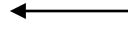


Adınızı soyadınızı giriniz

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)

**MİTOKONDİRİ METABOLİZMASINDA ROL ALAN AMPK
YOLAĞI İLE İLİŞKİLİ MİKRO RNA VE ADAY GENLERİN
ANLATIM DÜZEYLERİNİN KORONER ARTER
HASTALARINDA İNCELENMESİ**

NAZLI DOĞAN

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. NESLİHAN ÇOBAN**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK**

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübelerini her zaman içtenlikle paylaşarak bana yol gösteren; hoşgörüsü, motivasyonu ve iyimserliğini daima örnek alacağım değerli hocam Doç. Dr. Neslihan ÇOBAN'a,

Bu tez çalışmasında doku örneklerini çalışmama olanak sağlayan ve bu süreçte yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Arş. Gör. Dr. Filiz GÜÇLÜ GEYİK'e,

Bu tezin hazırlanmasında yol göstericiliği ile çok büyük emeği olup, her konuda ve her durumda yardımcı olan, motivasyonumun düşmesine asla izin vermeyen; kendisini her zaman iyi yerlerde görmeyi dilediğim canım arkadaşım Uz. Mol. Bio. Aybike Sena ÖZUYNUK'a,

Bu süreçte yardımları, iyimserliği ve göstermiş olduğu samimiyetini asla unutamayacağım canım arkadaşım Uz. Mol. Bio. Pınar KÖSEOĞLU'na,

Bu çalışmanın deneysel süreçlerinde ve yazımda kullandığım figürlerde büyük emeği olan sevgili Cemre Buse KIRŞAN'a ve desteğini her zaman hissettiren Aslıhan Gizem BİLGİN'e,

Yüksek Lisans eğitimime başlamam ve devam etmem konusunda desteğini esirgemeyen sevgili hocalarım Prof. Dr. Macit KOLDAŞ, Uz. Dr. Esma YÜCETAŞ, Uz. Dr. Yasemin Erdoğan DÖVENTAŞ ve Uzm. İbrahim YILMAZ'a,

Bu süreçte aynı zamanda görev aldığım İstanbul Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda birlikte çalışmaktan keyif aldığım, her zaman gösterdikleri destekleri ve içtenlikleri için Biyolog ve Laboratuvar Teknikeri arkadaşlarıma; bu süreç içinde her konuda büyük yardımları dokunan Biyokimya Laboratuvarı Sorumlusu Lab. Tek. Mustafa ORHAN'a,

Hiçbir şekilde hakkını ödeyemeyeceğim canım aileme,

TEŞEKKÜR EDERİM.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37688

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Koroner Arter Hastalığı	3
2.1.1. Ateroskleroz	3
2.1.1.1. Ateroskleroz Patogenezi.....	7
2.1.1.2. Aterosklerozun Klinik Belirtileri	9
2.1.1.3. Ateroskleroz için Risk Faktörleri	10
2.1.2. Epikardiyal Yağ Dokusu ve Ateroskleroz İlişkisi.....	12
2.2. Mitokondri	14
2.2.1. Mitokondrinin Yapısı.....	16
2.2.2. Mitokondrinin Fonksiyonu	18
2.2.3. Mitokondriyal Biyoenerjetik.....	19
2.3. Mitokondriyal Genom ve Mitokondriyal Genomun Düzenleyicileri	22
2.3.1. Mitokondriyal DNA Replikasyonu.....	23
2.3.2. Mitokondriyal DNA Kopya Sayıları.....	25
2.4. Mitokondriyal Biyogenez	26
2.4.1. Füzyon.....	26
2.4.2. Fisyon.....	27
2.4.3. Mitofaji.....	28
2.4.4. Mitokondriyal Biyogenezin Düzenleyicileri.....	30

2.4.4.1. AMPK	31
2.4.4.2. SIRT1/SIRT3	33
2.4.4.3. Mitokondriyal Biyogenezde Nükleer Genomun Diğer Protein Düzenleyicileri	33
2.5. Koroner Arter Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyon	34
2.6. Mitokondriyal Biyoenerjetikteki Bozulmalar ve Katkıda Bulunan Mekanizmalar	35
2.6.1. Reaktif Oksijen Türleri- Serbest Radikaller ve Yaşlanma	36
2.7. Koroner Arter Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyonda Rol Oynayan Aday MikroRNA'lar	37
2.7.1. miR-155-5p	39
2.7.2. miR-30a-5p	39
2.7.3. miR-326	40
2.7.4. miR-1247-5p	40
2.8. Koroner Arter Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyonda Rol Oynayan Aday Genler	41
2.8.1. AMPK Alt Birim Alfa 2 (<i>PRKAA2</i>) Geni	41
2.8.2. PGC-1 α (<i>PPARGC1A</i>)	42
2.8.3. <i>SIRT1</i> Geni	43
2.8.4. NF-kB Alt Birimi p65 (<i>RELA</i>) Geni	44
2.8.5. <i>TNFA</i> (TNF- α) Geni	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Gereçler	48
3.1.1. Çalışma Grubu Seçimi ve Dokuların Toplanması	48
3.1.2. Kitler	48
3.1.3. Cihazlar	49
3.2. Yöntemler	50
3.2.1. Doku Örneklerinin Homojenizasyonu ve RNA İzolasyonu	50
3.2.2. RNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü	50
3.2.3. Total RNA'dan cDNA Sentezi	51
3.2.3.1. Total RNA'dan mRNA cDNA Sentezi	51
3.2.3.2. Total RNA'dan miRNA cDNA Sentezi	52
3.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR	54
3.2.4.1. Gen Ekspresyon Analizinde qRT-PZR Uygulaması	55

3.2.4.2. MiRNA Ekspresyon Analizinde qRT-PZR Uygulaması	56
3.2.5. Rölatif Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Hesaplanması	57
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	57
4. BULGULAR.....	59
4.1. Çalışma Grubunun Değerlendirilmesi	59
4.2. Gen Anlatım Düzeylerinin Değerlendirilmesi	61
4.2.1. <i>PRKAA2</i> Anlatım Düzeyi.....	61
4.2.2. <i>PPARGC1A</i> Anlatım Düzeyi	64
4.2.3. <i>SIRT1</i> Anlatım Düzeyi	68
4.2.4. <i>RELA</i> Anlatım Düzeyi	71
4.2.5. <i>TNFA</i> Anlatım Düzeyi	73
4.3. MiRNA Anlatım Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	76
4.3.1. MiR-155-5p Anlatım Düzeyinin Değerlendirilmesi	76
4.3.2. MiR-30a-5p Anlatım Düzeyinin Değerlendirilmesi	80
4.3.3. MiR-326 Anlatım Düzeyinin Değerlendirilmesi	83
4.3.4. MiR-1247-5p Anlatım Düzeyinin Değerlendirilmesi	85
5. TARTIŞMA	93
KAYNAKLAR	106
ETİK KURUL KARARI	135
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	136
ÖZGEÇMİŞ	137

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Mitokondriyal genom ile nükleer genom karşılaştırması.....	22
Tablo 3-1. Kitler	49
Tablo 3-2. Cihazlar	50
Tablo 3-3. mRNA cDNA sentezinin I. aşama reaksiyon karışımı.....	51
Tablo 3-4. mRNA cDNA sentezi II. aşama reaksiyon karışımı.	52
Tablo 3-5. Total RNA'dan miRNA cDNA sentezi aşamaları ve reaktifleri.....	53
Tablo 3-6. Seçilen hedef gen primer dizileri	54
Tablo 3-7. miRNA assay'leri.....	55
Tablo 3-8. mRNA qRT-PZR reaksiyon bileşenleri.	55
Tablo 3-9. mRNA qRT-PZR koşulları.	56
Tablo 3-10. miRNA qRT-PZR reaksiyon bileşenleri.	56
Tablo 3-11. miRNA qRT-PZR reaksiyon koşulları.....	57
Tablo 4-1. Kontrol ve hasta grubunun karakteristik özellikleri.....	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Aterosklerotik lezyon oluşumu	5
Şekil 2-2. Aterosklerotik plak oluşum basamakları.....	6
Şekil 2-3. Ateroskleroz lezyonlarının zamana göre dağılımı ve lezyon tiplerinin fenotipleri.....	7
Şekil 2-4. Epikardiyal yağ dokusu.....	13
Şekil 2-5. Endosimbiyotik teori.....	15
Şekil 2-6. Nükleer DNA'dan kodlanan polipeptidlerin mitokondriye taşınımı.....	16
Şekil 2-7. Mitokondri yapısı.....	17
Şekil 2-8. Oksijenli solunum.....	21
Şekil 2-9. Mitokondriyal DNA replikasyonu.....	24
Şekil 2-10. Mitokondriyal biyogenez düzenleyicileri.....	30
Şekil 2-11. AMPK proteini alt birimleri.....	31
Şekil 2-12. MiRNA sentezinin şematik gösterimi.....	38
Şekil 2-13. <i>PRKAA2</i> geninden kodlanan AMPK'nın etkileşimi.....	41
Şekil 2-14. <i>PPARGC1A</i> geninden kodlanan PGC-1 α 'nın etkileşimi.....	43
Şekil 2-15. <i>SIRT1</i> geninden kodlanan SIRT1 proteininin etkileşimi.....	44
Şekil 2-16. <i>RELA</i> geninden kodlanan p65/RelA proteininin NF-kB sinyal yolağındaki rolü.....	45
Şekil 2-17. <i>TNFA</i> geninden kodlanan TNF- α proteininin NF-kB sinyal yolağı aktivasyonu.....	47
Şekil 4-1. KAH ve alt gruplarda <i>PRKAA2</i> anlatım düzeyleri.....	63
Şekil 4-2. <i>PRKAA2</i> anlatım düzeyinin KAH grubunda VKİ ile korelasyonu.....	64
Şekil 4-3. KAH ve alt gruplarda <i>PPARGC1A</i> anlatım düzeyleri.....	66
Şekil 4-4. <i>PPARGC1A</i> anlatım düzeyinin KAH grubunda açlık glukoz ile korelasyonu.....	67
Şekil 4-5. <i>PPARGC1A</i> anlatım düzeyinin KAH(+)DM(+) grubunda biyokimyasal parametreler ile korelasyonları.....	68
Şekil 4-6. KAH ve alt gruplarda <i>SIRT1</i> anlatım düzeyleri.....	70
Şekil 4-7. <i>SIRT1</i> anlatım düzeyinin KAH grubunda açlık glukoz parametresi ile korelasyonu.....	71
Şekil 4-8. KAH ve alt gruplarda <i>RELA</i> anlatım düzeyleri.....	72

Şekil 4-9. KAH ve alt gruplarda <i>TNFA</i> anlatım düzeyleri.	74
Şekil 4-10. <i>TNFA</i> anlatım düzeyinin KAH grubunda HDL kolesterol ve total kolesterol ile ilişkisi.	75
Şekil 4-11. <i>TNFA</i> anlatım düzeylerinin KAH-DM grubunda korelasyonları.	76
Şekil 4-12. KAH ve alt gruplarda EYD miR-155-5p anlatım düzeyleri.	77
Şekil 4-13. KAH ve alt gruplarında VYD miR-155-5p anlatım seviyeleri.	78
Şekil 4-14. EYD miR-155-5p anlatım düzeyinin KAH-DM grubunda CRP düzeyleri ile korelasyonu.	79
Şekil 4-15. VYD miR-155-5p anlatım düzeylerinin KAH grubunda açlık glukoz seviyeleri ile korelasyonu.	79
Şekil 4-16. MiR-155-5p anlatım düzeyinin KAH grubunda EYD <i>RELA</i> anlatım düzeyi ile korelasyonu.	80
Şekil 4-17. KAH, kontrol ve alt gruplarda EYD miR-30a-5p anlatım düzeyleri.	81
Şekil 4-18. KAH, kontrol ve alt gruplarda VYD miR-30-5p anlatım düzeyleri	82
Şekil 4-19. VYD miR-30a-5p anlatım düzeyi ve biyokimyasal parametrelerin korelasyonu.	83
Şekil 4-20. KAH, kontrol ve alt gruplarda EYD miR-326 anlatım düzeyleri.	84
Şekil 4-21. KAH, kontrol ve alt gruplarda VYD miR-326 anlatım düzeyi.	85
Şekil 4-22. KAH, kontrol ve alt gruplarda EYD miR-1247-5p anlatım düzeyi.	87
Şekil 4-23. KAH, kontrol ve alt gruplarda VYD miR-1247-5p anlatım düzeyi.	88
Şekil 4-24. EYD miR-1247-5p anlatım düzeyi ve VKİ korelasyonu.	89
Şekil 4-25. EYD miR-1247-5p anlatım düzeylerinin total kolesterol ve LDL kolesterol ile ilişkisi.	89
Şekil 4-26. EYD miR-1247-5p anlatımının açlık glukoz düzeyi ile ilişkisi.	90
Şekil 4-27. VYD miR-1247-5p anlatım düzeyinin kolesterol düzeyleri ile ilişkisi.	91
Şekil 4-28. MiR-1247-5p anlatım düzeyinin KAH grubunda EYD <i>PRKAA2</i> anlatım düzeyi ile korelasyonu.	91
Şekil 4-29. EYD miR-1247-5p anlatım düzeyinin KAH-DM grubunda EYD <i>PRKAA2</i> anlatım düzeyi ile korelasyonu.	92
Şekil 4-30. EYD miR-1247-5p anlatım düzeyinin KAH-DM grubunda EYD <i>TNFA</i> anlatım düzeyi ile korelasyonu.	92

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

(O₂⁻): Süperoksit Anyonu

ACTB: Beta Aktin

AMİ: Akut Miyokard İnfarktüsü

AMP: Adenozin Monofosfat

AMPK: AMP- Aktive Edici Protein Kinaz

ATP: Adenozin Trifosfat

B2M: Beta-2-Mikroglobulin

CaMKK β : Kalsiyum/Kalmodulin Bağlı Protein Kinaz

CAT: Katalaz

CRP: C-Reaktif Protein

dk: Dakika

DM: Diyabetes Mellitus

DNaz: Deoksiribonükleaz

dPZR: Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

eNOS: Endotel Nitrik Oksit Sentaz

ETZ: Elektron Taşıma Zinciri

EYD: Epikardiyal Yağ Dokusu

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

IL-1 β : İnterlökin 1 β

IL-6: İnterlökin 6

KAH: Koroner Arter Hastalığı

kb: Kilobaz

KVH: Kardiyovasküler Hastalıklar

KY: Kalp Yetmezliği

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

LKB1: Karaciğer Kinaz B1

M: Molar

MAPK p38: p38 Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz

MB: Mitokondriyal Biyogenez

mg: Miligram

Mİ: Miyokard İnfarktüsü

ml: Mililitre

MT-CYB: Mitokondriyal Sitokrom B

mtDNA: Mitokondriyal DNA

mtDNA-KS: Mitokondriyal DNA Kopya Sayıları

mtRNA: Mitokondriyal RNA

mtROT: Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türleri

mtSSB: Mitokondriyal Tek Dizi Bağlama Proteini

nDNA: Nükleer DNA

NF-Kb: Nükleer Faktör Kappa B

nm: Nanometre

NO: Nitrik Oksit

°C: Sanrigrat Derece

Ox-LDL: Okside LDL

POLRMT: Mitokondriyal RNA Polimeraz

PolY: Polimeraz Gamma

PPARGC1A: Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gamma Koaktivatör 1 Alfa Geni

PRKAA2: AMP- Aktive Edici Protein Kinaz Geni

qPZR: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RELA: NF-kB p65 Proteini Geni

RNaz: Ribonükleaz

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

rRNA: Ribozomal Ribonükleik Asit

SAP: Stabil Anjina Pektoris

SIRT: Sirtuin

sn: Saniye

ssDNA: Tek Sarmallı Deoksiribo Nükleik Asit

SYD: Subkutan Yağ Dokusu

T2DM: Tip 2 Diyabetes Mellitüs

Tak1: Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF)- β Aktive Kinaz 1

TFAM: Mitokondriyal Transkripsiyon Faktörü A

TNFA: Tümör Nekroz Faktörü α Geni

TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü α

tRNA: Transfer RNA

UCP1: Termogenin

USAP: Kararsız Anjina Pektoris

VYD: Viseral Yağ Dokusu

ÖZET

Doğan, N. (2022). Mitokondri Metabolizmasında Rol Alan AMPK Yolağı İle İlişkili MikroRNA ve Aday Genlerin Anlatım Düzeylerinin Koroner Arter Hastalarında İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Koroner arter hastalığı (KAH), yüksek mortalite prevalansı ile küresel sağlık sorunlarından biridir. KAH'ın önlenmesi için, KAH'ın temel nedeni ateroskleroz oluşumunda etkisi olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması önemlidir. Bu bağlamda, ateroskleroz oluşumunda oksidatif stres nedeniyle değişen mitokondri biyoregülasyonunda etkili genlerin ve mikroRNA'ların (miRNA) anlatım düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasında, *PRKAA2*, *PPARGC1A*, *SIRT1*, *RELA* ve *TNFA* gen anlatımları epikardiyal yağ dokusunda (EYD) ve miR-155-5p, miR-30a-5p, miR-1247-5p, miR-326 anlatım düzeyleri EYD ve viseral yağ dokularında (VYD) incelenmiştir.

63 KAH'lı ve 30 KAH olmayan bireye ait EYD örneklerinde ve 65 kişinin (46 KAH ve 19 KAH olmayan) VYD örneklerinde kantitatif gerçek zamanlı PZR ile gen ve miRNA'ların anlatım düzeyleri değerlendirilmiştir. KAH'lı bireylerin EYD örneklerinde *TNFA* anlatım düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p=0,006$). KAH gruplarına ek olarak diyabet ve obezite durumlarına göre alt gruplar (Diyabet, KAH-Diyabet, Obezite, KAH-Obezite) oluşturulmuştur. Tüm grupların hasta bireylerinde *PRKAA2*, *PPARGC1A*, *SIRT1* ve *TNFA* genlerinin EYD örneklerinde gruplar arası değişen anlatım düzeyleri belirlenmiştir ($p < 0,050$). MiR-1247-5p anlatım düzeyinin obez ve obez KAH'lı bireylerde ilgili kontrollere göre azaldığı belirlenmiştir (Obez, $p=0,040$; KAH-Obez, $p=0,021$). Seçilen miRNA'ların incelenen alt gruplarda biyokimyasal parametreler ile korelasyonları gözlenmiştir ($p < 0,050$).

Bu tez çalışması, seçilen gen ve miRNA'ların KAH, obezite ve diyabet patogenezi için viseral ve epikardiyal yağ dokusunda birlikte incelendiği ilk çalışma olması yönünden önem arz etmektedir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, incelenen gen ve miRNA'ların KAH patogenezinin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini göstermektedir. Ateroskleroz patogenezinde oksidatif stresin araştırılmasını hedefleyen bu çalışma ile oksidatif streste rolü olabilecek yeni hedefler belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Koroner arter hastalığı, Ateroskleroz, Epikardiyal yağ dokusu, Mitokondriler, Oksidatif stres

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37688

ABSTRACT

Dogan, N. (2022). Investigation of Expression Levels of MicroRNA and Candidate Genes Associated with AMPK Pathway Involved in Mitochondrial Metabolism in Coronary Artery Patients. . İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics. Master Thesis. İstanbul.

Coronary artery disease (CAD) is one of the global health problems. To prevent CAD, it is important to elucidate the molecular mechanisms that contribute to the formation of atherosclerosis. In this context, it is aimed to investigate the expression levels of microRNAs (miRNAs) and genes effective in bioregulation of mitochondria that change due to oxidative stress in atherosclerosis. In this study, *PRKAA2*, *PPARGC1A*, *SIRT1*, *RELA*, and *TNFA* gene expressions were examined in epicardial adipose tissue (EAT) while miR-155-5p, miR-30a-5p, miR-1247-5p, and miR-326 expression levels were examined in EAT and visceral adipose tissues (VAT).

Expression levels of genes and miRNAs were evaluated by qRT-PCR in EAT samples from 93 individuals (63 CAD; 30 non-CAD), and VAT samples from 65 individuals (46 CAD; 19 non-CAD). EAT *TNFA* expression levels were higher in the CAD group compared to non-CAD ($p=0.006$). In addition subgroups were formed according to diabetes and obesity status. Expression levels of *PRKAA2*, *PPARGC1A*, *SIRT1*, and *TNFA* genes were different between several subgroups in EAT samples ($p<0.050$). The expression levels of miR-1247-5p were found to decrease in obese and obese CAD patients ($p<0.050$). Selected miRNAs were found to correlate with biochemical parameters in subgroups ($p<0.050$).

This study is important as it is the first study in which selected genes and miRNAs were examined together in VAT and EAT for the pathogenesis of CAD, obesity, and diabetes. The results obtained in the study show that the examined genes and miRNAs may be a potential target in the prevention and treatment of CAD.

Key Words: Coronary artery disease, Atherosclerosis, Epicardial fat tissue, Mitochondria, Oxidative stress

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 37688

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner arter hastalığı (KAH), gelişmekte olan ülkelerde elli yılı geçen süre boyunca mortalitenin önde gelen nedeni olmuştur (1). Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) grubunda yer alan KAH, kalbi besleyen koroner arterlerde aterosklerotik plak oluşumu olarak tanımlanmaktadır (2). Bu hastalık, hem genetik hem de çevresel faktörlerin birlikte etki ettiği, yaşın önemli bir risk faktörü olduğu kronik bir süreç olarak kabul edilmektedir (3). Günümüze kadar yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilerle; farmakolojik tedavinin yanı sıra, eğitim ve alışkanlık modifikasyonu ile kardiyak morbidite ve mortalitenin değişebileceği umulmaktadır (4). KAH prognozunda umut verici bir yaklaşımla, risk faktörlerinin kontrolünün sağlanmasının yanı sıra, bu risk faktörleri ile ilişkili moleküler mekanizmalar hakkında araştırmalar devam etmektedir.

Koroner arterlerde oluşan ateroskleroz KAH'ın en önemli nedeni olup, arterlerin intima tabakasında aterom plakların olduğu kronik inflamatuvar bir süreçtir (5, 6). KAH'ın çevresel risk faktörleri, KAH patogenezinde rolü olan oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı antioksidan savunma sisteminin azalmasıdır. ROT, DNA, protein, lipid gibi makromoleküllere ve organellere hasar vermektedir. ROT, aterosklerozun ilerleme aşamasındaki süreçler olan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunda, endotel disfonksiyonunda, inflamasyonda ve mitokondriyal disfonksiyonda rolü olan oksidatif stres etkenidir (7). ROT'un neden olduğu moleküler düzeydeki hasarlar mitokondri fonksiyonunu bozmakta ve disfonksiyonel mitokondrileri oluşturmaktadır. Disfonksiyonel mitokondrinin oksidatif metabolizmasındaki kusurlar da ROT oluşumunu artırarak oksidatif strese neden olmaktadır (8).

Epikardiyal yağ dokusu (EYD), kalp ve koroner arterlerin etrafında yerleşmiş viseral yağ dokusunun (VYD) özel bir şeklidir. EYD'nin kalınlığı ve içeriğinin değişimi KVH için risk faktörüdür. EYD'de salgılanan proaterojen ve proinflamatuvar sitokinler koroner arterler için inflamatuvar bir etkidir (9-12). ROT, proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını düzenleyen transkripsiyon faktörlerini aktive ederek KAH patogenezinde ayırt edici bir özellik olan inflamatuvar süreçte önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, KAH risk faktörü koşullarında ROT üretiminin arttığı gösterilmiştir (13).

Hücresel ATP üretiminde rol alan mitokondrinin fonksiyonu, mitokondriyal biyogeneze (MB) bağlıdır ve MB regülasyonu nükleer genlerin anlatım seviyelerinden etkilenmektedir (14). AMP ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK), MB ve kardiyak fonksiyonları kontrol eden önemli bir proteindir. AMPK ve AMPK'nın aktive ettiği proteinlerden biri olan Sirtuin 1 (SIRT1), postranskripsiyonel seviyede MB ana düzenleyicisi olan peroksizom proliferatör aktive reseptör gamma koaktivatör alfa'yı (PGC-1 α) aktive ederek ekspresyon düzeylerini artırmaktadır. PGC-1 α , mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM)'nın seviyelerini artırmakta ve mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) replikasyon sürecini hızlandırmaktadır. AMPK eksikliğinin ROT oluşumunu artırdığına dair sağlanan kanıtlara göre, AMPK seviyelerinin düşmesi inflamatuvar süreç ve mitokondri disfonksiyonu ile ilişkilidir (15). AMPK ile ilişkili NF- κ B proteini, inflamatuvar süreçlerde merkezi öneme sahip transkripsiyon faktörü ailesi üyesidir. AMPK eksikliği ile artan ROT seviyelerinin NF- κ B sinyal yolağında çeşitli düzenleyici rollere sahip olduğu gösterilmiştir (16).

KAH patogenezinde rolü olan epigenetik faktörlerden biri olan mikroRNA'lar (miRNA) transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen kısa (20-23 nükleotid uzunluğunda) kodlama yapmayan RNA molekülleridir (17). Literatürde hsa-miR-155-5p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-326 ve hsa-miR-1247-5p'nin KAH'ta artan EYD hacmi ile ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (18, 19).

Bu tez çalışmasında, KAH ve kontrol olarak belirlenen bireylerden elde edilen EYD ve VYD örneklerinde mitokondri fonksiyonunda rol alan AMPK yolağı ve NF- κ B sinyal yolağı ile ilişkili *PRKAA2*, *SIRT1*, *PPARGC1A*, *RELA* ve *TNFA* genleri ve bu genler ile etkileşimde olduğu düşünülen hsa-miR-155-5p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-326 ve hsa-miR-1247-5p'nin anlatım düzeylerinin değişimi detaylı olarak incelenmiştir. Bu tez çalışması, seçilen gen ve miRNA'ların koroner arter hastalığı için VYD ve EYD'de birlikte incelendiği ilk çalışma olması yönünden önem arz etmektedir. KAH oluşumunun önlenmesi için, bu hedeflerin terapötik olarak iyileştirilmesi ile ilgili gelecek çalışmalara bu çalışmada odaklanılan noktaların katkıda bulunacağı öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koroner Arter Hastalığı

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) güncel verilerine göre genel popülasyonun majör ölüm nedenidir. KAH, serebrovasküler hastalık, periferik arter hastalığı, romatizmal kalp hastalığı, konjenital kalp hastalığı ve derin ven trombozu; KVH grubunda yer alan hastalıklardır (20, 21).

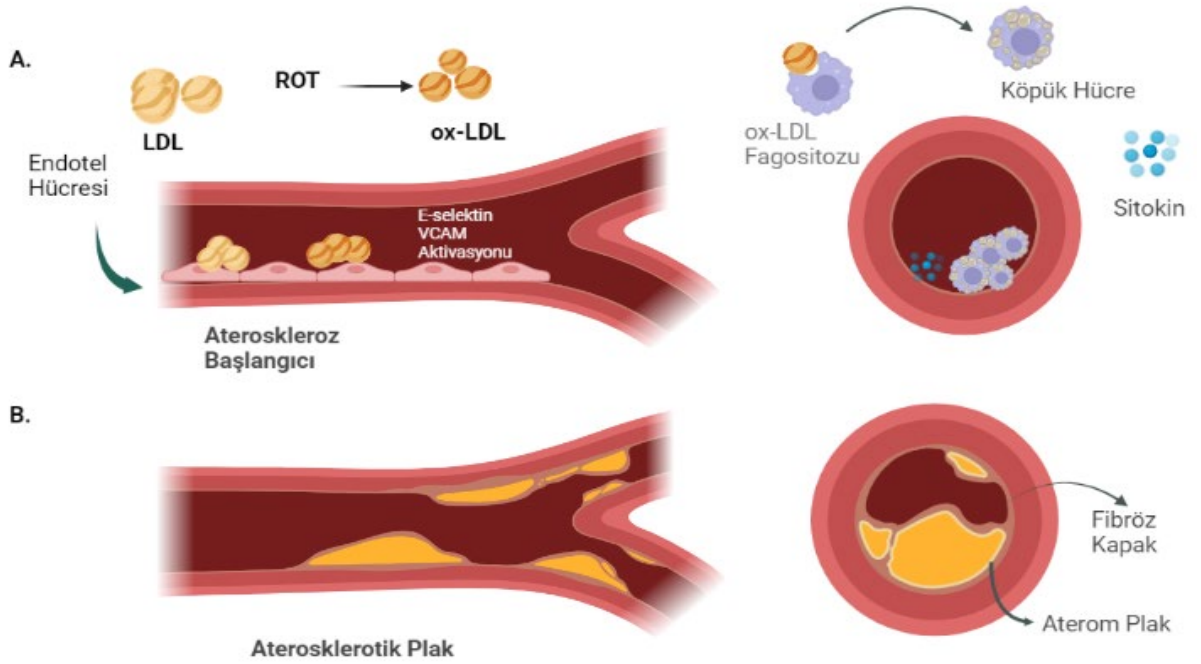
Koroner Kalp Hastalığı (KKH) olarak da adlandırılan KAH, KVH'ların neredeyse yarısını oluşturmaktadır (20). KAH, kalbe oksijen ve besin sağlayan koroner arterlerin aterosklerotik plak oluşumu sonucu sertleşmesi ve daralması yönünde yapısal değişimi olarak tanımlanmaktadır (22, 23). Ateroskleroz, KAH'nın birincil nedeni olarak kabul edilmektedir (24). Daha önceki çalışmalarda aterosklerozun "hafif bir lipid depolama hastalığı" olan tanımlı deneysel anlamda önemli ilerlemelerin sonucunda zaman içerisinde değişmiştir. KAH sürecinin temeli olan aterogeneze, inflamasyon ile hücre ve moleküler mekanizmaların katkıda bulunduğu ortaya konulmuştur (23).

2.1.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz, arterlerde lipid birikimi ile makrofajlar, lenfositler ve düz kas hücrelerinden oluşan fibröz yapının gelişimi sonucu aterosklerotik plak oluşumunu tanımlayan kronik bir hastalıktır (25). Koroner arterler, lümeninde oksijenli kanı taşıyarak kalbe oksijen ve besin sağlayan iletken damarlar olarak tanımlanmaktadır. Arter lümenini çevreleyen arter duvarı, lümenden damar duvarının dış tabakasına doğru sırayla; intima, mediya ve adventisya olmak üzere üç katmandan oluşmaktadır (26). Ateroskleroz arter duvarının intima tabakasında başlayarak damar duvarındaki üç katmanın da yapısını ve işlevini etkilemektedir (27).

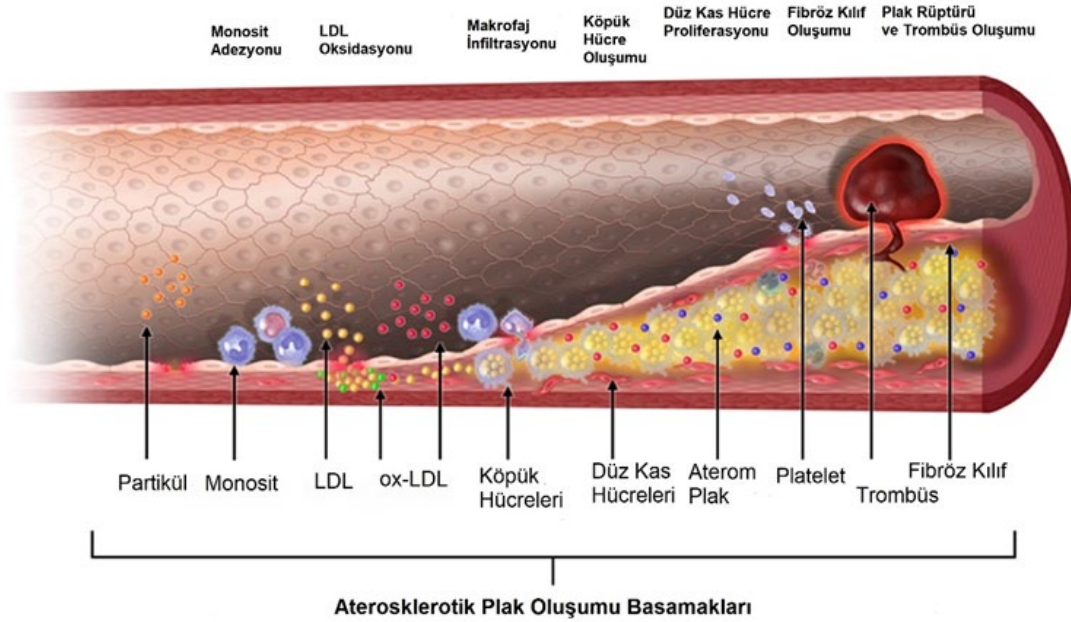
Aterosklerotik lezyonların oluşumu karmaşık bir dizi patojenik faktörü harekete geçiren endotel hücre işlev bozukluğu ile başlamaktadır. Dolaşımdaki yüksek kolesterol konsantrasyonları ateroskleroz oluşumunu destekleyen bir etken olarak belirlenmiştir. Kolesterol, dolaşımda LDL tarafından taşınmaktadır. Subendotelyal boşlukta biriken LDL, ROT'un neden olduğu oksidatif değişimlere eğilimlidir. ROT ile LDL oksidasyonu sonucunda oluşan okside-LDL (ox-LDL) endotel hücrelerinin aktivasyonuna yol açmaktadır ve bu durum arterin endotel yüzeyinde E-selektin ve VCAM-1 gibi yapışma moleküllerinin aktivasyonuna neden olmaktadır (28). Bu aktivasyon inflamatuvar

yanıtların oluşmasını sağlamaktadır. İnflamatuvar yanıt olarak dolaşımdaki monositler intimada makrofajlara farklılaşmaktadır ve makrofajlar modifiye lipoproteinleri fagositoz ile içine alarak köpük hücrelerine dönüşmektedir (29) (Şekil 2-1). Normal koşullar altında makrofajlar hücre içindeki kolesterolü ters kolesterol taşınım mekanizması ile hücre dışı yüksek yoğunluklu lipoproteine (HDL) aktarmaktadır. Ancak bu mekanizmada kolesterolün içeri girişi ve dışa akışı arasındaki dengenin bozulması ve makrofajlardan HDL'ye kolesterol akışının sekteye uğraması sonucunda makrofajlar köpük hücrelerine dönüşmektedir (30, 31). Köpük hücrelerinin oluşumuyla birlikte komşu düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinin salgıladığı sitokinler ve büyüme faktörleri, makrofaj ve endotel hücrelerinin proliferasyonlarında artışa neden olmakta ve hücre dışı matris bileşenlerinin sentezinin indüklenmesiyle oluşan fibröz başlık ile örtülü bu kitle, aterosklerotik plağı oluşturmaktadır (Şekil 2-2) (29, 32).



Şekil 2-1. Aterosklerotik lezyon oluşumu

(A) Endotel hücrelerin disfonksiyonu aterom plak oluşumunda patojenik faktörlerin öncüsü olmaktadır. Subendotelyal boşlukta biriken LDL, ROT tarafından oksidasyona uğrayarak ox-LDL'ye dönüşmektedir. Ox-LDL, arterin endotel yüzeyinde E-selektin ve VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu aktivasyon ile oluşan inflamatuvar yanıtta, dolaşımdaki monositler makrofajlara farklılaşmaktadır. Makrofajların dolaşımdaki modifiye lipoproteinleri fagositoz ile içine alması ile köpük hücreler oluşmaktadır. Makrofajların oluşturduğu köpük hücreler aterom plak yapısına katılmaktadır. (B) Endotel ve köpük hücrelerin proliferasyonu ile oluşan bu kitle fibröz başlık ile örtülü aterom plağı oluşturmaktadır (33). Şekil BioRender web tabanlı aracı ile oluşturulmuştur.



Şekil 2-2. Aterosklerotik plak oluşum basamakları

LDL oksitlenmesi ile başlayan inflamatuvar yanıtta, makrofajların ox-LDL'yi fagositoz ile içine alması ile köpük hücre oluşmaktadır. Köpük hücreleri, endotel hücreleri, lipid yüklü düz kas hücreleri ve lipid damlacıkları, fibröz kılıf ile örtülü aterom plak oluşumuna katılmaktadır. Aterosklerozun ilerleyen aşamalarında endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve makrofajların ölümü ile ortaya çıkan lipidler yırtılmaya eğilimli fibröz kılıfın oluşmasına neden olmaktadır. Aterom plağı örten fibröz kılıfın incilmesi ve hasar görmesi sonucunda, plak rüptürü ve trombüs meydana getirmektedir (34).

Ateroskleroz patogenezinde fibröz plağın kalınlığı klinik olayların gelişiminde rol alan bir etkidir. Kalın fibroz kılıf ile çevrili plak, stabil ilerlemiş aterosklerotik lezyonları oluşturmaktadır. Stabil plaklar iskemik semptomlara neden olabilmektedir. Diğer yandan lipid ve inflamatuvar hücrelerden zengin ve fibröz plağın ince olduğu kararsız plaklar komplike lezyonlara yol açabilmektedir (35). Bu plakların yanında bulunan inflamatuvar hücre popülasyonu plağın yapısal kararsızlığına katkıda bulunmaktadır. Kararsız plaklar aterosklerozun akut klinik semptomlarının nedenidir. Plak rüptürü (yırılması), fissür plak, plak içi kanama ve erozyon, kararsız plakların farklı fenotipleridir. Ancak bu farklı fenotipler, genellikle plak rüptürü olarak isimlendirilmektedir (36). Kararsız plakların rüptürü sonucu plak içeriğinin dolaşıma karışması olarak adlandırılan trombüs, aterotrombotik tıkanıklığı tetiklemektedir. Plak

rüptürü ve trombüs (pıhtı oluşumu), miyokard infarktüsü (Mİ) ve inme ile sonuçlanan akut kardiyovasküler olayların gelişimine neden olmaktadır (29, 37).

2.1.1.1. Ateroskleroz Patogenezi

Ateroskleroz, kardiyovasküler iskemik olayların altında yatan başlıca etiyolojik faktör olmaktadır. İskemi, kardiyak fonksiyonu telafi edilemeyecek biçimde bozan ve prognozu olumsuz etkileyen bir süreçtir (38, 39). Ateroskleroz, orta ve büyük arterlerin duvarında inflamatuvar olayların gelişimi ile kanama, rüptür ve kalsifikasyon gibi birçok patolojik sonuca yol açmaktadır (40).

Ateroskleroz histolojik olarak, aterosklerozun başlangıç aşamasını ve ileri aterosklerotik lezyonları içeren gelişim aşamalarının sınıflandırıldığı altı lezyon tipine ayrılmaktadır. Bu lezyonlar, hastalığın başlangıcından klinik durumun gelişimine kadar tip I-VI olmak üzere kronolojik sıralama ile gruplandırılmaktadır. Aterosklerozun hastalığa neden olabilecek lezyonlarının klinik sessiz öncüleri olan lezyon tipleri; tip I-II ve tip III lezyonlardır. Tip I-II-III lezyonlar yaşamın ilk yıllarında oluşmaktadır. Tip IV-V ve tip VI lezyonlar ise ileri aterosklerotik lezyonlardır ve bu lezyonların herhangi biri arter lümenini, ölüm ile sonuçlanabilen klinik olaylara yol açabilecek biçimde tıkayabilmektedir (Şekil 2-3) (41).

İlk 10 yıl		Tip I Lezyon Köpük Hücreleri
		Tip II Lezyon Yağlı Çizgi
10-30 yıl		Tip III Lezyon Geçiş Lezyonu
		Tip IV Lezyon <u>Aterom</u>
40 yıl ve sonrası		Tip V Lezyon <u>Fibröz Plak</u>
		Tip VI Lezyon Komplike lezyon/ <u>Rüptür</u>

Şekil 2-3. Ateroskleroz lezyonlarının zamana göre dağılımı ve lezyon tiplerinin fenotipleri.

Aterosklerotik lezyonların histolojik sınıflandırılması, fenotipik özellikleri ve yaş büyüklüğü ile ilişkilendirilmesi gösterilmektedir (42).

Tip I lezyon, makrofajların köpük hücrelerine dönüşümü için yeterli miktarda aterosjenik lipoprotein içeriğini ifade etmektedir (43). Tip I lezyon, ox-LDL'nin yol açtığı endotel disfonksiyon sonucu inflamatuvar yanıtla köpük hücrelerine dönüşen makrofajları içermektedir. Tip II lezyonlar temel olarak makrofaj köpük hücrelerinin katmanlarından ve lipid yüklü düz kas hücrelerinden oluşmaktadır ve büyük ölçüde yağlı çizgi olarak adlandırılan lezyonları içermektedir (43). Tip III lezyon, potansiyel olarak klinik semptomaya yol açan tip IV lezyon ile tip II lezyon arasında bir geçişi ifade etmektedir. Tip III lezyon intimal düz kas hücrelerinin yapışmasını bozan ekstrasellüler lipid damlacıklarını içermektedir. Bu lipid damlacıkları tip IV lezyondaki nekrotik çekirdeğin öncüsü olmaktadır (43).

Aterosklerotik lezyonlar arter duvarının yapısının bozulması ile ilişkili olduğunda histolojik kriterlere göre ilerlemiş kabul edilmektedir. İlerlemiş aterosklerotik lezyonlar tip IV, V ve VI olmak üzere üç ana histolojik sınıfa ayrılmaktadır (43). Tip IV lezyonlar aterom olarak bilinmektedir, bu lezyon lipid çekirdeği olarak bilinen yoğun hücre dışı lipid birikimini içermektedir (43). Tip IV lezyonun lipid çekirdekleri arter duvarını kalınlaştırmaktadır. Bu lezyonda lipid çekirdek ve endotel arasında makrofajlar, mast hücreleri, lenfositler, düz kas hücreleri ve kalsifiye olmuş düz kas hücre kalıntıları mevcuttur (43). Aterom plağın etrafını saran fibröz dokunun artması ile tip V lezyon oluşmaktadır (43). Tip V ve tip IV lezyonlar fibröz başlık bakımından ayırt edilmediğinden, tip IV ve tip V lezyonlar fibröz plak olarak isimlendirilmektedir (43). Yüzey bozulması, hematoma, kanama ve trombotik birikimler olaylarından birine ya da daha fazlasına sahip olan tip IV veya tip V lezyonları, komplike lezyon olan tip VI lezyonu olarak sınıflandırılmaktadır. Lipid çekirdek ve lezyon yüzeyi arasında bulunan proteoglikan, köpük hücreleri, düz kas hücreleri ve minimal kollajen içerdiğinden fissür oluşumuna (tip VI) neden olabilmektedir (43). Histolojilerine göre ilerlemiş kabul edilen lezyonlar aterosklerozda klinik seyrin belirleyicisi olmaktadır. Bununla birlikte, lümen darlığı ve klinik bulgular göstermeyen lezyonlar da bulunmaktadır. Lümen darlığı oluşturmamasına rağmen bu lezyonlar ani olarak gelişen komplikasyonlara neden olduğundan klinik olarak önemli olabilmektedir (43).

Aterosklerozun ilerleyen aşamalarında, aterom plaklardaki köpük hücreleri endotel hücreleri ve düz kas hücreleri apoptotik hücre ölümüne uğramaktadır. Bu yol ile serbest kalan lipidler plak stabilitesini olumsuz etkileyen yumuşak ve kararsız yapıya

sahip nekrotik çekirdek oluşumuna neden olmaktadır. Nekrotik çekirdek; oksitlenmiş lipoprotein, kolesterol kristali ve hücre kalıntılardan oluşan bir ilerlemiş aterosklerotik plak oluşumudur. Lipidden zengin nekrotik çekirdeğin üzerini örten fibröz kılıf gelişiminde değişen derecelerde matriks yeniden şekillenmesi ve kalsifikasyon lezyonların yapısal şekillenmesi sağlanmaktadır (8, 11).

Yüzey bozulmasına meyilli lezyonlarda (tip IV ve tip V) inflamatuvar hücrelerin varlığı intima bozulmasına neden olmaktadır (43). Yırtılmaya eğilimli plaklarda inflamatuvar hücrelerin yanı sıra, düz kas hücrelerinin düşük yoğunluğu ve ince fibröz başlık karakteristik bulgulardır. Rüptür; aktif rüptür, plak yırtılması ve plak erozyonu mekanizmalarının sonucu gerçekleşmektedir. Aktif rüptür proteolitik enzimlerin sekresyonu ile ilişkili iken, pasif plak yırtılması fiziksel kuvvete bağlı gelişmektedir. Plak erozyonu ise plak rüptürünün beraberinde ortaya çıkıp, trombüsün yapışmasını sağlayan ve plağın hızlı büyümesini sağlayan bir durumdur. Plak rüptürü sonucu oluşan trombüs, dolaşıma karıştığı durumda arteriyolları ve/veya kapilleri tıkayabilmektedir. Damar tıkanıklığına yol açan trombüs emboli denilen duruma yol açmaktadır. Trombüs sonucu oluşan emboli, etkilediği damar ve o damarla ilişkili organa göre Mİ veya inme olmak üzere iskemik olaylara neden olmaktadır (44).

2.1.1.2. Aterosklerozun Klinik Belirtileri

Aterosklerozda lezyon ilerlemesi onlarca yıl boyunca klinik belirti vermeksizin gerçekleşmektedir. Yaşamın ilk dört dekatında, ateroskleroz, asemptomatik veya subklinik semptomlar gösterebilmektedir (45). Ateroskleroz, arterlerde plak gelişimi ile karmaşık lezyonların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. İlerlemiş aterosklerotik lezyonların damarın lümenini daraltması, kronik iskemik semptomlara yol açabilmektedir. Kalın bir fibröz kapağa sahip olan ve plak rüptürü riski taşımayan iskemik bölgelerdeki aterosklerotik plaklar stabil plaklar olarak isimlendirilmektedir. Stabil plaklar klinik olarak sessiz kalabilmekte ya da stabil anjina olarak isimlendirilen iskemik göğüs ağrısı ile klinik bulgu gösterebilmektedir. (46). Stabil anjina pectoris (SAP), zihinsel stres veya fiziksel aktivite sonucu ortaya çıkabilen göğüs ağrısı epizodları olarak tanımlanmaktadır, göğüs ağrısı dinlenme veya kalbin oksijen ihtiyacını azaltan nitrogliserin gibi ilaçlar ile geçmektedir (47). Ancak diğer bir yandan klinik olarak SAP tanılı hastalarda, SAP'tan sorumlu olan plakların her zaman stabil olmaması durumu da söz konusudur. Bu bağlamda klinik stabilite, inflamasyon ve

trombüs olmaması nedeniyle histolojik stabiliteyi tahmin etmede yanıltıcı görünmektedir (48) .

İnflamasyon aterosklerozda plak destabilitesine önemli ölçüde etki etmektedir. Bu noktada inflamatuvar hücrelerin intima'ya infiltrasyonu matris zayıflamasına yol açarak fibröz kılıfın incelmeye neden olmaktadır. İnce fibröz kapağa sahip plaklar, stabil olmayan ya da kararsız plak olarak isimlendirilmektedir. Kararsız plaklar, plak rüptürü ve trombüse eğilimlidir (48). Kararsız plaklarda oluşan plak rüptürü ve trombüs, Mİ ve inme ile sonuçlanmaktadır (12). Kararsız plakta trombüsün büyüklüğü plak rüptürünün ölümcül komplikasyonudur. Buna karşın kararsız plakta trombüs küçük ve tıkaçıcı boyutta olmadığına da klinik semptomlara yol açabilmektedir. Kararsız anjina pectoris (UAP), plak rüptürü devamında lümen tıkaçıcı olmayan trombüs nedeniyle koroner arter daralmasını ifade etmektedir. UAP daha önce anjina yaşamamış bireylerde fiziksel zorlanma ve stres koşullarına bağlı olmadan dinlenme durumunda ve minimum fiziksel efor sırasında ortaya çıkabilmektedir (49). UAP, SAP paterninde plak stabilitesi ilişkili bir değişiklik ile de gözlenebilmektedir (50).

Kararsız plaklarda trombüsün lümeni tam kapatarak kalbe giden dolaşımı etkilemesi, halk arasında kalp krizi olarak nitelendirilen Mİ'ye neden olmaktadır. Mİ akut bir durumdur ve yalnızca kararsız plak sonucu lümen tıkanması nedeniyle oluşmamaktadır. Nadiren de olsa koroner artere başka bir bölgeden gelen pıhtı da Mİ'ye neden olmaktadır (48, 51). Kararsız plak sonucu oluşan trombüs, beyine dolaşımı ileten arterlerde daralmaya yol açtığına iskemik inme meydana gelmektedir (52).

2.1.1.3. Ateroskleroz için Risk Faktörleri

Epidemiyolojik çalışmalar, birçok genetik ve çevresel risk faktörünün ateroskleroz gelişiminde önemli bir rolü olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bireylerin yaşam tarzının risk faktörlerini oluşturmada önemli olduğu; diyet, bağırsak mikrobiyotası, egzersiz, sigara tüketimi, hava kirliliği, gürültü, psikososyal stres ve uykusuzluk gibi faktörlerin ateroskleroza zemin hazırlayan durumlar arasında yer aldığı bilinmektedir (53).

Hiperkolesterolemi ateroskleroza neden olan biyokimyasal bir risk faktörüdür. Kolesterol, ters kolesterol taşınım mekanizması ile HDL'ye aktarılmaktadır. Ateroprotektif rolü olan ters kolesterol taşınım yolunun ana bileşenleri arasında HDL, apolipoprotein A-I (ApoA-I), lesitin, kolesterol açıl transferaz (LCAT), fosfolipid

transfer proteini (PLTP), hepatik lipaz ve kolesterol ester transfer proteini (CETP) bulunmaktadır. Makrofajlarda biriken kolesterolün HDL'ye aktarılması ATP bağlayıcı membran kaset taşıyıcı A1 (ABCA1), çöpçü reseptör B1 (SR-B1), kaveolinler ve ApoA-I'i içeren mekanizmalar aracılığıyla ya da pasif difüzyon ile gerçekleşmektedir (54). Ancak ters kolesterol taşınım mekanizması ile trigliseritin HDL'ye aktarılamaması sonucu, kolesterol taşıyan LDL partiküllerinin ve ox-LDL'nin artması inflamatuvar yanıtın oluşmasına yol açarak ateroskleroza artırmaktadır. Ateroskleroz patogenezinde ters kolesterol mekanizmasında rol alan bileşenlerin ekspresyonlarındaki değişimler, ilgili genlerdeki mutasyonlar ve polimorfizmler rapor edilmiştir (54-57). Ateroskleroz patogenezinde önemli bir etken olan ters kolesterol taşınım mekanizması üzerine yapılan genetik çalışmalar, trigliseritten zengin LDL partiküllerinin oluşum nedeninin genetik kanıtını ortaya koymaktadır (53).

İnflamasyon, arter duvarındaki hücrelerin fonksiyonunu değiştirerek ateroskleroz gelişiminde kilit rol oynamaktadır. Yaşam koşullarına bağlı oluşan risk faktörleri inflamasyona neden olmaktadır. Ateroskleroz patogenezinde C-reaktif protein (CRP) gibi inflamasyon biyobelirteçleri kardiyovasküler risk faktörü ile pozitif ilişki göstermektedir (58).

Arterin intima yüzeyinde bulunan endotel hücrelerinde gerçekleşen birtakım değişiklikler aterosklerozun erken aşamasında yer alan ilk olaylardandır. Aterojenik risk faktörleri endotel hücrelerinin, nitrik oksit (NO) gibi endojen vazodilatörleri üretimini etkilemektedir. Diğer bir risk faktörü olan LDL'nin subendotel yüzeyde birikimi, inflamatuvar hücrelerin intima tutunmasını sağlayan ve endotel hücrelerinden salgılanan adezyon moleküllerinin ekspresyonunu aktive edebilmektedir (58).

Ateroskleroz, çevresel risk faktörleri ve genetik risk faktörlerinin birlikte etkili olduğu multifaktöriyel bir süreçtir. Aterosklerozun genetik temelini incelemek amacı ile yapılan bağlantı çalışmaları ve genom çapında ilişkilendirme çalışmaları ateroskleroz gibi karmaşık hastalıklarda ilişkili genetik varyantların belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Ateroskleroz patogenezinde değişen gen ekspresyonları ve bu genlerdeki varyantların ateroskleroz ile ilişkisi birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (59). Benzer şekilde, genetik faktörlerle birlikte epigenetik gen regülatörleri de kardiyovasküler hastalıklara risk faktörü olarak katkı sağlamaktadır. Epigenetik değişimleri inceleyen çalışmalar, ateroskleroz risk faktörlerinin epigenetik düzenleyicilerle ilişkisini açıklama

imkanını sunmaktadır (60). Genetik tabanlı popülasyon çalışmaları KAH kalıtsallığı ve genetik risk faktörlerinin KAH patogeneğinde etkisini açıklayabilmektedir (59).

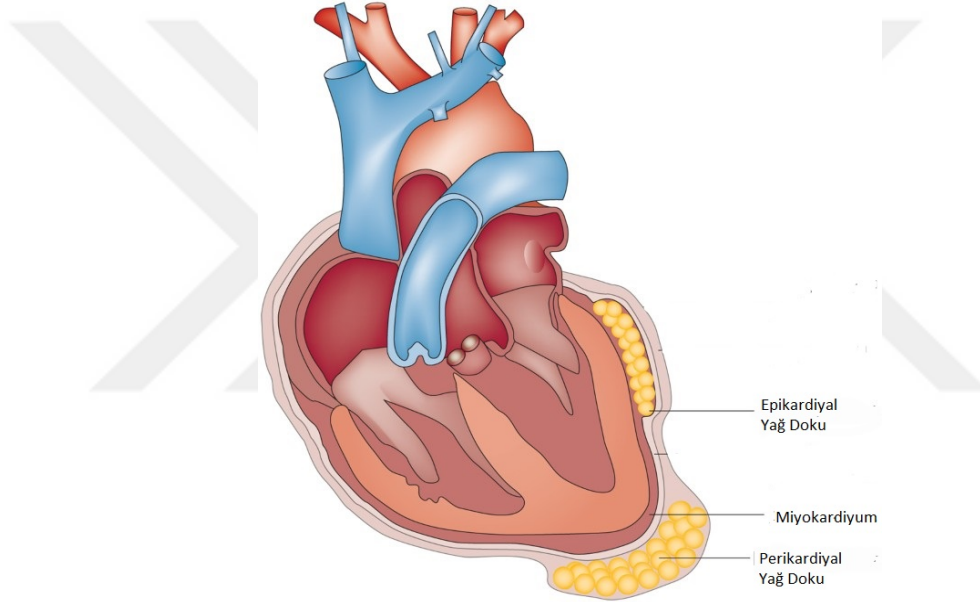
2.1.2. Epikardiyal Yağ Dokusu ve Ateroskleroz İlişkisi

Adipoz doku olarak da isimlendirilen yağ doku, çok hücreli organizmalarda enerjinin lipidler halinde depolanmasını sağlayan özel bir yapıdır. Adiposit adı verilen yağ dokusu hücrelerinden oluşan adipoz doku, lipid depolama işlevinden ziyade aktif metabolik ve endokrin bir organdır (61). Adipoz doku bu özellikleri ile komşu organları ile yakın ilişkiler içindedir (62).

Memelilerde beyaz adipoz doku (BAD) ve kahverengi adipoz doku (KAD) olmak üzere iki ana tip adipoz doku mevcuttur. Bu iki yağ doku, yapısal ve işlevsel olarak birbirinden farklıdır. KAD, kış uykusuna yatan hayvanlarda ve bebeklerde keşfedilmiş bir adipoz dokudur. KAD, çok sayıda küçük lipid damlacıkları (multioküler) ve çok sayıda mitokondri içermesi nedeniyle oksidatif fosforilasyon ve ısı üretiminde önemli bir yakıt görevi görmektedir. KAD'ta eksprese edilen termogenin proteini (UCP1 – *uncoupling protein 1*), mitokondriyal iç zarda protonların yer değişimi ile ısı üretimini sağlamaktadır. İşlevsel olarak KAD memelilerin vücut sıcaklığının ortam sıcaklığına göre yüksek tutulmasını sağlayan bir yağ dokusudur. Bu yağ doku, postnatal dönemin başında bebekleri daha sıcak tutmaktadır. Ayrıca KAD dağılımının yaş aldıkça azaldığı bilinmektedir. Yaş aldıkça azalan KAD yetişkin döneminde BAD'dan ayırt edilemez hale gelmektedir (63). BAD ise morfolojik ve işlevsel açıdan KAD'dan farklı bir yağ dokusudur. BAD, morfolojik olarak tek bir lipid damlacığı (unioküler) ve az sayıda mitokondri içeriği ile karakterizedir. BAD termal yalıtkan görevi gören ve mekanik hasarlara karşı koruma sağlayan bir dokudur. BAD insan vücudunda subkutan (SYD) ve VYD olarak iki farklı formda görülmektedir. VYD iç organların etrafında, SYD ise derinin altında yer almaktadır (64). Memelilerin iki ana tip yağ dokusu olan BAD ve KAD yağ dokusuna ek olarak; beyaz yağ depolarında bulunan ve KAD ile BAD'ın moleküler ve metabolik özelliklerini gösteren yağ dokusu ise kahverengi benzeri veya bej yağ dokusu olarak bilinmektedir (65). Bej yağ dokusunda beyaz yağ dokusundan farklı olarak, KAD'da eksprese edilen UCP1 proteini eksprese edilmektedir (66).

EYD, kalp ve koroner arterlerin etrafında yerleşmiş VYD'nin özel bir şeklidir (Şekil 2-4) (65). EYD, visceral yağ dokusunun özel bir şekli olmasının beraberinde,

VYD'den işlevsel anlamda farklılık göstermektedir. KAD'da eksprese edilen doku spesifik UCP1 proteininin EYD'de de anlatım göstermesi, EYD'nin bej yağ doku profili gösterdiğini işaret etmektedir. EYD, miyokardiyal enerji üretimi için trigliserit depolamakta ve adipokin üretimi sağlamaktadır (66). Yaş, bel çevresi ve kardiyak kitle EYD hacminin bağımsız belirleyicileridir. EYD, parakrin ve vazokrin etkiler yoluyla miyokardı ve koroner arterleri etkileyen faktörleri serbest bırakmaktadır. EYD normal kilo aralığına sahip bireylerde koruyucu ve antiinflamatuvar özellikler göstermektedir. Ancak obezite durumunda EYD, inflamatuvar özellik kazanmaktadır ve hacim olarak artmaktadır. EYD'nin antiinflamatuvar fenotipten proinflamatuvar fenotipe geçişi ve kalınlığının artması kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörüdür (67).



Şekil 2-4. Epikardiyal yağ dokusu

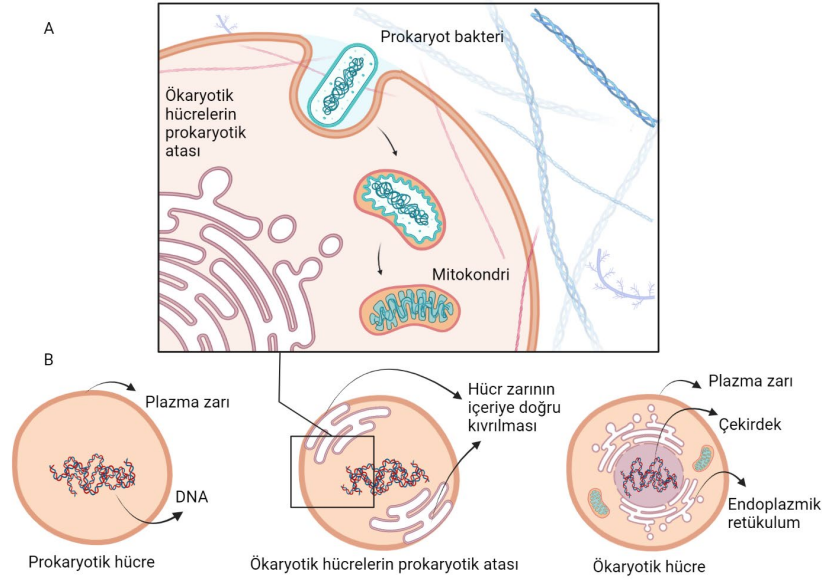
EYD, kalp ve koroner arterlerin etrafına yerleşmiş, parakrin ile vazokrin inflamatuvar etkilere sahip VYD'nin özel bir şeklidir. EYD kalınlığının değişimi metabolik sendrom ve KAH'ta karakteristik bir özelliktir (68).

KVH'de EYD'nin lokal etkiler ile ateroskleroza uyarabildiği bilinmektedir. EYD'den salınan sitokin ve kemokinler, endotel ve vasküler düz kas hücrelerindeki etkileri aracılığıyla aterogenezi destekleyen monositleri aktive edebilmektedir. KAH hastalarında yapılan çalışmalarda EYD'de, ateroskleroza rolü olduğu bilinen interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi inflamatuvar proteinlerinin düzeylerinde artış gözlemlenmiştir (69).

2.2. Mitokondri

Organeller hücre sitoplazmasında yer alan ve depolama, salgılama, boşaltım, solunum, parçalama gibi hücresel metabolik faaliyetleri sistemli bir biçimde yürüten hücre yapı birimleridir. Hücrelerin işlevini devam ettirebilmesi için organellerin faaliyetlerini koordine etmesi gereklidir (70). Mitokondri, ökaryotik hücrelerde aerobik hücre solunumu, enerji üretimi, kalsiyum homeostazı, hücre fonksiyonelliği ve hücre ölümü gibi süreçleri yöneten çift membranlı sitoplazmik bir organeldir (71). 1840'lı yıllara dayanan araştırma geçmişine sahip olan mitokondri, 1888 yılında Carl Benda tarafından Yunanca “mitos” (iplik) ve “kondros” (granül) kelimelerinden türevlenerek tanıtılmıştır (72). İlk biyokimyasal çalışmalar mitokondrinin hücrenin enerji santrali olduğu fikri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar, evrimsel kökeni nedeniyle hücrenin yarı bağımsız organeli olan mitokondriye odaklanan çalışmalara öncülük etmiştir (73).

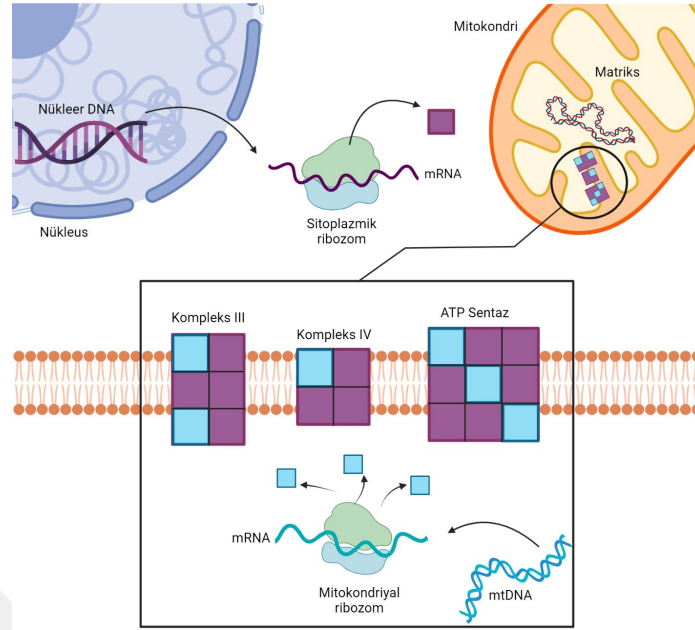
Mitokondri, diğer ökaryotik hücre organellerinden farklı olarak kendini kopyalayabilen dairesel bir genoma sahiptir (71). Mitokondri evrimsel geçmişe sahip bir organeldir. 1966 yılında kabul görmüş endosimbiyotik teori, mitokondrinin evrimsel geçmişini açıklamaktadır. Bu teori, mitokondrinin bir zamanlar bağımsız prokaryotik bir bakteri olduğunu ifade etmektedir. İki prokaryotik bakterinin (biri büyük, diğeri küçük) simbiyotik ilişkisi sonucu, küçük prokaryot (mitokondrinin atası) ileride zarlı organellere sahip olacak diğer prokaryotun hücre organeline dönüşmüştür (74). Evrimsel süreçte büyük olan prokaryotun küçük olan prokaryotu endositoz yolu ile alması ancak sindirememesi sonucunda bu iki hücre kaynaşmıştır. Bu durum, iki prokaryotik bakteri için de avantaj sağlamıştır. Mitokondrinin atası olarak atfedilen küçük bakteri büyük bakterinin hücre içi bazı görevlerini yerini getirmiştir. Aynı zamanda bu küçük bakteri, büyük bakteri içerisinde ihtiyacı olan materyale kolay ulaşmıştır. Endosimbiyotik teorinin baş oyuncusu olan bu iki bakteri zarlı olmayan prokaryotlardan, zarlı organellere sahip ökaryotlara evrimleşmiştir (Şekil 2-5) (75).



Şekil 2-5. Endosimbiyotik teori.

Endosimbiyotik teori, mitokondri ve kloroplast organellerinin prokaryotlardan endosimbiyoz yolu ile ortaya çıktığını öne sürerek, bu organellerin serbest yaşayan prokaryotlara benzerliğini açıklamaktadır. Simbiyoz kavramı; iki farklı organizmanın birlikte yaşam kurabilmesi ve hatta yeni bir organizma tipine yol açabilmesini ifade etmektedir (76) . Endosimbiyotik teoride iki prokaryotik bakterinin ilişkisi ele alınmıştır. Büyük boyutta olan bakterinin, mitokondrinin atası olarak kabul edilen küçük bakteriyi endositoz ile hücre içine alıp sindirememesi sonucu; bu iki prokaryot simbiyotik yaşam sürdürmüştür. Bu süreçte büyük olan bakterinin küçük bakterinin ihtiyacı olan materyale kolay ulaşmasını sağlamış ve mitokondrinin atası olan küçük bakteri, büyük bakterinin hücre içi görevlerini yerine getirmiştir. Kısaca endosimbiyotik teori, prokaryotların zarlı organellere sahip ökaryotlara dönüşümünü açıklamaktadır. Şekil BioRender web tabanlı aracı ile oluşturulmuştur.

Evrimsel geçmişinden ötürü kendi genomuna sahip olmasına rağmen mitokondri, ribozomal proteinlerini içinde bulunduğu hücreden sentezlemektedir. Oksidatif fosforilasyon başta olmak üzere mitokondride bulunan katabolik yolların enzimleri mtDNA ve hücrenin nükleer DNA'sı tarafından kodlanmaktadır. Nükleer DNA'dan kodlanan mitokondriye hedefli polipeptidler, sitozolik ribozomlar üzerinde sentezlendikten sonra mitokondriye aktarılarak fonksiyonlarını yerine getirmektedir (Şekil 2-6) (77).



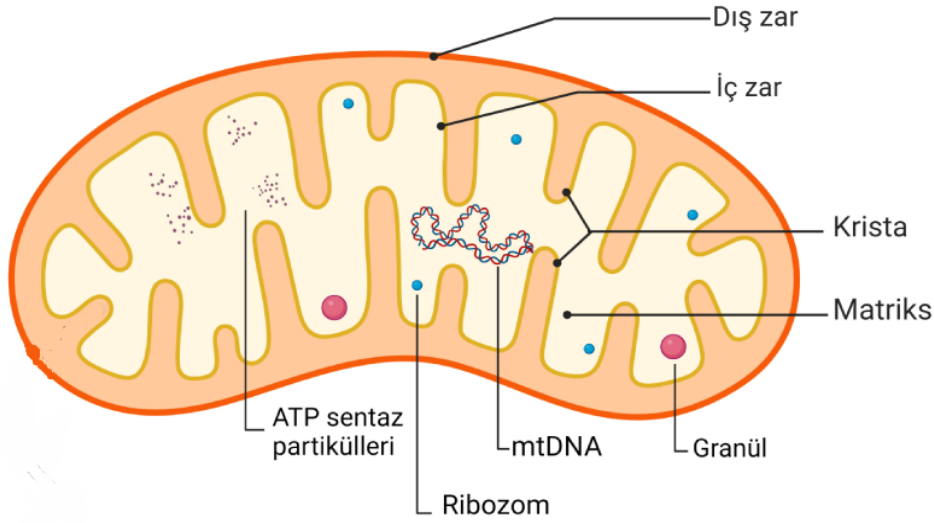
Şekil 2-6. Nükleer DNA'dan kodlanan polipeptitlerin mitokondriye taşınımı.

Mitokondrinin kendi genomu olmasına rağmen kendi genom ürünleri, mitokondriyal metabolizmayı ve mitokondriyal işlevi yürüten protein ve enzimlerin sınırlı bir kısmını kodlamaktadır. Mitokondrinin ribozomal proteinlerinin ve mitokondride yürütülen katabolik yolların enzimlerinin önemli bir kısmı nükleer DNA tarafından kodlanmaktadır. Nükleer DNA'dan kodlu polipeptitler sitozolik ribozomlar üzerinde sentezlendikten sonra, mitokondriyal dış ve iç membranda bulunan translokasyon sistemlerinin aracılığı ile mitokondriye aktarılmaktadır (78). Şekil BioRender web tabanlı aracı ile oluşturulmuştur.

Mitokondri morfolojisinin ve mitokondrinin işlevinin korunması tüm hücrel süreçlerde önem arz etmektedir. Bozulmuş mitokondriyal fonksiyon hücre fonksiyonunu olumsuz etkilemekte ve beraberinde çeşitli hastalıklara yol açmaktadır (79).

2.2.1. Mitokondrinin Yapısı

1950'li yıllarda Elektron mikroskobu (EM) üzerine tekniklerin gelişmesi, mitokondrinin yapısının aydınlatılmasına ve mitokondri ile ilgili çalışmalara öncülük etmiştir. Mitokondrinin yapısını açıklamak amaçlı yapılan öncü çalışmalardan biri olan Palade'nin 1952 yılında EM görüntülemesi ile mitokondrinin yapısı açıklanmıştır. Günümüzde gösterilen mitokondri modeli Palade'nin açıkladığı mitokondri yapısının geliştirilmiş halidir (Şekil 2-7) (80).



Şekil 2-7. Mitokondri yapısı.

Mitokondri dış ve iç zar olarak adlandırılan iki zardan oluşmaktadır. Dış zar düz bir görünüme sahip iken, krista olarak adlandırılan iç zar kıvrımlardan oluşmaktadır. Krista üzerinde oksidatif fosforilasyonda rolü olan enzim kompleksleri, matrikste ise mitokondrinin DNA, RNA ve ribozomları yer almaktadır. Şekil BioRender web tabanlı aracı ile oluşturulmuştur.

Mitokondri genelde dairesel ve oval görünümlü sitoplazmik bir organeldir. Mitokondriler yapı olarak düz bir dış membran, girintileri olan iç membran (krista) ve membranlar arası bölge (matriks) olarak adlandırılan bölgelerden oluşmaktadır. Palade'nin çalışmasında nötr ve alkali pH koşullarındaki kesitlerde yapılan incelemeler sonucunda mitokondriyal dış membranın genel olarak düz ve keskin hatlarla sınırlı yoğun homojen bir bant görünümünde olduğu gösterilmiştir. Asidik pH düzeylerinde sabitlenerek incelenen kesitlerde, dış membranın daha kalın yapıda olduğu belirlenmiştir. Mitokondrinin iç membranından oluşan kıvrımlı yapıdaki krista, daha yoğun yapıya sahip bir merkezi tabakayı iki yönlü çevreleyen daha ince iki tabaka ile toplamda üç katmanlı yapıdadır. Krista üzerindeki enzim kompleksleri mitokondride biyokimyasal mekanizmaların yürütülmesinde rol almaktadır (81). Kristaların mitokondrideki yerleşimleri düzenli aralıklarla paralel biçimde konumlanmış uzun seriler halindedir. Mitokondri kristasının sıklığı ve aralığının hücre tipine bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Mitokondri matriksi kristanın iç boşluğunda homojen görünümlü bir diğer mitokondri bileşenidir (82). Mitokondride hücresel solunumun bir adımı olan elektron taşınımını gerçekleştiren yapılar krista üzerinde konumlanmış olan enzim kompleksleridir. Mitokondri yapısında bu yapıların yanı sıra, matrikste bulunan

ve mitokondrinin fonksiyonelliğinde önemli rol oynayan mtDNA, mtRNA ve ribozomlar yer almaktadır (83).

2.2.2. Mitokondrinin Fonksiyonu

Mitokondri içinde, anabolik ve katabolik faaliyetleri içeren sayısız reaksiyonlar gerçekleşmektedir (73). Hücrel homeostaz ile yakından ilişkili olan mitokondri, oksidatif fosforilasyonun yanı sıra amino asit, fosfolipid, nükleotit ve üre gibi bir çok metabolitin biyosentezinde de rol almaktadır (83). Mitokondrinin morfolojisi mitokondrinin fonksiyonu üzerinde önemli etkiye sahiptir (73).

Enerji gerektiren hücrel süreçleri yönetmek için mitokondrinin fonksiyonel olması gereklidir. Mitokondri, adenosin trifosfat (ATP) üretiminin yanı sıra hücrel sinyalleri alarak ve hücreye yanıt sağlayarak hücrel solunumu ve hücre döngüsünü modüle etmektedir. Hücre döngüsünde yüksek enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır, düşük enerji koşulunda mitokondrinin etkisiyle hücre döngüsü durdurulmaktadır. AMPK, yüksek adenosin monofosfat AMP koşullarında aktive olan bir heterotrimerik kinazdır. AMPK aktivasyonu ATP üretimi ve tüketiminde modifiye edici bir etkidir. Aktive edilmiş AMPK, hücre döngüsünü düzenleyen transkripsiyon faktörü p53'ü fosforile ederek, DNA hasarı durumunda ve anormal büyüme faktörü sinyali sırasında hücre döngüsünü durdurmaktadır. Bu moleküler mekanizmalar düşük glukoz ve ATP koşullarında hücre döngüsünün durmasını açıklamaktadır. Bu durum hücre bölünmesinden önce mitokondrinin hücrenin metabolik kontrolünü sağladığını açıklamaktadır (73).

Hücre bölünmesinin başında sağladığı metabolik kontrol faaliyetine ek olarak mitokondri, mitoz sırasında da etkin bir role sahiptir. Mitokondri çoğalmasında etkisi olan proteinlerden biri olan mitofusin (Mfn) 2'nin aşırı ekspresyonunun G1'den S evresine geçişte hücre döngüsünün durdurulmasında rolü bulunmaktadır. Hücre bölünmesi ve hücre döngüsüne ek olarak mitokondri hücre ölümünde de sinyal görevi görmektedir. Apoptoz, mitokondri ile ilişkili olan programlı hücre ölüm mekanizmasıdır. Mitokondriden salınan sitokrom C, proapoptotik proteinlerin aktivasyonunu sağlayan apoptoz başlatıcı sinyaldir (73).

Yaşlanma birçok hastalık için önemli bir risk faktörüdür. Yaşlanma ile ilgili mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olsa dahi mitokondrinin yaşlanma sürecinde merkezi rol oynadığı bilinmektedir. Mitokondride oksidatif metabolizmanın iz ürünü

olan mitokondriyal reaktif oksijen türleri (mtROT) miktarının artması, oksidatif stres durumunu meydana getirmektedir. Oksidatif stresin artması yaşlanma ve KAH'nın da içinde bulunduğu çeşitli patolojik durumların oluşmasına neden olmaktadır. mtROT seviyelerinin artması ve mitokondriyal fonksiyon kaybı birbirini tetikleyen olaylardır. Dokularda mitokondrinin fonksiyonu ve sayısı önemlidir. İskelet kası, kalp ve yağ dokusu dahil olmak üzere çeşitli organlarda daha az ATP üreten işlevsiz mitokondri, patolojik durumlar ile ilişkilendirilmiştir (84).

Mitokondri immünolojik savunmada merkezi rol oynamaktadır (73). Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) doğuştan gelen bağışıklık düzenleyicisi olarak kabul edilen bir transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B, hücre adezyonu, hücre çoğalması, inflamasyon ve dokuya özgü enzimlerden sorumlu faktörlerin gen ifadesini regüle eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B'nin hücredeki etkisi karmaşıktır ve hücre tipine, gelişim aşamasına ve patolojik duruma bağlı olarak nöroprotektif veya proinflamatuvar olabilmektedir. 2000'li yılların başında yapılan çalışmalarda NF- κ B alt birimleri olan p50, p65 ve I κ Ba'nın mitokondride bulunduğu tespit edilmiştir (85). Tüm hücre tiplerinde anlatım gösteren bu protein, proinflamatuvar, pro-adezyon ve prooksidan genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek KAH patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif stres koşullarında yüksek miktarda olan ve antioksidan sistemler ile indirgenemeyen mtROT, NF- κ B aracılığı ile endotel hücrelerinde inflamatuvar yolların aktivasyonuna yol açmakta ve bunun sonucunda aterom plak oluşum sürecine katılmaktadır (86).

2.2.3. Mitokondriyal Biyoenerjetik

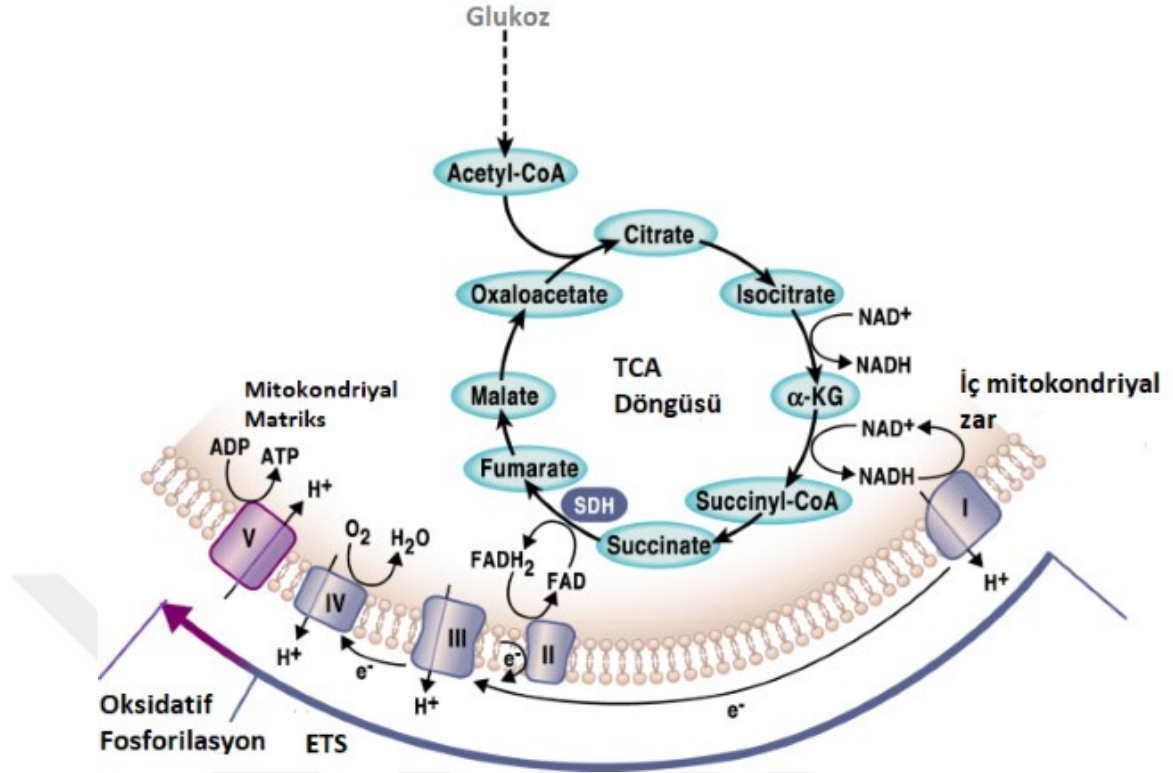
Biyoenerjetik, enerjinin organizmalar tarafından işlenmesini ifade eden bir biyokimya dalıdır (87). Biyoenerjetik biliminin gelişimine, fermentasyon, fotosentez ve solunum konusundaki ilk çalışmalar öncülük etmiştir (88). Mitokondri biyoenerjetikte merkezi rol oynamaktadır. Mitokondri, organel içinde gerçekleşen oksidatif fosforilasyon ile hücre ATP'nin % 90'ının üretimi, ROT üretimi, Ca²⁺ homeostazı, biyokimyasal ara maddeleri sentezleme-bozma ve hücre ölümünün regülasyonu temel işlevlerine sahiptir (89).

Canlı hücreler dış kaynaklardan enerji elde etmek zorundadır. Ekosisteme güneş ışığı olarak giren enerji girdisinden, ilk önce fotosentetik canlıların enerji üretimini sağladığı fotosentez ile oksijen ve organik moleküller oluşturulmaktadır. Fotosentez ile

oluşturulan oksijen ve organik moleküller ökaryotların mitokondrilerinde hücre solunumu için yakıt olarak kullanılmaktadır. Hücresel solunum olarak bilinen aerobik (oksijenli) solunum, hücresel yakıt olan glukozdan enerji eldesi için glikoliz, sitrik asit döngüsü (Krebs döngüsü veya Trikarboksilik Asit Döngüsü (TCA)) ve oksidatif fosforilasyonu içeren üç metabolik aşamanın birlikte gerçekleştirildiği bir enerji üretim yoludur (90).

Hücresel solunumun ilk aşaması olan glikoliz hücrenin sitozolünde gerçekleşmektedir. Glikoliz, fermentasyon, anaerobik solunum ve aerobik solunumda ortak olarak görülen evrimsel geçmişe sahip düşük miktarda ATP (2 ATP) üretimini sağlayan bir enerji üretim mekanizmasıdır. Glikoliz aşamasında glukozun yıkılması ile elde edilen piruvatın mitokondriye girişi ile devam eden aerobik solunum aşamaları mitokondride yürütülmektedir. Piruvatın oksidasyon ürünü olan Asetil CoA, sitrik asit döngüsüne (TCA) aktarılmaktadır. TCA'da glukozun karbondioksit'e yıkımı tamamlanmaktadır. Glikoliz ve TCA'da ATP'nin küçük bir kısmı substrat düzeyinde fosforilasyon adı verilen mekanizma ile üretilmektedir. Bu iki aşamada elektronları alma görevi olan elektron taşıyıcıları olan NADH (Nikotinamid adenin dinükleotit) ve $FADH_2$ (Flavin Adenin Dinükleotit), elektronları mitokondri iç zarında bulunan elektron taşıma zincirine (ETZ) aktararak oksidatif fosforilasyon ile elektron taşımını sağlamaktadır (90).

Solunumda üretilen ATP'nin %90'ı, TCA'da indirgenen NADH ve $FADH_2$ 'nin besinden koparılan elektronları ETZ'ye aktarması sonucunda oksidatif fosforilasyon ile üretilmektedir (Şekil 2-8). ETZ, ökaryotik hücrelerin mitokondri iç zarına gömülü yapılardan oluşmaktadır. Mitokondriyal iç zarın kristaller oluşturacak biçimde kıvrımlar yapması, her mitokondrinin binlerce ETZ içermesini mümkün kılacak alanı sağlamaktadır. Bu durum yapının işleve uygunluğuna bir örnektir. Zincir bileşenlerinin çoğu I ve IV arasında numaralandırılan çoklu protein kompleksleri halinde bulunan protein yapısındadır. ETZ zincirinin sonunda elektronlar oldukça elektronegatif olan oksijene aktarılır. Elektronu alan her oksijen atomu elektronların yanı sıra çevredeki ortamdan bir çift hidrojen iyonu alır ve su oluşturur. ETZ'den açığa çıkan kimyasal enerjinin, mitokondri zarında bulunan ATP sentaz enzimi tarafından ATP formuna çevrilmesi ile ATP üretimi tamamlanmaktadır (90).



Şekil 2-8. Oksijenli solunum.

Sitoplazmada gerçekleşen glikoliz aşamasında bir glukozdan elde edilen iki piruvat, sitoplazmadan mitokondriyal matrikse taşınarak TCA döngüsünden karbondioksit olarak çıkmaktadır. TCA'da NADH ve FADH tarafından koparılan elektronlar mitokondriyal krista üzerinde yer alan ETZ enzimleri ile oksijene iletilmektedir. Oksijen atomu elektronları aldığında, bir çift hidrojen alarak su molekülünü oluşturmaktadır. ETZ'de çıkan kimyasal enerji, oksidatif fosforilasyonda ATP sentaz enzimi tarafından ATP formuna dönüştürülmektedir.

Özetle aerobik solunum sürecinde enerjinin akış yönü glukoz molekülünün sitoplazmada yürütülen ve solunumun ilk aşaması olan glikoliz sonucunda piruvata dönüşümü ile başlamaktadır. Glukozun yıkım ürünü olan piruvat, solunumun ikinci ve üçüncü aşaması olan TCA ve ETZ'de hücrel enerji harcama birimi olan ATP'ye dönüştürülmek üzere mitokondriye aktarılmaktadır. Net ATP hesabı yapılacak olursa, glikolizde iki ATP ve TCA döngüsünde iki ATP, oksidatif fosforilasyonda ise 26-28 ATP üretimi ile her bir glukoz molekülünden 30-32 ATP üretilmektedir (90).

Hücrel solunum sürecinde mitokondrinin işlevselliği biyoenerjetikte önemli rol oynamaktadır. Mitokondride ETZ'de üretilen ROT, oksidatif stres koşulunda mitokondriye hasar vermektedir. Mitokondrinin ROT'un hem üreticisi hem de hedefi olması ile ROT'un mtDNA'ya çeşitli hasarları sonucunda kusurlu ETZ süreçleri oluşmaktadır. Solunum zincirindeki oluşan kusurlar ROT üretiminin daha da artmasına neden olmaktadır (91). Hasarlı mitokondriyal enerji metabolizmasında NAD⁺

seviyelerinin azalması ile birlikte ROT oluşumunda rolü olan ETZ'den sızan elektronlar da ETZ fonksiyonunun azalmasına katkıda bulunmaktadır (92).

2.3. Mitokondriyal Genom ve Mitokondriyal Genomun Düzenleyicileri

mtDNA, 16 kilobaz (kb) uzunluğunda, nükleer genoma benzer çift sarmallı dairesel bir DNA molekülüdür (93, 94). MtDNA, 13 peptid, 2 ribozomal RNA (rRNA), ve organel içindeki proteinleri sentezlemek için gerekli olan 22 transfer RNA (tRNA) olmak üzere 37 gen kodlamaktadır (94). MtDNA çift sarmallı yapısı ile nükleer genoma benzemesine rağmen, nükleer genomdan belirli özellikleri ile farklıdır (Tablo 2-1). MtDNA'dan kodlanan proteinlerin tümü, hücreye enerji sağlama görevini yürüten mitokondriyal oksisidatif fosforilasyon sisteminin enzim kompleksleridir. Ancak bu genom, mitokondriyal işlevsellik için gerekli olan tüm proteinleri sentezlemek için tek başına yeterli değildir (93). Mitokondri işlevselliği için gerekli olan mitokondriyal proteinlerin çoğu nükleer genomdan kodlanmaktadır (77). Nükleer genomdan kodlanan proteinler, sitozolde sentezlendikten sonra mitokondrinin dış ve iç zarlarında bulunan protein translokasyon transmembran proteinleri aracılığı ile mitokondriye yerleşmektedir (95). Mitokondri içine protein translokasyonunda dış zar translokazı (TOM), iç zar translokazı (TIM), presekans translokaz ilişkili Motor (PAM) ve matriks Hsp70 kompleksleri görev almaktadır (96).

Tablo 2-1. Mitokondriyal genom ile nükleer genom karşılaştırması.

	Mitokondri Genomu	Nükleer Genom
Genom Şekli	Dairesel	Doğrusal
Genom Büyüklüğü	16.569 bç	3,099 Mbç
Kodlanan Gen Sayısı	37	~ 20.000
Kodlamayan DNA (%)	% 3	% 99
Kalıtım	Maternal	Biparental
Genom Organizasyonu	Zarflanmamış Yapı	Kromatin Paket
mRNA Kopyalama	Polisistronik	Monosistronik
Hücrede Kopya Sayısı	~ 100-1000	2

Birçok ökaryot gibi memelilerde mtDNA, maternal kalıtım paterni göstermektedir. Bir hücrede nükleer bir genin biri anneden, diğeri babadan gelen iki kopyası bulunmaktadır ancak nükleer genomun aksine, hücre içerisinde maternal kalıtmı çok sayıda (~100-1000) mtDNA kopyası bulunmaktadır. Tipik olarak bireyler sadece maternal mtDNA genotipini içermektedir ve bu çok sayılı genomların tamamının aynı olması homoplazmi olarak adlandırılmaktadır. Mitokondriyal genomda oluşan

mutasyonlar sonucunda yabanil tip ve mutant allellerin bir arada bulunmasına heteroplazmi denilmektedir. Heteroplazmi, mitokondriyal hastalıklarla ve bu hastalıkların şiddeti ile ilişkilendirilmektedir (97).

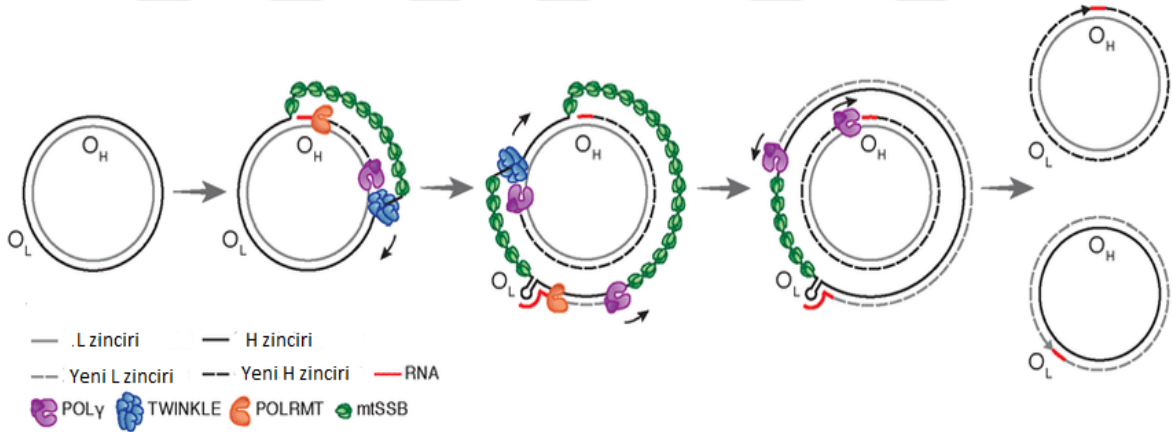
2.3.1. Mitokondriyal DNA Replikasyonu

MtDNA'da baz bileşimlerinde farklılık gösteren, pürinlerden oluşan ağır (H) zincir ve pirimidinlerden oluşan hafif (L) zincir olmak üzere iki adet zincir bulunmaktadır. MtDNA kontrol bölgesi olarak bilinen uzun kodlamayan bölge (NRC) içermektedir. Bu bölgede hafif iplik ve ağır iplik için bir tane olmak üzere polisistronik transkripsiyon promotörleri mevcuttur (98). Ağır zincirde yer alan ve ağır zincirin replikasyonunu kontrol eden 1211 baz çifti (bç)'lik kodlamayan bölge D-halkası (D-loop; displacement loop) gen içermemektedir ve polimorfiktir (99).

MtDNA replikasyonu için gerekli olan proteinler nDNA'dan kodlanmaktadır. DNA polimeraz γ (Pol γ), mitokondrideki replikatif polimerazdır ve yeni sentezlenen mtDNA'daki hata okuma için ekzonükleaz alanını içermektedir. Pol γ , şablon olarak çift sarmallı DNA'yı kullanamamaktadır ve bu nedenle mitokondriyal replikasyon çatalında DNA şablonunu çözmek amaçlı bir DNA helikaz gerekmektedir. TWINKLE helikaz, çift sarmallı DNA şablonunu çözerek Pol γ 'nın önünde hareket etmektedir. Mitokondriyal tek sarmallı DNA bağlayıcı protein (mtSSB), TWINKLE'in sarmalı açarak oluşturduğu tek sarmallı DNA (ssDNA) 'ya bağlanarak, ssDNA'yı nükleazlara karşı korumaktadır. MtSSB, aynı zamanda TWINKLE'nin helikaz aktivitesini uyarmakta ve ayrıca Pol γ 'nın işlenebilirliğini artırmaktadır (98). MtDNA replikasyonuna yardımcı olan ek proteinler de bulunmaktadır. Pol γ enzimine ek olarak mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM) da mtDNA replikasyonunda transkripsiyon hızını kontrol etmek gibi önemli bir role sahiptir (100).

MtDNA replikasyonu için önerilen farklı modeller bulunmaktadır. Bu modellerin içinde en çok kabul edilen iplik yer değiştirme (SDM) modelidir. MtDNA'nın her iki ipliği için ayrı replikasyon orijini bulunmaktadır. İplik yer değiştirme modeline göre mtDNA replikasyonu H zinciri sentezi için NCR bölgesi içinde H zinciri replikasyon orijini (OriH) olarak bilinen bölgeden başlamaktadır. H zinciri sentezi tek yönlü ve sürekli olarak ilerlemektedir. Bu aşamada L zinciri sentezi henüz başlamamıştır. L ipliği oriL adı verilen fiziksel olarak farklı konumda olan replikasyon orijini ile farklı zamanda replikasyona başlamaktadır (101). İlk replikasyonu yürütülen H zincirinde

TWINKLE sarmalı açılmaktadır ve Poly DNA replikasyonundaki replikatif polimeraz olarak işlevini yerine getirmektedir. Bu aşamada mtSSB H zincirine bağlanarak, mitokondriyal RNA polimeraz (POLRMT)'ın zincir üzerinde RNA sentezi başlatmasını engellemektedir. Replikasyon çatalı, mtDNA replikasyonun üçte iki oranında tamamlanması ile diğer zincirine ait olan diğer replikasyon orijini oriL'ye geçmektedir. Tek sarmal yapıdaki H zinciri oriL'deki kök-ilmek (stem-loop) yapısına katlanmaktadır. Kök (stem), mtSSB'nin bağlanmasını etkili bir şekilde bloke etmektedir. Bu engellenmenin sonucunda halka bölgesinde kısa bir tek sarmallı DNA uzantısına POLMRT bağlanarak RNA sentezini başlatmaktadır. Ancak POLRMT, bu tek sarmallı DNA üzerinde işlem yapmamaktadır. Bu işlemin devamında, Poly POLRMT ile yer değiştirerek L zincirinin DNA sentezini başlatmaktadır. Bu noktadan itibaren H ve L zincir sentezi, iki iplik tam daireye ulaşınca kadar sürekli olarak ilerlemektedir (98). Yeni kopyalanmış yavru mtDNA'lar, mekanik olarak birbirine kenetlenmiş yapıdadır. Dairesel genomların replikasyonunda yavru DNA'ların ayrımı için dekatasyon gereklidir. Topoizomeraz 3α'nın (Top3α) bir mitokondriyal izoformu, hemikatenan yapısını çözmek için gereklidir (Şekil 2-9). (98).



Şekil 2-9. Mitokondriyal DNA replikasyonu.

MtDNA replikasyonu H zincirinde başlamaktadır. Replikasyonda dört enzim görev almaktadır. TWINKLE helikaz çift sarmalı açmaktadır. mtSSB tek sarmala bağlanarak hatalı çoğalmaları önlemektedir. Poly replikatif polimeraz enzimidir. POLRMT RNA sentezini başlatmaktadır. H zincirinde devam eden replikasyon L zincirindeki replikasyon orijininin bulunduğu konuma geldiğinde kök yapısına bağlanarak Poly ile L zincirinin replikasyonunu başlatmaktadır. Replikasyon tamamlandığında iki yavru zincir topoizomeraz enzimi ile ayrılmaktadır.

2.3.2. Mitokondriyal DNA Kopya Sayıları

Memelilerde mtDNA, bir hücrede nükleer bir genin biri anneden biri babadan gelen iki kopyasının aksine bir hücrede, hücrenin türüne ve enerji talebine yanıt olarak yüzlerce veya binlerce kopya sayısında bulunmaktadır (100). Bu durum aynı biçimde mitokondri için de geçerli olmakta olup, mitokondrinin işlevselliğine paralel olarak her bir mitokondri başına replike olmuş mtDNA oranı değişmektedir. Bu bağlamda; hücrelerin enerji talebine göre, hücrelerde bulunan mitokondri sayıları ve tek mitokondri içerisindeki çoklu mtDNA kopyaları ile hücrelerdeki mtDNA oranı değişmektedir. MtDNA'nın replikasyonu hücre ve mitokondri içerisindeki mtDNA kopya sayısını (mtDNA-KS) arttırmaktadır (102).

Yaşlanma, nörodejeneratif bozukluklar ve KAH'n da içinde bulunduğu patolojik süreçlerde mitokondri fonksiyonu olumsuz anlamla değişmektedir. Mitokondri fonksiyonu; mitokondriyal morfolojide, sayı ve protein seviyelerini ifade eden mitokondriyal içerikte ve oksidatif fosforilasyon kapasitesindeki değişimlerle bozulmaktadır. Yaşlanma ve patolojik süreçlerde mtDNA'da nokta mutasyonları, delesyonlar ve mtDNA-KS değişimleri daha önceki çalışmalarda incelenmiştir (102-106). Çok sayıda çalışmada, periferik kanda mtDNA-KS'nin yaşlanma ve farklı patolojik durumlarda azaldığı gösterilmiştir. Buna karşın, çeşitli hastalık ve dokularda mtDNA-KS incelemelerinin sonucuna göre dokuya özgü olarak artış olduğu belirlenmiştir (107).

mtDNA-KS ölçümü, periferik kandan veya diğer dokulardan elde edilmiş DNA örneklerinden yapılabilir. MtDNA-KS'nin belirlenmesi için kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılmaktadır. Kantitatif PZR yönteminde mitokondriyal genlerin, nükleer genomdan anlatımları olan genlere oranı hesaplanmaktadır. Mitokondriyal NADH ubikinon oksidoredüktaz zincir genleri (*MT-ND1*, *MT-ND4*), mitokondriyal sitokrom B (*MT-CYB*) ve mitokondriyal tRNA lösin 1 (*MT-TL1*) genlerini kapsayan mitokondriyal genler ve nükleer genomdan Beta-2 Mikroglobulin (*B2M*), büyük ribozomal protein (*RPLPO*), beta aktin (*ACTB*) ve Ribonükleaz P RNA Bileşeni H1 (*RPPH1*) genleri bu yöntemle referans alınan genlerdir. MtDNA-KS'lerin qPZR haricinde mikrodizin, tüm genom ve tüm ekzom analizlerinden de ölçümü mümkün olabilmektedir. Dijital PZR (dPZR), bu yöntemlere ek ve yeni bir yöntemdir. Dijital veya damlacık PZR olarak isimlendirilen bu yöntem,

mitokondriyal prob sayısı ile nükleer prob sayısını oranlayarak kantitatif mtDNA-KS ölçümünü yapmaktadır (108). KVH ile ilgili çeşitli çalışmalar ve meta analizlerde, mtDNA-KS'nin kardiyovasküler hastalık prevalansı ve insidansı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (92).

2.4. Mitokondriyal Biyogenez

Hücrelerde mitokondri ve mitokondriyal genomunun toplam içeriği, hücre fonksiyonunun devamı ve biyolojik süreçler için büyük önem taşımaktadır. Hücre ve mitokondri ilişkisinin açıklaması amacı ile yapılan araştırmalarda, memelilerin çeşitli hücre tiplerinde hücre başına düşen mitokondri ve mtDNA-KS'nin farklı olduğu gösterilmiştir (109). Hücrelerdeki mitokondrilerin morfolojisi, işlevselliği ve sayısı mitokondriyal biyogenez (MB) ile ilişkilendirilmiştir. MB, mitokondrinin büyüme ve bölünme sürecinde nükleer DNA ve mtDNA'dan kodlanan proteinlerin koordineli sentezi ile regüle edilen mitokondriyal yaşam döngüsüdür. (100). Mitokondri, hücrenin fonksiyonlarının devamını sağlayabilmek için değişen koşullara uyum sağlamak ve mitokondriyal homeostazı sürdürmek için sürekli olarak fisyon, füzyona ve mitofajiye uğrayan dinamik bir organeldir. Bu süreçlerle mitokondri kalite kontrolü sağlanmaktadır (102, 110).

2.4.1. Füzyon

Füzyon kelimesi türkçede birleşme, kaynaşma anlamına gelmektedir (111). Anlamına paralel olarak füzyon, iki mitokondrinin sırasıyla dış ve iç membranlarının birleşmesiyle gerçekleşen bir işlemdir. Füzyon sırasında hasar görmüş mitokondriyi onarmak amacı ile birbirine bağlı mitokondri ağları oluşmaktadır (112). Memelilerde mitokondriyal füzyona, dinamin ailesinden guanin trifosfataz (GTPaz) olan Mfn1/2 ve optik atrofi 1 (OPA1) füzyon proteinleri aracılık etmektedir. Mitofusinler bağlandıktan sonra GTP hidrolizi, mitokondriyal füzyonu sağlamak için önemli bir adımdır, çünkü GTPaz hasarı kaynaşmamış mitokondri membranı ile sonuçlanmaktadır (113). OPA1 iç mitokondriyal zarların füzyonundan sorumludur (110). OPA1 proteini iç zarların kaynaşmasını sağlarken mitokondri kristallerini birbirine bağlar ancak kaynaştırmaz (113).

Mitokondriyal füzyon sırasında mtDNA'da oluşan mutasyon ve delesyon hasarları, aynı hücre içindeki başka bir yabancı tip mitokondri ile birleşme ve çapraz tamamlama yoluyla düzeltilmektedir. Bu olay haricinde mitokondriler arasında protein

ve lipid alışverişi yapılarak çevresel hasarların etkileri azaltılabilmektedir. Mitokondriyal füzyon, membran potansiyelinin yüksek olmasına ve ATP düzeyine bağlıdır. Bu nedenle, mitokondriyal füzyon, oksidatif fosforilasyona gerek duyan hücrede oksidatif kapasiteyi en üst düzeye çıkarabilen bir mekanizmadır. Protein sentezini etkileyen tedaviler ve artan otofaji de füzyonu artırmaktadır. Mitokondriyal füzyon, mitokondri metabolizmasındaki değişikliklere yanıt olarak da artabilmektedir (112).

2.4.2. Fisyon

Ayrışma anlamına gelen fisyon, hasarlı mitokondrilerin mitofaji aracılığıyla mitokondri popülasyonundan ayrılması için mitokondriyal fragmanlar oluşturulmaktadır. Fisyon, mitofajiyi kolaylaştırma ve hücre proliferasyonunu hızlandırma amacı ile küçük ve ayrılmış halde mitokondri fragmanları oluşturmaktadır (114). Memelilerde mitokondriyal fisyon aynı zamanda büyük bir GTPaz olan dinaminle ilişkili protein 1 (Drp1) aracılık etmektedir. Drp1, mitokondriyi fragmente etmek için dış mitokondriyal membrana alınabilen sitozolik bir proteindir ve sonuçta bir mitokondrinin iki ayrı organelle bölünmesine neden olur. Drp1, fisyon sırasında, fisyon 1 (FIS1), mitokondri fisyon faktörü (Mff), mitokondriyal dinamik protein (MID49) ve MID51 proteinleri olmak üzere dört mitokondriyal reseptör proteini ile etkileşime girmektedir. Memeli hücrelerinde, FIS1 ve Drp1 arasındaki etkileşimin mitokondriyal fisyonun düzenlenmesinde küçük bir role sahip olduğu, buna karşın Drp1'in diğer üç reseptör proteini ile etkileşimlerinin fisyon için önemli roller oynadığı görülmektedir. Mitokondriyal fisyon ve füzyon işleyişleri, proteoliz ve translasyon sonrası modifikasyonlarla düzenlenmektedir (112). Mitokondriyal fisyon, hücreleri yeterli sayıda mitokondri ile doldurmak, büyümek ve bölünmek için gereklidir (112).

Fisyon ve füzyon ayrılmaz bir şekilde bağlantılıdır. Canlı hücre görüntüleme kullanılarak, mitokondriyal bölünme bölgelerinin benzer şekilde füzyon bölgeleri gibi davranabileceği gösterilmiştir. Ek olarak, mitokondriyal füzyonu fisyon olayı takip edebilir. Füzyon ve fisyon mekanizmalarının bileşenleri arasındaki doğrudan etkileşimler de rapor edilmiştir (115). Mitokondrinin morfolojisi, sayısı ve biyoenerjetiği, fisyon ve füzyon arasındaki denge ile korunmaktadır. Füzyon ve fisyon dengesinin bozulması, mitokondrinin fonksiyonelliğini olumsuz anlamda etkilemektedir. Mitokondrinin fizyolojik işlevlerinde ve morfolojisindeki anormallik

mitokondriyal disfonksiyon olarak tanımlanmaktadır. MB'nin düzensizleşmesi, düşük NAD⁺ seviyeleri, mutasyona uğramış mtDNA ve elektron sızıntısı ile serbest radikallerin oluşumu, mitokondriyal biyoenerjiğin bozulmasına neden olmaktadır. Mitokondri enerji metabolizmasının bozulması, azalmış ETZ ve dolayısıyla artmış ROT'a neden olmaktadır. ROT artışı sonucunda füzyon ve fisyon arasındaki denge bozularak, mitokondriyal homeostaz ve mitokondriyal kalite zarar görmektedir (100).

2.4.3. Mitofaji

Mitokondri, oksidatif fosforilasyon sırasında elektron taşınmasının bir yan ürünü olarak sürekli olarak yüksek oranda ROT üretir. ROT proteinlere, lipidlere ve DNA'ya zarar verir. Mitokondri, hasarlı proteinleri elimine etmek için kalite kontrol proteazlarını kullanmaktadır. Hasarlı mitokondriyal dış zar proteinleri de ubikuitin proteazom kalite kontrol yolu ile uzaklaştırılmaktadır. Mitokondri, çekirdekte bulunan DNA onarım yollarının tümü olmasa da bazıları ile genotoksik hasara yanıt verir. Bu proteotoksik ve genotoksik hasar-tepki yolları, kalite kontrolü için tek tek molekülleri hedefleyerek değiştirilmiş fisyon veya füzyon oranlarına gerek kalmadan mitokondriyi küçük hasarla ile kurtarır. Bir başka kalite kontrol mekanizması, mitokondriyal fisyon ve füzyonla bağlantılı bir süreç olan otofaji aracılığıyla mitokondrinin tamamen ortadan kaldırılmasını içermektedir (112).

Otofaji (Latince: oto-faji kendini yemek) hücredeki hasarlı parçaların lizozomal veziküller tarafından sindirildiği bir süreçtir. Otofaji besin yoksunluğu koşullarında hücreye metabolit sağlamaktadır (116). Otofaji bazal seviyelerde olduğunda hücre içi homeostazın devamını sağlamaktadır. Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere tanımlanan üç otofaji formu bulunmaktadır. Bu üç otofaji formundan biri olan mikrotofaji organellerle ilişkili olan bir otofaji formudur. Mikrotofajide hasarlı olan organel, lizozomal membranın invajinasyonu ile yutulmaktadır. Mikrotofaji hasarlı organellerin yüzeyinde bulunan sinyal molekülleri ile başlatılmaktadır ve hedeflenen organelle bağlı olarak isimlendirilmektedir. Örneğin mitokondri için mitofaji terimi kullanılmaktadır (117, 118). Mitofaji, normal fizyolojik koşullar ve patolojik stres altında disfonksiyonel mitokondriyi ortadan kaldırmaktadır. ROT artışında, mitokondriyal hasarın artması ve mitofajinin bozulması ile hasarlı mitokondrilerin sindirilememesi sonucu hücrelerde hasarlı mitokondriler birikmektedir (100). Bu bağlamda otofaji, eski ve hasarlı mitokondriyi ortadan kaldırarak sağlıklı bir

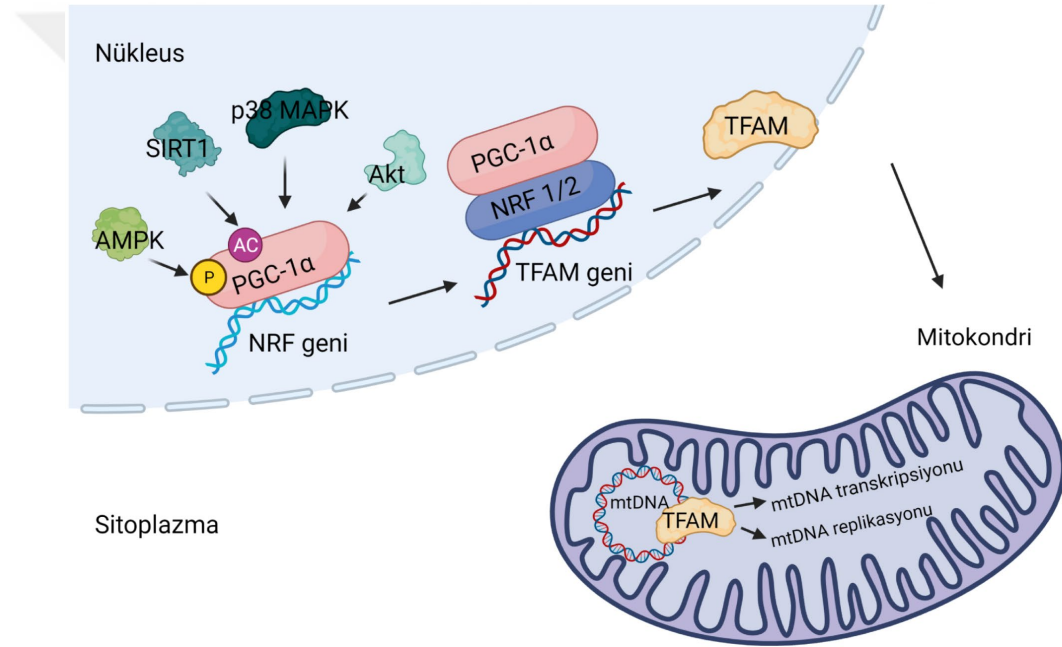
mitokondriyal ağı sürdürmek için de gereklidir. Mitokondrinin otofajik olarak ortadan kaldırılması, mitokondriyal fisyon ve füzyon süreçleriyle yakından bağlantılıdır (112).

Memelilerde mitofaji başlaması için sinyal oluşumu gereklidir. Mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Krebs döngüsünün aktivitesi ile ilişkili redoks dönüşümlerinden kaynaklanmaktadır ve ATP sentaz tarafından ATP yapmak için kullanılan ara enerji depolama formudur. Redoks dönüşümleri yalnızca bir elektrik potansiyeli değil, aynı zamanda bir proton gradyanı da üretir ve birlikte hidrojen iyonlarının zar ötesi potansiyelini oluştururlar. Normalde hücrelerde $\Delta\Psi_m$ ile ATP seviyeleri dengeli gitmektedir. $\Delta\Psi_m$, ATP sentezinde temel rol oynamasıyla birlikte, aynı zamanda mitokondrilerin canlılığını belirleyen bir faktördür. Ancak hücrede dejeneratif olayların sonucunda yetersiz ATP üretimi veya daha fazla ATP kullanımı ATP seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır. Arz-talep dengesizliği sonucunda ATP seviyelerindeki düşüş, mitokondrinin membran potansiyelini azaltmaktadır (119). $\Delta\Psi_m$ kaybı memeli hücrelerinde mitofajiyi başlatıcı bir sinyal olmaktadır. PTEN ile indüklenen kinaz 1 (PINK1) ve Parkin memeli hücrelerinde işlevsiz mitokondriyi algılayan protein ve enzim yapısıdır. PINK1 normal koşullarda mitokondride inaktif durumdadır. Sonuç olarak Parkin sitozolde inaktif kalmaktadır ve mitofaji baskılanmaktadır. Mitokondri hasarlı olduğunda PINK1 bir mitokondri membran protein kompleksi olan TOM ile etkileşime girmektedir. Bu heterooligomerik komplekste, iki PINK1 molekülü, yüksek derecede aktif hale gelmek için birbirini dimerize ederek çapraz fosforile etmektedir. PINK1 Parkin'i fosforile etmektedir. Fosforillenmiş Parkin, konformasyonel değişime uğrayıp fosfo-ubikuitine bağlanmakta ve tamamen aktif hale gelmektedir (120). Mitokondriyal membran üzerinde PINK1'in birikmesi ve Parkin'i fosforillemesi sonucunda mitokondriyal proteinler üzerinde ubikuitin zincirlerinin oluşumu, otofaji reseptörlerinin ve sinyal proteinlerinin mitokondriyal yüzeye bağlanmasına yol açarak mitofajiye aracılık etmektedir (121).

ROT artışı mitokondriyal hasarın artmasına ve mitofajinin bozulmasına yol açarak hücrelerde hasarlı mitokondrilerin birikmesine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar, hücrelerde hasarlı mitokondri birikiminin yaşlanma sürecinde ve KAH'ın da dahil olduğu birçok hastalıkta önemli bir etken olduğu göstermektedir (100).

2.4.4. Mitokondriyal Biyogenezin Düzenleyicileri

Egzersiz, kalori kısıtlaması ve sıcaklık gibi fizyolojik uyarılara karşılık olarak hücreler MB sürecini başlatmaktadır. MB süreci, hücrede bulunan ve mtDNA'ya etkide bulunan birçok transkripsiyonel düzenleyici tarafından modüle edilmektedir (96). Hücrede mitokondrinin sayısının kontrolü ve mtDNA replikasyonu ile artan mtDNA-KS, MB ile düzenlenmektedir. Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör-gama koaktivatör-1 α (PGC-1 α), mitokondriyal biyogenezin anahtar düzenleyicisi olan bir kotranskripsiyonel düzenleme faktörüdür. PGC-1 α , MB'nin diğer düzenleyicileri olan nükleer solunum faktörleri (Nrf1/2) ve TFAM gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek mtDNA transkripsiyonunu düzenlemektedir (122).



Şekil 2-10. Mitokondriyal biyogenez düzenleyicileri.

PGC-1 α , mitokondriyal biyogenezin ana düzenleyicisi olan nükleer DNA kodlu transkripsiyon koaktivatörüdür. PGC-1 α , Nrf1/2 ile etkileşime girerek mtDNA transkripsiyonu ve replikasyonunu başlatan TFAM'ı aktive etmektedir. PGC-1 α ; AMPK, Akt ve p38 MAPK'nın fosforilasyonu ve SIRT1'in deasetilasyonu ile aktive olmaktadır. Şekil BioRender web tabanlı aracı ile oluşturulmuştur.

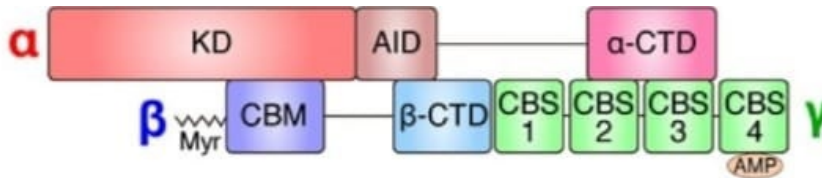
PGC-1 α , mtDNA replikasyon düzenleyicisi olan TFAM'ın ekspresyonunu modüle etmek için mtDNA promotörlerinde Nrf-1 ve Nrf-2 ile etkileşime girmektedir. Böylece PGC-1 α mtDNA'nın replikasyon, transkripsiyon ve translasyonunun başlamasını sağlamaktadır. MB faktörleri olan Nrf-1 ve TFAM'ın artan protein seviyeleri aynı zamanda mtDNA'yı tamir etmektedir (Şekil 2-10) (100).

MB'nin ana düzenleyicilerinden olan PGC-1 α aktivitesi; protein kinaz B (Akt), AMPK, Sirtuin 1/3 (SIRT1/3) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK p38) tarafından düzenlenmektedir (100).

2.4.4.1. AMPK

AMPK, hücre içi enerji dengesinin düzenlenmesinde rol alan bir protein kinazdır. AMP:ATP oranındaki artış AMPK'nın aktivasyonu ile sonuçlanmakta ve bu aktivasyon sonucunda ATP üretiminde artış sağlanmaktadır. Enerji homeostazının bozulması, tip 2 diyabetes mellitus (T2DM), obezite ve kanser gibi çeşitli hastalıkların oluşumuna yol açmaktadır. AMPK enerji homeostazındaki rolü nedeniyle, metabolik hastalıkların önlenmesi ve yeni tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde önemli bir hedef haline gelmiştir (123).

İnsanda bulunan AMPK, katalitik α -alt birimi ($\alpha 1$ ve $\alpha 2$), iskele β -alt birimi ($\beta 1$ ve $\beta 2$) ve düzenleyici γ -alt biriminden ($\gamma 1$, $\gamma 2$ ve $\gamma 3$) oluşan heterotrimerik bir komplekstir (Şekil 2-11) (123, 124). AMPK'nın α alt birimi, N-terminal protein kinaz alanı (KD) ve C terminal düzenleyici alanı içermektedir. β alt biriminin C terminali bölgesi bir iskele görevi görerek γ alt birimi ve α alt biriminin C terminali bölgesi ile etkileşime girmektedir. AMPK β alt birimi aynı zamanda, karbonhidrat ve glikojen bağlanması için bağlanma alanı olarak adlandırılan bir bölge içermektedir. AMPK γ alt birimi ise, nükleotid bağlanmasında yer alan dört sistatyonin-b-sentaz bölgesini içermektedir. Memelilerde 12 farklı AMPK kompleksi bulunmaktadır. AMPK α ve β alt birimlerinin iki izoformu, γ alt biriminin üç izoformu, bu komplekslerin oluşumunda rol almaktadır (123). Oluşan farklı heterotrimerik AMPK kompleksleri farklı işlevlerine göre hücre ve doku spesifik dağılım göstermektedir (124).



Şekil 2-11. AMPK proteini alt birimleri.

AMPK α alt birimi katalitik, β alt birimi iskelet yapısı, γ alt birimi düzenleyici görevlerini yürütmektedir.

AMPK, AMP tarafından doğrudan aktive edildiği gibi, sentetik AMP analogları tarafından da aktive edilmektedir. Bu moleküller, AMPK α alt biriminde Thr172'nin fosforilasyonu aracılığı ile aktivasyonu sağlamaktadır ve bu aktivasyon fizyolojik AMPK aktivasyonu olarak isimlendirilmektedir. AMPK aktivasyonu ayrıca, yukarı akış (*upstream*) kinazlar tarafından da düzenlenmektedir. Karaciğer kinaz B1 (LKB1) ve kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz β (CaMKK β), AMPK α Thr172 fosforilasyonunu yaparak AMPK'yı aktive eden iki yukarı akış kinazdır (124).

AMPK, glukoz/lipid homeostazı, vücut ağırlığı, gıda alımı, insülin sinyalizasyonu ve mitokondriyal biyogeneze fonksiyonel özelliklere sahiptir. AMPK'nın aktivasyonu antitümörojenik ajan olarak hücre döngüsünü durdurmaktadır. AMPK'nın diğer önemli bir yönü, memelilerde otofajiyi regüle eden bir protein kinaz olan Unc-51 benzeri otofajiyi aktive eden kinaz (ULK1) ve fosfatidilinositol 3-kinaz, katalitik alt birim tip 3 (PI3K3/VPS34) kinazlarını doğrudan fosforile etmesidir (124). AMPK ayrıca mitokondriyal biyogenezi arttırarak, dokunun ve hücrenin enerji ihtiyacı doğrultusunda mitokondriyal kütlenin artmasını sağlamaktadır. AMPK mitokondriyal biyogenezin ana düzenleyicisi olan PGC-1 α 'yı doğrudan fosforile ederek, PGC-1 α protein ekspresyonunu arttırmaktadır (125).

Mitokondriyal biyogeneze önemli rolü olan AMPK'nın doğrudan aktivatörleri olduğu gibi dolaylı aktivatörleri de bulunmaktadır. Metformin, T2DM tedavisinde kullanılan oral antidiyabetik bir ilaçtır. Metformin dolaylı olarak, mitokondriyal zincir I kompleksini inhibe ederek AMP:ATP oranının artmasına neden olmaktadır. Bu bağlamda metformin, AMPK'ya bağımlı etkiler ile kanda lipid ve glukoz seviyelerini düşürmektedir. Sebze ve tahıllarda bulunan pelifenol, resveratrol, berberin ve kersetin gibi doğal antioksidanlar da AMPK'nın dolaylı aktivatörleri arasında yer almaktadır. AMPK, aynı zamanda hücre içi ROT seviyelerine de duyarlılık göstermektedir. Oksidatif stres AMPK seviyelerini düşürmektedir bunun yanında, artan ROT seviyesinin ATP seviyesinde azalma olmaksızın AMPK aktivasyonunu uyarabildiği gösterilmiştir (126, 127). Bu bağlamda ROT üretimine neden olan ve DNA'ya hasar veren ajanlar AMPK'yı aktive edebilmektedir (124). Bireylerin yaşam koşullarının da AMPK aktivasyonunda rol aldığı bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda, AMPK'nın egzersiz sonucunda aktive olduğu ve metabolik sağlık üzerinde olumlu etkiler gösterdiği belirtilmiştir (128).

2.4.4.2. SIRT1/SIRT3

Memeli sirtuinleri NAD⁺ bağımlı enzim ailesi proteinleridir. İnsanlarda SIRT1-7 olarak isimlendirilen yedi adet sirtuin bulunmaktadır. Literatürde üzerinde en çok çalışılan SIRT1, hücre döngüsü ve enerji homeostazı gibi birçok metabolik yolda önemli rol almaktadır. Diğer bir sirtuin olan SIRT3 ise, mitokondri fonksiyonu ve mitokondriyal enerji metabolizması üzerinde önemli etkilere sahiptir. Genel olarak, sirtuinler NAD⁺ varlığında enzimatik aktivite gösteren hücre enerji sensörleridir. Hücresel stres ve düşük enerji koşulunda, NAD⁺ artmakta ve sirtuinler aktive olmaktadır (129).

Memeli SIRT1, mitokondriyal fonksiyon ve metabolizma için bir dizi hedef proteinin deasetilasyonundan sorumludur (129). SIRT1, transkripsiyon sırasında PGC-1 α 'yı deasetile ederek PGC-1 α 'nın aktivasyonunu sağlamaktadır (130). SIRT1 bu fonksiyonlarından dolayı, MB'yi arttırıcı bir işlev görmektedir. SIRT3 ise, mitokondride lokalize mitokondriyal proteinlerin deasetilasyonu ile mitokondri biyoenerjetliğini düzenlemektedir (129).

SIRT1 metabolik fonksiyonlar için önemli bir proteindir. Bu metabolik fonksiyonların aydınlatılmasında fare modelleri kullanılmıştır. SIRT1 proteini eksikliğinde, kalp kusurları, azalmış lokomotor aktivite ve metabolik anomalilikler meydana gelmektedir. SIRT1'in aşırı ekspresyonunda ise, fareler yüksek yağlı diyet ile beslenmesine rağmen metabolik bozukluğa karşı direnç göstermişlerdir. Bu bulgular sonucunda, farmakolojik olarak SIRT1 aktivasyonunun metabolik bozukluklarla ilişkili patolojik durumları hafifletebileceği varsayılmaktadır (129). SIRT1 aktivatörü olan resveratrolün farmakolojik olarak uygulanmasıyla oluşturduğu metabolik faydalar üzerinde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (131-133).

2.4.4.3. Mitokondriyal Biyogenezde Nükleer Genomun Diğer Protein Düzenleyicileri

PGC-1 α , Nrf1/2, TFAM ve PGC-1 α 'nın aktivatörleri olan AMPK ve SIRT1 proteinlerinin yanı sıra başka düzenleyiciler de MB'yi regüle etmektedir. PGC-1 β , PGC-1 α ile benzer moleküler özellikler taşımakta ve MB'yi PGC-1 α ile benzer şekilde Nrf1/2 üzerinden düzenlemektedir. PGC-1 α 'ya benzer özellikler göstermesine karşın PGC-1 β , soğuğa ve egzersize yanıt olarak kas dokusunda yukarı regüle edilmemektedir (96).

Kalsiyum / kalmodulin bağımlı protein kinaz tip IV (CaMKIV), mitokondriyal biyogenezin başka bir düzenleyicisi olarak PGC-1 α aktivasyonunu, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon kapasitesini ve mtDNA-KS'yi arttırmaktadır. Ek olarak NO, MB'nin olumlu düzenleyicileri arasında yer almaktadır. Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) sentezleyen hücrelerde *PPARGC1A*, *NRE-1* ve *TFAM* ekspresyonunda bir artış olduğu gösterilmiştir. NO'nun nükleusa gönderdiği bir sinyal aracılığı ile PGC-1 α gen ekspresyonunu ve MB'yi indüklediği gösterilmiştir. Kalsinörin, kalsiyum/kalmodulin bağımlı bir protein fosfatazdır ve PGC-1 α seviyelerini artıran diğer bir MB düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. cAMP yanıt elemanı-bağlayıcı protein (CREB)'in koaktivatörü olan Rapamisin hedefi kompleksi (TORC), PGC-1 α 'yı aktive eden MB'nin diğer olumlu düzenleyicileri arasında yer almaktadır (96).

MB'nin olumlu düzenleyicilerinin yanı sıra, reseptörle etkileşen protein 140 (RIP140) ve Sin transkripsiyon regülatör aile üyesi A (Sin3A) proteinleri MB'yi negatif olarak düzenlemektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada, RIP140 proteininin eksikliği sonucunda mitokondriyal gen ekspresyonu ve oksidatif kapasitenin arttığı gösterilmiştir. Sin3A, bir multiprotein korepresör kompleksinin temel bir bileşenidir ve Sin3A'nın eksikliğinin oksidatif metabolizmada yer alan genlerin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (96).

2.5. Koroner Arter Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyon

KVH risk faktörleri arasında yer alan obezite, insülin direnci, dislipidemi ve hipertansiyon, metabolik sendrom olarak adlandırılan metabolik bozukluklardır. Söz konusu bu risk faktörlerinin prevalansının yüksek olması, KAH'nın önlenmesi konusundaki gelişmeleri olumsuz anlamda etkilemektedir (134).

KAH risk faktörlerinin mitokondriyal disfonksiyon ile yakından ilişkili olduğunun ikna edici kanıtları bulunmaktadır. Mitokondriyal disfonksiyonun insülin metabolik sinyallemedeki bozulmalara katkısı sonucunda insülin direnci ve T2DM gelişmektedir (134). KAH'nın temel nedeni olan aterosklerozun oluşum ve ilerleme sürecinde oksidatif stres yaygın nedenlerden biri olarak bilinmektedir. Normal koşullarda ROT antioksidanlar tarafından nötralize edilmektedir. Ancak oksidan ve antioksidan dengesinde oksidanların fazla olması oksidatif stres koşulunu meydana getirmektedir (135). Artan oksidatif stres KAH patogenezinde yer alan risk faktörleri ile ilişkilidir. ROT, sağlıklı damar yapısı için önemli bir bileşik olan NO seviyelerini

azaltmaktadır. Bunun sonucunda ROT, vasküler NO biyoyararlanımının azalmasına ve endotel hücre hasarının oluşumuna neden olarak aterom plak oluşumunun ilk aşamasında rol almaktadır (136).

Ateroskleroz patogeneğinde olumsuz rolü olan ROT'un, mitokondriyal solunum kompleks proteinlerine ve mtDNA'ya hasar verdiği bilinmektedir. Oluşan bu hasar mitokondri biyoenerjetğinde ve mitokondriyal iç zarın akışkanlığındaki değişimlere yol açarak oluşan ROT miktarını arttırmaktadır (135). Artan ROT miktarı, aterojenik süreçte önemli bir risk faktörü olarak kabul edilen ox-LDL oluşumuna yol açmaktadır. Ayrıca ROT, LDL oksidasyonuna neden olurken, LDL oksidasyonu da ROT oluşumuna neden olmaktadır (7).

Kronik inflamatuvar bir durum olan aterosklerozda, ROT inflamatuvar süreci başlatan bir faktördür. Oksidatif stres koşulunda yüksek seviyelerde olan ROT, NF-κB yolu ile endotel hücrelerinde inflamasyonu indükleyerek aterom plak oluşumuna uygun ortamı sağlamaktadır. NF-κB, inflamasyondan sorumlu faktörlerin gen ifadesini regüle eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür. NF-κB mtDNA'ya bağlanarak mitokondriyal gen ekspresyonunu azaltmaktadır. Tüm hücre tiplerinde anlatımı olan bu transkripsiyon faktörü, proinflamatuvar, pro-adezyon ve prooksidan genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek KAH patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (137). Aterosklerozlu bireylerde NF-κB yolağı ile ilişkili olan CRP, interlökin 1 (IL-1), serum amiloid ve interlökin 6 (IL-6) gibi inflamatuvar biyobelirteçler NF-κB aktivitesi ile pozitif korelasyon göstermektedir (86, 134, 138, 139).

2.6. Mitokondriyal Biyoenerjetikteki Bozulmalar ve Katkıda Bulunan Mekanizmalar

Mitokondri biyoenerjetik görevinin yanında antioksidan savunmada önemli rol oynamaktadır. Mitokondri enerji ihtiyacının yüksek olduğu beyin, iskelet kası ve kalp kası dokularında bol miktarda bulunmaktadır. Mitokondriyal biyoenerjetikğin sürdürülebilmesi için mitokondrinin fonksiyonel olması gereklidir. Mitokondriyal dinamizm olarak da adlandırılan MB'de, füzyon ve fisyon süreçleri mitokondri fonksiyonu için temel belirleyicilerdir. MB'nin düzensizleşmesi mitokondriyal biyoenerjetikğin bozulmasının sebeplerinden biridir. Mitokondriyal fonksiyonun korunması için füzyon ve fisyon mekanizmaları dengede olmalıdır (140). Mitokondriyal fisyon proteinlerinin düzeylerindeki değişiklikler mitokondriyal metabolizmayı

etkilemektedir. Fisyon proteinleri olan Drp1 ve FIS1 seviyelerinin azalması sonucunda, mitokondriyal solunum zinciri aktivitesi değişmesi ile ATP sentez miktarı azalmaktadır. Benzer şekilde füzyon inhibisyonu da ATP sentezini olumsuz etkilemektedir. Füzyon proteinlerinden Mfn1/2 ile OPA1'in azalmış seviyelerinin oksidatif fosforilasyon kapasitesini düşürdüğü gözlenmiştir (141). Ayrıca MB'in düzenleyicilerinden AMPK ve SIRT1 düzeylerinin azalması solunum zincirinde eksikliklere neden olarak ile mtROT seviyelerinde yükselişe yol açmaktadır (92).

Mitokondriyal biyoenerjiğin zarar görmesi, ETZ fonksiyonunun azalarak ROT oluşumunun artması ile sonuçlanmaktadır (135). Fizyolojik koşullar altında, elektronların kompleks I ve III'ten sızması ile üretilen solunum zincirinin ilk ürünü olan süperoksit anyonu (O_2^-), süperoksit dismutaz 2 (SOD2) tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülmektedir. H_2O_2 , katalaz (CAT) enzimi ile oksijen ve suya kataliz edilmektedir. Mitokondrinin oksidan/antioksidan durumunu belirleyen SOD2 ve CAT enzimlerinde eksilme ya da yapısal bozulma, mitokondri içerisinde mtROT'un artışına neden olmaktadır. (142).

MtROT'un artan seviyeleri mtDNA'da oksidatif hasar ile sonuçlanmaktadır. mtDNA, DNA onarım yeteneğine sahip olmadığından ve mtROT üretim alanına yakınlığı nedeniyle ROT kaynaklı hasarlara karşı oldukça savunmasızdır. ROT mtDNA'da nokta mutasyonları, delesyonlar ve mtDNA-KS'nin azalmasına neden olmaktadır. MtDNA replikasyonunda, replikasyon ilişkili primer proteinlerden DNA Poly mtDNA sentezi ve hata okuma işlevlerini üstlenmektedir. ROT Poly'nın hata okuma aktivitesini azaltarak çoğalma hatalarına neden olmaktadır. Ek olarak, oksidatif stresin mtDNA replikasyon enzimlerine ve mtDNA'ya verdiği hasarlar sonucunda mitokondrinin enerji metabolizması bozulmaktadır (92).

2.6.1. Reaktif Oksijen Türleri- Serbest Radikaller ve Yaşlanma

Yaşlanma, organizmada birtakım değişikliklerin sonucu ilerleyen yaşla birlikte ortaya çıkan, dokularda hastalık ve ölüm riskini arttıran bir olgudur (143). Yaşlanmanın biyolojik sürecini açıklayan somatik mutasyon, genetik yaşlanma, serbest radikaller, hücre yaşlanması, bağışıklık, ve endokrin teorileri bulunmaktadır (144).

Yaşlanma sürecini moleküler olarak açıklayan teorilerden biri olan serbest radikaller teorisi 1954 yılında Dr. Gerschman tarafından ortaya konulmuştur. Serbest radikaller teorisine göre, oksijen türevi olan süperoksit ve diğer radikaller, hücrenin

DNA, enzim, protein ve lipid gibi makromoleküllerine hasar vererek hücrelerde ve ilişkili organlarda birikmiş hasara yol açmaktadır (144). Süperoksit radikalleri ya da diğer ismiyle serbest radikaller, genel olarak ROT olarak isimlendirilmektedir. ROT önceki bölümlerde anlatıldığı üzere hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda mitokondri tarafından üretilmektedir. Oksidatif stresin oluşmasında temel rolü olan ROT'un oluşturduğu moleküler hasarların ilerleyen yaşla birlikte arttığı bilinmektedir (145). Oksidatif stresle ilgili biyobelirteçlerin yaşlanma ile birlikte arttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Farklı yaş aralığındaki bireylerin dahil edildiği bir çalışmada, oksidatif stres ile ilişkili o-tirozin, 3-klorotirozin, 3-nitrotirozin, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin ve 8-hidroksiguanozin biyobelirteçlerinin yaş ile birlikte attığı tespit edilmiştir (146).

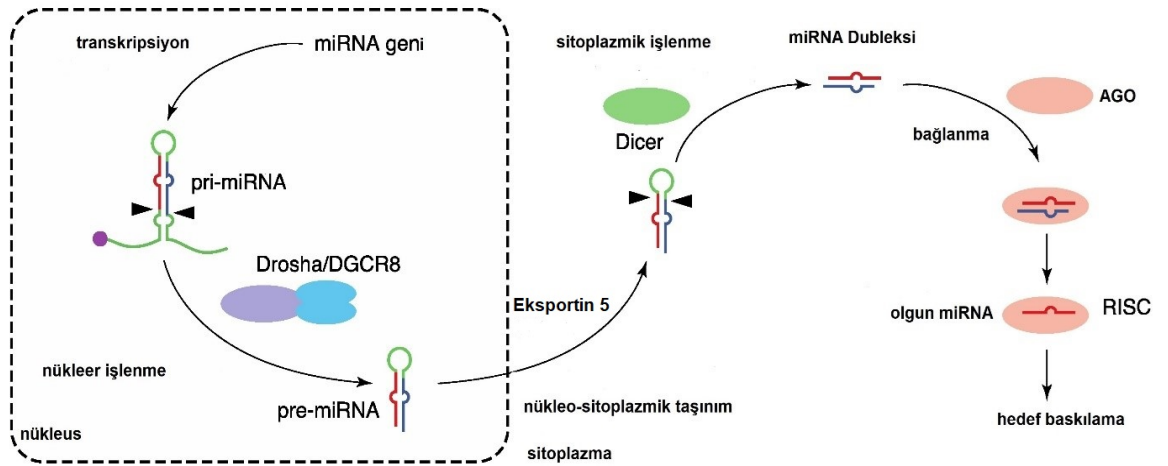
İleri yaştan aynı zamanda metabolik ve kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (147). İlerleyen yaş ile artan oksidatif stres, Alzheimer, kanser, diyabet, obezite ve KAH gibi multifaktöriyel hastalıkların altında yatan ve bu alanda araştırılan önemli bir risk faktörü olmaya devam etmektedir (148-150). KAH patogenezinde, aterom plak oluşumunun ilk aşamasında ROT, LDL'yi okside ederek aterosklerotik plağın oluşumunda kritik rolü olan köpük hücrelerinin oluşumuna neden olmaktadır (145).

2.7. Koroner Arter Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyonda Rol Oynayan Aday MikroRNA'lar

MikroRNA (miRNA)'lar transkripsiyon sonrası gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan, 20-30 nükleotid uzunluğunda, kodlama yapmayan tek sarmallı RNA molekülleridir. MiRNA'ların, hedef mRNA'ların 3' veya 5' translasyon olmayan bölgeleri (Untranslated Region; UTR), kodlama dizileri ve gen promotörleri ile etkileşime girdiği bilinmektedir. MiRNA'ların genel olarak hedef mRNA'ların translasyonunun bastırılmasında rol almasının yanında, belirli koşullar altında hedef gen ekspresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. MiRNA'ların biyolojik süreçlerde ve patolojik durumlarda düzenleyici roller oynadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. MiRNA ifadesindeki değişimler, birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir (151).

DNA dizilerinden transkribe edilen primer miRNA'lar (pri-miRNA), öncü miRNA'lar (pre-miRNA) ve olgun miRNA'lara (matur miRNA) işlenmektedir. MiRNA transkripsiyonu RNA polimeraz II/III enzimleri tarafından yapılmaktadır. MiRNA

genlerinden transkribe edilen saç tokası yapısındaki pri-miRNA'lar, RNA bağlayıcı protein DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8 (DGCR8) ve ribonükleaz (RNaz) enzimi Drosha'nın oluşturduğu mikroişlemci kompleksi tarafından pre-miRNA'lara işlenmektedir. Eksportin 5 kompleksi tarafından nükleustan sitoplazmaya aktarılan pre-miRNA'ların saç tokası ilmik yapısını Rnaz III endonükleaz olan Dicer tarafından kesilmektedir. Bu işlem ile pre-miRNA, biri *guide* (rehber), diğeri *passenger* (yolcu) olarak isimlendirilen zincirlerden oluşan olgun bir miRNA dubleksine dönüşmektedir (151, 152). Saç tokası yapısının 5'ucundan uzayan 5p zinciri, 3' ucundan uzayan 3p zinciri yapıları, olgun miRNA'ların isimlendirilmesini belirlemektedir. Pre-miRNA'ların Dicer kesimi ile oluşan olgun miRNA dubleksinden türetilen 5p ve 3p zincirinden birisi Argonaute (AGO) proteinine bağlanabilmektedir. Olgun miRNA'ların AGO'ya bağlanan 5p ve 3p zinciri, hücreye ve hücresel ortama bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak daha düşük stabiliteye sahip 5p zinciri AGO'ya bağlanmaktadır ve bu zincir rehber zincir olarak isimlendirilmektedir. Rehber zincir ile birleşen AGO proteini RNA indüklenmiş susturma kompleksi'ni (RISC) oluşturmakta ve RISC kompleksi hedef mRNA'nın stabilizasyonunun bozulmasına ya da translasyonel baskılanmasına neden olmaktadır (Şekil 2-12) (153).



Şekil 2-12. MiRNA sentezinin şematik gösterimi.

Nükleusta miRNA geninden kodlanan saç tokası yapısındaki pri-miRNA'lar DGCR8 ve Drosha kompleksi tarafından pre-miRNA'lara işlenmektedir. Nükleusta oluşan pre-miRNA Eksportin 5 aracılığı ile sitoplazmaya taşınmaktadır. Sitoplazmaya taşınan pre-miRNA'nın ilmik yapısı Dicer RNaz enzimi tarafından kesilerek olgun miRNA kompleksine dönüşmektedir. Olgun miRNA kompleksinin rehber zinciri RISC kompleksini oluşturan AGO proteinine bağlanmaktadır. Rehber zincir ve AGO ile oluşan RISC kompleksi, hedef mRNA'yı translasyonel olarak baskılamaktadır (154).

Bu çalışmada, EYD ve VYD’de ifade edilen, KAH patogenezi ile ilişkili olduğu bilinen ve aynı zamanda mitokondriyal disfonksiyonu ve mitokondri biyogenezini düzenleyen nükleer genleri hedefleyen miRNA’lar aday olarak belirlenmiştir. Bu tez kapsamında, belirtilen özelliklere sahip miR-155-5p, miR-30a-5p, miR-326 ve miR-1247-5p’nin EYD ve VYD dokularında karşılaştırılmalı olarak incelenmesi hedeflenmiştir.

2.7.1. miR-155-5p

MiR-155-5p, 21q21.3 kromozom bölgesinde lokalize olan *MIR155HG* geni tarafından kodlanan, kodlama yapmayan bir RNA’dır. MiR-155-5p, immünomodülatör proteinleri, tümör baskılayıcı proteinleri ve inflamatuvar proteinleri kodlayan genleri düzenlemektedir. MiR-155-5p’nin KVH, inflamasyon ve kanserin de dahil olduğu multifaktöriyel durumlar ile ilişkisinin gösterildiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır (155).

Mitokondriyal biyogenezin ana protein düzenleyicileri olan AMPK ve SIRT1, miR-155’in hedefleri arasında bulunmaktadır. MiR-155-5p ve *SIRT1* ekspresyon seviyelerinin incelendiği bir çalışmada, miR-155-5p seviyelerinin artması ile *SIRT1* seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir (156). Oksidatif stres koşulunda artan ROT, inflamatuvar NF-kB kompleksini aktive etmektedir. Yapılan çalışmalarda, miR-155-5p’nin NF-kB aktivasyonu ve proinflamatuvar proteinlerin ekspresyon düzeyi ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (157).

2.7.2. miR-30a-5p

MiR-30a-5p, kromozom 6q13 bölgesinde lokalize olan bir intronik transkripsiyonel birim tarafından kodlanan, bir miRNA’dır (158). MiR-30a’nın birçok tümörde proliferasyon ve metastazı inhibe etmesi ve kanser ile ilişkili biyolojik süreçlerdeki rolü bilinmektedir (159).

MiR-30a-5p’nin KAH patogenezindeki rolünü araştıran bir çalışmada, akut Mİ (AMİ) geçiren ve buna bağlı kalp yetmezliği (KY) olan bireylerin serum örneklerinde miR-30a-5p seviyelerinin önemli ölçüde yükseldiği belirlenmiştir (160). Başka bir çalışmada ise, ateroskleroz patogenezinde yüksek seviyede eksprese olan miR-30a-5p’nin makrofajlarda lipid birikimini ve köpük hücre oluşumunu azalttığı gösterilmiştir

(161). Ayrıca miR-30a-5p anlatımının KAH hastalarına ait EYD örneklerinde azaldığı tespit edilmiştir (19).

2.7.3. miR-326

MiR-326, 11p14 kromozom bölgesinde lokalize olan *MIR326* geni tarafından kodlanır ve kanser, multipl skleroz ve glioblastoma gibi hastalıklar ile ilişkili bir miRNA'dır (162). MiR-326 ateroskleroz risk faktörlerinden biri olan obezite ilişkisi incelendiğinde, miR-326'nın adipoz dokuda artan inflamasyon ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (163). Adipoz dokuda yapılan başka bir çalışmada ise, KAH hastalarının EYD örneklerinde miR-326 seviyelerinin sağlıklı bireylere göre düşük olduğu gösterilmiştir (19). Aterosklerozlu hastaların vasküler düz kas hücrelerinde miR-326 seviyelerinin aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (164).

2.7.4. miR-1247-5p

MiR-1247 ailesinin bir üyesi olan miR-1247-5p, tümör ilerlemesinde kritik rol oynadığı belirlenmiş bir kodlamayan RNA'dır. MiR-1247-5p ve kanser ilişkisi incelenmiş ve insan kanser türlerinde değişen seviyede ekspresyon profili gösterdiği belirlenmiştir. Meme kanserinde miR-1247 seviyelerinin normal dokulara göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir (165). Prostat kanserinde ise malign doku örneklerinde benign karakterli prostat dokusuna oranla daha yüksek seviyede miR-1247 anlatımı olduğu belirlenmiştir (166). Hepatosellüler kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, miR-1247-5p'nin hastaların örneklerinde aşağı regüle edildiği rapor edilmiştir (167). Plazma miR-1247-5p ekspresyon seviyelerinin akciğer kanserli hastalarda yükselmesi ile bu miRNA'nın küçük hücreli olmayan akciğer kanseri için biyobelirteç olabileceği ifade edilmiştir (168).

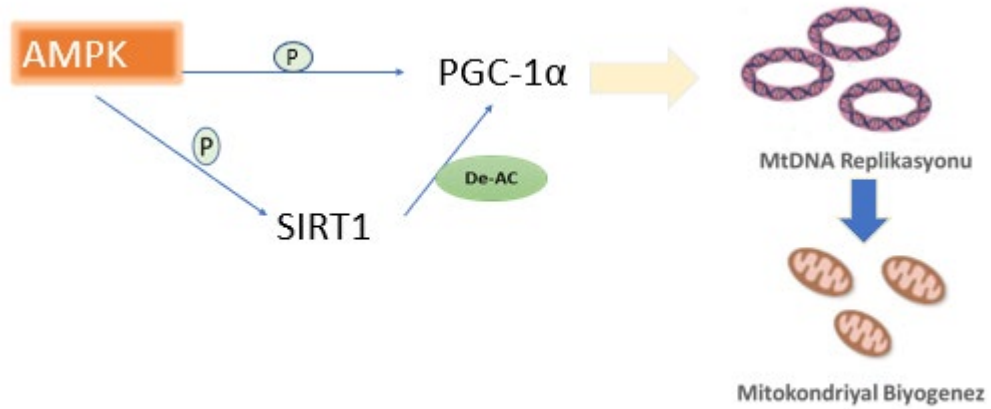
KVH'larda ise miR-1247-5p ekspresyon seviyesi dolaşımda incelenmiştir. KY olan bireylerde miR-1247-5p ekspresyonunun dolaşımda daha düşük seviyelerde olduğu saptanmıştır (169). Vacca ve ark. KAH ve diğer kalp hastalıkları için EYD örneklerinde gerçekleştirdiği miRNA mikrodizin analizinde, miR-1247-5p'nin KAH grubunda kontrol grubuna göre daha düşük seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir (19).

2.8. Koroner Arter Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyonda Rol Oynayan Aday Genler

Bu tez çalışmasında KAH patolojisinde ve bozulmuş mitokondriyal fonksiyonda ortak rolü olduğu düşünülen genler seçilmiştir. KAH ve mitokondriyal disfonksiyonda rolü olduğu düşünülen *PRKAA2*, *PPARGC1A*, *SIRT1*, *RELA* ve *TNFA* genlerinin anlatım düzeylerindeki değişiklikler EYD örneklerinde incelenmiştir.

2.8.1. AMPK Alt Birim Alfa 2 (*PRKAA2*) Geni

1p32.2 kromozomal bölgede lokalize olan *PRKAA2* geni AMPK α 2 katalitik alt birimini kodlamaktadır (170). 70 kb uzunluğunda olan *PRKAA2* geni, 10 ekzondan oluşup kalp ve böbrek dokusunda yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir (170). AMPK α alt biriminin α 1 ve α 2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır (171).



Şekil 2-13. *PRKAA2* geninden kodlanan AMPK'nın etkileşimi.

AMPK, mtDNA replikasyonunda düzenleyici rolü olan PGC-1 α 'yı ve PGC-1 α 'nın transkripsiyonel aktivatörü olan SIRT1'i fosforilleyerek aktive etmektedir. AMPK ile aktive olan PGC-1 α , mtDNA replikasyonunu başlatması ile mitokondri sayısının çoğalması yönünde MB'nin bir düzenleyici transkripsiyonel koaktivatörü olmaktadır.

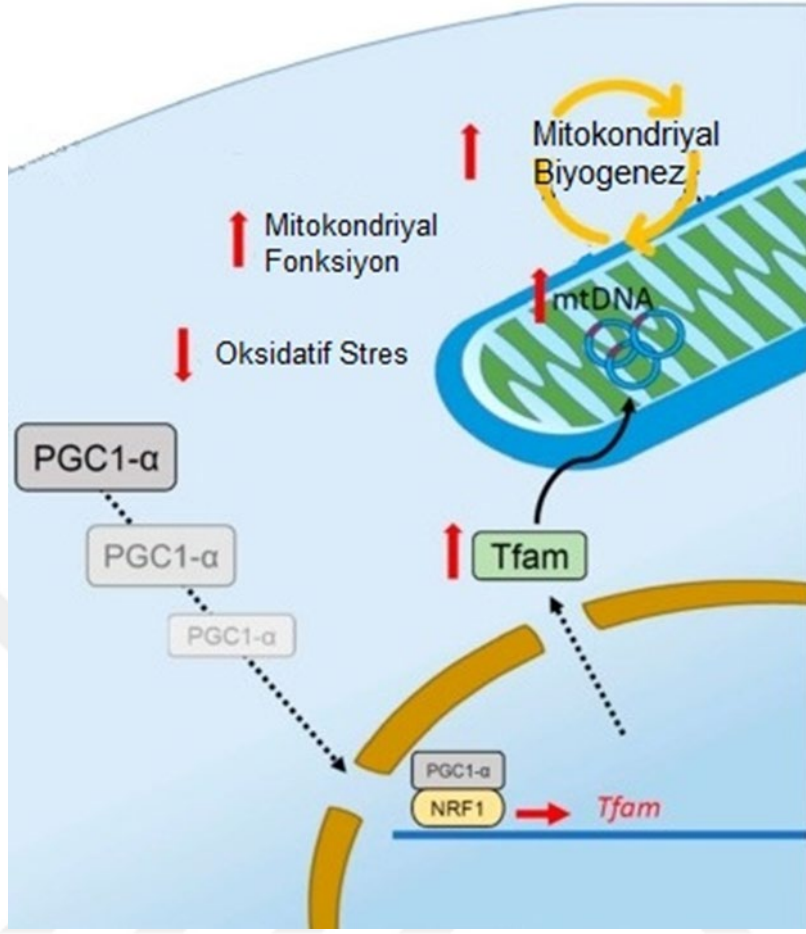
AMPK, α katalitik alt biriminin Thr172 aktivasyon bölgesinden memeli kinazları tarafından fosforile edilerek aktive olmaktadır (172). AMPK hücresel enerji metabolizmasının düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadır. Hücre içi ATP seviyelerinin azalmasına yanıt olarak enerji tüketen anabolik yolları inhibe ederken, enerji üreten katabolik yolları aktive etmektedir. AMPK, çeşitli metabolik enzimleri ve transkripsiyon faktörlerini fosforillemektedir. AMPK lipid metabolizması, glikoliz ve

enerji metabolizmasının transkripsiyonel düzenleyicilerini fosforilasyon ile aktive ederek bu metabolik faaliyetlerde önemli rol almaktadır. AMPK, MB ana düzenleyicisi olan PGC-1 α 'yı kodlayan *PPARGC1A* genini transkripsiyonel olarak düzenlemektedir (Şekil 2-13). Ayrıca, kalori kısıtlamasına yanıt olarak, otofajiyi negatif düzenleyen mTORC1 kompleksi alt bileşenlerinden RAPTOR ve tuberini (TSC2) fosforilasyon yolu ile aktive ederek mTORC1'i inaktive etmektedir. MTORC1 inaktivasyonuna ek olarak, otofaji proteinlerinden ATG1/ULK1'i aktive ederek AMPK otofajinin başlatılmasında etkin rol almaktadır (173).

AMPK yaşlanma süreci ve yaşlanma ile ilişkili hastalıklarda rolü olan bir protein kinazdır. AMPK'nin azalmış seviyeleri KAH'ın en önemli risk faktörlerinden olan metabolik sendrom ile ilişkili bulunmuştur (172). AMPK aktivatörleri olan LKB1 ve CaMKK genlerinin azalmış ekspresyonlarının AMPK seviyelerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (174, 175). AMPK anlatım seviyelerinin transkripsiyon regülatörlerinin yanı sıra leptin, TNF- α gibi endokrin sistem düzenleyicileri ve miRNA'lar aracılığı ile düzenlendiği bilinmektedir. TNF- α proteini, AMPK'yı dolaylı yoldan inhibe etmektedir ve yapılan bir çalışmada *TNFA* gen ekspresyonu azaldığında AMPK aktivasyonunun arttığı tespit edilmiştir (172). Bu tez çalışmasında seçilen miR-155-5p, AMPK aktivatörü LKB1'in ifadesini dolaylı yoldan azaltarak AMPK ekspresyon seviyelerini düşürmektedir (176).

2.8.2. PGC-1 α (*PPARGC1A*)

PPARGC1A geni 4p15.2 kromozomal bölgede bulunmaktadır. 112 kb büyüklüğünde olan *PPARGC1A* geni 26 ekzon içermektedir. *PPARGC1A* 18 alternatif kırılma ürününü kodlamaktadır. *PPARGC1A* geni içerisinde 5 alternatif promötör ve 9 alternatif poliadenilasyon bölgesi bulunmaktadır. *PPARGC1A*, enerji metabolizmasında yer alan genleri düzenleyen transkripsiyonel koaktivatör olan PGC-1 α 'yı kodlamaktadır (Şekil 2-14). Bu genin kodladığı protein MB'nin düzenlenmesinde direkt rol almaktadır. *PPARGC1A* kalp, karaciğer ve böbrek dokularında yüksek ekspresyon seviyeleri göstermektedir (177).



Şekil 2-14. *PPARGC1A* geninden kodlanan PGC-1 α 'nın etkileşimi.

MB ana düzenleyicisi olan PGC-1 α , NRF1/2 ile etkileşime girerek, mtDNA replikasyonu ve transkripsiyonunu başlatan mitokondriyal transkripsiyon faktörü TFAM'ın ekspresyonunu düzenlemektedir (178).

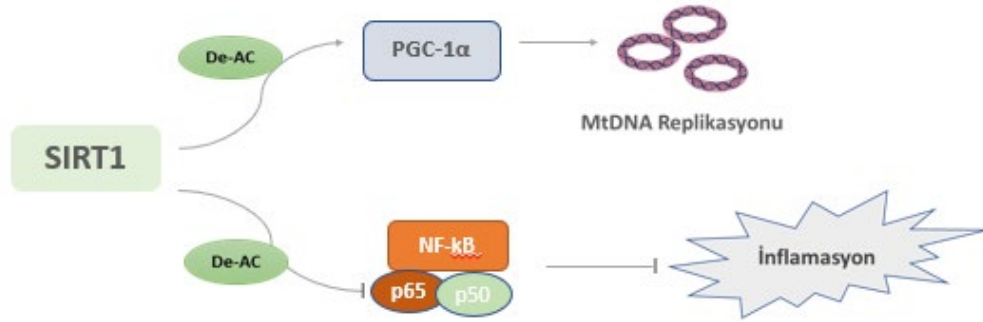
PPARGC1A geninden kodlanan PGC-1 α , MB'nin önemli düzenleyicisidir. PGC-1 α Nrf1/2 ile etkileşime girerek mtDNA replikasyonunda TFAM'ı modüle etmektedir ve böylece kardiyak sağlık için önemli kabul edilen mtDNA-KS artışını sağlamaktadır. Posttranskripsiyonel seviyede PGC-1 α aktivitesi, AMPK tarafından fosforillenme ve SIRT1 tarafından gerçekleştirilen deasetilasyon yolu ile düzenlenmektedir (100). EYD ve farklı tip dokularda azalmış *PPARGC1A* düzeylerinin KAH patogenezi ile ilişkisinin gösterildiği çalışmalar mevcuttur (179, 180).

2.8.3. *SIRT1* Geni

10q21.3 kromozomal bölgeden kodlanan *SIRT1* geni, sirtuin protein ailesi bir üyesi olan SIRT1 proteinini kodlamaktadır. *SIRT1* geni 34,11 kb büyüklüğündedir ve 11

ekzon içermektedir. *SIRT1* geni 7 farklı alternatif kırılma ürününü kodlamaktadır. Bu gende 5 olası alternatif promotör ve 6 poliadenilizasyon bölgesi mevcuttur (181).

SIRT1 geni, işlevsel olarak kromotin ve rRNA sessizleştirme histon deasetilasyonu, hücre çoğalması, hücre farklılaşması, DNA replikasyonu ve onarımı gibi hücresel süreçlerde etkin rol almaktadır. *SIRT1* geni Alzheimer, kanser, diyabet gibi metabolik hastalıklar ve oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir. *SIRT1* geninden kodlanan SIRT1 proteini, PGC-1 α ve NF- κ B alt birimi p65 ile etkileşim halindedir (Şekil 2-15) (181). SIRT1 proteini, PGC-1 α 'yı deasetilleyerek aktive eden bir MB düzenleyicisidir. SIRT1 proteini, inflamatuvar mediyatör olan NF- κ B'nin p65 altbiriminin deasetilasyonunu sağlayarak, NF- κ B'yi inaktive etmektedir. Ayrıca, SIRT1 NF- κ B'nin aracılık ettiği inflamatuvar yanıtın azalmasına neden olmaktadır (182). MB düzenleyicisi olan AMPK, SIRT1'i fosforile ederek aktive etmektedir (183). SIRT1 ateroskleroz patogenezinde, vazodilatasyonda ve inflamatuvar yanıtın önlenmesi gibi süreçlerde aracı bir proteindir (184). Metabolik ve hücre içi homeostazda önemli rolleri olan SIRT1'in ekspresyonunun azalması diyabet, obezite, hiperkolesterolemi gibi metabolik hastalıklar ve KAH ile ilişkili bulunmuştur (185-189).



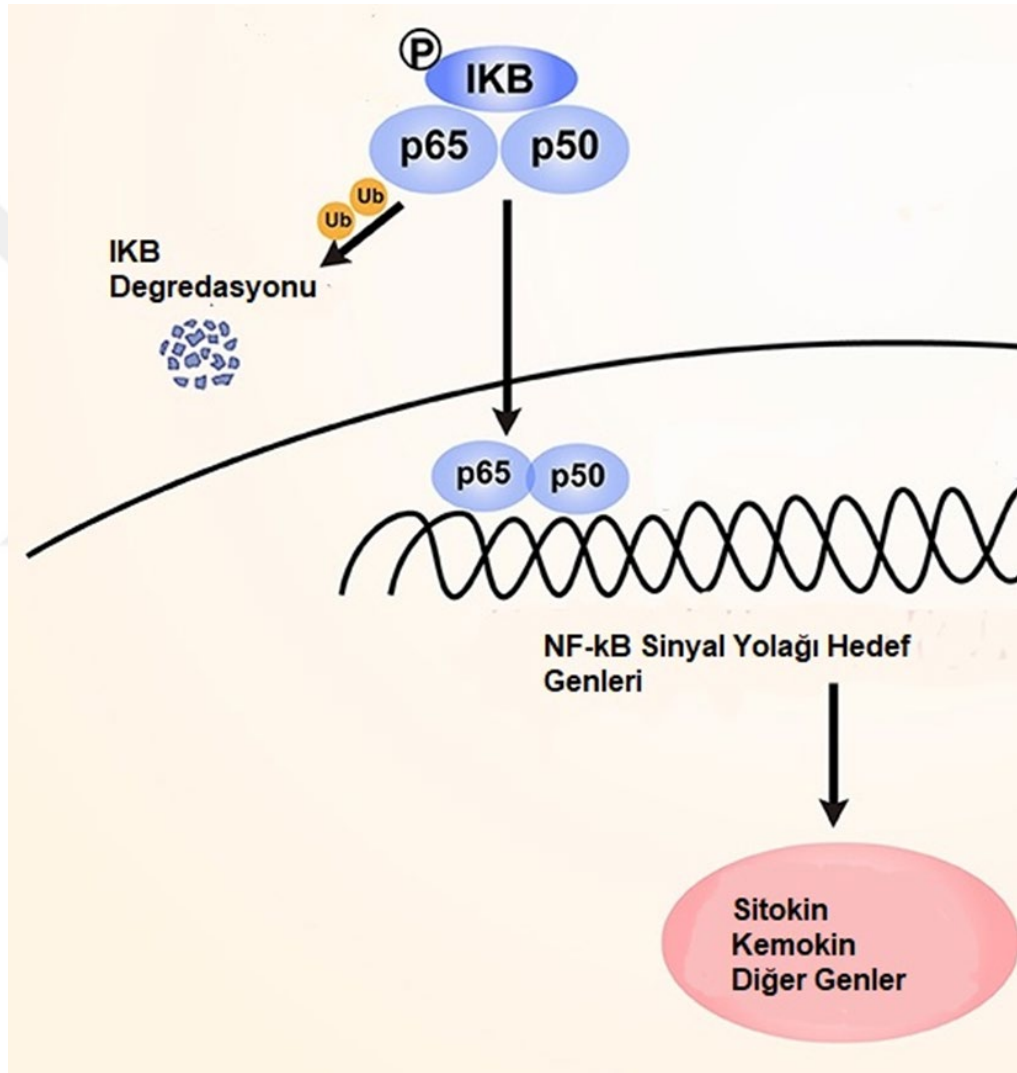
Şekil 2-15. *SIRT1* geninden kodlanan SIRT1 proteininin etkileşimi.

SIRT1, MB ana düzenleyicisi PGC-1 α 'yı deasetilasyon ile aktive etmektedir. Normal koşulda SIRT1'in, proinflamatuvar transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin p65/p50 dimerinden p65'i deasetile ederek, inflamasyonu engelleyici rolü bulunmaktadır.

2.8.4. NF- κ B Alt Birimi p65 (RELA) Geni

NF- κ B, çeşitli biyolojik süreçlerde yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre içinde spesifik inhibitörler tarafından sitoplazmada inaktif olarak tutulmaktadır. NF-

kB'yi inhibe eden inhibitörün bozunması sonucunda NF-kB sitoplazmadan nükleusa transloke olarak, spesifik genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. NF-kB proteinlerinin iki sınıfa ayrılan beş monomeri bulunmaktadır. NF-kB1 ve NF-kB2 sınıf I monomerleri iken, RelA, RelB ve c-Rel sınıf II monomerleridir (85). *RELA* geni NF-kB'nin monomeri olan RelA proteinini kodlamaktadır (Şekil 2-16). Sitoplazma içerisinde NF-kB heterodimerik yapıdadır. NF-kB'nin hücrede en bol bulunan formu, RELA (p65) ve NFKB1 (p50) heterodimer kompleksidir (190).



Şekil 2-16. *RELA* geninden kodlanan p65/RelA proteininin NF-kB sinyal yolağındaki rolü.

Normal koşullar altında, NF-kB dimerlerinden en çok bulunan formu p65/p50 IKB proteinine bağlı inaktif bir biçimde sitoplazmada bulunmaktadır. IKB'nin fosforilasyonu ile IKB degradasyonunun sonucunda NF-kB dimerleri serbest bir biçimde, nükleusa transloke olmaktadır. Nükleusta p65, sitokin ve kemokin gibi proinflamatuvar faktörlerin genlerini hedef olarak aktive etmektedir ve inflamasyonu başlatmaktadır (191).

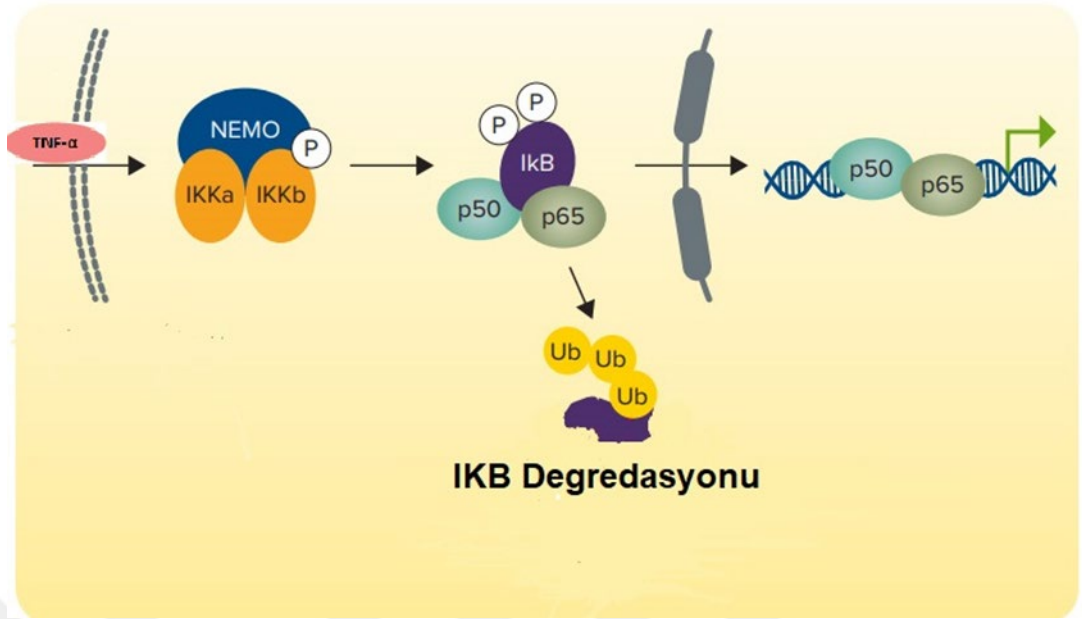
Sitogenetik olarak 11q13 kromozomal bölgede konumlu olan *RELA* geni 9,59 kb uzunluğunda olup, 12 ekzon bölgesi içermektedir. *RELA* geninden 22 farklı ürün transkribe edilmektedir. *RELA* geninde 2 olası alternatif promotör ve 5 valide edilmiş alternatif poliadenilizasyon bölgesi bulunmaktadır (192) .

RELA geni inflamatuvar sitokin ve kemokin ekspresyonunda ve oksidatif stres aracılı hücre ölümü gibi birçok sinyal yolunda rol almaktadır (192). Aterosklerotik plaklarda proinflamatuvar sitokin üretiminin NF- κ B'ye bağlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, NF- κ B'nin mitokondriyal genoma etki ederek mitokondriyal gen ekspresyonunu da azalttığı belirlenmiştir. Mitokondriyal gen ekspresyonunun azalması ile ilişkili olan mitokondriyal disfonksiyon ve mitokondriyal disfonksiyon sonucu artan ROT ile aktive olan NF- κ B aracılı inflamasyon, aterosklerozun da içinde bulunduğu çeşitli patolojik durumlarda gösterilmiştir (85, 193-195).

2.8.5. *TNFA* (TNF- α) Geni

TNFA geni TNF protein ailesine ait çok işlevli bir proinflamatuvar sitokin olan TNF- α proteinini kodlamaktadır. *TNFA* geni 6p21.3 kromozomal bölgede lokalizedir. 2,77 kb uzunluğunda olan bu genden 3 farklı mRNA alternatif kırılma ürünü transkribe edilmektedir (196).

TNF- α , esas olarak makrofajlardan salgılanmaktadır. TNF- α , hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, inflamasyon, lipid metabolizması ve pıhtılaşmanın dahil olduğu pek çok biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu sitokin, otoimmün hastalıklar, metabolik hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserin de dahil olduğu çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (196). TNF- α , proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasında etkin rol oynayan NF- κ B aktivasyonunu sağlamaktadır (Şekil 2-17) (197). KAH hastalarında TNF- α sitokin düzeyleri, diğer inflamatuvar medyatörlere paralel olarak yüksek seviyelerde bulunmaktadır (197, 198).



Şekil 2-17. *TNFA* geninden kodlanan TNF- α proteininin NF- κ B sinyal yolağı aktivasyonu.

TNF- α NF- κ B yolağında IKB kinaz kompleksi (IKK)'nin aktivasyonuna yol açmaktadır. IKK kompleksi aktivasyonu, NF- κ B heterodimerini inhibe eden IKB'nin fosforilasyonu ve degradasyonu ile sonuçlanmaktadır. IKB degradasyonu ile NF- κ B p65/50 dimeri serbest kalarak sitozolden çekirdeğe hareket etmektedir ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmaktadır (199).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışma Grubu Seçimi ve Dokuların Toplanması

Bu çalışmada, kullanılan mRNA ve miRNA materyali önceden çalışılmış olan “Yağ Dokusunda MiRNA'ların Araştırılması ve Ateroskleroz ile İlişkilendirilmesi” başlıklı proje kapsamında toplanmış olan EYD ve VYD doku örneklerinden elde edilmiştir. Bu çalışma için tasarlanmış çalışma grubu cinsiyet ve yaş dağılımları dikkate alınarak KAH ve kontrol olarak belirlenmiş bireylerden oluşmuştur. Araştırmaya, koroner anjiyografi sonucunda koroner arterlerindeki aterosklerotik plakta %50 ve üzeri darlık tespit edilen bireyler hasta grubuna dahil edilirken, koroner anjiyografi sonucunda damarlarında lezyon gözlenmeyen aortik veya mitral kapak bozukluğu nedeni ile ameliyat olan bireyler ise kontrol grubuna dahil edilmiştir. Ateroskleroz gelişimi görülen romatoid artrit, sistemik lupus eritematosus ve antifosfolipit sendromunu içine alan çeşitli sistemik otoimmün veya kronik inflamatuvar hastalığın bir arada bulunduğu hastalar ve daha önce vasküler olayları olan hastalar çalışmadan dışlanmıştır. Belirtilen proje kapsamında EYD ve VYD örnekleri, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi ve Kardiyoloji Enstitüsü, Kalp ve Damar Cerrahi Anabilim Dallarında ameliyat olan bireylerden elde edilmiştir.

EYD ve VYD örnekleri hastaya uygulanacak cerrahi işlemin başında, ameliyatın ilk 20 dakikası içerisinde cerrahi uzman tarafından alınmıştır. VYD örnekleri göğüs kesisinin yapıldığı bölgeden, EYD örnekleri ise sağ koroner arterin proksimal şeridinin yakınından alınmıştır. 50-100 mg ağırlığı arasında alınan yağ doku örnekleri, işlemin hemen sonrasında sıvı azot içine konulmuştur. Doku örnekleri RNA izolasyonuna kadar -80° C koşulunda muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kitler

Çalışmada, cDNA sentezi ve mRNA-miRNA ekspresyon analizlerinde kullanılan kitler Tablo 3-1’de gösterilmiştir.

Tablo 3-1. Kitler

Kit Adı	Markası	Kit İçeriği
Qiazol Reaktifi	QIAGEN	Qiazol Lizis Reaktifi
RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti	Thermo Fisher	Random Hekzamer
		Nükleaz İçermeyen Su
		5x Reaksiyon Tamponu
		RNaz İnhibitörü
		10 mM dNTP
		Revertaid M_MuLV RT
Taqman Advanced miRNA cDNA Sentez Kiti	Thermo Fisher	10x Poli (A) Tamponu
		ATP
		Poli (A) Enzimi
		Nükleaz İçermeyen Su
		5x DNA Ligaz Tamponu
		%50 PEG 8000
		25x Ligasyon Adaptör
		RNA Ligaz
		5x RT Tamponu
		dNTP Karışımı
		20x Üniöersal RT Karışımı
		10x RT Enzim Karışımı
		20x miR-Amp Karışımı
Taqman Fast Advanced miRNA Assay	Thermo Fisher	Taqman Fast Advanced Assay
SYBR Green I Karışımı	Roche	SYBR Green I

3.1.3. Cihazlar

Bu tez çalışmasında uygulanan yöntemlerde kullanılan cihazlar Tablo 3-2’de gösterilmiştir.

Tablo 3-2. Cihazlar

Cihaz	Markası
Çelik Bıçaklı Döner Homojenizatör	IKA
Santrifüj	Thermo Scientific
Masaüstü Santrifüj	Denville Scientific
Spektrofotometre	Thermo Scientific NanoDrop 2000
PZR Cihazı	Techne TC-512 Thermal Cycler, Techne
PZR Cihazı	T-100, Thermal Cycler, Bio-RAD
Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR	LightCycler 480, Roche
Buzdolabı	-20°C Vestel, -80°C Thermo, +4°C Beko

3.2. Yöntemler

3.2.1. Doku Örneklerinin Homojenizasyonu ve RNA İzolasyonu

Bu çalışmada, “Yağ Dokusunda MiRNA’ların Araştırılması ve Ateroskleroz ile İlişkilendirilmesi” başlıklı proje kapsamında toplanmış olan EYD ve VYD doku örneklerinden elde edilmiş RNA örnekleri kullanılmıştır. Bahsi geçen proje kapsamında Qiazol reaktifi kullanılarak çelik bıçaklı döner homojenizatör aracılığıyla dokuların homojenizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından elde edilen bu homojenatlardan total RNA materyali izole edilmiştir ve RNA örnekleri komplementer DNA (cDNA) sentezi işlemi yapılana kadar -80°C koşulunda muhafaza edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen bu RNA örnekleri kullanılarak çalışmada planlanan deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. RNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü

Doku homojenatından izole edilmiş olan RNA örneklerinin konsantrasyon ve kalitesinin tayini için Nanodrop2000 (ND-2000, Thermo Fisher, ABD) cihazı kullanılmıştır. Ölçüm için, 1 µl RNA kullanılarak 230, 260 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik inceleme yapılmıştır. 260 nm dalga boyunda RNA örneklerinin konsantrasyonu, 260nm/280nm ve 260nm/230nm dalga boyu oranları değerlendirilerek ise RNA örneklerinin saflığı belirlenmiştir. RNA örneklerinin dalga boyu oranının, 260nm/280nm kabul aralığı olan 1.7-2.0, ve 260nm/230nm kabul aralığı olan 2.0-2.2 aralığında olması gerektiği göz önünde bulundurulmuştur.

3.2.3. Total RNA'dan cDNA Sentezi

Konsantrasyon ve saflık ölçümleri yapılmış olan total RNA örneklerinden seçilen gen ve miRNA'ların ekspresyon analizlerini yapmak için cDNA sentezi protokolleri uygulanmıştır. cDNA sentezleri, mRNA ve miRNA cDNA sentezi için tasarlanmış ticari olarak temin edilen cDNA sentez kitleri ile yapılmıştır. Bu kitler kullanılarak üreticinin sunduğu protokol yönlendirmesi ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Total RNA'dan mRNA cDNA Sentezi

Dokudan izolasyonu yapılmış RNA örneklerinden, RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (Thermo Fisher, ABD) kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Reaktifler prosedür boyunca buz üstünde tutulmuştur. cDNA protokolü öncesi, RNaz kontaminasyonunu önlemek amaçlı, prosedürde kullanılmış olan ekipmanlar (pipetler, mikrosantrifüj cihazı, vorteks cihazı vb.) ve deney ortamı RNaz inhibitörü ile muamele edilmiştir.

Sabit RNA konsantrasyonları ile cDNA sentezinin gerçekleştirilmesi amacıyla, önceden spektrofotometrik ölçüm ile konsantrasyonu belirlenmiş total RNA örneklerinin konsantrasyonları dilüsyon yapılarak 100 ng/μl olarak ayarlanmıştır. Reaksiyon bileşenleri buz üzerinde çözüldükten sonra kısaca santrifüjlenmiştir. Ardından kit prosedürünün ilk kısmı, kit talimatlarına göre Tablo 3-3'te belirtilen reaksiyon bileşenleri ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-3. mRNA cDNA sentezinin I. aşama reaksiyon karışımı.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Total RNA Örneği	2 μl
Random Hekzamer	1 μl
Nükleaz içermeyen su	9 μl
Toplam Reaksiyon Miktarı	12 μl

Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra karıştırılıp, kısaca santrifüj edilmiştir. Reaksiyon karışımı PZR cihazında 65°C sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası reaksiyonun birinci aşama ürünleri 3 dk buz üzerinde bekletilmiştir. cDNA sentezinin II. aşamasında Tablo 3-4'te tarif edilen şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı, I. aşama reaksiyon ürünlerinin üzerine eklenmiştir.

Tablo 3-4. mRNA cDNA sentezi II. aşama reaksiyon karışımı.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
5 x Reaksiyon Tamponu	4 µl
RiboLock RNaz İnhibitörü	1 µl
10 mM dNTP	2 µl
Revertaid M-MvLV Ters Transkriptaz (RT)	1 µl
I. Aşama Reaksiyon Ürünü	12 µl
Toplam Reaksiyon Miktarı	20 µl

Reaksiyon karışımı hafifçe karıştırıldıktan sonra kısaca santrifüj edilmiştir. Karışım, PZR cihazında 20°C’de 5 dk, 42°C’de 60 dk ve 70°C’de 5 dk inkübe edilmiştir. Total RNA’dan elden edilmiş cDNA örnekleri gerçek zamanlı kantitatif PZR aşamasına kadar -20°C koşulunda muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. Total RNA’dan miRNA cDNA Sentezi

EYD ve VYD dokularından elde edilen RNA örneklerinden Taqman Advanced miRNA cDNA sentez kiti (Thermo Fisher, ABD) kullanılarak miRNA cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Kit bileşenleri prosedür boyunca buz üzerinde muhafaza edilmiştir. cDNA protokolü öncesi, RNaz kontaminasyonunu önlemek amaçlı, prosedürde kullanılmış olan ekipmanlar (pipetler, mikrosantrifüj cihazı, vorteks cihazı vb.) ve deney ortamı RNaz inhibitörü ile muamele edilmiştir. Üreticinin talimatına göre uygulanmış total miRNA cDNA sentezi aşamaları ve kullanılan reaktifler Tablo 3-5’de listelenmiştir.

MiRNA ekspresyon analizinde, reaksiyon verimliliğini kontrol etmek amaçlı kullanılan ekzojen kontrol için, ticari olarak satın alınan 5’ ucu fosforile sentetik cel-miR-39-3p (Thermo Fisher, ABD) kullanılmıştır. Reaktif stok (100 mM), nükleaz içermeyen suda çözülerek hazırlanmıştır. Dilüsyon işlemi ile elde edilen dilue kontrol (50 pM), miRNA cDNA sentezi birinci aşamasında reaksiyon bileşenleri içerisine 0,4 µl miktarında eklenmiştir.

Konsantrasyonu belirlenen total RNA örneklerinin, miRNA cDNA sentezinde sabit konsantrasyonu sağlamak amacıyla 10 ng/µl dilüsyonları yapılmıştır. Reaksiyon bileşenleri buz üzerinde çözöldükten sonra kısaca santrifüjlenmiştir. Kit prosedürüne

uygun şekilde cDNA sentezi dört aşamada gerçekleştirilmiştir; poli A kuyruk eklenmesi, adaptör ligasyonu, revers transkripsiyon ve miRNA amplifikasyonu. Bu aşamaların reaktifleri ve reaksiyon koşulları Tablo 3-5’de gösterilmiştir.

Tablo 3-5. Total RNA’dan miRNA cDNA sentezi aşamaları ve reaktifleri.

Aşama	Reaksiyon Bileşenleri	Miktar	Reaksiyon Koşulu
Aşama I Poli A Kuyruk	cel-miR-39 (Spike-In) Normalizasyon Kiti	0,4 µl	Poliadenilasyon 37 °C /45 dk Sonlandırma 65 °C /10 dk Soğutma 4 °C / Süresiz
	10x Poli (A) Tamponu	0,5 µl /2	
	ATP	0,5 µl /2	
	Poli(A) Enzimi	0,3 µl /2	
	Nükleaz İçermeyen Su	0,9 µl /2	
	Total RNA örneği	1 µl	
	Toplam Reaksiyon Miktarı	2,5 µl	
Aşama II Adaptör Ligasyonu Reaksiyonu	5x DNA Ligaz Tamponu	3 µl /2	Ligasyon 16 °C /60 dk Soğutma 4 °C / Süresiz
	%50 PEG 8000	4,5 µl /2	
	25x Ligasyon Adaptör	0,6 µl /2	
	RNA Ligaz	1,5 µl /2	
	Nükleaz İçermeyen Su	0,4 µl /2	
	Poli A Kuyruk Reaksiyon Ürünü	2,5 µl	
	Toplam Reaksiyon Miktarı	7,5 µl	
Aşama III Ters Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu	5x RT Tamponu	6 µl /2	Ters Transkripsiyon 42 °C / 15 dk Sonlandırma 85 °C / 5 dk Soğutma 4 °C /Süresiz
	dNTP Karışımı (25 nM)	1,2 µl /2	
	20x Ünlversal RT Primer	1,5 µl /2	
	10x RT Enzim Karışımı	3 µl /2	
	Nükleaz İçermeyen Su	3,3 µl /2	
	Adaptör Ligasyon Reaksiyon Ürünü	7,5 µl	
	Toplam Reaksiyon Ürünü	15 µl	
Aşama IV miR-Amp Reaksiyonu	2x miR-Amp Karışımı	11 µl /2	Enzim Aktivasyonu 95 °C / 5 dk (x1) Denatürasyon 95 °C/ 3 sn (x14) Bağlanma 60 °C/ 30 sn (x14) Sonlandırma 99 °C /10 dk (x1) Soğutma 4 °C /Süresiz
	20x miR-Amp Primer Karışımı	11 µl /2	
	Nükleaz İçermeyen Su	11 µl /2	
	RT Reaksiyonu Ürünü	15 µl	
	Toplam Reaksiyon Ürünü	37,5 µl	

Reaksiyon bileşenleri karıştırılıp, kısaca santrifüjlendikten sonra PZR cihazında üreticinin sunduğu reaksiyon koşullarında inkübe edilmiştir. Doku homojenatından elde edilmiş total RNA’dan miRNA cDNA sentezi reaksiyon ürünleri gerçek zamanlı PZR aşamasına kadar -20°C koşulunda muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR

Bu çalışmada, hasta ve kontrol grubu EYD örneklerinden elde edilen total RNA'dan sentezlenen cDNA ürünlerinden Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) yöntemi kullanılarak hedef genlerin ekspresyon seviyeleri rölatif kıyaslama ile değerlendirilmiştir. Çalışma için seçilen hedef genlerin anlatım düzeylerinin belirlenmesi için Tablo 3-6'da gösterilen primer dizileri kullanılmıştır.

Tablo 3-6. Seçilen hedef gen primer dizileri

Gen	Tm	Primer Dizisi
<i>PRKAA2</i>	58 °C	F-CTTGAACCTGGGAGGCAGAG
		R-AGTCTTGTGCTGTCACCCAG
<i>SIRT1</i>	58 °C	F-AAATGCTGGCCTAATAGAGTGG
		R-GGCAAAAACAGATACTGATTACCA
<i>PPARGC1A</i>	58 °C	F-ACCATATTCCAGGTCAAGATCAA
		R-GGCTTGACTCATAGTAATAGCAGGA
<i>RELA</i>	58 °C	F-CCGGGATGGCTTCTATGAGG
		R-GGGGTTGTTGTTGGTCTGGATG
<i>TNFA</i>	58 °C	F-CACAGTGAAGTGCTGGCAAC
		R- GATCAAAGCTGTAGGCCCCA
<i>GAPDH</i>	58 °C	F-GATGCTGGTGCTGAGTATGT
		R-GAGATGATGACCCTTTTGGC

Seçilen hedef miRNA'lar hasta ve kontrol grubunda kıyaslamalı olarak EYD ve VYD total RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA ürünlerinden qRT-PZR yöntemi ile değerlendirilmiştir. MiRNA ekspresyon seviyelerini ölçmek için kullanılan qRT-PZR miRNA spesifik Taqman Advanced miRNA Assay'leri (Thermo Fisher, ABD) Tablo 3-7'de listelenmiştir.

Tablo 3-7. miRNA assay'leri

miRNA Assay	Katolog No
hsa-miR-155-5p	483064_mir
hsa-miR-30a-5p	479448_mir
hsa-miR-326	478027_mir
hsa-miR-1247-5p	477882_mir
cel-miR-39-3p	478293_mir

3.2.4.1. Gen Ekspresyon Analizinde qRT-PZR Uygulaması

Ekspresyon analizi her gen için 10 µl reaksiyon karışımı hazırlanarak 96 kuyucuklu PZR plakada gerçekleştirilmiştir. Çalışılacak kuyu sayısına göre reaksiyon karışımı hazırlanarak kuyulara dağıtılmıştır. Bir kuyuya 9 µl reaksiyon karışımı konulmuş ve ardından 1 µl cDNA örneği eklenmiştir (Tablo 3-8). PZR plakasının üzeri film ile kaplandıktan sonra, 1500 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Reaksiyon LightCycler 480 (Roche, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-8. mRNA qRT-PZR reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
SYBR Green I Karışımı	5 µl
Primer F (10 pmol)	1 µl
Primer R (10 pmol)	1 µl
Nükleaz İçermeyen Su	2 µl
cDNA örneği	1 µl
Toplam Reaksiyon Miktarı	10 µl

Çalışmada her örnek duplike olarak çalışılmıştır. Örnekler arasındaki ekspresyon farklılıklarını standartize etmek amacıyla, kontrol olarak her dokuda eksprese edilen (housekeeping) *GAPDH* geni kullanılmıştır. Gen ekspresyon analizinde PZR reaksiyon koşulları Tablo 3-9'da listelenmiştir.

Tablo 3-9. mRNA qRT-PZR koşulları.

Reaksiyon Aşamaları	Koşullar
Predenatürasyon	95 °C - 5 dk
Denatürasyon (Denaturation)	95 °C - 10 sn (x45)
Bağlanma (Annealing)	58 °C - 20 sn (x45)
Uzama (Elongation)	72 °C - 10 sn (x45)
Çözülme Eğrisi (Melting Curve)	95 °C – 5 sn
	65 °C – 1 dk
	95 °C
Soğutma (Cooling)	40 °C – 10 sn

3.2.4.2. MiRNA Ekspresyon Analizinde qRT-PZR Uygulaması

Ekspresyon analizi her miRNA için 10 µl reaksiyon karışımı hazırlanarak 96 kuyucuklu PZR plakada gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı çalışılacak kuyu sayısı hesaplanarak hazırlanmıştır. Her kuyuya 7,5 µl reaksiyon karışımı konulmuş, üzerine 2,5 µl miRNA cDNA örneği eklenmiştir (Tablo 3-10). PZR plakanın üzeri film ile kaplandıktan sonra, 1500 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiştir. Reaksiyon LightCycler 480 (Roche, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-10. miRNA qRT-PZR reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Fast Advanced Karışımı	5 µl
Advanced miRNA Assay	0,5 µl
Nükleaz İçermeyen Su	2 µl
cDNA örneği	2,5 µl
Toplam Reaksiyon Miktarı	10 µl

Çalışmada ekspresyonu değerlendirilecek miRNA’ların her biri için, her örnek iki kuyu olacak şekilde çalışılmıştır. Reaksiyon verimliliğini kontrol etmek amaçlı endojen ve ekzojen kontrol kullanılmıştır. Çalışma tasarımında hsa-let-7g-5p’nin (Thermo Fisher, ABD) endojen referans miRNA olması ve rölatif hesaplama için

kullanılması planlanmış fakat ekspresyon düzeylerinin hasta ve kontrol gruplarında değişkenlik göstermesi nedeni ile referans miRNA olarak kullanılamamıştır. Bu sebeple daha önceki çalışmalarda da kullanıldığı üzere kontrol miRNA olarak her örneğe cDNA sentezi aşamasında sentetik cel-miR-39-3p eklenmiş ve ekzojen referans miRNA ile rölatif hesaplama yapılmıştır (200). MiRNA ekspresyon analizinde PZR reaksiyon koşulları Tablo 3-11’de listelenmiştir.

Tablo 3-11. miRNA qRT-PZR reaksiyon koşulları.

Reaksiyon Aşamaları	Koşullar
Ön denatürasyon	95 °C - 10 dk
Amplifikasyon-Denatürasyon	95 °C – 10 sn (x45)
Amplifikasyon- Bağlanma	60 °C – 30 sn (x45)
Amplifikasyon-Uzama	72 °C – 1 sn (x45)
Soğuma (Cooling)	40 °C – 30 sn

3.2.5. Rölatif Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Hesaplanması

Ekspresyon analizlerinde, rölatif kantitasyon hedef gen ekspresyonlarının referans gen ekspresyon düzeylerine göre belirlenmesi metodu kullanılmıştır. Ekspresyon düzeyini rölatif olarak hesaplamak için $\Delta\Delta Ct$ metodu kullanılmıştır. $\Delta\Delta Ct$ metodunda gen anlatım düzeyini hesaplamak için ilk adım olarak, hedef genin gen anlatım düzeyini ifade eden Ct değerlerinden referans olarak seçilen *GAPDH* geninin Ct değeri çıkartılarak ΔCt değeri elde edilmiştir. Elde edilen Ct değerlerinin normalizasyonunu sağlamak için kontrol grubundaki bireylerin ortalama değerleri kullanılarak kalibratör oluşturulmuştur. ΔCt değerinden kalibratör değeri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri elde edilmiştir. Ekspresyon kat değişim düzeyleri $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ şeklinde hesaplanmıştır. Rölatif miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde referans olarak ekzojen kontrol olan ve deney sırasında tüm örneklerle eşit miktarda eklenen sentetik cel-miR-39-3p kullanılmış ve yukarıda tarif edildiği şekilde $\Delta\Delta Ct$ ve ekspresyon kat değişimleri belirlenmiştir.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Değerlendirilen tüm parametreler normal dağılım açısından incelenmiştir. Normal dağılıma uyan biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirmesi T-test

kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. Normal dağılıma uymayan sürekli değişkenlerin analizi için Mann-Whitney U analizi yapıp sonuçlar medyan (%25-%75) olarak belirtilmiştir. Kategorik değişkenlerin analizinde ise ki-kare analizi kullanılarak sonuçlar yüzde (gruptaki kişi sayısı) şeklinde gösterilmiştir. Kontrol ve hasta gruplarının miRNA ve gen ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Biyokimyasal ölçümler ve ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkilerin incelenmesinde parametrik olmayan Spearman korelasyon analizi kullanılmıştır. Korelasyon analizi sonuçlarında, korelasyon kat sayısı (r) değerleri; $r < 0,2$ çok zayıf korelasyon; $r = 0,2-0,4$ zayıf korelasyon; $r = 0,4-0,6$ orta derece korelasyon; $r = 0,6-0,8$ güçlü korelasyon; $r = 0,8-1,0$ çok güçlü korelasyon olarak nitelendirilmiştir. Receiver operating characteristics (ROC) eğrilerinin oluşturulmasında eşik değer 0.5 alınmış ve duyarlılık ve özgüllük yüzde olarak belirtilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir. Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS (v23.0) (IBM Corp., ABD) ve GraphPad Prism (v8) (GraphPad Software, ABD) yazılımları kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunun Değerlendirilmesi

Bu çalışmaya katılan bireylerin, “Yağ Dokusunda MiRNA'ların Araştırılması ve Ateroskleroz ile İlişkilendirilmesi” konulu projede toplanmış olan EYD ve VYD örneklerinden izole edilmiş RNA materyalleri kullanılmıştır. Bu projede hasta grubu olarak tanımlanan bireylerin koroner anjiyografi sonucunda, koroner arterlerinde aterosklerotik plak olduğu rapor edilmiştir. Koroner anjiyografi sonucunda, koroner arterlerinde aterosklerotik lezyon görülmeyen ancak aortik/mitral kapak bozukluğu nedeniyle cerrahi operasyon geçiren ve ameliyat sırasında EYD ve VYD örnekleri alınan bireyler kontrol grubu olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmaya hasta grubuna dahil edilen 64 birey ve kontrol olarak belirlenen 30 bireyin katılımı ile toplam 94 kişi dahil edilmiştir. Çalışma grubunun karakteristik özellikleri Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Tablo 4-1. Kontrol ve hasta grubunun karakteristik özellikleri.

	Kontrol (n=30)	KAH (n=64)	<i>p-değeri</i>
	Ortalama $\pm$ SS	Ortalama $\pm$ SS	
Yaş (Yıl) ¹	56,73 $\pm$ 14,14	60,44 $\pm$ 11,32	0,215
Vücut kitle indeksi (kg/m ²) ¹	29,26 $\pm$ 7,06	28,71 $\pm$ 5,18	0,734
Bel Çevresi (cm) ¹	92,50 $\pm$ 10,40	96,79 $\pm$ 8,25	0,139
Aile Öyküsü ³	%11,50 (3)	%12,00 (6)	0,953
Diyabet ³	%20,00 (6)	%46,90 (30)	0,012
Obezite ³	%33,30 (8)	%42,60 (26)	0,431
Hipertansiyon ³	%40,00 (12)	%57,80 (37)	0,107
Hiperlipidemi ³	%28,60 (4)	%31,30 (10)	0,856
Antidiyabetik İlaç Kullanımı ³	%6,70 (2)	%15,60 (10)	0,225
Lipid Düşürücü İlaç Kullanımı ³	%10,00 (3)	%56,30 (36)	<0,001
Sigara tüketimi ³	%26,70 (8)	%34,40 (22)	0,574
Total kolesterol (mg/dL) ¹	192,78 $\pm$ 40,93	191,00 $\pm$ 55,67	0,893
HDL kolesterol (mg/dL) ²	47,00 (39,00-59,00)	39,00 (33,00-44,00)	0,030
LDL kolesterol (mg/dL) ¹	120,57 $\pm$ 39,10	128,56 $\pm$ 42,60	0,424
Trigliserit (mg/dL) ²	105,00 (85,50-152,00)	146,50 (109,50-210,25)	0,009
Açlık Glukoz (mg/dL) ²	105,00 (88,00-133,00)	101,00 (95,00-127,00)	0,731
C-Reaktif Protein (CRP) ²	3,00 (1,10-12,75)	4,21 (2,50-11,00)	0,301
Cinsiyet (Kadın) ³	%53,30 (16)	%25,00 (16)	0,007

¹T-testi uygulanmış ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. ²Normal dağılıma uymayan parametrelere Mann-Whitney U analizi uygulanıp sonuçlar medyan (%25-75) olarak belirtilmiştir. ³Kategorik değişkenler için Ki-kare testi uygulanmıştır ve sonuç yüzde (kişi sayısı) olarak verilmiştir. SS: Standart Sapma, VKİ: Vücut Kütle İndeksi

Kontrol ve hasta grupları arasındaki klinik ve biyokimyasal özellikler bakımından yapılan istatistiksel değerlendirmede; iki grup arasında HDL kolesterol ($p = 0,030$), trigliserit düzeyleri ($p = 0,009$) ve DM durumu ($p = 0,012$), lipid düşürücü ilaç kullanımı ($p < 0,001$) ve cinsiyet dağılımı ($p = 0,007$) farklı bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında KAH ve kontrol gruplarının yanı sıra DM ve obezite gibi KAH risk faktörlerine göre alt gruplar oluşturulmuştur. Oluşturulan beş alt grupta (KAH, DM, Obez, KAH-DM, KAH-Obez) ve grupların kontrolleri arasında gen ve miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır.

4.2. Gen Anlatım Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada, *PRKAA2*, *PPARGC1A*, *SIRT1*, *RELA* ve *TNFA* aday genlerinin anlatım düzeyleri hasta-kontrol ve belirlenen diğer alt gruplarda aşağıda açıklandığı gibi değerlendirilmiştir. Aday genlerin anlatım düzeylerinin, biyokimyasal parametreler ile korelasyonları tüm gruplarda değerlendirilmiştir. Analizler sırasında, dokularda ekspresyon farklılıkları incelenen gen anlatım düzeylerinde sapmaya neden olan değerler dışlanmıştır.

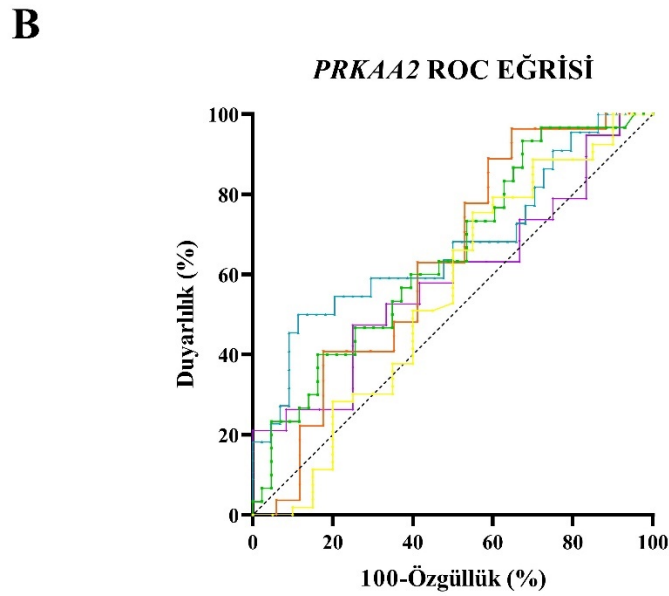
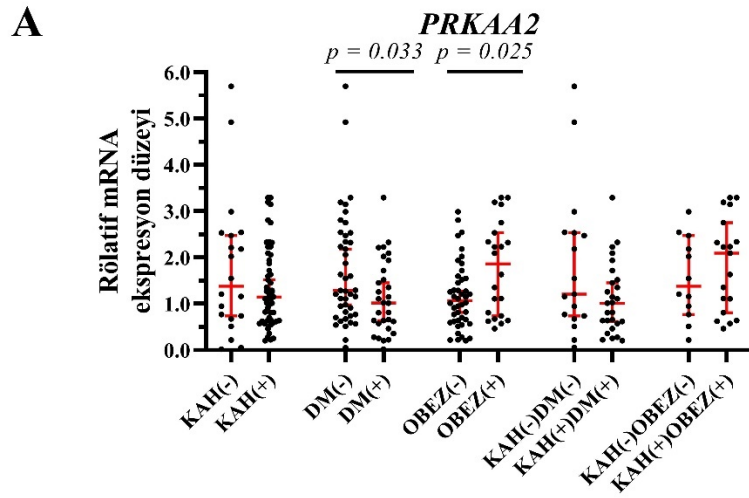
4.2.1. *PRKAA2* Anlatım Düzeyi

PRKAA2 anlatım düzeyleri farkı, şekil 4-1'de gösterildiği gibi DM ($p = 0,033$) ve obezite ($p = 0,025$) alt gruplarında hasta ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. DM grubunda *PRKAA2* anlatım düzeylerinde, DM olmayan bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalma gözlemlenmiştir (0,79 kat, $p = 0,033$). Bunun yanında, obez bireylerde obez olmayan bireylere göre *PRKAA2* anlatım düzeylerinde artış olduğu gözlemlenmiştir (1,73 kat, $p=0,025$) (Şekil 4-1).

KAH, KAH ve DM'in birlikte incelendiği (KAH-DM) iki grupta hastaların kontrol grubuna göre *PRKAA2* anlatım seviyelerinde, sırasıyla 0,83 ve 0,84 katlık azalma olmasına rağmen bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (KAH $p=0,508$; KAH-DM $p=0,632$). Ek olarak, obez olan KAH'lı bireylerde *PRKAA2* anlatım düzeyleri obez ve KAH olmayan bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan 1,51 katlık bir artış göstermiştir ($p=0,588$) (Şekil 4-1).

ROC eğrisi, incelenen parametrenin iki grubu ne kadar iyi ayırt edebildiğini gösteren bir analizdir. ROC eğrisinin şekilde görülen duyarlılık eksenine yakın olması (sol üst köşe) testin doğruluğunu göstermektedir. ROC eğrisi altındaki alan (AUC)'ın 0,5 ve 1,0 arasındaki değeri incelenen parametrenin iki grubu ne kadar iyi ayırt edebildiğini gösteren bir ölçüdür (Şekil 4-1) (201). DM'li bireylerde DM olmayan

bireylere göre *PRKAA2* anlatım düzeyi 0,79 kat azalmıştır ($p = 0,033$). Bu anlamlı sonucun iki grup arasındaki ayrımı ROC eğrisinde incelenmiştir ve *PRKAA2* düzeylerinin DM ve DM olmayan bireylerin ayırımında 0,648 AUC değeri (%95 Güven aralığı: 0,521-0,755), %60,0 duyarlılık ve % 60,5 özgüllük ile tanısal duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Eşik değer (*cut-off*) =1,15). *PRKAA2* anlatım düzeyi farkının istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu diğer alt grup olan obezitede, *PRKAA2* anlatım düzeyi obez bireylerde obez olmayan bireylere göre 1,73 katlık bir artış göstermiştir. *PRKAA2* düzeylerinin obez ve obez olmayan bireyleri ayırt etmede 0,671 AUC değeri (%95 Güven aralığı: 0,524-0,817), %54,5 duyarlılık ve %79,5 özgüllük ile tanısal duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Eşik değer = 1,61). *PRKAA2* düzeyleri KAH ve KAH'la birlikte değerlendirilen DM ve obezite gruplarında ilgili kontrol gruplarına göre zayıf tanısal duyarlılığa sahiptir (Şekil 4-1).

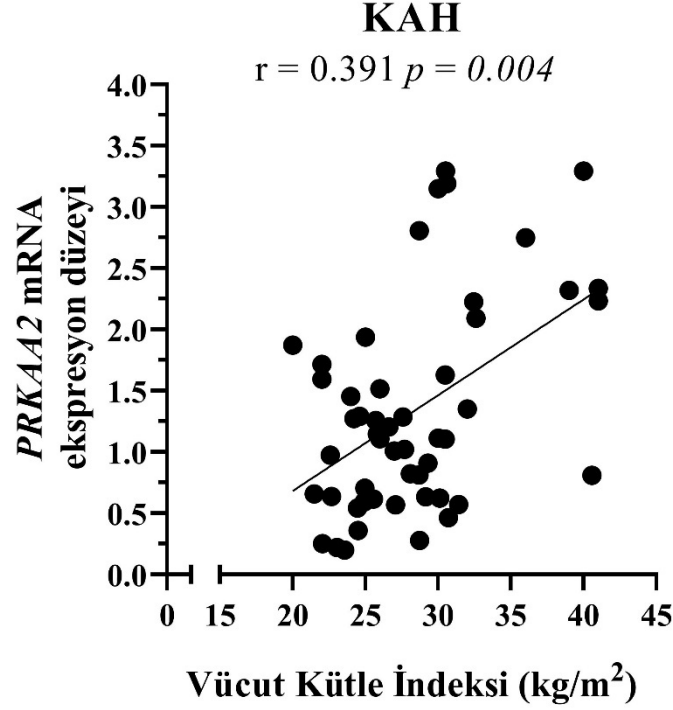


	KAH	DM	OBEZ	KAH-DM	KAH-OBEZ
	KAH(-) KAH(+)	DM(-) DM(+)	OBEZ(-) OBEZ(+)	KAH(-)DM(-) KAH(+DM(+)	KAH(-)OBEZ(-) KAH(+OBEZ(+)
Eğrinin altındaki alan	0,551	0,648	0,671	0,632	0,588
Standart hata	0,083	0,065	0,075	0,092	0,104
%95 Güven Aralığı	0,387 - 0,714	0,521 - 0,775	0,524 - 0,817	0,452 - 0,812	0,384 - 0,792
Duyarlılık ve Özgüllük (%)	—	60,0 - 60,5	54,5 - 79,5	—	—

Şekil 4-1. KAH ve alt gruplarda *PRKAA2* anlatım düzeyleri.

A) *PRKAA2* anlatım düzeyleri KAH ve alt gruplarında gösterilmiştir. KAH ve alt gruplarda hasta ve kontrol arasında anlatım düzeyi farklarının istatistiksel olarak anlamlılığını belirten p değerleri şekilde gösterilmiştir (DM $p=0,033$; obezite $p=0,025$). B) ROC eğrisi analizi, *PRKAA2* anlatım düzeyi analizinin belirtilen gruplarda hasta ve kontrol arasındaki ayrımını göstermektedir. ROC eğrisi analizine ait AUC, %95 güven aralığı, standart hata, duyarlılık yüzdesi ve özgüllük yüzdesi değerleri alt tabloda gösterilmiştir (Eşik değer = DM (1,15); obezite (1,61)).

PRKAA2 anlatım düzeylerinin, biyokimyasal ve klinik parametrelerle korelasyonları belirlenen tüm gruplarda değerlendirilmiştir. *PRKAA2* anlatım düzeyinin KAH(+)KAH(-) grubunda, KAH'lı bireylerde VKİ ile zayıf derecede pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir ($r = 0,391$, $p = 0,004$) (Şekil 4-2).



Şekil 4-2. *PRKAA2* anlatım düzeyinin KAH grubunda VKİ ile korelasyonu

PRKAA2 anlatım düzeyi KAH'lı bireylerde VKİ ile zayıf derecede pozitif korelasyon göstermiştir ($r=0,391$, $p=0,004$).

4.2.2. *PPARGC1A* Anlatım Düzeyi

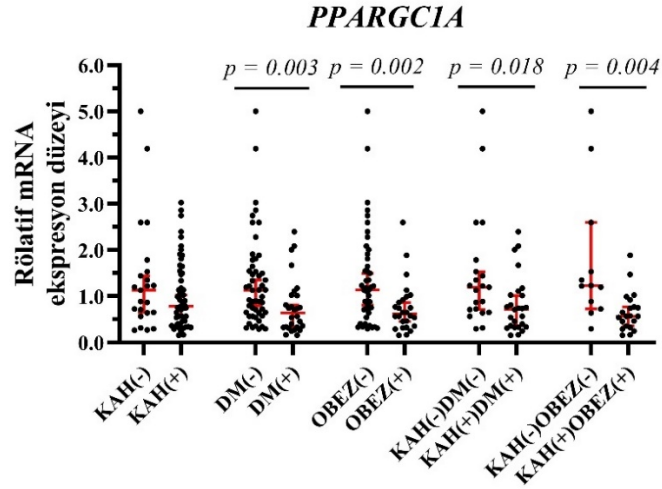
PPARGC1A anlatım düzeyleri, Şekil 4-3'de gösterildiği gibi DM, obezite, KAH-DM, KAH-Obezite alt grupları ve kontrolleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. DM grubu *PPARGC1A* anlatım düzeyleri DM olmayan grup ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve 0,55 kat azalma gözlenmiştir ($p = 0,003$). Bunun yanında, obez olan bireylerde obez olmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı 0,44 kat daha düşük *PPARGC1A* anlatım seviyeleri gözlemlenmiştir ($p = 0,002$). KAH-DM ve KAH-Obez gruplarında, bu alt grupların kontrollerine göre *PPARGC1A* mRNA anlatım düzeyleri sırası ile 0,55 ve 0,46 kat daha düşük göstermiştir

ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırası ile $p = 0,018$ ve $p = 0,004$) (Şekil 4-3).

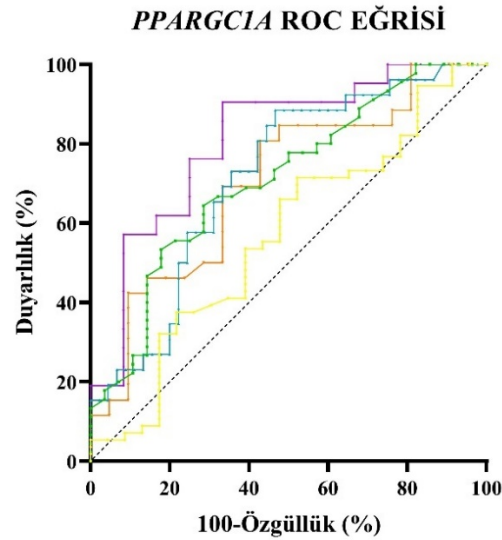
KAH ve kontrol grubunda *PPARGC1A* mRNA anlatım düzeyleri kıyaslandığında ise, KAH grubunda 1,44 katlık bir artış olduğu gözlenmiştir. Ancak, *PPARGC1A* mRNA anlatım düzeyindeki bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p = 0,365$) (Şekil 4-3).

ROC eğrisi analizi, *PPARGC1A* mRNA anlatım düzeyi farkının grupların hasta ve kontrolleri arasındaki ayırt edilebilirliğinin derecesini göstermektedir. ROC eğrisi analizinde DM, obezite, KAH-DM ve KAH-Obez alt gruplarında *PPARGC1A* anlatım düzeyi hasta ve kontrolleri ayırt etmede şekil 4-3'te gösterilen AUC değerleri, duyarlılık ve özgüllük ile duyarlıdır (Sırası ile eşik değer = 0,83; 0,87; 0,83; 0,82) (Şekil 4-3).

A



B

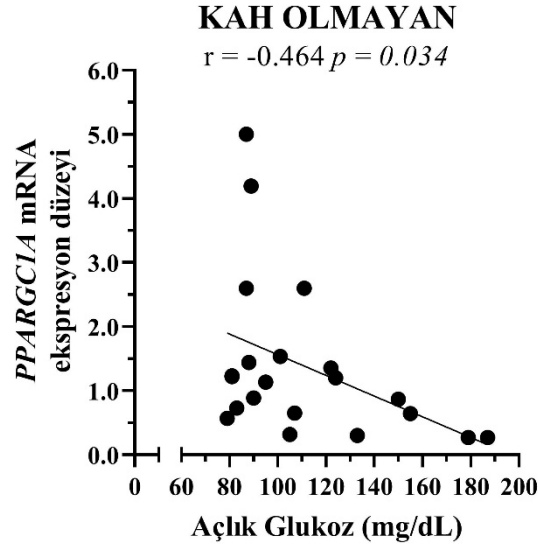


	KAH	DM	OBEZ	KAH-DM	KAH-OBEZ
	KAH(-) KAH(+)	DM(-) DM(+)	OBEZ(-) OBEZ(+)	KAH(-)DM(-) KAH(+)-DM(+)	KAH(-)OBEZ(-) KAH(+)-OBEZ(+)
Eğrinin altındaki alan	0,565	0,710	0,717	0,702	0,810
Standart hata	0,073	0,062	0,062	0,077	0,082
%95 Güven Aralığı	0,422 - 0,709	0,588 - 0,831	0,596 - 0,838	0,551 - 0,854	0,650 - 0,969
Duyarlılık ve Özgüllük (%)	—	71,4 - 62,7	73,1 - 64,4	69,2 - 66,7	76,2 - 75,0

Şekil 4-3. KAH ve alt gruplarda *PPARGC1A* anlatım düzeyleri.

A) *PPARGC1A* mRNA anlatım düzeyleri KAH ve alt gruplarında gösterilmiştir. KAH ve alt gruplarda hasta ve kontrol arasında anlatım düzeyi farklarının istatistiksel olarak anlamlılığını belirten p değerleri şekilde gösterilmiştir (DM $p=0,003$; Obezite $p=0,002$; KAH-DM $p=0,018$; KAH-Obez $p=0,004$). B) ROC eğrisi analizi, *PPARGC1A* mRNA anlatım düzeyi analizinin belirtilen gruplarda hasta ve kontrol arasındaki ayrımını göstermektedir. ROC eğri analizlerine ait AUC, %95 güven aralığı, standart hata, duyarlılık yüzdesi ve özgüllük yüzdesi değerleri alt tabloda gösterilmiştir (Eşik değer = DM (0,83); Obezite (0,87); KAH-DM (0,83); KAH-Obez (0,82)).

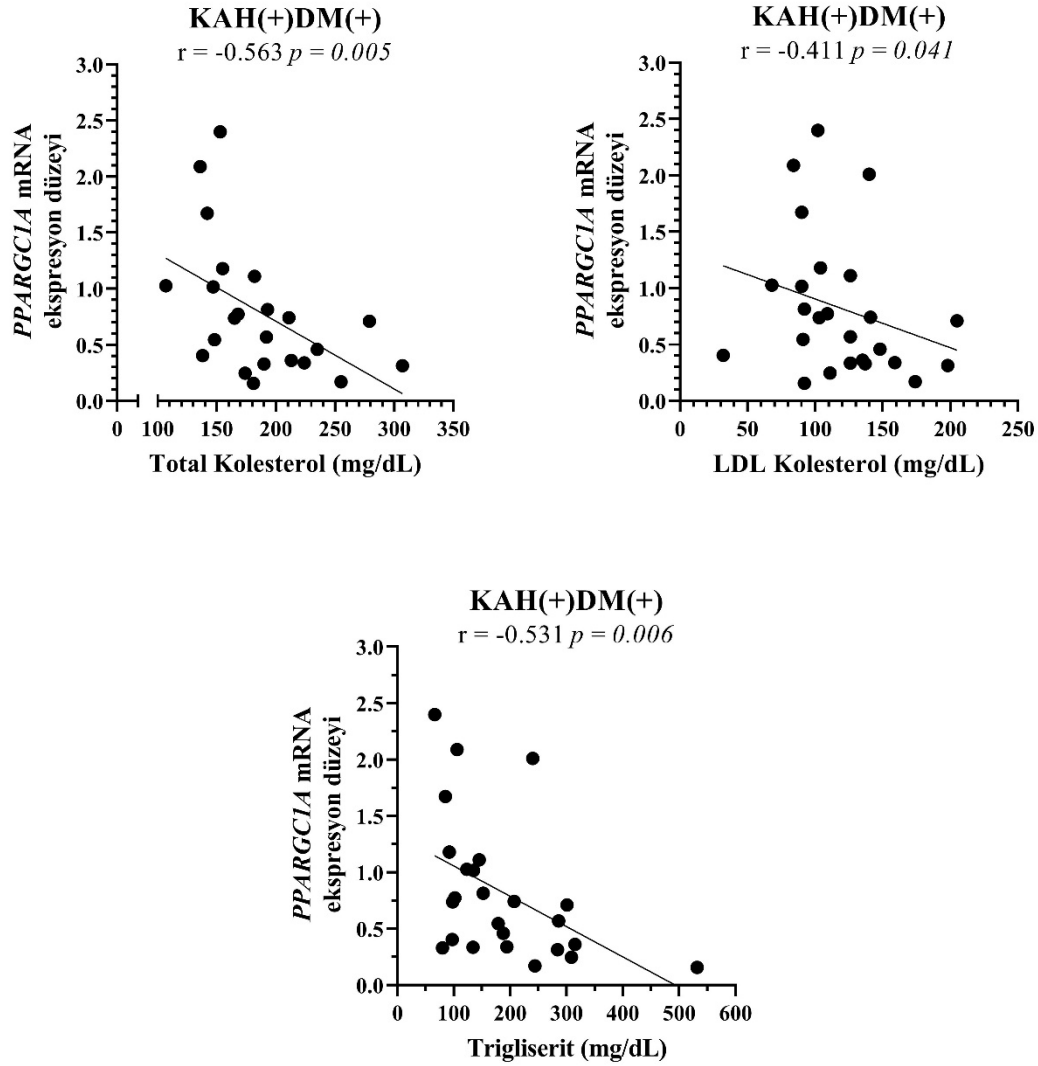
PPARGC1A anlatım düzeylerinin, biyokimyasal ve klinik parametreler ile korelasyonları belirlenen tüm gruplarda değerlendirilmiştir. *PPARGC1A* anlatım düzeyi KAH(+)KAH(-) grubunda KAH olmayan bireylerde açlık glukoz parametresi ile Şekil 4-4 'de gösterildiği gibi orta derecede negatif korelasyon gösterilmiştir ($r = -0,464$, $p=0,034$).



Şekil 4-4. *PPARGC1A* anlatım düzeyinin KAH grubunda açlık glukoz ile korelasyonu.

PPARGC1A mRNA anlatım düzeyi KAH olmayan bireylerde açlık glukoz ile orta derecede negatif korelasyon göstermiştir ($r = -0,464$, $p=0,034$).

KAH ve DM birlikte incelendiği alt grupta, diyabetik KAH'lı bireylerde *PPARGC1A* anlatım düzeyi, total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserit ile orta derecede negatif korelasyon göstermiştir (sırası ile; $r = -0,563$ $p=0,005$; $r = -0,411$ $p=0,041$; $r = -0,531$ $p=0,006$) (Şekil 4-5).



Şekil 4-5. *PPARGC1A* anlatım düzeyinin KAH(+)/DM(+) grubunda biyokimyasal parametreler ile korelasyonları.

PPARGC1A mRNA anlatım düzeyi diyabeti olan KAH'lı bireylerde total kolesterol, LDL ve trigliserit parametreleri ile orta derecede negatif korelasyon göstermiştir (Total Kolesterol $r = -0,563$ $p=0,005$; LDL $r = -0,411$ $p=0,041$; Trigliserit $r = -0,531$ $p=0,006$).

4.2.3. *SIRT1* Anlatım Düzeyi

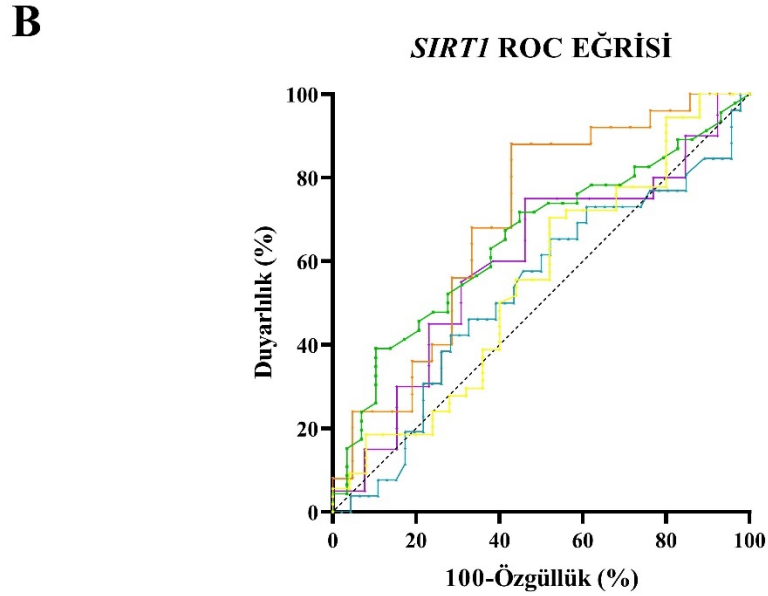
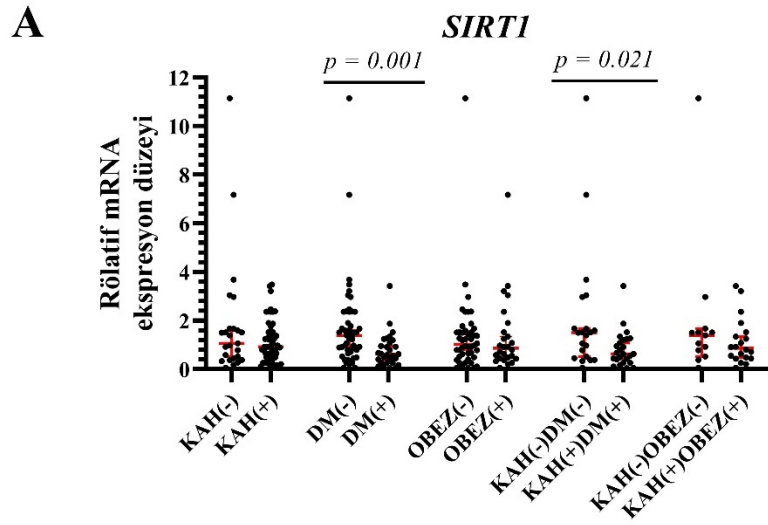
Çalışma grubunda *SIRT1* anlatım düzeyleri, DM ve KAH-DM gruplarında kontrol grubuna göre sırası ile 0,54 ve 0,42 katlık düşüş göstermiştir. Bu iki grubun hasta ve kontrolleri arasındaki *SIRT1* anlatım düzeyleri farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (DM; $p=0,001$) (KAH-DM $p=0,021$) (Şekil 4-6).

SIRT1 anlatım düzeyleri KAH grubunda ve KAH-Obez alt grubunda, bu grupların kontrollerine göre sırasıyla 1,15 ve 1,61 katlık artış göstermiştir, ancak bu anlatım

düzeyi artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (KAH $p = 0,457$; KAH-Obez $p = 0,329$). Obezite alt grubunda *SIRT1* anlatım düzeyi, obez olmayan bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan 0,84 katlık düşüş göstermiştir ($p = 0,686$) (Şekil 4-6).

ROC eğrisi analizinde KAH ve diğer alt gruplarda *SIRT1* anlatım düzeyi farkının hasta ve kontrol arasında duyarlılık ve özgüllüğü incelenmiştir. İncelenen gruplar arasında DM ve KAH-DM grubunda kontrol grubuna göre düşüş gösteren *SIRT1* anlatım düzeyinin şekil 4-6'da gösterilen AUC değerleri, duyarlılık ve özgüllük ile tanısal duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Eşik değer = DM (0,96); KAH-DM (0,96)) (Şekil 4-6).



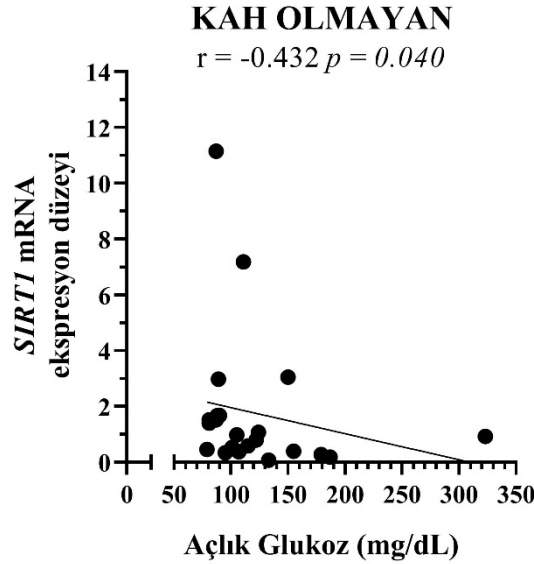


	KAH	DM	OBEZ	KAH-DM	KAH-OBEZ
	KAH(-) KAH(+)	DM(-) DM(+)	OBEZ(-) OBEZ(+)	KAH(-)DM(-) KAH(+DM(+)	KAH(-)OBEZ(-) KAH(+OBEZ(+)
Eğrinin altındaki alan	0,552	0,650	0,529	0,699	0,602
Standart hata	0,072	0,064	0,073	0,080	0,103
%95 Güven Aralığı	0,410 - 0,694	0,525 - 0,776	0,387 - 0,671	0,542 - 0,856	0,400 - 0,803
Duyarlılık ve Özgüllük (%)	—	72,4 - 62,0	—	68,0 - 66,7	—

Şekil 4-6. KAH ve alt gruplarda *SIRT1* anlatım düzeyleri.

A) *SIRT1* anlatım düzeyleri KAH ve alt gruplarında gösterilmiştir. KAH ve alt gruplarda hasta ve kontrol arasında anlatım düzeyi farklarının istatistiksel olarak anlamlılığını belirten p değerleri şekilde gösterilmiştir (DM $p=0,029$; KAH-DM $p=0,021$). B) ROC eğrisi analizi, *SIRT1* anlatım düzeyi analizinin belirtilen gruplarda hasta ve kontrol arasındaki ayrımını göstermektedir. ROC eğri analizlerine ait AUC, %95 güven aralığı, standart hata, duyarlılık yüzdesi ve özgüllük yüzdesi değerleri alt tabloda gösterilmiştir (Eşik değer = DM (0,96); KAH-DM (0,96)).

SIRT1 anlatım düzeylerinin, biyokimyasal ve klinik parametreler ile belirlenen tüm gruplarda korelasyonları değerlendirildiğinde; *SIRT1* anlatım düzeyi, KAH olmayan bireylerde Şekil 4-7’de gösterildiği gibi açlık glukoz ile orta derecede negatif korelasyon göstermiştir ($r = -0,432$, $p=0,040$).



Şekil 4-7. *SIRT1* anlatım düzeyinin KAH grubunda açlık glukoz parametresi ile korelasyonu.

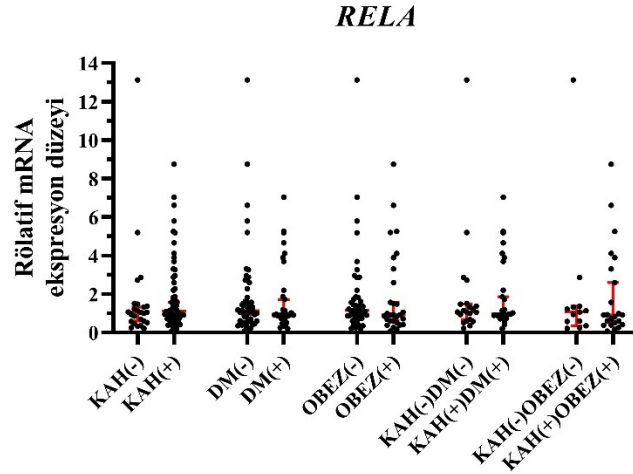
SIRT1 anlatım düzeyi KAH olmayan bireylerde açlık glukoz ölçümü ile orta derecede negatif korelasyon göstermiştir ($r = -0,432$, $p=0,040$).

4.2.4. *RELA* Anlatım Düzeyi

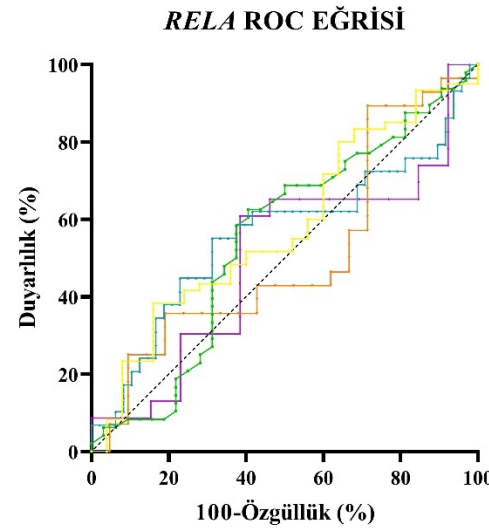
Bu çalışmada *RELA* anlatım düzeyleri, belirlenen tüm gruplarda ilgili kontrollere göre düşüş göstermiştir (KAH 0,94 kat, DM 0,82 kat, KAH-DM 0,91 kat, Obezite 0,80 kat, KAH-Obezite 0,85 kat). Buna karşın, *RELA* anlatım düzeyleri arasında görülen bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4-8).

ROC eğrisi analizinde *RELA* anlatım düzeylerinin bütün grupların hasta ve kontrolleri arasında tanısal duyarlılığı ve özgüllüğü gözlemlenmemiştir (Şekil 4-8).

A



B



	KAH	DM	OBEZ	KAH-DM	KAH-OBEZ
	KAH(-) KAH(+)	DM(-) DM(+)	OBEZ(-) OBEZ(+)	KAH(-)DM(-) KAH(+DM(+)	KAH(-)OBEZ(-) KAH(+OBEZ(+)
Eğrinin altındaki alan	0,577	0,549	0,560	0,507	0,502
Standart hata	0,067	0,068	0,073	0,086	0,102
%95 Güven Aralığı	0,446 - 0,709	0,416 - 0,683	0,417 - 0,702	0,338 - 0,676	0,301 - 0,702

Şekil 4-8. KAH ve alt gruplarda RELA anlatım düzeyleri.

A) *RELA* anlatım düzeyleri KAH ve alt gruplarında gösterilmiştir. Hasta ve kontroller arasındaki *RELA* anlatım düzeyleri tüm gruplarda grupların kontrollerine göre düşüş göstermiştir, ancak anlatım düzeyleri farkı tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.050$). (KAH 0,94 kat, $p = 0,263$) (DM 0,82 kat, $p = 0,458$) (Obezite 0,80 kat, $p = 0,383$) (KAH-DM 0,91 kat, $p = 0,936$) (KAH-Obez 0,85 kat, $p = 0,987$). B) ROC eğrisi analizi *RELA* mRNA anlatım düzeyi gruplarda hasta ve kontrol arasındaki ayrımını göstermektedir. ROC eğri analizlerine ait AUC, %95 güven aralığı ve standart hata değerleri alt tabloda gösterilmiştir.

RELA anlatım düzeylerinin tüm gruplarda biyokimyasal ve klinik parametreler ile korelasyonları değerlendirilmiştir ancak *RELA* anlatım düzeyi incelenen parametreler ile korelasyon göstermemiştir ($p>0,050$).

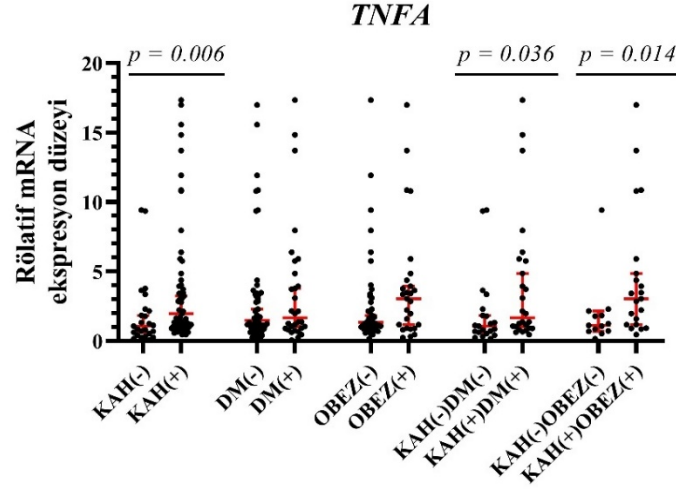
4.2.5. *TNFA* Anlatım Düzeyi

TNFA anlatım düzeyleri KAH'lı, obez KAH'lı ve diyabetik KAH'lı bireylerde belirtilen grupların kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. KAH'lı bireylerde kontrollere göre *TNFA* anlatım düzeyi 1,32 kat artış göstermiştir ($p = 0,005$). *TNFA* anlatım düzeyi KAH-DM grubunda, kontrol grubuna göre 1,57 kat ($p = 0,035$); obezitenin eşlik ettiği KAH grubunda ise *TNFA* anlatım düzeyi kontrol grubuna göre 2,72 katlık ($p = 0,014$) bir artış göstermiştir (Şekil 4-9).

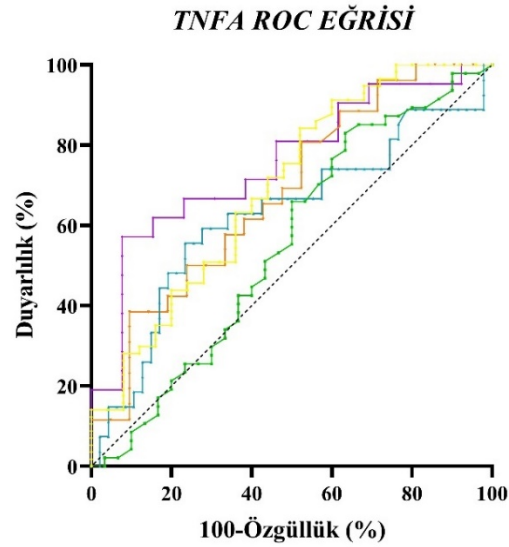
Diyabet ve obezite gruplarında, *TNFA* geni mRNA anlatım düzeyleri kontollere göre 1,12 ve 2,29 katlık artış göstermiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (DM $p=0,436$, Obez $p=0,074$) (Şekil 4-9).

ROC eğrisi analizlerine göre *TNFA* ekspresyonunun KAH, KAH-DM ve KAH-Obezite alt gruplarında hasta ve kontrolleri ayırt etmede şekil 4-9'da gösterilen AUC, duyarlılık ve özgüllük ile tanısal duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Eşik değer = KAH(1,33); KAH-DM (1,35); KAH-Obez (2,19)) (Şekil 4-9).

A



B

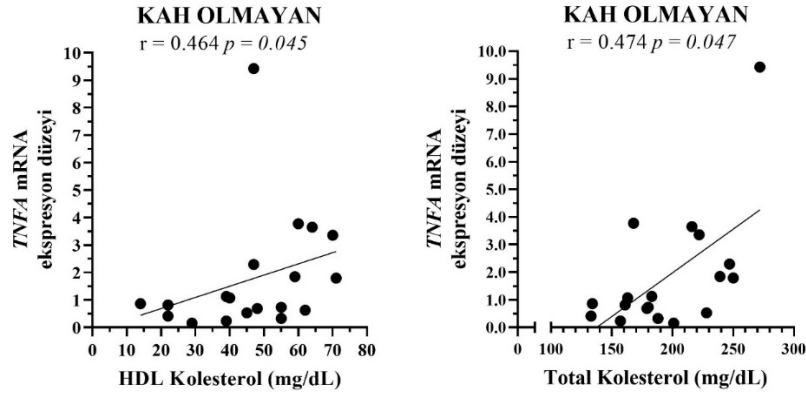


	KAH	DM	OBEZ	KAH-DM	KAH-OBEZ
	KAH(-)	DM(-)	OBEZ(-)	KAH(-)DM(-)	KAH(-)OBEZ(-)
	KAH(+)	DM(+)	OBEZ(+)	KAH(+DM(+)	KAH(+OBEZ(+)
Eğrinin altındaki alan	0,694	0,553	0,625	0,680	0,755
Standart hata	0,066	0,071	0,072	0,079	0,085
%95 Güven Aralığı	0,565 - 0,822	0,415 - 0,691	0,485 - 0,765	0,526 - 0,835	0,588 - 0,921
Duyarlılık ve Özgüllük (%)	63,2 - 64	—	—	57,7 - 66,7	61,9 - 84,6

Şekil 4-9. KAH ve alt gruplarda TNFA anlatım düzeyleri.

A) *TNFA* anlatım düzeyleri KAH ve alt gruplarında gösterilmiştir. KAH ve alt gruplarda hasta ve kontrol arasında anlatım düzeyi farklarının istatistiksel olarak anlamlılığını belirten p değerleri şekilde gösterilmiştir (KAH $p=0,005$; KAH-DM $p=0,035$; KAH-Obez $p=0,014$). B) ROC eğrisi analizinde TNFA mRNA anlatım düzeyi gruplarda hasta ve kontrol arasındaki ayrımını göstermektedir. ROC eğri analizlerine ait AUC, %95 güven aralığı, standart hata, duyarlılık yüzdesi ve özgüllük yüzdesi değerleri alt tabloda gösterilmiştir (Eşik değer = KAH(1,33); KAH-DM (1,35); KAH-Obez (2,19)).

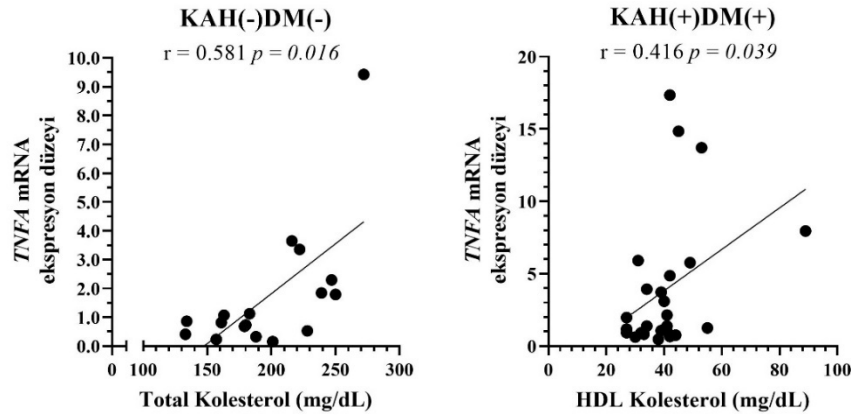
TNFA anlatım düzeyinin belirlenen tüm gruplarda klinik ve biyokimyasal parametreleri ile korelasyonları değerlendirilmiştir. KAH grubunda *TNFA* anlatım düzeyi KAH'lı olmayan bireylerde HDL kolesterol ve total kolesterol ölçümleri ile Şekil 4-10'da gösterildiği gibi orta derecede pozitif korelasyon göstermiştir (HDL kolesterol $r = 0,464$ $p = 0,045$; Total kolesterol $r = 0,474$ $p = 0,047$).



Şekil 4-10. *TNFA* anlatım düzeyinin KAH grubunda HDL kolesterol ve total kolesterol ile ilişkisi.

TNFA anlatım düzeyi KAH olmayan bireylerde HDL ($r = 0,464$ $p = 0,045$) ve total kolesterol ($r = 0,474$ $p = 0,047$) ile orta derecede pozitif korelasyon göstermiştir.

Ek olarak *TNFA* anlatım düzeyi KAH ve DM'in birlikte incelendiği KAH-DM grubunda; diyabetik KAH'lı bireylerde HDL kolesterol ile orta düzey pozitif korelasyon göstermiştir ($r = 0,416$ $p = 0,039$). KAH ve diyabeti olmayan bireylerde ise *TNFA* anlatım düzeyi total kolesterol ile orta derece pozitif korelasyon göstermiştir ($r = 0,581$ $p = 0,016$) (Şekil 4-11).



Şekil 4-11. *TNFA* anlatım düzeylerinin KAH-DM grubunda korelasyonları.

TNFA anlatım düzeyleri KAH-DM olmayan bireylerde total kolesterol ile orta düzey pozitif korelasyon göstermiştir ($r = 0,581$ $p=0,016$). Diyabeti olan KAH'lı bireylerde *TNFA* anlatım düzeyleri HDL ölçümü ile orta düzey pozitif korelasyon göstermiştir ($r=0,416$ $p=0,039$).

4.3. MiRNA Anlatım Düzeylerinin Değerlendirilmesi

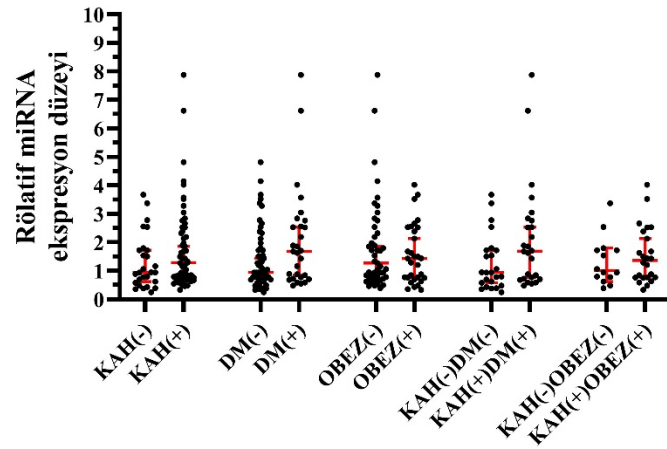
Çalışmada belirlenmiş miR-155-5p, miR-30a-5p, miR-326 ve miR-1247-5p aday miRNA'larının anlatım düzeyleri tüm gruplarda (KAH, DM, Obez, KAH-DM ve KAH-Obez) EYD ve VYD dokularında değerlendirilmiştir. Ek olarak, tüm gruplarda miRNA anlatım düzeylerinin biyokimyasal parametreler ile korelasyonları değerlendirilmiştir. Analizler sırasında, incelenen miRNA'larda sapmaya neden olan değerler dışlanmıştır.

4.3.1. MiR-155-5p Anlatım Düzeyinin Değerlendirilmesi

EYD örneklerinde miR-155-5p'nin incelenen gruplar ile kontrolleri arasında anlatım düzeyleri farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.050$, Şekil 4-12). KAH'lı bireylerde kontrol grubuna göre miR-155-5p anlatım düzeyi 1,39 katlık bir artış göstermiştir ($p = 0,161$). MiR-155-5p düzeyleri DM ve KAH-DM gruplarının kontrol gruplarına göre sırası ile 1,79 ve 1,82 kat artışla ifade edilmektedir (Diyabet $p = 0,091$; KAH-DM $p = 0,062$). Obez olan bireylerde ve obez KAH gruplarında ise, miR-155-5p anlatım düzeyleri 1,12 ve 1,35 kat artmıştır (Obezite $p = 0,631$, KAH-Obezite $p = 0,832$) (Şekil 4-12). ROC eğrisi analizinde EYD mir-155-5p anlatım düzeyinin tüm grupların hasta ve kontrolleri arasında tanısal duyarlılığı ve özgüllüğü gözlemlenmemiştir (Şekil 4-12).

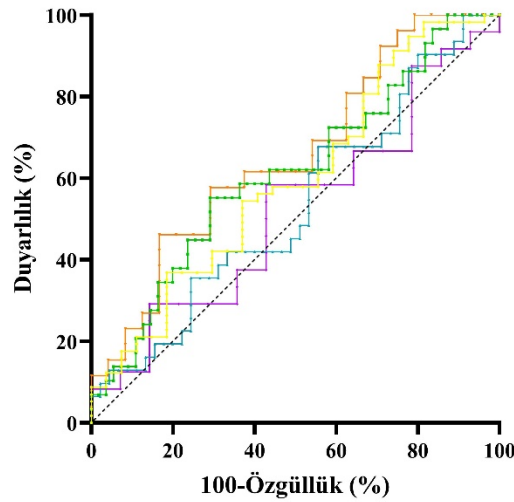
A

EYD-hsa-miR-155-5p



B

EYD-hsa-miR-155-5p ROC EĞRİSİ

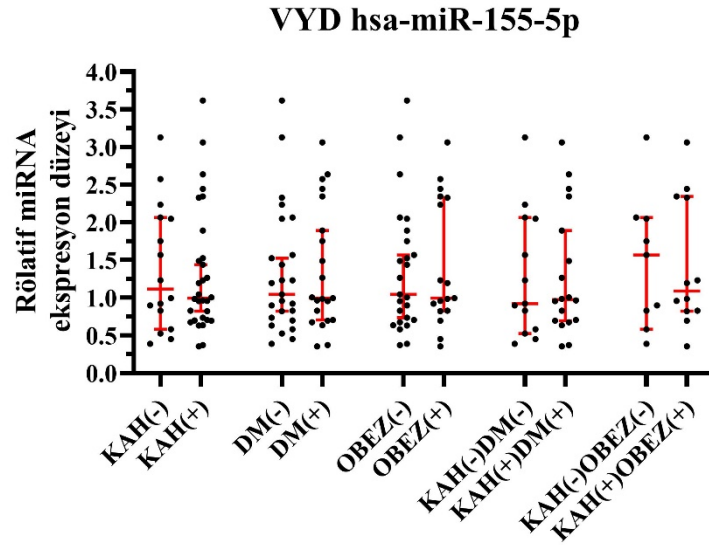


	KAH	DM	OBEZ	KAH-DM	KAH-OBEZ
	KAH(-) KAH(+)	DM(-) DM(+)	OBEZ(-) OBEZ(+)	KAH(-)DM(-) KAH(+)DM(+)	KAH(-)OBEZ(-) KAH(+)OBEZ(+)
Eğrinin altındaki alan	0,595	0,613	0,533	0,654	0,521
Standart hata	0,067	0,065	0,068	0,078	0,098
%95 Güven Aralığı	0,463 - 0,727	0,485 - 0,740	0,400 - 0,666	0,502 - 0,806	0,329 - 0,712

Şekil 4-12. KAH ve alt gruplarda EYD miR-155-5p anlatım düzeyleri.

A) Tüm gruplarda miR-155-5p, kontrol gruplarına göre yüksek seviyelerde ekspresyon seviyeleri göstermesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.050$). Kontrollere göre anlatım düzeyi kat değişimleri ve p değerleri; (KAH 1,39 kat, $p=0,161$), (DM 1,79 kat, $p=0,091$), (Obezite 1,12 kat, $p=0,631$), (KAH-DM 1,82 kat, $p=0,062$), (KAH-Obez 1,35kat, $p=0,832$). B) ROC eğrisi analizi miR-155-5p anlatım düzeyinin gruplarda hasta ve kontrol arasındaki ayrımını göstermektedir. ROC eğri analizlerine ait AUC, %95 güven aralığı ve standart hata değerleri alt tabloda gösterilmiştir.

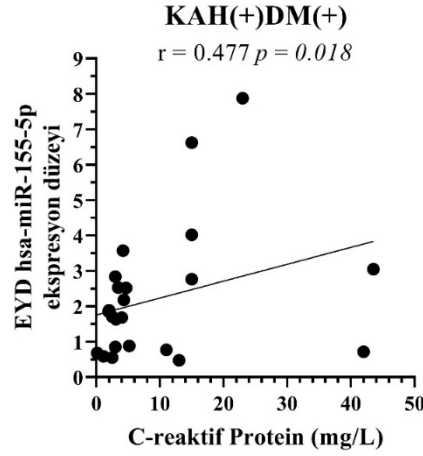
VYD örneklerinde miR-155-5p anlatım düzeylerinin gruplar arasındaki değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.050$) (Şekil 4-13). KAH grubunda kontrol grubuna göre 0,89 kat azalma gözlemlenmiştir ($p = 0,854$). DM ve KAH-DM gruplarında kontrol gruplarına göre sırasıyla 0,95 katlık azalma ve 1,05 katlık artış belirlenmiştir (DM $p = 0,791$; KAH-DM $p = 0,857$). MiR-155-5p ekspresyon seviyeleri obez ve KAH'lı obez gruplarında, ilgili kontrol gruplarına göre 0,95 ve 0,69 kat azalma göstermiştir ($p > 0.050$) (Şekil 4-13).



Şekil 4-13. KAH ve alt gruplarında VYD miR-155-5p anlatım seviyeleri.

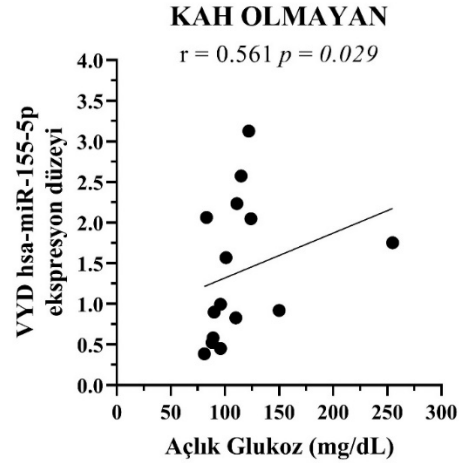
(A) KAH ve alt gruplarında miR-155-5p anlatım düzeyleri grafikte gösterilmiştir. Tüm gruplarda kontrollere göre miR-155-5p'nin anlatım seviyeleri farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.050$). Kontrollere göre anlatım düzeyi kat değişimleri ve p değerleri; (KAH 0,89 kat azalma $p = 0,854$), (DM 0,95 kat azalma $p = 0,791$), (Obezite 0,95 kat azalma $p > 0,050$), (KAH-DM 1,05 kat artış $p = 0,857$), (KAH-Obez 0,69 kat azalma $p > 0,050$).

EYD ve VYD örneklerinde miR-155-5p anlatım düzeylerinin, biyokimyasal ve klinik parametreler ile korelasyonları belirlenen tüm gruplarda değerlendirilmiştir. KAH-DM grubunda EYD miR-155-5p anlatım düzeylerinin CRP ile orta derecede pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir ($r = 0,477$, $p = 0,018$, Şekil 4-14). Ek olarak, KAH ve kontrol grubunun VYD örneklerinde korelasyon analizi yapıldığında miR-155-5p anlatım düzeyinin kontrol grubunda açlık glukoz düzeyi ile orta derecede pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur ($r = 0,561$, $p = 0,029$, Şekil 4-15).



Şekil 4-14. EYD miR-155-5p anlatım düzeyinin KAH-DM grubunda CRP düzeyleri ile korelasyonu.

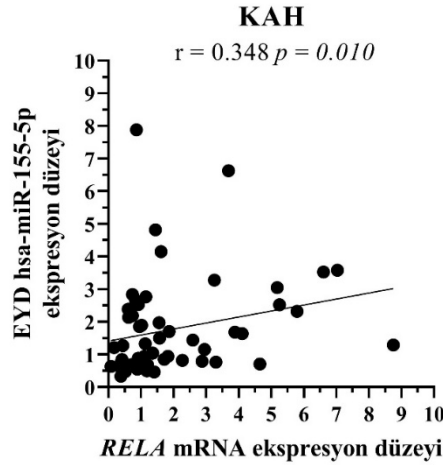
MiR-155-5p ekspresyon düzeyi KAH(+)DM(+) grubunda CRP ile orta derece korelasyon göstermiştir ($r = 0,477$, $p = 0,018$).



Şekil 4-15. VYD miR-155-5p anlatım düzeylerinin KAH grubunda açlık glukoz seviyeleri ile korelasyonu.

KAH Olmayan grupta miR-155-5p ekspresyon düzeyi açlık glukoz ile orta derece pozitif korelasyon göstermiştir ($r = 0,561$, $p = 0,029$).

MiR-155-5p anlatım düzeyinin, çalışmada EYD örneklerinde incelenmiş genlerin mRNA anlatım düzeyleri ile korelasyonları tüm gruplarda değerlendirilmiş; miR-155-5p anlatım düzeyi KAH(-)KAH(+) grubunda KAH'lı bireylerde *RELA* anlatım düzeyi ile zayıf derecede pozitif korelasyon göstermiştir ($r = 0,348$ $p=0,010$ Şekil 4-16)



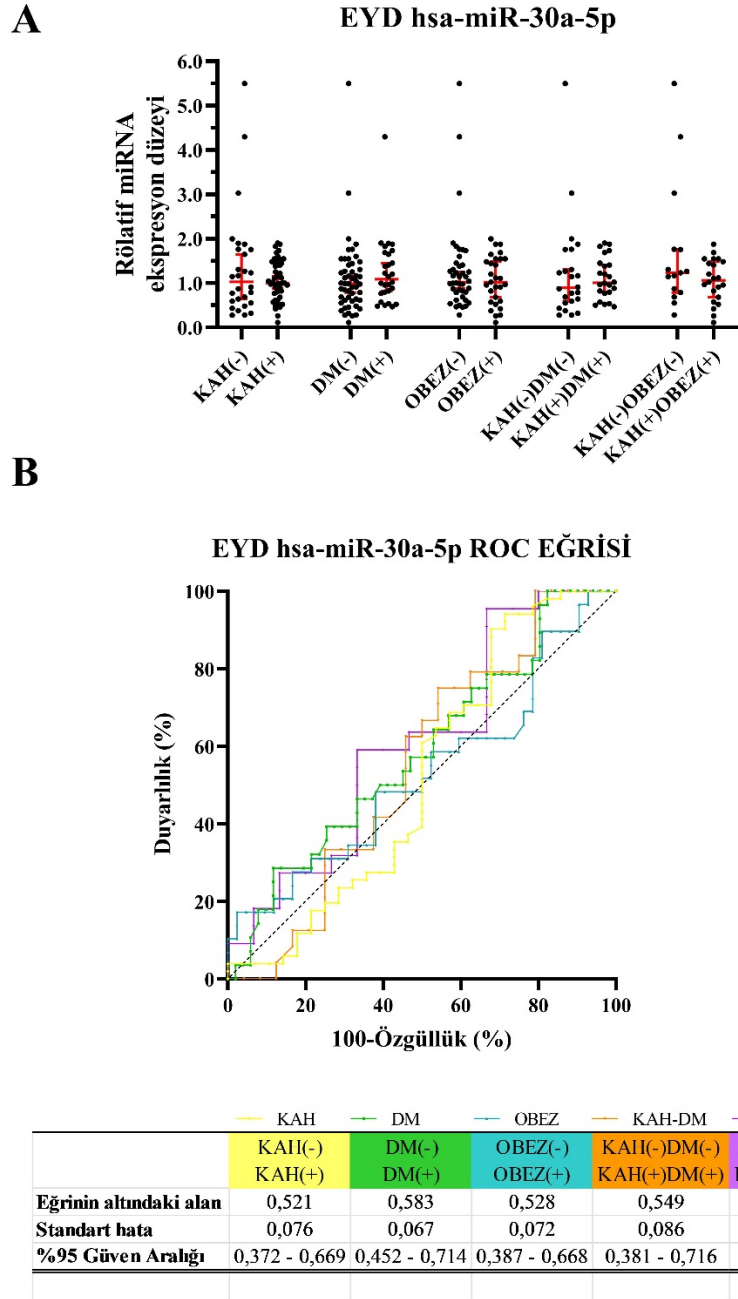
Şekil 4-16. MiR-155-5p anlatım düzeyinin KAH grubunda EYD *RELA* anlatım düzeyi ile korelasyonu.

MiR-155-5p anlatım düzeyi KAH'lı bireylerde EYD *RELA* anlatım düzeyi ile zayıf derecede pozitif korelasyon göstermiştir ($r = 0,348$ $p = 0,010$)

4.3.2. MiR-30a-5p Anlatım Düzeyinin Değerlendirilmesi

EYD örneklerinde analiz edilen miR-30a-5p anlatım düzeylerinde incelenen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.050$) (Şekil 4-10). KAH ve kontrol grubu kıyaslandığında, KAH grubunda miR-30a-5p anlatım düzeyi kontrol grubuna göre 0,97 kat düşüş göstermiştir, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,762$). Buna karşın, DM ve KAH-DM grubunda sırası ile 1,10 ve 1,12 katlık ekspresyon artışı gözlenmiştir (DM, $p = 0,225$, KAH-DM, $p = 0,564$). Obez KAH'lı bireylerde ise miR-30a-5p anlatım düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olmayan 0,86 katlık azalma göstermiştir (KAH-Obezite, $p = 0,265$). Ayrıca, obez ve obez olmayan gruplar karşılaştırıldığında miR-30a-5p düzeylerinin iki grupta benzer olduğu bulunmuştur ($p = 0,695$) (Şekil 4-17).

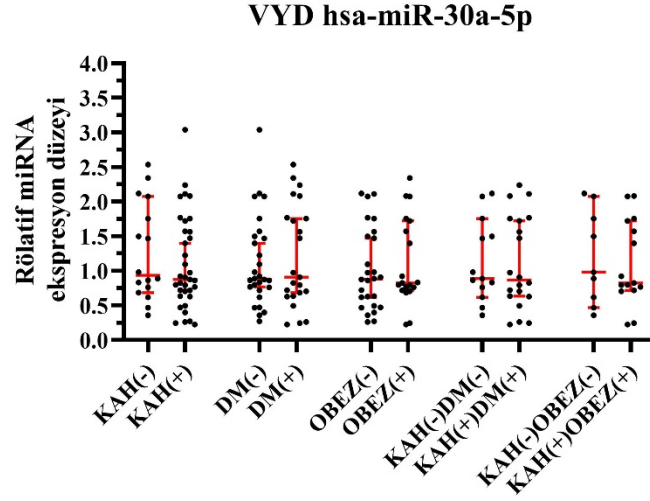
EYD miR-30a-5p anlatım düzeylerinin tüm grupların hasta ve kontrollerinde ayırım gücü ROC eğrisi analizinde incelenmiş; miR-30a-5p grupların hasta ve kontrollerinde tanısal duyarlılık ve özgüllük göstermemiştir (Şekil 4-17).



Şekil 4-17. KAH, kontrol ve alt gruplarda EYD miR-30a-5p anlatım düzeyleri.

MiR-155-5p anlatım düzeyleri KAH ve alt gruplarda gösterilmiştir. Tüm alt gruplar ilgili kontrolleri ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı miR-30a-5p ifadesi gözlenmemiştir ($p > 0.050$) Kontrollere göre anlatım düzeyi kat değişimleri ve p değerleri; (KAH; 0,97 kat düşüş, $p = 0,762$), (DM; 1,10 katlık artış, $p = 0,225$) (KAH-DM; 1,12 katlık artış, $p = 0,564$) (Obezite; benzer anlatım düzeyi $p = 0,695$), (KAH-Obez; 0,86 katlık azalma, $p = 0,265$). B) ROC eğrisi analizi miR-30a-5p anlatım düzeyinin tüm gruplarda hasta ve kontrol arasındaki ayrımını göstermektedir. ROC eğri analizlerine ait AUC, %95 güven aralığı ve standart hata değerleri alt tabloda gösterilmiştir.

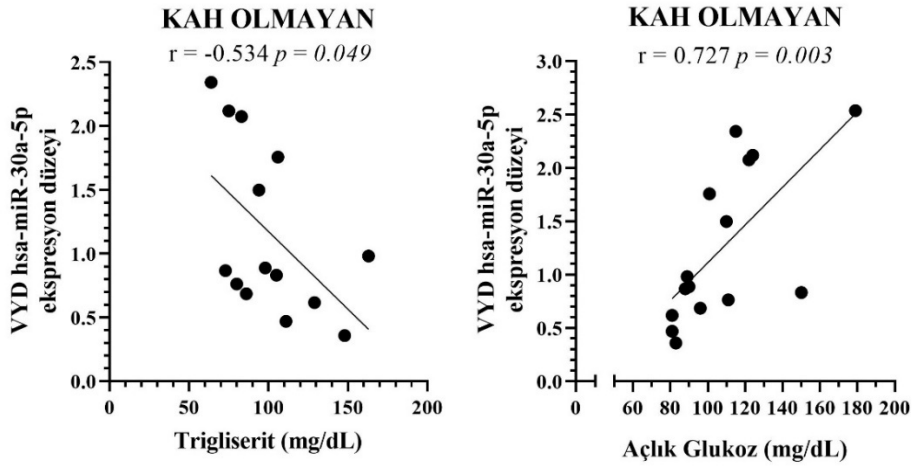
MiR-30a-5p ifade düzeyi değişimleri VYD örneklerinde incelenen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.050$) (Şekil 4-18).



Şekil 4-18. KAH, kontrol ve alt gruplarda VYD miR-30-5p anlatım düzeyleri

VYD örneklerinde miR-155-5p anlatım düzeyleri KAH ve alt gruplarda gösterilmiştir. Tüm alt gruplar ilgili kontrolleri ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı miR-30a-5p ifadesi gözlenmemiştir ($p > 0.050$). Kontrollere göre anlatım düzeyi kat değişimleri; (KAH 0,93 katlık azalma; DM 0,91 katlık artma; KAH-DM 0,96 katlık azalma; Obezite 0,94 katlık artma; KAH-Obez 0,84 katlık artma, $p > 0,050$).

MiR-30a-5p'nın ekspresyon düzeyinin çalışma grubunun biyokimyasal ve klinik özellikleri ile korelasyonu her iki dokuda da incelenmiş olup; VYD'de KAH(+)/KAH(-) grubunda KAH olmayan bireylerde miR-30a-5p anlatım düzeyinin trigliserit ile orta düzey negatif korelasyon ($r = -0,534$, $p = 0,049$) ve açlık glukoz düzeyi ile pozitif güçlü korelasyon ($r = 0,727$, $p = 0,003$) gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4-19). EYD örneklerinde miR-30a-5p anlatım düzeyi ile bireylerin biyokimyasal ve klinik özellikleri arasında korelasyon bulunmamıştır ($p > 0,050$).



Şekil 4-19. VYD miR-30a-5p anlatım düzeyi ve biyokimyasal parametrelerin korelasyonu.

VYD’de mir-30a-5p ekspresyon düzeyi KAH olmayan bireylerde trigliserit ($r = -0,534$, $p = 0,049$) ve açlık glukoz ($r=0,727$, $p = 0,003$) parametreleri ile korelasyon göstermiştir.

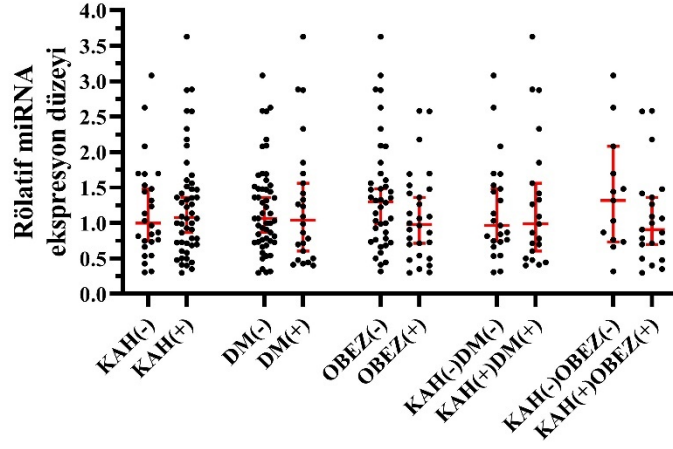
4.3.3. MiR-326 Anlatım Düzeyinin Değerlendirilmesi

EYD örneklerinde incelenen tüm alt gruplarda miR-326’nın anlatım düzeylerinde hasta ve kontrolleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,050$) (Şekil 4-20). Kontrol grubuna göre KAH’lı bireylerde miR-326 anlatım düzeyi 0,87 kat düşüş göstermiştir, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,801$). DM’li bireylerde DM grubunun kontrol bireylerine göre anlatım düzeyinin 1,02 katlık artışı gözlemlenmiştir ($p = 0,742$). KH-DM grubunda, diyabeti olan KAH’lı bireylerde 0,98 katlık anlatım düzeyi düşüşü istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p = 0,916$). Obez ve obez KAH’lı bireylerde ise miR-326 anlatım düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olmayan 0,75 ve 0,68 katlık düşüş göstermiştir (Obezite, $p = 0,111$, KAH-Obezite, $p = 0,208$).

ROC eğrisi analizinde EYD miR-326 anlatım düzeylerinin tüm grupların hasta ve kontrollerinde ayırım gücü incelenmiş; miR-326’nın grupların hasta ve kontrolleri arasında tanısal duyarlılığı ve özgüllüğü gözlemlenmemiştir (Şekil 4-20).

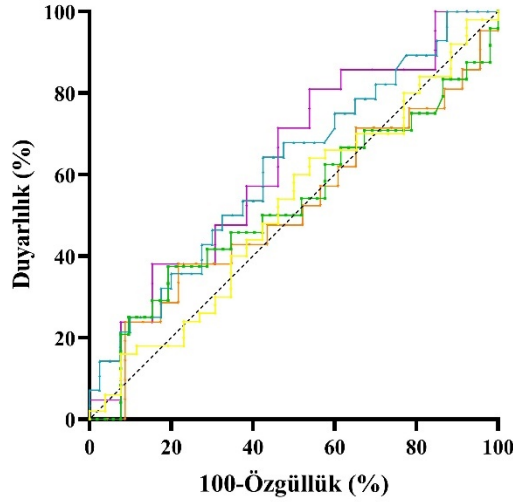
A

EYD-hsa-miR-326



B

EYD-hsa-miR-326 ROC EĞRİSİ

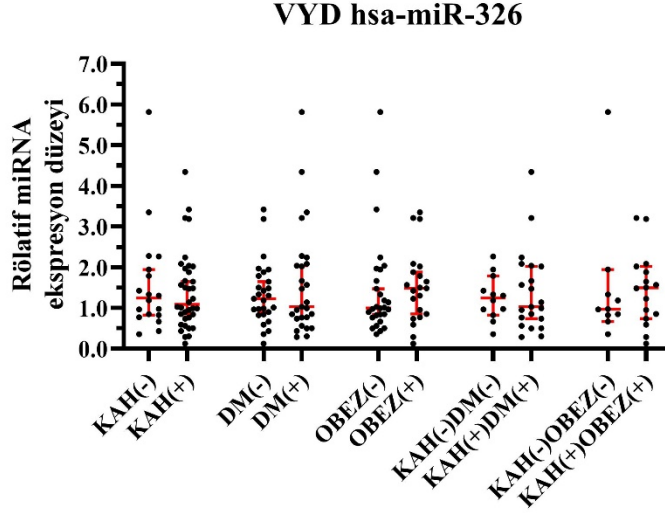


	KAH	DM	OBEZ	KAH-DM	KAH-OBEZ
	KAH(-) KAH(+)	DM(-) DM(+)	OBEZ(-) OBEZ(+)	KAH(-)DM(-) KAH(+DM(+)	KAH(-)OBEZ(-) KAH(+OBEZ(+)
Eğrinin altındaki alan	0,518	0,524	0,614	0,509	0,630
Standart hata	0,071	0,077	0,069	0,090	0,101
%95 Güven Aralığı	0,380 - 0,656	0,373 - 0,674	0,478 - 0,750	0,333 - 0,685	0,433 - 0,828

Şekil 4-20. KAH, kontrol ve alt gruplarda EYD miR-326 anlatım düzeyleri.

A) MiR-326 anlatım düzeyleri KAH ve alt gruplarında gösterilmiştir. Tüm alt gruplar ilgili kontrolleri ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı miR-326 ifadesi gözlenmemiştir ($p > 0.050$) Kontrollere göre anlatım düzeyi kat değişimleri ve p değerleri; (KAH 0,87; DM 0,98; Obezite 0,75; KAH-DM 1,02; KAH-Obez 0,75; $p > 0.05$). B) ROC eğrisi analizi miR-326 anlatım düzeyinin gruplarda hasta ve kontrol arasındaki ayırımını göstermektedir. ROC eğri analizlerine ait AUC, %95 güven aralığı ve standart hata değerleri alt tabloda gösterilmiştir.

MiR-326 ekspresyon düzeyleri tüm gruplarda VYD örneklerinde incelenmiş olup, hasta ve kontrollerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.050$) (Şekil 4-21).



Şekil 4-21. KAH, kontrol ve alt gruplarda VYD miR-326 anlatım düzeyi.

VYD örneklerinde MiR-326 anlatım düzeyleri KAH ve alt gruplarda gösterilmiştir. Tüm alt gruplar ilgili kontrolleri ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı miR-326 ifadesi gözlenmemiştir ($p > 0.050$). Kontrollere göre anlatım düzeyi kat değişimleri ve p değerleri; (KAH 0,87 katlık azalma; DM 0,84 katlık azalma; KAH-DM 0,83 katlık azalma; Obez 1,48 katlık artış; KAH-Obez 1,53 katlık artış; $p > 0,050$)

EYD ve VYD örneklerinde MiR-326 ekspresyon düzeylerinin biyokimyasal parametreler ile korelasyonu incelendiğinde, çalışılan gruplarda klinik anlam ifade eden düzeyde bir korelasyon bulunmamıştır ($p > 0,050$).

4.3.4. MiR-1247-5p Anlatım Düzeyinin Değerlendirilmesi

MiR-1247-5p ekspresyon düzeyleri obezite ve KAH ile obezitenin birlikte incelendiği gruplarda; obez ve obez KAH'lı bireylerde sırasıyla 0,74 ve 0,69 kat azalmıştır. Bu iki grupta ilgili kontrol grubuna göre miR-1247-5p'nin anlatım düzeyinin azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Obesite, $p = 0,040$, KAH-Obesite, $p = 0,021$) (Şekil 4-22).

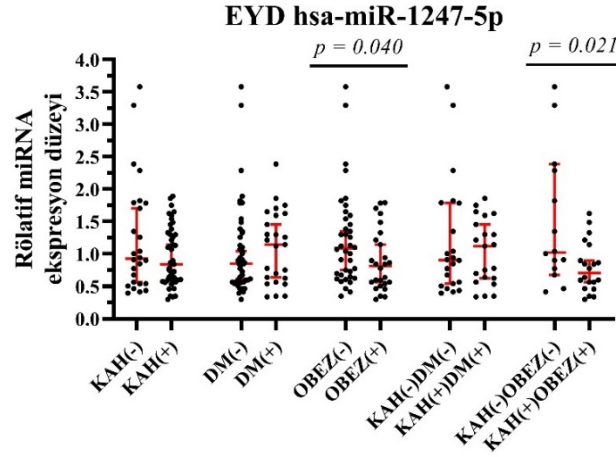
EYD örneklerinde miR-1247-5p anlatım düzeyleri, DM ve KAH-DM gruplarında ilgili kontrol gruplarına göre sırası ile 1,35 ve 1,24 kat artış göstermiştir (DM $p=0,414$,

KAH-DM $p=0,884$). Buna karşın, KAH grubunda miR-1247-5p anlatım düzeyleri 1,23 kat azalmıştır ($p=0,832$). MiR-1247-5p ekspresyon düzeyinin KAH(+)/KAH(-), DM(+)/DM(-) ve KAH-DM(-)/KAH-DM(+) gruplarındaki hasta ve kontrol arasındaki değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4-22).

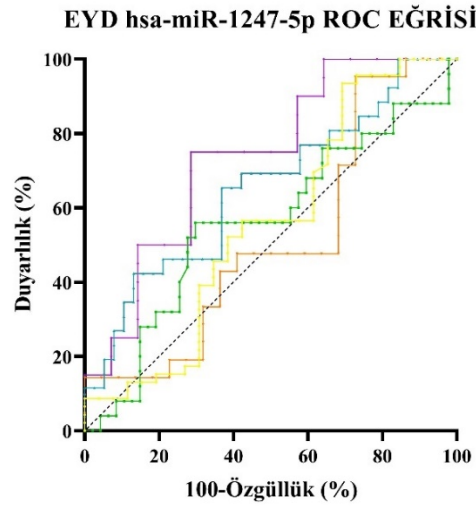
MiR-1247-5p'nin tüm gruplarda hasta ve kontrol arasındaki ayırt edilebilirlik gücü ROC eğrisinde incelenmiştir. MiR-1247-5p anlatım düzeylerinin obez ve obez KAH'lı bireyleri ilgili kontrol bireylerden ayırımında şekil 4-22'de gösterilen AUC, duyarlılık ve özgüllük ile tanısal duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu gözlemlenmiştir (Eşik değer = Obes (0,89); KAH-Obes (0,89) (Şekil 4-22).



A



B

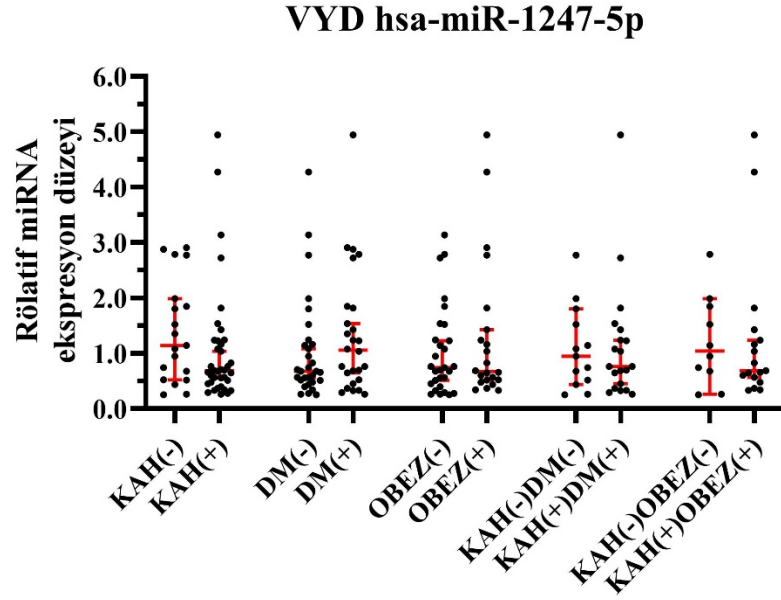


	KAH	DM	OBEZ	KAH-DM	KAH-OBEZ
	KAH(-) KAH(+)	DM(-) DM(+)	OBEZ(-) OBEZ(+)	KAH(-)DM(-) KAH(+DM(+)	KAH(-)OBEZ(-) KAH(+OBEZ(+)
Eğrinin altındaki alan	0,557	0,559	0,652	0,513	0,736
Standart hata	0,076	0,074	0,071	0,091	0,090
%95 Güven Aralığı	0,409 - 0,705	0,414 - 0,703	0,513 - 0,790	0,334 - 0,692	0,560 - 0,911
Duyarlılık ve Özgüllük (%)	—	—	65,4 - 63,2	—	75,0 - 71,4

Şekil 4-22. KAH, kontrol ve alt gruplarda EYD miR-1247-5p anlatım düzeyi.

A)KAH ve alt gruplarda miR-1247 anlatım seviyeleri şekilde gösterilmiştir. Obez ve obez KAH'lı bireylerde sırası ile 0,74 ve 0,69 kat düşüş gösteren miR-1247-5p ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Obezite, $p=0,040$), (KAH-Obezite, $p=0,021$). İncelenen diğer grupların hasta ve ilgili kontrolleri arasında anlatım düzey farkı istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.050$). B) ROC analizinde miR-1247-5p anlatım düzeylerinin AUC değeri ile hasta kontrol arasındaki test duyarlılığı belirtilmektedir. ROC eğri analizlerine ait AUC, %95 güven aralığı, standart hata, duyarlılık yüzdesi ve özgüllük yüzdesi değerleri alt tabloda gösterilmiştir (Eşik değer = Obez (0,89); KAH-Obez (0,89)).

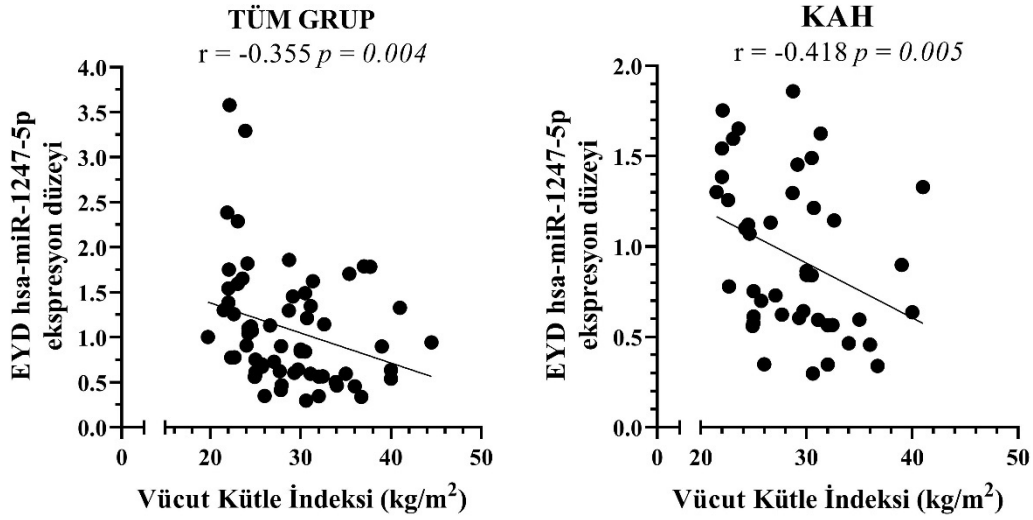
VYD örneklerinde miR-1247-5p anlatım düzeyleri tüm gruplardaki hasta ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,050$) (Şekil 4-23).



Şekil 4-23. KAH, kontrol ve alt gruplarda VYD miR-1247-5p anlatım düzeyi.

miR-1247-5p anlatım düzeyleri grafikte gösterilmiştir. Tüm gruplarda miR-1247-5p seviyeleri kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.050$). Kontrollere göre anlatım düzeyi kat değişimleri ve p değerleri; (KAH 0,87 katlık azalma; DM 0,84 katlık artış; KAH-DM 0,83 katlık azalma; Obez 0,90 katlık azalma; KAH-Obez 0,66 katlık azalma; $p > 0,050$).

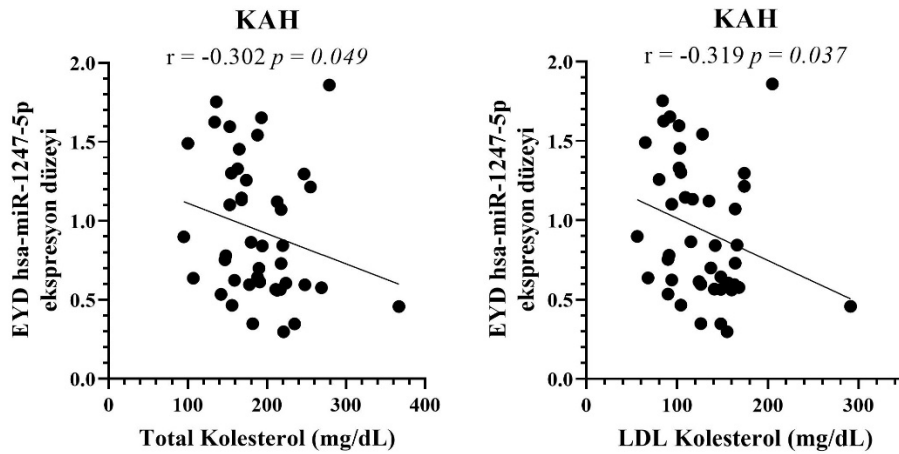
EYD miR-1247-5p ekspresyon düzeyinin biyokimyasal parametreler ile korelasyonları belirlenen tüm gruplarda değerlendirilmiştir. EYD miR-1247-5p ekspresyon düzeyi, tüm çalışma grubunda ve KAH grubunda VKİ ile negatif korelasyon göstermiştir. MiR-1247-5p anlatım düzeyi ve VKİ tüm grupta zayıf derecede negatif korele ($r = -0,355$, $p = 0,004$), KAH'lı bireylerde orta derece negatif korele ($r = -0,418$, $p = 0,021$) bulunmuştur (Şekil 4-24).



Şekil 4-24. EYD miR-1247-5p anlatım düzeyi ve VKİ korelasyonu.

miR-1247-5p anlatım düzeyi VKİ ile tüm grupta ($r = -0,355$, $p=0,004$) ve KAH'lı bireylerde ($r = -0,418$, $p=0,021$) negatif korelasyon göstermiştir.

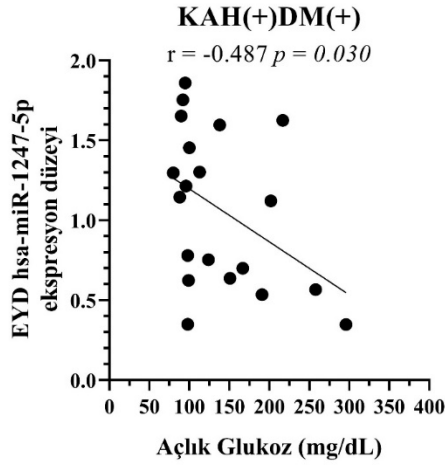
EYD miR-1247-5p anlatım düzeyleri KAH grubunda total kolesterol ($r = -0,302$, $p = 0,049$) ve LDL kolesterol ($r = -0,319$, $p = 0,037$) ile zayıf negatif korelasyon göstermiştir (Şekil 4-25).



Şekil 4-25. EYD miR-1247-5p anlatım düzeylerinin total kolesterol ve LDL kolesterol ile ilişkisi.

KAH'lı bireylerde miR-1247-5p ekspresyon düzeyleri total kolesterol ($r = -0,302$, $p = 0,049$) ve LDL kolesterol ($r = -0,319$, $p = 0,037$) ile negatif korelasyon göstermiştir.

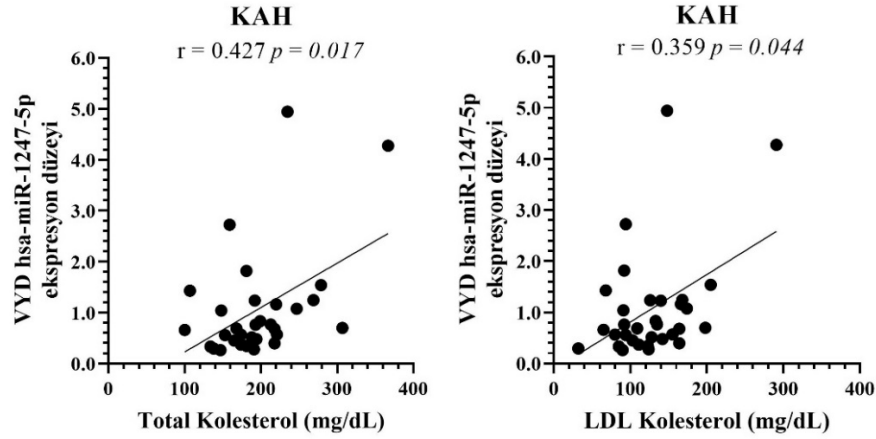
EYD miR-1247-5p anlatım düzeyleri diyabetik KAH grubunda açlık glukoz düzeyi ile orta derece negatif korelasyon göstermiştir ($r = -0,487$, $p = 0,030$) (Şekil 4-26).



Şekil 4-26. EYD miR-1247-5p anlatımının açlık glukoz düzeyi ile ilişkisi.

MiR-1247-5p anlatım düzeyi diyabetik KAH grubunda açlık glukoz düzeyi ile orta derece ($r = -0,487$, $p = 0,030$) negatif korelasyon göstermiştir.

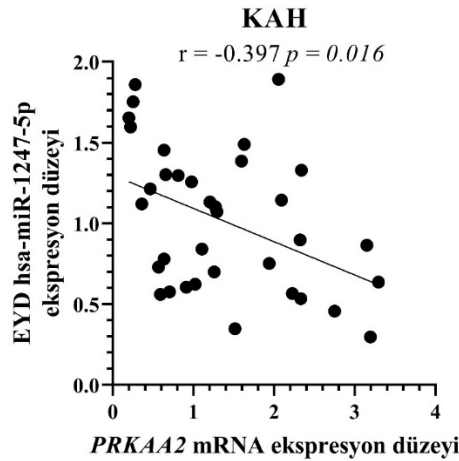
VYD miR-1247-5p ekspresyon düzeyleri ve biyokimyasal parametrelerin ilişkisi incelendiğinde ise, KAH grubunda miR-1247-5p ekspresyonunun total kolesterol ile orta düzeyde korelasyon ($r = 0,427$; $p = 0,017$) ve LDL kolesterol ile zayıf düzeyde korelasyon ($r = 0,359$; $p = 0,044$) gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4-27).



Şekil 4-27. VYD miR-1247-5p anlatım düzeyinin kolesterol düzeyleri ile ilişkisi.

MiR-1247-5p düzeyleri KAH'lı bireylerde total kolesterol ile orta derece pozitif korelasyon göstermiştir ($r = 0,427$; $p = 0,017$). KAH'lı bireylerde miR-1247-5p anlatım düzeyleri LDL ile zayıf derece korelasyon göstermiştir ($r = 0,359$; $p = 0,044$).

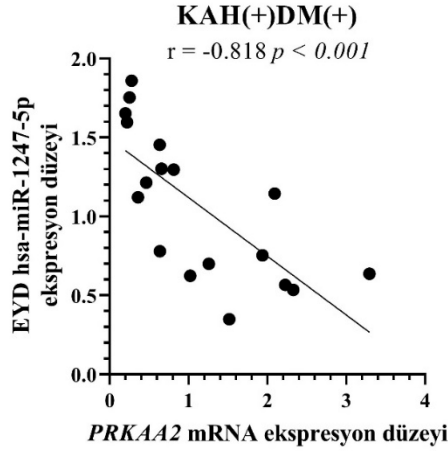
MiR-1247-5p anlatım düzeyinin, çalışmada EYD örneklerinde incelenmiş genlerin mRNA anlatım düzeyleri ile korelasyonları tüm gruplarda değerlendirilmiş; KAH ve kontrollerin incelendiği grupta miR-1247-5p anlatım düzeyi, Şekil 4-28'de gösterildiği gibi KAH'lı bireylerde *PRKAA2* anlatım düzeyi ile zayıf derecede negatif korelasyon göstermiştir ($r = -0,397$, $p=0,0016$).



Şekil 4-28. MiR-1247-5p anlatım düzeyinin KAH grubunda EYD *PRKAA2* anlatım düzeyi ile korelasyonu.

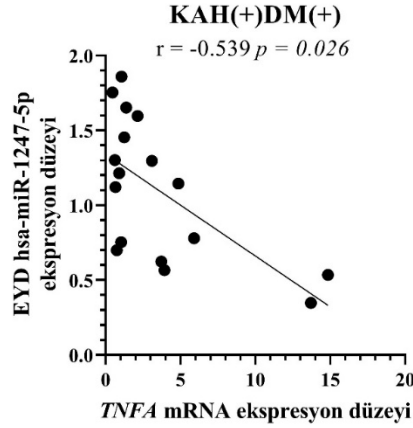
MiR-1247-5p anlatım düzeyi KAH'lı bireylerde EYD *PRKAA2* anlatım düzeyi ile zayıf derecede negatif korelasyon göstermiştir ($r = -0,397$, $p=0,0016$).

MiR-1247-5p anlatım düzeyi KAH ve DM'in birlikte incelendiği (KAH-DM) grupta, diyabetik KAH'lı bireylerin EYD *PRKAA2* anlatım düzeyi ile çok güçlü derecede negatif korelasyon göstermiştir ($r = -0,818$ $p < 0,001$) (Şekil 4-30). Ek olarak bu grupta miR-1247-5p anlatım düzeyi EYD TNFA anlatım düzeyi ile orta derecede negatif korelasyon göstermiştir ($r = -0,539$ $p = 0,003$) (Şekil 4-31)



Şekil 4-29. EYD miR-1247-5p anlatım düzeyinin KAH-DM grubunda EYD *PRKAA2* anlatım düzeyi ile korelasyonu.

MiR-1247-5p anlatım düzeyi KAH-DM grubunda EYD *PRKAA2* anlatım düzeyi ile çok güçlü derecede negatif korelasyon göstermiştir ($r = -0,818$ $p < 0,001$).



Şekil 4-30. EYD miR-1247-5p anlatım düzeyinin KAH-DM grubunda EYD TNFA anlatım düzeyi ile korelasyonu.

KAH-DM grubunda miR-1247-5p anlatım düzeyleri EYD *TNFA* anlatım düzeyi ile orta derecede negatif korelasyon göstermiştir ($r = -0,539$ $p = 0,026$).

5. TARTIŞMA

KAH, aterosklerotik plak oluşumunun sonucunda koroner arterlerin morfolojisini ve fizyolojisini olumsuz anlamda değiştiren KVH grubu hastalığıdır. KAH'ın nedeni olan ateroskleroz, yaşamın ilk yıllarında oluşmaktadır ve ortalama kırklı yaşlara kadar semptom göstermeksizin veya subklinik belirtiler ile kronik şekilde ilerlemektedir. Aterosklerozun ilerlemiş lezyonları sonucunda KAH'ın klinik belirtiler verdiği dönemde, farmakolojik tedavilerin etkisi olmamakta, ancak anjiyo ve By-pass gibi cerrahi müdahaleler ile ileri derece daralmalar tedavi edilebilmektedir. Toplum sağlığını etkileyen bu hastalığın günümüzde farmakolojik tedavisi, plak ve pıhtı oluşumunu önlemek amaçlı uygulanmaktadır. KAH patogenezi ile ilgili yapılan çalışmalarda KAH'ın oluşum süreci ve KAH risk faktörleri ilişkili farklı moleküler mekanizmalar açıklanmıştır. Ateroskleroz patogenezinde majör veya minör etkisi olan bu moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve bu moleküler olayların önlenmesi KAH prognozunun kontrolü açısından büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmanın tasarımı, KAH patogeneziye katkısı olan moleküler mekanizmaların yanında moleküler süreçlerle fonksiyonu değişen organeller göz önünde bulundurulmuştur. Yaşamın ilerlemesinde edinilen çevresel risk faktörleri oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres koşulunda antioksidanlara karşı düzeyleri artan ve çeşitli nedenlerden dolayı seviyeleri kontrol edilemeyen ROT, aterosklerozun oluşumunda etkin rol almaktadır. ROT hasarı ile DNA, protein, lipid gibi makromoleküllerin ve mitokondrinin işlevsel bozuklukları oluşmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak, ateroskleroz patogenezinde rolü olan mitokondrinin bozulmuş biyoregülasyonu ve inflamasyon ile ilişkili gen ve ilişkili miRNA'ların değişen anlatım düzeyleri bu çalışmanın temel konusu olmuştur.

Çalışmanın hipotezinde belirlenmiş *PRKAA2*, *PPARGC1A*, *SIRT1*, *RELA* ve *TNFA* aday genlerinin, çalışmada kullanılan KAH hasta ve kontrol grubunun EYD örneklerinde anlatım düzeyleri farkı incelenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, KAH ve KAH risk faktörlerinden obezite ve diyabet koşulları ile kombine edilmiş beş grupta değerlendirilmiştir. KAH'lı ve kontrol olarak belirlenen bireylerde aday genlerden yalnızca *TNFA* anlatım düzeyi KAH'lı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı derece yüksek bulunmuştur. Çalışmaya katılan katılımcılar yalnızca diyabet hastalığına

göre değerlendirildiğinde, diyabeti olan kişilerin *PRKAA2*, *PPARGC1A* ve *SIRT1* mRNA anlatım düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Diyabet hastalığı, KAH ile birlikte değerlendirilmiş; diyabeti olan KAH'lı bireylerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösteren *PPARGC1A* ve *SIRT1* ve artış gösteren *TNFA* ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir. Katılımcılar yalnızca obezite durumuna göre değerlendirildiğinde; obezite koşulunda *PRKAA2* ekspresyon düzeylerinin artması ve *PPARGC1A* ekspresyon düzeylerinin azalması anlamlı bulunmuştur. KAH grubuna obezite koşulu eklendiğinde, obezite sorunu olan KAH'lı bireylerde, ilgili kontrol grubuna göre *PPARGC1A* anlatım düzeyleri azalma göstermiştir. Bu grupta ayrıca kontrol grubundan yüksek seviyede *TNFA* ekspresyon düzeyi gözlemlenmiştir.

Çalışmada araştırılan miR-155-5p, miR-30a-5p, miR-326 ve miR-1247-5p aday miRNA'larının anlatım düzeyleri, katılımcıların EYD ve VYD örneklerinde hasta ve kontrol grubu ile birlikte diyabet ve obezitenin de dahil edildiği beş farklı grupta incelenmiştir. EYD'de miR-1247-5p, obezitenin incelendiği grupta obez olan bireylerde ve KAH ile obezitenin birlikte incelendiği grupta obez KAH'lı bireylerde azalmıştır. MiR-1247-5p'nin EYD'de obez ve obez KAH'lı bireylerde azalmış anlatım düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. miR-155-5p, miR-30a-5p ve miR-326, EYD ve VYD örneklerinde incelenen tüm gruplarda hasta ve ilgili kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir.

Bu çalışmada genlerin ve miRNA'ların anlatım düzeylerinin incelendiği EYD, kalp ve koroner arterlerin etrafında mekanik, metabolik, termojenik ve endokrin/parakrin fonksiyonlara sahip özel bir yağ dokusudur. Bej adipositlerde mitokondri içeriğinin fazla olması ve termogenezin uyarılması karakteristik özelliktir. Yapılan bir çalışma KAH, obezite ve diyabette EYD'nin kalınlığının artması ve proinflamatuvar etken olmasında, EYD'de ROT üretiminin rolü olduğunu göstermiştir (202). KAH patogenezinde EYD'de mitokondriyal kompleks enzimlerinin mRNA düzeylerinin, sağlıklı bireylere göre daha düşük ekspresyon düzeyi göstermesi, patolojik koşullarda EYD'de mitokondriyal disfonksiyonun arttığını kanıtlar niteliktedir (203).

AMPK, MB regülasyonu, kardiyovasküler sistemde kalp dokusunda ATP mevcudiyetinin artması, endotel hücrelerin merkezi sinyal enzimi eNOS'u fosforilleyerek aktive etme, vazodilatasyonu sağlama ve ROT oluşumunu engelleme

işlevleri ile kardiyovasküler sağlıkta koruyucu rolü olan bir protein kinazdır. AMPK ayrıca KAH ile ilişkili metabolik hastalıklardan dislipidemi, obezite ve diyabetin oluşumunu önleyici etkilere sahiptir (204, 205). Oksidatif stres ve KAH patogenezinde koruyucu etkileri olan AMPK ile ilgili çalışmalar genellikle AMPK aktivatörleri aracılığıyla AMPK'nın aktivasyonunun artırılması sağlanarak yapılmış çalışmalardır (206-209). KAH patogenezinde AMPK heterotrimerik yapısını oluşturan alt birimlerini kodlayan genlerin anlatım düzeylerini dolaşımda ve in vitro koşullarda inceleyen çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda diyabet ile KAH patogenezinde AMPK gen anlatım düzeylerinin düşük olduğu; ateroskleroza karşı koruyucu olduğu düşünülen betanin ve krosin gibi fitokimyasalların AMPK gen anlatım düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (210-213). Epikardiyal dokuda AMPK ile ilgili tek çalışma mevcuttur; bu çalışmada obezite patogenezinde rolü olan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) mutant farelerin EYD'lerinde inflamasyonun arttığı ve AMPK fosforilasyonunun (aktivasyonunun) azaldığı tespit edilmiştir (214). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda EYD'de AMPK gen anlatım düzeylerinin ilişkilendirildiği çalışma henüz yapılmamış olup, bu çalışma EYD'de AMPK gen anlatım düzeyinin ilk incelendiği çalışma niteliğinde olmuştur. Bu çalışmada MB'yi regüle eden AMPK'nın $\alpha 2$ alt birimini kodlayan *PRKAA2* anlatım düzeylerinin, incelenen ve bu bölümde örnekleri gösterilen çalışmalara paralel olarak; KAH'lı bireylerin EYD örneklerinde kontrol grubuna göre daha düşük seviyelerde olabileceği öngörülmüştür. Ancak bu çalışmada KAH ve kontrol bireylerinin EYD örneklerinde yapılan değerlendirmede; AMPK'nın KAH'lı bireylerin dokusunda ekspresyon seviyelerinin azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışma alt grubundan biri olan KAH'tan bağımsız olarak incelenen DM'li bireylerin EYD örneklerinde, ilgili kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük *PRKAA2* anlatım düzeyi tespit edilmiştir. AMPK seviyelerinin diyabette incelendiği çalışmalarda diyabet hastalarında AMPK aktivasyonunun azaldığı gösterilmektedir (215, 216). Çalışmada diyabet grubunda EYD dokusunda AMPK gen anlatım düzeyinin azalması, diyabet hastalarında AMPK aktivasyonunun azalması ile uyumlu olmaktadır. Ancak EYD'de diyabet koşulunda *PRKAA2* gen anlatım düzeyi ile ilgili bu sonucun validasyonunun ele alınacağı ilgili bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Obezite patogenezinde AMPK aktivasyonu ile ilgili çalışmalar mevcut olmasına karşın, *PRKAA2* gen anlatım düzeyinin incelendiği çalışma bulunmamaktadır. İlk kez bu tez çalışmasında araştırılan, çalışma gruplarından yalnızca

obezitenin incelendiği grupta, obez bireylerde EYD *PRKAA2* düzeylerinin obez olmayanlara göre artmış seviyeleri ilk kez bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Çalışmada KAH ve kontrollerin incelendiği grupta KAH'lı bireylerde *PRKAA2* gen anlatım düzeyinin, VKİ ile zayıf derecede pozitif korelasyon göstermesi, obezitede AMPK gen anlatım düzeylerinin obez olmayan bireylere göre artması sonucunu desteklemektedir.

PGC-1 α , hücrel enerji metabolizması regülasyonunda, adaptif termogeneizde, mitokondriyal biyogeneizde, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında etkin rolü olan bir transkripsiyon koaktivatörüdür. PGC-1 α 'nın çeşitli dokularda azalmış anlatım düzeyleri inflamasyon, KAH, diyabet ve obezite ile ilişkili bulunmaktadır (217-220). Kardiyak fonksiyonun korunmasında mitokondriyal dinamiğin bir parçası olan MB'nin kalp kasında belirli bir potansiyelde olmasının önemli olduğu bilinmektedir. MB'nin düzenleyicileri olan AMPK ve PGC-1 α düzeyleri birbirine bağlı olmakta; oksidatif stres koşulunda mitokondriyal disfonksiyon ile regülasyonu bozulan oksidatif fosforilasyon sonucunda aktivasyonu azalan AMPK, PGC-1 α aktivitesini de azaltmaktadır (221). MB ana düzenleyicisi olan PGC-1 α normal koşullarda EYD'de yüksek ekspresyon seviyeleri göstermektedir (222). Bu çalışmada *PPARGC1A* anlatım düzeyi KAH patogenezinde beklenildiği üzere hastalarda düşük seviyelerde tespit edilmiştir, ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. T2DM ve KAH'ın birlikte incelendiği bir çalışmada, KAH-T2DM hastalarının EYD örneklerinde sağlıklı bireylere göre daha düşük PGC-1 α anlatım düzeyleri gözlemlenmiştir (188). Çalışmada diyabet ve KAH ile diyabetin birlikte incelendiği iki grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunan düşük seviyede PGC-1 α anlatım düzeyi, EYD'de PGC-1 α 'nın DM ve KAH-T2DM hastalarında düşük seviyede gösterildiği çalışmaları desteklemektedir. Bu çalışmada *PPARGC1A* anlatım düzeyinin KAH ve kontrollerin incelendiği grupta, KAH olmayan bireylerde açlık glukoz ile orta derece negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç, PGC-1 α gen anlatım düzeylerinin azalmasının patolojik koşullara öncülük edebileceğini gösterebilmektedir (219, 223). Çalışmada obezite ve obezite ile KAH'ın birlikte incelendiği iki grupta *PPARGC1A* anlatım düzeyinin, ilgili kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçları destekler şekilde, daha önce yapılan bir çalışmada, yüksek yağlı diyet ile beslenen obez farelerin EYD örneklerinde PGC-1 α ekspresyon seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (224). Çalışmamız, insan EYD

örneklerinde obezite ve KAH-obezite patolojilerinde PGC-1 α anlatım düzeylerini gösteren ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

SIRT1, oksidatif stresi ve inflamasyonu negatif yönde regüle eden, aterosklerozda endotelial adezyon moleküllerinin ekspresyonunu önleyerek arterlerde plak gelişimini engelleyen ve eNOS'u aktive eden ateroprotektif bir proteindir (225). Oksidatif stres koşulunda, oksidatif fosforilasyonun hasar görmesi ile aktivasyonu azalan AMPK, SIRT1 aktivitesini de azaltmaktadır. ROT üretiminin EYD'de arttığını rapor eden çalışmalardan çıkarımla EYD'de SIRT1 aktivasyonunun ve gen anlatım düzeyinin azalabileceği öngörülmüştür. Bu öngörüğü doğrular biçimde, aterosklerotik KAH'lı bireylerde *SIRT1*'in ekspresyon düzeylerinin azaldığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (186, 187, 226). Khanahmedi ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada, EYD'de *SIRT1* ekspresyon düzeyinin aterosklerozda azaldığı tespit edilmiştir (227). Bu çalışmada *SIRT1* anlatım düzeyleri beklendiği gibi tüm grupların hasta bireylerinde azalmasına rağmen bu azalma yalnızca diyabet ve KAH ile diyabetin birlikte incelendiği grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diyabet patogenezinde SIRT1 genelde dolaşımda inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, SIRT1'in artan seviyeleri ve *SIRT1* gen anlatım düzeyinin artması ile diyabetin önlenabilirliği konusu öngörülmektedir (228-230). Bizim sonuçlarımız bu yönden bu çalışmaları desteklemekle birlikte ekspresyonu azalan *SIRT1*'in DM ve KAH-DM EYD'lerinde daha önce incelendiği bir çalışma henüz mevcut değildir.

KAH'lı bireylerin EYD'lerinde makrofaj, T lenfosit, mast hücreleri, NF- κ B ve çeşitli sitokinler gibi inflamatuvar medyatörlerin artmış seviyeleri önceki çalışmalarda gösterilmiştir (231, 232). KAH patogenezinde oksidatif stresin incelendiği bir çalışmada epikardiyal ve subkutan yağ dokuları karşılaştırılmış, EYD'de ROT ile ilişkili genlerin yüksek ekspresyon düzeyleri, EYD içerik değişiminde oksidatif stresin rol aldığını göstermiştir (202). Oksidatif stres ile artan ROT, TNF- α seviyelerini arttırarak, TNF- α ile indüklenebilen NF- κ B transkripsiyon faktörünü aktive etmektedir, bundan dolayı oksidatif stres ve inflamasyon artan EYD kalınlığında iyi bilinen bir patolojik özelliktir (231, 233). SIRT1, aterosklerozda NF- κ B yolağında RelA/p65 deasetilasyonu ile anti-inflamatuvar etkilere sahiptir (184, 225). Oksidatif stres koşulunda artan ROT, SIRT1 anlatım düzeyini azaltmaktadır. SIRT1'in azalan düzeyleri sonucunda NF- κ B transkripsiyon faktörünün katalitik alt birimi p65/RelA'nın asetilasyonu ile RelA

seviyeleri artmaktadır. Ele alınan bu bilgiler ile, NF- κ B'yi aktive eden *TNFA* ve *RELA* ekspresyon düzeyinin KAH'lı bireylerin EYD'sinde artması beklenmektedir. Önceki çalışmalar, KAH hastalarında NF- κ B aracılı inflamasyonda EYD'de p65 protein düzeyinin *TNFA* anlatımı ile korele bir şekilde arttığını göstermiştir (234, 235). Çalışmamızda *TNFA* ve *RELA* genlerinin anlatım düzeyleri tüm gruplarda incelenmiştir. *RELA* geninin anlatım düzeyi, incelenen tüm grupların hasta bireylerinde azalmış fakat bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışma *RELA* anlatım düzeyi bakımından önceki çalışmalardan farklı bir sonuç vermiştir. Bu farkın çalışmaya katılan katılımcı sayısı, çalışmaya katılan katılımcıların gruplar oluşturulurken dahil edilme ve dışlanma kriterlerinin her çalışmada farklı olmasından kaynaklı olabileceği tahmin edilmektedir. Ek olarak bu farklılığın biyoinformatik ve analiz yöntemleri gibi metodolojik farklardan kaynaklanmış olduğu düşünülmektedir. *TNFA* anlatım düzeyi, KAH-kontrol, KAH-DM ve KAH-Obezite grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Buna ek olarak KAH ve KAH'la diyabetin birlikte incelendiği iki grubun kontrol bireylerinde *TNFA* anlatım düzeyleri, trigliserit ile orta derecede pozitif korelasyon göstermiştir. Bu korelasyon sonucu, KAH patogenezinde kanda artmış trigliserit düzeylerinin ateroskleroz patogenezinde inflamatuvar yanıtta rol aldığını desteklemektedir. EYD değişiminin obezite ve diyabette değerlendirildiği önceki çalışmalar incelendiğinde; çalışmalarda hasta bireylerin kan örneklerinde *TNFA* anlatım düzeylerinin artması EYD kalınlığının artışı ile korele olarak tespit edilmiştir (236, 237). Ancak bu tez çalışmasında obezite ve diyabetin tek başına incelendiği gruplarda kontrol grubuna göre artmış *TNFA* anlatım düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmamız sonucundan EYD'de *TNFA* anlatım düzeyi değişiminin KAH patogenezinde özgü olduğu sonucu çıkarılabilmektedir. Önceki çalışmalara kıyasla, bu çalışma obezite ve diyabet patolojilerinde EYD'de *TNFA* düzeyinin incelendiği ilk çalışma olmuştur.

Seçtiğimiz aday miRNA'lerden birisi olan miR-155-5p ekspresyon düzeyindeki değişim KAH patogenezinde ateroskleroz etkilerinin çoğuna aracılık etmektedir (238). Adipoz dokuda en bol bulunan bağışıklık hücrelerinden biri olan makrofajlardan salınan miRNA'lar, inflamatuvar ortamı, kolesterol akışını, lipid metabolizmasını düzenleyerek ateroskleroz ilerlemesinde rol almaktadırlar. Aterosklerotik lezyonlarda miR-155-5p'nin artmış ekspresyonu, bozulmuş lipid metabolizması, inflamasyon, köpük hücre oluşumu ve aterom plak gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (238, 239). Ateroskleroz patogenezinde

artan miR-155-5p ROT oluşumunu arttırmakta ve artan ROT dolaylı olarak NF- κ B'yi aktive etmektedir (240). Atriyal fibrilasyonu olan bireylerde incelenen bir çalışmada, hastalık insidansı ile bağımsız ilişkili olarak ilişkili olan artmış EYD kalınlığının dolaşımdaki miR-155-5p ekspresyon düzeyi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (18). KY patolojisi konulu bir çalışmada, KY olan farelerin kalp dokusunda SIRT1, NF- κ B ve miR-155 ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve KY'li grubun kalp dokusunda bastırılmış SIRT1 ile yüksek seviyede NF- κ B ve miR-155 seviyeleri tespit edilmiştir. SIRT1'in bastırılmış seviyeleri NF- κ B'nin asetilasyonunu arttırarak p65(RelA) ifadesinin yükselmesine neden olmaktadır. Ayrıca bu çalışma, NF- κ B p65'in susturulması ile miR-155 seviyelerinin azalması sonucu; NF- κ B p65'in miR-155 geninin promotör bölgesine bağlanarak miR-155'i yukarı regüle ettiğini göstermiştir (241). Bu çalışma, bizim çalışmamızda gösterilen miR-155-5p'nin KAH'lı bireylerde *RELA* mRNA anlatım düzeyi ile gösterdiği pozitif korelasyonu sonucunu desteklemektedir (241). AMPK seviyeleri ve miR-155-5p üzerine yapılan bir çalışmada miR-155-5p, MB düzenleyicilerinden AMPK'yı fosforilasyon ile aktive eden kalsiyum bağlayıcı protein 39 (Cab39)'un lusiferaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (176). MiR-155-5p ile ilgili ele alınan bu çalışmalardan çıkartılan sonuçla, MB regülasyonunu sağlayan nükleer düzenleyiciler olan çalışmada EYD'de incelenmiş aday genlerden *PRKAA2* ve *SIRT1* ekspresyonlarının KAH patogenezinde arttığı belirtilen miR-155-5p ekspresyonu ile azalması beklenmiştir. Bu tez çalışmasında, KAH'ta miR-155-5p ekspresyon seviyelerinin artan *RELA* ekspresyonuna paralel olarak EYD'de artabileceği düşünülerek, çalışmada EYD'ye özgü olarak değiştiği düşünülen miR-155-5p ekspresyon düzeyinin incelenmesi tasarlanmıştır. Dolaşımda artan miR-155-5p'nin atriyal fibrilasyonlu bireylerin EYD kalınlığı ile ilişkisinin gösterildiği çalışma dışında epikardiyal doku ve miR-155-5p seviyelerinin değerlendirildiği başka bir çalışma bulunmamaktadır (18). Bu çalışmada EYD miR-155-5p seviyeleri, incelenen tüm gruplarda ilgili kontrollere göre çalışmanın tasarımında beklendiği üzere artış göstermiştir ancak bu artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. KAH olmayan bireylerde VYD miR-155-5p düzeyi açlık glukoz ile orta düzeyde pozitif korelasyon göstermiştir. Diyabet ve miR-155-5p seviyesi ilişkisini ele alan çalışmalara incelendiğinde diyabetli bireylerde görülen azalmış miR-155-5p düzeyi ve bu azalmanın hiperglisemiye neden olduğunu gösteren çalışmalar ile bu tez çalışması kapsamında miR-155-5p ile açlık glukoz düzeyleri arasında gözlenen pozitif korelasyon çelişkilidir.

Bu çelişkinin incelenen çalışmalarda patoloji ve doku farklılığından kaynaklı olabileceği tahmin edilmektedir (242). EYD’de miR-155-5p seviyeleri KAH ve DM’in birlikte incelendiği grupta, diyabetik KAH’lı bireylerde inflamatuvar belirteç olan CRP ile orta düzeyde pozitif korelasyon göstermiştir. Çeşitli dokularda ve hücre kültürü çalışmalarında miR-155-5p’nin proinflamatuvar biyobelirteçler olan TNF- α , interlökin ve CRP seviyeleri ile pozitif yönde ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar ile bu çalışmadaki miR-155-5p ve CRP korelasyon sonucu uyumludur (33, 243, 244).

Bu çalışmada tüm gruplarda incelenen miR-30a-5p, miR-1247-5p ve miR-326 aday miRNA’larının KAH patogenezinde EYD üzerinden birlikte değerlendirildiği tek çalışma Vacca ve ark. tarafından 2016 yılında yapılmıştır (19). Vacca ve ark. KAH ve metabolik olarak sağlıklı bireylerin EYD ve SYD’lerinde karşılaştırmalı olarak gen ve miRNA’ları değerlendirmiştir. SYD ile kıyaslama sonucunda, KAH’ta proinflamatuvar özellikli bir doku olan EYD’ye özgü ekspresyonu değişen miRNA’lar ve genler bu çalışmanın sonucunda belirtilmiştir. Vacca ve ark. çalışmada miRNA’ların ekspresyon seviyelerini mikrodizin yöntemi ile değerlendirmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında EYD’ye özgü olarak gösterilmiş olan miR-30a-5p, miR-1247-5p ve miR-326 aday miRNA’larının KAH’ta düşük seviyelerde eksprese edildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda miR-30a-5p validasyon için seçilmiş ve RT-qPCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Çalışmada miR-30a-5p’nin ekspresyon düzeyinin KAH bireylerin EYD örneklerinde kontrollere göre düşük düzeylerde olduğu doğrulanmıştır (19). Bu tez çalışmasında miR-30a-5p, miR-326 ve miR-1247-5p ekspresyon düzeylerinin KAH’lı grubun EYD örneklerinde Vacca ve ark. çalışması ile uyumlu şekilde azaldığı belirlenmiş, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Obezitenin değerlendirildiği gruplarda ilgili kontrollere göre anlamlı olarak anlatımı değişen miR-1247-5p’nin EYD örneklerinde obez ve obez KAH’lı bireylerde azalmış anlatım düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. MiR-1247-5p genelde kanser ile ilgili çalışmalarda yer verilmiş, kanser türüne göre değişen tümör baskılayıcı ya da tümör gelişimini indükleyici profile sahip miRNA’lardan biridir (167, 168, 245, 246). KVH grubu hastalıklarda miR-1247-5p ekspresyon düzeyleri incelenmiş, akut koroner sendromlu hastalar ile ilgili bir çalışmada hastaların dolaşımadaki miRNA profilleri incelendiğinde; miR-1247-5p’nin dolaşımda KY patolojisi ile ters orantılı olarak potansiyel bir biyobelirteç olduğunu gösterilmiştir (247). KY ile ilgili yapılmış bir başka çalışmada ise miR-1247-5p’nin hasta grubunda

önemli ölçüde aşağı regüle edildiği tespit edilmiştir (248). Bu çalışmada bulunan sonuçlara ilişkin daha önce obezite ve miR-1247-5p anlatım düzeylerinin incelendiği yalnızca bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada obezite ve kolorektal kanser patolojileri birlikte değerlendirilmiş ve obez olan kolorektal kanser hastalarının VYD örneklerinde miR-1247-5p anlatım düzeyi, sağlıklı bireylere göre düşük seviyede gözlemlenmiştir (249). Ele alınan çalışma ile bu çalışmada obezite patolojisinde VYD örneklerinde miR-1247-5p anlatım düzeyinin düşmesi birbiri ile uyumlu sonuçlar olmaktadır, ancak bu çalışmada VYD’de görülen ekspresyon azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu tez çalışması EYD mir-1247-5p’nin obez ve obez KAH’lı bireylerde düşük ekspresyon seviyelerini gösteren ilk çalışma olmuştur. Ek olarak, miR-1247-5p ekspresyon düzeylerinde görülen bu değişimin yanında biyokimyasal parametreler ve miR-1247-5p anlatım düzeyleri arasında korelasyonlar saptanmıştır. VYD miR-1247-5p anlatım düzeyleri, KAH’lı bireylerde total kolesterol ile orta derece pozitif, LDL kolesterol düzeyi ile zayıf derecede pozitif korelasyon göstermiştir. EYD miR-1247-5p, KAH’lı bireylerde LDL kolesterol ve total kolesterol ile zayıf derece negatif korelasyon göstermiştir. VYD’de miR-1247-5p, KAH olmayan bireylerde açlık glukoz ile orta derece pozitif korelasyon göstermiştir. EYD’de ise miR-1247-5p diyabeti olan KAH’lı bireylerde açlık glukoz ile orta derecede negatif korelasyon göstermiştir. MiR-1247-5p ile EYD ve VYD’de korelasyonları gösterilen lipid ve glukoz sonuçlarının kıyaslanacağı bir çalışma literatürde mevcut değildir. MiR-1247-5p EYD’de VKİ ile tüm grupta zayıf derece, KAH’lı bireylerde orta derece negatif korelasyon göstermiştir. Bu sonuç miR-1247-5p’nin azalan anlatım düzeylerinin, artan VKİ ile obezite riskini artırmasını ve obezitenin KAH risk faktörü olmasından dolayı KAH gelişiminde etkili olabileceğini göstermektedir. Ek olarak, KAH’lı bireylerde miR-1247-5p ve *PRKAA2* gen ekspresyonunun negatif korelasyon göstermesi, bu çalışmada obezitede artan *PRKAA2* anlatım düzeyi ile uyumludur ve elde edilen bu bulguların paralelliği sonuçlara güvenilirliğini arttırmaktadır.

MiR-30a-5p, genellikle glioma, kolorektal, küçük hücreli akciğer kanseri, osteosarkom, karaciğer ve meme kanserlerinde tümör gelişimini baskıladığı bilinen ve tümör gelişiminde ekspresyonu azalan bir miRNA’dır (250-254). KVH grubu hastalıklar ile miR-30a-5p ekspresyon düzeylerinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. AMİ geçiren ve KY olan hastalarda plazma ve serum düzeyinde artmış miR-30a-5p ekspresyon düzeyleri gözlemlenmiştir (161, 255). Farelerde kronik KY’nin

incelendiği bir çalışmada, farelerin miyokardiyal dokularında yüksek seviyedeki miR-30a-5p düzeylerinin *SIRT1* anlatım düzeylerini baskıladığı ve miR-30a-5p inhibisyonunun ya da *SIRT1* aşırı ekspresyonunun miyokardiyal fonksiyonu iyileştirdiği ve inflamatuvar yanıtı baskıladığı gözlemlenmiştir (256). KAH ile ilgili yapılan bir çalışmada ise, Apo E^{-/-} olan farelerin makrofajlarında ox-LDL'nin miR-30a-5p anlatım düzeyini azaltıldığı gösterilmiştir (161). KVH grubunda farklı patolojilerde farklı sonuçlar veren miR-30a-5p düzeyleri, KAH ile ilgili çalışmalarda düşük seviyelerde tespit edilmiştir (19, 161). Bu tez çalışmasında KAH'lı bireylerin EYD ve VYD'sinde miR-30a-5p anlatım düzeyleri azalmış ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Epikardiyal ve viseral adipoz dokuda miR-30a-5p ekspresyon değişimlerinin çalışmaya katılan bireylerin klinik parametreleri ile her iki dokuda değerlendirilmesi yapılmıştır. EYD'de miR-30a-5p ve çalışma grubunun klinik özellikleri arasında korelasyon bulunmamıştır. VYD miR-30a-5p ekspresyon seviyesi, KAH olmayan bireylerin trigliserit düzeyi ile orta düzeyde negatif korelasyon, açlık glukoz değerleri ile güçlü pozitif korelasyon göstermiştir. Bu korelasyon sonuçlarına benzer olarak; miR-30a-5p'nin aterosklerozda lipid metabolizmasını düzenlemeye katılması ile ilgili bir çalışmada, miR-30a-5p ile serum trigliserit düzeyinin ters orantılı olduğu tespit edilmiştir (161). KAH olmayan grupta miR-30a-5p düzeyinin açlık glukoz ile güçlü pozitif korelasyon göstermesi ise, miR-30a-5p'nin prediyabette T2DM'ye göre ekspresyon seviyelerinin yüksek olması ve glukoz ve insülin parametreleri ile pozitif korele olması ile ilişkilendirilebilmektedir (257).

MiR-326, kanser patogeneğinde genellikle potansiyel biyobelirteç olarak incelenmiş bir mikroRNA'dır. MiR-326 ve kanser ilişkisi üzerine yapılan çalışmalar, çeşitli kanser türlerinde değişken ekspresyon seviyeleri gösteren miR-326'nın tümör gelişiminde ve metastazda rol aldığını göstermektedir (255, 258-260). Kardiyovasküler patolojilerden biri olan kardiyak hipertrofisi olan farelerin hipertrofik H9c2 hücrelerinde miR-326'nın ekspresyon düzeylerinin azaldığını gösteren çalışmada, miR-326'nın kardiyak hipertrofide potansiyel terapötik hedef olabileceği tespit edilmiştir (261). Ateroskleroz ile ilgili yapılmış çalışmalarda, miR-326'nın vasküler düz kas hücrelerinde aşağı regüle edildiğini, serumda ise ekspresyon düzeyinin arttığını göstermektedir (261, 262). Bu tez çalışmasında miR-326, ekspresyon düzeyleri KAH'lı grubun EYD ve VYD örneklerinde Vacca ve ark.'ın çalışması ile uyumlu bir biçimde azalmıştır, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çalışma genel olarak, hipotezimiz ile ilişkili olan literatür çalışmalarıyla uyumlu sonuçlar vermiştir. Bu çalışma hipotezinde belirlenmiş aday gen ve miRNA'ların EYD'de değerlendirilmesinin yanında, EYD'yi kıyaslamak amaçlı olarak VYD'de değerlendirilmesi ile aday gen ve miRNA'ların hastalık patogenezinde düzeyleri konusunda bilgi sağlanmıştır. Bu tez çalışması, aday gen ve miRNA'ların EYD ve VYD'de ilk kez birlikte değerlendirildiği çalışma olması ile önem kazanmaktadır. Çalışmaya katılan katılımcı sayısının, daha önce EYD ile ilişkili çalışmalara kıyasla daha büyük sayıda olması çalışmanın güçlü yönlerinden biridir. Çalışmada hasta ve kontrol grubuna ek olarak ayrı olarak değerlendirilmiş alt gruplarda hipotezde belirlenmiş aday gen ve miRNA'larla ilişkili farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu yönden çalışmada gözlemlenen ve yukarıdaki paragraflarda ele alınan sonuçların, KAH patogenezi, diyabet ve obezite ile ilişkili çalışmalar incelendiğinde literatürde mevcut olmaması, bu sonuçların EYD'de sözü edilen patolojiler için ilk çalışma niteliğinde olmasını sağlamıştır. Kısaca örnekler verilecek olursa: Bu tez çalışması bu noktada, mitokondriyal fonksiyonda önemi olan *SIRT1* ekspresyon seviyesini EYD'de diyabet ve diyabetik KAH'lı bireylerde incelemiş ilk çalışma olmaktadır. *SIRT1*'e ek olarak, mitokondriyal fonksiyonda ve oksidatif stresin indirgenmesinde rolü olan AMPK mRNA anlatım düzeylerinin EYD'de incelendiği bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışması KAH, diyabet ve obezitede AMPK'nın EYD'de ekspresyon düzeylerinin incelendiği ilk çalışma olma niteliğindedir. AMPK ekspresyon seviyelerinin yalnızca diyabet ve obezitenin incelendiği grupta hasta ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı olması dikkat çekmiştir. Obezite ve diyabet KAH'la birlikte değerlendirildiğinde ve KAH patogenezinde AMPK'nın hasta ve kontrol arasında değişen anlatım düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçtan AMPK ekspresyon seviyelerinin diyabet ve obezite patolojilerinde daha fazla araştırılması gerekliliği çıkarılmaktadır. Önceki çalışmalarda, inflamasyon ile ilişkili olarak NF-kB p65/RelA'nın protein düzeyi çalışılmış ancak literatürde RelA'nın mRNA seviyelerinin olmadığı gözlemlenmiştir. Bu çalışma RelA mRNA ekspresyon düzeylerinin incelendiği ilk çalışmadır. Obezitede EYD'nin kalınlığının artması ve inflamatuvar bir profile girmesi bilinen bir özelliktir, ancak bu çalışmada obezite ve diyabet tek başına incelendiğinde artmış *TNFA* ekspresyon düzeylerinin değişimi istatistiksel olarak anlamlı olmaması, KAH ve KAH'lı diyabet ve KAH'lı obez bireylerde *TNFA* ekspresyon düzeyinin artmasının istatistiksel olarak anlamlı olması

dikkat çekmektedir. Bu sonuçlar, *TNFA* ekspresyon düzeyinin EYD'de KAH patogenezinin özgü olarak değişebileceğini vurgulamaktadır. KAH patogenezinde miR-155-5p anlatım düzeylerinin değişimi literatürde dolaşımda incelenmiş olup, çalışmamız EYD miR-155-5p anlatımını inceleyen ilk çalışmadır. Bu tez çalışmasında EYD'de obezite ve KAH'lı obez bireylerde anlamlı çıkan miR-1247-5p ekspresyon düzeyinin yalnızca KAH'ın incelendiği grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması, bu çalışmaya göre miR-1247-5p'nin obeziteye özgü olan bir miRNA olabileceğini düşündürmektedir. MiR-1247-5p anlatım düzeyinin daha önce obez ve kolorektal kanser olan bireylerde VYD'de incelendiği bir çalışma mevcuttur, bu çalışmaya ek olarak EYD'de obezite patolojisinde miR-1247-5p incelemesi ile bu tez çalışması katkı sağlamıştır.

KAH patogenezi ile ilgili daha önceki çalışmaların sonuçları ile bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların önemli bir kısmı benzer olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması bu çalışmanın sınırlamalarından biri olmaktadır. Sözü edilen farklılıkların çalışma tasarımlarındaki farklılıklar ile oluşabileceği düşünülmektedir. Bu farklılığa, Vacca ve ark.'ın çalışma grubunda kontrol olarak belirlenen bireylerin metabolik olarak sağlıklı olması ve bu tez çalışmasında kontrol olarak belirlenen bireylerin kapak hastası olması örnek gösterilebilir. Ek olarak, Vacca ve ark.'nın çalışmasında miRNA anlatım düzeylerinin belirlenmesinde mikrodizin yöntemi kullanımı, bu çalışmada miRNA anlatım düzeylerinin belirlenmesinde qRT-PZR yönteminin kullanımı örnek olarak gösterilen bu iki çalışma arasında diğer farklılığı göstermektedir. Literatürde KAH patogenezinde yer alan genlerin ve epigenetik düzenleyicilerin ifadeleri; in vivo ve in vitro koşullarda, farklı dokularda, farklı hücrelerde, çeşitli yönlerden, çeşitli kombinasyonlar ile ele alınmıştır. Bu çeşitlilikte çalışmalar KAH patogenezinin aydınlatmada değerli bir bilgi birikimine katkı sağlamaktadır ancak bu konuda deneysel koşula veya başka nedenlere bağlı olarak birbirini desteklemeyen çalışmalar da bulunmaktadır. Bu bağlamda bu çalışmalarda optimizasyon süreçlerinin farklı olması ve çoğu çalışmanın içeriğinin net bir şekilde bilinmemesi bu zorlukları beraberinde getirmektedir. Bu konuda daha çok ve daha kapsamlı yapılacak çalışmaların ileride araştırmacılara yol gösterici olabilmesi mümkündür.

Bu tez çalışmasında, KAH ve kontrol olarak belirlenen bireylerden ve aynı zamanda çalışma grubunda, KAH patogenezinin eşlik eden diyabet ve obezite patolojileri hem tek olarak hem de KAH'la birlikte, epikardiyal ve viseral yağ dokularında oksidatif stres ve mitokondri disfonksiyonunda rolü olan AMPK ve NF- κ B sinyal yolağı ile ilişkili *PRKAA2*, *SIRT1*, *PPARGC1A*, *RELA* ve *TNFA* genlerinin ve miR-155-5p, miR-30a-3p, miR-326 ve miR-1247-5p miRNA'larının anlatım düzeylerinin değişimi detaylı olarak incelenmiştir. Bu tez çalışması, dayandığı hipotezde söz edilen genler ve miRNA'ların KAH, obezite ve diyabet patogenezi için viseral ve epikardiyal yağ dokusunda birlikte incelendiği ilk çalışma olması yönünden önem arz etmektedir. KAH ve metabolik hastalıkların oluşumunun önlenmesi amaçlı, gelecekte çalışılacak terapötik konulu çalışmalara bu çalışmada odaklanılan ilgili yollarla ilişkili gen ve miRNA'ların katkıda bulunacağı umulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Arkins R, Smessaert AA, Hicks RG. Mortality and morbidity in surgical patients with coronary artery disease. *Jama*. 1964;190(6):485-8.
2. Abu-Amro KK, Al-Boudari OM, Mousa A, Gonzalez AM, Larruga JM, Cabrera VM, et al. The mitochondrial DNA variant 16189T>C is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in Saudi Arabs. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010;14(1):43-7.
3. McCullough PA. Coronary artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(3):611-6.
4. Jia S, Liu Y, Yuan J. Evidence in Guidelines for Treatment of Coronary Artery Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1177:37-73.
5. Nilsson J, Hansson G. Autoimmunity in atherosclerosis: a protective response losing control? *Journal of internal medicine*. 2008;263(5):464-78.
6. Bierman EL, editor *Atherosclerosis and aging*. Federation Proceedings; 1978.
7. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(11):42.
8. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*. 2016;7(29):44879-905.
9. FİDANCI İ, Şükrü E, Arslan İ, ÇAKIT M, Tekin O. Aile Hekimliği Polikliniğinde Saptanan Bir Epikardiyal Yağ Dokusu Olgusu. *Ankara Medical Journal*. 2015;15(4).
10. Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2005;184(4):285-93.

11. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003;108(20):2460-6.
12. Talman AH, Psaltis PJ, Cameron JD, Meredith IT, Seneviratne SK, Wong DT. Epicardial adipose tissue: far more than a fat depot. *Cardiovascular diagnosis and therapy*. 2014;4(6):416.
13. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation research*. 2017;120(4):713-35.
14. Favaro G, Romanello V, Varanita T, Andrea Desbats M, Morbidoni V, Tezze C, et al. DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass. *Nature communications*. 2019;10(1):1-17.
15. Turdi S, Fan X, Li J, Zhao J, Huff AF, Du M, et al. AMP-activated protein kinase deficiency exacerbates aging-induced myocardial contractile dysfunction. *Aging cell*. 2010;9(4):592-606.
16. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2016;8(3):227-41.
17. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-κB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*. 2009;27:693-733.
18. Tran K-V, Majka J, Sanghai S, Sardana M, Lessard D, Milstone Z, et al. Micro-RNAs are related to epicardial adipose tissue in participants with atrial fibrillation: data from the MiRhythm study. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2019:115.
19. Vacca M, Di Eusanio M, Cariello M, Graziano G, D'Amore S, Petridis FD, et al. Integrative miRNA and whole-genome analyses of epicardial adipose tissue in patients with coronary atherosclerosis. *Cardiovascular research*. 2016;109(2):228-39.

20. Olvera Lopez E, Ballard BD, Jan A. Cardiovascular Disease. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
21. Organization WH. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability 2019 [Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>.
22. Khera AV, Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nat Rev Genet.* 2017;18(6):331-44.
23. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(9):1135-43.
24. Pahwa R, Jialal I. Atherosclerosis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
25. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011;12(3):204-12.
26. Bossone E, Eagle KA. Epidemiology and management of aortic disease: aortic aneurysms and acute aortic syndromes. *Nat Rev Cardiol.* 2021;18(5):331-48.
27. Milutinović A, Šuput D, Zorc-Plesković R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2020;20(1):21-30.
28. Poznyak AV, Nikiforov NG, Markin AM, Kashirskikh DA, Myasoedova VA, Gerasimova EV, et al. Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis. *Front Pharmacol.* 2020;11:613780.
29. Gimbrone MA, Jr., García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36.

30. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of the American College of cardiology*. 2006;47(8S):C7-C12.
31. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res*. 2019;124(10):1505-18.
32. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douadi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *International journal of preventive medicine*. 2014;5(8):927.
33. Abdul-Maksoud R, Sediq A, Kattaia A, Elsayed W, Ezzeldin N, Abdel Galil S, et al. Serum miR-210 and miR-155 expression levels as novel biomarkers for rheumatoid arthritis diagnosis. *British Journal of Biomedical Science*. 2017;74(4):209-13.
34. Nelson J, Wani O, May H, Budoff M. Potential benefits of eicosapentaenoic acid on atherosclerotic plaques. *Vascular pharmacology*. 2017;91:1-9.
35. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*. 2001;104(4):503-16.
36. Koplay M, Erol C. Koroner arter hastalığı. *Türk Radyoloji Seminerleri*. 2013;1:57-69.
37. Derneği TPH. Tromboz. 2022.
38. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014;276(6):618-32.
39. Pagliaro BR, Cannata F, Stefanini GG, Bolognese L. Myocardial ischemia and coronary disease in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2020;25(1):53-65.
40. Lu H, Daugherty A. Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(3):485-91.

41. Sary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1177-8.
42. Koenig W, Khuseyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2007;27(1):15-26.
43. Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull Jr W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92(5):1355-74.
44. Enar R. Ateroskleroz-aterotromboz. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Ateroskleroz. 2006:9-27.
45. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature.* 2021;592(7855):524-33.
46. NHS. Angina Pectoris [Available from: <https://www.nhs.uk/conditions/angina/>.
47. Wild D. The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques: Newnes; 2013.
48. van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerotic plaque rupture—pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovascular research.* 1999;41(2):334-44.
49. Foundation H. Angina [Available from: <https://www.heartfoundation.org.nz/your-heart/heart-conditions/angina>.
50. Gottlieb SO. The prognostic importance of asymptomatic ischemic episodes in patients with unstable angina pectoris. *Herz.* 1987;12(5):336-40.
51. Clinic C. Heart Attack (MI) 2021 [Available from: [https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/16818-heart-attack-myocardial-infarction#:~:text=A%20myocardial%20infarction%20\(commonly%20called,more%20of%20your%20heart's%20arteries](https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/16818-heart-attack-myocardial-infarction#:~:text=A%20myocardial%20infarction%20(commonly%20called,more%20of%20your%20heart's%20arteries).

52. Maida CD, Norrito RL, Daidone M, Tuttolomondo A, Pinto A. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18).
53. Lechner K, von Schacky C, McKenzie AL, Worm N, Nixdorff U, Lechner B, et al. Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *Eur J Prev Cardiol.* 2020;27(4):394-406.
54. Rosenson RS, Brewer Jr HB, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation.* 2012;125(15):1905-19.
55. Nakamura A, Niimura H, Kuwabara K, Takezaki T, Morita E, Wakai K, et al. Gene-gene combination effect and interactions among ABCA1, APOA1, SR-B1, and CETP polymorphisms for serum high-density lipoprotein-cholesterol in the Japanese population. *PloS one.* 2013;8(12):e82046.
56. Santamarina-Fojo S, Remaley AT, Neufeld EB, Brewer HB. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *Journal of lipid research.* 2001;42(9):1339-45.
57. Hovingh GK, Hutten BA, Holleboom AG, Petersen W, Rol P, Stalenhoef A, et al. Compromised LCAT function is associated with increased atherosclerosis. *Circulation.* 2005;112(6):879-84.
58. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):56.
59. Sayols-Baixeras S, Lluís-Ganella C, Lucas G, Elosua R. Pathogenesis of coronary artery disease: focus on genetic risk factors and identification of genetic variants. *The application of clinical genetics.* 2014;7:15.

60. Turunen MP, Aavik E, Ylä-Herttuala S. Epigenetics and atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2009;1790(9):886-91.
61. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548-56.
62. Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus MV. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab*. 2018;27(1):68-83.
63. Enerbäck S. Human brown adipose tissue. *Cell metabolism*. 2010;11(4):248-52.
64. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta physiologica*. 2012;205(2):194-208.
65. Fenzl A, Kiefer FW. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014;19(1):25-37.
66. Sacks HS, Fain JN, Bahouth SW, Ojha S, Frontini A, Budge H, et al. Adult epicardial fat exhibits beige features. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(9):E1448-E55.
67. Le Jemtel TH, Samson R, Ayinapudi K, Singh T, Oparil S. Epicardial Adipose Tissue and Cardiovascular Disease. *Curr Hypertens Rep*. 2019;21(5):36.
68. EROĞLU S. Prehipertansiyon ve epikardiyal yağ dokusu kalınlığı arasındaki ilişki. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*. 2014;42(4):365-7.
69. Djaberi R, Schuijf JD, van Werkhoven JM, Nucifora G, Jukema JW, Bax JJ. Relation of epicardial adipose tissue to coronary atherosclerosis. *The American journal of cardiology*. 2008;102(12):1602-7.
70. Cohen S, Valm AM, Lippincott-Schwartz J. Interacting organelles. *Current opinion in cell biology*. 2018;53:84-91.

71. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(5):1066-77.
72. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol.* 1981;91(3 Pt 2):227s-55s.
73. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology.* 2006;16(14):R551-R60.
74. Zimorski V, Ku C, Martin WF, Gould SB. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Curr Opin Microbiol.* 2014;22:38-48.
75. Bakırcı Ç. Endosimbiyoz Nedir? Endosimbiyotik Teori, Ökaryotların Prokaryotlardan Evrimi ve Canlılar Arası Endosimbiyotik İlişkiler Hakkında Neler Söyler? Evrim Ağacı. 2011.
76. Zimorski V, Ku C, Martin WF, Gould SB. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current opinion in microbiology.* 2014;22:38-48.
77. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410(2):103-23.
78. Bauer MF, Hofmann S, Neupert W, Brunner M. Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends in cell biology.* 2000;10(1):25-31.
79. Duchen MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes.* 2004;53(suppl_1):S96-S102.
80. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences.* 2000;25(7):319-24.
81. Joubert F, Puff N. Mitochondrial Cristae Architecture and Functions: Lessons from Minimal Model Systems. *Membranes.* 2021;11(7):465.
82. Palade GE. The fine structure of mitochondria. *Anat Rec.* 1952;114(3):427-51.

83. Chinnery PF, Schon EA. Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74(9):1188-99.
84. Boengler K, Kosiol M, Mayr M, Schulz R, Rohrbach S. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2017;8(3):349-69.
85. Albensi BC. What is nuclear factor kappa B (NF- κ B) doing in and to the mitochondrion? *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019:154.
86. Pamukcu B, Lip GY, Shantsila E. The nuclear factor--kappa B pathway in atherosclerosis: a potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. *Thromb Res*. 2011;128(2):117-23.
87. Reichle DE. *The Global Carbon Cycle and Climate Change: Scaling Ecological Energetics from Organism to the Biosphere*. 2019.
88. Palmeira CM, & Moreno, A. J. (Eds.). *Mitochondrial Bioenergetics*. 2018.
89. Wallace DC. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(4):1405-12.
90. Jane B. Reece (Author) LAUA, Michael L. Cain (Author), Steven A. Wasserman (Author), Peter V. Minorsky (Author), Robert B. Jackson (Author). *Campbell Biology (9th Edition)- Cellular Respiration and Fermentation*. 2013:Chapter 9.
91. Lenaz G, D'Aurelio M, Pich MM, Genova M, Ventura B, Bovina C, et al. Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2000;1459(2-3):397-404.
92. Quan Y, Xin Y, Tian G, Zhou J, Liu X. Mitochondrial ROS-modulated mtDNA: a potential target for cardiac aging. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020;2020.

93. Chial H, Craig J. mtDNA and mitochondrial diseases. *Nature Education*. 2008;1(1):217.
94. Schon KR, Horvath R, Wei W, Calabrese C, Tucci A, Ibañez K, et al. Use of whole genome sequencing to determine genetic basis of suspected mitochondrial disorders: cohort study. *Bmj*. 2021;375:e066288.
95. Stojanovski D, Johnston AJ, Streimann I, Hoogenraad NJ, Ryan MT. Import of nuclear-encoded proteins into mitochondria. *Exp Physiol*. 2003;88(1):57-64.
96. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*. 2010;47:69-84.
97. Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA. *Autophagy*. 2012;8(3):424-5.
98. Falkenberg M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. *Essays Biochem*. 2018;62(3):287-96.
99. Fontana GA, Gahlon HL. Mechanisms of replication and repair in mitochondrial DNA deletion formation. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(20):11244-58.
100. Quan Y, Xin Y, Tian G, Zhou J, Liu X. Mitochondrial ROS-Modulated mtDNA: A Potential Target for Cardiac Aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:9423593.
101. Yasukawa T, Kang D. An overview of mammalian mitochondrial DNA replication mechanisms. *J Biochem*. 2018;164(3):183-93.
102. Popov LD. Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med*. 2020;24(9):4892-9.
103. Botto N, Berti S, Manfredi S, Al-Jabri A, Federici C, Clerico A, et al. Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease. *Mutat Res*. 2005;570(1):81-8.

104. Ding Y, Gao BB, Huang JY. The role of mitochondrial DNA mutations in coronary heart disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(16):8502-9.
105. Sobenin IA, Chistiakov DA, Sazonova MA, Ivanova MM, Bobryshev YV, Orekhov AN, et al. Association of the level of heteroplasmy of the 15059G>A mutation in the MT-CYB mitochondrial gene with essential hypertension. *World J Cardiol*. 2013;5(5):132-40.
106. Vecoli C, Borghini A, Pulignani S, Mercuri A, Turchi S, Carpeggiani C, et al. Prognostic value of mitochondrial DNA(4977) deletion and mitochondrial DNA copy number in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2018;276:91-7.
107. Filograna R, Mennuni M, Alsina D, Larsson NG. Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Lett*. 2021;595(8):976-1002.
108. Castellani CA, Longchamps RJ, Sun J, Guallar E, Arking DE. Thinking outside the nucleus: Mitochondrial DNA copy number in health and disease. *Mitochondrion*. 2020;53:214-23.
109. Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol*. 1988;136(3):507-13.
110. Ni H-M, Williams JA, Ding W-X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox biology*. 2015;4:6-13.
111. Türkçe Nd. Füzyon Ne Demek? 2020.
112. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012;337(6098):1062-5.
113. Hales KG. Mitochondrial Fusion and Division. 2010.
114. Otera H, Ishihara N, Mihara K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2013;1833(5):1256-68.

115. Elgass K, Pakay J, Ryan MT, Palmer CS. Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2013;1833(1):150-61.
116. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med*. 2009;361(16):1570-83.
117. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
118. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect*. 2009;11(13):1050-62.
119. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*. 2018;552:50-9.
120. Eiyama A, Okamoto K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Current opinion in cell biology*. 2015;33:95-101.
121. Ge P, Dawson VL, Dawson TM. PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: A source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Molecular neurodegeneration*. 2020;15(1):1-18.
122. Bhatti JS, Kumar S, Vijayan M, Bhatti GK, Reddy PH. Chapter Two - Therapeutic Strategies for Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Age-Related Metabolic Disorders. In: Reddy PH, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 146: Academic Press; 2017. p. 13-46.
123. Carling D. AMPK signalling in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*. 2017;45:31-7.
124. Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med*. 2016;48(4):e224.

125. Jäger S, Handschin C, Pierre JS-, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(29):12017-22.
126. Quintero M, Colombo SL, Godfrey A, Moncada S. Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(14):5379-84.
127. Wu Y, Viana M, Thirumangalathu S, Loeken M. AMP-activated protein kinase mediates effects of oxidative stress on embryo gene expression in a mouse model of diabetic embryopathy. *Diabetologia*. 2012;55(1):245-54.
128. Vieira RFL, Junqueira RL, Gaspar RC, Munoz VR, Pauli JR. Exercise activates AMPK signaling: impact on glucose uptake in the skeletal muscle in aging. *Journal of Rehabilitation Therapy*. 2020;2(2).
129. Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, et al. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiological reviews*. 2012.
130. Zhou Y, Wang S, Li Y, Yu S, Zhao Y. SIRT1/PGC-1 α Signaling Promotes Mitochondrial Functional Recovery and Reduces Apoptosis after Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:443.
131. Cottart CH, Nivet-Antoine V, Beaudoux JL. Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58(1):7-21.
132. Michno A, Gruzewska K, Ronowska A, Gul-Hinc S, Zyśk M, Jankowska-Kulawy A. Resveratrol Inhibits Metabolism and Affects Blood Platelet Function in Type 2 Diabetes. *Nutrients*. 2022;14(8):1633.

133. Crandall JP, Oram V, Trandafirescu G, Reid M, Kishore P, Hawkins M, et al. Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2012;67(12):1307-12.
134. Ren J, Pulakat L, Whaley-Connell A, Sowers JR. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Journal of molecular medicine*. 2010;88(10):993-1001.
135. Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med*. 2005;33(12 Suppl):S498-501.
136. Tomasian D, Keaney JF, Vita JA. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res*. 2000;47(3):426-35.
137. Donato AJ, Pierce GL, Lesniewski LA, Seals DR. Role of NFkappaB in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(8):678-80.
138. Kinlay S, Egidio J. Inflammatory biomarkers in stable atherosclerosis. *The American journal of cardiology*. 2006;98(11):S2-S8.
139. Moriya J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *Journal of cardiology*. 2019;73(1):22-7.
140. Joshi AU, Mochly-Rosen D. Mortal engines: Mitochondrial bioenergetics and dysfunction in neurodegenerative diseases. *Pharmacological research*. 2018;138:2-15.
141. Knowlton AA, Chen L, Malik ZA. Heart failure and mitochondrial dysfunction: the role of mitochondrial fission/fusion abnormalities and new therapeutic strategies. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;63(3):196-206.
142. Thirupathi A, de Souza CT. Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise. *J Physiol Biochem*. 2017;73(4):487-94.

143. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2003;5(5):557-61.
144. Jin K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging Dis*. 2010;1(2):72-4.
145. Shields HJ, Traa A, Van Raamsdonk JM. Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: A comprehensive review of comparative and experimental studies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:181.
146. Syslová K, Böhmová A, Mikoška M, Kuzma M, Pelclová D, Kačer P. Multimarker screening of oxidative stress in aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:562860.
147. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis*. 2015;6(2):109-20.
148. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*. 2013;12(1):376-90.
149. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(2):621S-9S.
150. Wei W, Liu Q, Tan Y, Liu L, Li X, Cai L. Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications. *Hemoglobin*. 2009;33(5):370-7.
151. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:402.
152. He J, Zhao J, Zhu W, Qi D, Wang L, Sun J, et al. MicroRNA biogenesis pathway genes polymorphisms and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ*. 2016;4:e2706.
153. Hitit M, Kurar E, GÜZELOĞLU A. MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 2015;10(3).

154. Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis. *International journal of molecular sciences*. 2019;21(1):132.
155. R&D BG. miR-155. 2022.
156. Wang Y, Zheng Z-j, Jia Y-j, Yang Y-l, Xue Y-m. Role of p53/miR-155-5p/sirt1 loop in renal tubular injury of diabetic kidney disease. *Journal of translational medicine*. 2018;16(1):1-9.
157. Wang L, Zhang H, Rodriguez S, Cao L, Parish J, Mumaw C, et al. Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF- κ B-dependent manner. *Cell stem cell*. 2014;15(1):51-65.
158. OMIM. MIKRO RNA 30A; MIR30A. 2022.
159. Jiang L-h, Zhang H-d, Tang J-h. MiR-30a: A novel biomarker and potential therapeutic target for cancer. *Journal of oncology*. 2018;2018.
160. Maciejak A, Kostarska-Srokosz E, Gierlak W, Dluzniewski M, Kuch M, Marchel M, et al. Circulating miR-30a-5p as a prognostic biomarker of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-11.
161. Song F, Li J-Z, Wu Y, Wu W-Y, Wang Y, Li G. Ubiquitinated ligation protein NEDD4L participates in MiR-30a-5p attenuated atherosclerosis by regulating macrophage polarization and lipid metabolism. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2021;26:1303-17.
162. GeneCards. miR-326. 2022.
163. Vega-Cárdenas M, Uresti-Rivera EE, Cortés-García JD, Briones-Espinoza M, Ruíz-Rodríguez VM, Reynaga-Hernández E, et al. Increased levels of adipose tissue-resident Th17 cells in obesity associated with miR-326. *Immunology letters*. 2019;211:60-7.

164. Li R, Jiang Q, Zheng Y. Circ_0002984 induces proliferation, migration and inflammation response of VSMCs induced by ox-LDL through miR-326-3p/VAMP3 axis in atherosclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2021;25(16):8028-38.
165. Zhang P, Fan C, Du J, Mo X, Zhao Q. Association of miR-1247-5p expression with clinicopathological parameters and prognosis in breast cancer. *Int J Exp Pathol*. 2018;99(4):199-205.
166. Scaravilli M, Porkka KP, Brofeldt A, Annala M, Tammela TL, Jenster GW, et al. MiR-1247-5p is overexpressed in castration resistant prostate cancer and targets MYCBP2. *Prostate*. 2015;75(8):798-805.
167. Chu Y, Fan W, Guo W, Zhang Y, Wang L, Guo L, et al. miR-1247-5p functions as a tumor suppressor in human hepatocellular carcinoma by targeting Wnt3. *Oncology reports*. 2017;38(1):343-51.
168. Dong X, Chang M, Song X, Ding S, Xie L, Song X. Plasma miR-1247-5p, miR-301b-3p and miR-105-5p as potential biomarkers for early diagnosis of non-small cell lung cancer. *Thoracic Cancer*. 2021;12(4):539-48.
169. Tran KV, Tanriverdi K, Aurigemma GP, Lessard D, Sardana M, Parker M, et al. Circulating extracellular RNAs, myocardial remodeling, and heart failure in patients with acute coronary syndrome. *J Clin Transl Res*. 2019;5(1):33-43.
170. NCBI. PRKAA2 protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2 [Homo sapiens (human) NCBI. 2022.
171. Li Q, Li C, Li H, Zeng L, Kang Z, Mao Y, et al. Effect of AMP-activated protein kinase subunit alpha 2 (PRKAA2) genetic polymorphisms on susceptibility to type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy in a Chinese population: PRKAA2

- 基因多态性对中国人群易感 2 型糖尿病和糖尿病肾病的影响研究. *Journal of Diabetes*. 2018;10(1):43-9.
172. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiological reviews*. 2009;89(3):1025-78.
173. GeneCards. PRKAA2 Gene. 2022.
174. Sakamoto K, Zarrinpashneh E, Budas GR, Pouleur A-C, Dutta A, Prescott AR, et al. Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPK α 2 but not AMPK α 1. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2006;290(5):E780-E8.
175. Kobayashi T, Imachi H, Fukunaga K, Lyu J, Sato S, Saheki T, et al. HDL promotes adiponectin gene expression via the CAMKK/CAMKIV pathway. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2022;68(2):89-98.
176. Hong Y, He H, Jiang G, Zhang H, Tao W, Ding Y, et al. miR-155-5p inhibition rejuvenates aged mesenchymal stem cells and enhances cardioprotection following infarction. *Aging Cell*. 2020;19(4):e13128.
177. NCBI. PPARGC1A PPARG coactivator 1 alpha. 2022.
178. Chuang Y-C, Chen S-D, Jou S-B, Lin T-K, Chen S-F, Chen N-C, et al. Sirtuin 1 regulates mitochondrial biogenesis and provides an endogenous neuroprotective mechanism against seizure-induced neuronal cell death in the hippocampus following status epilepticus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(14):3588.
179. Saboori S, Koohdani F, Nematipour E, Rad EY, Saboor-Yaraghi AA, Javanbakht MH, et al. Beneficial effects of omega-3 and vitamin E coadministration on gene expression of SIRT1 and PGC1 α and serum antioxidant enzymes in patients with coronary artery disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2016;26(6):489-94.

180. Kadlec AO, Chabowski DS, Ait-Aissa K, Hockenberry JC, Otterson MF, Durand MJ, et al. PGC-1alpha overexpression in coronary artery disease recruits nitric oxide and hydrogen peroxide during flow-mediated dilation and protects against increased intraluminal pressure. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*. 2017;70(1):166.
181. AceView N. Homo sapiens gene SIRT1, encoding sirtuin 1. 2022.
182. Yang H, Zhang W, Pan H, Feldser HG, Lainez E, Miller C, et al. SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF- κ B activity. 2012.
183. Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, et al. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2010.
184. Stein S, Matter CM. Protective roles of SIRT1 in atherosclerosis. *Cell cycle*. 2011;10(4):640-7.
185. Ota H, Eto M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. SIRT1/eNOS axis as a potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2010;1003080195-.
186. Chan S-H, Hung C-H, Shih J-Y, Chu P-M, Cheng Y-H, Lin H-C, et al. SIRT1 inhibition causes oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Redox biology*. 2017;13:301-9.
187. Breitenstein A, Wyss CA, Spescha RD, Franzeck FC, Hof D, Riwanto M, et al. Peripheral blood monocyte Sirt1 expression is reduced in patients with coronary artery disease. *PLoS One*. 2013;8(1):e53106.
188. Peeters AV, Beckers S, Verrijken A, Mertens I, Roevens P, Peeters PJ, et al. Association of SIRT1 gene variation with visceral obesity. *Human genetics*. 2008;124(4):431-6.

189. Pardo PS, Boriek AM. SIRT1 regulation in ageing and obesity. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2020;188:111249.
190. GeneCards. RELA gene. 2022.
191. Peng C, Ouyang Y, Lu N, Li N. The NF- κ B signaling pathway, the microbiota, and gastrointestinal tumorigenesis: Recent advances. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1387.
192. AceView N. Homo sapiens complex locus RELA, encoding v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian). 2022.
193. Ichiyama T, Ueno Y, Isumi H, Niimi A, Matsubara T, Furukawa S. An immunoglobulin agent (IVIG) inhibits NF- κ B activation in cultured endothelial cells of coronary arteries in vitro. *Inflammation Research*. 2004;53(6):253-6.
194. Coto E, Reguero JR, Avanzas P, Pascual I, Martín M, Hevia S, et al. Gene variants in the NF-KB pathway (NFKB1, NFKBIA, NFKBIZ) and risk for early-onset coronary artery disease. *Immunology letters*. 2019;208:39-43.
195. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*. 1996;12(4):274-7.
196. AceView N. Homo sapiens gene TNF, encoding tumor necrosis factor. 2022.
197. Nteeba J, Ortinau L, Perfield Jn, Keating A. Diet-induced obesity alters immune cell infiltration and expression of inflammatory cytokine genes in mouse ovarian and peri-ovarian adipose depot tissues. *Molecular reproduction and development*. 2013;80(11):948-58.
198. Lubrano V, Di Cecco P, Zucchelli G. Role of superoxide dismutase in vascular inflammation and in coronary artery disease. *Clinical and Experimental Medicine*. 2006;6(2):84-8.

199. Cathy Olsen P. Monitor NF- κ B activation with a sensitive dual reporter assay on the SpectraMax iD5 microplate reader.
200. Turai PI, Herold Z, Nyirő G, Borka K, Micsik T, Tőke J, et al. Tissue miRNA Combinations for the Differential Diagnosis of Adrenocortical Carcinoma and Adenoma Established by Artificial Intelligence. *Cancers (Basel)*. 2022;14(4).
201. Bilimcisi V. ROC Eğrisi. 2017.
202. Salgado-Somoza A, Teixeira-Fernández E, Fernández ÁL, González-Juanatey JR, Eiras S. Proteomic analysis of epicardial and subcutaneous adipose tissue reveals differences in proteins involved in oxidative stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2010;299(1):H202-H9.
203. Kratochvílová H, Mráz M, Kasperová BJ, Hlaváček D, Mahrík J, Laňková I, et al. Different Expression of Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Stress Genes in Epicardial Adipose Tissue Depends on Coronary Atherosclerosis. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(9):4538.
204. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell metabolism*. 2011;13(4):376-88.
205. O'Neill HM, Holloway GP, Steinberg GR. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2013;366(2):135-51.
206. Lu Q, Li X, Liu J, Sun X, Rousselle T, Ren D, et al. AMPK is associated with the beneficial effects of antidiabetic agents on cardiovascular diseases. *Bioscience reports*. 2019;39(2).

207. Shafique E, Choy WC, Liu Y, Feng J, Cordeiro B, Lyra A, et al. Oxidative stress improves coronary endothelial function through activation of the pro-survival kinase AMPK. *Aging (Albany NY)*. 2013;5(7):515.
208. Mackenzie RM, Salt IP, Miller WH, Logan A, Ibrahim HA, Degasperis A, et al. Mitochondrial reactive oxygen species enhance AMP-activated protein kinase activation in the endothelium of patients with coronary artery disease and diabetes. *Clinical science*. 2013;124(6):403-11.
209. An D, Kewalramani G, Qi D, Pulinkunnil T, Ghosh S, Abrahani A, et al. β -Agonist stimulation produces changes in cardiac AMPK and coronary lumen LPL only during increased workload. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2005;288(6):E1120-E7.
210. Abedimanesh N, Motlagh B, Abedimanesh S, Bathaie SZ, Separham A, Ostadrahimi A. Effects of crocin and saffron aqueous extract on gene expression of SIRT1, AMPK, LOX1, NF- κ B, and MCP-1 in patients with coronary artery disease: A randomized placebo-controlled clinical trial. *Phytotherapy research*. 2020;34(5):1114-22.
211. Mahami N, Abedimanesh N, Asghari S, Mohammadnejad K, Eskandari MR, Nejadebrahimi Z, et al. Effects of betanin on AMPK, Sirtuin1, and Sirtuin6 gene expression and inflammatory cytokines levels in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary artery disease. *Nutrition & Food Science*. 2021.
212. Rahimi E, Ahmadi A, Boroumand MA, Soltani BM, Behmanesh M. Nutrient sensing pathway genes expression dysregulated in patients with T2DM and coronary artery disease. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2019;151:39-45.

213. مهامی, ندا. Effect of betanin on SIRT1 and AMPK gene expression in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with coronary artery disease and healthy volunteers: دانشگاه علوم پزشکی زنجان.
214. Patel VB, Mori J, McLean BA, Basu R, Das SK, Ramprasath T, et al. ACE2 deficiency worsens epicardial adipose tissue inflammation and cardiac dysfunction in response to diet-induced obesity. *Diabetes*. 2016;65(1):85-95.
215. Joshi T, Singh AK, Haratipour P, Sah AN, Pandey AK, Naseri R, et al. Targeting AMPK signaling pathway by natural products for treatment of diabetes mellitus and its complications. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(10):17212-31.
216. Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell metabolism*. 2009;9(5):407-16.
217. Di W, Lv J, Jiang S, Lu C, Yang Z, Ma Z, et al. PGC-1: The Energetic Regulator in Cardiac Metabolism. *Curr Issues Mol Biol*. 2018;28:29-46.
218. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*. 2006;30(4):145-51.
219. Moreno-Santos I, Pérez-Belmonte LM, Macías-González M, Mataró MJ, Castellano D, López-Garrido M, et al. Type 2 diabetes is associated with decreased PGC1 α expression in epicardial adipose tissue of patients with coronary artery disease. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14(1):1-9.
220. Zhloba A, Subbotina T, Alekseevskaya E, Moiseeva O, Gavriluk N, Irtyuga O. The level of circulating PGC1 α in cardiovascular disease. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2016;62(2):198-205.
221. Thirupathi A, De Souza CT. Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise. *Journal of physiology and biochemistry*. 2017;73(4):487-94.

222. Doukbi E, Soghomonian A, Sengenès C, Ahmed S, Ancel P, Dutour A, et al. Browning Epicardial Adipose Tissue: Friend or Foe? *Cells*. 2022;11(6):991.
223. Sacks HS, Fain JN, Holman B, Cheema P, Chary A, Parks F, et al. Uncoupling protein-1 and related messenger ribonucleic acids in human epicardial and other adipose tissues: epicardial fat functioning as brown fat. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(9):3611-5.
224. Moslehi E, Minasian V, Sadeghi H. Alterations in PGC-1 α and UCP1 gene expression in epicardial adipose tissue and serum orexin-a following aerobic exercise in high-fat diet induced obesity of male wistar rats. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2020;22(1):92-100.
225. D'Onofrio N, Servillo L, Balestrieri ML. SIRT1 and SIRT6 signaling pathways in cardiovascular disease protection. *Antioxidants & redox signaling*. 2018;28(8):711-32.
226. Askin L, Tibilli H, Tanriverdi O, Turkmen S. The relationship between coronary artery disease and SIRT1 protein. *Northern Clinics of İstanbul*. 2020;7(6):631.
227. Khanahmadi M, Manafi B, Tayebinia H, Karimi J, Khodadadi I. Downregulation of Sirt1 is correlated to upregulation of p53 and increased apoptosis in epicardial adipose tissue of patients with coronary artery disease. *Excli j*. 2020;19:1387-98.
228. Liang F, Kume S, Koya D. SIRT1 and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*. 2009;5(7):367-73.
229. Safarpour P, Daneshi-Maskooni M, Vafa M, Nourbakhsh M, Janani L, Maddah M, et al. Vitamin D supplementation improves SIRT1, Irisin, and glucose indices in overweight or obese type 2 diabetic patients: a double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. *BMC Fam Pract*. 2020;21(1):26.

230. Khalili L, Alipour B, Asghari Jafar-Abadi M, Faraji I, Hassanililou T, Mesgari Abbasi M, et al. The Effects of *Lactobacillus casei* on Glycemic Response, Serum Sirtuin1 and Fetuin-A Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Controlled Trial. *Iran Biomed J.* 2019;23(1):68-77.
231. Wu Y, Zhang A, Hamilton DJ, Deng T. Epicardial fat in the maintenance of cardiovascular health. *Methodist DeBaakey cardiovascular journal.* 2017;13(1):20.
232. Li J-J, Qin X-W, Li Z-C, Zeng H-S, Gao Z, Xu B, et al. Increased plasma C-reactive protein and interleukin-6 concentrations in patients with slow coronary flow. *Clinica Chimica Acta.* 2007;385(1-2):43-7.
233. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology.* 2006;72(11):1493-505.
234. Baker A, Harte A, Howell N, Pritlove D, Ranasinghe A, Da Silva N, et al. Epicardial adipose tissue as a source of nuclear factor- κ B and c-Jun N-terminal kinase mediated inflammation in patients with coronary artery disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2009;94(1):261-7.
235. Sedaia E, Revenco V, Gutan I, Ochisor V, Vascenco A. The role of epicardial fat thickness and lipid profile in right ventricular remodeling in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 2020;315:e202.
236. Sato T, Aizawa Y, Yuasa S, Kishi S, Fuse K, Fujita S, et al. The effect of dapagliflozin treatment on epicardial adipose tissue volume. *Cardiovascular diabetology.* 2018;17(1):1-9.
237. Chumakova G, Gritsenko O, Gruzdeva O, Dyleva Y. Analysis of probable lipotoxic damage and myocardial fibrosis in epicardial obesity. *Aging (Albany NY).* 2021;13(11):14806.

238. Elton TS, Selemon H, Elton SM, Parinandi NL. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*. 2013;532(1):1-12.
239. Fitzsimons S, Oggero S, Bruen R, McCarthy C, Strowitzki MJ, Mahon NG, et al. microRNA-155 is decreased during atherosclerosis regression and is increased in urinary extracellular vesicles during atherosclerosis progression. *Frontiers in immunology*. 2020:3001.
240. Lingappan K. NF- κ B in Oxidative Stress. *Curr Opin Toxicol*. 2018;7:81-6.
241. Lin B, Zhao H, Li L, Zhang Z, Jiang N, Yang X, et al. Sirt1 improves heart failure through modulating the NF- κ B p65/microRNA-155/BDNF signaling cascade. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(10):14482.
242. Huang Y, Liu Y, Li L, Su B, Yang L, Fan W, et al. Involvement of inflammation-related miR-155 and miR-146a in diabetic nephropathy: implications for glomerular endothelial injury. *BMC nephrology*. 2014;15(1):1-12.
243. Pfeiffer D, Roßmanith E, Lang I, Falkenhagen D. miR-146a, miR-146b, and miR-155 increase expression of IL-6 and IL-8 and support HSP10 in an In vitro sepsis model. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179850.
244. Hu Y-Y, Dong W-D, Xu Y-F, Yao X-D, Peng B, Liu M, et al. Elevated levels of miR-155 in blood and urine from patients with nephrolithiasis. *BioMed Research International*. 2014;2014.
245. Scaravilli M, Porkka KP, Brofeldt A, Annala M, Tammela TL, Jenster GW, et al. MiR-1247-5p is overexpressed in castration resistant prostate cancer and targets MYCBP2. *The Prostate*. 2015;75(8):798-805.
246. Zhang P, Fan C, Du J, Mo X, Zhao Q. Association of miR-1247-5p expression with clinicopathological parameters and prognosis in breast cancer. *International journal of experimental pathology*. 2018;99(4):199-205.

247. Tran K-V, Tanriverdi K, Aurigemma GP, Lessard D, Sardana M, Parker M, et al. Circulating extracellular RNAs, myocardial remodeling, and heart failure in patients with acute coronary syndrome. *Journal of Clinical and Translational Research*. 2019;5(1):33.
248. Li N, Kalyanasundaram A, Artiga EJ, Hansen BJ, Feather A, Rozenberg G, et al. Heart Failure Induced Alteration of MicroRNAs Associated With Down-Regulation of Neuronal Sodium Channel NaV1.6 May Cause Human Sinoatrial Node Dysfunction. *Circulation*. 2019;140(Suppl_1):A16332-A.
249. Tait S, Baldassarre A, Masotti A, Calura E, Martini P, Vari R, et al. Integrated transcriptome analysis of human visceral adipocytes unravels dysregulated microRNA-long non-coding RNA-mRNA networks in obesity and colorectal cancer. *Frontiers in oncology*. 2020:1089.
250. Baraniskin A, Birkenkamp-Demtroder K, Maghnouj A, Zöllner H, Munding J, Klein-Scory S, et al. MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL. *Carcinogenesis*. 2012;33(4):732-9.
251. Jia Z, Wang K, Wang G, Zhang A, Pu P. MiR-30a-5p antisense oligonucleotide suppresses glioma cell growth by targeting SEPT7. *PloS one*. 2013;8(1):e55008.
252. Wang K, Jia Z, Zou J, Zhang A, Wang G, Hao J, et al. Analysis of hsa-miR-30a-5p expression in human gliomas. *Pathology & Oncology Research*. 2013;19(3):405-11.
253. Wei W, Yang Y, Cai J, Cui K, xian Li R, Wang H, et al. MiR-30a-5p suppresses tumor metastasis of human colorectal cancer by targeting ITGB3. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;39(3):1165-76.
254. Xiong J, Wei B, Ye Q, Liu W. MiR-30a-5p/UBE3C axis regulates breast cancer cell proliferation and migration. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019;516(3):1013-8.

255. Jadideslam G, Ansarin K, Sakhinia E, Babaloo Z, Abhari A, Ghahremanzadeh K, et al. Diagnostic biomarker and therapeutic target applications of miR-326 in cancers: A systematic review. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(12):21560-74.
256. Wu Y-X, Xu R-Y, Jiang L, Chen X-Y, Xiao X-J. MicroRNA-30a-5p Promotes Chronic Heart Failure in Rats by Targeting Sirtuin-1 to Activate the Nuclear Factor- κ B/NOD-Like Receptor 3 Signaling Pathway. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2022:1-12.
257. Weale CJ, Matshazi DM, Davids SF, Raghubeer S, Erasmus RT, Kengne AP, et al. Circulating miR-30a-5p and miR-182-5p in prediabetes and screen-detected diabetes mellitus. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2020;13:5037.
258. Xian Z, Hu B, Wang T, Cai J, Zeng J, Zou Q, et al. CircABCB10 silencing inhibits the cell ferroptosis and apoptosis by regulating the miR-326/CCL5 axis in rectal cancer. *Neoplasma*. 2020;67(5):1063-73.
259. Moya L, Meijer J, Schubert S, Matin F, Batra J. Assessment of miR-98-5p, miR-152-3p, miR-326 and miR-4289 expression as biomarker for prostate cancer diagnosis. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(5):1154.
260. Pan Y-J, Wan J, Wang C-B. MiR-326: promising biomarker for cancer. *Cancer Management and Research*. 2019;11:10411.
261. Zhang J, Wei X, Zhang W, Wang F, Li Q. MiR-326 targets MDK to regulate the progression of cardiac hypertrophy through blocking JAK/STAT and MAPK signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*. 2020;872:172941.
262. Danaii S, Shiri S, Dolati S, Ahmadi M, Ghahremani-Nasab L, Amiri A, et al. The association between inflammatory cytokines and miRNAs with slow coronary flow phenomenon. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2020:56-64.



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİTOKONDİRİ METABOLİZMASINDA ROL ALAN AMPK YOLAĞI
İLE İLİŞKİLİ MİKORNA VE ADAY GENLERİN ANLATIM
DÜZEYLERİNİN KORONER ARTER HASTALARINDA
İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 6	% 2	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	aging-us.com İnternet Kaynağı	<% 1