

764729

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KORONER ATEROSKLEROZ ETİYOLOJİSİ İLE KORONER
BYPAS OLAN HASTALARDA
METİLEN TETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ
GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Müzeyyen İZMİRLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç.Dr. Davut ALPTEKİN

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TF2003YL8 nolu proje
olarak desteklenmiştir.**

Tez No:.....

ADANA – 2005

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Koroner Ateroskleroz Etiyolojisi ile Koroner Bypass Olan Hastalarda Metilen Tetrahydrofolat Redüktaz Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22/09/2005




Doç. Dr. Davut ALPTEKİN

Çukurova Üniversitesi



Prof. Dr. Mülkiye KASAP
Çukurova Üniversitesi



Prof. Dr. M. Şah TOPÇUOĞLU
Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun 19.10.2005 tarih ve 22/14-3.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Sait POLAT

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde beni destekleyen, yönlendiren, tez çalışmalarımın her aşamasında bilimsel ve sosyal katkılarını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Davut ALPTEKİN'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Çalışmalarımızda bize destek veren ve tez örneklerimizin sağlanmasında yardımcı olan Göğüs-Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Şah TOPÇUOĞLU'na ve çalışmamız sırasında desteğini esirgemeyen Mersin Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan, başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Mülkiye KASAP olmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerimize teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Gerek laboratuvar, gerekse ders aşamasında her türlü desteklerini esirgemedikleri için, Araş. Gör. Ali İrfan GÜZEL ve Uzman Dr. Ayfer PAZARBAŞI'na teşekkür ederim. Eğitimim süresinde manevi desteklerini esirgemeyen Acil Radyolojideki değerli nöbet arkadaşlarıma da içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni bu günlere getiren aileme, manevi desteklerini her zaman hissettirdikleri ve hep yanımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER ve TABLOLAR DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz Enzimi	3
2.1.1. Homosistein	4
2.2. Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz Geni ve Gen Ürünleri	6
2.3. Varyant MTHFR Tipleri	8
2.4. MTHFR'nin Tarihçesi	10
2.5. MTHFR'nin Klinik Önemi	11
2.5.1. Koroner Ateroskleroz	11
2.5.1.1. Koroner Aterosklerozun Biyolojik Mekanizması	13
2.5.1.2. Etiyolojisi	15
2.5.1.3. Aterosklerozun İnsidansı ve Prevalansı	16
2.5.1.3.1. Türkiye'de Ateroskleroza Bağlı Olayların İnsidans ve Prevalansı	17
2.5.1.4. Aterosklerozun Genetiği	17
2.5.1.4.1. Klasik Risk Faktörlerini Etkileyen Genetik Değişiklikler:	18
2.5.1.4.1.1. Lipoprotein Metabolizması	18
2.5.1.4.1.1.1. HDL (Yüksek Dansiteli Lipoprotein)	18
2.5.1.4.1.1.2. LDL (Düşük Dansiteli Lipoprotein)	18
2.5.1.4.1.1.3. Trigliseridler	18
2.5.1.4.1.2. Hipertansiyon	19
2.5.1.4.1.2.1. Monogenik Sendromlar	19
2.5.1.4.1.2.2. Poligenik Sendromlar	19
2.5.1.4.1.3. Diyabetis Mellitus ve İnsülin Rezistansı	19
2.5.1.4.2. Damar Duvarı ve İnflamatuvar Yanıtı Etkileyen Genetik Değişiklikler	20
2.5.1.4.3. Yeni Risk Faktörlerini Etkileyen Genetik Değişiklikler	20

2.5.1.4.3.1. Koagülasyon ve Trombozu Etkileyen Genler	20
2.5.1.4.3.2. Homosistein	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.2. Gereç	21
3.3. Kullanılan Başlıca Cihazlar ve Teknik Malzemeler	22
3.4. Yöntem	23
3.4.1. DNA İzolasyonu	23
3.4.1.1. Doymuş Tuz Çözeltisi ile Çöktürme Yöntemi	23
3.4.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi	24
3.4.3. MTHFR Geninin 677C→T ve 1298 A→C Polimorfizmleri İçin PCR Amplifikasyonu	25
3.4.3.1. MTHR Geni 677C→T ve 1298 A→C Polimorfizmleri İçin Kullanılan Primerler:	25
3.4.3.2. MTHFR geninin 677C→T ve 1298 A→C Polimorfizmleri İçin Kullanılan PCR amplifikasyonu	26
3.4.4. PCR Ürününün Elektroferezi	28
3.4.5. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi ile PCR Ürünlerinin Kesimi	29
3.4.6. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroferezi ve Yorumlanması	29
3.4.6.1. Jelin Değerlendirilmesi	30
3.5. İstatistik Analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1. Restriksiyon Enzimi Kesimleri	32
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	52
7. KAYNAKLAR	53
EKLER	59
EK-1. Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Hazırlanışı	59
1.1. Lizis Tamponu	59
1.2. Fizyolojik Tampon	59
1.3. TE-9	60
1.4. SDS (Sodyum Dedosil Sülfat) Solüsyonu	60

1.5. TE Tamponu (pH 7.0 ve 8.0)	60
EK-2. PCR	61
2.1. Bir PCR Reaksiyonu İçin Gerekli olan Bileşenler ve Fonksiyonları	62
2.1.1. Kalıp Genomik DNA	62
2.1.2. Primerler	62
2.1.3. Reaksiyon Tamponu	62
2.1.4. DNA Polimeraz	62
2.1.5. Deoksitükleotid Trifosfatlar (dNTPs)	63
2.2. PCR Reaksiyonun Hazırlanması	63
EK-3. Jel Elektroforezi	64
3.1. DNA'nın moleküler büyüklüğü	64
3.2. Agaroz konsantrasyonu	64
3.3. DNA'nın konformasyonu	65
3.4. Uygulanan voltaj	65
3.5. Elektrik akımının yönü	65
3.6. Baz kompozisyonu ve ısı	66
3.7. Boyaların etkisi	66
3.8. Elektroforez tamponunun kompozisyonu	66
EK-4. Agaroz Jelin Hazırlanması	68
4.1. Yükleme Tamponu (6X)	68
EK-5. Kullanılan Enzimler ve Tampon Sistemleri	69
5.1. Restriksiyon Endonükleazlar	69
EK-6. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	70
6.1. %30 Poliakrilamid	71
6.2. %25 Amonyum Per Sulfat (APS)	71
6.3. 5X TBE Tamponu (pH 8.0)	72
6.4. Ethidium Bromid (EtBr= 10mg/ml)	72
ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1	MTHFR enzimi ve fonksiyonu	3
Şekil 2	Kromozom 1	6
Şekil 3	Tıkanmış bir damar görüntüsü	12
Şekil 4	677 C→T polimorfizmi için çalışılan örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü	31
Şekil 5	1298 A→C polimorfizmi için çalışılan örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü	32
Şekil 6	677 C→T polimorfizmi için 10, 11, 33, 35, 36, 37, 38, 39 nolu hasta örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü.	32
Şekil 7	677 C→T polimorfizmi için 34, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 nolu hasta örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü.	33
Şekil 8	677 C→T polimorfizmi için 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 4, 15 nolu kontrol örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü.	33
Şekil 9	677 C→T polimorfizmi için 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27 nolu kontrol örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü.	33
Şekil 10	677 C→T polimorfizmi için 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 36 nolu kontrol örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü.	34
Şekil 11	677 C→T polimorfizmi için 25, 34, 37, 38, 47, 48, 49, 50, 51, 52 nolu kontrol örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü..	34
Şekil 12	1298 A→C polimorfizmi için 8, 9, 14, 16, 20, 24, 26, 30 nolu hasta örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü.	35
Şekil 13	1298 A→C polimorfizmi için 25, 26, 27, 28, 29 nolu hasta örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü.	35
Şekil 14	1298 A→C polimorfizmi için 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nolu hasta örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü.	35
Şekil 15	1298 A→C polimorfizmi için 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 nolu kontrol örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü.	36
Şekil 16	677 C→T ve 1298 A→C polimorfizm allellerinin hasta ve kontrol grupları içinde dağılımı.	39
Şekil 17	Hasta ve kontrol gruplarının 677 C→T polimorfizm grupları arasındaki ilişki.	39
Şekil 18	Hasta ve kontrol gruplarının 1298A→C polimorfizm grupları arasındaki ilişki.	40
Şekil 19	Cinsiyete göre 677 C→T polimorfizminin dağılımı.	41
Şekil 20	1298 A→C polimorfizminin cinsiyete göre dağılımı.	42

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

Şekil 21	677 C→T polimorfizmi ile tıkalı damar sayısının ilişkisi.	43
Şekil 22	1298 A→C polimorfizmi ile tıkalı damar sayısı arasındaki ilişki.	44
Şekil 23	677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmleri ile gruplandırılmış tıkalı damar arasındaki ilişki.	45
Şekil 24	Gruplandırılmış genotipler ile gruplandırılmış tıkalı damar sayıları arasındaki ilişki.	46



ÇİZELGELER ve TABLOLAR DİZİNİ

Çizelge 1	Ekzon 4	25
Çizelge 2	Ekzon 7	26
Çizelge 3	677 C→T polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu.	27
Çizelge 4	1298 A→C polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu.	27
Çizelge 5	Agoroz ve akrilamid konsantrasyonları ve ayırabildikleri DNA büyüklükleri.	64
Çizelge 6	Restriksiyon endonükleazlar.	69
Çizelge 7	Akrilamid.	70
Tablo 1	Ateroskleroz risk faktörleri. polimorfizm genotipleri	16
Tablo 2	Hasta ve kontrol grubunun 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizm genotipleri	36
Tablo 3	Cinsiyetin hasta ve kontrol grupları içinde dağılımı.	38
Tablo 4	677 C→T ve 1298 A→C polimorfizminin hasta ve kontrol grupları içerisinde dağılımı.	38
Tablo 5	Gruplandırılmış 677 C→T polimorfizminin genotipleri ile hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı ve arasındaki ilişki.	39
Tablo 6	Gruplandırılmış 1298 A→C polimorfizmi ile hasta ve kontrol grupları arasındaki ilişki.	40
Tablo 7	Cinsiyet gruplarına göre 677 C→T polimorfizminin dağılımı.	41
Tablo 8	1298 A→C polimorfizminin cinsiyete göre dağılımı.	41
Tablo 9	Hasta ve kontrol grubunda sigara ve alkol kullanımının dağılımı.	42
Tablo 10	677 C→T polimorfizminin tıkalı damar sayısına göre dağılımı.	43
Tablo 11	1298 A→C polimorfizmi ile damar sayısı arasındaki ilişki.	44
Tablo 12	677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmleri ile gruplandırılmış tıkalı damar arasındaki ilişki.	45
Tablo 13	Gruplandırılmış genotipler ile gruplandırılmış tıkalı damar sayıları arasındaki ilişki.	46

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
A	Amper
ABCA1 geni	“ATP Binding Cassette Sub-Family A (ABC1) üye 1”
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACE	Anjiyotensin Converting Enzim
AD	Anabilim Dalı
APS	Amonyum Perstüfat
AT I	Anjiyotensin I
bç	Baz çifti
BHMT	Betain-Homosistein Metiltransferaz
C	Sitozin
CBS	Sistasyon-β-Sentaz
C terminal	Karboksi terminal
dUMP	Deoksi Urasil Mono Fosfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	deoksi Nükleotid Tri Fosfat
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
G	Guanin
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
IL-8	İnterlökin 8
IRS-1	“İnsulin Rezistans Substrat 1”
kb	Kilobaz
kD	Kilodalton
L	Litre
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
μ	Mikro
MCP-I	Monosit Kemotaktik Protein I
MgCl ₂	Mağnezyum Klorür
ml	Mililitre
mRNA	“Messenger RNA”
MS	Metiyonin Sentaz
MTHF	Metilen Tetrahidrofolat
MTHFR	Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
N terminal	Amino terminal
NaCl	Sodyum Klorür
NADH	Nikotin Amid Dinükleotidin indirgenmiş hali
NADPH	Nikotin Amid Dinükleotid Fosfatın indirgenmiş hali
NF-B	Nükleer Faktör-B
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksir Sentaz
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PAİ-I	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-I
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

RNA	Ribo Nükleik Asit
S	Swedberg
SAH	S-Adenozil Homosistein
SAM	S-Adenozil Metiyonin
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
ssDNA	Tek İplikli DNA
T	Timin
TBE	Tris Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
TF	Doku Faktörü
THF	Tetrahidrofolat
TEKHARF	Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı Risk Faktörleri
TEMED	N, N, N, N'-Tetra Metilen Diamin
TM	Trombomodülin
Tm	Erime ısısı
TM-protein C	Trombomodülin-protein C
TNF α	Tümör Nekroz Faktörü alfa
t-PA	doku Plazminojen Aktivatörü
UTR	Translasyonu Olmayan Bölge
UV	Ultra Viyole
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
V	Volt

ÖZET

Koroner Ateroskleroz Etiyolojisi ile Koroner Bypass Olan Hastalarda Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması

Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) enzimi; 5,10 Metilen Tetrahidrofolat'ın 5 Metil Tetrahidrofolat'a dönüşümünü katalize eden bir enzimdir. MTHFR homosisteinin metilasyonu ve nükleotid biyosentezi gibi pek çok biyokimyasal yolda bulunan folat metabolizmasında rol oynar. MTHFR, DNA sentezi ve metilasyon reaksiyonları arasındaki dengeyi sağlar. Ayrıca bu enzim, kardiyovasküler hastalıklar için bir risk etmeni olan plazma homosistein seviyesini de etkilemektedir. MTHFR geni, 1p36.3'de haritalanmış bir gendir. İnsan MTHFR geninin cDNA'sı kısmi olarak 1994'te izole edilmiş ve cDNA sekansının yaklaşık 2.2 kilobaz (kb) büyüklüğünde olduğu ve 11 ekzon içerdiği saptanmıştır.

Bu çalışmanın amacı koroner ateroskleroz hastalığı ile MTHFR 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Bu amaçla polimorfizmlerin bulunduğu bölgeler Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile amplifiye edilmiştir. Polimorfizmler uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmalar kontrollü olarak yürütülmüştür.

Bu çalışmada MTHFR 677 C→T ve MTHFR 1298 A→C polimorfizmleri ile koroner ateroskleroz hastalığı (677 C→T için; p=0.240, 1298 A→C için; p=0.278), cinsiyet (677 C→T için; p=0.961, 1298 A→C için; p=0.980), tıkalı damar sayısı (677 C→T için; p=0.181, 1298 A→C için; p=0.747) arasındaki farkın önemli olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca, koroner ateroskleroz hastalığı ile sigara ve alkol tüketimi arasındaki farkın da anlamlı olmadığı bulunmuştur (sigara için; p=0.713, alkol için; p=0.429).

Anahtar Sözcükler: Homosistein, Koroner ateroskleroz, Metilen tetrahidrofolat redüktaz enzimi, Metilen tetrahidrofolat redüktaz geni.

ABSTRACT

Investigation of Methylene Tetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphism with Coronary Atherosclerosis Etiology at Coronary By-pass Patients

Methylen tetrahydrofolate reductase (MTHFR) is an enzyme that catalyses the conversion of 5,10 methylen tetrahydrofolate to 5 methyl tetrahydrofolate. MTHFR plays a role in the metabolism of folates which place in several biochemical pathways such as methylation of homocysteine and biosynthesis of nucleotides. MTHFR provides the balance between DNA synthesis and methylation reactions. Furthermore this enzyme also affects plasma homocysteine level which is a risk factor for cardiovascular diseases. MTHFR gene has been mapped to 1p36.3. cDNA of human MTHFR gene isolated partially in 1994 and sequence of the cDNA was approximately 2,2 kb and consisted of 11 exon.

The aim of this study was to investigate relationship between coronary atherosclerosis and MTHFR 677 C→T /1298 A→C polymorphisms. For this purpose, areas where polymorphisms located in, was amplified with Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Polymorphisms were determined by using available restriction enzymes with Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method. Present study was progressed with control group.

In this study, it was observed that there was no significant difference between MTHFR 677 C→T MTHFR, 1298 A→C and coronary atherosclerosis (for 677 C→T; $p=0.240$, for 1298 A→C; $p=0.278$), gender (for 677 C→T; $p=0.961$, for 1298 A→C için; $p=0.980$), the number of atherosclerotic arteries (for 677 C→T; $p=0.181$, for 1298 A→C; $p=0.747$). It was found that there was no significant difference between cigarette/ alcohol intake and coronary atherosclerosis (for cigarette intake; $p=0.713$, for alcohol intake; $p=0.429$).

Key Words: Coronary atherosclerosis, Homocysteine, Methylen tetrahydrofolate reductase enzyme, Methylen tetrahydrofolate reductase gene.

1. GİRİŞ

Folat döngüsü içerisinde yer alan 5,10 Metilen Tetrahidrofolat (MTHF), Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) enziminin katalizörlüğü ile 5-Metil Tetrahidrofolat (THF)'a dönüşür. Aynı zamanda 5 Metil THF, homosisteinin metiyonine remetilasyonu sırasında majör karbon vericisi olarak görev yapar. Burada görev yapan enzim metiyonin sentaz (MS)'dir. Metiyonin de genel metil vericisi olarak görev yapan S-Adenozil Metiyonin (SAM)'e dönüştürülür. Döngüde bundan sonraki aşamada S-Adenozil Homosistein (SAH) oluşur ve daha sonra da homosistein hidrolaz enziminin katalize ettiği reaksiyon sonucunda homosistein meydana gelir¹.

Sonuç olarak; MTHFR, DNA sentezi ve metilasyon reaksiyonları arasındaki dengeyi sağlamaktadır. Ayrıca bu enzim, kardiyovasküler hastalıklar için bir risk etmeni olan plazma homosistein seviyesini de etkilemektedir¹.

MTHFR aktivitesini etkileyen iki tip kusur vardır. Bu kusurlar sonucunda, homosistinüria ile birlikte şiddetli nörolojik ve vasküler anormallikler gözlenmiştir. 677. nükleotiddeki C→T polimorfizmi sonucunda, rezidüel enzim aktivitesinin %35-45 arasında gerçekleştiği belirlenmiştir². Bu varyant tip Kuzey Amerika ve Avrupalıların %5 ile 20'sinde homozigot olarak gözlenmektedir¹. Bu gende görülen ikinci polimorfizm 1298. nükleotiddedir. Bu nükleotidde A→C değişikliği söz konusudur ve bu değişiklik enzim aktivitesini az miktarda etkilemektedir³. 1298 A→C polimorfizmi için populasyon frekansının; Asya populasyonunda %17-19, batı Avrupa'da %27-36 arasında olduğu bulunmuştur⁴.

MTHFR polimorfizi, kardiyovasküler hastalıkların yanında nöral tüp defektleri içinde bir risk faktörüdür⁵. Ayrıca preeklamsi ve spontan abortus gibi gebelik komplikasyonları için de risk oluşturduğu gösterilmiştir⁶. Son zamanlarda yapılan çalışmalar neticesinde yarı damaklılık⁷, Down sendromu⁸ ve konjenital kalp defektlerinde⁹ de bu polimorfizmin rol oynadığı görülmüştür.

MTHFR 677 C→T polimorfizmi, folat miktarı da yeterli olduğu zaman kolon kanseri¹⁰, çocukluk¹¹ ve yetişkinlik dönemi lösemilerde koruyucu etki gösterebilmektedir⁵. Burada MTHFR enzimi eksikliği olduğu zaman 5,10 MTHF, 5 Metil THF'ye tamamen dönüşemeyerek birikir. 5,10 MTHF'nin, timidin sentezinde kullanılması sonucunda DNA

sentezi ve DNA tamiri için yeterli nükleotid sağlanır. Sonuç olarak DNA'daki urasil eşleşmeleri azalır. Bu da, kırık taşımayan sağlam kromozom sentezi anlamına gelmektedir ve sonuç olarak kansere karşı koruyucu bir etki oluşmaktadır¹².

Sonuç olarak, homosisteinin metiyonine dönüşümü, pürin-primidin sentezi (DNA ve RNA biosentezi) ve metilasyon reaksiyonlarının içerisinde bulunan MTHFR enzimi, önemli bir kavşak noktasında görev yapmaktadır¹³. Bu yüzden MTHFR enzim aktivitesinin azalması sonucunda çeşitli metabolik problemler meydana gelmektedir. Bunlardan bir tanesi hücre içerisinde homosistein birikimidir ve hücre için toksik olan bu madde koroner ateroskleroza neden olmaktadır¹⁴. Koroner ateroskleroz ise dünyadaki ölüm olaylarının %46'sından sorumlu, yaygın görülen bir hastalıktır¹⁵.

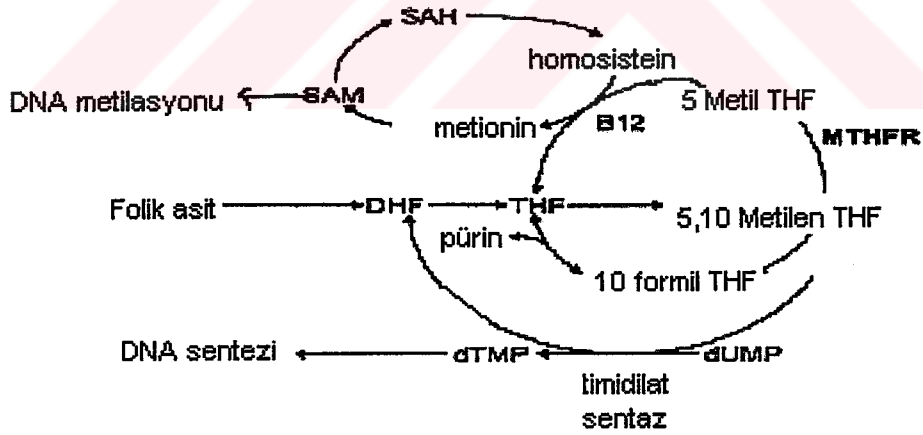
Bu çalışmada, koroner aterosklerozun sık görüldüğü Çukurova Bölgesi'nde tartışmalı bir risk etmeni olan MTHFR 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmlerinin koroner aterosklerozla olan ilişkisini, kesin tanısı koroner anjiyografi ve biyokimyasal yöntemler ile belirlenen bu hastalıkta genetik teşhisin tanı koymadaki yerini ve Çukurova bölgesi için bu polimorfizmlerin frekanslarını belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz Enzimi

Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) enzimi; 5,10 Metilen Tetrahidrofolat (MTHF)'in 5 Metil Tetrahidrofolat (THF)'a dönüşümünü katalize eden bir enzimdir¹. MTHFR, folat metabolizmasında önemli bir rol oynar. Folat ise homosisteinin metilasyonu ve nükleotid sentezi gibi pek çok biyokimyasal yolda görev yapan, bir vitamindir⁴.

5,10 MTHF'in 5 THF'a remetilasyonu sonucunda; homosistein, B₁₂'ye bağımlı metiyonin sentaz tarafından metiyonine dönüşür. Burada 5 Metil THF majör karbon kaynağı olarak görev yapar. Oluşan metiyonin metil transferaz için metil grubu vericisi olarak yardım eden S-Adenozil Metiyonin (SAM)'e dönüşür. Bu reaksiyonda oluşan diğer bir ürün S-Adenozil Homosistein (SAH)'dir. Bu da S-adenozil homosistein hidrolaz tarafından homosistein ve adenozeine hidrolizlenir. Ayrıca, 5,10 metilen THF, DNA sentezinde dUMP'nin timidilata dönüşümü için gereklidir (Şekil 1)¹⁶.



Şekil 1. MTHFR enzimi ve fonksiyonu¹⁶

Normal memeli hücrelerinde folat önemli bir besin kaynağıdır. Tek karbon fragmantlarının taşınmasında görev yapan folat, DNA, RNA ve protein metilasyonu için gerekli olan metil gruplarını sağlamaktadır. Folat çok önemli bir kavşak noktasında bulunmakta ve burada MTHFR, metionin, SAM ve DNA sentezi arasındaki dengeyi sağlamaktadır. Bulunduğu bu noktada SAM, MTHFR'nin inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Diyetle protein alımının yüksek olduğu durumlarda metionin SAM'a dönüştürülerek denge sağlanmaktadır¹³.

Sonuç olarak homosisteinin metiyonine dönüşümü, pürin-primidin sentezi (DNA ve RNA biosentezi) ve metilasyon reaksiyonlarının içerisinde bulunan MTHFR enzimi, önemli bir kavşak noktasında görev yapmaktadır¹³. Bu yüzden MTHFR enzim aktivitesinin azalması sonucunda çeşitli metabolik problemler meydana gelmektedir. Bunlardan bir tanesi hücre içerisinde homosistein birikimidir ve bu problem koroner ateroskleroza neden olmaktadır¹⁴.

2.1.1. Homosistein

Hücre içerisindeki fazlalığı toksik olan ve birikimi damar endotelinin bozulmasına neden olan homosistein, kükürt içeren bir aminoasittir. Esansiyel bir aminoasit olan metionin metabolizmasında bir ara ürün olarak meydana gelir. Homosistein sentezindeki ilk basamak; metioninden önemli bir metil vericisi olan S-adenozilmetionin (SAM) oluşumudur. SAM, S-adenozilhomosisteine dönüştürülür. S-adenozilhomosistein ise hidroliz olarak homosistein ve adozin oluşturur. Metionin göreceli eksikliğine veya fazlalığına bağlı olarak homosistein daha sonra transsülfürasyon veya remetilasyon yollarına girebilir. Metionin depoları yeterli ise veya sistein sentezi gerektiği hallerde homosistein, vitamin B₆ bağımlı enzimler olan sistasyon-β-sentaz (CBS) ve γ-sistatyoninazin kataliz ettiği bir dizi tepkimeyle sisteine dönüştürüleceği transsülfürasyon yolağına girer. Metionin korunması gerekli ise, homosistein remetilasyon yolağına girer. Remetilasyon iki tepkimeden biri ile meydana gelebilir. Birinci tepkimede homosistein, metionine kobalamin (vitamin B₁₂) bağımlı metionin sentaz (MS) tarafından katalizlenen bir tepkime ile 5-metiltetrahidrofolattan bir metil grubunun aktarımı yolu ile dönüştürülür. 5-metiltetrahidrofolatın oluşumu, kofaktör olarak riboflavin (vitamin B₂) gerektiren metilentetrahidrofolat redüktaz

(MTHFR) tarafından katalizlenir. Diğer remetilasyon yolağı ise vitamin B₁₂ ve folattan bağımsız olarak çalışır. Ancak metil vericisi olarak betaini kullanır ve betain-homosistein metiltransferaz (BHMT) gerektirir^{17,18,19,20,21,22,23,24}.

Dolaşımdaki total homosistein, proteine bağılı olan ve olmayan kısımlardan meydana gelir. Bağılı biçim %80'i oluştururken; temel olarak albumine bağılıdır. Bağılı olmayan kısım fizyolojik pH'daki yükselmeye duyarlıdır. Kendisi ile bir dimer oluşturarak homosisteini meydana getirebilir veya diğer tiyollerle etkileşerek (temelde sisteinle etkileşerek) sistein-homosistein karışık disülfidini oluşturabilir. Homosisteinin sadece küçük bir miktarı plazmada serbest indirgenmiş formda bulunur^{20,24}.

Sağlıklı kişilerde açlık durumunda total plazma homosistein düzeyi için referans aralık 5-15 µmol/L'dir. Kang ve arkadaşları açlıktaki derişimlerine göre hiperhomositeinemi orta (5-15 µmol/L), ara (31-100 µmol/L) ve ağır (> 100 µmol/L) olarak üç gruba ayırmışlardır^{20,21,22,23,24,25}.

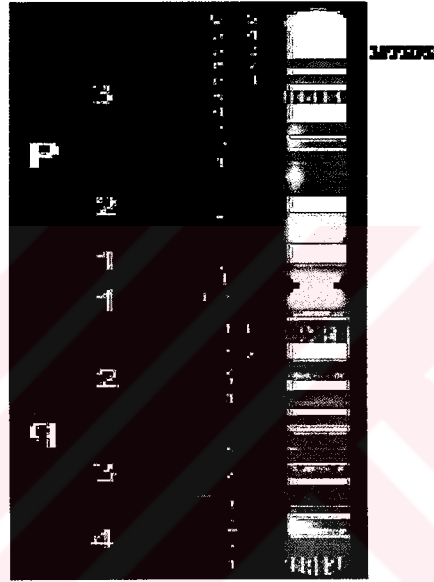
Plazma homosistein düzeyleri her iki cinste de ilerleyen yaşla birlikte artar. Erkeklerde homosistein düzeyi kadınlardan daha yüksektir. Çünkü östrojen, total homosistein derişimini beslenme ve kas kitlesinden bağımsız olarak düşürür. B vitaminlerinin düşük düzeyleri, sigara içimi, artmış kahve alımı, düşük folatlı diyetler plazma homosistein düzeylerinde artış yapar. Fiziksel aktivite, plazma homosistein düzeylerini azaltır. Uzun dönem aşırı alkol kullanımı folat ve B vitamini eksikliğine bağılı olarak plazma homosistein düzeylerini yükseltebilir. İlmli alkol tüketimi, daha düşük homosistein düzeyleri ile ilişkili olabilir^{17,19,20,21,22,24,26}.

Kronik böbrek yetmezliğinde, homosistein düzeylerinde 2-4 kat artış gözlenebilir. Böbrek nakli olan vakaların daha yüksek homosistein düzeylerine sahip olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Malignensiler, pernisiyöz anemi, hipotiroidizm ve iltihabi bağırsak hastalığı daha yüksek plazma homosistein düzeyleri ile ilişkili olabilir. Diyabetik hastalarda homosistein düzeyleri, glomerüler hiperfiltrasyon nedeni ile düşük veya normal olabilir. Damarsal hastalığın başlangıcı veya azalan glomerüler filtrasyon oranı, bu düzeylerin yükselmesine yol açabilir^{17,18,19,20,21,22,24}.

Artmış plazma homosistein düzeylerinin tıkalı damar hastalığı için bir risk etmeni olabileceğini güvenilir kanıtlar vurgulamaktadır. Homosistein düzeyinde 5 µmol/L'lik bir artış total kolesterol düzeyinde 20 mg/dl'lik artışa denk düzeyde kronik arter hastalığı riskini artırır^{16,19}.

2.2. Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz Geni ve Gen Ürünleri

MTHFR geni 1p36.3 de haritalanmış bir gendir (Şekil 2)^{27,28}. İnsan MTHFR geninin cDNA'sı 1994'te izole edilmiş ve cDNA sekansının yaklaşık 2.2 kb büyüklüğünde olduğu ve 11 ekzon içerdiği saptanmıştır²⁹. Bu genin ürünü, katalitik aktivitesi olan, 77 kD ağırlığında 656 aminoasitten oluşan bir proteindir¹³. Bazı dokularda 70 kD ağırlığında daha küçük izoformlarının da olduğu tanımlanmıştır³⁰. Western blot analizlerinde enzimin dokuya spesifik izoformlarının da olduğu anlaşılmıştır². 70 kD'luk izoformu yetişkin insanların karaciğerinde, fetüsün ise karaciğer ve böbreğinde bulunurken, 77 kD'luk izoformu diğer dokularda gözlenmiştir¹³.



Şekil 2. Kromozom 1²⁸

MTHFR ilk olarak domuzlarda çalışılmış ve bunun bir karaciğer enzimi olduğu anlaşılmıştır. Enzim sitoplazmik bir proteindir ve tripsin ile muamele edildiğinde 37 ve 40 kD'luk iki alt üniteye ayrılmaktadır. Fotometrik özelliklerine göre, C terminal bölge 8-azido-S-adenozil metionin olarak da isimlendirilmektedir. 37 kD'luk bölge C terminalini oluşturur ve bu bölge enzimin SAM regülatör bölgesidir. 40 kD'luk bölgede katalitik aktiviteyi gerçekleştiren N terminal bölgesini oluşturmaktadır¹³.

Goyette ve arkadaşları MTHFR geninin 2.8, 7.2 ve 9.8 kb büyüklüğünde üç tane mRNA'sı olduğunu bildirmişlerdir. Üç farklı mRNA olması, poliadenilasyon sinyal sekansları ve transkripsiyon başlangıç bölgelerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır²⁹.

MTHFR geni farelerde de çalışılmış ve 4. kromozomun distal bölgesinde olduğu tanımlanmıştır. 3.2 ve 7.5 kb büyüklüğünde iki MTHFR transkript ürünü olduğu tespit edilmiş ve farelerde tespit edilen bu ürünün insan MTHFR proteinine %90 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır¹³.

Hem insan hem de fare türünde MTHFR transkript ürünlerinin oluşumunda ve düzenlenmesinde alternatif poliadenilasyon formları vardır. Ökaryotik genler tek fonksiyonel poliadenilasyon sinyal sekansına sahip olmasına rağmen, MTHFR geni 3' UTR bölgesinde farklı poliadenilasyon bölgelerine sahiptir. Buna göre, alternatif poliadenilasyon şekillerine göre mRNA sentezlenir ve bunun sunucunda da gelişime göre değişen ve dokuya özel ekspresyonlar meydana gelebilmektedir. Örneğin testiste, benzer mRNA seviyesine sahip olmasına rağmen, farklı poliadenilasyondan dolayı 2.8 ve 7.2 kb büyüklüğünde iki farklı MTHFR ürünü elde edilebilmektedir. İnsan uzun MTHFR transkripti, AATAAA konsensus sinyali ile başlar. Daha kısa olan transkript te ise poliadenilasyon sinyal dizisi olmadan başlar. İnsan da 3' UTR 7.2 ve 9.8 kb uzunluğunda, fare de ise 7.5 kb uzunluğundadır. mRNA sekansı 2500 kişi üzerinde çalışılmış ve 3' UTR sekansının mRNA'nın %4'ünden daha büyük olduğu ve 3500 bp'den daha fazla baz çifti içerdiği ortaya çıkarılmıştır. mRNA'nın stabilizasyonunu sağlamada 3' UTR'nin ve 3' UTR ile ilişkisi olan steroid hormon reseptörlerinin kritik bir rolü vardır. Sonuç olarak farklı poliadenilasyon bölgelerine sahip MTHFR transkriptleri translasyonel seviyede düzenlenmektedir¹².

Pek çok mRNA'nın translasyonel düzenlenmesinde 5' UTR'nin de katkısı vardır. Bu konuda pek çok rapor verilmiştir. Bu bölgeye intrinsik yapısal elementler ya da represörlerin bağlanması ile mRNA'nın ribozomun 40S'lik subünitine bağlanması ve böylece transkripsiyonun devamı engellenir. Bunun sonucunda farklı büyüklükte MTHFR ürünleri elde edilir. Ayrıca farklı 5' UTR'lere sahip mRNA'ların olduğu da tanımlanmıştır. Uzun MTHFR mRNA transkriptinin 5' UTR'si 2.8 kb büyüklüğündedir. Bu bölge pek çok transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesini içermekte ve transkripsiyonun düzenlenmesini sağlamaktadır¹².

MTHFR geninin promoteri diğer genlere oranla daha az sayıda TATA'ya sahiptir. Tek karbon döngüsünde yer alan diğer enzimlerin genleri de bu şekildedir. Bu enzimler arasında metiyonin sentaz, metiyonin sentaz redüktaz, sistatyon β sentaz,

timidilat sentaz ve dihidrofolat redüktaz yer almaktadır. Bu tür promoterler zayıftır ve düşük kopya sayılı mRNA transkripsiyonuna sahiptir¹².

Goyette ve arkadaşları MTHFR geninin çeşitli upstream kontrol elementlerini tanımlamışlardır. Bunlardan biri Sp1 bağlanma bölgesi olup, GC'den zengindir ve bu bölge daha az TATA'ya sahip promoterlerin transkripsiyonunu düzenler. Sp1 seviyesi, hücre tipleri arasında ve gelişimin farklı evrelerinde çok büyük farklılığa sahiptir¹².

E.coli MTHFR enzimi ise 33 kD'luk homotetramer yapıdadır. Bu enzim de katalitik aktivite olarak, memelilerdeki gibi işlev görür. Fakat bunların SAM regülatör bölgesi yoktur. *E.coli* MTHFR geni ile insan MTHFR geninin N terminal bölgeleri yaklaşık %25 oranında benzerlik göstermektedir. Bu gözlemler, bakteri enziminin C terminal bölgesindeki regülatör bölgenin eksikliği ile de uyumlu olduğunu göstermiştir¹³.

Memeli ve bakteri enzimleri nonkovalent olarak bağlı FAD kofaktörüne sahiptir. FAD kofaktörü, NADPH ve NADH'daki hidrid iyonlarını, metilen tetrahidrofolata transferi sağlamaktadır. Burada memeliler NADPH kullanırken, bakteriler NADH kullanmaktadır¹³.

2.3. Varyant MTHFR Tipleri

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda MTHFR geninin varyantları olduğu bulunmuş ve homosistinüriyal hastalarda tanımlanmıştır. Bu gen varyantları *E.coli*'de de izole edilmiş ve bu varyantlarda iki önemli mutasyon noktası olduğu belirtilmiştir (677 C→T ve 1298 A→C). Spina bifida ve anensafalili hastalarda yapılan bir çalışmada 3. bir varyant olarak 1059T→C tespit edilmiştir^{4,5}.

Yaygın olarak 677 C→T ve 1298 A→C gen varyantları tanımlanmış olup diğer polimorfizmlerin ise 1059, 1317 ve 1793 bç noktalarında olduğu rapor edilmiştir. Bu polimorfizmler 677 C→T ve 1298 A→C varyantlarına göre daha az yaygındır. Ayrıca bu polimorfizmlerin henüz fonksiyonel ilişkisi araştırılmamıştır^{4,5}.

677 C→T polimorfizmi; ekzon 4'te yerleşmiştir ve 222. kodondaki alaninin valine dönüşümüne neden olur. Bu bölge enzimin amino terminal katalitik bölgesini oluşturur. MTHFR'nin kofaktörü olan FAD'ın bağlanma bölgesi MTHFR geninin 677. baz çiftinin belirlediği aminoasittir. 677 C→T mutasyonu sonucunda bu bağlanma

bölgesinde problem ortaya çıkar. MTHFR enziminin termolabil formu ile yabanıl formu FAD kofaktöründen ayrılma farklılıklarına göre karşılaştırıldığında, termolabil formunun enzim aktivitesinin daha hızlı azaldığı tespit edilmiştir. 677 TT genotipinin enzim aktivitesi yabani tipe göre %55-65 arasında azaldığı gözlenmiştir. Heterozigot (CT) genotipinin enzim aktivitesi ise %40 oranında azalmıştır. 677 C→T polimorfizmi ile enzim aktivitesi 46 °C'de %65, 37 °C'de %50-60 oranında düşer. Metilen tetrahidrofolat ürününün azalması ile homosisteininin metiyonine dönüşümü de azalır. Adenozilmetiyonin gereksiniminde metilasyon reaksiyonu için uygun olan metil gruplarında azalma olur. Bu gen kusuru olanların kan ve idrarında homosistein miktarı artar. Çünkü metiyonin teşekkülünde metil donörünün kaynağı azalır. Metilen tetrahidrofolatın azlığı yüzünden bu hastaların kanlarında metiyonin seviyesi yüksektir. Çünkü MTHF, MTHFR'nin substratıdır. Bu polimorfizmin popülasyon frekansı, Brezilya, Kanada ve Amerika'da %34-37 arasında, İtalya'da ise %18 oranındadır^{4,5}.

1298 A→C polimorfizmi; 7. ekzondadır. 429. kodondaki glutamat alanine dönüşür. Bu polimorfizm enzimin S-adenozil metiyonin regülatör bölgesini kodlayan nokta olan karboksi terminal bölgesinde meydana gelir. S-adenozil metiyonin bağlanma bölgesinin konformasyonel değişikliği enzim aktivitesini engeller. 1298 CC genotipine sahip MTHFR aktivitesinin %60 olduğu bildirilmiştir. 1298 A→C polimorfizmi için popülasyon frekansı; Asya popülasyonunda %17-19, batı Avrupa'da %27-36 arasında olduğu bulunmuş olup, Afrika ve Güney Amerika popülasyonlarındaki oranlarının ise küçük olduğu belirtilmiştir^{4,5}.

1317 T→C polimorfizmi; 1317. bazda timinin sitozine dönüşümü görülmektedir. Bu polimorfizm sonucunda aminoasit diziliminde bir değişiklik olmaz. Bu polimorfizmin allel frekansı 38 kişiden oluşan Kanada'lı kadınlardaki allel frekansı %59 olarak bildirilmiştir. Bu allelin frekansı Afrikalı Amerikan kadınları arasında ise %39 olarak bulunmuştur^{4,5}.

1793 G→A polimorfizmi; 594. kodonda arjinin glutamine dönüşür. Polonya-Rus-Alman Yahudileri arasında A allelinin frekansı %1, Afrikan-Amerikalılar arasında %3 olarak bulunmuştur. Bu oran Kafkaslar arasında %7, İspanyollar da ise %6'dır^{4,5}.

1059 T→C polimorfizmi; Son zamanlarda tanımlanmış bir polimorfizmdir. Amerika'nın Iowa bölgesinde yapılan çalışma sonucunda bu polimorfizmin frekansı %85 olarak bulunmuştur^{4,5}.

2.4. MTHFR'nin Tarihçesi

İlk olarak 1991'de Kang ve arkadaşları MTHFR enziminin koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir³¹.

1992'de Rosenblatt ve arkadaşları MTHFR'nin termolabil ve termostabil varyant formlarını tanımlamışlardır³².

Daha sonra 1993-94 yıllarında Goyette ve arkadaşları domuz MTHFR enzimini pürüfiye etmişler ve aminoasit sekansını çıkarmışlardır. Ayrıca 90 bç uzunluğundaki enzim cDNA'sını domuz karaciğerinden izole etmişlerdir²⁷. Aynı yıl Goyette ve arkadaşları insan MTHFR geninin 1p36.3'te lokalize olduğunu in-situ hibridizasyon tekniği ile tespit etmişlerdir. Aynı grup 1994'te MTHFR eksikliği olan kişilerde SSCP analizi ile 3 tane yer değişikliği mutasyonu tanımlamışlar, bunlardan ikisinin missense, birinin ise nonsense olduğunu bildirmişlerdir. Bu grup tarafından 1995 yılında mutasyon sayısına yedi mutasyon daha ilave etmişlerdir²⁹.

1995 yılında Engbersen ve arkadaşları damar hastalıkları olanlarda ve kontrollerde termolabil MTHFR'nin hafif hiperhomosisteinemiye ve normohomosisteinemiye neden olduğunu bildirmişlerdir³³.

Frosst ve arkadaşları 1995 yılında 677 C→T polimorfizmini, bu polimorfizmin enzimin termolabil formunu eksprese ettiğini ve bu polimorfizm sonucunda alaninin valine dönüştüğünü tanımlamışlardır².

Adam ve arkadaşları 1996'da 532 miyokard infarkt geçiren vakada 677 C→T polimorfizminin dağılımına bakmışlar ve hastalar ile kontroller arasında bir fark bulamamışlardır³⁴.

1996 yılında Rozen ve arkadaşları yüksek oranda MTHFR eksikliği olan hastaların MTHFR geninde 9 nokta mutasyonu belirlemişlerdir³⁵.

1998'de Goyette ve arkadaşları insan ve fare geninin yapısını tanımlamışlardır. Bu çalışmada genin 11 ekzondan oluştuğunu, bu ekzonların büyüklüklerini, intronların sınırlarını, intron büyüklüklerini, fare ile insan geni arasındaki benzerlikleri ve amino asit sekanslarının %90 oranında benzer olduğunu bildirmişlerdir²⁹.

2.5. MTHFR'nin Klinik Önemi

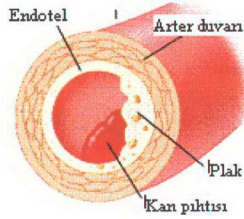
MTHFR eksikliği ile folat metabolizmasının doğuştan hatalı olması yaygın olarak görülen bir durumdur. MTHFR genindeki fonksiyon kayıplarına neden olan mutasyonlar klinik semptomlar ile ilişkilidir. Bu mutasyonlar ile hastalıklar arasındaki ilişki 2 şekilde ele alınabilmektedir. Birincisi, hastalık total homosistein seviyesini etkiler ancak MTHFR polimorfizminin varlığı, sonuçta değişikliklere yol açar. İkincisi, genotip hastalık riski taşımaktadır ve muhtemel mekanizması, folat ve total homosistein seviyesini etkileyerek olmaktadır³⁶.

Plazmadaki orta dereceli homosistein seviyesinin, koroner kalp hastalıklarında, myokard enfarktüsünde, iskemik felçde ve venöz trombozda risk faktörü olduğu bulunmuştur^{37,38,39}. MTHFR polimorfizmi ile ilişkili olarak klinik semptomlar içinde periferik nöropati, gelişim gecikmeleri, hipotonia, felç ve vasküler hastalıkları saymak mümkündür³⁶. İlaveten meme ve kolon kanseri, lösemi⁵, migren tipleri, şizofreni, vasküler demans, depresyon ve Alzheimer hastalıkları ile MTHFR gen polimorfizmi arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir⁴⁰. MTHFR polimorfizi, nöral tüp defektleri için de bir risk faktörüdür⁵. Ayrıca preeklamsi, plental yırtık ve spontan abortus gibi gebelik komplikasyonları için de risk oluşturduğu gösterilmiştir⁶. Son zamanlarda yapılan çalışmalar neticesinde yarı damaklılık⁷, Down sendromu⁸ ve konjenital kalp defektlerinde⁹ de bu polimorfizmin rol oynadığı görülmüştür.

2.5.1. Koroner Ateroskleroz

Koroner ateroskleroz, koroner arterlerin duvarındaki tabakaların birisi veya tamamının dejeneratif patolojisi anlamına gelmektedir. Koroner aterosklerozda arterlerin subintima tabakasında lipidler, kompleks karbonhidratlar, bazı kan türevi maddeleri, fibröz doku, kalsiyum gibi maddelerin lokal birikimlerinin oluşturduğu değişiklikler ile bunlara eşlik eden ortam değişikliklerinin birlikte ortaya çıkardığı patolojik bir durum söz konusudur (Şekil 3)^{15,41}.

Aterosklerotik plakların öyküsü, işlevsel yapılarını yitirmeye başlamış monositlerin endotele yapışması ve göç etmesiyle başlar. Burada, monositler makrofaj özelliğini kazanarak, lipidleri absorbe ederek köpük hücreler haline gelmeye başlarlar. Arteriyal apoptotik süreç sonucunda ölmeye başlayan hücreler, ekstraselüler alanda



Şekil 3. Tıkanmış bir damar görüntüsü⁴¹

birikiminin artmasına ve düz kas hücrelerinde kollajen sentezinin hızlanmasına yol açarlar. Bu da lipidlerin kollajenle çevrilmesine ve fibröz bir kapsülün oluşmasına neden olur. Tıkalı süreç böylece başlayıp, lümenin içine büyümeyle devam eder. Plakın içinde lipid materyalin zengin ve kolajenden fakir olması plakın yırtılmasına yol açan en önemli etkidir. Plak ciddi stenoza yol açsa da zengin kollajen içeren plaklarda yırtılma şansı azdır. Aktive olan trombositlerdeki CD40 ligandı endotelde yangısal olayları tetikler ve C-reaktif proteinin dolaylı olarak yükselmesine ve birçok yangısal yanıt hücresinin (makrofajlar, aktive T-lenfositler, aktive degranüle olan mast hücreleri) birikmesine yol açar. Plak yırtıldığı zaman değişik tipte trombojenik elemanlar dolaşıma girer ve trombositin matriksindeki reseptörlere bağlanan kollajen, fibronektin, laminin ve von Willebrand faktörü sayesinde de aktive olmuş bir yapı özelliği kazanmış olur. Aktive olmuş yapışkan moleküller karşı taraftaki yapışkan reseptörlere bağlanacak birçok reseptör içerir ve trombositlerin trombus kitlesi fibrin-fibrinojen ve von Willebrand faktör köprüleriyle bağlanmalarını sağlarlar. Trombus kitlesi zaman içinde büyümesini sürdürerek bir damarın tıkanması sonucunda, iskemik inme, anstabil angina, Q-dalgalı yada Q-dalgasız miyokard iskemisi ve periferik damarlarda ağır iskemik süreçlere yol açar. Ayrıca plaktan atılan mikroemboliler miyokarda mikrovasküler tıkanmalara ve beyinde sessiz infarktlara yol açarak, kalp dolaşımının etkilenmesiyle zaman içinde kalp yetmezliğine ve beyinde vasküler demansın olmasına yol açar¹⁵.

2.5.1.1. Koroner Aterosklerozun Biyolojik Mekanizması

Homosisteinin neden olduğu damar yaralanmasının olası mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarda endotel hücreleri dikkate değer bir önem kazanmıştır. Endotel hücrelerinde ki Nitrik oksit (NO) etkisi ile, damar tonusu ve geçirgenliği düzenlenmektedir. Endotel hücreleri; Trombomodülin-protein C (TM-protein C) ve heparin sülfat-antitrombin III etkileşimleri yoluyla pıhtılaşma kaskatını düzenlerken, doku Plazminojen Aktivatörü (t-PA) ve Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-I (PAİ-I) yoluyla gerçekleştirdiği fibrinolitik özelliklere sahiptir. Ayrıca subendotelial matriksin yapısı ve düz kas hücrelerinin çoğalmasını da etkileyebilir. Fakat endotel hücrelerinin bu normal özelliklerinin çoğu, artmış homosistein düzeyleri varlığında bozulabilir. Diğer bir ifade ile endotelial işlev bozukluğu ortaya çıkar. Hiperhomosisteininin aterojenik özelliğinin endotel işlev bozukluğu ve hasarından kaynaklandığı düşünülmektedir^{19,21,22,24,42}.

Homosistein plazmaya girdiği zaman homosistin, karışık disülfidler ve homosistein tiolaktan oluşturarak hızlı bir şekilde otookside olur. Süperoksit ve hidrojen peroksidin de dahil olduğu güçlü reaktif oksijen türleri, bu oksidasyon sırasında oluşur. Özellikle hidrojenperoksidin hiperhomositeneminin damar toksisitesinden, yani endotelial hücre hasarından sorumlu olduğu ve matriks ile düz kas hücrelerini ortaya çıkarıp, proliferasyonunu sağlayarak trombosit ve lökosit aktivasyonunu artırdığı ortaya konmuştur. Homosistein oksidasyonu, süperoksit anyon radikali ve hidroksil radikalini içeren diğer sitotoksik ve aktif oksijen ürünlerini de ortaya çıkarır. Süperoksit radikallerinin, hem endotelial bazal membran düzeyinde hem de lipoprotein partiküllerine etki ederek lipid peroksidasyonunu başlattığı gösterilmiştir^{17,22,24,43,44}.

Sayırsız antitrombotik özellikleri olan NO, Nitrik Oksit Sentaz (NOS) tarafından katalizlenen bir tepkime ile L-arjininden oluşur. Normal endotel hücreleri NO salarak homosisteini detoksifiye ederler. Ayrıca trombosit adhezyonu, aktivasyonu ve kümelenmesini inhibe eder. NO, homosistein gibi biyolojik tiyollerle S-nitrozotioller veya S-nitrozohomosistein meydana getirir. Vazodilatör ve güçlü bir trombosit inhibitörü olup antitrombotik aktivite gösteren S-nitrozohomosistein, hidrojen peroksid oluşumunu desteklemez ve tiolaktone dönüşmez. Devamlı hiperhomosisteinemi durumunda NO'nun bozulmuş endotelial üretimi ve biyoaktivitesinin azalmasından dolayı koruyucu özelliklere sahip S-nitrozohomosistein oluşumu bozulabilir.

Endotelyum, homosisteinin aracı olduğu oksidatif hasara karşı savunmasız kalır. Çünkü homosistein, endotelial NOS'ın ekspresyonunu azaltan lipit peroksidasyonunu artırıp doğrudan NO'yu parçalayarak, NO düzeyini azaltır^{17,18,21,22,24,44}.

Homosisteinin yüksek düzeyleri; homosistein, sistein ve glutatyonun dinamik etkileşimini yansıtan aminotiollerin redoks potansiyelini değiştirebilir. Bu redoks durumu hücre dışı antioksidan savunma mekanizmaları ile ilişkili olabilir. Ana hücre içi tamponlar olan azalmış glutatyon ve glutatyon peroksidaz hücre içi sülfidril gruplarını indirgenmiş durumda tutarlar. Ayrıca, hidrojen peroksiti detoksifiye edip trombosit kümelenmesini önlemede de bir rolü olabilir. Homosistein endotel hücrelerinden hücresele glutatyon peroksidaz ekspresyonunu baskılar. Bu etki, homosisteinin oksidasyonu sırasında oluşan reaktif oksijen türleri ile olan lipit peroksidasyonunu artırır^{17,21,22,44-46}.

Homosistein tarafından endotel görevinin bozulmasının diğer mekanizmaları arasında; Monosit Kemotaktik Protein I (MCP-I) ve İnterlökin 8 (İL-8)'in artmış üretimi, artmış nötrofil adezyonu ve göçü, Nüklear Faktör-B (NF-B) gibi transkripsiyon etmenleri ile etkileşim ve endoplazmik retikulumda glikoproteinlerin katlanması yer alır. Homosistein, endoplazmik retikulumdan protein salıverilmesini de etkileyebilir. Homosistein; damar düz kas hücreleri için güçlü bir mitojendir ve büyüyen tıkalı plakta kollajen depolanmasını etkileyebilir. Homosisteine maruz kalma, damar düz kas proliferasyonunda belirgin artışa neden olur. Düz kas hücrelerinin proliferasyonunda temel rol oynayan NF-B transkripsiyon etmen etkinliğinin, homosisteine bağlı oluşan reaktif oksijen türleri tarafından uyarıldığı düşünölmektedir^{17,19,21,22,24,44,47}.

Homosistein, doğrudan damar matriks hasarına da yol açar. Homosistein, LDL (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)'in hızlanmış oksidasyonuna neden olur. Homosistein LDL'ye bağlanarak makrofajlar tarafından, tıkalı plağı oluşturmak üzere taşınır. Okside LDL'nin damar toksisitesi, içeriğindeki lipit peroksidasyon ürünlerine bağlıdır. Homosistein; okside LDL oluşumunu, lipit peroksidasyonunu ve in vitro LDL oksidasyonunu artırır^{18,22,24}.

Artmış homosistein düzeyleri endotel hücrelerinin fibrinolitik ve antitrombotik mekanizmaları ile etkileşerek onu, daha tromboz yapıcı hale getirir. Yapılan çalışmalarda, endotel hücrelerinin homosisteine maruz kalmasının Faktör V etkinliğini arttırdığı bulunmuştur. Bu artışın nedeni; Faktör V etkinliğinin düzenleyicisi olan protein

C'nin etkinliğini sağlayan Trombomodülin (TM) denilen glikoprotein kofaktörünün engellenmesi ile protein C etkinliğinin baskılanmasıdır. Ayrıca homosistein Faktör XII'nin etkinliğini de artırmaktadır^{17,19,21,22,24,44,48-52}.

Homosistein, endotelden TM ve heparin sülfat salınımını baskılar. Homosistein; Doku Faktörü (TF) ekspresyonunu artırarak pıhtılaşmayı şiddetlendirebilir. Tüm bu etkiler trombin oluşumunu hızlandıran protrombotik bir ortam yaratır^{17,21,22,24,53}.

Homosistein, endotel protein salgılama yolları ile etkileşerek pıhtılaşma ve fibrinolitik olaylara katılan çok çeşitli proteinleri etkileyebilir. Deneysel çalışmalarda homosisteinin, heparin benzeri glikozaminglikanlar ve antitrombin-3 etkileşimleri gibi diğer endotel pıhtılaşmayı önleyici mekanizmaların görevlerinde etkilediği gösterilmiştir. Endotel hücrelerin fibrinolitik mekanizmaları (t-PA dahil) üzerine yapılan çalışmalarda azalmış t-PA aktivitesinin endotel hücresi yüzeyinde t-PA için bir bağlanma alanı olan annexin-II ile homosisteinin etkileşimine bağlı olduğu ortaya konmuştur^{17,21,44,47,54}.

Sonuç olarak homosisteinin sisteme irreversibl olarak dönüşümü reaksiyonunda, homosisteinin hücre dışına transportundan daha fazla olması ile sitotoksik olan homosistein hücre içerisinde birikir. Böylece spesifik hücreler hasara uğrar ve ateroskleroza sebep olan kaskat başlar. Hiperhomosisteinemi vasküler morfolojiyi değiştirir, inflamasyonu uyarır, endotelium ve kan pıhtılaşma kaskatını aktive eder ve fibrinolizi engeller ve ateroskleroz oluşur⁵⁵.

2.5.1.2. Etiyolojisi

Epidemiyolojik araştırmalar tablo 1'de verilen faktörlerin risk faktörleri olarak ateroskleroz gelişmesinde rolü olduğunu ortaya çıkarmıştır⁵⁶.

Koroner ateroskleroz hastalığı, erkeklerde kadınlardan çok daha fazla görülmektedir. İleri yaşlarda da tıkalı kalp hastalıkları insidansı artmaktadır. Yaş (erkeğin 45'in, kadının 55'in üzerinde olması veya prematüre menopoza girmesi), cinsiyet, ileri yaş ile birlikte serum lipoprotein anormallikleri, hipertansiyon (kan basıncını 140/90 mmHg üstünde bulunması), sigara, diyabet majör risk faktörleridir. Serum lipitlerinin anormalliği aterogenez için majör bir risk faktörüdür. Diyetle, kolesterol, total ve doymuş yağ, şeker oranı ve miktarı ile total kalorinin yüksek

olması erken koroner ateroskleroz tehlikesini artıran faktörlerdir. Hipertansiyon, sigara, ve diyabet de koroner ateroskleroz sıklığını artıran önemli bir risk faktörüdür⁵⁶.

Tablo 1. Ateroskleroz risk faktörleri⁵⁶

<u>Değiştirilmesi mümkün olmayanlar</u>	<u>Değiştirilmesi mümkün olanlar</u>
1. Aile hikayesi	1. Total kolesterol ve LDL kolesterolünün yüksekliği
2. Cinsiyetin erkek olması	2. HDL kolesterolünün düşük olması
3. İleri yaş	3. Hipertansiyon
	4. Diabet
	5. Sigara
	6. Sedanter hayat
	7. Şişmanlık ve insülin rezistansı
	8. Emosyonel stres
	9. Homosistein yüksekliği

Aterogenez açısından anlatılan majör ve çevresel risk faktörleri yanında obezite, sedanter yaşantı, psikososyal gerginlikler, plazma homosistein yüksekliği de minör çevresel risk faktörleri olarak bildirilmektedir⁵⁶.

2.5.1.3. Aterosklerozun İnsidansı ve Prevalansı

Her yıl yaklaşık 4 milyon Avrupalı kardiyovasküler hastalıklar ve onun komplikasyonları (Koroner arter hastalıkları, miyokard enfarktüsü, stroke, venöz tromboz) yüzünden ölmektedir. Meydana gelen ölüm olaylarının % 46'sından kardiyovasküler hastalıklar sorumludur¹⁵.

Aterotromboz toplumda en sık rastlanan kardiyovasküler hastalık olup, aynı zamanda en fazla sakatlanmaya ve ölüme yol açan hastalıktır. Ana belirtilerini koroner arter hastalıkları ve iskemik felç olarak yapar. Kuzey Amerika ve Avrupa'daki ölümlerin üçte birinden sorumludur. ABD ve Avrupa'da (17 Batı Avrupa ülkesinde) yıllık miyokard infarktüs insidansı (yeni olgu/yılda) 2.1 milyondur. Ancak aterotrombotik olaylara bağlı gelişen komplikasyonlar bir bölgeden bir bölgeye değişmektedir. Tıkalı miyokard olaylarının ABD'de (350 yeni olgu/100.000/yıl) diğer Avrupa ülkelerine (Fransa; 150 olgu; İtalya 150 olgu; İngiltere 250 olgu/100.000 popülasyon/yılda) göre insidansı daha fazladır¹⁵.

2.5.1.3.1. Türkiye’de Ateroskleroza Bağlı Olayların İnsidans ve Prevalansı

Ülkemizde epidemiyolojik verilere göre, Türkiye genelinde erişkinlerde, aterosklerotik kalp hastalığı prevalansı %3.8’dir (erkeklerde %4.1, kadınlarda %3.5’dir). Aterosklerotik kalp hastalığı prevalansı %2 veya altında iken 50-59 yaşlarında %8 sıklığındadır. “Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı Risk Faktörleri” (TEKHARF) çalışmasının sonuçlarına göre aterosklerotik kalp hastalıklarında hipertansiyon 3.2 kat, yüksek kolesterol veya diyabet normallerden 2 kat daha fazla sıklıktadır. Hipertansiyon 50 yaş üzeri erkeklerin %7.8’inde, kadınların %14’ünde mevcuttur. Önemli risk faktörlerinden olan diyabetin erkeklerde %2.5’luk prevalansına karşın kadınlarda %4’tür. Bir başka risk faktörü olan obezite, ülkemizde erkeklerde %9 civarında iken, kadınlarda %30 gibi yüksek rakamlara çıkmaktadır. Sigara içimi ise erkeklerde %59-60’lı rakamlara çıkmakta ise de kadınlarda %19 dolayındadır. Bütün bunlara ek olarak ülkemizdeki koroner kalp hastalıklarının ölüm oranı erkeklerde yılda %0.87, kadınlarda ise %0.63’tür¹⁵.

2.5.1.4. Aterosklozun Genetiği

İnsan genom haritasının çıkarılması ve çeşitli tek gen mutasyonuna bağlı gelişen kardiyovasküler hastalıkların tanımlanması ile aterosklerotik damar hastalığı patogenezi ile ilgili bilgilerimiz çok artmıştır. Karmaşık patogenezin kısmen aydınlanması, hangi faktörlerin ateroskleroz gelişimi sürecinde rol oynadığını ortaya çıkarmaya başlamıştır. Bu kompleks klinik durumu tek bir gen mutasyonu ile açıklamak mümkün değildir. Risk faktörlerine arter duvarı özelliklerine ve inflamatuvar yanıtı zemin hazırlayan çok sayıda genin etkileşimine bağlı olarak ateroskleroza genetik eğilim oluşmaktadır⁵⁷.

Bu günlük bilgilerimize göre aterosklerotik damar hastalığı tipik bir çevre-gen etkileşimidir. Çevresel risk faktörleri günümüzde açıkça tanımlanmış, genetik risk faktörleri ise yeni yeni aydınlatılmaya başlanmıştır. Genetik risk faktörleri hem ateroskleroza yatkınlık sağlamak hem de farklı çevresel faktörlere olan yanıtı belirlemektedir. Prematür tıkalı damar hastalığının kalıtsal kökenli olduğu gösterilmiştir. Bu kalıtım kısmen klasik risk faktörlerini düzenleyen genlerdeki mutasyonlarla açıklanabilir. Ancak bazı kişilerde hiçbir klasik ya da yeni koroner risk

faktörü olmaksızın kalıtsal bir eğilim olabilmektedir. Bu da bize tıkalı damar hastalığının genetiği ile ilgili bilgilerimizin henüz yetersiz olduğunu göstermektedir⁵⁷.

Tıkalı damar hastalığı genetiği ile ilgili günümüzde bilinen genetik değişiklikleri birkaç grup halinde inceleyebiliriz⁵⁷.

2.5.1.4.1. Klasik Risk Faktörlerini Etkileyen Genetik Değişiklikler:

2.5.1.4.1.1. Lipoprotein Metabolizması

2.5.1.4.1.1.1. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)

Plazma HDL düzeyleri ile koroner arter hastalığı arasında güçlü bir ters ilişki vardır. Prematür koroner arter hastalığı olanlarda düşük HDL düzeyleri saptanmaktadır. ATP Binding Cassette Sub-Family A gen ailesinin 1. üyesi (ABCA1), Lipoprotein lipaz/ Hepatik lipaz mutasyonları ve Apoprotein A1 eksikliğine neden olan mutasyonlar plazma HDL düzeyinde düşüklüğe neden olmakta ve dolayısı ile koroner arter hastalığı için bir risk faktörü oluşturmaktadır⁵⁷.

2.5.1.4.1.1.2. Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)

Plazma LDL kolesterol düzeyleri pek çok çalışmaya göre koroner kalp hastalığının en önemli belirleyicilerindendir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre plazma LDL düzeylerinin %50'sinin belirleyicisi genetik faktörlerdir. Ailesel Hiperkolesterolemi'ye neden olan LDL reseptör geni ve Apoprotein B mutasyonları plazma LDL seviyesinin artışına neden olmaktadır. Plazmada ki LDL kolesterolünün artışı sonucunda ise koroner arter hastalığı meydana gelmektedir⁵⁷.

2.5.1.4.1.1.3. Trigliseridler

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar uzun süre tek başına trigliserid yüksekliğinin tıkalı damar hastalığı için bir risk faktörü olduğunu sorgulamıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, ılımlı trigliserid yüksekliğinin, özellikle artık lipoproteinler ve Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinlerin (VLDL) yükselmesinin aterojenik olduğunu göstermiştir. Ailesel hipertrigliseridemi, Ailesel Kombine Hiperlipidemi ve Ailesel

dislipoproteinemi (Tip III hiperlipidemi)'ye neden olan mutasyonlar plazma trigliserid düzeylerini etkilemektedir ve sonuç olarak bu hastalarda ateroskleroz meydana gelmektedir⁵⁷.

2.5.1.4.1.2. Hipertansiyon

2.5.1.4.1.2.1. Monogenik Sendromlar

Klinik olarak nadiren tek bir gendeki mutasyon hipertansiyona yol açabilir. Buna monogenik türde hipertansiyon denir. Glikokortikoide hassas aldosteronizm, Liddle sendromu, belirgin mineralokortikoid fazlalığı ile giden hipertansiyon ve Tip II Pseudohipoaldosteronizm (Gordon sendromu)'e neden olan mutasyonlar çevresel faktörler ile de etkileşerek hipertansiyona neden olmaktadır⁵⁷.

2.5.1.4.1.2.2. Poligenik Sendromlar

Esansiyel hipertansiyonun büyük çoğunluğu birden fazla gen noktasındaki mutasyona bağlı, yani poligeniktir. Anjiyotensinojen gen mutasyonları, Anjiyotensin Converting Enzim (ACE) gen mutasyonları, Anjiyotensinojen Tip I (AT1) reseptör mutasyonları, sempatik sinir sistemini düzenleyen gen mutasyonları, Adducin mutasyonları ve sodyum kanallarındaki mutasyonlar hipertansiyona poligenik olarak etki eden mutasyonlardır⁵⁷.

2.5.1.4.1.3. Diyabetis Mellitus ve İnsülin Rezistansı

Tip II diabetes mellitus kompleks bir metabolik hastalık olup hem insülin direnci hem de kısmi insülin eksikliği ile karakterizedir. Bu hastalığa neden olan genetik faktörler arasında glukagon genini kodlayan mutasyonlar, pankreas B hücrelerinde oksidatif fosforilasyonu etkileyen mitokondriyal DNA mutasyonları, insülin reseptör tirozin kinazın bir substratı olan IRS-1'i kodlayan genlerdeki mutasyonlar da diyabete neden olmaktadır. Ancak bugüne kadar tanımlanan genetik defektler toplumdaki diyabetin sadece %2 kadarını açıklamaktadır⁵⁷.

2.5.1.4.2. Damar Duvarı ve İnflamatuvar Yanıtı Etkileyen Genetik Değişiklikler

Aterosklerozun inflamatuvar bir süreç olduğunun anlaşılması üzerine bu inflamatuvar yanıtı düzenleyen genler araştırılmaya başlanmıştır. Bu genler arasında tümör nekroz faktörü alfa (TNF α), transforming growth faktör B1 ve B2, interlökin 1 sistemi, CD yüzey molekülleri, adhezyon moleküllerinden P-selektin, integrinler, kemokinler sayılabilir. Ayrıca damarın kalsifikasyonuna yol açan etkenler ve plak rüptürüne yol açan genetik nedenler de araştırılmaktadır⁵⁷.

2.5.1.4.3. Yeni Risk Faktörlerini Etkileyen Genetik Değişiklikler

2.5.1.4.3.1. Koagülasyon ve Trombozu Etkileyen Genler

Plazma fibrinojen değerleri yeni tanımlanmış risk faktörlerinden olup artmış düzeyleri tıkalı damar hastalığı riskini artırmaktadır. Dolayısı ile fibrinojen değerlerinin artmasına neden olan mutasyonlar ateroskleroza neden olmaktadır. Pıhtıyı eritici yönde çalışan enzimlerdeki mutasyonlar da ateroskleroz için risk faktörü oluşturmaktadır⁵⁷.

2.5.1.4.3.2. Homosistein

Plazma homosistein düzeyleri hem kalıtsal hem de edinsel etmenler ile değişebilir. Homosisteini yıkan enzimlerdeki kalıtsal bozukluklar plazma homosistein düzeylerini belirgin bir şekilde artırabilir. Homosistinürinin klasik biçimi nadir görülüp CBS'nin homozigot eksikliği sonucu oluşur. CBS eksikliği, ağır hiperhomosisteineminin en sık karşılaşılan genetik nedenidir. CBS genindeki mutasyonlar 21. kromozomda yerleşiktir. Bu mutasyonun heterozigot formunda klinik bulgular daha az belirgin olup hiperhomosisteinemi ile sonuçlanır. Daha hafif vakalarda bu durum metionin yükleme testi sonucunda ortaya çıkabilir. MS ve MTHFR'deki mutasyonlar, homosistinürili vakalarda da tanımlanmıştır. MTHFR'nin homozigot eksikliği de ağır hiperhomosisteinemiye yol açar⁵⁷⁻⁵⁹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmaya alınan denekler Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda koroner ateroskleroz tanısı ile koroner bypass olan ya da olacak hastalar arasından seçilerek temin edilmiştir. Seçilen hastalara son altı ay içerisinde kan transfüzyonu yapılmamış olmasına dikkat edilmiştir. Hastaların yaşları 30 ile 74 arasında dağılmaktadır. Çalışmanın kontrol grubu, kendisinde ve ailesinde koroner ateroskleroz hastalığı olmayan, yaşları 26-76 arasında değişen bireylerden oluşturulmuştur. Alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplerde, 4 °C'de saklanmıştır. Çalışmamızda, 60 koroner bypass olan ya da olacak olan hasta ve 60 kontrol grubu kanı kullanılmıştır.

3.2. Gereç

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda verilmiştir.

1. Taq polimeraz (Fermentas)
2. Magnezyum klorür (MgCl₂) (Fermentas)
3. Sukroz (Fermentas)
4. Tris baz (Fermentas)
5. Sodyum klorür (NaCl) (Fermentas)
6. EDTA (Fermentas)
7. Sodyum dedosil sülfat (SDS) (Fermentas)
8. Proteinaz K (Fermentas)
9. Borik asit (Fermentas)
10. Brom fenol mavisi (Fermentas)
11. Etidyum bromür (Fermentas)
12. N, N, N, N'-tetra metilen diamin (TEMED) (Fermentas)
13. N,N'-Metilen -bis-Akrilamid (Sigma)
14. PCR tamponu (Fermentas)
15. Restriksiyon enzimleri (Takara, Fermentas)

16. Msp I ile kesilmiş pUC 18 marker DNA (Fermentas)
17. Hae III ile kesilmiş pUC marker DNA (Fermentas)
18. Primerler
19. Deoksitükleosit Trifosfat seti (Roche)
20. Agaroz (Promega)
21. Akrilamid (Sigma)
22. Amonyum Persulfat (APS) (Sigma)
23. Saf etanol (Riedel-de Haen)
24. DNA izolasyonu, PCR ve elektroforez ile ilgili diğerkimyasal maddeler (Sigma ve Merck)

3.3. Kullanılan Başlıca Cihazlar ve Teknik Malzemeler

1. “Thermal cycler” (Eppendorf Mastercycler)
2. Spektrofotometre (Pharmacia-Biotech, Gene Quant)
3. Jel görüntüleme cihazı (Uvitec)
4. Yatay ve dikey elektroforez tankları (Biogen ve Biolab)
5. Santrifüjler (Soğutmalı, Universal 16R ve Soğutmasız Techne force 16)
6. Su banyoları (Grant)
7. Hassas terazi (Sartorius)
8. pH metre (İnolab)
9. Buzdolabı (Arçelik)
10. Otoklav (Trans)
11. Ettüv (Dedeoğlu, Memert)
12. Vorteks (Nüve NM 110)
13. Steril kabin (Kojair KR- 125 Safety)
14. Otomatik pipetler (Gilson, Biohit ve Socorex)
15. Deepfreez (Siemens, Bosch)
16. Mezür

Bu teknik malzemeler araştırmanın yapıldığı Ç.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD moleküler biyoloji laboratuvarında bulunmaktadır.

3.4. Yöntem

Bu çalışmada, öncelikle hastalardan toplanan kan örnekleri numaralandırılıp listelendi. Daha sonra bu örneklerin DNA izolasyonu (Doymuş tuz çözeltisi ile çöktürme yöntemi kullanıldı)⁶⁰, PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi ve agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonun olup olmadığı kontrol edildi. PCR ürünleri kesim (RFLP) reaksiyonuna tabi tutularak poliakrilamid jelde yürütüldü. Jel üzerindeki bantlara göre mutasyon olup olmadığı değerlendirildi.

3.4.1. DNA İzolasyonu

3.4.1.1. Doymuş Tuz Çözeltisi ile Çöktürme Yöntemi

1. 700 µl tam kan 1.5 ml'lik ependorf tüp içerisine alındı. Daha sonra 700 µl eritrosit lizis tamponu (EK-1.1) ile muamele edildi. Bir iki kez karıştırılıp 3 dk beklendi. Bu süre içerisinde eritrosit patlayıp hemoglobin serbest kalınca, kan berrak kırmızı renk alır. Sonra santrifüj edilerek süpernatant pipet yardımı ile atıldı. Bu aşama 2 kez tekrarlanabilir.
2. Eğer pellet yeterince temiz değilse 1 ml fizyolojik tamponla (EK-1.2) yıkandı. Bunun için pellet üzerine fizyolojik tampon eklendi, santrifüj edilerek süpernatant pipetle alındı ve atıldı.
3. Pellet üzerine 300 µl TE-9 (pH:9) tamponu (EK-1.3) ilave edilerek pellet çözdürüldü. Daha sonra üzerine 100 µl %10'luk SDS (Sodyum Dedosil Sülfat) (EK-1.4) ve 20 µl Proteinaz K (Proteinaz K'nın final konsantrasyonu 0.5 mg/ml olmalıdır. Bunun belirlenmesi için $M1 \times V1 = M2 \times V2$ formülünden yararlanılabilir) ilave edildi. Tüp iyice karıştırılarak 65 °C'de 1.5-2 saat inkübe edildi. Bu süre içerisinde karışım için tüp ara sıra karıştırıldı.
4. İnkübasyon sonunda tüp içerisine 200 µl doymuş (6M) tuz çözeltisinden ilave edildi. Tüp iyice karıştırıldı ve süt beyazı rengine dönmüşlüğü gözlemlendi. Burada amaç DNA dışındaki protein, lipid gibi moleküllerin DNA'dan uzaklaştırılmasıdır. Daha sonra bu karışım santrifüj edildi ve böylece DNA diğer moleküllerden ayrıştırıldı.

5. Bu kez süpernatant steril ependorf tüplerine alındı ve üzerine 1 ml saf alkol ilave edilerek DNA oluşumu gözlemlendi ve DNA'nın tüpün dibinde çökmesi için santrifüj edildi.
6. Süpernatant döküldü ve pellet üzerine %75'lik alkolden 1 ml ilave edilerek iyice karıştırıldı ve tekrar santrifüj edildi. Pellet halinde kalan DNA'nın üzerindeki süpernatant döküldü ve DNA kurutuldu.
7. Etanolü tamamen uçmuş DNA üzerine 100-200µl arasında TE (EK-1.5) ilave edilerek 75 °C'de 10-15 dk bekletildi ve DNA'nın çözülmesi sağlandı.

3.4.2. DNA Konsantrasyonu ve Safılık Derecesinin Ölçülmesi

PCR reaksiyonunun hazırlanması aşamasında bilmemiz gereken diğer temel bir konu da DNA'yı çözdüğümüz sıvı ortam içerisindeki DNA konsantrasyonu ve safılık derecesidir. Bunun belirlenmesi UV (Ultra Viyole) spektrofotometresi ile yapılabilmektedir. DNA örneğinin içerisinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50 µg/ml, tek iplikli DNA (ssDNA) için 33 µg/ml, RNA için ise 40 µg/ml'lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir⁶¹.

UV absorbansı DNA'nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de de proteinler pik verir). Saf bir DNA örneğinde 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı $A_{260nm}/A_{280nm}=1.8$ 'dir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla bulduğumuz değer 1.8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. 1.8'den düşük değerler örnekte fenol ya da protein kontaminasyonu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir. RNA için $A_{260nm}/A_{280nm}=1.8-2.0$ 'dir⁶¹.

3.4.3. MTHFR Geninin 677C→T ve 1298 A→C Polimorfizmleri İçin PCR Amplifikasyonu

3.4.3.1. MTHFR Geni 677C→T ve 1298 A→C Polimorfizmleri İçin Kullanılan Primerler:

Çalışmamızda MTHFR genine ait iki değişik polimorfizme bakılmıştır. Bu polimorfizmlerin saptanması için, dizi analizi üzerinde ekzonların bulunduğu bölgeleri içerecek şekilde ve primer dizaynı kriterleri dikkate alınarak seçilen primerler kullanılmıştır. İnternet taraması sonucu elde edilen dizi analizi ile 677 C→T polimorfizminin bulunduğu 4. ekzonun 194 bç uzunluğunda olduğu belirlenmiştir⁶². Ekzonun kesim sonunda görülebilir bant vermesi için 198 baz çiftlik bölge çoğaltılmıştır ve bunun için primerler oluşturulmuştur. Aynı şekilde 1298 A→C polimorfizminin bulunduğu 7. ekzonun da 171 bç uzunluğunda olduğu belirlenmiştir⁶². Yine 138 baz çiftlik bölge çoğaltılmış ve bunun için primerler oluşturulmuştur.

677 C→T polimorfizminin primerleri:

Forward primer (sense): 5'TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA3'

Reverse primer (antisense): 5'AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG3'

Primer dizilerinin seçildiği bölgeler çizelge de gösterilmiştir. Burada koyu olarak gösterilen bölge ekzon 4, altı çizgili olan diziler primer dizileri, Büyük harfle gösterilen nükleotitler ise restriksiyon enziminin kestiği bölgedir. Kullanılan bu primerler ile 198 baz çiftlik bir bölge amplifiye edilmiştir.

Çizelge 1. Ekzon 4

```
5' .....
8581 ctctctctgc ccagtcacctg tggctctctt atccctcgcc tgaacaggt ggaggccagc
8641 ctctctctgac tgtcatccct attggcaggt taccocaaag gccaccocga agcagggagc
8701 tttagagctg acctgaagca cttgaaggag aagggtctctg cgggaGCcga ttctcatctc
8761 acgcagcttt tctttgaggo tgacacatct ttcgccttg tgaaggcatg caccgacatg
8821 ggcatacactt gccccatctg ccccgggatc ttcccatcc aggtgagggg cccaggagag
8881 cccataagct cctccacccc cactctcacc gcaccgctct cgcacaggct gggggctctg
8941 ggtggagtg tgaattctct gagttcttcc cagatctct ctcagggtcca gaacttgcac
.....
3'
```

1298 A→C polimorfizminin primerleri:

Forward primer (sense): 5'GGG AGG AGC TGA CCA GTG CAG3'

Reverse primer (antisense): 5'GGG GTC AGG CCA GGG GCA G3'

Primer dizilerinin seçildiği bölgeler çizelge de gösterilmiştir. Burada koyu olarak gösterilen bölge ekzon 7, altı çizgili olan diziler primer dizileri, büyük harfle gösterilen nükleotitler ise restriksiyon enziminin kestiği bölgedir. Kullanılan bu primerler ile 138 baz çiftlik bir bölge amplifiye edilmiştir.

Çizelge 2. Ekzon 7

```
5' .....  
10441gcagaattta caggaatggc ctccctgggca tgtggtggca ctgccctctg tcaggagtg  
10501gccctgacct ctgggacacc ctctgccagg ggcaattcct cttcccctgc ctttggggag  
10561ctgaaggact actacctctt ctacctgaag agcaagtccc ccaaggagga gctgctgaag  
10621atgtgggggg aggagctgac cagtgaagAA agtgtctttg aagtctttgt tctttacctc  
10681tcgggagaac caaacoggaa tggtcacaaa gtgagtgatg ctggagtggg gaccctggtt  
10741catccccctgc ccctggcctg accccagctg caggccaggc tgccgggctg tgacttcccc  
10801atcctgtgcc ctcccctcca tgctgtggac atggcaagg gagaagggta agttgggaga  
.....3'
```

Kullandığımız bu primerleri seçerken, primerde bazların dengeli dağılmasına, primerin kendi içerisinde bağlanmaya neden olacak dizi bulunmamasına, Tm ısısının 70-75 °C olmasına ve kalıp DNA içinde yanlışlıkla tanyacak baz dizisine sahip olmamasına⁶³ dikkat edilmiştir.

3.4.3.2. MTHFR geninin 677C→T ve 1298 A→C Polimorfizmleri İçin Kullanılan PCR amplifikasyonu (EK-2)

Örneklerimiz için uygun amplifikasyon koşullarının saptanması çeşitli denemelerle belirlendi. Primerlerin ve Taq polimerazın farklı konsantrasyonları yanında PCR programında farklı ısı döngüleri ve yapışma (annealing) ısıları denendi. Her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutuldu. Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği koşullar, bütün PCR reaksiyonları için kullanıldı. Çizelge 3'de 677 C→T polimorfizmi için, çizelge 4'de ise 1298 A→C polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonları verildi.

Çizelge 3. 677 C→T polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu

PCR Tamponu (10X)	2.5 µl
dNTP	0.2 µl
Primer 1	0.4 µl
Primer 2	0.4 µl
Taq polimeraz	1 µl
MgCl ₂	1.5 µl
Genomik DNA	1 µl
Su	19 µl
Toplam	25 µl

Optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri;

Ön denatürasyon:	95 °C	0:03:00
Denatürasyon:	95 °C	0:00:45
Yapışma:	62 °C	0:00:30
Sentez:	72 °C	0:00:30
Toplam döngü:	30	
Final sentez:	72 °C	0:05:00 sn

Çizelge 4. 1298 A→C polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu

PCR Tamponu (10X)	2.5 µl
dNTP	0.2 µl
Primer 3	0.2 µl
Primer 4	0.2 µl
Taq polimeraz	1 µl
MgCl ₂	1.5 µl
Genomik DNA	1 µl
Su	18.4 µl
Toplam	25 µl

Optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri;

Ön denatürasyon:	95 °C	0:03:00 sn
Denatürasyon:	95 °C	0:00:45 sn
Yapışma:	66 °C	0:00:30 sn

Sentez:	72 °C	0:00:30 sn
Toplam döngü:	30	
Final sentez:	72 °C	0:05:00 sn

Elde edilen PCR ürünleri 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

PCR reaksiyonunun hazırlanmasında izlenen basamaklar;

1. %70'lik alkolle temizlenmiş laminar flow kabini içinde üzerlerine örnek kodu yazılarak 200 µl'lik PCR tüpleri hazırlandı.
2. Tüm DNA örnekleri ve çözeltiler önce vorteks ile karıştırıldı, sonra santrifüj edildi.
3. PCR karışımı hazırlamak için daha önceden belirlenmiş olan miktarlardaki PCR tamponu, primerler (677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmleri için kendilerine özgü olan primerler kullanıldı), dNTP, Taq polimeraz, MgCl₂ çizelge 3'te verilen oranlara göre tüp içine eklendi.
4. İyice karışması için tüp, önce vorteksle karıştırıldı, daha sonra santrifüj edildi.
5. Kodlanmış her bir PCR tüpüne hazırlanan karışım dağıtıldı ve her tüpe kodunu taşıyan genomik DNA daha önceden belirlendiği miktarda eklendi.
6. Yine önceden belirlenen miktarda her tüpe deiyonize su ilave edildi.
7. Her tüp ayrı ayrı vorteks ile karıştırıldı, santrifüj edildi ve thermal cycler'a (her bir polimorfizm için ayrı olan PCR programlarına) yerleştirildi.

3.4.4. PCR Ürününün Elektroforezi (EK 3)

PCR bazen çeşitli nedenlerden dolayı başarılı olmayabilir. Örneğin, kullanılan DNA tam saf olmayabilir, seçilen primerler uygun olmayabilir ya da birden fazla tanıma dizisi bulunabilir. Elde edilen PCR ürünü doğru boyutlarda elde edilememiş olabilir⁶³. Bu yüzden, PCR tamamlandıktan sonra, ürünler RFLP aşamasında kullanılmadan önce ürün kalitesini kontrol etmek amacı ile agaroz jel elektroforezine tabi tutularak kontrol edildi (EK 4). Agaroz jel elektroforezinde (%1.5'lük), her bir reaksiyon için oluşan bantın parlaklığına, nonspesifik bant olup olmadığına bakılarak değerlendirildi. Bunun için , PCR reaksiyonu ürünlerine 6X yükleme tamponundan (EK 4.1) 1/5 oranında ilave edildi, pipetlenerek karıştırıldı. Örnekler %1.5'lük agaroz jel kuyularına dikkatli bir şekilde yüklendi ve 70 V, 100 mA de 20dk süreyle elektroforeze tabi tutuldu. Beklenen bant

büyüklüğü yaklaşık 200 bp olduğundan MspI ile kesilmiş pUC18 markeri ile birlikte yürütüldü ve beklediğimiz bant büyüklüğü elde ettiğimiz Uvitec jel görüntüleme cihazında doğrulandı.

3.4.5. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi ile PCR Ürünlerinin Kesimi

PCR ürünü içinde literatür taraması sonucu elde edilen mutasyon noktaları için tanıma dizisi olan endonükleazlar (EK 5) Gene Runner programının 3.05 versiyonu kullanılarak belirlendi. 677 C→T polimorfizmi için *Hinf* I, 1298 A→C polimorfizmi için ise *Ita* I (*Fnu4HI*) restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Bu enzimlerin kesim bölgesi *Hinf* I için G ANTC, *Ita* I (*Fnu4HI*) için ise GC NGC'dir.

3.4.6. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroferezi (EK 6) ve Yorumlanması

%10'luk poliakrilamid jeli hazırlamak için yapılan ön hazırlıklar:

1. %40'lık stok akrilamid çözeltisi hazırlandı (EK 6.1).
2. %25'lik Amonium Per Sülfat (APS) çözeltisi taze olarak hazırlandı (EK 6.2).
3. 5X TBE stok tamponu hazırlanıp otoklavda steril edildi (EK 6.3).
4. Dikey elektroforez cihazı temizlenip saf sudan geçirildikten sonra, elektroforez camları %70'lik alkolle silinip kurulandı.
5. Camların arasına sızdırmayı önlemek için özel bantları yerleştirildi.
6. Arasına özel bantları yerleştirilmiş olan camlar elektroforez aparatına yerleştirildi.
7. %10 olarak hazırlanmış jel enjektöre çekilerek , hava kabarcığı kalmayacak şekilde cam arasına enjekte edildi.
8. Polimerizasyonun gerçekleşmesi için 20-30 dk beklendi.
9. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra aparat tankın içine yerleştirildi.
10. Jelin alt ve üst sınırlarına temas edecek şekilde 1X TBE tamponu eklendi.
11. Tampon eklendikten sonra tarak, herhangi bir deformasyona sebep olmayacak şekilde, yavaşça çekildi.
12. Her bir kuyuya 5 µl yükleme tamponu ile karıştırılmış kesim ürünü yerleştirildi.

13. Kuyulardan birine karşılaştırma yapabilmek için marker, birine de PCR ürünü yüklendi.
14. 70V, 100A ve 7 Watta 1.5 saat elektroforeze tabi tutuldu.
15. Süre sonunda jel, camların arasından alınarak 1XTBE'de 0.5 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış EtBr çözeltisinde 10 dk boyandı (EK 6.4).
16. Boya artıklarından temizlemek için jel saf su içerisine alındı.
17. En son jel, Uvitec görüntüleme cihazında değerlendirildi.

3.4.6.1. Jelin Değerlendirilmesi

Jelin değerlendirilmesi örneklerin oluşturduğu bantlar ile marker bantları kıyaslanarak yapılır. Hem 677 C→T hem de 1298 A→C polimorfizmi için kullandığımız kesim enzimi mutasyon bölgesini tanıyarak kesen bir enzimdir. 677 C→T polimorfizminde, PCR ile 198 bç'lik çoğaltılmış olan bölge *Hinf*I enzimi kullanılarak 175 ve 23 bç'lik iki parçaya ayrılır. Homozigot mutasyonu olan örnekler jelde 175 bç ve 23 bç'lik bantları verir, homozigot sağlam örnekler 198 bç bantı ve heterozigot örnekler ise hem 198 hem de 175 bç ve 23 bç'lik bantları verir. 1298 A→C polimorfizmi için de PCR ile çoğaltılan 138 bç'lik bölge *Ita* I enzimi ile 119 ve 19 bç'lik iki parçaya ayrılır. Bu durumda homozigot mutasyonu olan örnekler jelde 119 ve 19 bç'lik bantlar, homozigot sağlam örnekler 138 bç'lik bantı ve heterozigot örnekler ise hem 138 hem de 119 ve 19 bç'lik bantları verir. Böylece homozigot sağlam, homozigot mutant ve heterozigot bireyler birbirinden ayrılır.

3.5. İstatistik Analiz

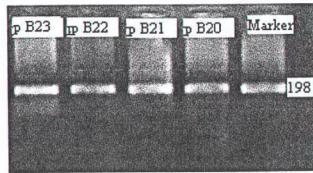
Verilerin analizinde SPSS PC (11.5 versiyon) programı kullanıldı. Oranların karşılaştırılmasında Pearson Ki-kare testi kullanıldı ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda koroner ateroskleroz teşhisi ile koroner bypas olmak üzere Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'na gelen 60 hastanın venöz kanından elde edilen genomik DNA'lar kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak ise aile öyküsünde koroner arter hastalığı olmayan 60 sağlıklı bireyin kanlarından izole edilen genomik DNA'lar kullanılmıştır.

Çalışmamıza başlarken; hasta grubu oluşturulurken koroner anjiyografisi yapılmış, koroner bypaslı hastalar olmasına dikkat edilmiştir. Bireyler ile yaptığımız görüşmelerde bireylerin yaşı, cinsiyeti, sigara kullanımı, alkol kullanımı ve aile öyküsü öğrenilmiştir. Kontrol grubu ile de aynı görüşmeler yapılmış ve kontrol grubu oluşturulurken aile öyküsünde koroner arter hastalığı olmayan bireyler seçilmiştir. Fakat kontrol grubu seçilirken, sigara içiminin ve alkol kullanımının yaygın olmasından dolayı bu konuda seçici davranılamamıştır.

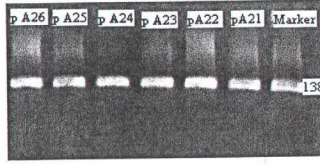
677 C→T Polimorfizmi için; uygun primerler ile optimizasyon denemeleri yapıldıktan sonra 198 bp'lik DNA alanı çoğaltılmıştır. Tüm örneklerden elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde 198 bp'lik fragmanı belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker ile beraber yürütülmüş ve jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarılmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. 677 C→T polimorfizmi için çalışılan örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü

1298 A→C Polimorfizmi; uygun primerler ile optimizasyon denemeleri yapıldıktan sonra 138 bp'lik DNA alanı çoğaltılmıştır. Tüm örneklerden elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde 138 bp'lik fragmanı

belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker ile beraber yürütülmüş ve jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarılmıştır (Şekil 5).

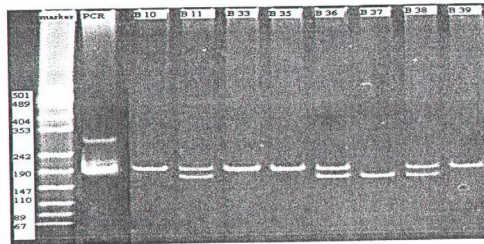


Şekil 5. 1298 A→C polimorfizmi için çalışılan örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü

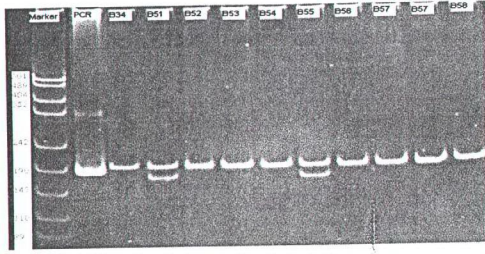
4.1. Restriksiyon Enzimi Kesimleri

PCR ürünlerinin uygun olduğu belirlendikten sonra tüm örnekler, mutasyonlu ürünleri belli noktalarda kesme özelliğine sahip olan *Hinf* I ve *Ita* I (*Fnu4HI*) restriksiyon endonüklezlar ile RFLP analizi için kesilmiştir. Kesim ürünleri %10'luk poliakrilamid jel elektroforezinde (PAGE) görüntülenerek değerlendirilmiştir ve görüntüleri şekil 6-15'de verilmiştir.

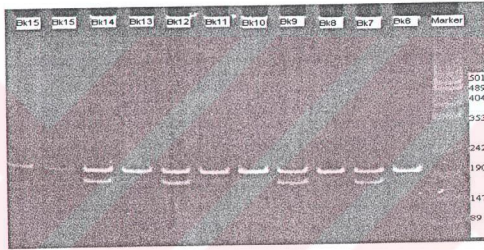
Jel elektroforezinin değerlendirilmesi, örneklerin oluşturduğu bantlar ile marker bantları kıyaslanarak yapılır. 677 C→T polimorfizminde, PCR ile 198 bç'lik çoğaltılmış DNA bölgesi *Hinf*I enzimi kullanılarak kesim yapıldığında 175 ve 23 bç uzunluğunda iki bant verir. Homozigot mutasyonu olan örnekler jelde 175 bç ve 23 bç'lik bantları, homozigot sağlam örnekler 198 bç bantı ve heterozigot örnekler ise hem 198 hem de 175 bç ve 23 bç'lik bantları verir. Şekil 6-11'de 677 C→T polimorfizmine ait %10'luk PAGE görüntüleri verilmiştir.



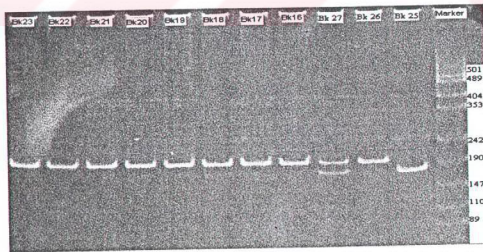
Şekil 6. 677 C→T polimorfizmi için 10, 11, 33, 35, 36, 37, 38, 39 nolu hasta örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü. (B10, B33, B35, B39 nolu örnekler CC homozigot sağlam genotipli; B11, B36, B38 nolu örnekler CT heterozigot genotipli; B37 nolu örnek ise TT homozigot mutant genotiplidir. Jelde 23 bç'lik parça görülmemektedir.)



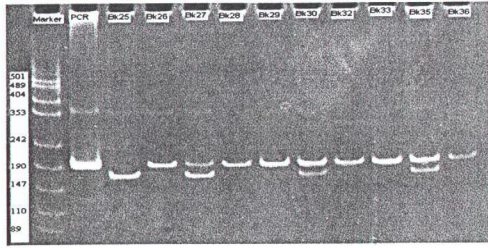
Şekil 7. 677 C→T polimorfizmi için 34, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 nolu hasta örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü. (B34, B52, B53, B54, B56, B57, B58 nolu örnekler CC homozigot sağlam genotipli; B51, B55 nolu örnekler CT heterozigot genotiplidir. Jelde 23 bç'lik parça görülmektedir.)



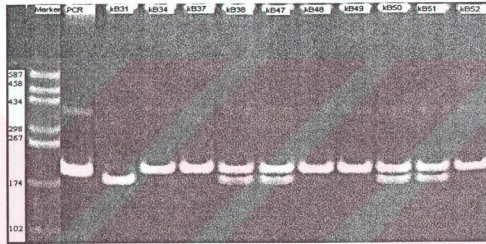
Şekil 8. 677 C→T polimorfizmi için 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 nolu kontrol örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü. (Bk 6, Bk 8, Bk 10, Bk 11, Bk 13, Bk 15 nolu örnekler CC homozigot sağlam genotipli; Bk 7, Bk 9, Bk 12, Bk 14 nolu örnekler CT heterozigot genotiplidir. Jelde 23 bç'lik parça görülmektedir.)



Şekil 9. 677 C→T polimorfizmi için 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27 nolu kontrol örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü. (Bk 26, Bk 16, Bk 17, Bk 18, Bk 19, Bk 20, Bk 21, Bk 22, Bk 23 nolu örnekler CC homozigot sağlam genotipli; Bk 27 nolu örnek CT heterozigot genotipli; Bk 25 nolu örnek ise TT homozigot mutant genotiplidir. Jelde 23 bç'lik parça görülmektedir.)

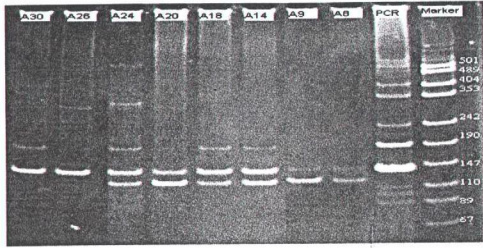


Şekil 10. 677 C→T polimorfizmi için 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 36 nolu kontrol örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü. (Bk 26, Bk 28, Bk 29, Bk 32, Bk 33, Bk 36 nolu örnekler CC homozigot sağlam genotipli; Bk 27, Bk 30, Bk 35 nolu örnekler CT heterozigot genotipli; Bk 25 nolu örnek ise TT homozigot mutant genotiplidir. Jelde 23 bç'lik parça görülmemektedir.)

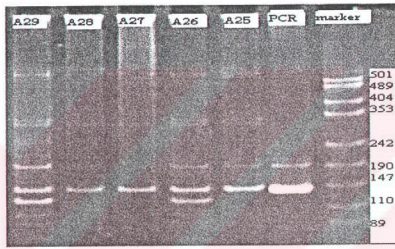


Şekil 11. 677 C→T polimorfizmi için 25, 34, 37, 38, 47, 48, 49, 50, 51, 52 nolu kontrol örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü. (Bk 34, Bk 37, Bk 48, Bk 49, Bk 52 nolu örnekler CC homozigot sağlam genotipli; Bk 38, Bk 47, Bk 50, Bk 51 nolu örnekler CT heterozigot genotipli; Bk 31 nolu örnek ise TT homozigot mutant genotiplidir. Jelde 23 bç'lik parça görülmemektedir.)

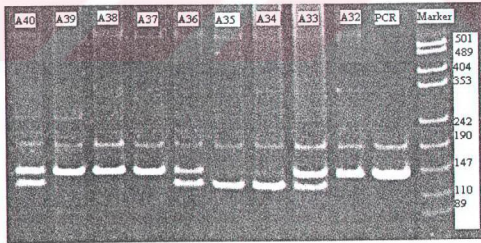
1298 A→C polimorfizmi için de PCR ile çoğaltılan 138 bç'lik DNA bölgesi *Ita I* enzimi ile 119 ve 19 bç'lik iki parçaya ayrılır. Homozigot mutasyonu olan örnekler jelde 119 bç ve 19 bç'lik bantları, homozigot sağlam örnekler tek 138 bç bantı ve heterozigot örnekler ise hem 119 hem de 138 bç ve 19 bç'lik bantları verir. Böylece homozigot sağlam, homozigot mutant ve heterozigot örnekler birbirinden ayrılır. Şekil 12-15'de 1298 A→C polimorfizmine ait %10'luk PAGE görüntülerinin yer aldığı şekiller görülmektedir.



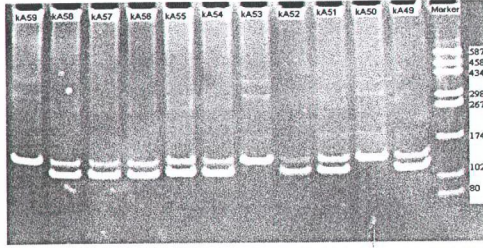
Şekil 12. 1298 A→C polimorfizmi için 8, 9, 14, 16, 20, 24, 26, 30 nolu hasta örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü. (A26, A30 nolu örnekler AA homozigot sağlam genotipli; A8, A9, A14, A18, A20, A24 nolu örnekler AC heterozigot genotiplidir. Jelde 19 bç'lik parça görülmektedir.)



Şekil 13. 1298 A→C polimorfizmi için 25, 26, 27, 28, 29 nolu hasta örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü. (A25, A27, A28 nolu örnekler AA homozigot sağlam genotipli; A26, A29 nolu örnekler AC heterozigot genotiplidir. Jelde 19 bç'lik parça görülmektedir.)



Şekil 14. 1298 A→C polimorfizmi için 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nolu hasta örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü. (A32, A37, A38, A39 nolu örnekler AA homozigot sağlam genotipli; A33, A36, A40 nolu örnekler AC heterozigot genotipli; A34, A35 nolu örnekler ise CC homozigot mutant genotiplidir. Jelde 19 bç'lik parça görülmektedir.)



Şekil 15. 1298 A→C polimorfizmi için 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 nolu kontrol örneklerinin kesimi sonucunda oluşan PAGE görüntüsü. (Ak 50, Ak 53, Ak 59 nolu örnekler AA homozigot sağlam genotipli; Ak 49, Ak 51, Ak 52, Ak 54, Ak 55, Ak 56, Ak 57, Ak 58 nolu örnekler AC heterozigot genotiplidir. Jelde 19 bp'lik parça görülmemektedir.)

Hasta ve kontrol grubunun 677 C→T ve 1298 A→C polimorfik genotipleri tablo 2'de verilmiştir. Buna göre 677 C→T polimorfizmi için; hasta grubunun 32'si CC, 24'ü CT ve 4'ü TT genotipli, kontrol grubunun ise 39'u CC, 20'si CT ve 1'i TT genotiplidir. 1298 A→C polimorfizmi için; hasta grubunun 25'i AA, 26'sı AC ve 9'u CC; kontrol grubunun ise 21'i AA, 34'ü AC ve 5'i CC genotiplidir.

Tablo 2. Hasta ve kontrol grubunun 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizm genotipleri

	Grup			Grup	
	677 C→T	1298 A→C		677 C→T	1298 A→C
Hasta 1	CT	AC	Kontrol 1	CC	AA
Hasta 2	CC	CC	Kontrol 2	CC	AC
Hasta 3	CT	AC	Kontrol 3	CC	CC
Hasta 4	CT	AA	Kontrol 4	CC	AA
Hasta 5	CC	AC	Kontrol 5	CC	AA
Hasta 6	CC	AC	Kontrol 6	CC	AC
Hasta 7	CT	AA	Kontrol 7	CT	AC
Hasta 8	CC	AC	Kontrol 8	CC	AC
Hasta 9	CC	AC	Kontrol 9	CT	AA
Hasta 10	CC	AA	Kontrol 10	CC	AC
Hasta 11	CT	AA	Kontrol 11	CC	AC
Hasta 12	CT	AA	Kontrol 12	CT	AC
Hasta 13	TT	AA	Kontrol 13	CC	AC
Hasta 14	CC	AC	Kontrol 14	CT	AC
Hasta 15	CC	AC	Kontrol 15	CC	AC
Hasta 16	CC	AC	Kontrol 16	CC	AC
Hasta 17	CC	CC	Kontrol 17	CC	AA
Hasta 18	CC	AC	Kontrol 18	CC	AA
Hasta 19	CT	AC	Kontrol 19	CC	AC
Hasta 20	CC	AC	Kontrol 20	CC	AA
Hasta 21	CT	AC	Kontrol 21	CC	AA
Hasta 22	CT	AA	Kontrol 22	CC	AC

Hasta 23	CC	CC	Kontrol 23	CC	AC
Hasta 24	CC	AC	Kontrol 24	CC	AC
Hasta 25	TT	AA	Kontrol 25	TT	AA
Hasta 26	CT	AA	Kontrol 26	CC	CC
Hasta 27	CT	AA	Kontrol 27	CT	AA
Hasta 28	CT	AA	Kontrol 28	CC	CC
Hasta 29	CC	AC	Kontrol 29	CC	CC
Hasta 30	CT	AA	Kontrol 30	CT	AC
Hasta 31	CC	AC	Kontrol 31	CT	AC
Hasta 32	CT	AA	Kontrol 32	CC	CC
Hasta 33	CC	AC	Kontrol 33	CC	AC
Hasta 34	CC	CC	Kontrol 34	CC	AA
Hasta 35	CC	CC	Kontrol 35	CT	AA
Hasta 36	CT	AC	Kontrol 36	CC	AC
Hasta 37	TT	AA	Kontrol 37	CC	AA
Hasta 38	CT	AA	Kontrol 38	CT	AC
Hasta 39	CC	AA	Kontrol 39	CC	AC
Hasta 40	CC	AC	Kontrol 40	CT	AC
Hasta 41	CC	AA	Kontrol 41	CC	AC
Hasta 42	CT	AA	Kontrol 42	CT	AC
Hasta 43	CT	AC	Kontrol 43	CT	AA
Hasta 44	CC	AC	Kontrol 44	CT	AA
Hasta 45	CC	CC	Kontrol 45	CC	AC
Hasta 46	CT	AA	Kontrol 46	CC	AA
Hasta 47	CT	AC	Kontrol 47	CT	AA
Hasta 48	CC	AA	Kontrol 48	CC	AC
Hasta 49	CT	AA	Kontrol 49	CC	AC
Hasta 50	CC	CC	Kontrol 50	CT	AA
Hasta 51	CT	AA	Kontrol 51	CT	AC
Hasta 52	CC	AA	Kontrol 52	CC	AC
Hasta 53	CC	AC	Kontrol 53	CT	AA
Hasta 54	CC	CC	Kontrol 54	CC	AC
Hasta 55	CT	AA	Kontrol 55	CC	AC
Hasta 56	CC	CC	Kontrol 56	CT	AC
Hasta 57	CC	AC	Kontrol 57	CT	AC
Hasta 58	CT	AC	Kontrol 58	CC	AC
Hasta 59	CC	AC	Kontrol 59	CT	AA
Hasta 60	TT	AA	Kontrol 60	CC	AA

Çalışmamız, 60 hasta ve 60 kontrol olmak üzere 120 bireyde yapıldı. Hasta grubunun 45'i erkek, 15'i kadın; kontrol grubunun ise 34'ü erkek, 26'sı kadındı (Tablo 3). Cinsiyete göre gruplar arası farkın önemli olmadığı belirlendi ($p= 0.240$).

Tablo 3. Cinsiyetin hasta ve kontrol grupları içinde dağılımı

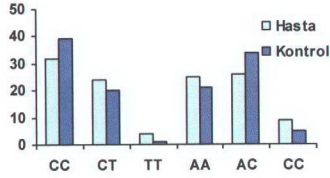
		Cinsiyet		Toplam
		Erkek	Kadın	
Grup	Hasta Yüzde	45 %75	15 %25	60
	Kontrol Yüzde	34 %56.7	26 %43.3	60
Toplam		79	41	120
p değeri		0.240, $p>0.05$		

Çalışmamızdaki 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmlerin dağılımı tablo 4'de verilmiştir. 677 C→T polimorfizmini incelediğimizde, CC homozigot hasta sayısının 32 (% 53.3), CT heterozigot hasta sayısının 24 (%40) ve TT homozigot hasta sayısının ise 4 (%6.7) olduğu bulundu. Kontrol grubunda ise; CC homozigot sayısı 39 (%65), CT heterozigot sayısı 20 (%33.3) ve TT homozigot sayısı ise 1 (%1.7) olarak bulundu (Tablo 4, Şekil 16). Bu değerlere göre; 677 C→T polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasındaki farkın Ki-kare testine göre istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu ($p= 0.240$).

1298 A→C polimorfizmini incelediğimizde AA homozigot hasta sayısının 25 (%41.7), AC heterozigot hasta sayısının 26 (%43.3), CC homozigot hasta sayısının ise 9 (%15) olduğu bulundu. Kontrol grubunda ise AA homozigot sayısı 21 (%35), AC heterozigot sayısı 34 (%56.7), CC homozigot sayısı 5 (%8.3) olarak bulundu (Tablo 4, Şekil 16). Bu değerlere göre; 1298 A→C polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasındaki farkın Ki-kare testine göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p=0.278$).

Tablo 4. 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizminin hasta ve kontrol grupları içerisinde dağılımı

		677 C→T Polimorfizm			Toplam	1298 A→C Polimorfizm			Toplam
		CC	CT	TT		AA	AC	CC	
Grup	Hasta Yüzde	32 %53.3	24 %40	4 %6.7	60	25 %41.7	26 %43.3	9 %15	60
	Kontrol Yüzde	39 %65	20 %33.3	1 %1.7	60	21 %35	34 %56.7	5 %8.3	60
Toplam		71 %59.2	44 %36.7	5 %4.2	120	46 %38.3	60 %50	14 %11.7	120
p değeri		0.240, $p>0.05$			0.278, $p>0.05$				

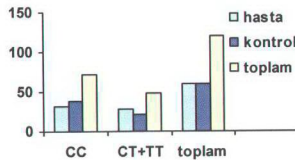


Şekil 16. 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizm allellerinin hasta ve kontrol grupları içinde dağılımı

Çalışmamızda, hasta ve kontrol grubunu, homozigot normal genotipliler ve heterozigot+homozigot mutant genotipli bireyler olarak da gruplandırarak karşılaştırıldı. Bu gruplandırmaya göre; 677 C→T polimorfizminde CC genotipli homozigot normal olanlar bir grup, CT (heterozigot mutant) ve TT (homozigot mutant) genotipleri diğer grup olarak belirlendi ve birbirleri ile karşılaştırıldı. CC genotipli 32 (%53.3) hasta ve CT + TT genotipli 28 (%46.7) hasta; CC genotipli 39 (%65) kontrol ve CT+TT genotipli 21 (%35) kontrol olduğu saptandı (Tablo 5, Şekil 17). Hasta ve kontrol grupları CC ve CT+TT genotiplerine göre Ki-kare testi ile karşılaştırıldığında aradaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p=0.295$).

Tablo 5. Gruplandırılmış 677 C→T polimorfizminin genotipleri ile hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı ve arasındaki ilişki

		Genotip		
		CC	CT+TT	
Grup	Hasta Yüzde	32 %53.3	28 %46.7	60
	Kontrol Yüzde	39 %65	21 %35	60
Toplam		71 %59.2	49 %40.8	120
p değeri		0.295, $p>0.05$		

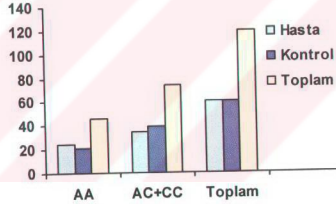


Şekil 17. Hasta ve kontrol gruplarının 677 C→T polimorfizm grupları arasındaki ilişki

Aynı gruptandırma 1298 A→C polimorfizmi için de yapıldı ve AA homozigot normal ve AC+CC (heterozigot mutant + homozigot mutant) genotipler olarak iki grup oluşturuldu. AA genotipli 25 (%41.7) hasta, AC + CC genotipli 35 (%58.3) hasta; AA genotipli 21 (%35) kontrol ve AC + CC genotipli 39 (%65) kontrol olduğu saptandı (Tablo 6, Şekil 18). Hasta ve kontrol grupları AA ve AC+CC genotiplerine göre Ki-kare testi ile karşılaştırıldığında aradaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (p=0.573).

Tablo 6. Gruplandırılmış 1298 A→C polimorfizmi ile hasta ve kontrol grupları arasındaki ilişki

		Genotip		Toplam
		AA	AC+ CC	
Grup	Hasta Yüzde	25 %41.7	35 %58.3	60
	Kontrol Yüzde	21 %35	39 %65	60
Toplam Yüzde		46 %38.3	74 %61.7	120
p değeri		0.573, p>0.05		

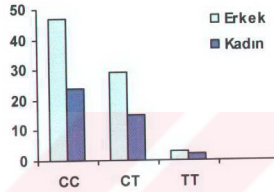


Şekil 18. Hasta ve kontrol gruplarının 1298 A→C polimorfizm grupları arasındaki ilişki

Hasta ve kontrol grupları birleştirilerek, 677 C→T polimorfizmi ile cinsiyet arasında ilişki olup olmadığına bakıldı. 79 erkek denegin 47 (%59.5)'si CC, 29 (%36.7)'u CT ve 3 (%3.8)'ü de TT genotipli olduğu bulunurken; 41 kadın denegin 24 (%58.5)'ü CC, 15 (%36.6)'i CT ve 2 (%4.9)'si de TT genotipli olduğu bulundu (Tablo 7, Şekil 19). Her iki cinsiyette de CC genotipinin daha çoğunlukta olduğu, genotipler ile cinsiyet arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (p=0.961).

Tablo 7. Cinsiyet gruplarına göre 677 C→T polimorfizminin dağılımı

		Genotip			Toplam
		CC	CT	TT	
Cinsiyet	Erkek	47	29	3	79
	Yüzde	%59.5	%36.7	%3.8	%100
Kadın	24	15	2	41	
	Yüzde	%58.5	%36.6	%4.9	%100
Toplam		71	44	5	120
Yüzde		%59.2	%36.7	%4.2	%100
p değeri		0.961, p>0.05			

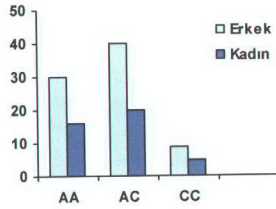


Şekil 19. Cinsiyete göre 677 C→T polimorfizminin dağılımı

Yine hasta ve kontrol grupları birleştirilerek 1298 A→C polimorfizmi ile de cinsiyet arasında ilişki olup olmadığına bakıldı. 79 erkek deneğin 30 (%38)'u AA, 40 (%50)'ü AC ve 9 (%11.4)'u da CC genotipli olduğu bulunurken; 41 kadın deneğin 16 (%39)'sı AA, 20 (%48.8)'si AC ve 5 (%12.2)' i de CC genotipli olduğu bulundu (Tablo 8, Şekil 20). Her iki cinsiyette de AC genotipli bireylerin yani heterozigot mutantların daha fazla olduğu ancak 1298 A→C polimorfizminin cinsiyete göre bir farklılık göstermediği; ve istatistiksel olarak da aradaki farkın anlamlı olmadığı bulundu (p=0.980).

Tablo 8. 1298 A→C polimorfizminin cinsiyete göre dağılımı

		Genotip			Toplam
		AA	AC	CC	
Cinsiyet	Erkek	30	40	9	79
	Yüzde	%38	%50	%11.4	%100
Kadın	16	20	5	41	
	Yüzde	%39	%48.8	%12.2	%100
Toplam		46	60	14	120
Yüzde		%38.3	%50	%11.7	%100
p değeri		0.980, p>0.05			



Şekil 20. 1298 A→C polimorfizminin cinsiyete göre dağılımı

Çalışmamıza katılan hasta ve kontrol grubundaki deneklerin sigara ve alkol içip içmeme durumu da değerlendirildi (Tablo 9).

Tablo 9. Hasta ve kontrol grubunda sigara ve alkol kullanımının dağılımı

Grup		Sigara		toplam	Alkol		Toplam
		Evete	Hayır		Evete	Hayır	
Grup	Hasta	35 %58.3	25 %41.7	60	16 %26.7	44 %73.3	60
	Kontrol	32 %53.3	28 %46.7	60	21 %35	39 %65	60
Toplam		67 %55.8	53 %44.2	120	37 %30.8	83 %69.2	120
p değeri		0.713, p>0.05			0.429, p>0.05		

Hasta grup içerisinde yer alan deneklerimizde sigara içenlerin sayısı 35 (%58.3) iken kontrol grubunda 32 (%53.3)'dir (Tablo 9). Hasta ve kontrol grubu sigara içip içmeme durumuna göre Ki-kare testi ile değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamadı (p=0.713).

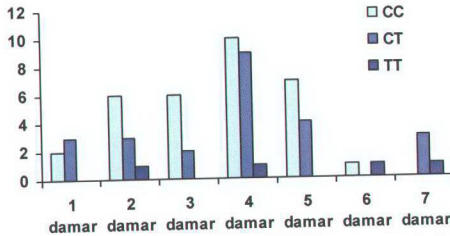
Çalışmamızda, hasta ve kontrol grubu alkol içip içmeme durumuna göre değerlendirildiğinde, hasta grubunda 16 (%26.7) alkol kullanana karşılık, 44 (%73.3) kullanmayan ve kontrol grubunda ise 21 (%35) alkol kullanana karşılık 39 (%65) kullanmayan olduğu tespit edildi (Tablo 9). Bu verilere göre hasta ve kontrol grupları arasında Ki-kare testi uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı (p=0.429).

Hastaların koroner arterlerindeki tıkalı damar sayısı kişisel farklılık göstermektedir. Çalışmamızdaki hasta grubundaki denekler de değişen sayıda (1-7) tıkalı damara sahipti. 677 C→T polimorfizminin tıkalı damar sayısına göre dağılımı tablo 10'da verilmiştir. Buna göre CC genotipli 2 (%6.3) hastada 1 damar, 6 (%18.8) hastada 2 damar, 6 (%18.8) hastada 3 damar, 10 (%31.3) hastada 4 damar, 7 (%21.9)

hastada 5 damar, 1 (%3.1) hastada 6 damar; CT genotipli 3 (%12.5) hastada 1 damar, 3 (%12.5) hastada 2 damar, 2 (%8.3) hastada 3 damar, 9 (%37.5) hastada 4 damar, 4 (%16.7) hastada 5 damar, 3 (%12.5) hastada 7 damar; TT genotipli 1 (%25) hastada 2 damar, 1 (%25) hastada 4 damar, 1 (%25) hastada 6 damar, 1 (%25) hastada 7 damar tıkalı olarak değerlendirilmiştir (Tablo 10, Şekil 21). CC genotipli hastalara göre CT ve TT genotipli mutant hastalarda tıkalı damar sayısının daha fazla olacağı düşünülmekteydi ancak yapılan istatistiksel değerlendirmede, Ki-kare testine göre tıkalı damar sayısı ile 677 C→T polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı (p=0.181).

Tablo 10. 677 C→T polimorfizminin tıkalı damar sayısına göre dağılımı

		Tıkalı Damar Sayısı							Toplam
		1	2	3	4	5	6	7	
677 C→T Polimorfizmi	CC	2 %6.3	6 %18.8	6 %18.8	10 %31.3	7 %21.9	1 %3.1	0 %0	32
	CT	3 %12.5	3 %12.5	2 %8.3	9 %37.5	4 %16.7	0 %0	3 %12.5	24
	TT	0 %0	1 %25	0 %0	1 %25	0 %0	1 %25	1 %25	4
Toplam		5 %8.3	10 %16.7	8 %13.3	20 %33.3	11 %18.3	2 %3.3	4 %6.8	60 %100
p değeri		0.181, p>0.05							



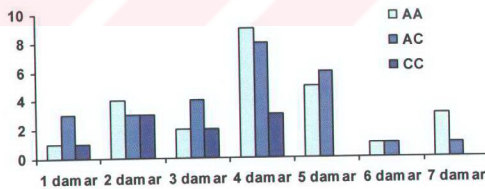
Şekil 21. 677 C→T polimorfizmi ile tıkalı damar sayısının ilişkisi

1298 A→C polimorfizminin tıkalı damar sayısına göre dağılımı tablo 11'de verilmiştir. AA genotipli tıkalı 1 damarı olan 1 (%4), 2 damarı olan 4 (%16), 3 damarı

olan 2 (%8), 4 damarı olan 9 (%36), 5 damarı olan 5 (%20), 6 damarı olan 1 (%4) ve 7 damarı olan 3 (%12) hasta olduğu bulundu. AC genotipli 1 damarı tıkalı olan 3 (%11.5), 2 damarı tıkalı olan 3 (%11.5), 3 damarı tıkalı olan 4 (%15.4), 4 damarı tıkalı olan 8 (%30.8), 5 damarı tıkalı olan 6 (%23.1) ve 7 damarı tıkalı olan 1 (%3.8) hasta olduğu bulundu ve CC genotipli hastalarda ise tıkalı damarı 1 olan 1 (%11.1), 2 olan 3 (%33.3), 3 olan 2 (%22.2) ve 4 olan 3 (%33.3) hasta olduğu bulundu (Tablo 11, Şekil 22). CC genotipli hastalarda 5-7 damarı tıkalı olan bireylere rastlanmadı. Bu verilere göre yapılan istatistiksel değerlendirmede Ki-kare testine göre 1298 A→C polimorfizmi ile tıkalı damar sayısı arasında anlamlı bir ilişki olmadığı bulundu ($p=0.747$).

Tablo 11. 1298 A→C polimorfizmi ile damar sayısı arasındaki ilişki

		DAMAR SAYISI							Toplam
		1	2	3	4	5	6	7	
1298 A→C Polimorfizmi	AA	1 %4	4 %16	2 %8	9 %36	5 %20	1 %4	3 %12	25
	AC	3 %11.5	3 %11.5	4 %15.4	8 %30.8	6 %23.1	1 %3.8	1 %3.8	26
	CC	1 %11.1	3 %33.3	2 %22.2	3 %33.3	0 %0	0 %0	0 %0	9
Toplam		5 %8.3	10 %16.7	8 %13.3	20 %33.3	11 %18.3	2 %3.3	4 %6.7	60
p değeri		0.747, $p>0.05$							



Şekil 22. 1298 A→C polimorfizmi ile tıkalı damar sayısı arasındaki ilişki

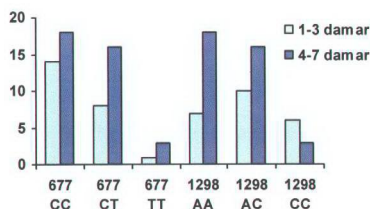
Tıkalı damar sayısı 1-3 ve 4-7 olarak hastalar iki gruba ayrılarak da değerlendirildi. Tıkalı damar sayısına göre hastalar gruplandırma yapıldıktan sonra 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizimleri için ayrı ayrı yeniden değerlendirilmiştir. 677 C→T polimorfizminde CC genotipli hastalardan 14 (%43.8)'ünün 1-3 damarı tıkalı, 18 (%56.3)'inin 4-7 damarı tıkalı; CT genotipli hastalardan 8 (%33.3)'inin 1-3 damarı

tıkalı, 16 (%66.7)'sının 4-7 damarı tıkalı, TT genotipli hastalardan ise 1 (%25)'inin 1-3 damarı tıkalı, 3 (%75)'ünün 4-7 damarı tıkalı bulundu (Tablo 12, Şekil 23). 1298 A→C polimorfizminde ise AA genotipli hastalardan 7 (%28)'sinin 1-3 damarı tıkalı, 18 (%72)'inin 4-7 damarı tıkalı; AC genotipli hastalardan 10 (%38.5)'unun 1-3 damarı tıkalı, 16 (%61.5)'sının 4-7 damarı tıkalı ve CC genotipli hastalardan ise 6 (%66.7)'sının 1-3 damarı tıkalı, 3 (%33.3)'ünün de 4-7 damarı tıkalı olduğu bulundu (Tablo 12, Şekil 23).

Tablo 12. 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmleri ile gruplandırılmış tıkalı damar arasındaki ilişki

		Damar Grupları		Toplam			Damar Grupları		Toplam
		1-3	4-7				1-3	4-7	
677 C→T Polimorfizmi	CC Yüzde	14 %43.8	18 %56.3	32	1298 A→C Polimorfizmi	AA Yüzde	7 %28	18 %72	25
	CT Yüzde	8 %33.3	16 %66.7	24		AC Yüzde	10 %38.5	16 %61.5	26
	TT Yüzde	1 %25	3 %75	4		CC Yüzde	6 %66.7	3 %33.3	9
	Toplam	23 %38	37 %61.7	60		Toplam	23 %38.5	37 %61.7	60
p değeri		0.621, p>0.05					0.123, p>0.05		

Uygulanan Ki-kare sonuçlarına göre; tıkalı damar sayıları ile polimorfizmler arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı bulundu (677 C→T için p=0.621, 1298 A→C için p=0.123).



Şekil 23. 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmleri ile gruplandırılmış tıkalı damar arasındaki ilişki

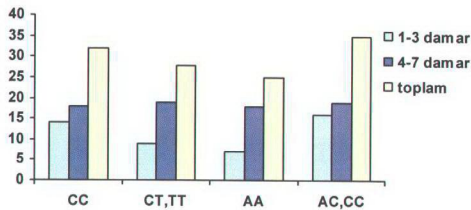
677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmlerinin homozigot sağlam genotipler (CC ve AA) ile homozigot mutant (TT ve CC) ve heterozigot mutant (CT ve AC) genotipler olarak gruplandırılarak, yine gruplandırılmış tıkalı damar sayısı ile (1-3 ve 4-7) karşılaştırılması yapıldı (Tablo 13, Şekil 24).

677 C→T polimorfizminde 1-3 damarı tıkalı olanların CC genotip frekansı %43.8 (14), CT ve TT genotip frekansı ise %32.2 (18); 4-7 damarı tıkalı olanların CC genotip frekansı %56.3 (18) ve CT ve TT genotip frekansı ise %67.9 (19) olduğu bulundu (Tablo 13). İstatistiksel olarak incelendiğinde, gruplandırılmış genotipler ile gruplandırılmış tıkalı damarlar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.430$).

1298 A→C polimorfizminde de 1-3 damarı tıkalı olanların AA genotip frekansı %28 (7), AC ve CC genotip frekansı %45.7 (16); 4-7 damarı tıkalı olan grupta ise AA genotip frekansı %72 (18) ve AC ve CC genotip frekansı %54.3 (19) olarak bulundu (Tablo 13). İstatistiksel olarak incelendiğinde Ki-kare testi ile değerlendirildiğinde, gruplandırılmış genotipler ile gruplandırılmış tıkalı damarlar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.189$).

Tablo 13. Gruplandırılmış genotipler ile gruplandırılmış tıkalı damar sayıları arasındaki ilişki

		Damar sayısı		Toplam	p değeri
		1-3	4-7		
677 CT	CC Yüzde	18 %56.3	18 %56.3	32	0.430, $p>0.05$
	CT, TT Yüzde	19 %67.9	19 %67.9	28	
1298 AC	AA Yüzde	18 %72	18 %72	25	0.189, $p>0.05$
	AC, CC Yüzde	19 %54.3	19 %54.3	35	



Şekil 24. Gruplandırılmış genotipler ile gruplandırılmış tıkalı damar sayıları arasındaki ilişki

5. TARTIŞMA

MTHFR enzimi, folat döngüsü içerisinde görev alan ve 5,10 MTHF'yi 5, MTHF'ye katalize eden enzimdir¹. MTHFR enziminin geni 1p 36.3'de lokalize olup bu gen üzerinde çeşitli nonsense ve missense mutasyonlar vardır²⁷. Bu mutasyonlar enzim aktivitesini farklı şekillerde etkilemektedir. Bunlardan 677 C→T polimorfizmi enzim aktivitesini % 55-65 oranında, 1298 A→C polimorfizmi ise %40 oranında azaltmaktadır. Azalan enzim aktivitesi, hiperhomosisteinemiye neden olmakta ve bunun sonucunda da çeşitli klinik problemler ortaya çıkmaktadır⁴.

Hiperhomosisteinemi sonucunda oluşan koroner ateroskleroz, Avrupa'da meydana gelen ölüm olaylarının %46'sından sorumludur. Bu nedenle MTHFR geni kodon 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmleri üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır⁴⁰.

Hastalığa hiperhomosisteineminin yanında folat eksikliği, B₆ vitamini yetersizliği, ilerlemiş yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, kolesterol, sedanter yaşantı, diyabet, hipertansiyon ve şişmanlık sebep olmaktadır⁵⁶.

Çalışmamızda 677 C→T polimorfizmi için; hasta grubunun %53.3 oranında CC genotipli, %40 oranında CT genotipli ve %6.7 oranında TT genotipli olduğu, kontrol grubunun ise; %65 oranında CC genotipli, %33.3 oranında CT genotipli ve %1.7 oranında TT genotipli olduğu bulundu. Ülkemizde Yılmaz ve arkadaşları tarafından yine aynı polimorfizm için 79 koroner arter hastası (damarında %50'den fazla darlık taşıyan) ve 93 sağlıklı kontrolle yapılan bir çalışmada ise; hasta grubunun %50.6 oranında CC genotipli, %40.5 oranında CT genotipli, %8.9 oranında TT genotipli olduğu; kontrol grubunun ise %46.2 oranında CC genotipli, %47.3 oranında CT genotipli ve %6.5 oranında TT genotipli olduğu bildirilmiştir⁶⁴. Bu verilere göre, 677 C→T polimorfizmi için bizim çalışmamızdaki hasta grubu ile yapılan çalışmanın hasta grubu benzerlik göstermektedir. Kontrol grupları arasında ise farklılık vardır. Ancak bu farklılık seçilen kontrol gruplarının benzer olmamasından kaynaklanabilir. Ayrıca her iki çalışmada da değerlere bakıldığında hasta ve kontrol grupları arasında fark olduğu görülmektedir. Fakat oluşan bu fark istatistiksel öneme sahip değildir. İsrail'de karotid aterosklerozlu hastalar kullanılarak yapılan çalışmada ise hasta grubunun %25 CC

genotipli, %56 CT genotipli %19 TT genotipli olduğu; kontrol grubunun ise %58 CC genotipli, %31 CT genotipli ve %11 TT genotipli olduğu bildirilmiştir⁶⁵. Buna göre İsrail popülasyonunda da Türk popülasyonunda olduğu gibi hasta ve kontrol grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen genotip frekansları tamamen farklılık göstermektedir. Ancak bu farklılığın değişik toplumlarda farklı olabileceğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Benzer çalışmalar Polonya⁶⁶, İspanya⁶⁷, Hollanda⁶⁸, Pakistan⁶⁹, Amerika⁷⁰ ve Arap⁷¹ popülasyonlarında da yapılmış ve her popülasyon için farklı genotip frekansları bulunmasına rağmen 677 C→T polimorfizmi için hasta ve kontrol grupları arasındaki farklar bizim çalışmamızda olduğu gibi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

677 C→T polimorfizmi ile ilgili olarak Japonya'da yapılan benzer çalışmalarda bizim bulgularımızdan farklı olarak koroner arter hastalığı ile arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Kluijtmans ve Whitehead bu çalışmaları toparlamış ve ortalama olarak, koroner arter hasta grubunun %34.6'sının CC genotipli, %45.6'sının CT genotipli, %19.8'inin TT genotipli; kontrol grubunun %42.6'sının CC genotipli, %46.4'ünün CT genotipli ve %11'inin TT genotipli olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmalardaki her grubun elde ettiği genotip frekansları farklılık göstermesine rağmen buldukları sonuçlar hepsinde de istatistiksel olarak anlamlıdır⁷². Genotip frekanslarının farklı olması seçilen hasta ve kontrol gruplarının farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Sonuç olarak MTHFR 677 C→T polimorfizminin Japonya popülasyonu için bir risk faktörü olduğu kanıtlanmıştır. Ancak yapılan diğer çalışmalara göre, bu polimorfizm Polonya, İspanya, Hollanda, Pakistan, Amerika, Arap ve Türk popülasyonları için risk faktörü oluşturmamaktadır⁶⁶⁻⁷¹.

Çalışmamızda MTHFR geni kodon 1298 A→C polimorfizmini, hasta ve kontrol grubunda incelediğimizde hastaların %41.7'si AA homozigot, %43.3'ü AC heterozigot, %15'i CC homozigot olarak bulundu. Kontrollerin ise %35'i AA homozigot, %56.7'si AC heterozigot ve %8.3'ü CC homozigot bulundu. Diğer polimorfizmde olduğu gibi bu polimorfizmde de hasta ve kontrol gruplarındaki değerlere bakıldığında fark olduğu görülmektedir. Fakat bu fark istatistiksel olarak önemli değildir. 1298 A→C polimorfizmi ile ilgili olarak Keku ve arkadaşları Amerika'da Kuzey Karolina'da beyaz ve zenci popülasyonunu çalışmışlardır. Bu çalışma sonucunda hasta zencilerde AA genotipi %64.6, AC genotipi %32.1, CC genotipi %3.3; sağlıklı zencilerde AA genotipi

%66, AC genotipi %30, CC genotipi %4 olarak bulunmuştur. Beyaz hasta grubunda AA genotipi %50.5, AC genotipi %42.7, CC genotipi %6.8; beyaz kontrol grubunda ise AA genotipi %43.8, AC genotipi %43.6, CC genotipi %12.6 olarak bulunmuştur⁷⁰. Her populasyon için genotip frekanslarında farklılık olmasına rağmen, hasta ve kontrol grupları arasındaki istatistiksel farkın önemsiz olduğu bildirilmiştir. 1298 A→C polimorfizmi ile ilgili olarak Rothenbacher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise hasta grubu için AA genotipi %42.7, AC genotipi %47.7, CC genotipi %9.7; kontrol grubu için AA genotipi %40.6, AC genotipi %45.6 ve CC genotipi %13.8 olarak bulunmuştur³⁶. Bu değerler bizim populasyon değerlerimize yakın değerler olup aynı şekilde hasta ve kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Arap populasyonu ile yapılan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir⁷¹. Sonuçların benzer olmasına rağmen genotip frekanslarındaki farklılık etnik köken kaynaklı olabileceği gibi seçilen gruplardaki bireylerin farklılığından ve yaşam koşullarının değişik olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Hasta ve kontrol grupları birlikte değerlendirilerek, 677 C→T polimorfizmi ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığına bakıldığında 79 erkek deneğin %59.5'i CC, %36.7'si CT ve %3.8'i de TT genotipli olduğu bulunurken; 41 kadın deneğin %58.5'i CC, %36.6'sı CT ve %4.9'u TT genotipli bulundu. Her iki cinsiyette de CC genotipinin daha çoğunlukta olduğu, fakat genotipler ile cinsiyet arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulundu. İspanya⁶⁷ ve Almanya³⁶'da yapılan çalışmalarda da cinsiyete göre genotip frekanslarının dağılımına bakılmış ve frekansları farklılık göstermesine rağmen bizim çalışmamızda olduğu gibi aradaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulunmuştur. Buna bağlı olarak genotip frekanslarının dağılımının cinsiyetle ilişkili olmadığı, seçilen grupların farklı olmasından dolayı da farklı frekansların bulunabileceği söylenebilir. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu yine birlikte değerlendirilerek 1298 A→C polimorfizmi ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığına bakıldığında 79 erkekte %38'i AA, %50'si AC ve %12'si CC genotipli bulunurken; 41 kadın deneğin %39'u AA, %48.8'i AC ve %12.2'si CC genotipli bulundu. Her iki cinsiyette de AC genotipli bireylerin yani heterozigot mutantların daha fazla olduğu, ancak cinsiyete göre bir farklılık göstermediği ve istatistiksel olarak da aradaki farkın anlamsız olduğu bulundu. Almanya'da yapılan çalışmada da bizim bulgularımıza benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Rothenbacher ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada da cinsiyet ile 1298 A→C polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır³⁶.

Sigara içimi, koroner arter hastalığı için tek başına en önemli risk etmenini oluşturur. Çalışmamızdaki sigara tüketimi frekansları hasta grubu için %58.3, kontrol grubu için %53.3 bulundu. Pek çok çalışmanın aksine bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubu sigara içip içmeme durumuna göre Ki-Kare testi ile değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır. Sigara içmeyenler ile sigara içenleri karşılaştıran bir çalışma Japonya'da yapılmıştır. Bu çalışmada iskemik stroke hastalarının %53.2'si, kontrollerin ise %24.5'i sigara tüketmekte olduğu bildirilmiştir⁷³. Buna göre iskemik felç için sigara tüketiminin hasta ve kontroller arasındaki farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bizim çalışmamızdaki anlamsız değerlerin sebebi bizim toplumumuzda sigara tüketiminin fazla olması ya da bölgemizde koroner arter hastalığının çok yaygın olması olabilir.

Çalışmamızda alkol kullanımı frekansları hasta grubunda %26.7, kontrol grubunda ise %35 olarak bulunmuştur. Japon populasyonu nu değerlendiren çalışmada alkol tüketimi hasta grubunda %55.8, kontrol grubunda ise %50.2 olarak bildirilmiştir⁷³. Hem bizim çalışmamızda hem de Japon populasyonunda yapılan çalışma da alkol tüketimi ile koroner ateroskleroz arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Bunun sebebi Japonyada alkol tüketiminin yaygın olması, her kesim tarafından tüketilmesi, bizim toplumumuzda ise geleneksel değerlerden ötürü alkol tüketiminin az olması olabilir.

Koroner ateroskleroz hastalarının tıkalı koroner arterlerinin sayısı kişisel farklılık göstermektedir. Çalışmamıza dahil ettiğimiz hasta grubunda değişen sayıda tıkalı koroner damar bulunmaktaydı. Heterozigot ve homozigot mutant bireylerdeki tıkalı damar sayısının homozigot sağlam bireylere göre daha fazla olacağı varsayımı ile yaptığımız istatistiki analizde tıkalı damar sayısının artışı ile 677 C→T polimorfizmi ve 1298 A→C polimorfizmi genotipleri arasında anlamlı bir ilişki kurulamadı. Tıkalı damar sayısının artışı ile polimorfizmler arasındaki bu anlamsız değer bizim populasyonumuz için beklediğimiz bir değerdi. Çünkü bu polimorfizmler bizim çalışmamızda zaten bir risk faktörü oluşturmamakta idi. Bu polimorfizmlerin tıkalı damar sayısında artış ile ilgisinin olup olmadığının anlaşılması için Japonya populasyonu gibi populasyonlarda bakılması anlamlı olacaktır. Çünkü bu populasyonda

677 C→T ve 1298 A→C polimorfizlerinin koroner ateroskleroz için risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Bu yüzden aradaki farkın anlamsız olması bizim popülasyonumuza mı özgü, yoksa gerçekten polimorfizmler ile tıkalı damar sayısının artışı arasındaki farkın anlamsız olduğu mu konusunda bir yorum yapmak yanlış olur düşüncesindeyiz.

Yapılan çeşitli çalışmalarda artmış homosistein seviyesinin koroner arter hastalığı riskini artırdığı bildirilmiştir. Clarke ve arkadaşları; kontrollerle karşılaştırıldığında koroner arter hastalığı olan vakalarda daha yüksek homosistein düzeyleri olduğunu bildirmişlerdir⁷⁴. Ou ve arkadaşlarının 677 C→T polimorfizmi üzerine yaptıkları çalışmalar neticesinde ise TT genotipinin total plazma homosistein seviyesini değiştirdiği yönünde sonuçlar bulmuşlardır. Bunlara göre TT genotipi, heterozigot CT ve homozigot CC genotipi ile karşılaştırıldığında, plazma total homosistein seviyesini artırdığı gözlenmiştir⁷⁵. Brattström ve arkadaşları 23 vaka-kontrol çalışması yaparak, çalışmalarında 5869 koroner arter hastası ve 6644 sağlıklı kontrol kullanmışlardır. Bu çalışmanın neticesinde TT genotipli bireylerin CC genotiplilere göre homosistein miktarının belirgin derecede yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir. Fakat bu çalışmada hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında MTHFR genotipinin koroner arter hastalığı ile ilişkili olmadığı da bildirilmiştir⁷⁶. Bizim çalışmamızda örneklerimizin homosistein seviyeleri değerlendirilmemiştir. Bu yüzden 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizm genotipleri ile homosistein seviyeleri karşılaştırılmamış ve çalışılan polimorfizmlerin homosistein değerlerini değiştirip değiştirmediğini ve bunun da hastalıkla ilişkili olup olmadığı değerlendirilememiştir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, Çukuruva Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalında koroner ateroskleroz tanısı ile koroner bypas olan ya da olacak olan hastaların kanlarında, MTHFR 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmleri araştırılmıştır. 1298 A→C polimorfizmi koroner ateroskleroz hastalarında ilk kez çalışılmıştır. Çalışmaya katılan hasta ve kontrol sayısı 60'tır. Çalışmamız sonucunda elde edilen sonuçlar şu şekildedir;

MTHFR 677 C→ T ve MTHFR 1298 A→C polimorfizmleri ile koroner ateroskleroz hastalığı arasındaki ilişkiye bakıldığında değerler arasında fark görülmesine rağmen, bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

MTHFR 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizmleri için cinsiyet arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Homozigot ve heterozigot mutant genotipler ile tıkalı damar sayısı arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

Koroner ateroskleroz hastalığı ile sigara ve alkol tüketimi arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

Koroner ateroskleroz, MTHFR 677 C→T-1298 A→C polimorfizmleri ve homosistein ile ilgili yayınlara göre; elde edilen sonuçlar, popülasyonlara göre farklılık göstermektedir. Bu polimorfizmler ile koroner ateroskleroz hastalığı arasındaki istatistiksel fark bazı popülasyonlarda anlamlı iken bazılarında anlamsızdır. Bunun yanında istatistiksel farkın anlamsız çıktığı çalışmalarda homosistein değerlerine bakıldığında polimorfizmler ile homosistein değeri arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmaktadır. Homozigot ve heterozigot mutant genotiplerde, homozigot sağlıklı genotipe göre homosistein düzeyinde belirli bir oranda artış gözlenmektedir. Bu çalışmalarda, 5 µmol/L'lik bir artışın koroner ateroskleroz hastalığı için bir risk etmeni olduğu bildirilmektedir. Bu verilere göre, homosistein artışı için, bu polimorfizmlerin bir risk faktörü olduğu, bundan dolayı da polimorfizmlerin koroner ateroskleroz hastalığı için risk faktörü olduğu söylenebilir. Bu yüzden polimorfizmler çalışılırken homosistein değerlerine de bakılacak olursa, bu polimorfizmlerin koroner ateroskleroz için bir risk faktörü olup olmadığı daha güvenilir bir şekilde tespit edilmiş olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Schwahn B, Rozen R. Polymorphisms in the methylentetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogenomics*, 2001; 1:189-201.
2. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, et al. A candidate genetic risk factor for cardiovascular disease: a common mutation at the methylentetrahydrofolate locus. *Natt Genet*, 1995; 10:111-113.
3. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, et al. The 1298 A→C polymorphism in methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis*, 2001; 156: 409-415.
4. Roiben K, Ulrich CM. 5,10-Methylen tetrahydrofolate reductase polymorphisms and Leukemia Risk. *American Journal of Epidemiology*, 2003; 157(7): 571-82.
5. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylen tetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 2000; 151:862-877.
6. Kupfermine MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med*, 1999; 340: 9-13.
7. Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, Burke H, Conley MR, et al. Methylentetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet*, 1999; 86: 71-74.
8. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylentetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr*, 1999; 70: 495-501.
9. Wenstrom KD, Johanning GL, Johnston KE, DuBard M. Association of the C677T methylentetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obstet Gynecol*, 2001; 184: 806-812.
10. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, et al. Methylentetrahydrofolate reductase, polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer res*, 1997; 57: 1098-1102.
11. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, et al. Methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98:4004-4009.
12. Tran P, Chan M, Pai A, Goyette P, Milos R, Rozen R et al. Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylentetrahydrofolate reductase gene result in two enzym isoforms. *Mamm Genome*, 2002; 9(8):652-656.

13. **Rozen R.** Methylen tetrahydrofolate reductase in vascular disease, neural tube defects and colon cancer. Unpublished data.
14. **Boushey CJ, Bersford SA, Omen GS et al.** A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*, 1995; 274, 1048-57.
15. **Kumral E.** Aterosklerozun Epidemiyolojisi ve Genel Özellikleri. Kumral E, İnce B. *Ateroskleroz ve Serebrovasküler Hastalıklar*, 1. Baskı, İstanbul: Tayf Matbacılık, 2003: 3-9.
16. **Matthews EG, Vanoni MA, Hainfeld JF, Wall J.** Methylen tetrahydrofolate reductase. Evidence for spatially distinct subunit domains obtained by scanning transmission electron microscopy and limited proteolysis. *J Biol Chem*, 1984; 259:11640-11647.
17. **Soydan İ.** Etiyolojik Faktörler. Kültürsay H. Koroner Kalp Hastalığı Primer ve Sekonder Korunma. 1. Baskı, İstanbul: Argos, 2001; 67-190.
18. **Libby P, Ridker PM, Genest J.** The Vascular Biology of Atherosclerosis and Risk Factors for Atherosclerotic Disease. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. *Heart Disease*. 6th Ed., Philadelphia: Saunders, 2001: 995-1039.
19. **Kullo JI, Gau TG, Tajik JA.** Novel Risk Factor Atherosclerosis. *Mayo Clin Proc*, 2000; 75: 369-380.
20. **Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K.** Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 1996; 27: 517-527.
21. **Seshadri N, Robinson K.** Homocysteine, B vitamins, and coronary artery disease. *Med Clin of North America*, 2000; 84: 215-237.
22. **Welch NG, Loscalzo J.** Homocysteine and Atherotrombosis. *N Engl J Med*, 1998; 338(15): 1042-1050.
23. **Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Anderson A, Allen RH.** Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem*, 1993; 39: 1764-1779.
24. **Sucu M, Karadede AA, Toprak N.** Homosistein ve Kardiyovasküler hastalıklar. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 2001; 29: 181-190.
25. **Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R.** Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem*, 1994; 40:873-81.

26. **Nygaard O, Vollset SE, refsum H.** Total plasma homocysteine and cardiovascular risk pr Hordoland Homocysteine Study. *JAMA*, 1995; 274: 177-184.
27. **Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, et al.** Human methylenetetrahydrofolate reductase : isolation of cDNA, mapping, and mutation identification. *Nat Genet*, 1994; 7: 195-200.
28. **Erişim:** <http://heartnet.bjmu.edu.cn/chrom/chrslide/t1.jpg>
Erişim Tarihi: 25/08/2005.
29. **Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R.** Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*, 1998; 9: 652-656.
30. **Daubner SC, Mathews RG.** Purification and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. *J Biol Chem*. 2001; 257: 140-145.
31. **Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J et al.** Thermolabile metylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet*, 1991; 48:536-545.
32. **Rosenblatt DS.** Methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Invest Med*, 2001; 24:56-59.
33. **Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, Stevens EMB et al.** Thermolabile 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet*, 1995; 56:142-150.
34. **Adams M, Smith PD, Martin D Et al.** Genetic analysis of thermolabile metylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for myocardial infarction. *Q J Med*, 1996; 89:437-444.
35. **Rozen R.** Molecular genetics of metylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 1996; 19:589-594.
36. **Ueland PM, Refsum H, Beresford SAA, Vollset SE.** The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr*, 2000; 72: 324-332.
37. **Rothenbacher D, Fischer HG, Hoffmeister A, Hoffman MM, Marz W, Bode G, Rosenthal J, Koenig W, Brenner H.** Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase genotype: association with risk of coronary heart disease and relation to inflammatory haemostatic and lipid parameters. *Atherosclerosis*, 2002; 162: 193-200.
38. **Wu Y, Tomon M, Sumino K.** Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke: sex difference in Japanese. *Kobe J Med Sci*, 2001; 47:255-262.

39. **Rigamonti A, Carriero MR, Boncoraglio C, Leone M, Bussone G.** Cerebral vein thrombosis and mild hyperhomocysteinemia: three new cases. *Neural Sci*, 2002; 23:225-227.
40. **Sazcı A, Ergul E, Guzelhan Y, Kaya G, Kara I.** Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with schizophrenia. *Molecular Brain Research*, 2003; 10; 117(1): 104.
41. **Erişim:** www.tmc.edu/thi/cad.html
Erişim Tarihi: 1/09/2005.
42. **Lusis AJ.** Atherosclerosis. *Nature*, 2000; 407: 224-233.
43. **Lascalzo J.** The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest*, 1996; 98:5-7.
44. **Robinson K.** Homocysteine, B vitamins , and risk of cardiovascular disease. *Heart*, 2000; 83: 127-130.
45. **Harker LA, Ross R, Slichter SJ.** Homocysteine-induced arteriosclerosis. *J Clin Invest*, 1976; 58: 731-741.
46. **Upchurch GRJr, Welch GN, Fabian AJ, et al.** Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, 1997; 272: 17012-7.
47. **Lentz SR, Sadler JE.** Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood*, 1993; 81: 683-689.
48. **Rodgers GM, Kane WH.** Activation of endogenous factor V by a homocysteine –induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest*, 1986; 77: 1909-1916.
49. **Wilcken DE, Wilcken B.** The pathogenesis of coronary artery disease: A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest*, 1976; 57: 1079-1082.
50. **Rodgers GM, Conn MT.** Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*, 1990; 75: 895-901.
51. **Lentz SR, Sadler JE.** Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest*, 1991; 88: 1906-14.
52. **Tokgözoğlu SL, Alikasıfoğlu M, Atalar E.** Homosistein ve MTHFR genotipinin koroner arter hastalığı risk ve yaygınlığının belirlenmesindeki önemi. *Türk Kardiyoloji Dern Arş*, 1999; 27: 598-603.
53. **Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB.** Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb*, 1993; 13: 1317-1333.

54. **Hajjar KA, Mauri L, Jacovina AT.** Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain: Direct modulation by homocysteine. *J Biol Chem*, 1998; 273:9987-9993.
55. **Stanger O, Hermann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M.** Consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. *D.A.C.H.-Liga Homocystein*, 2003.
56. **Sonel A.** *Kardiyoloji*. 4. Baskı, Ankara: Semih Ofset, 2002: 498s.
57. **Tokgözoğlu L.** Aterosklerozun Genetiği. Kumral E, İnce B. *Ateroskleroz ve Serebrovasküler Hastalıklar*, 1. Baskı, İstanbul: Tayf Matbacılık, 2003: 15-25.
58. **Girelli D, Friso S, Trabetti E.** Methylentetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: Evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood*, 1998; 91: 4158-4163.
59. **Jacques PF, Bostom AG, Williams RR.** Relation between folate status, a common mutation in methylentetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*, 1996; 93: 7-9.
60. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16(3): 125.
61. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
62. **Erişim:** http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/cgi-bin/get_entry.pl?AY338232
Erişim Tarihi: 09/09/2005.
63. **İşcan M.** Moleküler Genetikte Modern Teknikler. Telefoncu A, Küfrevioğlu Öİ, Pazarlıoğlu N. *Biyoinformatik-I*. 1. Baskı, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 2003: 71-82.
64. **Yılmaz H, Isbir S, Agachan B, Ergen A, Faesak B, Isbir T.** C677T Mutation of methylentetrahydrofolate reductase gene and serum homocysteine levels in Turkish patients with coronary disease. *Cell Biochemistry Function*, 2005;
65. **Bova I, Chapman J, Sylantiev C, Korczyn AD, Bornstein NM.** The A677V Methylentetrahydrofolate reductase gene polymorphism and Carotid Atherosclerosis. *American Heart Association*, 1999; 2180-2182.
66. **Erişim :**
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10948708&dopt=Abstract
Erişim Tarihi: 25/08/2005.

67. Guillen M, Corella O, Portoles JI, Gonzalez F, Mulet F, Saiz C. Prevalence of the methylentetrahydrofolate reductase 677C>T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *European Journal of Epidemiology*, 2001; 17:255-261.
68. Kluijtmans LAJ, Kastelein JJP, Lindemans JL, Godfried HJ et al. Thermolabile Methylentetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *American Heart Association*, 1997; 96:2573-2577.
69. Perwaiz MI, Tasneem F, Siddiqi P, Farzana Y, Frossard PM et al. Lack of association methylentetrahydrofolate reductase 677C>T mutation with coronary artery disease in Pakistani population. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 2005; 1 (1):0-0.
70. Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L, Martin C, Sandler R. 5,10-Methylentetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and Whites. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2002; 11:1611-1621.
71. Khaled KA, Wyngaard CA, Dzmiri N. Prevalence and role of methylentetrahydrofolate reductase 677 CT and 1298 AC polymorphisms in coronary artery disease. *Arch Pathol Lab Med.*, 2003; 127:1349-1352.
72. Kluijtmans LAJ, Whitehead AS. Methylentetrahydrofolate reductase genotypes and predisposition to atherothrombotic disease. *European Heart Journal*, 2001; 22:294-299.
73. Wu Y, Tomon M, Sumino K. Methylentetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke: sex difference in Japanese. *Kobe J Med Sci*, 2001; 47:255-262.
74. Clarke R, Daly L, Robinson K. Hyperhomocysteinemia: An independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, 1991; 324:1149-1155.
75. Ou T, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T et al. Methylentetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphisms are independent risk factors for coronary artery disease in Japanese: a case-control study. *Atherosclerosis*, 1998; 137:23-8.
76. Brattström L, Wilcken DEL, Ohrvik J, Brudin L. Common methylentetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease. The results of a meta-analysis. *Circulation*, 1998; 98:2520-6.

EKLER

EK-1. Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Hazırlanışı

Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning Kataloğu” esas alınmıştır⁶¹.

Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarına ulaştırmak için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüştürmelerinde $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formülünden yararlanılmıştır⁶¹.

M_1 = Hazırlanan stok konsantrasyonu (M, N veya %)

V_1 = Stoktan alınması gereken miktar (V)

M_2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V_2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (V)⁶¹

1.1. Lizis Tamponu

0.32 M sukroz

10 mM Tris HCl

5 mM MgCl₂

%1 TritonX100

Hazırlanacak hacim için sukroz, Tris HCl, MgCl₂ ve TritonX100 hesaplanarak tartılır ve üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.2. Fizyolojik Tampon

0.075 M NaCl

0.025 M EDTA

Hazırlanacak hacim için NaCl ve EDTA hesaplanarak tartılır ve üzeri saf su ile tamamlanır, pH 7.5-7.4'e ayarlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.3. TE-9

500 mM Tris baz

20 mM EDTA pH 9.0

10 mM NaCl

Hazırlanacak hacim için kullanılacak olan Tris, EDTA ve NaCl hesaplanarak tartılır, üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.4. SDS (Sodyum Dedosil Sülfat) Solüsyonu

%10 SDS

20 ml için 2 gr SDS tartılır, 20 ml saf su ile bir şişe içerisinde iyice karıştırılır.

Kullanıncaya kadar buzdolabında veya oda ısısında tutulabilir.

1.5. TE Tamponu (pH 7.0 ve 8.0)

10 mM Tris pH 8.0

0.1 mM EDTA pH 8.0

Hazırlanacak hacim için kullanılacak olan Tris ve EDTA hesaplanarak stoklardan alınır, üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

EK-2. PCR

PCR ilk kez Kaliforniya'da Berkeley yakınlarında, Cetus firmasında çalışan Kary Mullis tarafından 1985 yılında icat edilmiştir⁶³. PCR, kalıp DNA üzerindeki belirli bir gen bölgesinin ısıya dayalı olarak tekrar eden reaksiyon döngüleriyle ve enzimler aracılığı ile *in vitro* koşullarda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir.

Her bir PCR döngüsü, reaksiyon karışımının, reaksiyonun gerçekleşmesi için daha önceden belirlenmiş olan en uygun üç sıcaklık derecesi arasında transfer edilmesi ile tamamlanır. PCR bir zincir reaksiyonudur, çünkü, yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve istenildiği kadar tekrar edilir. 25-30 döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1 000 000 kez artış olur⁶³. Reaksiyon boyunca gereken sıcaklık, süre, döngü sayılarını kontrolü ve otomasyonu Thermal Cycler olarak bilinen cihazlarla yapılır⁶¹. Bu yöntem ile, klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere, bol miktarda hedef DNA parçaları elde edilir⁶³.

DNA çift sarmalı üzerinde bulunan karşılıklı bazlar arasındaki hidrojen bağlarının kırılarak, primerlerin yapışabileceği tek iplikli DNA moleküllerinin oluşumunu sağlayan sıcaklık denatürasyon sıcaklığıdır (genellikle 94 °C). Burada kullanılacak DNA temiz olmak zorunda değildir. Kurumuş kan veya semen gibi adli tıp örnekleri, tek bir saç teli, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler, mumya kalıntıları ve fosil gibi değişik kaynaklardan genomik DNA elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır. Bu süreç yaklaşık 5 dakikadır ve bu süreçte enzimler çalışmaz⁶³.

Primerlerin tek iplikli DNA molekülü üzerinde komplementer olduğu bölgelere hibridize olduğu sıcaklık annealing (yapışma) sıcaklığıdır. Annealing sıcaklığı primer uzunluğuna ve baz içeriğine göre değişir. Reaksiyonun özgüllüğü için son derece önemlidir. Primer-kalıp DNA hibridizasyonu sıcaklığa bağlı bir olay olduğundan annealing sıcaklığı hibridizasyonun oluşumunu sağlayacak kadar düşük ve yanlış bağlanmalara izin vermeyecek kadar da yüksek olmalıdır. Bu sıcaklık 50-70 °C arasındadır⁶¹.

DNA polimeraz için optimum olan sıcaklık ise uzama (sentez) sıcaklığı olarak belirtilir. Bu sıcaklık kullanılan DNA polimerazlara göre farklılık gösterebilir. Örneğin Taq DNA polimeraz için 72 °C iken Pwo için 68 °C'dir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5'den 3'ne doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli bir

kopyasını oluşturur. Doğru pozisyon almamış primerler ve kalıp DNA arasındaki bağlar bu ısıda ayrılırlar⁶¹.

2.1. Bir PCR Reaksiyonu İçin Gerekli olan Bileşenler ve Fonksiyonları

2.1.1. Kalıp Genomik DNA

PCR reaksiyonunda amplifiye edilecek bölge için kalıp görevi yapar. Yapılacak olan çalışmaya göre herhangi bir canlının kanından veya dokusundan izole edilebilir⁶¹.

2.1.2. Primerler

PCR reaksiyonunda amplifiye edilecek bölgenin sınırlarını belirleyen sentetik oligonükleotidlerdir. Ayrıca polimerizasyon reaksiyonları için DNA polimeraz enzimine primer görevi yaparlar. Primerler sadece amplifiye edilecek olan hedef bölgenin kanat bölgelerine komplementer olmalıdır. Aksi takdirde non-spesifik amplifikasyonlar gözlenebilir. Bu nedenle reaksiyonun istenilen yönde gerçekleşmesini sağlayan en temel faktörlerden biridir ve seçiminde şu hususlara dikkat edilmelidir⁶¹.

Primer dizisi 1-2 pürin bazı ile başlayıp bitmeli.

Kullanılan primerlerin kendi aralarında ve dizileri içerisinde komplementer bölgeler olmamalı.

Timin nükleotidi yanlış eşleşmeye daha toleranslı olduğundan 3' uçlarında bulunmamalı.

Tm'leri aynı veya çok yakın olmalı.

GC (Guanin-Sitozin) oranı %40-60 arasında olmalı

Herhangi bir baz 4'den fazla arka arkaya tekrar etmemeli⁶¹.

2.1.3. Reaksiyon Tamponu

PCR reaksiyonunda, reaksiyon koşullarının optimum şartlara getirilmesini sağlayan (iyonik direnci, pH, Mg⁺² gibi) karışımdır⁶¹.

2.1.4. DNA Polimeraz

PCR reaksiyonunda polimerizasyonun gerçekleşmesini sağlayan enzimdir. Isıya dayanıklı termofilik bakterilerden izole edildiğinden ötürü yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır⁶¹.

2.1.5. Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTPs)

PCR reaksiyonunda, polimerizasyon için gerekli olan enerji ve nükleotid kaynağını oluştururlar⁶¹.

2.2. PCR Reaksiyonun Hazırlanması

Roche protokolünde PCR reaksiyonundaki bileşenlerinin miktarları 25 µl'lik reaksiyon hacmi için şu şekilde önerilmektedir:

5 µl 10X reaksiyon tamponlarının birinden

0.6 µl 10 mM dNTP karışımı

Her bir primerden 200 ng

150 ng Kalıp DNA

2 U Termotabil DNA Polimeraz

25 µl'ye tamamlayacak kadar deiyonize su

PCR'da tampon bileşimi ve ortam pH'sı reaksiyon verimini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Öncelikle, reaksiyon sonunda kalitatif ve kantitatif olarak en iyi sonucu verecek ve daha sonraki PCR reaksiyonlarında da kullanılacak olan tampon bileşiminin belirlenmesi için optimizasyon kitindeki bütün tamponların kullanıldığı bir optimizasyon reaksiyonu hazırlandı. Reaksiyonlar mümkün olduğu kadar steril şartlarda ve buz üzerinde, en son enzim ilave edilecek şekilde hazırlandı⁶¹.

EK-3. Jel Elektroforezi

Bir su yosunundan elde edilen agaroz, D-Galaktoz ve 3,6-anhidro L-Galaktoz birimlerinin lineer polimerleridir⁶¹.

Agaroz jeller, uygun tamponla berrak bir çözelti elde edene kadar ısıtılıp kaynatma yolu ile hazırlanır. İçine 0.5µl/ml oranında ethidium bromide (EtBr) eklenerek jel dökme kabına dökülür ve polimerize olması için beklenir. Polimerize olan jel, yoğunluğu agarozun konsantrasyonu ile belirlenen bir matriks oluşturur. Jel boyunca elektrik akımı uygulandığı zaman, nötral pH'da negatif yüklü olan DNA, anoda doğru göç eder. Göç oranı pek çok parametre ile belirlenir⁶¹.

3.1. DNA'nın moleküler büyüklüğü

Lineer çift iplikli DNA molekülleri bir elektrik alanında bir bütün halinde hareket etme eğilimindedir. Jel matriksi boyunca baz çifti sayısının 10 tabanına göre logaritması (\log_{10}) ile ters orantılı bir oranda göç eder. Büyük moleküller sürtünme direncinden ötürü daha yavaş hareket ederler ve porlar boyunca kat ettikleri yolu küçük moleküllere oranla daha fazla ısıtırlar (Çizelge 5)⁶¹.

Çizelge 5. Agoroz ve akrilamid konsantrasyonları ve ayırabildikleri DNA büyüklükleri

Agaroz mik. (%)	DNA (kb)	Akrilamid mik. (%)	DNA (bç)
0.3	5-60	3.5	100- 1000
0.6	1-20	5.0	80- 500
0.7	0.8-10	8.0	60- 400
0.9	0.5-7	12.0	40- 200
1.2	0.4-6	20.0	10- 100
1.5	0.2-4		
2.0	0.1-3		

3.2. Agaroz konsantrasyonu

Bilinen büyüklükte lineer bir DNA parçası farklı agaroz konsantrasyonlarındaki jellerde farklı oranda göç eder. Jel konsantrasyonu (γ) ile DNA'nın elektroforetik

hareketinin (μ) logaritması arasında aşağıdaki eşitlikle tanımlanan lineer bir ilişki mevcuttur:

$$\text{Log}\mu = \text{Log}\mu_0 - Kr \cdot Y$$

μ_0 : DNA'nın serbest elektroforetik hareketi ve

Kr: Gecikme sabitesi (Jelin özelliklerine, büyüklüğüne ve göç eden molekülün göç şekline bağlı sabit bir sayıdır)⁶¹.

3.3. DNA'nın konformasyonu

Aynı moleküler ağırlıktaki süperhelikal sirküler (form I), çentikli sirküler (form II) ve lineer DNA (form III), agaroz jellerde farklı oranlarda göç eder. Üç formun rölatif hareketi primer olarak jeldeki agaroz konsantrasyonuna bağlıdır. Fakat uygulanan akımın gücü, tamponun iyonik gücü ve form I DNA'nın süperhelikal kıvrımlarının yoğunluğu da bu hareketi etkilemektedir. Aynı şartlar altında form I DNA, form II DNA'dan daha hızlı göç eder; farklı şartlar altında ise durum tam tersidir⁶¹.

3.4. Uygulanan voltaj

Düşük voltajlarda, lineer DNA parçalarının göç oranı uygulanan voltajla orantılıdır. Yani agaroz jellerde etkili ayırma oranı voltaj arttıkça azalmaktadır. 2 kb'dan daha büyük DNA parçalarını maksimum oranda ayırıştırmak için agaroz jellere 5V/cm'den daha fazla voltaj uygulanmamalıdır. Mesafe jelin uzunluğu olarak değil, elektrodlar arasındaki en kısa yol olarak ölçülmelidir⁶¹.

3.5. Elektrik akımının yönü

50-100 kb'dan daha büyük DNA molekülleri elektrik akımının yönü sabit kalırsa agaroz jelde aynı yönde göç ederler. Bununla birlikte elektrik akımının yönü periyodik olarak değiştirilerek DNA moleküllerinin zorunlu olarak yönlerini değiştirmesi sağlanır. Daha büyük olan DNA moleküllerinin yeni akım yönüne uyum sağlamaları daha uzun zaman alır. Pulsed-field jel elektroforezi ekstrem büyüklükteki DNA molekülü popülasyonunu ayırmak için kullanılabilir⁶¹.

3.6. Baz kompozisyonu ve ısı

Poliakrilamid jellerin tersine agaroz jellerde DNA'nın elektroforetik davranışı, DNA'nın baz kompozisyonu veya elektroforez esnasındaki ısıdan pek etkilenmez. Yani agaroz jellerde, farklı büyüklükteki DNA fragmanlarının elektroforetik hareketi 4-30 °C arasında değişmez. Agaroz jel elektroforezi genelde oda ısısında yapılır. %0.5'ten daha az agaroz içeren jeller ve düşük kaynama ısılı agaroz jeller daha narindir ve zarar görmemeleri için elektroforezlerinin 4 °C'de gerçekleştirilmesi daha iyi sonuç verir⁶¹.

3.7. Boyaların etkisi

Ethidium bromid, agaroz ve poliakrilamid jellerde DNA'yı gözlemek için kullanılan floresan bir boyadır ve lineer DNA'nın elektroforetik hareketini %15 oranında azaltır. Boya, baz çiftlerinin arasına girerek lineer ve çentikli sirküler DNA moleküllerinin boyuna uzatarak onları daha rijit hale getirir⁶¹.

3.8. Elektroforez tamponunun kompozisyonu

Elektroforez tamponunun iyonik gücü ve kompozisyonu DNA'nın elektroforetik hareketini etkiler. Ortamda iyonlar olmazsa elektriksel iletkenlik minimal düzeydedir ve DNA oldukça yavaş hareket eder. Yüksek iyonik güce sahip tamponlarda (10X elektroforez tamponu yanlışlıkla kullanılırsa) elektriksel iletkenlik oldukça etkili olur ve önemli oranda ısı ortaya çıkar. Daha da kötüsü jel kaynar ve DNA denatüre olur. Çift iplikli DNA'nın elektroforezi için kullanılabilen çeşitli tamponlar mevcuttur. Elektroforez tamponları genellikle konsantre çözeltiler halinde hazırlanırlar ve oda ısısında saklanırlar⁶¹.

Agaroz jeller yatay kalıplara yaklaşık 0.5 cm kalınlıkta, poliakrilamid jeller ise dikey kalıplara 0.3 mm kalınlıkta dökülür. Oluşan DNA bantlarını jelde UV altında görebilmek için EtBr ile boyanması gerekmektedir. Boyama işleminde jel ya yürütme işleminden sonra EtBr içeren bir solüsyonda bekletilir ya da hazırlanma aşamasında içerisinde daha önceden hazırlanmış olan EtBr solüsyonu ilave edilir. Bu yöntemler ile 25 ng'dan az DNA içeren bantların gözlenmesi zordur. Bu nedenle DNA miktarı az olan DNA bantlarının incelenmesinde direk problama, southern blot ve otoradyografi gibi yöntemler kullanılır⁶¹.

Jel elektroforezi ile PCR reaksiyonunun sonucu amplifikasyonunu gerçekleştirdiğimiz bölge pozitif kutba doğru hareket ederek bantları meydana getirir. Bantların büyüklüklerini tahmin etmede kullanılan kontrollerin yanında kesim reaksiyon ürünleri belli olan markerlar kullanılmaktadır. Örneğin, pUC 18 plazmid DNA'sının Hae III ile kesiminden büyüklükleri 587 b ile 11 b arasında değişen, 11 parça oluşur. Bu Şekilde bir marker kullanarak düşük bir yanılma olasılığı ile fragmanların büyüklüğü tahmin edilebilir⁶¹.



EK-4. Agaroz Jelin Hazırlanması

Agaroz hazırlanmasında jel kalınlığı dikkate alınarak jel döküm tablasının boyutları ölçülür ve jel hacmi belirlenir. Hazırlanmak istenen yüzde konsantrasyona göre (örn. %1'lik), belirlenen hacim için gerekli olan agaroz tartılır ve erlen içine koyulur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu ilave edilir ve mikrodalga fırında eritilir. Çok kısa süreli bir kaynama yeterlidir. Daha sonra jel üzerine son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde stok EtBr solüsyonundan ilave edilir. Jel sıcaklığı 45-50 °C'ye geldiğinde hazırlanan jel kabına dikkatli bir şekilde, hava kabarcığı oluşturmadan dökülür ve yaklaşık 30 dk beklenerek polimerize olması sağlanır. Jel elektroforez tankına alınır ve üzerini kapatacak şekilde 1X TBE tamponu eklenir.

4.1. Yükleme Tamponu (6X)

100 ml hazırlamak için;

40 gr Sukroz

0.25 gr Bromfenol mavisi

Belirtilen miktarlarda sukroz ve bromfenol mavisi tartılır, üzerine 100 ml distile su ilave edilerek vorteksle iyice karıştırılır. Daha sonra ependorf tüplere paylaştırılarak 4°C'de saklanır. PCR ürünü DNA solüsyonu ile 1/5 oranında karıştırılır.

EK-5. Kullanılan Enzimler ve Tampon Sistemleri

5.1. Restriksiyon Endonükleazlar

Kullanılan restriksiyon endonükleazlar Fermentas firmasından satın alındığından enzimlerin özelliklerinde ve tampon sistemlerinin sınıflandırılmasında bu firmanın katalog bilgileri esas alınmıştır (Çizelge 6).

Nükleotidler için kullanılan kısaltmalar:

A: Adenin,	Y: C veya T,	B: C veya G veya T,
T: Timin ,	M: A veya C,	D: CA veya G veya T,
G: Guanin,	K: G veya T,	H: A veya C veya T,
C: Sitozin,	S: G veya C,	V: A veya C veya G,
R: G veya A,	W: A veya T,	N: A veya C veya G veya T

Çizelge 6. Restriksiyon endonükleazlar

		RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ		
		<i>Ita I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Msp I</i>
Tanıma Dizisi (5'→3')		GC NGC	G ANTC	C CGG
İzoizomeri		<i>Fnu4HI</i>	–	<i>Hpa II</i>
Çalışma sıcaklığı		37 °C	37 °C	37 °C
Saklama sıcaklığı		–20 °C	–20 °C	–20 °C
Kaynağı		<i>Ilyobacter tartaricus</i>	<i>Haemophilus influenzae Rf</i>	<i>Acinetobacter rwoffii</i>
İnaktivasyonu		65 °C'de 10 dk	EDTA (0.5 M)	65 °C'de 15 dk
İnkübasyon tamponu ve konsantrasyonu		10X H	10X H	10X H
Hacim aktivitesi (U/μl)		10	10	10
Farklı DNA'larda Kesim Bölge Sayısı	λ	380	–	6
	PBR322	42	10	26
	pUC18	–	–	13

EK-6. Poliakrilamit Jel Elektroforezi

Genellikle amonyum persülfattan sağlanan serbest radikallerin varlığında ve TEMED (N,N,N',N', tetrametilen-diamin) in instabilize edici etkisi altında akrilamit monomerlerin uzun zincirler halinde polimerize olması sağlanır. İki fonksiyonlu bir ajan olan N, N'-metilenbisakrilamit polimerizasyon reaksiyonuna katıldığı zaman lineer akrilamit zincirlerini çapraz bağlayarak jeli oluşturur. Reaksiyon N,N'-metilenbisakrilamiti, akrilamit konsantrasyonunun 1/30'u oranında içermelidir. Jelin gözenekliliğini zincirlerin uzunluğu ve çapraz bağlanma oranı belirler. Zincirlerin boyunu belirleyen, polimerizasyon reaksiyonundaki akrilamidin konsantrasyonudur (%3.5-20). Reaksiyon, her 29 akrilamit monomeri için 1 molekül çapraz bağlayıcı yani bisakrilamit içermektedir. Nondenatüre jellerde farklı poliakrilamit konsantrasyonlardaki etkili ayırma aralığı çizelge 7'de gösterilmiştir⁶¹.

Çizelge 7. Akrilamit

AKRİLAMİT ^a (%w/v)	ETKİLİ AYIRMA ARALIĞI (bç)
3.5	1000-2000
5.0	80-500
8.0	60-400
12.0	40-200
15.0	25-150
20.0	6-100

Poliakrilamit jellerin hazırlanması ve elektroforezi agaroz jele oranla oldukça zahmetlidir. Karışım, speysırlarla ayrılmış, ve alttan akması önlenmiş iki cam arasına dökülür. Poliakrilamit jeller, gerekli olan ayırma bağı olarak 10-100 cm arasında değişen uzunluklarda olabilir. Poliakrilamit jeller istisnasız olarak dikey çalışırlar. Agaroz jellerle kıyaslamada üç temel avantaja sahiptirler:

- 1) Ayırma güçleri o kadar büyüktür ki uzunlukları sadece % 0.2 oranında değişen (örneğin 500 bç'de 1 bç) DNA moleküllerini bile ayırabilir.
- 2) Tek bir poliakrilamit kuyusuna uygulanabilen DNA miktarı hem agarozu göre daha fazladır ve hem de rezolüsyonda bir fark yoktur.
- 3) DNA jelden daha saf ve çeşitli amaçlara uygun olarak izole edilebilir⁶¹.

Çift iplikli DNA fragmanlarının purifikasyonu ve ayrımı için kullanılan nondenatüran poliakrilamit jeller: Bu jeller, polimerize olduktan ve örnekler uygulandıktan sonra 1X TBE'de ve düşük voltajda (1-8 V/cm) elektroforeze tabi tutulurlar. Elektrik akımı nedeni ile oluşan ısının küçük DNA fragmanlarını denatüre etmesini önlemek amacıyla düşük voltaj uygulanır⁶¹.

20 cmX40 cm'lik cam plakları tutmak üzere dizayn edilmiş bir çok vertikal elektroforez tankı, ticari kaynaklardan sağlanabilir. Uygun tanklarla daha büyük veya daha küçük jellerinde kullanımı mümkündür. Speysırlar 0.5-2 mm arasında değişebilen inceliktedir. Jel ne kadar kalın ise elektroforez esnasında o kadar fazla ısınır. Fazla ısınma kuyruklu DNA bantlarına ve daha başka problemlere sebep olur. Bu yüzden daha keskin ve yassı DNA bantlarına imkan tanıdığından ince jeller tercih edilir. Ayrıca büyük miktarlarda DNA hazırlamak gerektiğinde (1 µg/bant) daha kalın jeller kullanmak gereklidir⁶¹.

6.1. %30 Poliakrilamit

29 gr akrilamit

1 gr N,N'-metilenbisakrilamit

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

100 ml %30'luk poliakrilamit solüsyonu hazırlamak için yukarıda verilen miktarlarda kimyasallar tartılır ve toplam hacimden biraz az saf su ile çözülür. Kimyasal çözününce saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlanır. Kimyasalların iyice çözünmesi için solüsyon 37 °C'de su banyosunda bir süre bekletilir. 0.22 µm por çapına sahip steril filtreden süzülüp steril edilir ve oda ısısında saklanır.

6.2. %25 Amonyum Per Sulfat (APS)

0.125 gr APS

Saf su ile 0.5 ml'ye tamamlanır.

1.5 ml'lik temiz bir ependorf tüpüne yukarıda belirtilen miktarda APS tartılır ve üzerine saf su eklenir. Karışım iyice karıştırılır ve iyice çözülmesi için 37 °C'de su banyosunda bir süre bekletilir. 4 °C'de 1-2 hafta saklanabilir.

6.3. 5X TBE Tamponu (pH 8.0)

1 litre için;

54 gr Tris baz

27.5 gr Borik asit

0.01 M EDTA (pH 8.0)

Hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıdaki değerlere göre oranlanarak alınır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülür, NaOH ile pH 8.0'a ayarlanır ve otoklavlanır.

1 hacim 5X TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilerek 1X TBE tamponu elde edilir.

6.4. Ethidium Bromid (EtBr= 10mg/ml)

Hazırlanacak hacim uyarınca gereken miktar Ethidium Bromid (EtBr) dikkatli bir şekilde tartılır ve suda iyice karıştırılarak çözülür. Işığa hassas olduğu için renkli bir cam şişede veya alüminyum folyo sarılarak +4 C'de saklanır. Jele son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

EtBr, floresan bir boyadır ve DNA ve RNA'ya bazları arasından girerek kuvvetlice bağlanır. UV ile parlayarak görüntü verir ve jeldeki nükleik asitlerin yerinin belirlenmesini sağlar.

ÖZGEÇMİŞ

Kahramanmaraş'ın Merkez İlçesinde 1973'te doğdu. Sergentepe İlkokulunda ilk öğrenimini, Cumhuriyet Ortaokulunda orta öğrenimini ve Kahramanmaraş Lisesinde lise öğrenimini tamamladı. 1990 yılında Marmara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri M.Y.O. Radyoloji bölümünü kazandı. 1992 yılında mezun olduktan sonra İstanbul'da çeşitli özel sağlık kuruluşlarında çalıştı. 1996 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı. 1998 yılında İstanbul Üniversitesi V. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresine "Bazı Bitkilerin Antimikrobiyal Etkileri Üzerine Araştırmalar" adlı çalışma ile katıldı. 2000 yılında "Sınıf Öğretmenliği Sertifikası" almaya hak kazandı. Aynı yıl K.S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden bölüm birincisi olarak mezun oldu. Bitirme tezi olarak "Bazı Pinus ve Thuja Türlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerinde *in-vitro* Araştırmalar" isimli tezi çalıştı. 2001 yılında Ç.Ü. Tıp Fakültesi Hastanesinde sağlık teknisyeni olarak göreve başladı. 2001 yılında Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2003 yılında "Biyoinformatik-2003: Teori ve Uygulama" isimli lisanüstü yaz okuluna ve 8. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresine katıldı. Halen Ç.Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi Radyoloji bölümünde sağlık teknisyeni olarak görevini sürdürmektedir.