical Reports. 2021;15(4):1-7.
166. Thrash-Bingham CA, Tartof KD. aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia. Journal of the National Cancer Institute. 1999;91(2):143-51.
167. Melior H, Maaß S, et al. The leader peptide peTrpL forms antibiotic-containing ribonucleoprotein complexes for posttranscriptional regulation of multiresistance genes. MBio. 2020;11(3):10.1128/mbio. 01027-20.
168. Gehring J, Azzout-Marniche D, et al. Rats self-select a constant protein-to-carbohydrate ratio rather than a constant protein-to-energy ratio and have low plasma FGF21 concentrations. The Journal of nutrition. 2021;151(7):1921-36.
169. Lopes NLV, Gracitelli CP, et al. Ocular surface evaluation after the substitution of benzalkonium chloride preserved prostaglandin eye drops by a preservative-free prostaglandin analogue. Medical Hypothesis, Discovery, and Innovation in Ophthalmology. 2019;8(1):52.

170. Li P, Xing J, et al. Inhibition of long noncoding RNA HIF1A-AS2 confers protection against atherosclerosis via ATF2 downregulation. Journal of advanced research. 2020; 26:123-35.
171. Jozefczuk J, Adjaye J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. Methods in enzymology. 500: Elsevier; 2011. p. 99-109.
172. Biassoni R, Raso A. Quantitative real-time PCR: Springer; 2016.
173. Rouhi V, Habibi S, et al. Upregulation of uracil DNA glycosylase (UNG) in prostate cancer. Cancer Genetics. 2025; 296:130-2.
174. Deprez RHL, Fijnvandraat AC, et al. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depend on cDNA synthesis conditions. Analytical biochemistry. 2002;307(1):63-9.
175. Suzuki K, Bose P, et al. REAP: A two-minute cell fractionation method. BMC research notes. 2010;3(1):294.
176. Unal S, Arapi B, et al. The upregulation of miR-21-5p in atherosclerotic plaque. Molecular Biology Reports. 2025;52(1):686.
177. Habibi S, Rouhi V, et al. Analysis of miR-155 Expression in Prostate Cancer Patients. Cerrahpaşa Medical Journal. 2025;49(1):1-5.
178. Mondal T, Subhash S, et al. MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF-β pathway genes through formation of RNA–DNA triplex structures. Nature communications. 2015;6(1):7743.
179. Hnasko R. Elisa: Springer; 2015.
180. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cancer cell biology: Methods and protocols: Springer; 2022. p. 115-34.
181. Balachandra D, Rahumatullah A, et al. A new antigen detection ELISA for the diagnosis of Strongyloides infection. Acta tropica. 2021; 221:105986.
182. Kaya AD, Kaya E, et al. Comparison of inflammatory biomarkers between peripheral artery disease patients and healthy individuals. Cardiovasc Surg Int. 2024;11(3):18392.
183. McDermott MM, Guralnik JM, et al. Patterns of inflammation associated with peripheral arterial disease: the InCHIANTI study. American heart journal. 2005;150(2):276-81.
184. Ridker PM, Cushman M, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. New England Journal of Medicine. 1997;336(14):973-9.
185. Ridker PM, Rifai N, et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. New England Journal of Medicine. 2001;344(26):1959-65.
186. Barter P. HDL-C: role as a risk modifier. Atherosclerosis supplements. 2011;12(3):26770.
187. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000. Circulation. 2004;110(6):738-43.
188. Go AS, Chertow GM, et al. chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. New England Journal of Medicine. 2004;351(13):1296305.
189. Choudhry H, Harris AL. Advances in hypoxia-inducible factor biology. Cell metabolism. 2018;27(2):281-98.
190. Schmitz SU, Grote P, et al. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. Cellular and Molecular Life Sciences. 2016;73(13):2491509.
191. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. Molecular cell. 2011;43(6):904-14.

192. Bridges MC, Daulagala AC, et al. LNCcation: lncRNA localization and function. Journal of Cell Biology. 2021;220(2): e202009045.
193. Yundung Y, Mohammed S, et al. Transcriptomics analysis of long non-coding RNAs in smooth muscle cells from patients with peripheral artery disease and diabetes mellitus. Scientific Reports. 2024;14(1):8615.
194. Kierans S, Taylor C. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. The Journal of physiology. 2021;599(1):23-37.
195. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. cell. 2012;148(3):399-408.
196. Militello G, Weirick T, et al. Screening and validation of lncRNAs and circRNAs as miRNA sponges. Briefings in bioinformatics. 2017;18(5):780-8.
197. Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. Molecular cell. 2008;30(4):393-402.
198. Schödel J, Ratcliffe PJ. Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. Nature Reviews Nephrology. 2019;15(10):641-59.
199. Mizuno S, Toga H, et al. Hypoxic Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues-From Molecules to Humans: IntechOpen; 2012.
200. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. Cardiovascular research. 2010;86(2):23642.
201. Cramer T, Yamanishi Y, et al. HIF-1α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. cell. 2003;112(5):645-57.
202. Abe H, Semba H, et al. The roles of hypoxia signaling in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2017;24(9):884-94.
203. Aarup A, Pedersen TX, et al. Hypoxia-inducible factor-1α expression in macrophages promotes development of atherosclerosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2016;36(9):1782-90.
204. Li L, Wang M, et al. lncRNAs HIF1A-AS2 facilitates the up-regulation of HIF-1α by sponging to miR-153-3p, whereby promoting angiogenesis in HUVECs in hypoxia. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017; 96:165-72.
205. Dong P, Li Q, et al. HIF-1α in cerebral ischemia. Molecular Medicine Reports. 2022;25(2):41.
206. Liao T-T, Chen Y-H, et al. Hypoxia-induced long noncoding RNA HIF1A-AS2 regulates stability of MHC class I protein in head and neck cancer. Cancer immunology research. 2024;12(10):1468-84.
207. Botto N, Rizza A, et al. Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2001;493(1-2):23-30.
208. Liu C-S, Tsai C-S, et al. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. Free radical research. 2003;37(12):1307-17.
209. Kuchta A, Pacanis A, et al. Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease. Kidney and Blood Pressure Research. 2011;34(1):12-9.
210. Martinet W, Knaapen MW, et al. Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering. Circulation research. 2001;88(7):733-9.
211. Schönbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? Circulation. 2004;109(21_suppl_1): II-18-II-26.

212. Förstermann U, Xia N, et al. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. Circulation research. 2017;120(4):713-35.
213. Van Houten B, Santa-Gonzalez GA, et al. DNA repair after oxidative stress: current challenges. Current opinion in toxicology. 2018; 7:9-16.
214. Drager LF, Yao Q, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. American journal of respiratory and critical care medicine. 2013;188(2):240-8.
215. Sluimer JC, Gasc J-M, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. Journal of the American College of Cardiology. 2008;51(13):1258-65.
216. Heriansyah T, Chomsy IN, et al. Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1α (HIF1A) and Lp-PLA2 in low, intermediate, and high cardiovascular disease risk population. Vascular Health and Risk Management. 2020:507-13.
217. Wang X, Shen C, et al. Long noncoding RNAs in the regulation of oxidative stress. Oxidative medicine and cellular longevity. 2019;2019(1):1318795.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



turnitin Sayfa 2 / 124 - Bütünlük Genel Bakış Gönderi Kimliği trn:oid:::1:3567448966

9% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çakışan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Rapordan Filtrelenen

- Bibliyografya
- Alıntılanan Metin

Hariç tutulacaklar

- 42 Çıkarılan Eşleşme

Ön Sıradaki Kaynaklar

8% İnternet kaynakları
5% Yayınlar
3% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Bütünlük Bayrakları

İnceleme için 1 Bütünlük Bayrağı

Değiştirilen Karakterler
56 sayfada 327 şüpheli karakter
Harfler başka bir alfabeden benzer karakterlerle değiştirilir.

Sistemimizin algoritmaları bir belgede, onu normal bir gönderiden ayırabilecek her türlü tutarsızlığı derinlemesine inceler. Tuhaf bir şey fark edersek incelemeniz için bayrak ekleriz.

Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için dikkatinizi vermenizi öneririz.

turnitin Sayfa 2 / 124 - Bütünlük Genel Bakış Gönderi Kimliği trn:oid:::1:3567448966