

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı**
bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KORONER ARTER HASTALIĞINDA ROLÜ OLDUĞU
DÜŞÜNÜLEN ADAY GEN(LER)İN FONKSİYONEL
ANALİZİ**

AYBİKE SENA ÖZUYNUK

**DANIŞMAN
PROF. DR. NİHAN ERGİNEL-ÜNALTUNA**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK**

İSTANBUL-2019

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

KORONER ARTER HASTALIĞINDA ROLÜ OLDUĞU
DÜŞÜNÜLEN ADAY GEN(LER)İN FONKSİYONEL
ANALİZİ

AYBİKE SENA ÖZUYNUK

İKİNCİ DANIŞMAN
AR. GÖR. DR. NESLİHAN ÇOBAN

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK

İSTANBUL-2019

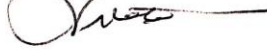
TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Aybike Sena ÖZUYNUK tarafından Prof. Dr. Nihan ÜNALTUNA'nın danışmanlığında hazırlanan "Koroner Arter Hastalığında Rolü Olduğu Düşünülen Aday Gen(ler)in Fonksiyonel Analizi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 19.07.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nihan ÜNALTUNA

İ.Ü. Aziz Sancar DETAE

Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Selçuk S. TOKDEMİR

İ.Ü. Aziz Sancar DETAE

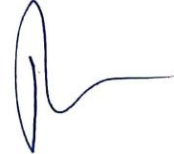
Genetik Anabilim Dalı



Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ

İ.Ü. Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fak.

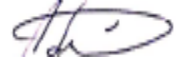
Çocuk Sağ. ve Hast. A.D.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Aybike Sena Özuynuk



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez danışmanım Prof. Dr. Nihan ERGİNEL-ÜNALTUNA'YA laboratuvarının bir üyesi olmama izin verdiği için içten teşekkürlerimi sunuyorum. Bana bu çalışma sırasında duyduğu güven, sağladığı motivasyon ve bilimsel desteği için minnettarım.

Çok sevgili ikinci tez danışmanım Dr. Neslihan ÇOBAN'a bana gösterdiği bütün sabır, sağladığı tüm destek ve benimle paylaştığı tüm bilgiler için teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Filiz GÜÇLÜ-GEYİK ve Dr. Zeynep Gamze GÜVEN'e her zaman yanırlarımı düzelttikleri, sorularımı cevapladıkları ve beni daima yüreklendirdikleri için çok teşekkür ediyorum.

Çalışmamızda kullandığımız hücre soyunu bize sağlayarak çalışmamızın gerçekleşmesine olanak veren Doç. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ'ye teşekkürlerimi sunarım. Akım sitometri cihazının kullanılmasında ve sonuçların analizinde yardım ettiği için Abdullah YILMAZ'a teşekkür ederim.

İkinci ailem haline gelen canım Pınar KÖSEOĞLU'na bitmeyen iyimserliği, inanılmaz enerjisi, mutluluğu, bu zorlu süreçte her saniye yanımda olduğu ve beni olduğum gibi kabul ettiği için sonsuz şükranlarımı sunuyorum. Geçirdiğimiz en zor günü bile mutlu hatırlamamı sağladığın için çok teşekkür ederim.

Hem laboratuvarıda hem de dışarıda her zaman desteklerini gösteren, tez çalışmalarımın başlangıcından sonuna kadar motivasyonumu yüksek tutan, Esra KAYNAK'a, Tuğçe SUDUTAN'a, Burcu SALMAN'a ve Muhammed Abdulvahid KALKAN'a teşekkür ederim.

Bu süreçte her an beni destekleyen, her vazgeçtiğimde yeniden başlamamı sağlayan, komik yorumlarıyla beni güldüren canım Okan CANKURT'a yanımda olduğu için çok teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her anında sonsuz sevgileriyle bana destek olan aileme şükranlarımı sunuyorum. Kardeşim Mert Alp ÖZUYNUK'a beni her zaman neşelendirdiği için, babam Ayhan ÖZUYNUK ve annem Nesrin ÖZUYNUK'a, bitmeyen sabırları ve yardımları için teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34037

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Koroner Arter Hastalığı	3
2.2. Ateroskleroz.....	3
2.2.1. Ateroskleroz Patogenezi ve Histolojisi	5
2.2.2. Aterosklerozun Klinik Belirtileri	9
2.2.3. Ateroskleroz Etiyolojisi	10
2.3. Programlı Hücre Ölümü.....	12
2.3.1. Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	13
2.3.1.1. Apoptoz	13
2.3.1.2. Otofaji	13
2.3.1.3. Nekroz	14
2.4. Ferroptoz	14
2.4.1. Ferroptoz İndükleyicileri.....	16
2.4.2. Ferroptoz İnhibitörleri.....	17
2.4.3. Ferroptozun Moleküler Temelleri	18
2.4.3.1. Lipid peroksidasyonu	18
2.4.3.2. Demir Metabolizması.....	19
2.5. Ferroptoz ve Koroner Arter Hastalığı	21
2.6. Ferroptoz ve Koroner Arter Hastalığında Rol Oynayan Aday Genler	21
2.6.1. Retikülön 3 (<i>RTN3</i>).....	22

2.6.2. Katalaz (CAT)	22
2.6.3. Solute Carrier Family 25 Member 1 (SLC25A1)	24
2.6.4. Heme Oksijenaz 1 (HMOX1)	24
2.6.5. Glutasyon peroksidaz 4 (GPX4)	26
2.6.6. Uzun Zincirli Açıl-CoA Sentetaz 4 (ACSL4)	28
2.6.7. Solute Carrier Family 7 Member 11 (SLC7A11)	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Gereçler	30
3.1.1. Çalışma Grubu Seçimi	30
3.1.2. Kullanılan Hücre Soyu	30
3.1.3. Kimyasallar	30
3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	31
3.1.4.1. Hücre kültüründe kullanılan medyum ve solüsyonlar	31
3.1.5. Kullanılan Kitler	33
3.1.6. Kullanılan Cihazlar	34
3.2. Yöntemler	35
3.2.1. HEPG2 Hücre Soyu	35
3.2.2. HEPG2 Hücre Kültürü	35
3.2.3. HEPG2 Hücrelerinde Ferroptoz Olayının İndüklenmesi	37
3.2.3.1. Optimum Erastin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	37
3.2.3.2. Ferroptozun İnhibe Edilmesi	37
3.2.4. Lipid Peroksidasyonunun Ölçülmesi	37
3.2.5. HEPG2 Hücrelerinden RNA İzolasyonu	38
3.2.6. RNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi	39
3.2.7. Total RNA'dan cDNA sentezi	39
3.2.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR	40
3.2.8.1. qRT-PZR Aşaması	42
3.2.9. İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1. Fonksiyonel Çalışmalar	44
4.1.1. Optimum Erastin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	44
4.1.2. Optimum Erastin ve Ferrostatin-1 Konsantrasyonunun Belirlenmesi	48
4.1.3. 25 µM Erastin ve 2 µM Fer-1'in Lipid Peroksidasyonu Üzerindeki Etkisi	52

4.1.4. Farklı Erastin ve Ferrostatin-1 Konsantrasyonlarının İncelenmesi.....	54
4.1.5. 35 µM Erastin ve 2.5 µM Fer-1'in Lipid Peroksidayonu Üzerindeki Etkisi	56
4.1.6. Hücre Kültürü Aday Gen Ekspresyonları	58
4.2. Hasta-Kontrol Grubu Çalışmaları	60
4.2.1. Aday Gen Anlatımlarının Hasta ve Kontrol Gruplarında Değerlendirilmesi ...	60
5. TARTIŞMA	63
KAYNAKLAR	69
ETİK KURUL KARARI	83
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	84
ÖZGEÇMİŞ	85



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Kullanılan kimyasallar	31
Tablo 3-2: Ferroptoz aktivatör ve inhibitörlerinin stok solüsyonlarının hazırlanması ...	32
Tablo 3-3: Kullanılan kitler ve içerikleri	33
Tablo 3-4: Kullanılan cihazlar	34
Tablo 3-5: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon miksi ve uygulanan koşullar	40
Tablo 3-6: qRT-PZR’de kullanılan primer dizileri	41
Tablo 3-7: qRT-PZR reaksiyon içeriği ve koşulları	43
Tablo 4-1: Hasta ve kontrol grubuna ait karakteristik özellikler	60



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Aterosklerotik plak oluşumunda rol oynayan mekanizmalar.....	4
Şekil 2-2: Aterosklerozun temel histolojisi	6
Şekil 2-3: Koroner Arter Hastalığının Aşamaları	8
Şekil 2-4: Koroner arter hastalığı risk faktörleri.....	11
Şekil 2-5: Temel ferroptoz mekanizmaları	15
Şekil 2-6: Ferroptozun indüklenme mekanizması	18
Şekil 2-7: Hücresel demir metabolizması.....	20
Şekil 2-8: RTN3 izoformları.....	22
Şekil 2-9: Katalazın kristal yapısı.....	23
Şekil 2-10: Heme oksijenaz enzim reaksiyonunun şematik gösterimi	25
Şekil 2-11: Ferroptoz mekanizmasında HMOX1'in rolü	26
Şekil 2-12: GPX4 proteininin yapısı.....	27
Şekil 2-13: Sistem Xc- ve GPX4 ilişkisi	27
Şekil 4-1: Farklı erastin konsantrasyonlarının hücre morfolojisi ve canlılığı üzerindeki etkisi.....	45
Şekil 4-2: Farklı erastin konsantrasyonlarında rölatif hücre canlılığı.....	46
Şekil 4-3: 25 µM erastinin hücre canlılığına etkisi.....	47
Şekil 4-4: 25 µM erastin içeren koşulların rölatif hücre canlılık oranı.....	48
Şekil 4-5: Erastin ve Fer-1 içeren koşullarda hücre morfolojisi ve canlılığı	49
Şekil 4-6: 25 µM erastin ve 2 µM Fer-1 içeren koşulların rölatif hücre canlılık oranı ..	50
Şekil 4-7: 25 µM Erastin ve 2 µM Fer-1 içeren koşullarda hücre morfolojisi ve canlılığı	51
Şekil 4-8: 25 µM erastin ve 2 µM Fer-1 içeren koşulların rölatif hücre canlılık oranı ..	52
Şekil 4-9: 25 µM erastin ve 2 µM Fer-1 ile değişen lipid peroksidasyonu	53
Şekil 4-10: Farklı erastin ve Fer-1 konsantrasyonlarında hücre yoğunluğu ve morfolojisi	55
Şekil 4-11: 35 µM ve 50 µM erastin konsantrasyonunda hücre canlılık oranları	56
Şekil 4-12: 35 µM erastin ve 2.5 µM Fer-1 ile değişen lipid peroksidasyonu	57
Şekil 4-13: HEPG2 hücre soylarında belirlenen koşullarda <i>RTN3</i> , <i>SLC25A1</i> , <i>CAT</i> , ...	58
Şekil 4-14: HEPG2 hücre soylarında belirlenen koşullarda <i>HMOX-1</i> rölatif gen anlatım düzeyleri.....	59

Şekil 4-15: HEPG2 hücre soylarında belirlenen koşullarda <i>SLC7A11</i> rölatif gen anlatım düzeyleri.....	59
Şekil 4-16: KAH ve KAH olmayan gruplarda <i>RTN3</i> , <i>CAT</i> ve <i>SLC25A1</i> rölatif gen anlatım düzeyleri.....	61
Şekil 4-17: KAH ve KAH hastası olmayan gruplarda <i>HMOX-1</i> , <i>GPX4</i> , <i>ACSL4</i> ve <i>SLC7A11</i> gen anlatım düzeyleri	62



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μL:	mikrolitre
μM:	mikro molar
ACSL4:	Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4
ApoE:	Apolipoprotein E
CAT:	Katalaz
CO ₂ :	Karbon dioksit
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DMT1:	Divalent Metal Taşıyıcı 1
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
EMEM:	Eagle's Minimum Essential Medium
FBS:	Fetal Sığır Serumu
Fer-1:	Ferrostatin-1
FPN:	Ferroportin 1
GPX4:	Glutasyon Peroksidaz 4
GSH:	Glutasyon
GSSG:	Glutasyon Disülfid
HBSS:	Hank's Balanced Salt Solution
HDL:	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HMOX-1:	Heme oxygenase 1
KAH:	Koroner Arter Hastalığı
KKH:	Koroner Kalp Hastalığı
KVH:	Kardiyovasküler Hastalık
LDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LIP:	Kararsız demir havuzu
MI:	Miyokard infarktüsü
mL:	mililitre
oxLDL:	Okside düşük yoğunluklu lipoprotein
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PUFA:	Çoklu Doymamış Yağ Asidi

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RTN3: Retikülön 3

SLC7A11: Solute Carrier Family 7 Member 1

SLC25A1: Solute Carrier Family 25 Member 1

SAP: Stabil anjina pektoris

STEMI: ST yükselmeli miyokard infarktüsü

TF: Transferrin

TfR1: Transferrin Reseptörü 1

USAP: Stabil olmayan anjina pektoris

ÖZET

Özuynuk, A.S. (2019). Koroner Arter Hastalığında Rolü Olduğu Düşünülen Aday Gen(ler)in Fonksiyonel Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kalbe besin ve oksijen taşıyan arterlerde aterosklerotik plak oluşumuyla karakterize olan koroner arter hastalığı hem ülkemizde hem de dünyada en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Ateroskleroz çoğunlukla önlenabilir bir hastalık olduğundan temelinde yatan mekanizmaların ve dolayısıyla risk faktörlerinin aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Yeni tanımlanan bir programlı hücre ölüm şekli olan ferroptozun temel etmenlerinden olan aşırı demir yükü ile artan lipid peroksitler ve doku hasarının ateroskleroz ve diyabete yol açabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle bu tez projesi kapsamında, ferroptoz ile hücre ölümünün ve koroner arter hastalığının oluşumunda rol oynayan mekanizmaların araştırılması amaçlanmış ve bunun için *RTN3*, *CAT*, *SLC25A1*, *HMOX-1*, *GPX4*, *ACSL4* ve *SLC7A11* genleri seçilerek bu mekanizmalardaki rolleri incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında, *in vitro* ortamda HEPG2 hücrelerinde ferroptoz hücre ölüm mekanizması, belirlenen en uygun konsantrasyonda erastin ile indüklenmiş ve ferrostatin-1 ile inhibe edilmiştir. İndüklemenin yapıldığı koşullar ile birlikte, indükleyici ve inhibitörün bir arada bulunduğu koşullarda da hücre canlılık oranları ve aday genlerin anlatım düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. HEPG2 hücrelerinde çalışılan koşullarda, kantitatif gerçek zamanlı PZR ile anlatımları incelenen genlerden, *RTN3*, *CAT*, *SLC25A1* ve *GPX4* ifadelerinin azaldığı gözlemlenirken, *HMOX-1* ve *SLC7A11* gen anlatımları artmış ve *ACSL4* anlatımı değişmemiştir. Koroner arter hastası ve hasta olmayan bireyler arasında aday gen anlatımları incelendiğinde ise *RTN3*, *CAT* ve *SLC25A1* ifadelerinin anlamlı olarak değiştiği gözlemlenmiştir.

Erastin ile ferroptotik hücre ölümünün indüklenmesinin ardından seçilen genlerin anlatımlarında görülen değişimler, bu genlerin ferroptoz mekanizması için önemli adaylar olabileceğini göstermektedir. Ateroskleroz patogenezinde ferroptozun etkisinin araştırılmasını amaçlayan bu çalışma ile mekanizmalarda rol oynuyor olabilecek yeni hedefler belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ateroskleroz, Koroner arter hastalığı, Ferroptoz, Erastin

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34037

ABSTRACT

Ozuyunuk, A.S. (2019). Functional Analysis of the Candidate Gene(s) that is Considered to Play Role in Coronary Artery Disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics. Master Thesis. İstanbul.

Coronary artery disease (CAD), which is characterized by the formation of atherosclerotic plaque in arteries carrying food and oxygen to the heart, is one of the most important public health problems both in our country and in the world. Since atherosclerosis is often preventable, it is of utmost importance to elucidate the underlying mechanisms and, therefore, risk factors. It is thought that increased lipid peroxidation and tissue damage with iron overload, which is one of the main factors of the newly defined programmed cell death -ferroptosis-, can lead to atherosclerosis and diabetes. Therefore, the aim of this thesis project is to investigate the mechanisms involved in the formation of ferroptotic cell death and CAD. For this purpose, *RTN3*, *CAT*, *SLC25A1*, *HMOX-1*, *GPX4*, *ACSL4* and *SLC7A11* genes were selected and their roles in these mechanisms were investigated.

In this study, ferroptosis in HEPG2 cells was induced by erastin and inhibited by ferrostatin-1. The conditions which ferroptosis is induced and both inducer and inhibitor-containing conditions were examined for the viability of cells and gene expressions of candidate genes. While the expression of *RTN3*, *CAT*, *SLC25A1* and *GPX4* were observed to be decreased, *HMOX-1* and *SLC7A11* gene expressions were increased and *ACSL4* expression did not change. When the expression levels of the selected genes were compared in patients with CAD and non-CAD individuals, it was observed *RTN3*, *CAT*, and *SLC25A1* expressions changed significantly.

Changes in expression of selected genes after induction of ferroptotic cell death with erastin suggest that these genes may be important candidates for the mechanism. In this research which aims for the investigation of the effect of ferroptosis on the pathogenesis of atherosclerosis, new targets which may play roles in both mechanisms are identified.

Keywords: Atherosclerosis, Coronary artery disease, Ferroptosis, Erastin

This study was supported by İstanbul University Scientific Research Projects Unit.
Project No: 34037

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aterosklerotik koroner arter hastalığı (KAH), çevresel ve genetik faktörlerin etki ettiği multifaktöriyel bir hastalık olup, damar duvarının kalınlaşması ve esnekliğinin kaybolması ile karakterize edilmektedir (1). Bu hastalığın gelişiminde, plak oluşumu ve aktivasyonunda, çeşitli metabolik, inflamatuvar, enfeksiyöz veya hemodinamik faktörler yer almaktadır (1, 2). Etiyolojik, patofizyolojik, klinik ve epidemiyolojik karmaşıklığına rağmen, ateroskleroz önlenabilir bir durum olduğundan, oluşum mekanizmalarının anlaşılması büyük önem taşımaktadır. KAH Türk popülasyonunda da önemli bir halk sağlığı sorunudur. Her ne kadar hastalık etiyojisinin altında yatan klasik risk faktörleri iyi tanımlanmış olsa da bu faktörleri yöneten moleküler mekanizmalar halen araştırılmaktadır.

Yeni keşfedilmiş bir programlı hücre ölüm tipi olan ferroptoz, yüksek hücre içi demir konsantrasyonları, lipid peroksitlerin oluşumunun artmasıyla tetiklenebilmektedir (3). Aşırı demir yükü ile artan lipid peroksitler sonucu oluşan doku hasarının ateroskleroza yol açabileceği düşünülmektedir. Aterosklerotik plak oluşumunda lipid metabolizması ve lipidlerin yapısındaki bozukluklar büyük önem taşımaktadır. Ferrik ve Ferröz demirin düşük yoğunluklu lipoproteinleri oksitlediği ve hücre içi demir birikiminin bu durumu arttırdığı bilinmektedir (4). Ferroptozun aterosklerotik plak oluşumuna katkıda bulunan metabolik yollar üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında, ferroptoz indükleyici ve baskılayıcı maddeler içeren koşullar hücre kültürü ortamında oluşturulmuştur ve hücre sayılarının belirlenmesi ile canlılık oranları belirlenerek başarı oranı elde edilmiştir. Ayrıca, *in vitro* ortamda erastin aracılığıyla indüklenmiş ferroptoz koşulları ile hem indükleyici hem baskılayıcı maddeler içeren koşullarda da seçilen genlerin anlatım seviyelerindeki farklılıklara kantitatif gerçek zamanlı PZR ile incelenmiştir. Bunun yanında, koroner arter hastası ve hasta olmayan bireylere ait RNA örneklerinde hastalık ve ferroptoz oluşumunda rol oynadığı düşünülen aday genlerin anlatım düzeyleri incelenmiştir. Bu çalışma ile, ferroptoz ve ateroskleroz mekanizmasında da rol oynayan ortak genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması, KAH patogenezindeki moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve ferroptotik hücre ölümünün bu hastalığın üzerinde etkili olup olmadığının belirlenmesi konusunda yapılan ilk çalışma olması yönünden önem arz

etmektedir. Projenin sonucunda, aterosklerozun meydana gelmesinde ve hücre ölümünde rolü olan hedef genler ve bunların yolları hakkında yeni bilgiler elde edilmesi amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koroner Arter Hastalığı

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre kardiyovasküler hastalıklar (KVH), kalp ve kan damarları bozukluklarını içeren hastalıkları kapsayan grubun genel adıdır. KVH grubunda, koroner kalp hastalığı (KKH), serebrovasküler hastalık, periferik vasküler hastalık, kalp yetmezliği, romatizmal kalp hastalığı, konjenital kalp hastalığı ve derin ven trombozu bulunmaktadır (5).

KVH'ler dünya genelinde ölüm nedenleri arasında ilk sırada bulunmaktadır. 2008 yılındaki verilere göre, 17,3 milyon insanın KVH'lerden ölmüş olduğu ve bu ölüm vakalarının 7,3 milyonunun KKH, 6,2 milyonunun ise inme nedeni ile olduğu bildirilmiştir (5).

KKH olarak da adlandırılan KAH, kalbe besin ve oksijen taşıyan arterlerde aterosklerotik plak oluşumuyla karakterize edilmektedir. Oluşan plak ile arter duvarı kalınlaşmasına ve çeşitli faktörler ile tromboz ve hematoma neden olarak iskemi ile sonuçlanmaktadır.

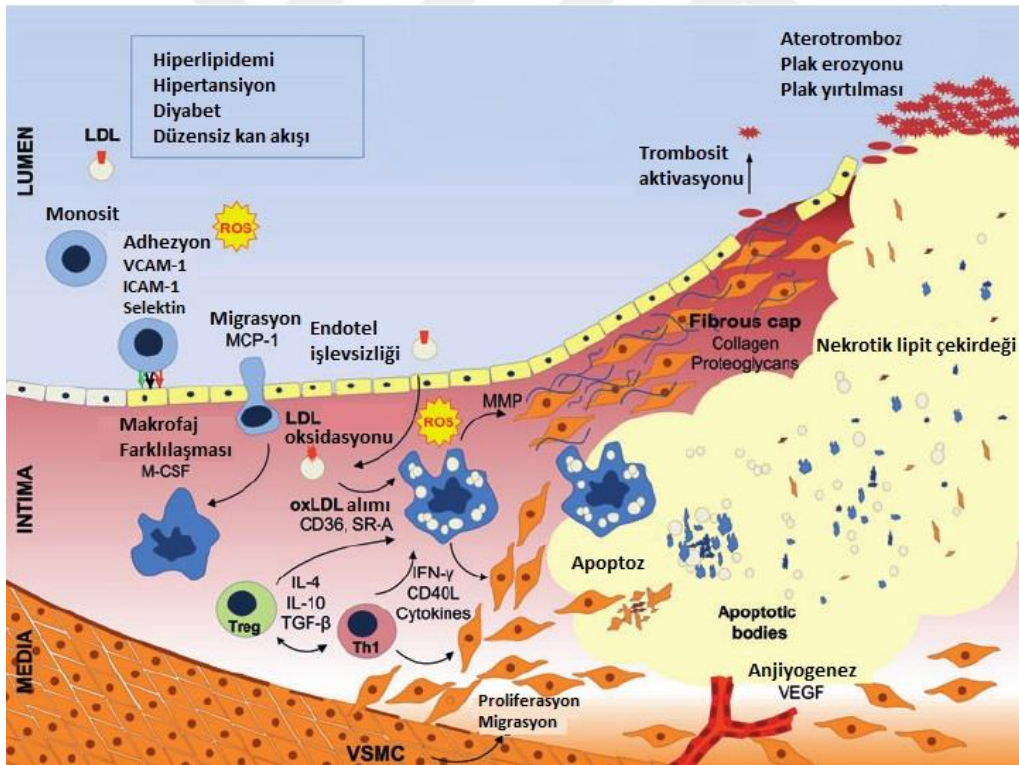
2.2. Ateroskleroz

Ateroskleroz, büyük arterlerde lipid ve fibröz elementlerin akümüasyonu ile karakterize ilerleyici bir hastalıktır. Erken yaşlarda başlayan bu oluşumda süreç endotel işlev bozukluğu ile başlamaktadır. Arterleri saran endotel hücrelerinin işlev kaybı sonucunda, nitrik oksit sinyalleri aracılığı ile vasküler tonuyu oluşturmaması durumu aterosklerotik plak oluşumunu başlatmaktadır. Endotel işlev bozukluğu ile başlayan ve bunu takip eden köpük hücre oluşumu, düz kas hücre proliferasyonu ile ilerleyen iltihap özelliği taşıyan kronik bir hastalık olan aterosklerozun erken dönem lezyonları, 'köpük hücresi' olarak adlandırılan kolesterolce zenginleşmiş makrofajların subendotelial bölgede birikimlerinden oluşmaktadır (1, 2).

Endotel işlev kaybının oluşumu ile başlayan, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) subendotel boşlukta birikmesi ve bu bölgedeki LDL'nin endotel hücrelerinden salınan reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından okside edilmesi inflamatuvar yanıtın oluşmasına sebep olmaktadır. Daha sonra subendotel bölgeye göç eden monosit hücreleri makrofaj hücrelerine farklılaşır ve süreç makrofajların intimada biriken okside olmuş düşük yoğunluklu lipoproteinleri (oxLDL) fagositoz yolu ile alarak devam eder. Makrofaj

hücrelerindeki ters kolesterol iletim mekanizmasının bozulması ile uzaklaştırılmayan oxLDL birikimi sonucunda kolesterolden zengin makrofaj hücreleri oluşarak aterosklerotik plağın temel yapısı olan köpük hücrelerine dönüşmektedirler (6, 7, 8). Burada oluşan yapının sonucunda, T hücreleri ve makrofajlardan salgılanan sitokinler ile inflamatuvar yanıt artar ve oluşan inflamatuvar yanıt düz kas hücre göçüne ve çoğalmasına sebep olarak plağın gelişiminin artması ve damar lümeninin daralmasına neden olmaktadır. Oluşan bu komplike yapıya aterosklerotik plak adı verilmektedir (Şekil 2-1) (8).

Plaklar kalsifikasyon ve lümen yüzeyindeki ülser oluşumu ile giderek daha karmaşık hale gelebilmektedir. Her ne kadar ilerlemiş lezyonlar kan akışını engellemek için yeterince büyük olsalar bile, en önemli klinik komplikasyon miyokard infarktüsü (MI) veya inme ile sonuçlanan tromboz ve kan pıhtısı oluşumuna bağlı akut tıkanmalardır. Tromboz, genellikle lezyonun yırtılması veya erozyonu ile ilişkilidir. (1).



Şekil 2-1: Aterosklerotik plak oluşumunda rol oynayan mekanizmalar

Ateroskleroz oluşumunda rol oynayan farklı mekanizmalar gösterilmiştir. Hiperlipidemi, hipertansiyon ve diyabet gibi risk faktörlerinin varlığında, endotel işlev bozukluğu, makrofaj farklılaşmasının ardından kolesterolce zengin makrofajların oluşumu ve düz kas hücresi proliferasyonu ile damar yapısının bozulması sonucu aterosklerotik plak oluşmaktadır (9).

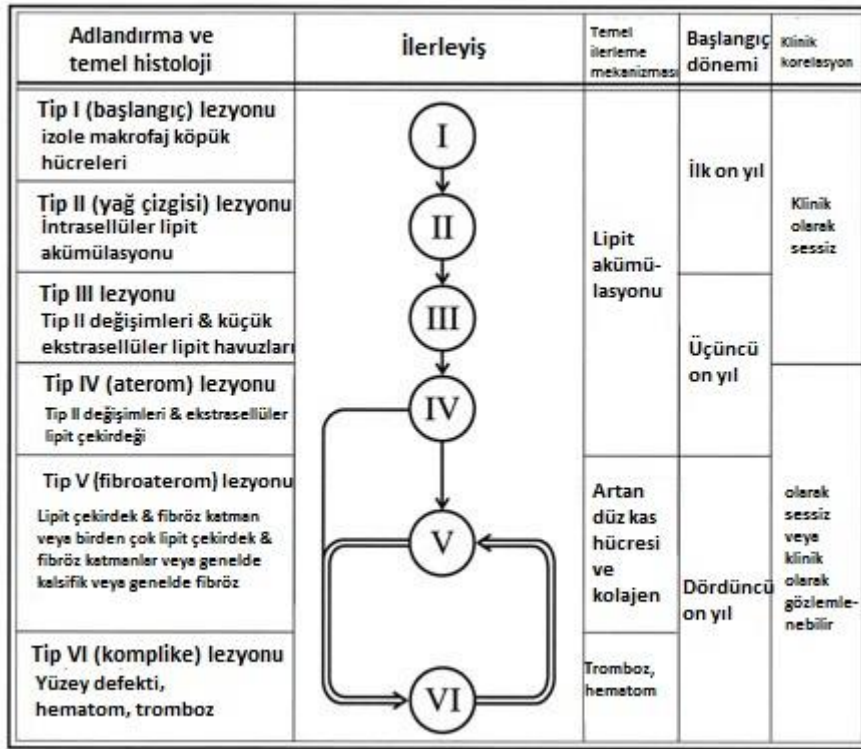
2.2.1. Ateroskleroz Patogenezi ve Histolojisi

İnsanlarda, yağ çizgi lezyonları genellikle yaşamın ilk on yılında aortta, ikinci on yılında koroner arterlerde ve üçüncü veya dördüncü on yılında serebral arterlerde oluşmaktadır (1).

Aterosklerotik lezyonların başlangıcı olarak tanımlanan erken lezyonlar üç gruba ayrılmıştır. Tip I ve tip II lezyonlar genellikle arteryal intimada küçük lipid birikimleri olarak gözlemlenirken, tip III lezyonlar genelde yağ çizgisi olarak adlandırılan lezyonları içermektedir (10). Tip II lezyonlar genellikle kolesterol esterleri, kolesterol ve fosfolipidlerden oluşmaktadır (11). Tip II lezyonlarda lipidler hücre içinde bulunurken, bu lezyonlarda makrofaj ve lipid içeren düz kas hücrelerinin oranları değişkendir. Ayrıca tip II lezyonların büyük bir bölümünde lipidler makrofaj hücrelerinden dönüşen köpük hücrelerinde bulunmaktadır. Tip I ve II lezyonlar genellikle yaşamın erken evrelerinde görülmektedir. Aynı zamanda preaterom olarak da adlandırılan tip III lezyonlar ise tip II lezyonlar ve aterom arasında bir geçiş evresi olarak değerlendirilebilmektedir. Preateromlarda, düz kas hücreleri arasında oluşan ekstrasellüler lipid birikimi mikroskopta görülebilmektedir (10). Bu aşamada, ekstrasellüler lipidlerin birleşmiş ve iyi tanımlanmış birikimi ve lipid çekirdeği oluşumu henüz gelişmemiştir. Bu tip lezyonlarda tip II lezyonlara göre daha fazla serbest kolesterol, yağ asidi, sfingomiyelin, lisolesitin ve trigliserit içermektedir (12). Pek çok çalışmada, ileri lezyonların karakteristik bileşeni olan lipid çekirdeğinin, tip III lezyonunda görülen ayrı hücre dışı lipid havuzlarının artması ve birleşmesiyle oluştuğu gösterilmektedir. Bu üç tip lezyonun ortak özelliği yaşamın sonraki evrelerinde hastalık yaratabilecek olan lezyonların klinik olarak sessiz öncüleri olmalarıdır.

İleri aterosklerotik lezyonlar histolojik karakterlerine göre, tip IV, V ve VI olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Aynı zamanda aterom olarak da adlandırılan tip IV lezyonlarda, intimada belirli bir yer tutan bir lipid akümüasyonu ve birikimi ile oluşan lipid çekirdeği gözlemlenmektedir (13). Bu tip lezyonlarda, fibröz doku artışı ve tromboz gibi komplikasyonlar gözlemlenmezken, lezyonların ileri aterosklerotik olarak sınıflandırılması, intimada lipid çekirdeğinin sebep olduğu şiddetli düzensizliklerden kaynaklanmaktadır. Her ne kadar aterom plaklar arter duvarında kalınlaşmaya sebep olsalar da koroner arter lümenini daraltacak kadar etkiye sahip değildirler (14). Ayrıca bu tip lezyonlarda, lipid çekirdeği ve endotel yüzey arasında, intimada, lipid birikimleri

içeren ve içermeyen makrofaj ve düz kas hücreleri gözlemlenir. Tip V lezyonlarda ise yeni ve belirgin bir fibröz bağlayıcı doku oluşumu görülmektedir. Lipid çekirdeğin yapısına ve fibröz dokunun oluşum yerine göre tip V lezyonlar alt gruplara ayrılabilir. Bu tip lezyonlarda arterlerde görülen daralma tip IV lezyonlara göre daha fazladır, aynı zamanda tip V lezyonlar fisür, hematoma ve tromboza sebep olabildiklerinden klinik olarak büyük önem arz etmektedirler. Tip IV ve tip V lezyonlar yüzey bozulması, hematoma, tromboz ya da tüm bu özellikleri birden geliştirebilir ve tip VI lezyonları oluşturabilirler. Tip VI lezyonlar bu özelliklerin tamamını ya da bir tanesini taşımalarına göre alt gruplara ayrılırlar (Şekil 2-2) (13).



Şekil 2-2: Aterosklerozun temel histolojisi

Aterosklerotik lezyonların sınıflandırılması, ilerleyiş şeması, temel ilerleme mekanizmaları, başlangıç dönemleri ve klinik korelasyonları gösterilmiştir (13).

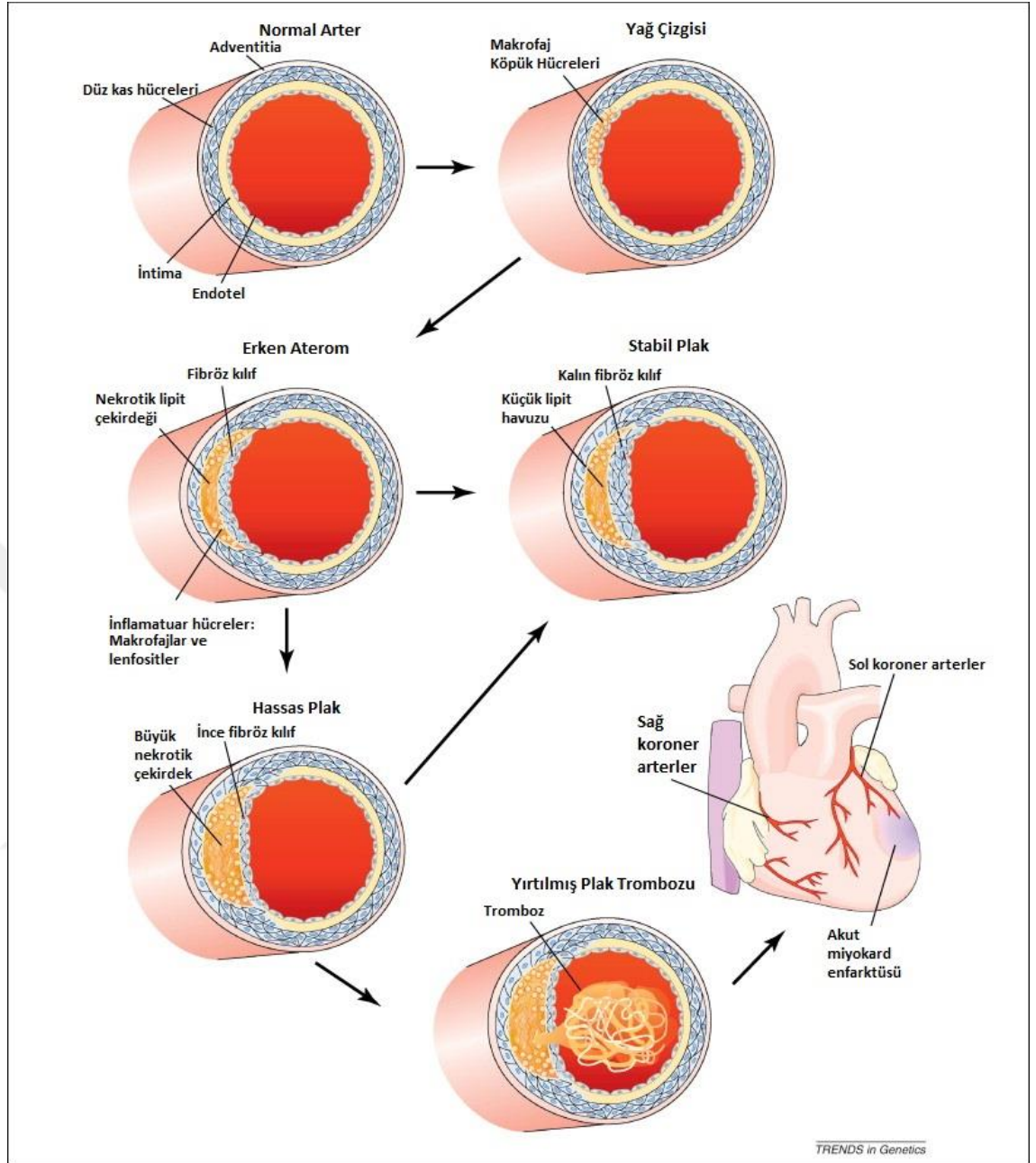
Aterom plak lezyonları özellikle lezyon yüzey bozulmasına yatkındırlar. Lezyonlarda intimal bozulmalara ve tromboza yol açan faktörler arasında; inflamatuvar hücrelerin varlığı, lezyonlardaki makrofajlardan salınan toksik maddeler ve proteolitik enzimler, koroner spazm, lezyon bileşimine bağlı yapısal zayıflıklar bulunmaktadır.

Genellikle yırtılmalar, sayıca fazla makrofaj köpük hücrelerine sahip lezyon bölgelerinde daha sık meydana gelmektedir.

Önceki çalışmalarda, trombüs ya da trombüs kalıntısı taşıyan ileri aterosklerotik lezyonların yaşamın dördüncü on yılından itibaren sıkça görüldüğü gösterilmiştir. Buna ek olarak bir çalışmada, 30 ile 59 yaş arasında aortta ileri aterosklerotik lezyonu olan bireylerin %38'inin lezyon yüzeyinde trombüs gözlemlenmiştir (15).

Patolojik çalışmalar, yırtılan ve akut miyokard infarktüsünü tetikleyen ateromun genellikle, belirgin bir lipid havuzu ve çoğunluğu makrofaj olmak üzere çok sayıda inflamatuvar hücre içerdiğini göstermiştir. İnflamatuvar hücreler, kollajen sentezi azaltarak ve yıkımını artırarak, lezyonun lipid çekirdeğini örten fibröz kılıfı incelten ve zayıflatan araçlar salgırlar. Bunun yanında, düz kas hücresi apoptozu da fibröz başlıktaki kollajenlerin azalmasına neden olabilmektedir. Aktive olan makrofajlar, güçlü bir koagülasyon kaskadı aktivatörü olan doku faktörünü eksprese etmektedir. Hassas plakların ince fibröz kılıfının bozulması, kan pıhtılaşma faktörlerinin doku faktörüne doğrudan temas etmesine neden olur ve bu durum trombüs oluşumunu tetikleyebilir (16).

Hassas plaklarda ince fibröz kılıf, büyük lipid havuzu, sayıca fazla inflamatuvar hücre ve az sayıda düz kas hücresi bulunurken stabil plaklarda bu özelliklerin tam tersi gözlemlenmektedir (16).



Şekil 2-3: Koroner Arter Hastalığının Aşamaları

Normal damar yapısının bozulması ile intimada biriken makrofaj köpük hücreleri yağ çizgisi oluşumuna neden olmaktadır. Aterosklerotik plak oluşumunun ilerlemesi ile nekrotik lipid çekirdeği ve bu çekirdeğin üstünü kaplayan fibröz kılıf oluşumu gözlemlenmektedir. Fibröz kılıfın kalınlığı ve nekrotik lipid çekirdeğinin boyutu plağın stabilitesini belirlemektedir. Plağın yırtılması ile tromboz oluşumu ve bunun sonucunda oluşan akut miyokard enfarktüsü gösterilmiştir (17).

2.2.2. Aterosklerozun Klinik Belirtileri

Aterosklerozun klinik komplikasyonları, etkilenen damarların yeri ve büyüklüğüne, kronik sürecin süresine ve plak tipine bağlı olarak büyük ölçüde değişebilmektedir, çünkü aterosklerozdaki bozulmanın ciddiyeti damar yapısı boyunca farklılık göstermektedir. Örneğin, stabil plak, nispeten küçük koroner damarların çapını doğrudan etkileyen kalın fibröz kılıfı ile anjina pectorise neden olmaktadır. Öte yandan, korunmasız plak, daralma açısından büyük öneme sahip değildir, ancak fiziksel olarak stresli bölgelerde bulunduğu yırtılmaya karşı kırılabilirliğinden dolayı kolayca akut tromboza ve dolayısıyla miyokard infarktüsüne neden olabilmektedir (18). Ateroskleroz sonucunda, daralan damarlar ile anjina pectoris ve plak instabilitesine bağlı olarak akut koroner sendromlar gözlemlenmektedir (19).

Anjina pectoris, koroner arterlerin bir kısmının tıkanması ile kalbin oksijen gereksiminin tam olarak karşılanamaması olarak tanımlanır. Stabil anjina yüksek efor ve stresle ortaya çıkmaktadır ve nitrogliserin ve istirahat ile klinik semptomları geçmektedir. Oluşan ağrı, torasik ve servikal sinirler yoluyla nöral refleks yolağının etkilenmesinden kaynaklanır. Bu nedenle, belirli bir noktada hissedilmemektedir ve lokalizasyonu zor bir ağrı şeklindedir. Anjina sıklıkla üst karın, omuz, kollar, bilek, parmak, boyun, boğaz, alt çene ve dişler de dahil olmak üzere vücudun çeşitli bölgelerine yayılmaktadır (20).

Akut koroner sendrom (AKS) terimi, akut miyokard iskemisi ile uyumlu herhangi bir klinik semptom grubunu ifade etmektedir ve stabil olmayan anjina (UA) ile ST segment yükselmesiz miyokard infarktüsünden (Non-STEMI) ST segment yükselmeli miyokard infarktüsü (STEMI) kadar değişen klinik koşullar spektrumunu kapsamaktadır (21). AKS'de altta yatan patofizyoloji, genellikle plak yırtılması ve trombüs oluşumunun ardından kalp kas sisteminin bir kısmına kan akışının azalmasıdır. Plak yırtılması, subendotelyal kollajenin ortaya çıkmasına ve buna bağlı olarak trombositlerin ve pıhtılaşma kaskadının aktivasyonuna dolayısıyla trombüs oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan trombüs tamamen veya kısmen tıkaçıcı olabilmektedir. Tamamen tıkanıklığı olan hastalar genellikle STEMI bulgusu gösterirler. Bunun aksine kısmen tıkalı koroner arterleri olan hastalar genellikle ST-segment yükselmesine sahip değildirler. Bu hastalar miyokard hasarı kanıtı olup olmamasına bağlı olarak UA veya NSTEMI olarak sınıflandırılmaktadır (22).

2.2.3. Ateroskleroz Etiyolojisi

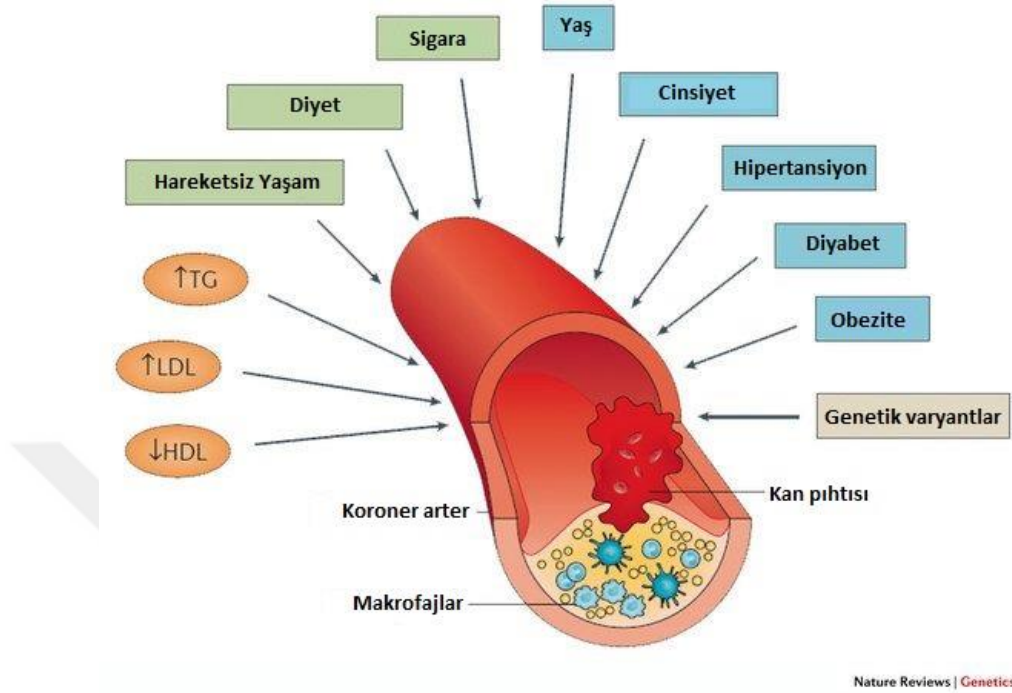
Aterosklerozun kesin nedenleri tam olarak bilinmemektedir, ancak bazı koşullar, özellikler veya alışkanlıklar ateroskleroz gelişme olasılığını arttırdığı gösterilmiştir. Yüksek kolesterol ve LDL, kanda düşük seviyede yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), hipertansiyon, tütün ürünleri tüketimi, diyabet, obezite, inaktif yaşam tarzı, yaş ve erkek cinsiyet gibi risk faktörlerinin ateroskleroz gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (Şekil 2-4) (23). INTERHEART çalışmasında dislipidemi, tütün ürünleri tüketimi, fiziksel aktivite eksikliği, abdominal obezite, psikososyal faktörler, yetersiz günlük meyve ve sebze tüketimi, düzenli alkol tüketimi, hipertansiyon ve şeker hastalığı önlenebilir risk olarak belirlenmiştir.

Yüksek apolipoprotein B/apolipoprotein A-I oranı ile tanımlanan dislipidemi en önemli önlenebilir risk faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda yüksek doymuş yağ tüketimi ve yüksek kolesterol seviyesine sahip ülkelerde, koroner hastalıktan ölüm oranlarının, geleneksel olarak düşük doymuş yağ ve kolesterol tüketimine sahip ülkelere göre daha yüksek olduğunu gösterilmiştir.

Sistolik kan basıncı ≥ 130 veya diyastolik kan basıncı ≥ 80 mmHg olarak tanımlanan evre I hipertansiyon, Amerika Birleşik Devletleri'nde, diğer önlenebilir risk faktörlerinden daha fazla aterosklerotik kardiyovasküler hastalığa bağlı ölüm ile ilişkili bulunmuştur. 61 prospektif çalışmanın meta-analizinde, 115 ile 180 mmHg arasında değişen sistolik kan basıncı seviyeleri ve 75 ile 105 mmHg arasında değişen diyastolik kan basıncı seviyeleri ile aterosklerotik kardiyovasküler hastalık riski arasında log-lineer bir ilişki gözlemlenmiştir (24). Bu çalışmada, 20 mmHg daha yüksek sistolik kan basıncı ve 10 mmHg daha yüksek diyastolik kan basıncının felç, kalp hastalığı veya diğer vasküler hastalıklardan ölüm riskini iki kat artırdığı gösterilmiştir (24).

Pek çok çalışmada pasif içicilik de dahil olmak üzere tütün kullanımının, ateroskleroz ve iskemik kalp hastalığı riskini arttırdığı gösterilmiştir. Topluluklarda Ateroskleroz Riski Çalışması'nda (ARIC), sigaranın ateroskleroz gelişimi üzerindeki doğrudan etkisinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, üç yıl boyunca 10.914 hastanın karotid arterinin intima-medial kalınlığını ultrason ölçülmesi sonucunda, sigara içenlerin ateroskleroz progresyonunun, çalışma süresince sigara içmeyenlere kıyasla %50 oranında arttığı gösterilmiştir (25). Ayrıca, çevresel sigara dumanına maruz kalanlarda, sigara

dumanına maruz kalmayan hastalara göre %20 daha yüksek hızda aterosklerotik ilerleme gözlemlenmiştir (26).



Şekil 2-4: Koroner arter hastalığı risk faktörleri

Koroner arter hastalığı oluşumunda rol oynayan risk faktörleri arasında plazma HDL azalması, TG ve LDL yükselmesi, hareketsiz yaşam tarzı, beslenme, sigara tüketimi, ileri yaş, erkek cinsiyet, hipertansiyon, diyabet, obezite ve genetik varyasyonlar gösterilmektedir (27).

INTERHEART çalışmasında, hareketsiz yaşamın ilk miyokard infarktüsü riskinin %12'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Fiziksel egzersizin faydaları arasında, trigliserit düzeylerinin ve kan basıncının düşmesi, HDL'nin yükselmesi, insülin duyarlılığının artması ve endotel hücreleri tarafından nitrik oksit üretimi ve kilo kaybı sayılmaktadır (28).

Amerikan Kalp Derneği, obeziteyi KKH için bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlamaktadır (29). Yapılan çalışmalarda obezitenin, hipertansiyon, insülin direnci, glukoz intoleransı, düşük HDL serum seviyesi ve hipertrigliseridemi gibi ateroskleroz için önemli risk faktörleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Kadınlar ve erkekler, kalp ve damar hastalıkları için farklı risklere sahiptir. Örneğin, genç yaşta, erkeklerin kadınlardan dört ila beş kat daha yüksek riske sahip oldukları tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, riskler arasındaki bu fark yaşın ilerlemesi

ile azalmaktadır ve menopoza ile riskler arasındaki fark kapanmaktadır (30). Bu durumdan, menopoza ile östrojen seviyelerindeki düşüşün etkili olabileceği ve östrojenin atero koruyucu etkilere sahip olabileceği öne sürülmüştür. Östrojen, menopoza öncesi dönemde kadınlarda, serum HDL seviyelerini yükseltmekte ve LDL seviyelerini azaltmaktadır. Ayrıca östrojen, antioksidan ve antitrombotik özellikler gösterebilmektedir ve endotel bağımlı vazodilatasyonu arttırmaktadır (31).

Hemoglobin A1 oranı $> \% 6.5$ olarak tanımlanan Tip 2 Diabetes Mellitus, hiperglisemiye yol açan insülin direnci ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Diyabetin, akut koroner olay riskini üç ila beş kat arttırdığı ve diyabetik hastaların $\%80$ 'inin ateroskleroz ile ilgili kardiyovasküler hastalıklara yakalandığı gözlemlenmiştir. Diyabet hastaları için ateroskleroz riskinin, daha önce miyokard infarktüsü geçiren hastalardaki kadar yüksek olduğu kabul edilmektedir. Bu gözleme dayanarak, ABD'deki Ulusal Kolesterol Eğitim Programı'nın raporu ve Avrupa'dan gelen kılavuzlar, tip 2 diyabeti KKH eşdeğeri olarak değerlendirmekte ve miyokard infarktüsü için en yüksek risk altında sınıflandırmaktadır (32).

2.3. Programlı Hücre Ölümü

Hücre ölümleri, morfolojik gözlemlere göre temel olarak üç gruba ayrılmaktadır. Günümüze kadar geçen süreçte bu gruplar, apoptoz (tip I), otofaji (tip II) ve nekroz (tip III ya da programsız hücre ölümü) olarak tanımlanmıştır. Apoptoz ve otofaji programlı hücre ölümleri olarak sınıflandırılırken, nekroz ise programsız bir hücre ölüm şekli olarak sınıflandırılmıştır. Fakat, günümüzde bu tanımlar, yeni hücre ölüm mekanizmalarının keşfi ile değişmektedir. Programlı hücre ölümleri, biyolojik süreç başladıktan sonra hücre içinde çeşitli moleküler mekanizmaların aktive olmasıyla karakterizedir ve en önemli örneği apoptoz olarak bilinmektedir. Apoptoz sırasında, hücre proinflatuvar ajanların çevreye salınımı önlemek için komponentlerine ayrılır. Geçmişte programsız hücre ölüm tipi olduğu düşünülen nekrozun da çeşitli düzenleyici araçlar ile ilerlediği gösterilmiştir. Günümüzde çok sayıda farklı programlı hücre tipleri bilinmektedir. Bunlar arasında, nekroptoz, oksitoz ve ferroptoz da sayılabilir.

2.3.1. Hücre Ölüm Mekanizmaları

2.3.1.1. Apoptoz

Apoptoz kaspaz-bağımlı bir programlı hücre ölüm şeklidir (33). Apoptozun karakteristik morfolojik özellikleri arasında nükleer fragmentasyon, sitoplazma azalması, kromatin kondenzasyonu ve apoptotik cisim oluşumu gösterilmektedir (34).

Apoptozun oluşumunda, hücre içinde ve dışında yer alan faktörler rol oynamaktadır (35). Hücre dışı uyaranlara hücre ölümünü indükleyen sitokinlerden Fas Ligand (FasL) örnek verilebilir. Fas reseptörü tarafından alınan sinyal, *death-inducing signaling complex* (DISC) oluşumuna sebep olmaktadır ve DISC, *Fas-associated Death Domain* (FADD) ile birlikte kaspaz-8'i sürece dahil etmektedir (36). Kaspaz-8'in aktive olması, kaspaz-3, -6 ve -7'nin de kırılmasına yol açarak apoptoz sürecinin ilerlermesini sağlamaktadır (33). Hücre içi uyaranlar ile indüklenen apoptoz oluşumunun, mitokondri dışı membran geçirgenliğine bağlı olduğu bilinmektedir. Bunun yanında, pro ve anti-apoptotik BCL-2 protein aile üyeleri arasındaki etkileşimin de, membran üzerindeki por oluşumunu kontrol ettiği için bu süreçte kritik rol oynadığı gösterilmiştir (37). Ayrıca, Z-VAD-FMK önemli apoptoz modülatörlerinden biri olarak tanımlanmıştır.

2.3.1.2. Otofaji

Otofaji, bir hücrenin gereksiz, işlevini kaybetmiş hücresel bileşenleri ve makromolekülleri degrade ettiği ve geri dönüştürdüğü işlem olarak tanımlanmaktadır. Otofaji, makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç ana şekilde gerçekleşmektedir (38). Otofaji degrade olacak hücre bileşeni ya da makromolekülün bir vezikül içerisine alınmasıyla başlamaktadır ve ardından bu vezikülün lizozom ile birleşmesi ile bileşen degrade olmaktadır. Sonrasında, degrade olan yapıların kullanımı gerçekleşmektedir. Otofaji ile ilişkili genler, indüksiyon, vezikül oluşumu ve otofagazom degradasyonu gibi sürecin farklı aşamalarında görev almaktadır. PI3K-AKT-mTOR yoluyla besin azlığına bağlı makrotofajinin gerçekleşmesinde temel rol oynamaktadır (38). Araştırmalar, otofajinin, açlık adaptasyonu, hücre içi protein ve organel temizlenmesi, gelişme, antiaging, mikroorganizmaların ortadan kaldırılması, hücre ölümü ve tümör baskılanması gibi çok önemli bir fizyolojik ve patofizyolojik rollere sahip olduğunu göstermiştir.

2.3.1.3. Nekroz

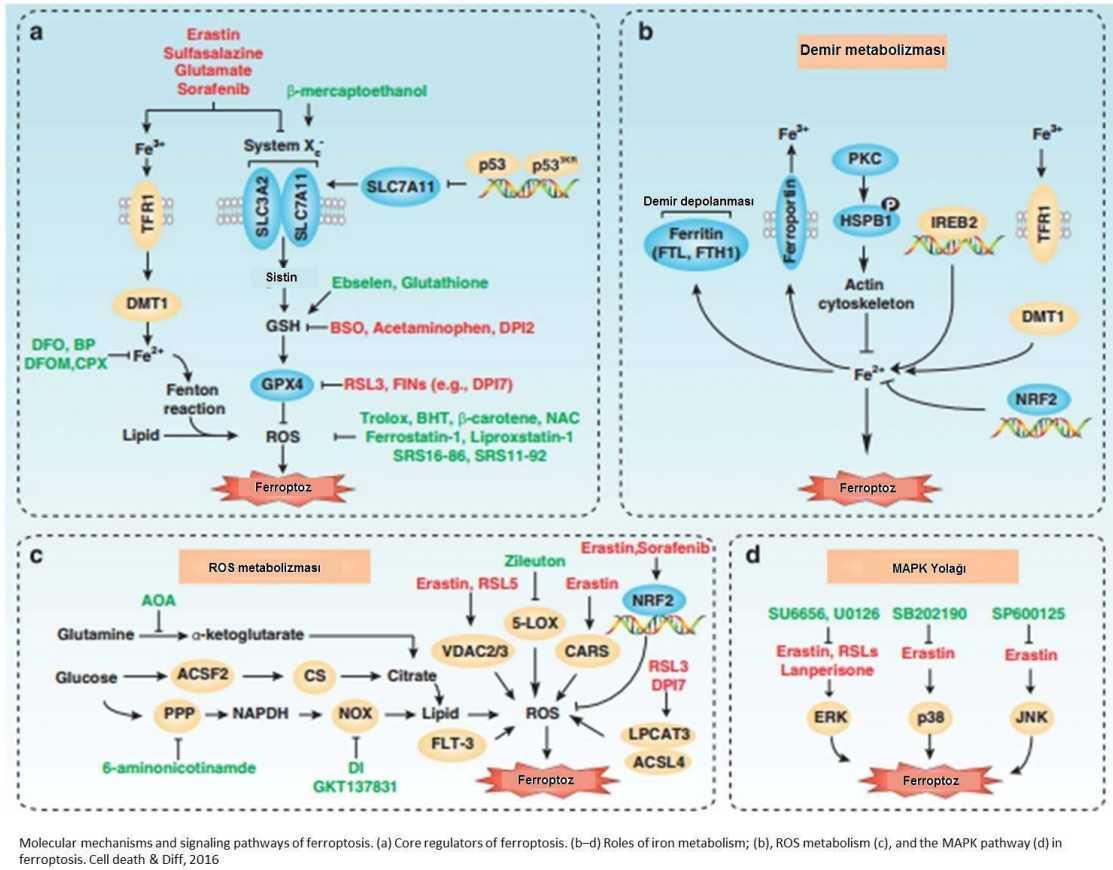
Tip III ölüm olan nekroz genellikle, yüksek sıcaklık, ekstrem pH, ya da hücre zarının yırtılmasına sebep olabilecek fiziksel olaylar gibi fizyokimyasal etkiler ile gerçekleşmektedir. Nekroz, tip I ve II gibi kompleks mekanizmalar üzerinden ilerleyen ölüm şekillerine göre daha hızlı şekilde cereyan etmektedir (39). Tip III ölüm şeklinde hücrelerde apoptoz ve otofajide görülen morfolojik olaylar gözlemlenmezken, kimi zaman hücresel hacimde artış ve yüksek oksidatif stres gözlemlenebilmektedir. Ayrıca apoptoz belirteci olan kaspaz aktivasyonunun nekrozda yer aldığı düşünülmesi de katepsinler gibi diğer proteazlar hücresel parçalanmada rol oynayabilmektedir (40).

Biyokimyasal düzeyde nekrozu daha iyi tanımlamak adına yapılan çalışmalarda, regülasyon içeren özelliklere sahip olarak birçok nekrotik ölüm şekli tanımlanmıştır (41, 39,42). Bu hücre ölümü formları apoptotik veya otofajik belirteçlerden yoksun olmasına karşın nekrotik özellikler göstermektedir ancak hedeflenen genetik veya farmakolojik araçlar yoluyla düzenlenebilmektedir (39, 41, 42).

Regüle nekroza en iyi örnek olarak tanımlanan nekroptoz, apoptoz geçirme yetisinde kusurlu olan hücrelerin, dışsal apoptoz uyaranlarına maruz kaldığında ortaya çıkan bir hücre ölümü şeklidir (42, 43, 44, 45).

2.4. Ferroptoz

Ferroptoz, fosfolipid glutatyon peroksidaz (GPX4) ile ilişkili yollar tarafından kontrol edilen demir-bağımlı bir oksidatif hücre ölüm şekli olarak tanımlanmaktadır (3, 46, 47, 48). Ferroptoz yolu ile oluşan hücre ölümünde, apoptozda görülen kromatin kondenzasyonu, otofajide görülen sitoplazmik vakuolizasyon ve nekroziste görülen hidrojen peroksit ile indüklenen morfolojik özellikler gözlemlenmemektedir (3, 49). Bunun yanı sıra, ferroptoz yolu ile gerçekleşen hücre ölümü, otofaji ve apoptoz inhibitörleri ile önlenememektedir (3, 49). Ferroptoz sırasında görülen en önemli morfolojik özellik mitokondride görülen küçülme ve membran yoğunluğudur (3). Hücre içi serbest demir miktarındaki artış ve lipid peroksidasyonu ferroptozun biyokimyasal habercileridir (3, 50, 51).



Şekil 2-5: Temel ferroptoz mekanizmaları

(a) Temel ferroptoz regülatörleri ve mekanizmaları. Erastin sınıfı indükleyiciler sistem Xc-’yi inhibe ederken hücre için demir yoğunluğunu arttırmaktadır. DFO, BP, DFOM ve CPX gibi demir şelatörleri aksi takdirde fenton reaksiyonlarına sebep olabilecek hücre içi Fe^{2+} yoğunluğunu azaltmaktadır. Ebselen ve glutatyon GPX4’ün aktivitesini artırırken RSL3 sınıfı indükleyiciler GPX4’ü inhibe etmektedir. Artan ROS Trolox ve Ferrostatin-1 gibi inhibitörler ile azaltılmadığında ferroptoz meydana gelmektedir. (b) Demir metabolizması. Gösterilen mekanizmalar ile hücre içi Fe^{2+} yoğunluğunun artmasıyla ferroptoz gerçekleşmektedir. (c) ROS metabolizması. Hücre içi ROS’un artması ferroptozu neden olmaktadır. RSL3 sınıfı indükleyiciler ACSL4 ve LPCAT3 üzerinden, erastin VDAC2/3 ve CARS üzerinden ROS oluşumunu arttırmaktadır. Zileuton 5-LOX’u inhibe ederek ve Nrf2 hedefinde bulunan genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek ferroptozu engellemektedir. (d) MAPK yolağı. Erastin ve RSL sınıfı indükleyiciler ERK, p38 ve JNK aracılığıyla ferroptozu arttırmaktadır (52).

Ferroptozun lipofilik antioksidanlar ve demir şelatörleri aracılığı ile baskılandığı gösterilmiştir. Bu spesifik modülatör profilinin, sadece oksidatif olmayan hücre ölümleri arasında değil, aynı zamanda oksidatif hücre ölüm formları içinde de ferroptozu özgü olduğu gösterilmiştir (51). Bu özgünlüğün temelinde, reaktif demirin lokalizasyonu ve kaynağını ve ROS oluşumunun diğer oksidatif hücre ölümlerinden farklı olması yatmaktadır. Genel olarak ROS oluşumunu indükleyen uyarıcılar, mitokondriyal ROS

oluşumuna sebep olurken ferroptoz sırasında bu durum mitokondriden bağımsız ve lipidlerde lokalize olarak görülmektedir (3, 53). Ferroptotik olmayan ROS indükleyicileri hidrofilik antioksidanlar tarafından baskılanabilirken, lipofilik antioksidanlar tarafından baskılanamamaktadır (3). Ferroptozun demir şelatörleri ve lipofilik antioksidanlar ile baskılabiliyor olması, diğer oksidatif hücre ölümlerinden ayrılmasına sebep olan ve onu tanımlayan en önemli özelliğidir (54).

2.4.1. Ferroptoz İndükleyicileri

Ferroptoz, ilk olarak erastin adı verilen bir molekül tarafından indüklenebilen bir hücre ölüm modeli olarak tanımlanmıştır. Erastin molekülünün bulunmasının ardından aynı mekanizmaya sahip başka küçük moleküller bulmak adına yapılan sentetik lethal kimyasal taraması ile DPI10, RSL3 DPI7 gibi ferroptoz indükleyicileri tanımlanmıştır (55, 56, 57). Bu moleküller üzerine yapılan proteomik çalışmaları sonucunda, voltaj-bağımlı anyon kanalları bu indükleyicilerin hedeflerinden biri olarak gösterilmiştir (51). Ardından, bu moleküllerin ayrıca hücre içi sistin ve glutatyon mekanizmasını değişik basamaklarda hedef aldığı gösterilmiştir (50). Bu indükleyiciler, glutatyon oluşumunu azaltanlar (Sınıf I) ve GPX4 fonksiyonunu engelleyenler (Sınıf II) olarak iki sınıfa ayrılmıştır.

Sınıf I ya da erastin sınıfı ferroptoz indükleyicileri hücre içi sistein düzeyinin ve bir sistein metaboliti olan glutatyon seviyesinin birincil düzenleyicisi olan sistin glutamat antiporterı sistem Xc-‘nin inhibisyonuna sebep olmaktadır. Glutamat ile indüklenen eksitotoksisitede, yüksek ekstrasellüler glutamat düzeyi sistem Xc-‘nin aktivitesinin engellenmesine, glutatyon miktarında düşüşe ve ferroptozla özgü lipofilik bir antioksidan olan ferrostatin ile engellenebilen demir bağımlı oksidatif hücre ölümüne sebep olmaktadır (3). Buna ek olarak, yüksek glutamat içeren ortamda β -merkaptotanol gibi indirgen maddelerin varlığında sistinin sistine indirgenmesi sonucunda hücrelerin erastin aracılı ferroptozdan kurtulduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca metabolit profillemeye çalışmaları ile erastin aracılı ferroptozda hücre içindeki glutatyon düzeyindeki düşüş bu indüklenme şeklinin ayırıcı özelliği olarak tanımlanmıştır (48, 50). Tüm bu bilgiler sistem Xc-‘nin ferroptozun oluşumunda önemli bir etkiye sahip olduğunu ve erastinin bu yolak üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Sulfasalazin ve sorafenib maddeleri de sistem Xc-‘ üzerindeki etkileri göz önüne alınarak erastin sınıfı indükleyiciler olarak sınıflandırılmıştır (3, 48).

Aynı zamanda RSL3 sınıfı olarak da adlandırılan sınıf II indükleyiciler ise fosfolipid glutasyon peroksidaz (GPX4) inhibisyonuna sebep olmaktadır. RSL3, GPX4'e bağlanırken, diğer RSL3 sınıfı indükleyiciler enzimatik reaksiyonu engellemektedir (50). RSL3 sınıfı indükleyicilerin GPX4 gibi katalitik selenosistein rezidüleri içeren yüksek reaktiviteye sahip selenoproteinlere bağlanmalarının altında yatan etkenin, sahip oldukları alfa-kloroamid yapı olduğu düşünülmektedir (58).

2.4.2. Ferroptoz İnhibitörleri

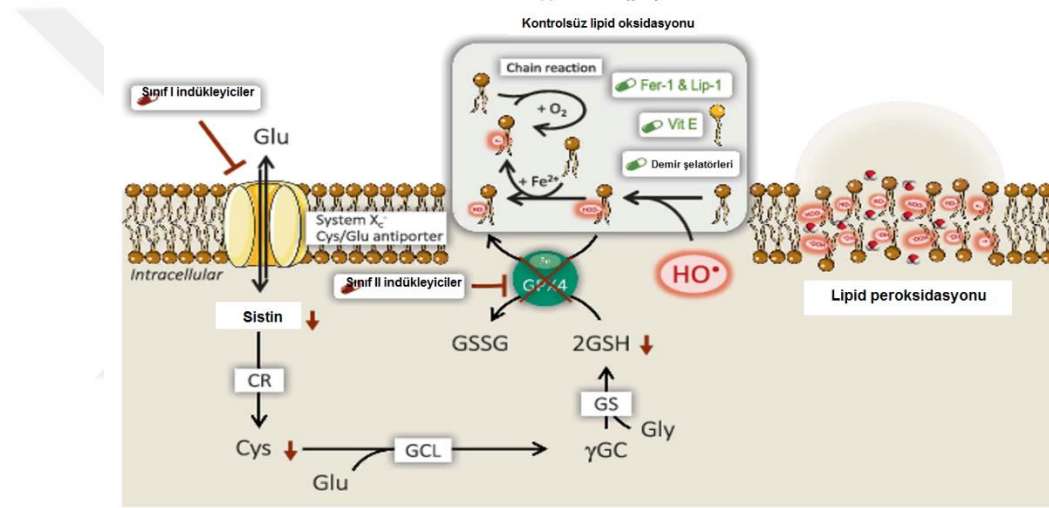
Ferroptotik hücre ölümü, lipofilik antioksidanlar, demir şelatörleri, lipid peroksidasyonuna yol açan substratlar olan çoklu doymamış yağ asit fosfolipidlerin (PUFA-PL) azalması ve lipid peroksidasyon inhibitörleri ile inhibe edilebilmektedir (59). Lipid peroksidasyonunun, ferroptotik hücre ölümündeki önemi göz önüne alındığında enzimatik ve enzimatik olmayan lipid peroksidasyonunun önlenmesi ferroptoz inhibisyonunda büyük önem arz etmektedir. Lipid peroksidasyon inhibitörleri, radikal tutucu antioksidanlar (RTA) ve lipooksijenaz inhibitörleri olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır (59).

Lipooksijenaz inhibitörleri etki mekanizmalarına bağlı olarak beş ana gruba ayrılmaktadır: (i) aktif bölge demir atomunu inaktif formda tutan redoks inhibitörleri; (ii) aktif bölge demirinin uzaklaştırılmasıyla enzimi inaktive eden demir şelatörleri; (iii) substratın bağlanmasını engelleyen, aktif bölgeyi işgal edebilecek rekabetçi inhibitörler; (iv) enzimi geri dönüşümsüz biçimde inaktive eden substratlar; ve (v) substrat bağlama cebinden uzak bir bölgeye bağlanarak enzim aktivitesini etkileyen allosterik inhibitörlerdir. Zileuton, BW A4C, PD146176 ve NDGA lipooksijenaz inhibitörlerinden bazılarıdır (60).

Aynı zamanda zincir kıran antioksidanlar olarak da adlandırılan RTA'lar, otooksidasyon zincir reaksiyonunu bozmaktadır. Uzun süre petrol türevi ürünlerde otooksidasyonu önlemek için kullanılan bu antioksidanların lipidler gibi biyolojik hidrokarbonlar üzerindeki koruyucu etkisi yeni keşfedilmiştir. Bu sınıf inhibitörler arasında sayılan liproksatinler ve ferrostatinler, ferroptozu etkin bir şekilde inhibe edebilen bileşikler tanımlamak adına yapılan yüksek çıktılı tarama (high-throughput screening) çalışmaları sonucunda bulunmuştur. Başlangıçta etki mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmesine rağmen Ferrostatin-1'in (Fer-1) bir RTA olarak etki ettiği

gösterilmiştir (47). Birinci jenerasyon ferrostatin olarak tanımlanan Fer-1'in, HT1080 hücrelerinde erastin ve RSL3 kaynaklı ferroptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (3). Liproksatin-1'in (Lip-1), GPX4^{-/-} hücrelerde ROS birikimini ve hücre ölümünü engellediği bulunmuştur. Ayrıca, *in vitro* ortamda ferroptoz indükleyiciler (örn: RSL3 ve erastin) ile indüklenen ferroptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (61).

Desferrioksiamin (DFO) gibi demir şelatörlerinin, serbest haldeki Fe^{2+} 'ye bağlanarak fenton reaksiyonlarının oluşumunu önlediği gösterilmiştir.



Şekil 2-6: Ferroptozun indüklenme mekanizması

Sınıf I ferroptoz indükleyiciler SLC3A2 ve SLC7A11'den oluşan sistem Xc-'yi inhibe ederek glutatyon sentezi için gerekli sisteine indirgenecek sistinin hücre içine alımını engellemektedir. Sınıf II indükleyiciler, glutatyonu kofaktör olarak kullanan GPX4 aktivitesini inhibe ederek, hidrojen peroksit, organik hidroperoksitler ve lipid peroksitlerin detoksifikasyonunu engellemektedir. GPX4 aktivitesinin yokluğu ile membrandaki lipidlerin kontrolsüz peroksidasyonu ferroptotik hücre ölümüne yol açmaktadır. Fer-1, Lip-1, Vit E ve demir şelatörleri peroksidasyonu engellemektedir (62).

2.4.3. Ferroptozun Moleküler Temelleri

2.4.3.1. Lipid peroksidasyonu

Lipid hidroperoksitlerinin detoksifikasyonu açısından temel rol oynayan ve RSL3 sınıfı indükleyicilerin direkt hedefi ve erastin sınıfı indükleyicilerin indirekt hedefi olan GPX4 bu işlevleri ile ferroptozun önemli morfolojik olayı olan lipid peroksidasyonu konusunda önem arz etmektedir (3, 50, 63).

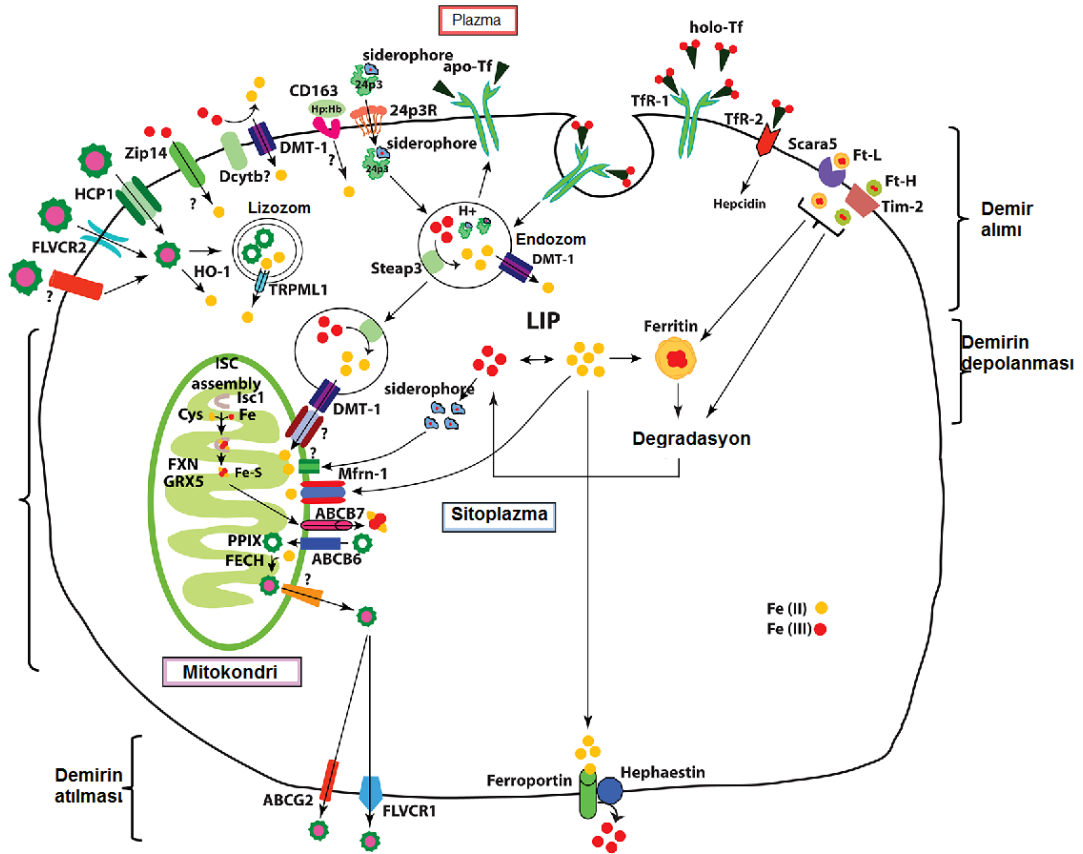
Lipid peroksidasyon döngüsü doymamış yağlardan hidrojen ayrılmasıyla oluşan lipid radikallerini içermektedir (64). Bu lipid radikalleri peroksidede olup lipid peroksil radikallerini oluşturarak diğer doymamış yağlardan hidrojen ayrılmasına neden olmaktadır. Bu döngünün nispeten daha stabil olan son ürünleri dahi hala oldukça reaktif haldedir. Ardından lipid peroksitler, lipid oksil radikalleri ve hidroksi radikallerine ayrıştırılabilmektedir (65).

Lipid peroksidasyonu enzim bağımlı ya da enzimatik olmayan şekilde gerçekleşebilmektedir (66). Ferroptoz sırasında lipid peroksidasyonun hangi yol üzerinden ilerlediği henüz kesin olarak belirlenememiştir. Ferroptoz oluşumunu baskılayan lipofilik antioksidanlar bu kabiliyetlerini lipid radikal ara ürünlerini baskılamalarına ve lipid peroksitlerini direkt olarak hidrojen atom transferi ile lipid alkollerine indirgemelerine borçludur. Bu antioksidanların, GPX4'ün lipid peroksitlerini su ve lipid alkollerine dönüştürerek detoksifiye etmelerine benzer bir mekanizmaya sahip oldukları gösterilmiştir (47).

2.4.3.2. Demir Metabolizması

Ferroptoz oluşumu demire bağımlı bir hücre ölüm şekli olarak tanımlanmaktadır. Vücutta demir seviyeleri, diyetten alınan demir alımı ile korunmaktadır. Bununla birlikte, vücutta fazla demirin atılması için özel bir fizyolojik mekanizma bulunmamaktadır. Bu nedenle ilerleyen yaş ile belirli dokularda demir birikimi meydana gelmektedir. Aşırı demir, Fenton reaksiyonuna sebep olarak ROS üretime yol açmakta ve ferroptoz oluşumuna katkıda bulunmaktadır (52).

Dolaşımdaki demir, transferrine bağlanmış halde ferrik demir (Fe^{3+}) formunda bulunmaktadır. Fe^{3+} , bir membran proteini olan transferrin reseptörü 1 (TFR1) yolu ile hücrelere alınmaktadır. Endozomda lokalize olan Fe^{3+} , STEAP3'ün ferriredüktaz aktivitesi ile ferröz demire (Fe^{2+}) indirgenmektedir. Ardından, aynı zamanda SLC11A2 olarak da adlandırılan DMT1 aracılığıyla, Fe^{2+} , endozom içerisinden sitoplazma içindeki bir kararsız demir havuzuna (LIP) salınmaktadır. Fazla demir, ferritin hafif zinciri (FTL) ve ferritin ağır zinciri 1 (FTH1) içeren bir demir depolama proteini kompleksi olan ferritin içinde depolanmaktadır. Demirin dışarı atılması, SLC11A3 olarak da adlandırılan bir demir akış pompası olan ferroportin aracılığı ile gerçekleşmektedir (Şekil 2-7) (67).



Şekil 2-7: Hücresel demir metabolizması

Hücresel demir metabolizmasında rol oynayan faktörler gösterilmiştir (67).

Ferroptozla dirençli hücreler ile kıyaslandığında, Ras mutasyonlu ferroptozla duyarlı hücrelerde, artmış *TFR1* ve azalmış *FTL* ve *FTH1* ekspresyonu görülmüştür. Bu, artan demir alımının ve düşük demir depolamasının ferroptoz sırasında aşırı demir yüklenmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Demir şelatörleri (örneğin, deferoksamin, desferrioksamin mesilat, siklopiroks olamin) tarafından aşırı demir yüklenmesinin azaltılması, erastin kaynaklı ferroptozu inhibe etmektedir. (3).

IREB2 demir metabolizmasının ana transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. IREB2'nin RNA interferans yöntemi ile baskılanması sonucunda demir metabolizmasıyla ilişkili gen ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı ve bu durumun erastine ile indüklenen ferroptozu azalttığı gösterilmiştir. Bu bilgiler, hücrede ferroptozun indüklenmesi için demirin alınması ve kullanılmasına ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (57).

2.5. Ferroptoz ve Koroner Arter Hastalığı

Aşırı demir yükü ile artan lipid peroksitler ve doku hasarı ateroskleroz ve diyabete yol açabilmektedir (68). Ferroptozun tümör, doku veya organ yaralanması, felç, iskemi-reperfüzyon hasarı ve böbrek dejenerasyonu gibi çeşitli hastalıkların patolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (69).

Fe^{2+} ve Fe^{3+} önemli LDL oksitleyicileri olarak tanımlanmıştır. Ateroskleroz oluşum mekanizmasında, önemli rol oynayan oxLDL'nin, akut MI, USAP ve SAP hastalarının plazma örneklerinde arttığı gözlemlenmiştir (4).

Aterosklerotik plaklarda proinflamatuvar M1 ve antiinflamatuvar M2 makrofajlarının ikisi de bulunmaktadır. M1 makrofajları yüzeylerindeki reseptörler aracılığıyla oxLDL'leri alarak kolesterol ester ile aşırı dolmakta ve köpük hücresi halini almaktadır. Bunun aksine yüzey reseptörü taşımayan M2 makrofajları, düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve kollajen I üretimini indükleyerek plak stabilitesini arttırmaktadır (70). M1 makrofajlarında ferroportin, HO-1 ve CD163 anlatımlarının düşük ve ferritin anlatımının fazla olduğu görülürken bu durumun M2 makrofajlarında tam tersi şekilde olduğu görülmüştür (71).

Yapılan bir çalışmada LIP'in, makrofajlarda, endotel hücrelerinde ve vasküler düz kas hücrelerinde, ROS aracılı LDL oksidasyon/peroksidasyonunu katalize ettiği görülmüştür ve bu durum demir şelatörü eklenmesiyle tersine dönmüştür (72).

Kardiyovasküler bir hastalık geçiren insanlar ile kontroller arasında yapılan bir çalışmada ise, iki grubun da monositlerindeki LIP ölçüldüğünde, hastalarda Fe^{2+} yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmüştür (73).

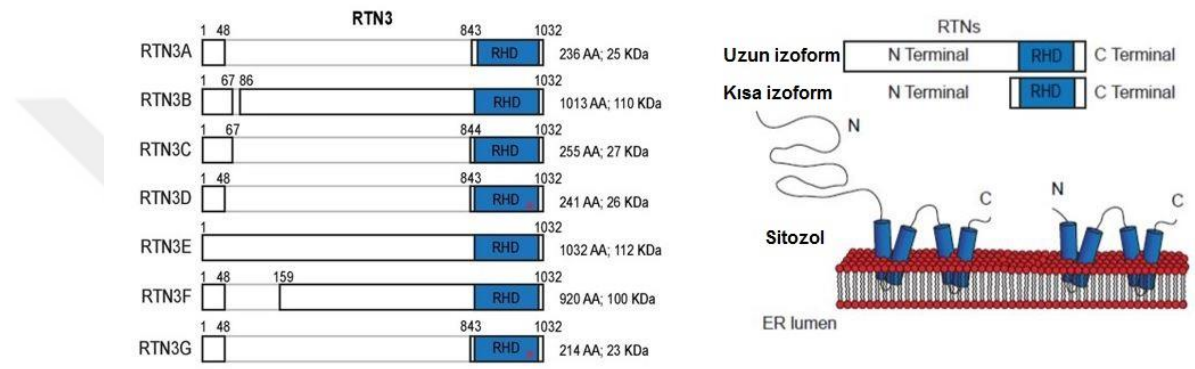
Kardiyomiyositler ve vasküler endotel hücrelerde yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular, ferroptozun bu hücre tiplerinde de belirgin bir hücre ölüm şekli olduğunu göstermektedir (74).

2.6. Ferroptoz ve Koroner Arter Hastalığında Rol Oynayan Aday Genler

Bu çalışmada KAH'da rol oynadığı düşünülen ve ferroptoz mekanizması ile ilişkili genler aday gen olarak seçilmiştir. Hastalık ve ferroptotik hücre ölümünde ortak bir mekanizmada görev alabilecekleri düşünüldüğünden, bu konunun aydınlatılabilmesi adına *RTN3*, *CAT*, *SLC25A1*, *HMOX-1*, *GPX4*, *ACSL4* ve *SLC7A11* genlerinin anlatım düzeylerindeki değişimlerin incelenmesine karar verilmiştir.

2.6.1. Retikülön 3 (RTN3)

Endoplazmik retikulumun (ER) tübüler ağlarını şekillendiren retikülönlar (RTN'ler), her dokuda ekspresyona sahip bir ökaryotik gen ailesidir. 11q13.1'de lokalize olan *RTN3* geninin, en uzun transkriptinin 4.9 kb olduğu ve farklı kırılma izoformlarına sahip olduğu gösterilmiştir. RTN1-4'ten oluşan retikülön ailesi her biri çok sayıda farklı kırılma izoformuna sahip olduğundan kompleks bir yapıdadır (75). Tüm kırılma ürünlerinde ortak olarak retikülön bölgesi ve kısa C-terminal bölgesi görülürken, varyasyonların büyük kısmı N-terminal bölgesinde görülmektedir (75).



Şekil 2-8: RTN3 izoformları

Uzun ve kısa izoformların protein yapısı ve topolojisi şematik olarak gösterilmiştir. (75)

RTN3 ve RTN4 proteinlerinin kaspaz-8'i indükleyerek apoptoza sebep oldukları gösterilmiştir. Bunun yanı sıra birbirleri ile etkileşimlerinin hücre apoptozu ve sağ kalımı üzerindeki etkisinin apoptozla ilişkili hastalıkları etkileyebileceği gösterilmiştir (76). Ayrıca yapılan çalışmalarda RTN4'ün vasküler yeniden düzenlenmede rol oynadığı ve aterosklerozda kilit rol oynuyor olabileceği gösterilmiştir (77).

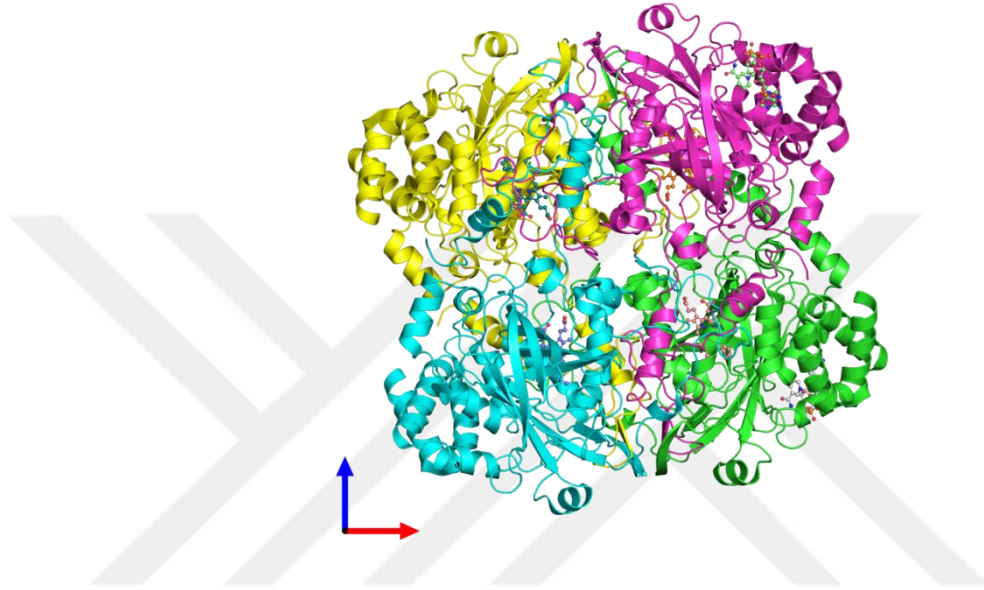
RTN3 ve ateroskleroz ilişkisi üzerine yapılan bir çalışmada, plazma RTN3 düzeylerinin koroner arter hastalarında arttığı ve hastalığın ciddiyeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında aterosklerotik köpük hücre oluşumunda RTN3 anlatım düzeylerinin ve hücre içi lokalizasyonunun değiştiği gösterilmiştir (78).

2.6.2. Katalaz (CAT)

Genomda 11p13'te lokalize olan *CAT* geni, 2.3 kb uzunluğundadır 13 ekzondan oluşur ve katalaz proteinin alt ünitelerini kodlar. Türler arasında oldukça korunan bu gen,

tüm dokularda anlatıma sahip olsa da karaciğer, böbrek ve eritrositlerde yüksek anlatım göstermektedir (79).

Katalaz, kavramsal olarak dört alana bölünebilecek dört alt ünitelerden oluşan tetramer bir yapıya sahiptir. Alternatif kırılma sonucunda farklı protein varyantları oluşabilmektedir (80).



Şekil 2-9: Katalazın kristal yapısı

Katalaz enzimine ait kristal yapı gösterilmiştir. Farklı renkler tetrameri oluşturan dört alt üniteyi göstermektedir (81).

Oksidatif strese karşı savunmada kilit bir antioksidan enzim olan katalaz, neredeyse tüm aerobik hücrelerin peroksizomunda bulunan bir heme enzimidir. Katalaz, hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürerek hidrojen peroksitin toksik etkilerini azaltmaktadır. Aksi takdirde oluşan oksidatif stres, diyabet, astım, Alzheimer hastalığı, sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit ve pek çok kanser çeşidi gibi birçok kronik veya geç başlangıçlı hastalıkların gelişiminde rol oynamaktadır (82).

ApoE^{-/-} fareler kullanılarak yapılan bir çalışmada katalazın aşırı gen anlatımının olması durumunda ateroskleroz ilerlemesinin yavaşladığı gösterilmiştir (82). Bir diğer çalışmada, katalazın aşırı gen anlatımıyla, vasküler hücrelerin oksitlenmiş lipidlere tepkilerinin azaldığı gösterilmiştir (83). Tüm bu bilgiler hidrojen peroksitin,

aterosklerozun patogenezinde, lipid peroksidasyonunu indükleyerek ve vasküler hücrelerin oksitlenmiş lipidlere duyarlılığını artırarak etkili olduğunu göstermektedir.

2.6.3. Solute Carrier Family 25 Member 1 (*SLC25A1*)

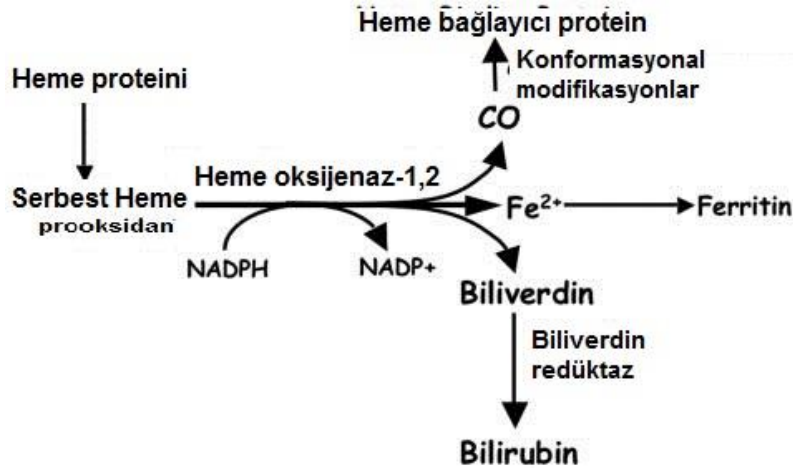
İnsan genomunda 22q11.21'de lokalize olan *SLC25A1* geni 10 ekzondan oluşmakta ve çözünen taşıyıcı proteinlerin bir mitokondriyal taşıyıcı alt ailesi üyesi olan mitokondriyal sitrat taşıyıcısı (CIC) kodlamaktadır.

Aynı zamanda CIC olarak da adlandırılan *SLC25A1*, yağ asidi ve sterol biyosentezi, glukoneogenez ve glikolizde görev almaktadır. Mitokondride, *SLC25A1*, mitokondriyal sitrat/izositratın, sitozolik malat ile değiştirilmesine aracılık etmektedir (84). Ayrıca, sitosolik izositrat dehidrojenaz 1 (IDH1) ve mitokondriyal izositrat dehidrojenaz 2 (IDH2) ile birlikte *SLC25A1* mitokondriyal membran üzerindeki indirgeyici karboksilasyondan elde edilen NADPH'ın taşınmasında rol oynamaktadır ve bu sebeple glutatyon rejenerasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (85). Ayrıca, yapılan çalışmalarda kromozom bütünlüğünün korunmasında ve otofajinin düzenlenmesinde de rol oynayabileceği öne sürülmüştür (86, 87).

SLC25A1'in sitratı sitoplazmaya taşıma görevinin, makrofaj aktivasyonunda sitokin ile indüklenen inflamasyon sinyalleri aracılığı ve NADPH redoks durumunun korunması ile temel rol oynadığı gösterilmiştir (88, 89).

2.6.4. Heme Oksijenaz 1 (*HMOX1*)

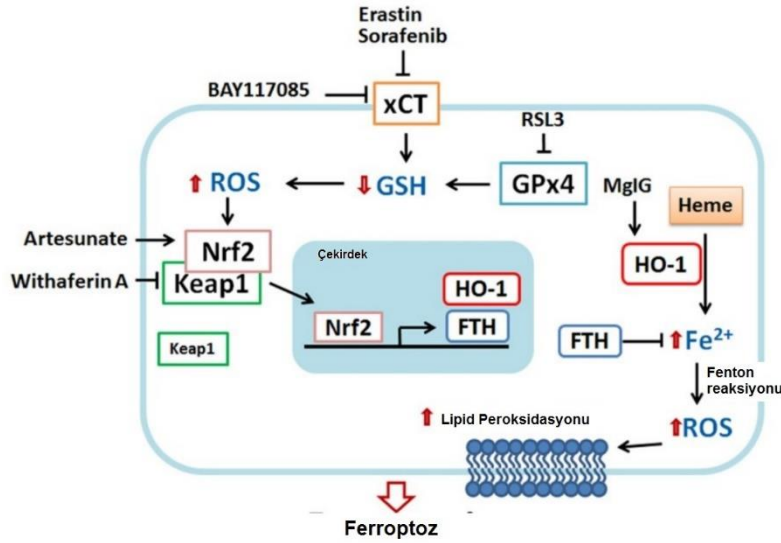
Genomda 22q12.3'te lokalize olan ve 5 ekzondan oluşan *HMOX1* geni heme oksijenaz-1 enzimini kodlamaktadır. Heme oksijenaz-1 (*HMOX1*), hemeyi metabolize ederek karbon monoksit (CO), biliverdin ve Fe^{2+} üretmektedir. Biliverdin daha sonra biliverdin redüktaz ile bilirubine metabolize edilmektedir (92).



Şekil 2-10: Heme oksijenaz enzim reaksiyonunun şematik gösterimi

HMOX1, 2 serbest hemeyi Fe^{2+} , karbon monoksit ve biliverdine dönüştürmektedir. Biliverdin daha sonra bilverdin redüktaz aracılığıyla bilirubine ve karbon monoksit konformasyonel modifikasyonlar ile heme-bağlayıcı proteine çevirilmektedir. Oluşan Fe^{2+} daha sonra ferritine bağlanmaktadır (93).

HMOX1, ferroptozda, pro-ferroptotik ve anti-ferroptotik etkilerle ikili bir rol oynamaktadır. Erastin ve RSL3, ROS oluşumuna yol açarak oksidatif strese yol açmaktadır. Bu duruma cevap olarak nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1'den (Keap1) ayrılmakta ve daha sonra çekirdekte HO-1 ve ferritin gibi proteinlerin genlerini hedefleyen antioksidan-cevap elementi (ARE) bölgesine bağlanmaktadır (94).



Şekil 2-11: Ferroptoz mekanizmasında HMOX1'in rolü

HMOX1 hemeyi metabolize etmesi sonucu ortaya çıkan Fe^{2+} fenton reaksiyonları ile ROS oluşumuna ve lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Erastin sınıfı indükleyiciler ile sistem Xc-'nin inhibisyonu sonucunda ve Fenton reaksiyonları ile artan ROS, Nrf2'nin ve Keap'ten ayrılarak aktive olmasına sebep olmaktadır. Nrf2 hedefinde bulunan *HO-1* ve *FTH*'nin anlatımını arttırmaktadır (95).

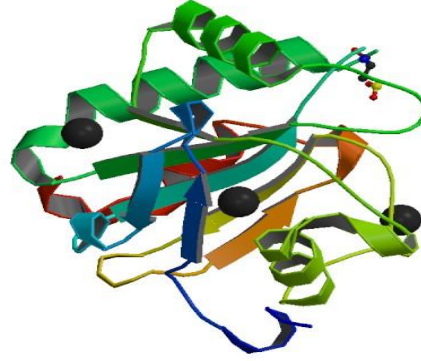
HMOX1 aktivitesi sonucunda oluşan Fe^{2+} , pro-oksidan olarak oldukça reaktif olduğundan hücre içinde ROS'un artmasına sebep olmaktadır. Aksine, HMOX1'in aktivasyonu bir hücrenin korunmasına neden olabilmektedir. Nrf2, ROS oluşumunu azaltmak adına ferritin ekspresyonunu indüklemektedir ve böylece demir toksisitesini nötralize etmektedir (95).

2.6.5. Glutasyon peroksidaz 4 (GPX4)

Yedi ekzondan oluşan *GPX4* geni genomda 19p13.3'de lokalizedir ve bir glutasyon peroksidaz aile üyesi olan GPX4'ü kodlamaktadır. Glutasyon peroksidaz ailesi hidrojen peroksitin, organik hidroperoksitlerin ve lipid hidroperoksitlerin indirgenmesini katalize ederek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır (96).

GPX ailesi, GPX 1-8 olmak üzere çeşitli üyelerden oluşmaktadır. GPX1, 2, 3, 4 ve 6, aktif bölgelerinde selenosistein bulunduran selenoproteinler iken, aktif bölgesinde sistein taşıyan GPX5, 7 ve 8'in glutasyon peroksidaz aktivitesinin çok düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca *GPX3* plazmada bulunurken, *GPX2* gastrointestinal kanalda ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra, *GPX1* ve *GPX4* tüm dokularda anlatım göstermektedir (97). Tek bir genden kodlanan üç farklı GPX4 bulunmaktadır. Üç GPx4 tipi arasında, mitokondri, nükleoli, sitozol ve çekirdek gibi farklı organellere taşınmak için sinyal

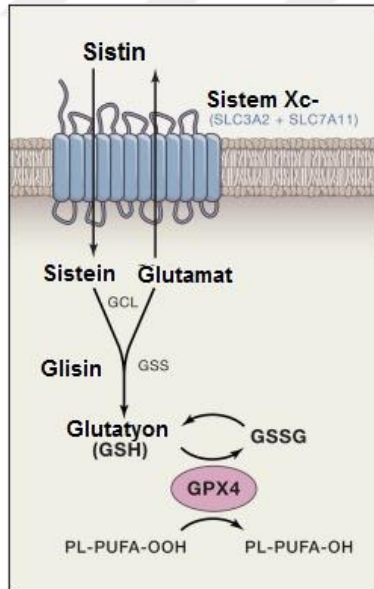
dizisini içeren N-terminal dizisinde farklılık gözlemlenirken, enzimatik aktif bölgeyi içeren C terminali tarafında kalan amino asit dizisi tüm tiplerde korunmuştur (98).



Şekil 2-12: GPX4 proteininin yapısı

GPX4'e ait 3 boyutlu protein yapısı gösterilmiştir (99).

GPX4 indirgenmiş glutatyonu, okside glutatona (GSSG) dönüştürürken lipid hidroperoksitleri karşılık gelen alkollere veya serbest hidrojen peroksiti suya indirgemektedir (52).



Şekil 2-13: Sistem Xc- ve GPX4 ilişkisi

SLC3A2 ve SLC7A11'in oluşturduğu sistem Xc- bir sistin glutamat antiporteridir, hücre içine sistin alımını sağlarken glutamati hücre dışına atmaktadır. Alınan sistinin sistine dönüştürülmesinin ardından glisin ve glutamat ile beraber bir tripeptit olan glutatyonu oluşturmaktadır. Lipid hidroperoksitleri indirgeyerek detoksifiye eden GPX4 enzimi, glutatyonu kofaktör olarak kullanmaktadır (69).

GPX4, amino asit sekansının tanımlanması ve RSL3 ile afinite saflaştırması ile RSL3'ün hedef proteini olarak tanımlanmıştır. RSL3, elektrofilik kloroasetamid içermektedir ve GPX4'ün aktif bölgesi olan selenosistein ile kovalent olarak etkileşime girerek enzimatik aktivitesini inhibe etmektedir (50, 100). *GPX4* aşırı ekspresyonunun, RSL3 ile indüklenen ferroptozu baskıladığı ve *GPX4*'ün *knockdown* olduğu durumda, RSL3 ile indüklenen ferroptozu duyarlılığın arttığı gösterilmiştir. Bu durum GPX4'ün aktivitesinin inhibe edilmesinin ferroptoz ile hücre ölümüne katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu nedenle, GPX4'ün erastin ve RSL3 tarafından indüklenen ferroptozda anahtar bir regülatör görevinde olduğu düşünülmektedir (101).

ApoE-/- farelerde GPX4'ün ateroskleroz üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan bir çalışmada, GPX4'ün aşırı ekspresyonunun, lipid peroksidasyonunu azaltarak ve vasküler hücrelerin okside olmuş lipidlere duyarlılığını inhibe ederek ateroskleroz gelişimini engellediği bulunmuştur (102).

2.6.6. Uzun Zincirli Açıl-CoA Sentetaz 4 (ACSL4)

ACSL4 geni 17 ekzondan oluşup genomda Xq23'te lokalizedir ve bir uzun zincirli açıl-CoA sentetaz enzimi olan *ACSL4*'ü kodlamaktadır. Memelilerde, uzun zincirli açıl-CoA sentetazları (ACSL), yağ asidi degradasyonu, fosfolipid yeniden düzenlenmesi ve çeşitli fizyolojik süreçleri düzenleyen uzun açıl-CoA esterlerinin üretimi için gerekmektedir. Açıl-CoA sentetazları, tercih ettikleri açıl gruplarının zincir uzunluğuna bağlı olarak beş alt aileye ayrılmaktadır. Bu aileler açıl-CoA sentetaz kısa zincirli (ACSS), orta zincirli (ACSM), uzun zincirli (ACSL), bubblegum (ACSBG), çok uzun zincirli, (SLC27A) olarak tanımlanmaktadır (103). *ACSL*'ler, 1, 3, 4, 5 ve 6'dan oluşmaktadır ve hepsi birçok farklı transkript varyantı içermektedir. *ACSL*'ler doku dağılımı, hücre altı lokalizasyonu, yağ asidi tercihi, farmakolojik inhibitörlere cevap verme ve transkripsiyonel regülasyon yönleriyle birbirlerinden farklılık göstermektedir (104). *ACSL4* iki farklı kırılma varyantına sahiptir. *ACSL4* arakidonik asidi (AA) açillemektedir ve lizofosfatidilkolin açiltransferaz 3 (LPCAT3) açillenmiş AA'yı membran fosfolipidlerine katalize etmektedir. Bu nedenle, *ACSL4* ve *LPCAT3*'ün inhibe edilmesi membrandaki bazı yağ asitlerinin oksitlenmesini azaltabilmektedir.

ROS, lipid membranlardaki çoklu doymamış yağ asitleri ile (PUFA) reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu indükleyebilmektedir. *LPCAT3* ve *ACSL4*'ün, RSL3 ve DPI7 ile indüklenen ferroptozu arttırdığı belirlenmiştir (105). Yapılan bir çalışmada

ACSL4'ün *knockdown* olmasının HEPG2 ve HeLa hücrelerinde ferroptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca *ACSL4* anlatımının bulunmadığı ve ferroptozu dirençli LNCaP ve K562 hücrelerinde, *ACSL4* aşırı ekspresyonunun ferroptozu indüklediği gösterilmiştir (106).

2.6.7. Solute Carrier Family 7 Member 11 (*SLC7A11*)

Genomda 4q28'de lokalize olan *SLC7A11* geni, sistein ve glutamata spesifik olan heteromerik, sodyumdan bağımsız, aniyonik bir amino asit taşıma sisteminin (sistem Xc-) bir üyesini kodlamaktadır. Bu taşıyıcı sistem, 1:1 oranında hücre içi glutamat karşılığında hücre dışı sistini hücre içine almaktadır (107). Sistem Xc- hafif zincir alt ünitesi olan *SLC7A11* ve ağır zincir alt ünitesi olan *SLC3A2*'den oluşmaktadır. Sistem xc-, hücrelerde majör bir antioksidan olan glutatyonun biyosentezi için sistein sağlamada merkezi bir rol oynamaktadır. Sistin bazı doku ve hücre hatlarında trans sülfürasyon yolağı ile homosistein ve serinden sentezlense de çoğu hücre gerekli olan sistini, Sistem Xc aracılığıyla almaktadır (108). Ekstrasellüler ortamın yükseltgen koşulları sebebiyle sistein hücre dışında iki sistein molekülünden oluşan sistin halinde bulunmaktadır. Hücre içine alındığında koşulların indirgen olması sebebiyle, sistin sisteine indirgenmektedir. Sistein glutatyon sentezi açısından büyük önem arz etmektedir. Glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptit olan glutatyon, GPX4 gibi ROS detoksifiye edici enzimlere kofaktör olarak görev yapmaktadır (Şekil 2-13).

Yapılan çalışmalar sonucunda, *SLC7A11* ekspresyonunun elektrofilik ajanlar ve diğer hücresel stresler tarafından indüklenmesinin, Nrf2'nin *SLC7A11* promotöründe bulunan ARE bölgelerine bağlanması sonucu olduğu gösterilmiştir (109). Bu bilgiler Nrf2'nin aşırı ekspresyonunun, diğer antioksidan hedef genleri arasında *SLC7A11*'in de ekspresyonunu arttırdığı ve artan glutatyon sentezine yol açtığını gösterilmiştir (110).

Sistin yokluğu veya erastin gibi ilaçlar tarafından *SLC7A11* aracılı sistin alımının farmakolojik olarak inhibe edilmesi, hücre içi glutatyonun tükenmesine neden olarak ferroptotik hücre ölümüne yol açmaktadır. Ayrıca, *SLC7A11* ekspresyonunun gen transfeksiyonu ile arttırılmasının, erastin ile indüklenen ferroptozu azalttığı gösterilmiştir (69, 3).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışma Grubu Seçimi

Bu çalışmada daha önce “Koroner Arter Hastalığı Ciddiyetinde Genetik Biobelirteçlerin Tanımlanması ve Fonksiyonel Analizleri” başlıklı proje için toplanmış olan örnekler kullanılmıştır. Aterosklerotik KAH vakalarının kan örnekleri ile normal kontrollere ait kan örnekleri T.C. Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı’ndan sağlanmıştır. Aterosklerotik KAH’ın Gensini ve SYNTAX skorları hesaplanıp derecelendirilmiş ve anjiyografik yaygınlık ve ciddiyeti belirlenmiştir. Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak, anjiyografide koroner arter lümeninde %70 ya da daha fazla darlık yaratan bir aterosklerotik plak saptanması halinde kişide KAH bulunduğu kabul edilerek hasta grubuna, %20 ya da daha az darlık olması durumunda birey kontrol grubuna dahil edilmiştir. Çalışma grubu oluştururken antidiyabetik ilaç kullanan ve HbA1c oranı 6’dan yüksek olan bireyler dışlanmıştır. Çalışmamız, bu kriterler dikkate alınarak belirlenen 8 koroner arter hastası ve buna uygun olarak seçilen 14 kişilik koroner arter hastası olmayan iki gruptan oluşmuştur. Çalışma öncesinde İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu’ndan gerekli izin alınmış ve çalışmaya katılan bireylerin tamamı bilgilendirilmiş gönüllü onay formunu imzalamıştır.

Çalışmaya katılan kişilerden araştırma esnasında kullanılmak üzere 10 ml’lik PAX RNA kan tüplerine alınan periferik kan örneklerinden RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA örneklerinin kalite ve miktarının belirlenmesi için Nanodrop2000 (Thermo Fischer, ABD) cihazı kullanılmıştır. Örnekler cDNA sentezine kadar geçen sürede -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Hücre Soyu

Bu çalışma kapsamında, ferroptoz mekanizması aktivasyonu ve KAH ile ilişkili yolaklardaki gen anlatım değişikliklerinin değerlendirilmesi için HEPG2 (ATCC® HB-8065™) hücre soyu kullanılmıştır. Bu hücre hattı Doç. Dr. Sema Sırma Ekmekçi’den temin edilmiştir.

3.1.3. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar tablo 3-1’de listelenmiştir.

Tablo 3-1: Kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Markası	Katalog Numarası
Antibiyotik-Antimikotik	Invitrogen	15240062
Dimetil Sülfoksit	Sigma	472301
EMEM	Wisent	320-006-CL
Etanol	Merck	8187601000
Fetal Bovin Serum	Capricorn	FBS-HI-11B
İzopropanol	Merck	1096341000
Phosphate Buffered Saline	Wisent	311-010-CL
Hanks Balanced Salt Solution	Wisent	311-513-CL
Erastin	Sigma	E7781
Ferostatin-1	Sigma	SML0583
BODIPY™ 581/591 C11	Invitrogen	D3861
Trypsin-EDTA	Wisent	325-542-EL

3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

3.1.4.1. Hücre kültüründe kullanılan medyum ve solüsyonlar

HEPG2 Kültür Medyumu

HEPG2 hücrelerinin inkübasyonunu sağlandığı kültür medyumu, Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) içerisine %10 Fetal Bovine Serum ve 1x penisilin (100IU/ml) streptomisin (100U/ml) eklenerek hazırlanmıştır.

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Mg²⁺ ve Ca²⁺ içermeyen, kullanıma hazır ve +4°C’de saklanan çözelti hücrelerin sayımında ve hücrelerin pasajlama öncesi yıkamada kullanılmıştır.

HEPG2 Hücre Dondurma Medyumları

Medyum 1: %40 Fetal bovin serum, %60 EMEM içerecek şekilde gerekli miktarda hazırlanmıştır.

Medyum 2: %40 Fetal bovin serum, %20 DMSO ve %40 EMEM içerecek şekilde gerekli miktarda hazırlanmıştır.

Tripsin -EDTA Solüsyonu

Donuk halde teslim alınan solüsyon 10 ml’lik alikotlara bölünerek kullanıma kadar -20°C’de saklanmıştır.

100x Penisilin Streptomisin Solüsyonu

Kuru buz içerisinde donuk halde teslim alınan solüsyon 5 ml şeklinde alikotlanıp, kullanıma kadar -20°C’de saklanmıştır.

Ferroptoz Aktivatörü ve İnhibitörü

Liyofilize halde teslim alınan kimyasallar tablo 3-2’de gösterildiği şekilde hazırlanıp, alikotlanarak kullanıma kadar -80°C’de saklanmıştır.

Tablo 3-2: Ferroptoz aktivatör ve inhibitörlerinin stok solüsyonlarının hazırlanması

Madde	Marka	Katalog No.	Moleküler Ağırlık	Ana Stok (-80°C)	
				Hazırlama	Konsantrasyon
Erastin	Sigma	E7781	547,04	0,914 ml DMSO	10 mM
Ferrostatin-1	Sigma	SML0583	262,35	1,905 ml DMSO	10 mM

3.1.5. Kullanılan Kitler

Çalışmalar sırasında kullanılan kitler, markaları ve içerikleri tablo 3-3'te verilmiştir.

Tablo 3-3: Kullanılan kitler ve içerikleri

Kit Adı	Markası	Kit İçeriği
RNA İzolasyon Kiti (High Pure RNA Isolation Kit)	ROCHE	Lysis/-Binding Buffer
		Dnase I, recombinant, lyophilized
		Dnase Incubation Buffer
		Wash Buffer I
		Wash Buffer II
		Elution Buffer
Hücre Sayım Kiti (Vi-Cell Single Pack)	BECKMAN COULTER	Vi-Cell Single Pack
cDNA Sentez Kiti (iScript™ cDNA Synthesis Kit)	BIO-RAD	Revers Transkriptaz
		Revers Transkripsiyon Tamponu, 5X
		PZR için H ₂ O
Ekspresyon Analiz Kiti (iTaQ™ Universal SYBR® Green Supermix)	BIO-RAD	2x qPCR mix (dNTP, iTaq DNA Polimeraz, MgCl ₂ , SYBR® Green I)

3.1.6. Kullanılan Cihazlar

Bu tez projesi sırasında yapılan deneylerde kullanılan cihazlar tablo 3-4'te verilmiştir.

Tablo 3-4: Kullanılan cihazlar

Cihaz	Markası
CO ₂ 'li inkübatör	Eppendorf
Su banyosu	Thermo Scientific
Laminar akışlı steril kabin	Thermo Scientific
Mikropipetler	Eppendorf, Axygen
Real-Time PZR	Roche, LightCycler 480
Pipetör	Axygen
Buzdolabı	-20°C Vestel, -80°C Thermo, +4°C Beko
Buz makinası	Cornelius
Masaüstü santrifüj	Denville Scientific
Soğutmalı santrifüj	Thermo Scientific
Spektrofotometre	Thermo Scientific NanoDrop
Vorteks	Biosan VFL-2400L

3.2. Yöntemler

Bu çalışmada HEPG2 (ATCC® HB-8065™) hücre soyu kullanılmıştır ve deneyler DETAE Genetik Anabilim Dalı, Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. HEPG2 Hücre Soyu

HEPG2 hücre soyu 15 yaşında hepatoasellüler karsinom hastası bireyin karaciğerinden elde edilmiştir. Işık mikroskopunda 12-16 µm boyutunda, köşeli ve genellikle birbirine tutunmuş halde görülmektedir. Adheziv yapıda olan bu hücreler %10 FBS ve %1 antibiyotik-antimikotik eklenmiş EMEM ile 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.

3.2.2. HEPG2 Hücre Kültürü

Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı azot tankında kriyotüplerde saklanan hücreler çıkarıldıktan hemen sonra 37°C'deki su banyosunda buz yapısı tamamen çözünene kadar tutularak çözülmüştür. Ardından çözünen hücreler hemen 15 ml'lik falkona artarılmış ve üzerine damla damla 4 ml kültür medyumu eklenmiştir. Sonrasında 15 ml'lik falkona 1500 rpm'de 6 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üst faz tamamen uzaklaştırılmış ve üzerine 3 ml yeni kültür medyumu eklenerek hücreler pipetleme ile çözülmüştür. İçerisinde 37°C kültür medyumu konulmuş T-25 flaska hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.

Hücre Kültürü ve Takibi

İnkübe edilen hücreler her gün invers ışık mikroskopunda hücre yoğunluğu ve morfolojisi açısından incelenmiştir. Kültür medyumu gün aşırı değiştirilmiştir.

Hücrelerin Pasajlanması

Hücre yoğunluğu %70'e ulaştığında hücreler pasajlanmıştır. Bu işlem için öncelikle hücrelerin sayısı ve canlılık oranının Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda bulunan Vi-Cell XR (Beckman Coulter, ABD) cihazı ile belirlenmesi gerekmektedir. Bu sebeple adheziv yapıdaki HEPG2 hücrelerinin öncelikle medyumu atılmıştır. Ardından hücreler Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen 1X PBS ile iki kez yıkanmıştır. PBS tamamen uzaklaştırıldıktan sonra Trypsin-EDTA solüsyonu flaskın her yerine gelecek şekilde damla damla

eklenmiştir. Ardından flask inkübatörde 9-11 dk bekletilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı için ışık mikroskobu ile teyit edilmesinin ardından Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar kültür medyumunu eklenerek enzimin inhibisyonu sağlanmıştır. Hücreler 15 ml'lik bir falkona alınarak 1500 rpm'de 6 dk santrifüjlenmiştir. Üst fazın tamamen atılmasının ardından hücreler yeni kültür medyumunda yavaş pipetleme işlemiyle homojenize edilmiştir. Ardından bu hücre çözeltisinden 100 µl alınarak cihazın sayım tüpüne konulmuş ve 400 µl 1X PBS ile karıştırılmıştır. Cihaz ile sayım işleminin ardından 1:3 şeklinde pasajlama yapılmıştır.

Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere saklanılacak hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra üst faz uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler gereçler kısmında tarif edilen dondurma medyumunu 1 ile çözülmüş ve üzerine damla damla eklenen dondurma medyumunu 2 ile pipetleme işlemi yapılarak karıştırılmıştır. İki medyundan eşit miktarda toplamda 1 ml olacak şekilde homojenize edilen hücreler 2 ml'lik kriyotüplere alınıp -1°C/dk sağlayan soğutma kabına konulmuştur. Gece boyu bu kabın içinde -80°C'de bekleyen hücreler sonraki gün sıvı azot tankına kaldırılmıştır.

Hücre Sayısının Hemositometre ile Belirlenmesi

Hücrelerin tripsin ile yüzeyden kaldırılmasının ardından 1500 rpm'de 6 dk santrifüj ile hücreler çöktürülmüştür. Tripsin ve kültür medyumundan oluşan üst fazın atılmasının ardından hücreler 200 µl kültür medyumunda homojen hale getirilmiştir. Hücre çözeltisinden 10 µl alınarak 10 µl Trypan Blue ile karıştırılmıştır. Ardından hemositometre üzerine aktarılan karışım invers ışık mikroskobu altında incelenmiştir. 4 köşe karedeki toplam hücre sayılmıştır. Hücre yoğunluğu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Yoğunluğu} = \frac{\text{Köşe karedeki ortalama hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü}}{\text{Karenin Hacmi (ml)}}$$

Köşelerdeki karelerin hacmi kullanılan hemositometrede 0.0001 ml'dir ve 1:2 olarak hazırlanan hücre çözeltisi sebebiyle dilüsyon faktörü 2 olarak belirlenmiştir. Bu formül kullanılarak mililitredeki hücre sayısı bulunmaktadır.

3.2.3. HEPG2 Hücrelerinde Ferroptoz Olayının İndüklenmesi

3.2.3.1. Optimum Erastin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

12-kuyulu petrilere her kuyuda 50.000 hücre olacak şekilde HEPG2 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklendikten sonra çeşitli konsantrasyonlarda erastin denemesi yapılmıştır. 12-kuyulu petrilere ekilmiş 50.000 hücreye 10, 15, 20, 25, 35 ve 50 μ M erastin ve negatif kontrol için 1, 1.5, 2 ve 2.5 μ l DMSO eklenerek 24 saat 37°C'de %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin Vi-Cell cihazı ve hemositometre ile sayımı gerçekleştirilmiş ve erastin eklenen koşulların DMSO eklenen koşullara göre ve sadece kültür medyumuna eklenen koşullara göre rölatif canlılık oranları belirlenmiştir. Tüm koşullar ikili olarak çalışılmıştır.

3.2.3.2. Ferroptozun İnhibe Edilmesi

12-kuyulu petrilere her kuyuda 50.000 hücre olacak şekilde HEPG2 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklenip ışık mikroskobu ile kontrolünün ardından erastin ve erastin ile Fer-1 içeren koşullar oluşturulmuştur. Kuyulara 25, 35 μ M erastin, 25, 35 μ M erastin ile 2, 2,5 μ M Fer-1 ve 2,5 μ l DMSO eklenmiştir. 24 saat 37°C'de %5 CO₂'de inkübe edilmiş ve hücrelerin hemositometre ile sayımı gerçekleştirilmiştir. Koşulların canlılık oranları yalnızca DMSO içeren koşula göre rölatif olarak hesaplanmıştır. Tüm koşullar üçlü çalışılmıştır.

3.2.4. Lipid Peroksidasyonunun Ölçülmesi

Bu çalışmada lipid peroksidasyonunun ölçümü BODIPY® 581/591 C11 (Invitrogen, ABD) spesifik floresan özelliklerine sahip bir yağ asidi analogu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu madde 488 nm dalga boyunda mavi ışıkla uyarıldığında, molekül maksimum 595 nm'de bir yapısal floresan emisyonuna sahiptir. Oksil radikal kaynaklı oksidasyona uğradığında, floresan emisyonu 520 nm'de maksimum emisyon ile daha kısa dalga boylarına kaymaktadır (111). Sahip olduğu lipofilik özellikler ile moleküller kolayca lipid çift katmanına girer ve hücre zarının içine girdiğinde, endojen yağ asitleri ile beraber boyanın poli-doymamış bütadienil kısmı, oksil radikalleri tarafından oksidasyona uğramaktadır. BODIPY® 581/591 undekanoik asit, hücrelerdeki ve membranlardaki ROS'u tespit etmek için kullanılmaktadır (112).

6-kuyulu petrilere her kuyuda 100.000 hücre olacak şekilde HEPG2 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Erastin ve erastin ile Fer-1 içeren koşulların oluşturulmasının ardından

hücreler 20 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Kuyulardaki kültür medyumunun uzaklaştırılmasının ardından hücreler tripsin ile petri yüzeyinden kaldırılmış ve tüplere aktarılmıştır. 1500 rpm'de 6 dk santrifüj ile dibe çöktürülen hücrelerin üst fazı atılmıştır. Ardından 500 µl HBSS içerisinde çözülen hücreler akan hücre ölçer cihazına uygun tüplere aktarılmıştır. HBSS ile yıkanan hücreler tekrar 1500 rpm'de 6 dk santrifüj edilmiştir ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Ardından hücre pelleti 2.5 µM BODIPY 581/591 C11 içeren HBSS ile homojenize edilmiş ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 30 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında, DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı'nda bulunan BD FACSCalibur™ akan hücre ölçer cihazında FL1 kanalında ölçümler yapılmıştır. Her koşul üçlü olarak çalışılmıştır.

3.2.5. HEPG2 Hücrelerinden RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için çeşitli şartlar altında 24 saat inkübe edilmiş hücreler tripsin ile petri yüzeyinden kaldırılmış ve PBS ile yapılan yıkama sonrasında 200 µl PBS içerisinde çözülmüştür. RNA izolasyon kiti (*Roche, High Pure RNA Isolation Kit*) kullanılarak aşağıdaki adımlar ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sırasında kullanılacak tüm cihazlar RNazdan arındırılmıştır ve kullanılan hiçbir malzeme RNaz içermemektedir. Tüm adımlar her örnek için tekrarlanmıştır.

1. 400 µl Lysis/Binding Buffer eklenerek 15 saniye vorteks yapılmıştır.
2. Örnekler filtreli kolonlara aktarılmıştır ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüj sonrasında toplama tüpündeki sıvı atılmıştır.
4. 10 µl DNaz 90 µl Dnaz inkübasyon buffer ile karıştırılmıştır ve filtreli kolona eklenmiştir. Örnek oda ısısında 15 dakika inkübe edilmiştir.
5. Ardından, filtreli kolona 500 µl Wash Buffer I eklenmiş ve 8000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
6. Toplama tüpündeki sıvının uzaklaştırılmasının ardından 500 µl Wash Buffer II eklenmiş ve tekrar 8000 g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
7. Toplama tüpündeki sıvının uzaklaştırılmasının ardından 200 µl Wash Buffer II eklenmiş ve 14000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.

8. Toplama tüpündeki sıvının uzaklaştırılmasının ardından filtreli kolonda kalan alkolün uzaklaştırılması için bir kez daha 14000 g'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır.
9. Kolon yeni bir 1,5 ml'lik tüp üzerine alınarak içindeki filtrenin üzerine 30 µl Elution Buffer eklenmiş, 2 dakika inkübe edilmiş ve ardından 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Santrifüjün ardından tüpler buz üzerine alınmış ve spektrofotometrik ölçümler ile kalite ve miktar tayini Nanodrop2000 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Ardından RNA'lar cDNA sentezinde kullanılabilecek kadar -80°C saklanmıştır.

3.2.6. RNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen total RNA örneklerinin kalite ve miktarının belirlenmesi için Nanodrop2000 (Thermo Fischer, ABD) cihazı kullanılmıştır. RNA örneğinden 1 µl'nin cihaza yüklenmesi ile cihaz 230, 260 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik okumalar yapmaktadır. RNA örneklerinde 260/280nm oranının 1,9-2,0 arasında olması gerekmektedir.

3.2.7. Total RNA'dan cDNA sentezi

Hücre kültürü çalışmalarında HEPG2 hücrelerinden ve ayrıca hasta grubu ve kontrol grubundan elde edilen RNA örneklerinden cDNA Sentez kiti (*iScript™ cDNA Synthesis Kit*) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon miksi ve koşulları tablo 3-5'te gösterildiği şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3-5: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon miksi ve uygulanan koşullar

Reaksiyon içeriği	Miktarı	
Revers Transkriptaz	1 µl	
Revers Transkripsiyon Tamponu, 5X	4 µl	
PZR için H ₂ O	5 µl	
RNA (30 ng/µl)	10 µl	
Reaksiyon Koşulları		
Primer Bağlanması	25 °C	5 dakika
Ters Transkripsiyon	42 °C	30 dakika
Ters Transkriptaz İnaktivasyonu	85 °C	5 dakika
Soğutma	4 °C	10 dakika

3.2.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR

Çalışmada, sentezlenen hasta kontrol grubu ve hücre kültürü cDNA örnekleri kullanılarak Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) yöntemi ile seçilen hedef genlerin ekspresyon düzeyleri rölatif olarak kıyaslanmıştır. Bunun için seçilen hedef genlere özgü primerler tasarlanmıştır.

Primer Tasarlanması

Primerler seçilen genler için 19-25 baz uzunluğunda tek zincirli ve %50 GC içerecek şekilde tasarlanmıştır. T_m dereceleri 58-65°C arasında olacak şekilde dizayn edilen forward ve revers primerlerin T_m sıcaklıkları arasındaki fark 1-2°C'dir. Primerlerin genom üzerinde bağlanabilecek tüm hedefleri kontrol edilmiştir. Hedef ve kontrol genlere ait dizayn edilen primer dizileri tablo 3-6'da verilmiştir.

Tablo 3-6: qRT-PZR’de kullanılan primer dizileri

Gen	Tm	Primer Dizisi
<i>RTN3</i>	65°C	F-GGCCCTGAAACTCATTATTCG R-TCCGTAAAAACAGCACCAA
<i>SLC25A1</i>	65°C	F-ATTGTGCGGGAACAAGGGCTG R-CTTGTTGGGGTTGTCCCCTCG
<i>GPX4</i>	60°C	F-TGCATCGTCACCAACGTGGC R-CTTCACCACGCAGCCGTTCT
<i>HO-1</i>	65°C	F-GACTCCCGCAGTCAGGCAGA R-CGTGAGGGGCTCTGGTCCTT
<i>SLC7A11</i>	60°C	F-TCTCCAAAGGAGGTTACCTGC R-AGACTCCCCTCAGTAAAGTGAC
<i>MBLN2</i>	65°C	F-GCCCATCCACCAAGAGTTT R-TTGCAGTTCTCTCGGGTACA
<i>ACSL4</i>	60°C	F-CATCCCTGGAGCAGATACTCT R-TCACTTAGGATTTCCTGGTCC
<i>CAT</i>	65°C	F-GCTCATTTTGACCGAGAGAGA R-TGACCTCAAAGTAGCCAAAGG
<i>ELOVL5</i>	65°C	F-GCATTGCTAGGCCCTCGAGATA R-TGATTCTCCTGCGGTGCGTG
<i>GAPDH</i>		F-GATGCTGGTGCTGAGTATGT R-GAGATGATGACCCTTTTGGC

qRT-PZR Normalizasyonu

Örneklerin arasındaki farklılıkları standardize etmek ve normalizasyonunu sağlamak için iç kontrol olarak *GAPDH* housekeeping geni kullanılmıştır. Housekeeping genleri her dokuda eksprese olan ve iç kontrol olan genler olarak tanımlanmaktadır.

cDNA Miktarının Belirlenmesi

qRT-PZR'de kullanılacak uygun cDNA'nın belirlenmesi için 300 ng içerecek şekilde hazırlanan cDNA örneklerin değişik konsantrasyonlarda dilüsyonu yapılmıştır. Ardından bu dilüsyonlar kontrol ve hedef genlerin primerleri ile qRT-PZR kullanılarak çalışılmıştır. Melting curve ve standart eğrilere göre uygun cDNA dilüsyonu hasta kontrol örneklerinde 1:6 ve hücre kültürü örneklerinde 1:3 olarak belirlenmiştir.

3.2.8.1. qRT-PZR Aşaması

Deney, her bir kuyu için toplam hacim 10 µl olacak şekilde 96 kuyulu PCR kabında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun içeriği 1,5 ml eppendorf içerisinde gerekli kuyu sayısına göre hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı her kuyuya 9 µl olarak konulmuş ve kuyulara 1 µl ilgili cDNA örneği eklenmiştir. Üzeri steril film ile kaplanan PZR kabı 1500 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Ardından qRT-PZR reaksiyonu Light Cycler480 (Roche) cihazında gerçekleştirilmiştir. Her örnek çift olarak çalışılmıştır. Reaksiyon içeriği ve koşulları tablo 3-7'de verilmiştir.

Tablo 3-7: qRT-PZR reaksiyon içeriği ve koşulları

Reaksiyon içeriği	Miktar	Reaksiyon koşulları	
H ₂ O	3 µl	Predenatürasyon	95°C 5 dk
Forward Primer (10 pmol)	0,5 µl	Denatürasyon	95°C 10 sn
		Bağlanma (Annealing)	60-65°C 20 sn
		Uzama (Elongation)	72°C 10 sn
Revers Primer (10 pmol)	0,5 µl	Çözülme Eğrisi (Melting Curve)	95°C 5 sn
			65°C 1 dk
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (2X)	5 µl	Soğutma (Cooling)	95°C (sürekli)
			40°C 10 sn
cDNA (1:6, 1:3)	1 µl		

45X

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Rölatif kantitasyon ile tek bir örnekle iki farklı dizinin (hedef gen ve referans gen) ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Ekspresyon düzeyini rölatif olarak hesaplamak için $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılmıştır. Hedef genin gen anlatım düzeyini ifade eden C_t değerlerinden referans olarak seçilen genin C_t değeri çıkartılarak ΔC_t değeri elde edilmiştir. ΔC_t değerlerinden çalışmada kullanılan ve elde edilen C_t değerlerinin normalizasyonunu sağlamak için bir kalibratör oluşturulmuştur. Bu kalibratör değeri elde edilen ΔC_t değerinden çıkarılarak $\Delta\Delta C_t$ değeri elde edilmiştir. Kontrol ve hasta örneklerinden elde edilen ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması için Mann-Whitney testi kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel çalışmaya ait değerler sürekli sayısal değerler ise ortalama $\pm$ standart sapma ve kategorik ise yüzde (%) ile belirtilmiştir. Mann-Whitney ve ki-kare testleri kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyleri $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS 21.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

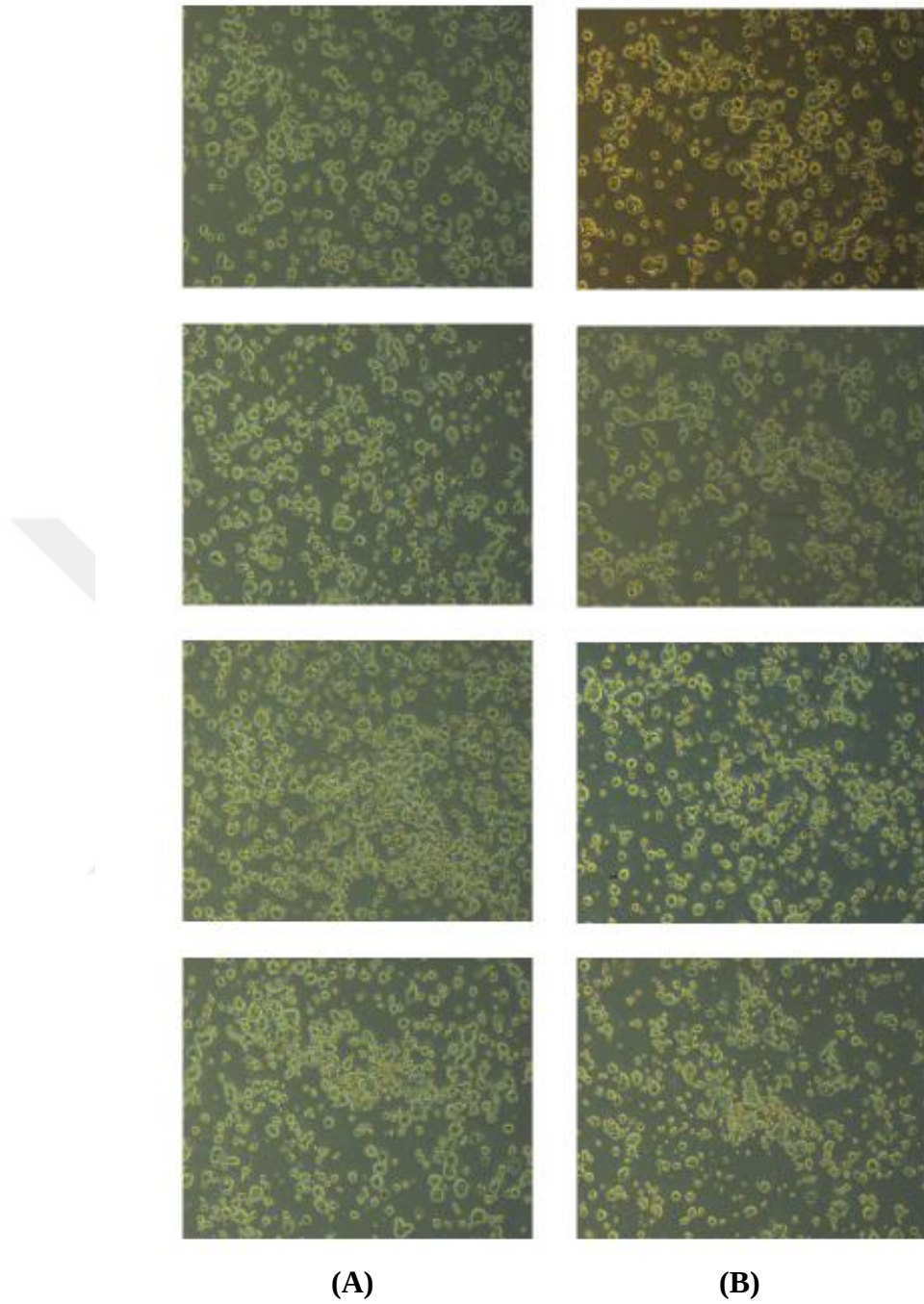
4. BULGULAR

4.1. Fonksiyonel Çalışmalar

4.1.1. Optimum Erastin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Ferroptoz hücre ölüm mekanizmasının indüklenmesi için hücre kültüründe yapılan çalışmalarda öncelikle optimum erastin konsantrasyonunun belirlenmesi adına farklı erastin konsantrasyonları denenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, incelenen konsantrasyon aralığında hücrelerin morfolojik değişiklikleri ve canlılık oranları belirlenmiştir.



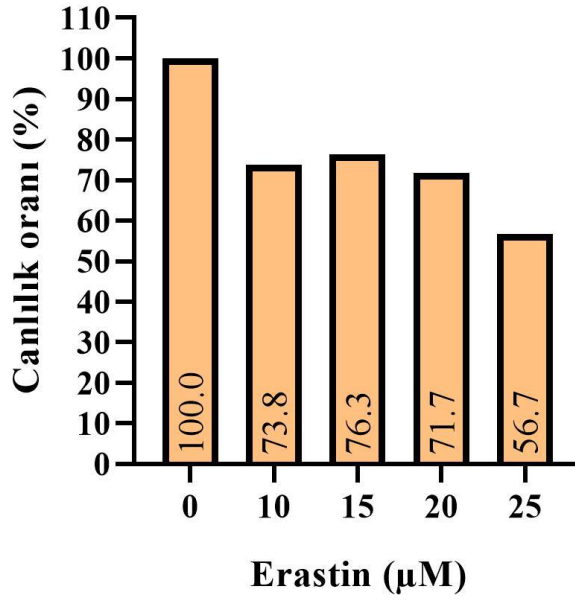


Şekil 4-1: Farklı erastin konsantrasyonlarının hücre morfolojisi ve canlılığı üzerindeki etkisi

(A) Yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla olarak 24 saatlik inkübasyon sonrasında 1, 1.5, 2 ve 2.5 μ l DMSO içeren koşullara ait hücre yoğunluğu ve hücre morfolojileri gösterilmiştir. (B) Yukarıdan aşağıya 10, 15, 20 ve 25 μ M erastin içeren koşulların 24 saatlik inkübasyon sonrası yoğunluk ve morfolojileri gösterilmiştir.

Şekil 4-1’de gösterilen hücrelere 10, 15, 20 ve 25 μ M erastin ve bunlara uygun olarak 1, 1.5, 2 ve 2.5 μ l DMSO kontrol koşulları eklenmiştir. DMSO içeren koşullarda

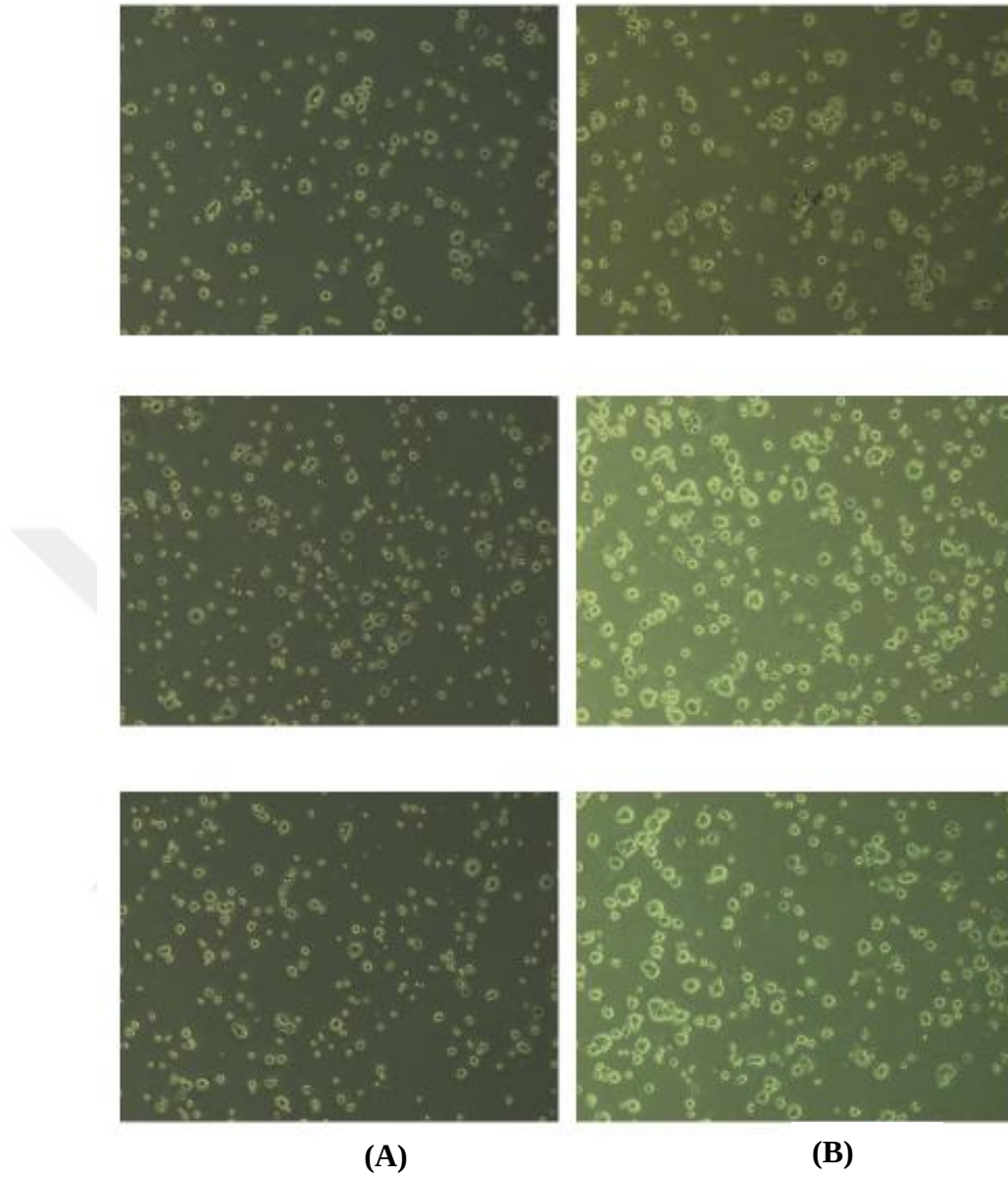
hücre morfolojisinde ve canlılık oranında bir değişiklik gözlemlenmezken, en düşük hücre canlılık oranına sahip olan erastin koşulu 25 μ M erastin içeren koşul olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-2: Farklı erastin konsantrasyonlarında rölatif hücre canlılığı

Erastin içeren koşulların hücre sayılarının, erastin içermeyen koşula göre karşılaştırılması ile elde edilen canlılık oranları yüzdesel olarak gösterilmiştir. Konsantrasyon denemeleri sonucunda, 10 15 ve 20 μ M erastin içeren koşullar arasında fark gözlemlenmezken 25 μ M erastin içeren koşulda diğer koşullara göre hücre ölümünde artış görülmüştür.

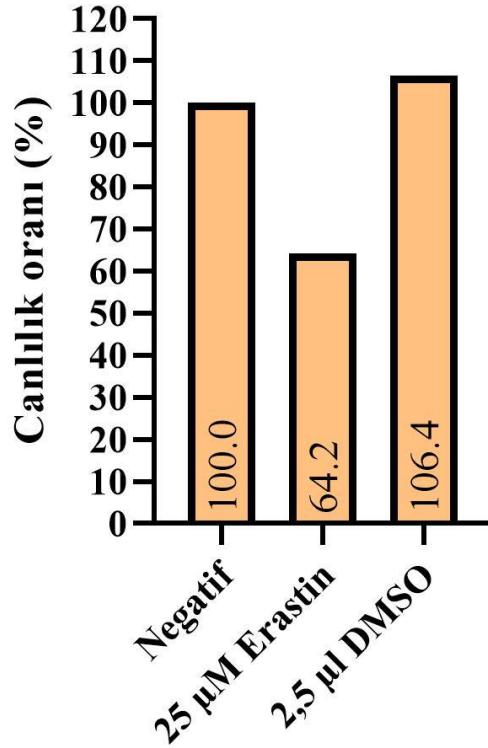
Hücrelerin 10, 15, 20 ve 25 μ M erastin içeren koşullar ile 24 saat inkübasyonun ardından hemositometri kullanılarak yapılan sayım ile hücre sayıları belirlenmiştir. Ardından hücre sayılarının erastin içermeyen koşula göre rölatif canlılığı hesaplanmıştır. Sonuçlara göre, %56,7 canlılık oranı ile en büyük düşüş 25 μ M erastin içeren koşulda gözlemlenmiştir (Şekil 4-2).



Şekil 4-3: 25 µM erastinin hücre canlılığına etkisi

(A) 12 kuyulu petrilere ekimi yapılan hücrelerin 24 saat sonunda uyarıcı madde eklenmesinden önceki morfolojileri ve hücre yoğunluğu gösterilmiştir. (B) Yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla 25 µM erastin, 2,5 µl DMSO ve sadece kültür medyumunu içeren koşulların 24 saat sonundaki yapısal ve sayısal durumları gösterilmiştir.

Şekil 4-3'te uyarıcı madde eklendikten 24 saat sonra, 25 µM erastin içeren koşulda hücre yoğunluğunun 2,5 µl DMSO ve sadece kültür medyumunu içeren koşullara göre daha az olduğu gözlemlenmiştir.



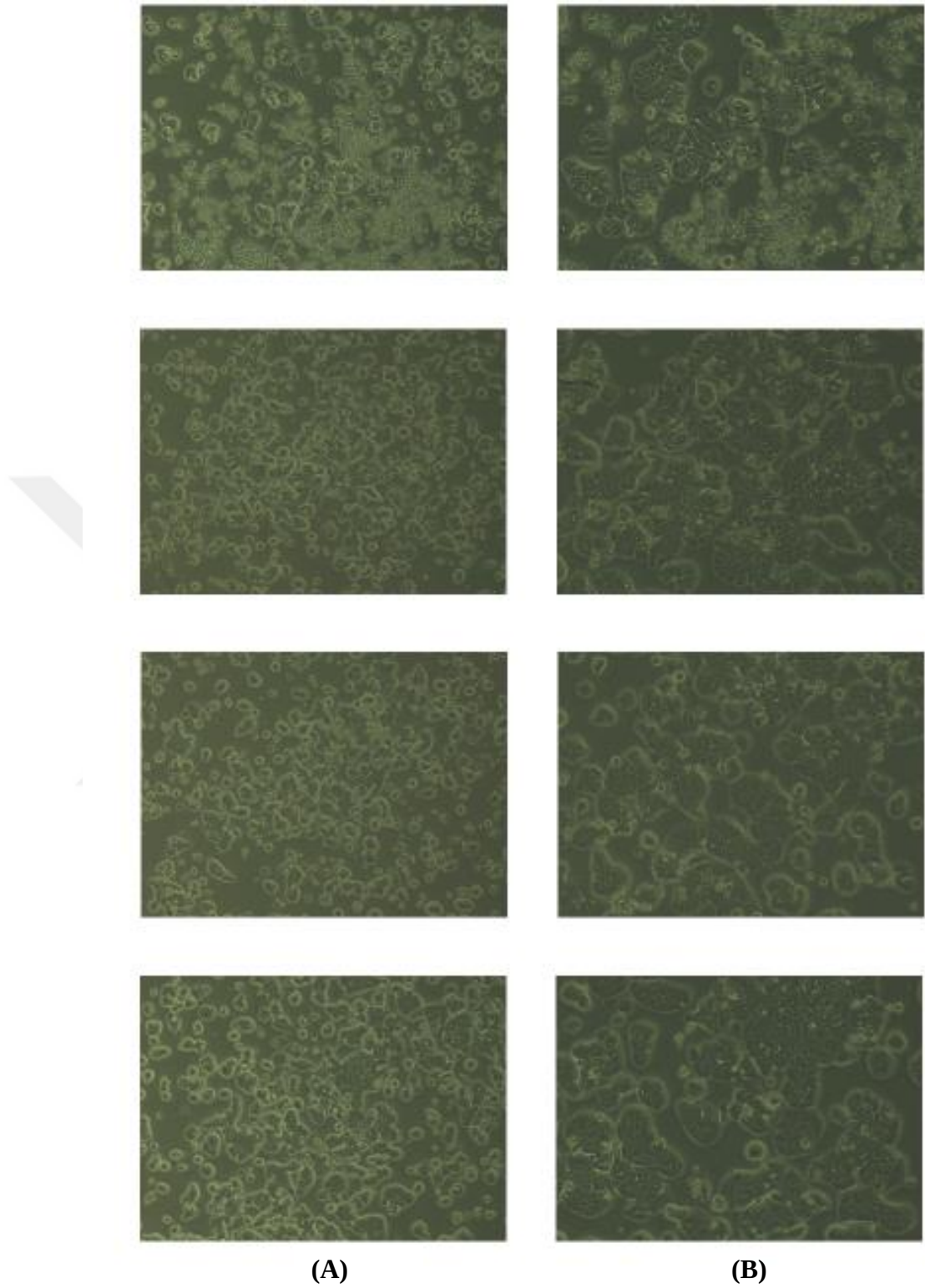
Şekil 4-4: 25 µM erastin içeren koşulların rölâtif hücre canlılık oranı

25 µM erastin, ve 2,5 µl DMSO içeren koşulların canlılık oranları sadece kültür medyumunu içeren koşullardaki hücre sayısına rölâtif olarak hesaplanmıştır. Tüm koşullar üçlü çalışılmış ve yapılan sayımlardaki sonuçların ortalaması alınmıştır. 25 µM erastin içeren koşulda %64,2 canlılık gözlemlenirken, 2,5 µl DMSO içeren koşulda canlılık oranında negatife göre artış görülmüştür.

Optimum erastin konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan çalışmada 10, 15, 20 ve 25 µM erastin içeren koşullarda en düşük canlılığın gözlemlendiği 25 µM erastin koşulu tekrarlanmıştır. Bu deney sonucunda benzer bir canlılık oranı gözlemlenmiştir (Şekil 4-4).

4.1.2. Optimum Erastin ve Ferrostatin-1 Konsantrasyonunun Belirlenmesi

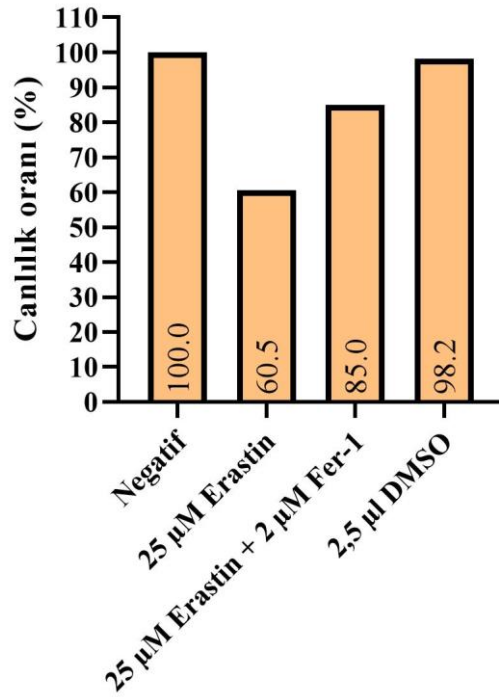
Erastin konsantrasyonunun 25 µM olarak belirlenmesinin ardından bir ferroptoz baskılayıcısı olan Fer-1 konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. 2 µM Fer-1+ 25 µM erastin içeren, yalnızca 25 µM erastin içeren ve 2,5 µl DMSO içeren koşullar oluşturulmuştur. 24 saat sonunda hücrelerde oluşan morfolojik değişimler ve hücre yoğunlukları şekil 4-5'te gösterilmiştir.



Şekil 4-5: Erastin ve Fer-1 içeren koşullarda hücre morfolojisi ve canlılığı

Ferroptoz inhibitörü olan ferrostatinin etkinliğini kontrol etmek için oluşturulan 25 μ M erastin ve 25 μ M erastin+ 2 μ M Fer-1 içeren koşullarda HEPG2 hücreleri 24 saat inkübe edilmiştir. Yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla yalnızca 25 μ M erastin, 2 μ M Fer-1+25 μ M, 2,5 μ l DMSO ve yalnızca kültür medyumunu içeren koşulların morfolojileri ve hücre yoğunlukları invers mikroskopta (A) 4X ve (B) 10X gösterilmiştir.

Hücreler 25 μ M erastin ve 25 μ M erastin+2 μ M Fer-1 içeren koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir. 25 μ M erastin içeren koşulda hücre ölümleri gözlemlenmiştir. Ayrıca erastin+Fer-1 içeren koşul, sadece erastin içeren koşula göre hücre yoğunluğunun daha fazla ve morfolojinin DMSO içeren kontrol ve negatif koşullarına benzer olduğu gösterilmiştir (Şekil 4-5).

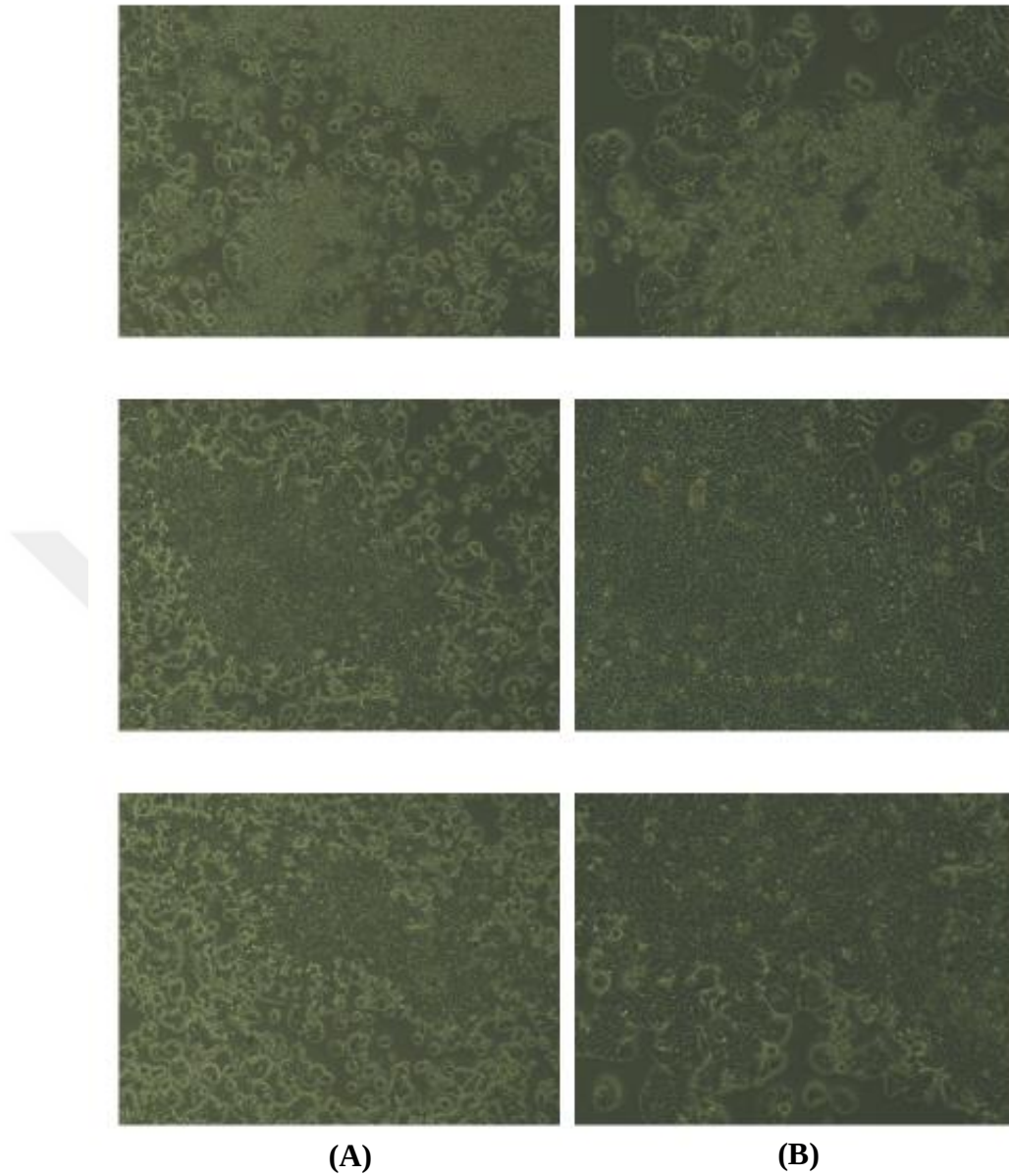


Şekil 4-6: 25 μ M erastin ve 2 μ M Fer-1 içeren koşulların rölatif hücre canlılık oranı

Koşulların canlılık oranları yalnızca kültür medyumunu ile inkübe edilmiş negatif kontrol hücre sayısına göre rölatif olarak hesaplanmıştır. Erastin koşulunda canlılık oranı %60,5, erastin ve Fer-1 içeren koşul için %85 olarak hesaplanmıştır.

Hücre canlılık oranları incelendiğinde en düşük canlılık oranı erastin içeren koşulda gözlemlenirken erastin ve Fer-1 içeren koşulda yalnızca erastin içeren koşula göre canlılık oranında artış görülmüştür. Hücrelerin inkübe edildiği medyuma DMSO eklenmesinin canlılık oranı üzerinde bir etkisi gözlemlenmemiştir (Şekil 4-6).

Yukarıda gösterilen sonuçların elde edilmesinin ardından deney aynı koşullar altında tekrarlanmış ve hücre canlılık oranları aynı şekilde hesaplanmıştır.



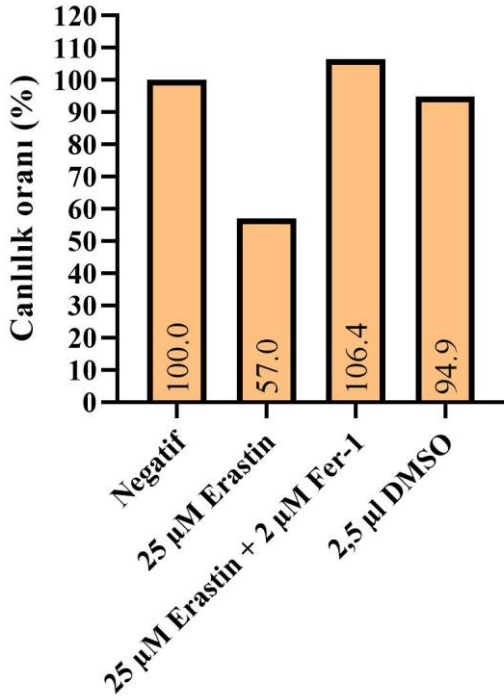
Şekil 4-7: 25 µM Erastin ve 2 µM Fer-1 içeren koşullarda hücre morfolojisi ve canlılığı

Yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla yalnızca 25 µM erastin, 2 µM Fer-1+25 µM erastin ve yalnızca kültür medyumunu içeren koşulların morfolojileri ve hücre yoğunlukları invers mikroskopta (A) 4X ve (B) 10X gösterilmiştir.

Şekil 4-5’te oluşturulan koşulların hücre kültür tekrar deneyi yapılmıştır ve sonuçlar her iki deneyde de aynı çıkmıştır (Şekil 4-5 ve Şekil 4-7). Hücrelerin 24 saat boyunca erastin ve Fer-1 ile inkübe edilmesinin ardından koşullardaki hücre yoğunlukları ve hücre morfolojileri şekil 4-7’de gösterilmiştir. Erastin içeren koşullarda morfolojik özelliklerin

diğer koşullardan farklı olduğu gözlemlenirken, bunun yanında hücre yoğunluğunun da azaldığı gösterilmiştir.

Deneyin tekrarlanması ile bağımsız olarak aynı sonuçların elde edilmesi amaçlanmış olup rölatif hücre canlılıkları şekil 4-8’de verilmiştir.



Şekil 4-8: 25 µM erastin ve 2 µM Fer-1 içeren koşulların rölatif hücre canlılık oranı

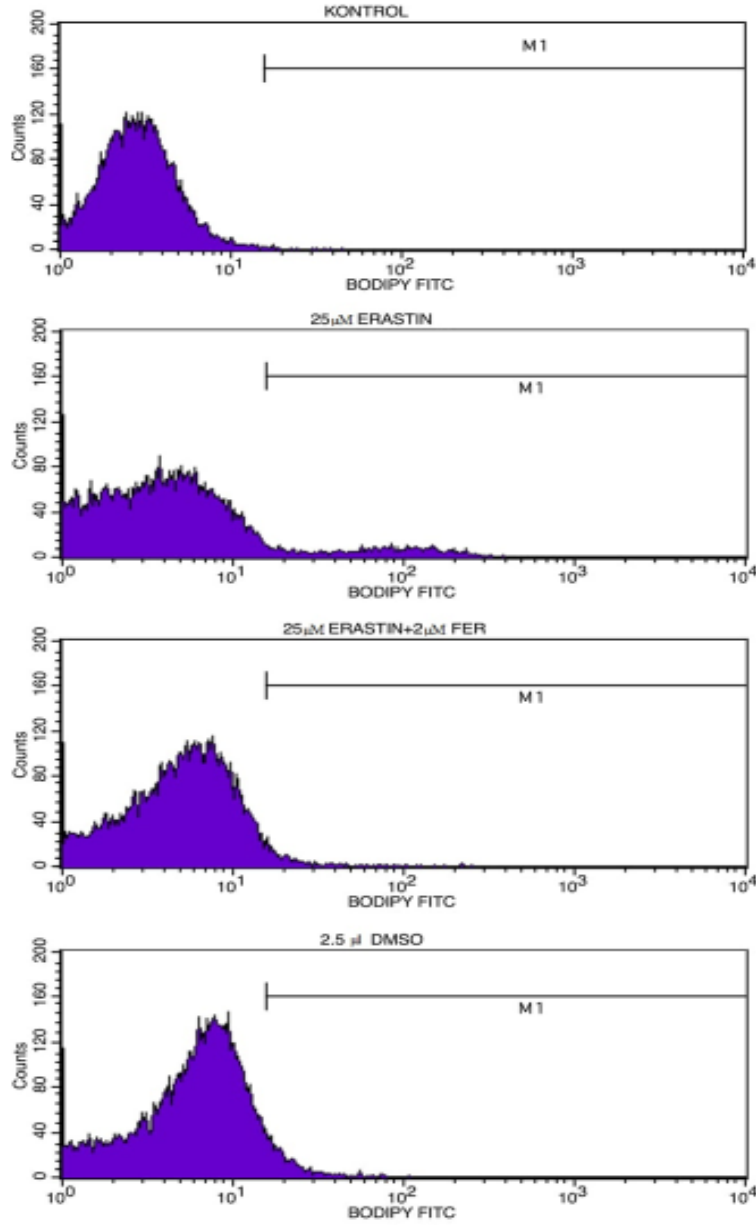
Koşulların canlılık oranları yalnızca kültür medyumı ile inkübe edilmiş koşulların hücre sayısına göre rölatif olarak hesaplanmıştır. Erastin koşulunda canlılık oranı %57, erastin+ Fer-1 içeren koşul için %106,4 ve 2,5 µl DMSO içeren koşulda %94,9 olarak hesaplanmıştır.

Tekrarlanan deneye ait sonuçların bir önceki deney ile tutarlı olduğu hücrelerin morfolojik görüntülerinde ve canlılık oranlarında ile belirlenmiştir. Erastin içeren koşulda hücre canlılığı %57’ye düşerken erastin+ Fer-1 içeren koşulda hücre canlılığının sadece medyum içeren ve DMSO içeren koşullara benzer olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ferroptoz inhibitörü olan Fer-1’in hücre canlılığını erastin varlığına rağmen arttırdığını göstermiştir.

4.1.3. 25 µM Erastin ve 2 µM Fer-1’in Lipid Peroksidasyonu Üzerindeki Etkisi

Lipid peroksidasyonu, ferroptozun en önemli belirteçlerinden sayıldığından dolayı ferroptozun indüklendiği ve baskılandığı koşullarda lipid peroksidasyonu

incelenmiştir. 25 μ M erastin ve 2 μ M Fer-1'in lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisi belirlemek için BODIPY® 581/591 C11 boyası kullanılarak yapılan deneyde, sadece erastin, erastin+Fer-1, ve DMSO içeren koşullar 20 saat ilgili maddeler ile inkübe edilmiştir. FACSCalibur akan hücre ölçer cihazı ile yapılan çalışmanın sonuçları şekil 4-9'da verilmiştir.



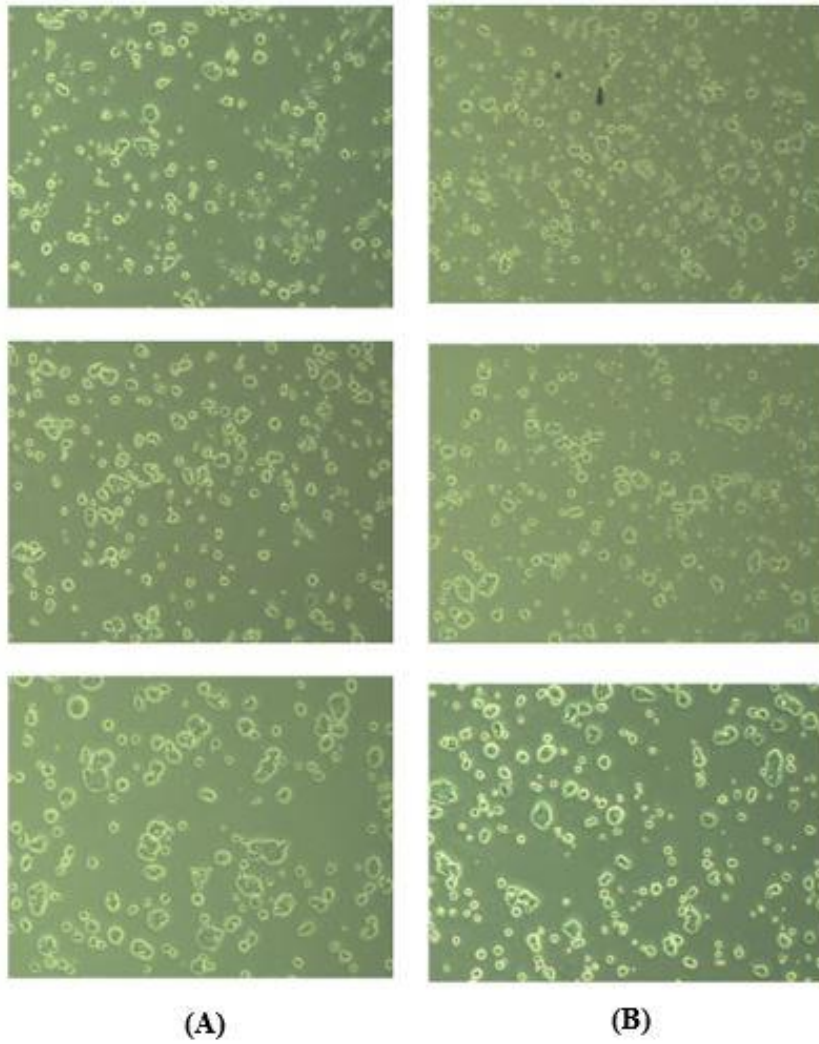
Şekil 4-9: 25 μ M erastin ve 2 μ M Fer-1 ile değişen lipid peroksidasyonu

Yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla kültür medyumunu, 25 μ M erastin, 25 μ M erastin ve 2 μ M Fer-1 ve 2.5 μ l DMSO ile 20 saat inkübasyonun ardından hücreler BODIPY® 581/591 C11 ile boyanmıştır. Tüm koşullar üçlü çalışılmıştır. Akan hücre ölçümüne göre lipid peroksidasyon oranında, negatif kontrol koşulu ile kıyaslandığında erastin içeren koşulda %5,43 ve erastin+Fer-1 içeren koşulda %2,18 fark görülmüştür.

Yapılan çalışma sonucunda lipid peroksidasyonuna uğrayan lipid miktarına göre koşullar arasında bir fark gözlemlenememiştir (Şekil 4-9). Canlılık oranlarında görülen farkların lipid peroksidasyonunda gösterilememesi üzerine farklı erastin konsantrasyonu denenmesi planlanmıştır.

4.1.4. Farklı Erastin ve Ferrostatin-1 Konsantrasyonlarının İncelenmesi

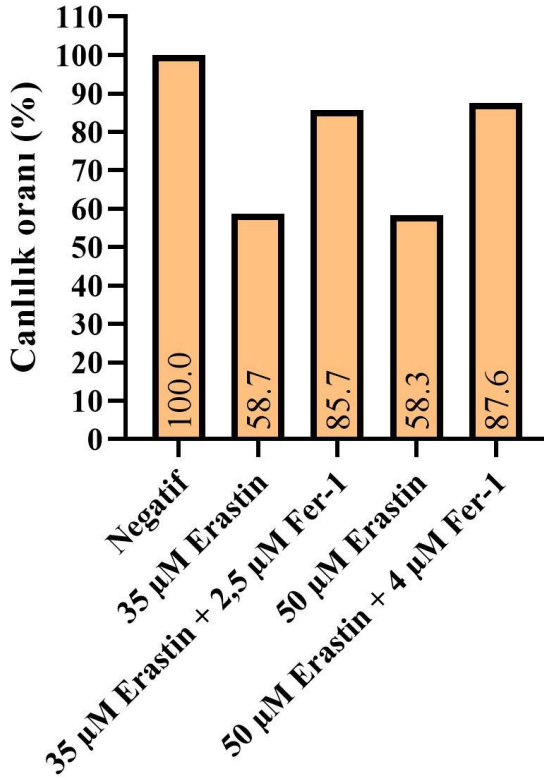
25 μ M Erastin konsantrasyonu ile istenilen lipid peroksidasyon düzeyinin gözlemlenememesi sebebiyle erastin konsantrasyonu arttırılmıştır. Kullanılan maddelerin kültür medyumuna ile dilüsyonları yapılarak DMSO koşulunun gerekliliği ortadan kaldırılmıştır. 35 μ M ve 50 μ M erastin içeren ve bu koşullara uygun olarak sırasıyla 2,5 μ M ve 4 μ M Fer-1 içeren koşullar oluşturulmuştur. Hücrelerin morfolojik özellikleri ve hücre yoğunlukları şekil 4-10'da gösterilmiştir.



Şekil 4-10: Farklı erastin ve Fer-1 konsantrasyonlarında hücre yoğunluğu ve morfolojisi

Yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla erastin, erastin+Fer-1 ve sadece kültür medyumunu içeren hücrelere ait fotoğraflar verilmiştir. (A) 35 μM erastin içeren koşullarda, hücre şekillerinde bozulmalar ve yoğunlukta azalma gözlemlenirken, 35 μM erastin ve 2,5 μM Fer-1 içeren koşul negatif koşul ile benzer görülmüştür. (B) 50 μM erastin içeren koşullarda hücre sayısında azalma ve morfolojik farklılıklar gözlemlenirken, 50 μM erastin ve 4 μM Fer-1 içeren koşul negatife benzer olduğu gözlemlenmiştir.

Erastin konsantrasyonunun arttırılması ile 25 μM erastin koşuluna benzer görüntüler elde edilmiştir. Hücre canlılık oranlarının karşılaştırılması için hemositometri ile canlı hücreler sayılmış ve sadece kültür medyumunu içeren koşula göre rölatif canlılık hesaplanmıştır.



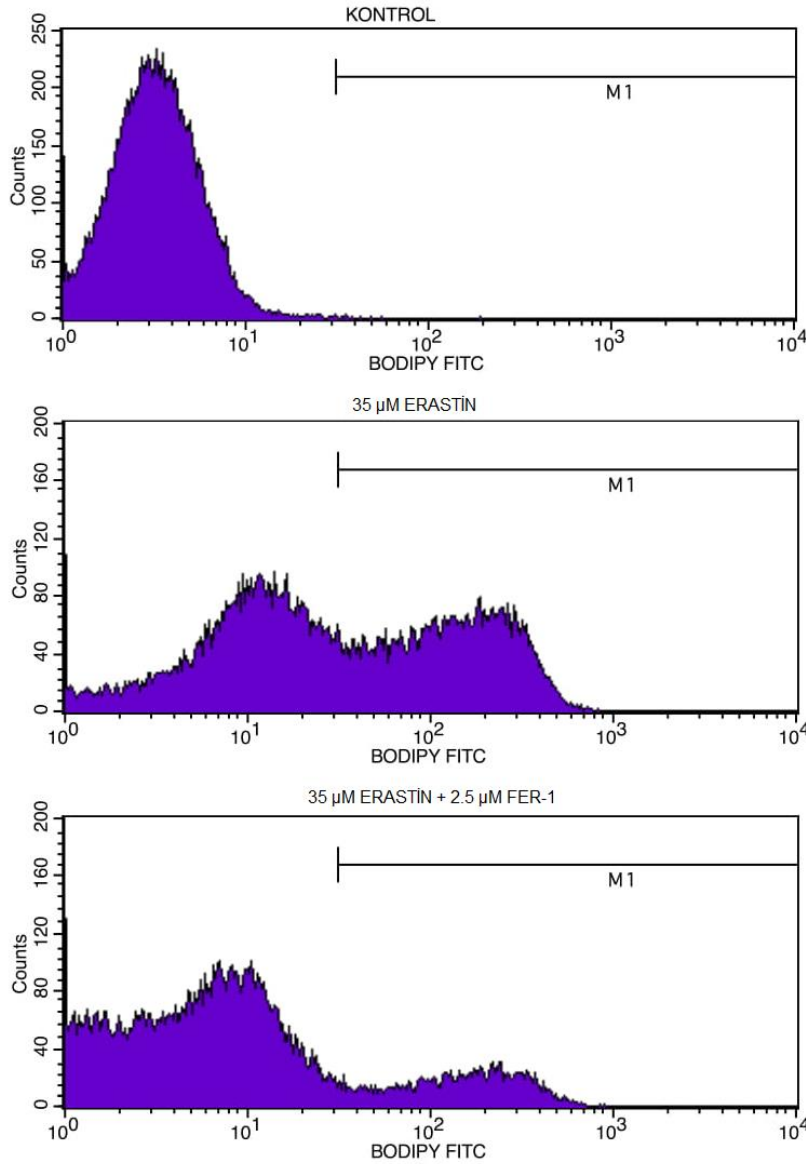
Şekil 4-11: 35 µM ve 50 µM erastin konsantrasyonunda hücre canlılık oranları

35 µM ve 50 µM erastin eklenmesi sonucunda yalnızca kültür medyumunu içeren koşula göre sırasıyla %58,7 ve 58,3 canlılık oranı gözlemlenmiştir. Erastin+ Fer-1 içeren koşullarda sırasıyla %85,7 ve %87,6 rölatif canlılık hesaplanmıştır.

Erastin ve buna bağlı olarak Fer-1 konsantrasyonunun artırılması sonucunda hücre canlılık oranlarının 25 µM erastin ve 2 µM Fer-1 ile benzer olduğu gözlemlenmiştir. 35 ve 50 µM içeren koşullar arasında fark gözlemlenmemesi sebebiyle 35 µM erastin ile inkübasyon sonrasında lipid peroksidasyonunun incelenmesine karar verilmiştir.

4.1.5. 35 µM Erastin ve 2.5 µM Fer-1'in Lipid Peroksidasyonu Üzerindeki Etkisi

Yeni konsantrasyon denemeleri sonucunda canlılık oranları hesaplanan 35 µM erastin içeren ve 35 µM erastin+2,5 µM Fer-1 içeren koşulların lipid peroksidasyon düzeyleri ölçülmüştür.



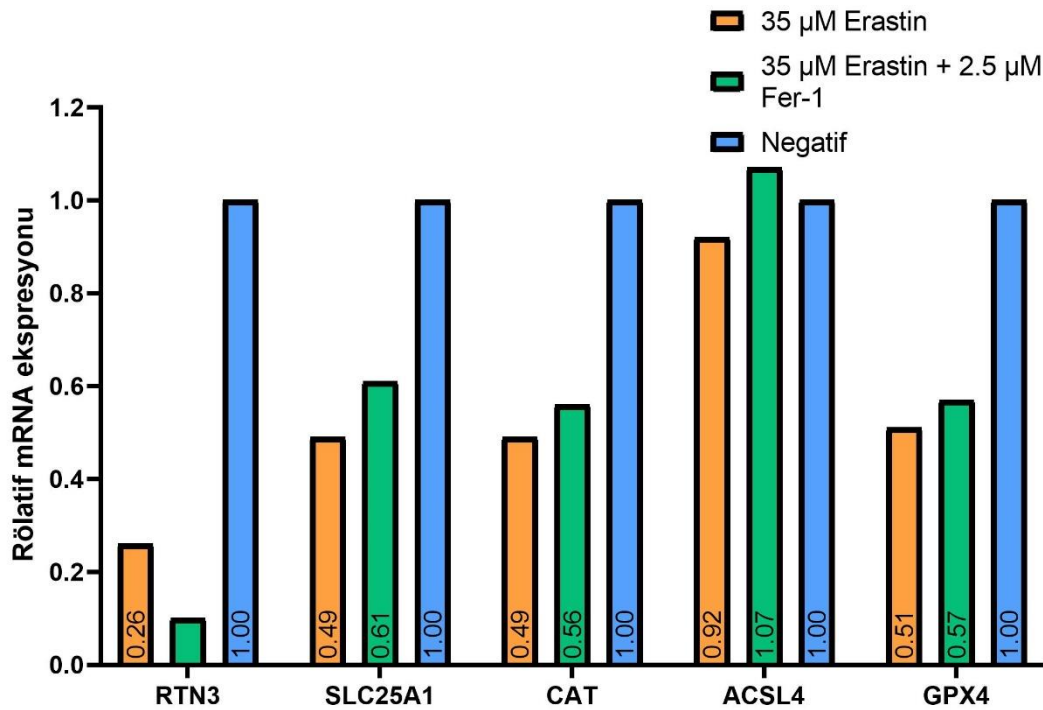
Şekil 4-12: 35 µM erastin ve 2.5 µM Fer-1 ile değişen lipid peroksidasyonu

Yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla kültür medyumunu, 35µM erastin, ve 35µM erastin+ 2,5 µM Fer-1 ile 20 saat inkübasyonun ardından hücreler BODIPY® 581/591 C11 ile boyanmıştır. Akan hücre sitometrisi ölçümüne göre lipid peroksidasyon oranında, negatif kontrol koşulu ile kıyaslandığında erastin içeren koşulda %46,93 ve erastin+ Fer-1 içeren koşulda %14,15 artış görülmüştür.

Yapılan çalışma sonucunda erastin içeren koşulda lipid peroksidasyonunda %46,93 artış görülürken, erastin+Fer-1 koşulunda negatife göre %14,15 artış görülmüştür. Bu durum 35 µM erastinin lipid peroksidasyonuna sebep olduğunu ve Fer-1 eklenmesinin lipid peroksidasyonunu düşürdüğünü göstermektedir (Şekil 4-12). Bu nedenle gen ekspresyon deneylerine 35 µM erastin ve 2,5 µM Fer-1 ile devam edilmiştir.

4.1.6. Hücre Kültürü Aday Gen Ekspresyonları

35 μ M erastin ve 2,5 μ M Fer-1 ile yapılan deneylerde elde edilen canlılık oranları ve lipid peroksidasyonunda görülen değişimler sonucu seçilen aday genlerin ekspresyon analizlerinin bu konsantrasyonlarda yapılmasına karar verilmiştir. 35 μ M erastin, 35 μ M+2,5 μ M Fer-1 ve negatif koşullarında, KAH aday genleri olabileceği belirlenen *RTN3*, *SLC25A1*, *CAT*, *ACSL4*, *GPX4*, *HMOX-1* ve *SLC7A11* gen ekspresyonları incelenmiştir.

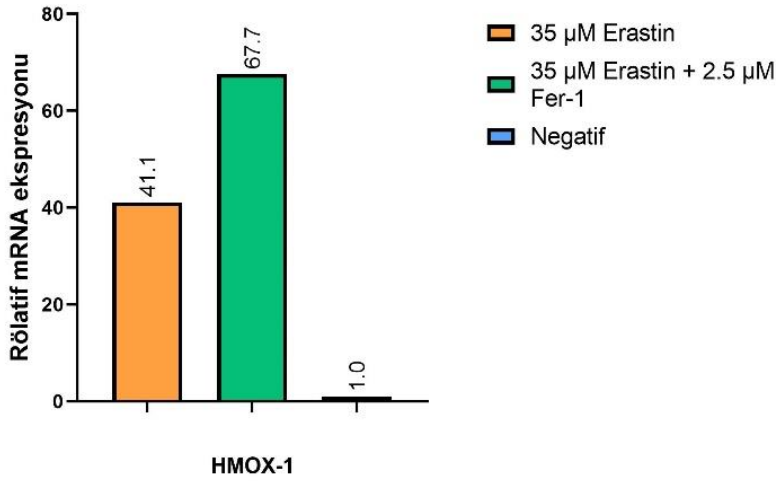


Şekil 4-13: HEPG2 hücre soylarında belirlenen koşullarda *RTN3*, *SLC25A1*, *CAT*,

ACSL4 ve *GPX4* rölatif gen anlatımları

35 μ M erastin, 35 μ M erastin+2,5 μ M Fer-1, ve sadece kültür medyumunu ile inkübe edilmiş koşullarda sırasıyla *RTN3*, *SLC25A1*, *CAT*, *ACSL4* ve *GPX4* gen anlatım düzeyleri *GAPDH* ile normalizasyon yapılmış ve sonuçlar negatif koşula göre rölatif olarak gösterilmiştir.

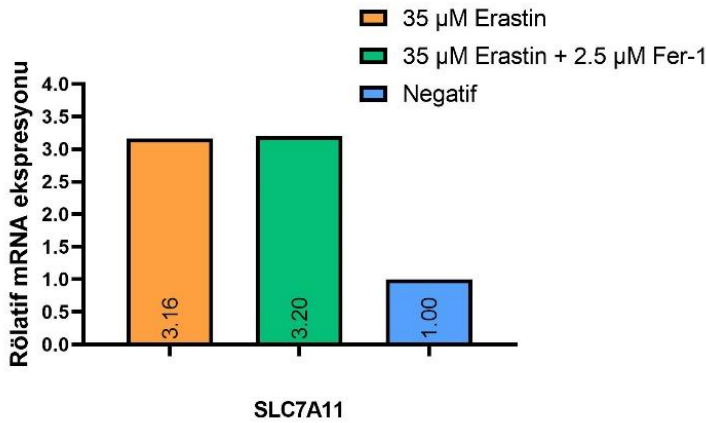
ACSL4 dışındaki gen anlatım düzeylerinde erastin ve erastin ile Fer-1 içeren koşullarda negatife göre azalma gözlemlenirken, *ACSL4* anlatım düzeyinin değişmediği görülmüştür (Şekil 4-14). Bununla birlikte, *RTN3* gen anlatım düzeyinde erastin+ Fer-1 içeren koşulda erastin koşuluna göre düşüş belirlenmiştir. Diğer aday genlerin anlatım düzeylerinin ise erastin+Fer-1 içeren koşulda erastin koşuluna göre arttığı gözlenmiştir (Şekil 4-13).



Şekil 4-14: HEPG2 hücre soylarında belirlenen koşullarda *HMOX-1* rölatif gen anlatım düzeyleri

35 µM erastin, 35µM erastin+2,5 µM Fer-1, ve sadece kültür medyumunu ile inkübe edilmiş koşullarda *HMOX-1* gen anlatımlarındaki değişimler *GAPDH* ile normalizasyonun ardından negatif koşula göre rölatif olarak gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada *HMOX-1* geninin erastin eklenmesi ile gen anlatım düzeyinin negatif koşula göre 41,1 kat ve erastin ile Fer-1 eklenmesiyle 67,7 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4-14).



Şekil 4-15: HEPG2 hücre soylarında belirlenen koşullarda *SLC7A11* rölatif gen anlatım düzeyleri

35 µM erastin, 35µM erastin+ 2,5 µM Fer-1, ve sadece kültür medyumunu ile inkübe edilmiş koşullarda *SLC7A11* gen anlatımlarındaki değişimler *GAPDH* ile normalizasyonun ardından negatif koşula göre rölatif olarak gösterilmiştir.

SLC7A11 gen anlatım düzeyleri incelendiğinde negatife göre erastin içeren koşulda 3,16 ve erastin+Fer-1 içeren koşulda 3,2 katlık artış gözlemlenmiştir (Şekil 4-15).

4.2. Hasta-Kontrol Grubu Çalışmaları

Bu çalışmada, literatürle uyumlu olarak, anjiyografide koroner arter lümeninde %70 ya da daha fazla darlık yaratan bir aterosklerotik plak saptanması halinde kişi koroner arter hastası grubuna ve %20 ya da daha az darlık olması durumunda birey kontrol grubuna dahil edilmiştir. Hasta grubu 8 ve kontrol grubu 14 bireyden oluşmaktadır. Gruplara ait karakteristik özellikler tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Tablo 4-1:Hasta ve kontrol grubuna ait karakteristik özellikler

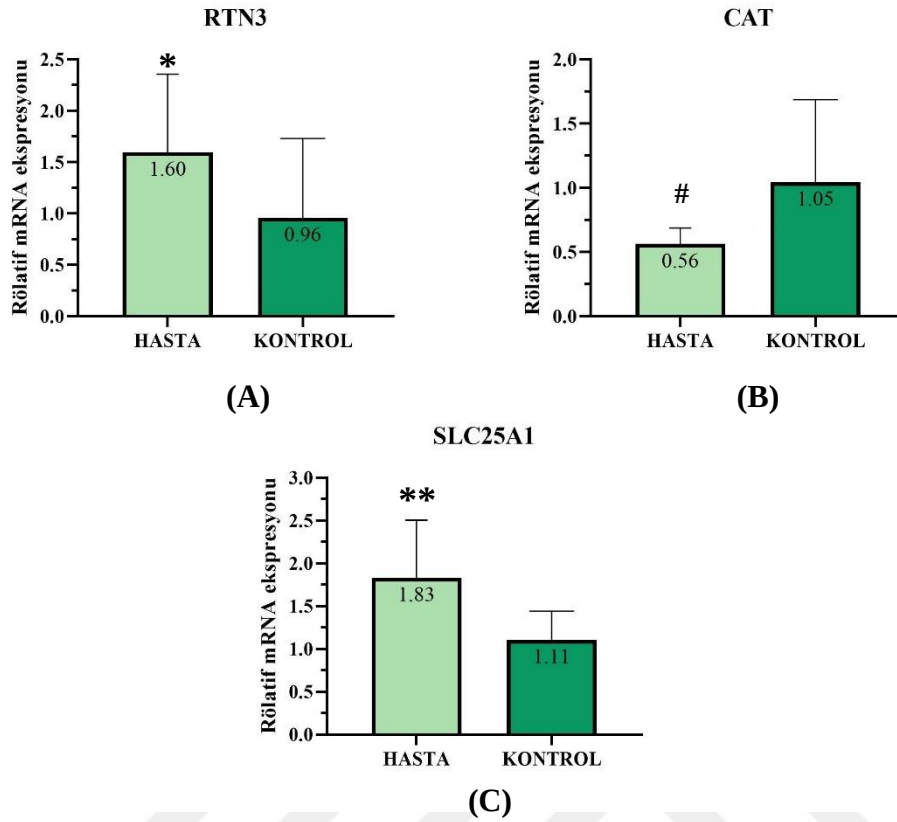
	KAH (n=8)	Kontrol (n=14)	<i>p-değeri</i>
	Ortalama ± SS	Ortalama ± SS	
Yaş (yıl)	60.9 ± 13.7	60.4 ± 10.7	0.570
BKİ (kg/m ²)	24.7 ± 3.0	28.6 ± 4.3	0.042
Açlık glukozu (mg/dL)	114.3 ± 45.2	95.4 ± 11.7	0.238
HbA1c (%)	5.50 ± 0.32	5.49 ± 0.45	0.973
Darlık (%)	80.0 ± 9.3	9.3 ± 9.2	<0.001
Statin kullanımı, %	62.5	35.7	0.225
Antidiyabetik ilaç kullanımı, %	0.0	7.1	0.439
Cinsiyet, Kadın %	25.0	28.6	0.856

SS: Standart Sapma, BKİ: Beden Kitle İndeksi.

Hasta ve kontrol grupları arasında karakteristik özellikler açısından yapılan değerlendirme sonucunda BKİ ve darlık değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 4-1).

4.2.1. Aday Gen Anlatımlarının Hasta ve Kontrol Gruplarında Değerlendirilmesi

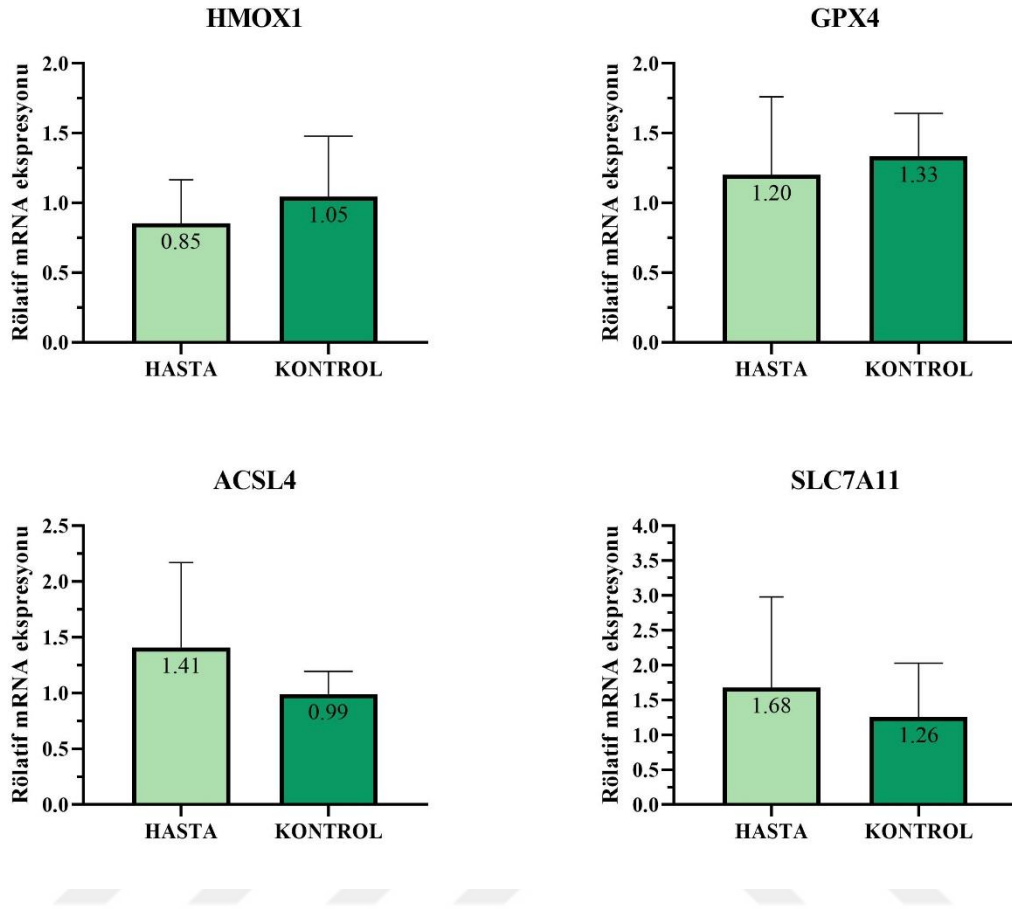
KAH ve KAH olmayan gruplarda, seçilen aday genlerin ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. *RTN3*, *SLC25A1*, *CAT*, *ACSL4*, *GPX4*, *HMOX-1* ve *SLC7A11* gen ekspresyon düzeyleri *GAPDH* ile yapılan normalizasyonun ardından kontrol grubu kalibratör olarak kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4-16: KAH ve KAH olmayan gruplarda *RTN3*, *CAT* ve *SLC25A1* rölatif gen anlatım düzeyleri

Hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla *RTN3*, *CAT* ve *SLC25A1* gen anlatım düzeyleri *GAPDH* ile normalizasyon yapılarak rölatif olarak gösterilmiştir. (A) *RTN3* gen anlatım düzeyinde kontrol grubuna göre 1,6 katlık artış gözlenmiştir (* $p=0,045$). (B) *CAT* gen anlatım düzeyinde kontrol grubuna göre 0,56 katlık düşüş gözlenmiştir (# $p=0,001$). (C) Kontrol grubuna göre hasta grubunda *SLC25A1* gen ekspresyon düzeyinde 1,83 katlık artış gözlenmiştir (** $p=0,007$)

RTN3, *CAT* ve *SLC25A1* gen anlatım düzeyleri kontrol grubuna göre hasta grubunda anlamlı olarak farklı bulunmuştur. *RTN3* ve *SLC25A1* anlatım düzeylerinin 1,6 ve 1,83 kat arttığı gözlemlenirken, *CAT* gen anlatım düzeyinin 0,56 kat azaldığı gösterilmiştir. Gözlemlenen değişimlerin tamamı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4-16).



Şekil 4-17: KAH ve KAH hastası olmayan gruplarda *HMOX-1*, *GPX4*, *ACSL4* ve *SLC7A11* gen anlatım düzeyleri

Hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla *HMOX-1*, *GPX4*, *ACSL4* ve *SLC7A11* gen anlatım düzeyleri *GAPDH* ile normalizasyon yapılarak rölatif olarak gösterilmiştir.

HMOX-1 ve *GPX4* anlatımının hasta grubunda kontrol grubuna göre azaldığı görülürken, diğer gen anlatımlarının arttığı gözlemlenmiştir. Görülen değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 4-17).

5. TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıklar tüm ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Bir kardiyovasküler hastalık olan KAH'ın altında yatan moleküler mekanizmaların ve hastalığın risk faktörlerinin belirlenmesi önemli bir halk sağlığı sorunu olan bu hastalığın önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Yeni tanımlanan bir programlı hücre ölüm şekli olan ferroptozun pek çok farklı hastalığın patogeneğinde rol oynuyor olabileceği düşünülmektedir. Oksidatif stres ve demir metabolizması ile ilişkili bu hücre ölüm şeklinin tümör, doku veya organ yaralanması, felç, iskemi-reperfüzyon hasarı ve böbrek dejenerasyonu gibi çeşitli hastalıkların patolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir. Ferroptozun temel özelliklerinden olan aşırı demir birikiminin, lipid peroksidasyonu ve doku hasarı aracılığı ile ateroskleroz ve diyabete yol açabileceği düşünülmüştür.

Çalışma ekibimiz tarafından gerçekleştirilen “Metabolik Sendrom ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi” başlıklı 214S340 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında yapılan RNA ekspresyon array çalışmasında *RTN3* ve *CAT* genlerin anlatımlarının metabolik sendrom hasta grubunda kontrol grubuna göre değiştiği gözlemlenmiştir. Metabolik sendrom hastalığının kriterleri arasında bulunan diyabet, insülin direnci, glukoz toleransı, hipertansiyon, dislipidemi ve abdominal obezite aynı zamanda koroner arter hastalığının önemli risk faktörleri arasında gösterilmektedir (113). Bu nedenle metabolik sendromlu bireylerde farklı anlatıma sahip bu genler, koroner arter hastalığı açısından önemli olabilecekleri düşünülerek çalışmamıza dahil edildi.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda, öncelikle HEPG2 hücrelerinde ferroptozun indüklenmesi ve baskılanması için gerekli koşulların optimum düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan literatür araştırması sonucunda HEPG2 hücrelerinde 20 μ M erastin ile hücre ölüm oranının yaklaşık %20 olduğu bulunmuştur (106). Bu sonuç göz önüne alınarak çalışmamızda yapılan farklı konsantrasyon denemelerinde 25 μ M erastin eklendiğinde hücrelerin canlılık oranının yaklaşık %60 olduğu gözlemlenmiştir. Ardından ferroptozun indüklendiği ve hem indükleyici hem de baskılayıcı içeren koşullar arasında lipid peroksidasyon düzeyleri kıyaslanmış ve fark görülebilmiştir. Bu sebeple erastin konsantrasyonunun arttırılmasına karar verilmiş olup deneyler 35 μ M erastin ile tekrarlanmıştır. Canlılık oranlarının yaklaşık değerlerinde fark gözlemlenmezken lipid peroksidasyonunda artış görülmüş ve bu artış Fer-1 eklenmesi ile azalmıştır. Bu sonuçlar sebebiyle optimum konsantrasyon 35

μ M erastin olarak belirlenmiş ve gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için bu koşullardan RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ferroptoz duyarlılık hücre tipleri arasında fark göstermektedir, bu sebeple optimum konsantrasyonların belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (69).

ER tübüler ağlarının düzenlenmesinde görev alan RTN3'ün yapılan çalışmalarda ateroskleroz mekanizmasında rol oynuyor olabileceği gösterilmiştir. KAH hastası bireylerde plazma RTN3 düzeylerinin arttığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında aterosklerotik köpük hücre oluşumunda RTN3 anlatım düzeylerinin ve hücre içi lokalizasyonunun değiştiği gösterilmiştir (78). Bu tez çalışmasında da hasta grubu ve kontrol grubu karşılaştırıldığında RTN3 gen anlatımının hastalarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, çalışmamızda hücre kültürü koşullarında ferroptozun indüklendiği koşulda RTN3 ekspresyon düzeyinin negatife göre azalmış olduğu ve Fer-1 eklenmesiyle gen anlatımının daha da azaldığı gözlemlenmiştir. Memeli hücrelerinde, ER-fajinin, ER'de lokalize proteinlerin, ER ile ilişkili protein yıkımı (ERAD) yolu ile proteazomal yıkımının verimsiz olması durumunda yedek bir plan olduğu gösterilmiştir. ER bileşenlerinin otofajiyle degradasyonu olarak tanımlanan ER-fajinin reseptörlerinden birinin RTN3 olduğu belirlenmiştir (75). ER stresinin artmasıyla, RTN3 aracılığıyla gerçekleşen ER degradasyonunun artacağı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada erastin eklenmesinin ER stresini de arttırdığı gösterilmiştir (114). Bizim çalışmamızda erastin ve Fer-1 eklenmesi ile RTN3 anlatımının değişmesinin bu mekanizmalar ile ilişki olabileceğini düşünmekteyiz. Bu genin HEPG2 hücrelerinde düşük anlatıma sahip olması ekspresyon düzeylerinin çalışılmasını zorlaştırmıştır.

Hücre için toksik olan hidrojen peroksitin su ve oksijene ayrılmasını sağlayan reaksiyonu katalizleyen katalaz enzimi, türler arasında oldukça korunmuş olup organizma için büyük önem arz etmektedir. Daha önce yapılan hayvan deneylerinde ApoE^{-/-} farelerde katalazın aşırı eksprese edilmesinin ateroskleroz ilerlemesini yavaşlattığı gösterilmiştir (82). Bir başka çalışmada aşırı anlatımının hücrelerin oksitlenmiş lipidlere olan duyarlılığını azalttığı gösterilmiştir (83). Ayrıca 42 hasta-kontrol çalışmasını içeren bir meta-analiz çalışmasında, katalaz aktivitesi ve KAH riski ters orantılı olarak ilişkili gösterilmiştir (115). Bu tez çalışmasında katalazı kodlayan *CAT* geninin ifadesinin hastalarda kontrollere göre anlamlı olarak daha az olduğu bulunmuş ve bu sonuç literatürdeki bilgiler ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir. HEPG2 hücrelerinde

ferroptozun indüklenmesi ile *CAT* gen ifadesinin azaldığı ve Fer-1 ile erastin içeren koşulda sadece erastin içeren koşula göre anlatımın az da olsa arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, ferroptoz oluşumunun KAH riskini arttıran bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir.

SLC25A1 geni yağ asidi ve sterol biyosentezi, glukoneogenez ve glikolizde görev alan CIC'yi kodlamaktadır. Daha önce yapılan bir çalışma CIC'nin, IDH1 ve IDH2 ile beraber glutatyon rejenerasyonunda rol oynuyor olabileceği gösterilmiştir (85). Glutatyon ROS'ların detoksifiye edilmesini sağlayan GPX4 için kofaktör olması yönünden büyük önem taşımaktadır. Ferroptoz ile hücre ölümünde temel role sahip olan glutatyon azalması, bu genin önemli bir hedef olduğunu düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında, *SLC25A1* gen anlatım düzeyinde ferroptotik hücre ölümünün indüklenmesiyle düşüş görülmüştür. Değişim görülmüş olmasının altında yatan mekanizmanın tanımlanabilmesi için proteinin etkileşimde olduğu diğer proteinlerin anlatımının da incelenmesi gerektiği düşünülmüştür. Hasta-kontrol grupları arasında *SLC25A1* gen anlatım düzeyleri karşılaştırıldığında hastalarda anlatımının anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Daha önce yapılan bir çalışmada tümör nekroz faktörü α 'nın (TNF α) *SLC25A1* gen anlatımı ve protein aktivitesini indüklediği gösterilmiştir (88). Yapılan hayvan çalışmalarında TNF α 'nın azalmasının ApoE $^{-/-}$ farelerde ateroskleroza azalttığı gösterilmiştir (116). Bu bilgiler sonucunda çalışmamızda elde edilen sonucun literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Lipid hidroperoksitleri alkollere ve suya indirgeyerek hücreyi oksidatif hasara karşı koruyan GPX4, bu özelliği sebebiyle ferroptoz ile hücre ölümüne karşı hücrenin en önemli savunma mekanizmasını oluşturmaktadır (96). Yapılan çalışmalarda GPX4'ün aşırı eksprese olmasının RSL3 ile indüklenen ferroptozu baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca Panc1 hücrelerinde yapılan bir çalışmada erastin ile ferroptoz indüklendiğinde *GPX4* gen anlatımı değişmezken protein anlatımı ve aktivitesinin artan erastin konsantrasyonu ile azaldığı gösterilmiştir (117). Bu tez çalışmasında, ferroptozun indüklenmesi ile *GPX4* gen anlatımının kontrole göre azaldığı gösterilmiştir. *GPX4* gen anlatım düzeyindeki azalma, HEPG2 hücrelerinde ferroptotik hücre ölümünün başarılı bir şekilde oluşturulduğunu destekleyen bir veridir. Ayrıca, sistem Xc- inhibisyonu ile azalan glutatyonun GPX4 dışında, hücre sağ kalımı açısından daha önemli diğer mekanizmalar tarafından kullanılabilmesi için *GPX4* gen anlatımı düzeyinin farklı

kontrol mekanizmaları ile azaltılmış olabileceği düşünülmektedir. Deney hayvanları üzerinde yapılan bir çalışmada, ApoE-/- farelerde GPX4 aşırı ekspresyonunun ateroskleroz gelişimini azalttığı gösterilmiştir (102). Bu tez çalışması kapsamında yapılan deneylerde, hasta ve kontrol grupları GPX4 gen anlatımları bakımından karşılaştırıldığında, iki grup arasında bir fark görülmemiş ve standart sapmanın yüksek olduğu tespit edilmiştir. Standart sapmanın çalışma grubunun sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmüş olup, hasta ve kontrol gruplarının genişletilmesi ile çalışmanın tekrarlanması gerekmektedir.

Pozitif fonksiyonlarının yanında, hemenin hücrede metabolize edilmeden serbest halde bulunması ROS oluşumuna sebep olarak oksidatif stres oluşmasına, dolayısıyla hücre ve doku hasarına yol açmaktadır (118). *HMOX1* tarafından kodlanan HO-1, hemeyi metabolize ederek CO, biliverdin ve Fe²⁺ üretmektedir. Erastin ve RSL3 gibi ferroptoz indükleyiciler ile ROS oluşumunun artması sonucunda oluşan oksidatif strese yanıt olarak hücrede Nrf2 transkripsiyon faktörünün uyarıldığı ve *HMOX1* ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (94). HT-1080 hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada ferroptotik hücre ölümü erastin ile indüklendiğinde *HMOX1* gen anlatımının yaklaşık 10 kat arttığı gözlemlenmiştir (119). Bu bilgiler ile uyumlu olarak, bu tez çalışmasında, hücre kültürü deneyleri sonucunda *HMOX1* ekspresyonunun erastin içeren tüm koşullarda arttığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında, yapılan vaka-kontrol çalışmalarında HO-1'in ateroskleroza karşı koruyucu özellikler gösterdiği paylaşılmıştır. Bu konuyla ilgili en önemli kanıtlardan biri oldukça nadir görülen HO-1 eksikliğine sahip 6 yaşında bir erkek çocukta otopsi sırasında görülen hiperlipidemi, karaciğerde köpüksü makrofajlar, aortta görülen yağ çizgisi ve fibröz plak oluşumlarıdır (120). Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarında *HMOX1* gen anlatım düzeyleri karşılaştırıldığında, hastalarda anlatımın azaldığı gözlemlenmiştir fakat sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Açıl-CoA esterlerin sentezinden görevli ve AA'ları açılleyen ACSL4 aynı isimli genden kodlanmaktadır. Sıklıkla peroksidasyona uğrayan lipid membranlardaki PUFA'lar ferroptoz oluşumu açısından büyük önem arz etmektedir. LPCAT3 ile beraber bu sürece katkıda bulunan ACSL4'ün RSL3 ile indüklenen ferroptozu arttırdığı gösterilmiştir (105). Aynı zamanda yapılan çalışmalarda, ACSL4'ün ferroptozun gerçekleşebilmesi için gerekli bir protein olduğu genin çeşitli hücre hatlarında *knockdown* edilmesi sonucu ferroptoz ile hücre ölümünün gerçekleşmemesiyle kanıtlanmıştır.

Çalışmada ACSL4 protein ekspresyonunun ferroptozun erastin ile indüklenmesi sonucu arttığı gösterilmiş, fakat gen anlatım düzeyinde değişim olup olmadığı sonuçlar arasında gösterilmemiştir (106). Bu tez çalışmasında ise hücre kültürü ortamında *ACSL4* gen anlatım düzeyinde bir fark gözlemlenmemiştir. Bu durumun, post-transkripsiyonel regülasyonlardan kaynaklanabileceği düşünülmüş olsa da temelde yatan neden protein çalışmalarının da gerçekleştirilmesinin ardından anlaşılacak olup protein çalışmaları planlanmaktadır. Literatürde KAH ile *ACSL4* ilişkisini içeren kaynakların sayısının oldukça az olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada rosiglitazone kullanılarak ACSL4 aktivitesinin inhibe edilmesi sonucunda yağ asitlerinin esterleşmesinin azaldığı gösterilmiştir (121). Bir diğer çalışmada, kararsız aterosklerotik plaklar, stabil plaklarla karşılaştırıldığında, ACSL4 anlatımının stabil plaklarda daha az olduğu öne sürülmüştür (122). Bu tez çalışmasında hasta ve kontrol örnekleri arasında *ACSL4* gen anlatım düzeyleri karşılaştırıldığında hastalarda *ACSL4* anlatımının arttığı gözlemlenmiş olsa da sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bu çalışmada, hücre içi sistin alımının en önemli yolu olan glutamat sistin antiporteri, sistem Xc-‘nin yapısını oluşturan proteinlerden birini kodlayan *SLC7A11* geninin anlatım düzeyleri hasta-kontrol gruplarında ve ferroptoz koşulları altında incelenmiştir (107). Yapılan çalışmalar, *SLC7A11* anlatımındaki değişimlere sebep olan elektrofili ajanlar ve hücresel streslerin, bu durumu Nrf2 transkripsiyon faktörü aracılığı ile gerçekleştirdiği göstermiştir (109). *SLC7A11* gen anlatımının gen transfeksiyonu ile artırılmasının ferroptozu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasında erastin ile indüklenen ferroptoz sonucunda bu genin anlatımının yaklaşık 3 kat arttığı gösterilmiştir. Bu durumun Nrf2 transkripsiyon faktörünün etkisiyle oluşmuş olabileceği düşünülmüştür. Hasta ve kontrol grupları arasında gen anlatım düzeyi karşılaştırıldığında, hastalarda *SLC7A11* anlatımının arttığı görülmüş fakat bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. *Systems Approach to Biomarker Research* (SABRe) isimli geniş bir çalışma grubunda yapılan araştırma sonucunda bu genin KKH hastalarında kontrol grubuna göre ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir (123). Gen anlatım düzeyinin değişmesinin altında yatan mekanizma henüz aydınlatılamamış olsa da çalışma sonuçlarının bizim sonuçlarımız ile aynı yönde olduğu görülmüştür.

Bu tez çalışmasının en önemli sınırlayıcı faktörünün KAH hasta grubu ve KAH hastası olmayan kontrol grubunun sayılarının az olması olduğu düşünülmektedir.

Projenin devamında grupların seçimine ek kriterler de eklenerek grupların genişletilmesi planlanmaktadır. Gen anlatım düzeylerinde görülen standart sapmaların en düşük düzeye getirilmesi ile daha güvenilir sonuçlar elde edilecektir.

Ayrıca, bu çalışma bu konuda grubumuzca yapılan ilk çalışma olduğundan koşulların optimizasyonunun sağlanması projenin birincil hedefi olarak belirlenmiştir. Hücre canlılık oranları ve lipid peroksidasyon oranları incelendiğinde Fer-1 içeren koşullarda negatif koşullara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu oranlar incelendiğinde hücrelerin ferroptotik hücre ölümünden kurtulduğu kanaatine varılmıştır. Bu sonuçlara göre optimizasyon aşamasında başarı kriterleri sağlanmıştır. Gen anlatım düzeylerinin incelenmesi sonucunda genlerin büyük kısmında, Fer-1 eklenen koşullarda negatif ile kat farkının azaldığı fakat erastin içeren koşula benzer olduğu gözlemlenmiştir. Fer-1, oluşan ROS miktarının azaltılmasında radikal tutucu olarak görev yapmaktadır. Hücre içi glutatyon düzeyinde bir değişime sebep olmadığından oksidatif stres dışındaki faktörlerden etkilenen gen anlatımları üzerinde büyük bir etkisi olması beklenmemektedir. Çalışmaların devamında genlerin kodladığı proteinlerin anlatım düzeylerinin incelenmesi planlanmaktadır. Protein anlatım düzeylerinin inhibisyonun tam olarak sağlanıp sağlanamadığı konusunda daha iyi bir belirteç olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis: Insight Review Article. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/35025203>
2. Ross, R., & others. (1999). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American Heart Journal*. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0146-7>
3. Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., ... Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
4. Ehara, S., Ueda, M., Naruko, T., Haze, K., Itoh, A., Otsuka, M., ... Becker, A. E. (2001). Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.15.1955>
5. World Health Organisation. (2009). Global Health Risks. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global.
6. Navab, M., Fogelman, A. M., Berliner, J. A., Territo, M. C., Demer, L. L., Frank, J. S., ... & Lusis, A. J. (1995). Pathogenesis of atherosclerosis. *The American journal of cardiology*, 76(9), 18C-23C.
7. Gerrity, R. G. (1981). The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *The American Journal of Pathology*.
8. Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis LIBBY2002. *Nature*.
9. Wilck, N., & Ludwig, A. (2014). Targeting the Ubiquitin-Proteasome System in Atherosclerosis: Status Quo, Challenges, and Perspectives. *Antioxidants & Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5805>
10. Sary, H. C., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., ... Wissler, R. W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.89.5.2462>
11. Katz, S. S., Shipley, G. G., & Small, D. M. (1976). Physical chemistry of the lipids of human atherosclerotic lesions. Demonstration of a lesion intermediate between

- fatty streaks and advanced plaques. *Journal of Clinical Investigation*.
<https://doi.org/10.1172/JCI108450>
12. DM, S. (1988). George Lyman Duff memorial lecture. *Arteriosclerosis*.
 13. Sary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., ... Wissler, R. W. (2012). A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Circulation*.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.92.5.1355>
 14. Glagov, S., Weisenberg, E., Zarins, C. K., Stankunavicius, R., & Kolettis, G. J. (1987). Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *The New England Journal of Medicine*.
<https://doi.org/10.1056/NEJM198705283162204>
 15. Yin J, Sary HC. Differences in thrombosis and composition of advanced atherosclerotic lesions between natives and non-natives of Alaska. *FASEB J*.1994; 8:A268.
 16. Libby, P., & Aikawa, M. (2002). Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. *Nature Medicine*.
<https://doi.org/10.1038/nm1102-1257>
 17. Lusis, A. J. (2012). Genetics of atherosclerosis. *Trends in Genetics*.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.03.001>
 18. Atherosclerosis, Ronak Delewi, MD; Hayang Yang, MsC; John Kastelein, MD, PhD <https://www.textbookofcardiology.org/wiki/Atherosclerosis>
 19. Bergheanu, S. C., Bodde, M. C., & Jukema, J. W. (2017). Pathophysiology and treatment of atherosclerosis: Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment. *Netherlands Heart Journal*.
<https://doi.org/10.1007/s12471-017-0959-2>
 20. Jawad, E., & Arora, R. (2008). Chronic stable angina pectoris. *Disease-a-month*: DM, 54(9), 671.
 21. Kumar, A., & Cannon, C. P. (2009). Acute coronary syndromes: Diagnosis and management, part I. *Mayo Clinic Proceedings*. <https://doi.org/10.4065/84.10.917>
 22. Makki, N., Brennan, T. M., & Girotra, S. (2015). Acute coronary syndrome. *Journal of intensive care medicine*, 30(4), 186-200.

23. Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Douadi, M., Baradaran, A., & Nasri, H. (2014). Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *International Journal of Preventive Medicine*.
24. Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R., & Collins, R. (2002). Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11911-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11911-8)
25. Howard, G., Wagenknecht, L. E., Burke, G. L., Diez-Roux, A., Evans, G. W., McGovern, P., ... Tell, G. S. (1998). Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.279.2.119>
26. Yatsuya, H., & Folsom, A. R. (2010). Risk of incident cardiovascular disease among users of smokeless tobacco in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *American Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq191>
27. Khera, A. V., & Kathiresan, S. (2017). Genetics of coronary artery disease: Discovery, biology and clinical translation. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.160>
28. Paffenbarger, R. S., Hyde, R. T., Wing, A. L., Lee, I. M., Jung, D. L., & Kampert, J. B. (1993). The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *The New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJM199302253280804>
29. Poirier, P., Giles, T. D., Bray, G. A., Hong, Y., Stern, J. S., Pi-Sunyer, F. X., & Eckel, R. H. (2006). Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000216787.85457.f3>
30. Grady, D., Herrington, D., Bittner, V., Blumenthal, R., Davidson, M., Hlatky, M., ... Wenger, N. (2002). Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and estrogen/progestin replacement study follow-up (HERS II). *Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.288.1.49>
31. Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., ... Writing Group for the Women's Health Initiative

- Investigators. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*.
32. Haffner, S., Letho, S., Ronnemaa, T., Pyorala, K., & Laakson, M. (1998). Mortality from coronary heart disease in subjects with and without type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*.
 33. Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*.
 34. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ... Melino, G. (2009). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
 35. Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., ... Kroemer, G. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.44>
 36. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., & Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90071-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90071-3)
 37. Oltval, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90509-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-O)
 38. Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>
 39. Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>
 40. Artal-Sanz, M., & Tavernarakis, N. (2005). Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.052>

41. Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., ... Kroemer, G. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>
42. Galluzzi, L., Kepp, O., Krautwald, S., Kroemer, G., & Linkermann, A. (2014). Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.006>
43. Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2970>
44. Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., ... Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1038/nchembio711>
45. Wilson, C. A., & Browning, J. L. (2002). Death of HT29 adenocarcinoma cells induced by TNF family receptor activation is caspase-independent and displays features of both apoptosis and necrosis. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401107>
46. Dixon, S. J., & Stockwell, B. R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1416>
47. Skouta, R., Dixon, S. J., Wang, J., Dunn, D. E., Orman, M., Shimada, K., ... Stockwell, B. R. (2014). Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja411006a>
48. Dixon, S. J., Patel, D., Welsch, M., Skouta, R., Lee, E., Hayano, M., ... Stockwell, B. R. (2014). Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.02523>
49. Lemberg, K. M. (2011). Ferroptosis: A Novel Form of Cancer Cell Death Induced by the Small Molecule Erastin.

50. Yang, W. S., Sriramaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., ... Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010>
51. Yagoda, N., Von Rechenberg, M., Zaganjor, E., Bauer, A. J., Yang, W. S., Fridman, D. J., ... Stockwell, B. R. (2007). RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature05859>
52. Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., ... Tang, D. (2016). Ferroptosis: Process and function. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.158>
53. Raimundo, N., Song, L., Shutt, T. E., McKay, S. E., Cotney, J., Guan, M. X., ... Shadel, G. S. (2012). Mitochondrial stress engages E2F1 apoptotic signaling to cause deafness. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.027>
54. Hamacher-Brady, A., Stein, H. A., Turschner, S., Toegel, I., Mora, R., Jennewein, N., ... Brady, N. R. (2011). Artesunate activates mitochondrial apoptosis in breast cancer cells via iron-catalyzed lysosomal reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.210047>
55. Bittker, J. A. et al. in *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program* (National Center for Biotechnology Information (US), 2010). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55069/>
56. Dolma, S., Lessnick, S. L., Hahn, W. C., & Stockwell, B. R. (2003). Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00050-3)
57. Yang, W. S., & Stockwell, B. R. (2008). Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death in Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells. *Chemistry and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.02.010>
58. Arnér, E. S. J. (2010). Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.032>

59. Angeli, J. P. F., Shah, R., Pratt, D. A., & Conrad, M. (2017). Ferroptosis Inhibition: Mechanisms and Opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.02.005>
60. Kuhn, H., Banthiya, S., & Van Leyen, K. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.10.002>
61. Friedmann Angeli, J. P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Hammond, V. J., ... Conrad, M. (2014). Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb3064>
62. Fearnhead, H. O., Vandenabeele, P., & Berghe, T. Vanden. (2017). How do we fit ferroptosis in the family of regulated cell death? *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.149>
63. Savaskan, N. E., Ufer, C., Kühn, H., & Borchert, A. (2007). Molecular biology of glutathione peroxidase 4: From genomic structure to developmental expression and neural function. *Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.126>
64. Buettner, G. R. (1993). The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>
65. Dalleau, S., Baradat, M., Guéraud, F., & Huc, L. (2013). Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.138>
66. Barrera, G. (2012). Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>
67. Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., & Devireddy, L. (2012). Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi300752r>
68. Cao, J. Y., & Dixon, S. J. (2016). Mechanisms of ferroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2194-1>
69. Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., ... Zhang, D. D. (2017). Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>

70. Medbury, H. J., James, V., Ngo, J., Hitos, K., Wang, Y., Harris, D. C., & Fletcher, J. P. (2013). Differing association of macrophage subsets with atherosclerotic plaque stability. *International Angiology*.
71. Recalcati, S., Locati, M., Marini, A., Santambrogio, P., Zaninotto, F., De Pizzol, M., ... Cairo, G. (2010). Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *European Journal of Immunology*.
<https://doi.org/10.1002/eji.200939889>
72. Matthews, A. J., Vercellotti, G. M., Menchaca, H. J., Bloch, P. H. S., Michalek, V. N., Marker, P. H., ... Buchwald, H. (1997). Iron and atherosclerosis: Inhibition by the iron chelator deferiprone (L1)1. *Journal of Surgical Research*.
<https://doi.org/10.1006/jsre.1997.5180>
73. Risko, P., Pláteník, J., Buchal, R., Potocková, J., & Kraml, P. J. (2017). The Labile Iron Pool in Monocytes Reflects the Activity of the Atherosclerotic Process in Men With Chronic Cardiovascular Disease. *Physiological Research*.
74. Baba, Y., Higa, J. K., Shimada, B. K., Horiuchi, K. M., Suhara, T., Kobayashi, M., ... Matsui, T. (2017). Protective Effects of the Mechanistic Target of Rapamycin against Excess Iron and Ferroptosis in Cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00452.2017>
75. Grumati, P., Dikic, I., & Stolz, A. (2018). ER-phagy at a glance. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.217364>
76. Liu, Q., Gan, M., Qi, Y., Li, L., & Qi, B. (2003). Dimerization of two novel apoptosis-inducing proteins and its function in regulating cell apoptosis. *Science in China. Series C, Life Sciences / Chinese Academy of Sciences*.
<https://doi.org/10.1360/03yc9024>
77. Acevedo, L., Yu, J., Erdjument-Bromage, H., Miao, R. Q., Kim, J. E., Fulton, D., ... Sessa, W. C. (2004). A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1020>
78. Chen, Y., Zhao, S., & Xiang, R. (2010). RTN3 and RTN4: Candidate modulators in vascular cell apoptosis and atherosclerosis. *Journal of Cellular Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1002/jcb.22838>

79. Nishikawa, M., Hashida, M., & Takakura, Y. (2009). Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.01.001>
80. Putnam, C. D., Arvai, A. S., Bourne, Y., & Tainer, J. A. (2000). Active and inhibited human catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3458>
81. Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 443.
82. Yang, H., Roberts, L. J., Ming, J. S., Li, C. Z., Ballard, B. R., Richardson, A., & Zhong, M. G. (2004). Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000149564.49410.0d>
83. Guo, Z. M., Van Remmen, H., Yang, H., Chen, X. L., Mele, J., Vijg, J., ... Richardson, A. (2001). Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/hq0701.092092>
84. Kaplan, R. S., Mayor, J. A., & Wood, D. O. (1993). The mitochondrial tricarboxylate transport protein. cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins. *Journal of Biological Chemistry*.
85. Jiang, L., Shestov, A. A., Swain, P., Yang, C., Parker, S. J., Wang, Q. A., ... Deberardinis, R. J. (2016). Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature17393>
86. Morciano, P., Carrisi, C., Capobianco, L., Mannini, L., Burgio, G., Cestra, G., ... Cenci, G. (2009). A conserved role for the mitochondrial citrate transporter Sea/SLC25A1 in the maintenance of chromosome integrity. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp370>
87. Catalina-Rodriguez, O., Kolukula, V. K., Tomita, Y., Preet, A., Palmieri, F., Wellstein, A., ... Avantiaggiati, M. L. (2012). The mitochondrial citrate

- transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.714>
88. Infantino, V., Iacobazzi, V., Menga, A., Avantiaggiati, M. L., & Palmieri, F. (2014). A key role of the mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) in TNF α - and IFN γ -triggered inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.013>
 89. Palmieri, E. M., Spera, I., Menga, A., Infantino, V., Porcelli, V., Iacobazzi, V., ... Castegna, A. (2015). Acetylation of human mitochondrial citrate carrier modulates mitochondrial citrate/malate exchange activity to sustain NADPH production during macrophage activation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.04.009>
 90. Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L., & Artero, R. (2006). The Muscleblind family of proteins: An emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation*. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00060.x>
 91. Liu, H., Lorenzini, P. A., Zhang, F., Xu, S., Wong, M. S. M., Zheng, J., & Roca, X. (2018). Alternative splicing analysis in human monocytes and macrophages reveals MBNL1 as major regulator. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky401>
 92. Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2009). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: From metabolism to molecular therapy. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0170TR>
 93. Morita, T. (2005). Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(9), 1786-1795.
 94. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., ... Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>
 95. Chiang, S. K., Chen, S. E., & Chang, L. C. (2019). A dual role of heme oxygenase-1 in cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20010039>

96. Borchert, A., Kalms, J., Roth, S. R., Rademacher, M., Schmidt, A., Holzhutter, H. G., ... Scheerer, P. (2018). Crystal structure and functional characterization of selenocysteine-containing glutathione peroxidase 4 suggests an alternative mechanism of peroxide reduction. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.06.006>
97. Imai, H., & Nakagawa, Y. (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01197-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01197-8)
98. Imai, H., Saito, M., Kirai, N., Hasegawa, J., Konishi, K., Hattori, H., ... Nakagawa, Y. (2006). Identification of the positive regulatory and distinct core regions of promoters, and transcriptional regulation in three types of mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj186>
99. Scheerer, P., Borchert, A., Krauss, N., Wessner, H., Gerth, C., Höhne, W., & Kuhn, H. (2007). Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry*, 46(31), 9041-9049.
100. Yang, W. S., Kim, K. J., Gaschler, M. M., Patel, M., Shchepinov, M. S., & Stockwell, B. R. (2016). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603244113>
101. Imai, H., Matsuoka, M., Kumagai, T., Sakamoto, T., & Koumura, T. (2017). Lipid peroxidation-dependent cell death regulated by GPx4 and ferroptosis. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*. https://doi.org/10.1007/82_2016_508
102. Guo, Z. M., Ran, Q., Roberts, L. J., Zhou, L., Richardson, A., Sharan, C., ... Yang, H. (2008). Suppression of atherogenesis by overexpression of glutathione peroxidase-4 in apolipoprotein E-deficient mice. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.09.009>
103. KORNBERG, A., & PRICER, W. E. (1953). Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of long chain fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry*.

104. Soupene, E., & Kuypers, F. A. (2008). Mammalian Long-Chain Acyl-CoA Synthetases. *Experimental Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.3181/0710-MR-287>
105. Dixon, S. J., Winter, G. E., Musavi, L. S., Lee, E. D., Snijder, B., Rebsamen, M., ... Stockwell, B. R. (2015). Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. *ACS Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00245>
106. Yuan, H., Li, X., Zhang, X., Kang, R., & Tang, D. (2016). Identification of ACSL4 as a biomarker and a molecontributor of ferroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.124>
107. Bannai, S. (1986). Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*
108. Conrad, M., & Sato, H. (2012). The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x_c⁻: Cystine supplier and beyond. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0867-5>
109. Sasaki, H., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Sato, K., Maebara, K., Wang, H., ... Bannai, S. (2002). Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208704200>
110. Shih, A. Y., Johnson, D. A., Wong, G., Kraft, A. D., Jiang, L., Erb, H., ... Murphy, T. H. (2003). Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*.
111. Drummen, G. P. C., Van Liebergen, L. C. M., Op den Kamp, J. A. F., & Post, J. A. (2002). C11-BODIPY581/591, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (Micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radical Biology and Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00848-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00848-1)
112. Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>

113. Arslan, M., Atmaca, A., Ayvaz, G., Başkal, N., Beyhan, Z., Bolu, E., ... & Demirer, A. N. (2009). Metabolik Sendrom Klavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği.
114. Lee, Y.-S., Lee, D.-H., Choudry, H. A., Bartlett, D. L., & Lee, Y. J. (2018). Ferroptosis-Induced Endoplasmic Reticulum Stress: Cross-talk between Ferroptosis and Apoptosis. *Molecular Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-18-0055>
115. Flores-Mateo, G., Carrillo-Santistevé, P., Elosua, R., Guallar, E., Marrugat, J., Bleys, J., & Covas, M.-I. (2009). Antioxidant Enzyme Activity and Coronary Heart Disease: Meta-analyses of Observational Studies. *American Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp112>
116. Bråné, L., Hovgaard, L., Nitulescu, M., Bengtsson, E., Nilsson, J., & Jovinge, S. (2004). Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000143933.20616.1b>
117. Zhu, S., Zhang, Q., Sun, X., Zeh, H. J., Lotze, M. T., Kang, R., & Tang, D. (2017). HSPA5 regulates ferroptotic cell death in cancer cells. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1979>
118. Chiabrando, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S., & Tolosano, E. (2014). Heme in pathophysiology: A matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00061>
119. Kwon, M.-Y., Park, E., Lee, S.-J., & Chung, S. W. (2015). Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5162>
120. Kawashima, A., Oda, Y., Yachie, A., Koizumi, S., & Nakanishi, I. (2002). Heme oxygenase-1 deficiency: The first autopsy case. *Human Pathology*. <https://doi.org/10.1053/hupa.2002.30217>
121. Askari, B., Kanter, J. E., Sherrid, A. M., Golej, D. L., Bender, A. T., Liu, J., ... Bornfeldt, K. E. (2007). Rosiglitazone inhibits Acyl-CoA synthetase activity and fatty acid partitioning to diacylglycerol and triacylglycerol via a peroxisome proliferator-activated receptor- γ - Independent mechanism in human arterial

smooth muscle cells and macrophages. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db06-0267>

122. Golej, D. L., Askari, B., Kramer, F., Barnhart, S., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., & Bornfeldt, K. E. (2011). Long-chain acyl-CoA synthetase 4 modulates prostaglandin E₂ release from human arterial smooth muscle cells . *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1194/jlr.m013292>
123. Joehanes, R., Ying, S., Huan, T., Johnson, A. D., Raghavachari, N., Wang, R., ... Munson, P. J. (2013). Gene expression signatures of coronary heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.301169>



ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1738

Konu: Prof. Dr. Nihan Erginel ÜNALTUNA hk.

Tarih : 20.12.2018

Sayın Prof. Dr. Nihan Erginel ÜNALTUNA
Tıbbi Genetik

İlg: Genetik Anabilim Dalının 07/12/2018 gün ve 335814 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Aybike Sena ÖZUYNUK'un yürüteceği 2018/1681 dosya numaralı "Koroner Arter Hastalığında Rolü Olduğu Düşünülen Aday Gen(lerin) Fonksiyonel Analizi" başlıklı çalışma kurulumuzun 14/12/2018 tarih ve 21 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Ekl: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KORONER ARTER HASTALIĞINDA ROLÜ OLDUĞU DÜŞÜNÜLEN ADAY GEN(LER)İN FONKSİYONEL ANALİZİ

ORJİNALLIK RAPORU

%5	%3	%1	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	deneyselfip.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK) Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Cumhuriyet University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to Dumlupınar University Öğrenci Ödevi	<%1
8	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Aybike Sena	Soyadı	Özuynuk
Doğ.Yeri	Bakırköy/İstanbul	Doğ.Tar.	28.02.1994
Email	aybikesena@gmail.com	Uyruğu	T.C

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2019
Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi	2017
Lise	Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi	2012

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	90.0	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	83		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

- **Ozuynuk AS**, Coban N, Erkan AF, Ekici B, Vurgun E, Erginel-Unaltuna N, Diker IY. “The role of lipid, sex hormone and inflammation pathway genes polymorphisms on coronary artery disease in Turks” (2018). European Atherosclerosis Society Congress 05-08 May 2018, Lisbon, Portugal.

- Pirim D, Coban N, Erkan AF, Ekici B, Erginel-Unaltuna N, Diker IY, **Ozuynuk AS**. “A novel mirsnp at the IGF1 3'UTR may modulate the mirna-mediated gene expression in cardiovascular disease” (2018). European Atherosclerosis Society Congress 05-08 May 2018, Lisbon, Portugal.
- Coban N, **Ozuynuk AS**, Erkan AF, Ekici B, Vurgun E, Erginel-Unaltuna N, Diker IY. “The role of lipoprotein metabolism and inflammatory gene polymorphisms on the coronary artery disease with type 2 diabetes mellitus” (2018). European Atherosclerosis Society Congress 05-08 May 2018, Lisbon, Portugal.
- Coban N, **Ozuynuk AS**, Erkan AF, Ekici B, Erginel-Unaltuna N, Vurgun E. “Genetic risk factors for coronary artery disease that are specific to Turkish population” (2018). Turkish Cardiology Congress 20-23 October 2018, Antalya, Turkey.
- **Ozuynuk AS**, Guclu-Geyik F, Koseoglu P, Erginel-Unaltuna N, Coban N. “Silencing of CERS5 (Ceramide synthase 5) alters the protein and gene expression of atherosclerosis related genes in endothelial cells” (2018). National Congress on Medical Genetics 07-11 November 2018, Antalya, Turkey.
- **Ozuynuk AS**, Coban N. “ROLE OF MIR-18A AND MIR-584 ON AMPK PATHWAY IN ENDOTHELIAL CELLS” (2019). Balkan Congress of Human Genetics 17-20 April 2019, Edirne, Turkey.
- Coban N, **Ozuynuk AS**, Erginel-Unaltuna. “AMPK ACTIVATION DECREASES EXPRESSION OF MIR-130B IN ENDOTHELIAL CELLS” (2019). European Atherosclerosis Society Congress 26-29 May 2019, Maastricht, The Netherlands.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):