

SERAP İLİKAY

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

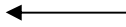
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2015



Adınızı soyadınızı giriniz

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



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



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ VE KAVEOLİN-1 GEN
VARYASYONLARININ BİREYSEL VE KOMBİNE ETKİLERİNİN
KORONER KALP HASTALIĞINDA İNCELENMESİ**

SERAP İLİKAY

**DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA YILMAZ AYDOĞAN**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**






İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Serap İLİKAY tarafından hazırlanan Endotelial Nitrik Oksit Sentaz ve Kaveolin-1 Gen Varyasyonlarının Bireysel ve Kombine Etkilerinin Koroner Kalp Hastalığında İncelenmesi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

05 / 01 / 2015

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. İlhan YAYLIM (İ.Ü.DETAE, Moleküler Tıp A.D)	
2.Prof. Dr. Oğuz ÖZTÜRK (İ.Ü.DETAE, Moleküler Tıp A.D)	
3.Prof. Dr. Sadrettin PENÇE (İ.Ü.DETAE, Moleküler Tıp A.D)	
4.Prof. Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN (İ.Ü.DETAE, Moleküler Tıp A.D)	
5.Doç. Dr. Fahri AKBAŞ (Bezmialem Vakıf Üniv. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D)	

BEYAN

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

Serap İlikay

imza



İTHAF

Canım aileme

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım Eraltan'a

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu ve eski başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Turgay İsbir'e

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, bana destek olan saygıdeğer hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hülya Yılmaz Aydoğan'a

Tez çalışmamın laboratuvar aşamalarında büyük destek ve katkılarından ötürü başta Dr.Ender M.Coşkunpınar ve tüm Tıbbi Genetik Bilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı çalışanlarına

Tezim için gerekli hasta örneklerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zehra Buğra'ya

Tez çalışmam süresince yardımları ve destekleri için başta Prof. Dr. Oğuz Öztürk, Prof. Dr. Bedia Ağaçhan, Doç. Dr. Ümit Zeybek , Doç Dr. Arzu Ergen ve Arş.Gör.Dr.Özlem Küçük hüseyin olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına

Bio.Bengü Tokat'a

Bana her koşulda destek ve cesaret veren aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma , İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37310

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 ATEROSKLEROZ PATOGENEZİ.....	4
2.2 ENDOTELYAL FONKSİYON BOZUKLUĞU.....	6
2.3 ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTETAZ (eNOS)VE NİTRİKOKSİT(NO).....	7
2.4 KAVEOLİN-1 (CAV-1) VE PROTEİNİ (CAV-1).....	10
2.5 KAVEOLİN-1 VE LİPOPROTEİN METABOLİZMASI	13
2.6 ENDOTELYAL DİSFONKSİYONDA eNOS VE CAV-1 MOLEKÜLLERİ.....	14
2.7 NOS3 VE CAV-1 GEN VARYASYONLARI VE HASTALIKLARI.....	15
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	18

3.1 KULLANILAN MATERYAL.....	19
3.1.1 Kullanılan Kimyasallar.....	19
3.1.2 Kullanılan Kitler.....	19
3.1.3 Kullanılan Markırlar.....	20
3.1.4 Kullanılan Cihazlar.....	20
3.1.5 Kullanılan Tampon Solüsyonları,Çözeltiler	20
3.2. KİT İLE DNA İZOLASYONU.....	21
3.3. DNA KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ.....	22
3.4. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ.....	22
3.5. REAL TİME(RT) PZR İLE GENOTİPLEME.....	23
3.6. PZR İLE GENOTİPLEME.....	26
3.6.1 PZR Yöntemi İle CAV1 rs3807990 Gen Polimorfizminin Araştırılması.....	26
3.6.2 PZR Yöntemi İle NOS3 rs1799983 (G>T) Gen Polimorfizminin Araştırılması.....	28
3.6.3 PZR Ürünlerinin Kontrolü.....	29
3.7. RFUP ANALİZİ	30
3.7.1 MspI Restriksiyon Endonükleaz Enzimi İle CAV-1 rs3807990 varyantının RFUP Analizi.....	30
3.7.2 BanII Restriksiyon Endonükleaz Enzimi İle NOS3 rs1799983 varyantının RFUP Analizi.....	31
3.8. PZR VE RFUP YÖNTEMLERİYLE ELDE EDİLEN SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	32
3.8.1 CAV-1 rs3807990 varyantının PZR ve RFUP Analizi.....	32
3.8.2 NOS3 rs1799983 varyantının PZR ve RFUP Analizi.....	33

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	33
4.BULGULAR.....	35
5.TARTIŞMA	45
KAYNAKLAR	53
HAM VERİLER	67
ETİK KURUL KARARI	68
ÖZGEÇMİŞ	70

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1 : CAV-1 genindeki varyasyonlardan rs3840634 polimorfizminin RT PZR reaksiyonu için termal profil şartları	24
Tablo 0-1 : rs3807990 varyantı için uygulanan PZR şartları.....	27
Tablo 3-3 : rs1799983 varyantı için uygulanan PZR koşulları.....	29
Tablo 0-2 : Çalışma Gruplarının Karakteristik Özellikleri.....	36
Tablo 0-3 : Çalışma gruplarında CAV-1 ve NOS3 Genotiplerinin Dağılımı.....	37
Tablo 0-4 : CAV-1 rs3807990 Genotiplerinin Çalışma Gruplarında Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi.....	39
Tablo 0-4 : NOS3 rs1799983 Genotiplerinin Çalışma Gruplarında Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi.....	40
Tablo 0-5 : CAV-1 rs3840634 Genotiplerinin Çalışma Gruplarında Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi.....	41
Tablo 0-6 : CAV-1 rs3807990 ve NOS3 rs1799983 Genotiplerinin Çalışma Gruplarında Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerinde kombine etkisi.....	42
Tablo 0-7 : Koroner kalp hasta grubunda hiperkolesterolemi ile ilişkili risk faktörlerinin lojistik regresyon analizinde değerlendirilmesi.....	44
Tablo 5-1 : Çeşitli populasyonlarda eNOS polimorfizmlerinin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi.....	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: A: İnsan NOS3 geni Intron-ekzon yerleşimi ve polimorfizmleri	8
B:İnsan NOS3 geninin promotor bölgesi ,polimorfizmleri ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri	8
Şekil 2.2 : NO Sentez Reaksiyonu	9
Şekil 2.3 : Endotelial Nitrik Oksitini biyolojik rolü.....	10
Şekil 2.4 : Cav-1 proteininin birincil yapısı ve topolojisi	12
Şekil 2.5 : Kaveolada sinyal iletimi	13
Şekil 3.1 : rs3840634 gen varyantının belirlenmesi için elde edilen erime eğrileri.....	25
Şekil 3.2 : rs3840634 TT Genotipi.....	26
Şekil 3.3 : CAV-1 rs3807990 için 243 bç'lik PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	29
Şekil 3.4 : NOS3 rs1799983 için 320 bç'lik PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	30
Şekil 3.5 : MspI enzim kesimi sonucunda ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsü.....	31
Şekil 3.6 : BanII enzim kesimi sonucunda ürünlerin jeldeki görüntüsü	32
Şekil 4.1 : (A) hasta ve (B) kontrol gruplarında CAV1 rs3807990 SNP'nin hiperkolesterol ile ilişkisi.....	43

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KKH :	Koroner Kalp Hastalığı
HC :	Hiperkolesterol
DM :	Şeker Hastalığı
CAV-1 :	Caveolin-1
eNOS:	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
LDL:	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
oxLDL:	Okside Olmuş Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
HDL:	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
VLDL:	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
NO :	Nitrik Oksit
NOS3 :	Endotelial nitrik oksit sentetaz enzimi
NOS1:	Nöral nitrik oksit sentetaz enzimi
NOS2:	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz enzimi
PGI2:	Prostasiklin
ET-1:	Endotelin
RAS:	Renin Anjiyotensin Sistem
AT1R:	AnjiyotensinII-tip1 Reseptör
Ca²⁺CaM:	Ca ²⁺ /Kalmodulin
EDRF:	Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör
sGC :	Çözünmüş guanilat siklaz
cGMP :	Siklik guanozin monofosfat
M-CSF:	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
SMC:	Düz Kas Hücreleri
RT PZR:	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ECTIM :	Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde

ÖZET

İLİKAY,S.(2014) Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz ve Kaveolin-1 Gen Varyasyonlarının Bireysel ve Kombine Etkilerinin Koroner Kalp Hastalığında İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Koroner kalp hastalığı (KKH) dünya çapında ölüm nedenlerinin başında gelen genetik ve çevresel etkenlerin yol açtığı kompleks bir hastalıktır. KKH'na yol açan ateroskleroz patogeneğinde, endotelyal fonksiyon bozukluğu önemli bir anahtardır. Endotel hücreleri vasküler homeostaz ve nitrik oksit üretimi gibi temel işlevlerini yerine getiremediğinde gelişen endotelyal disfonksiyon, aterosklerotik plak oluşumuna neden olur. Endotel hücre membranında bulunan endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ve kaveolin-1 (Cav-1) proteinleri direkt etkileşim halindedir ve diğer proteinlerle birlikte normal endotel hücre fonksiyonu için çalışırlar.

Çalışmamızda eNOS rs1799983 ve CAV-1 rs3840634 ve rs3807990 varyasyonlarının koroner kalp hastalığı teşhisi konan bireylerde incelenmesi ve hastalığın seyrinde bu varyasyonların bireysel ve birlikte etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışma gruplarımız 76 koroner kalp hastası ve 91sağlıklı bireyden oluşmuştur. NOS3 ve CAV-1 genotipleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi ile agaroz jel elektroforezi teknikleri uygulanarak belirlenmiştir. Koroner kalp hasta grubunda CAV-1 rs3807990 nadir T alleli ile birlikte NOS3 rs1799983 nadir TT genotipini taşıyan alt grupta total-kolesterol değeri, CAV-1 rs3807990 normal CC/ NOS3 rs1799983 normal G alleli taşıyan alt gruba göre yüksek bulunmuştur (p=0,048). Kontrol grubunda ise her iki varyasyonun nadir allelini birlikte taşıyan grupta (NOS3 rs1799983 T allel/ CAV-1 rs3807990 T allel) her iki varyasyonun normal genotiplerini birlikte taşıyan gruba (NOS3 rs1799983 GG CAV-1 rs3807990 GG) kıyasla diastolik kan basıncı (p=0,033) ve Total-kolesterol (p=0,041) değerleri yüksek bulunmuştur. KKH grubunda CAV-1 rs3807990 T alleli ve hiperkolesterolemi arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir ilişki söz konusudur (p=0,008). Lojistik regresyon analizinde CAV-1 rs3807990 T allelinin hasta grubunda hiperkolesterolemi gelişiminde risk oluşturduğu doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda CAV-1 rs3807990 T allelinin koroner kalp hastalığı risk faktörlerinden hiperkolesterolemi gelişiminde etken genetik risk faktörleri arasında yer alabileceği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kaveolin-1, eNOS, Kalp, Hastalık, Risk

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37310

ABSTRACT

ILIKAY,S.(2014).Investigation of separate and common effects of eNOS and CAV-1 gene variations in Coronary Heart Disease (CHD). İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine. Master's Thesis.İstanbul.

Coronary heart disease is a complex disease caused by genetic and environmental factors, being one of the major causes of death in the world.Endothelial dysfunction is important key for atherosclerosis patogenesis leading to CAD.Endothelial dysfunction causes the formation of atherosclerotic plaque when endothelial cells do not perform ultimate functions such as vascular homeostasis and nitric okside(NO) production.Endothelial nitric okside synthase(eNOS) and caveolin-1 (Cav-1) proteins in membrane of endothelial cells interact with each other directly and they work with other proteins for normal function of endothelial cell.

In our study, we purposed to investigate eNOS rs1799983, Cav-1 rs3840634 and rs3807990 variations in CHD patients and determine their individual and combined effects on CHD development .Our study groups comprise of 76 CAD patients and 91 healthy controls. eNOS and Cav-1 genotypes were determined by real time polymerase chain reaction, polymerase chain reaction, restriction fragment lenght polymorphism and agarose gel electrophoresis. Subgroup carrying CAV-1 rs3807990 mutant T allele and NOS3 rs1799983 mutant TT genotype has higher total-cholesterol than subgroup carrying CAV-1 rs3807990 normal CC/ NOS3 rs1799983 normal G allele in patient group (p=0,048). In control group, subgroup carrying together NOS3 rs1799983 T allele/ CAV-1 rs3807990 T allele has higher diastolic blood pressure (p=0,033) and total-chloolesterol (p=0,041) than the subgroup carrying together NOS3 rs1799983 GG and CAV-1 rs3807990 GG. There is a statistical significant correlation between CAV-1 rs3807990 T allele and hypercholesterolemia in patient group (p=0,008). Regression analysis confirmed that CAV-1 rs3807990 T allele is a risk factor for hypercholesterolemia process.

In conclusion, CAV-1 rs3807990 T allele were observed to create a risk factor for hyperchlesterolemia, being one of the risk factors of CAD..

Key words : Caveolin-1, eNOS, Heart, Disease, Risk

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University.

Project No.37310

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ateroskleroz, poligenik belirleyicilerin çeşitli çevresel faktörlerle birleşmesi sonucunda oluşan çok etmenli bir hastalıktır. Koroner arter hastalığı ve miyokard enfarktüsünün etyopatogenezinde yer alan bu hastalık dünyadaki ölüm nedenlerinin başında yer alır (1).

Ateroskleroz çok erken yaşlarda arter duvarında yağlı çizgilenmelerle başlayan, köpük hücre ve sonrasında fibröz plak oluşumuyla devam eden bir süreçtir. Endotelial disfonksiyonun da bu süreçte önemli rol oynamaktadır (2).

Endotelial fonksiyon bozukluğu, eNOS enziminin ürettiği NO'nun hücrelerdeki yararlanımının azalmasıyla gelişen bir durumdur. Bütün bilinen kardiyovasküler risk faktörleriyle ilişkili olan endotelial disfonksiyon, vasküler tonusta anormali, oksidatif strese, adezyon moleküllerinin ekspresyonunda, pro-inflamatuar ve pro-trombotik faktörlerin sentezindeki artışla karakterizedir (3).

Endotel hücrelerin membranında bulunan eNOS enzimi, kan akış gerilimi ve çeşitli sinyallerle uyarılarak NO üretmeye başlar. Üretilen NO, düz kas hücrelerinin gevşemesine neden olurken bu hücrelerin proliferasyonunu da engeller. Bununla birlikte platelet agregasyonu ve lökosit adezyonunu da inhibe eder (4). Normal endotel hücrelerde bazal olarak sürekli üretilen NO miktarı, eNOS enzim aktivitesinin Cav-1 proteiniyle inhibe edilmesi ya da Kalsiyum/kamodulin (Ca^{2+}/CaM) kompleksiyle aktive edilerek düzenlenir.

Cav-1 proteini, eNOS enzim aktivitesinin daimi düzenleyicilerinden biri olup (5) Src kinaz ailesini, G-proteini, G-protein bağlı reseptörünü, integrinleri ve çeşitli büyüme faktörlerini negatif olarak düzenler (6). Ayrıca Cav-1 proteini ve kaveolaların, kolesterol homeostazının sağlanmasında da rolleri vardır. Cav-1 proteini endoplazmik retikulumdan yeni sentezlenen kolesterolün plazma membranına taşınmasında görevli olan sterol taşıyıcı protein-

2 (SCP-2) ile etkileşim halindeyken (7) kaveolalar kan plazmasına salınan fazla serbest kolesterolün HDL'ler tarafından alınması sürecinde ve kolesterol esterlerinin plazmadan alınmasında etkilidirler (8).

Bu çalışmada endotelial disfonksiyonda etkili olan eNOS ve Cav-1 proteinlerine ait genlerdeki varyasyonların koroner kalp hastalarında incelenmesi ve hastalığın gelişiminde risk faktörü olarak bireysel ve kombine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Literatürde eNOS ve CAV-1 gen varyasyonlarının incelendiği çok az sayıda çalışma bulunmakla birlikte bu genlerdeki varyasyonları aterosklerotik kalp hastalıklarında birarada inceleyen bir araştırmaya ise rastlanmamıştır. Dolayısıyla tez projemiz eNOS ve CAV-1 genlerindeki polimorfizmlerin koroner kalp hastalığında birlikte incelendiği ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

Koroner kalp hastalığı (KKH), Dünya Sağlık Örgütü'nün 2012 yılı verilerine göre (9), Dünya'daki ölüm nedenlerin başında gelen kompleks bir hastalıktır. Temelinde aterosklerozun yattığı bu hastalık birden fazla risk faktörüne bağlı olarak gelişebilir. KKH'nin risk faktörleri; yaşam biçimine bağlı, biyokimyasal ve fizyolojik faktörler gibi değiştirilebilen ve değiştirilemeyen kişisel özellikleri içerir. Sigara, hipertansiyon, hiperlipidemi değiştirilebilen risk faktörleriyken, genetik etkenler, cinsiyet ve yaş değiştirilemeyen faktörlerdir (10).

KKH etyopatogenezinde yer alan ateroskleroz, lipidlerin, inflamatuvar hücrelerin ve bağ dokuların arter duvarında birikmesiyle karakterizedir (11). Düşük dansiteli lipoprotein (LDL) endotelden geçmesi, inflamatuvar hücrelerin intimada birikmesine neden olan çeşitli sitokinler ve kemotaktanların salınımı indükler. Oksidatif ve enzimatik reaksiyonlar sonucu modifiye olan lipidler (OxLDL), ileri düzeyde immünojenik olup proinflamatuvar kemotaktik faktör işlevi görerek endotel hücrelerinde lökosit adezyon moleküllerinin üretimini artırır ve buna bağlı olarak aktivasyon bölgesine kan hücrelerinin taşınmasını ve sitokin salgılanması tetikler (12,13).

İntimada biriken OxLDL'yi fagosite eden makrofajlar köpük hücrelere dönüşür. Bu hücrelerin birikimi ilk evrelerde intima altında sarı çizgilenmeler olarak gözlenir. Lümende darlık oluşturmeyen bu lezyonlar yağlı çizgilenme olarak adlandırılır ve aterosklerozun ilk lezyonudur (14). Köpük hücreler aynı zamanda pro-inflamatuvar sitokinleri salgılayarak intimanın büyümesine ve damar lümeninin daralmasına da neden olurlar.

Endotelial fonksiyon bozukluğu, aterosklerotik s¼recin gelişimine izin veren anahtar bir mekanizma olarak d¼ř¼n¼lebilir (2). Sigara, hipertansiyon, hiperlipidemi, şeker hastalığı (DM), obezite gibi geleneksel kardiyovask¼ler risk fakt¼rlerinin endotel disfonksiyona neden olabileceği çeşitli çalışmalarda g¼sterilmiřtir. Ayrıca oksidatif stres, vir¼sler, homosistein, immun kompleksler, kompleman aktivasyonunun da endotel hasarı, endotel fonksiyon bozukluğu ve inflamatuvar cevaba katkıda buldukları bildirilmiştir (15).

Son yıllarda ateroskleroz patojenezini aydınlatmak amacıyla yapılan çalışmalarda hastalığın risk fakt¼r¼ olarak tanımlanabilen çok sayıda protein, molek¼l ve gen yoğun olarak araştırılmaktadır. Patojenez s¼recinde aydınlatılmayı bekleyen evrelerden biri endotelial disfonksiyona neden olan molek¼ler mekanizmalardır. Endotelial NO ve Cav-1 proteini, endoteldeki nitrik oksit hemostazını sağlamak için direkt olarak etkileşim halindedir.

Tez projemizde, koroner kalp hastalarında eNOS ve Cav-1 proteinlerini kodlayan gen b¼lgelerinde seçtiğimiz hedef gen varyasyonlarının incelenmesi ve s¼z konusu varyantların risk temelinde hastalığın gelişimine etkisi ve metabolik/ klinik parametrelere yansımalarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.1 ATEROSKLEROZ PATOGENEZİ

Kalp hastalıklarının başlıca nedeni olan ateroskleroz, kolesterol içeren d¼ř¼k yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) intimada birikmesi ve endoteliumu aktive etmesiyle başlayan inflamatuvar bir hastalıktır (16). Gelişiminde kronik inflamasyon ve imm¼n disreg¼lasyon ¼nemli bir rol oynadığı için ateroskleroz otoimm¼n inflamatuvar bir hastalık olarak kabul edilmektedir (17).

Periferik ve koroner ateroskleroz patojenezinin başlangıç safhasında endotel fonksiyon bozukluğunun ¼nemli bir rol oynadığı bilinmektedir (15). Fonksiyonu bozulmuş endotel

hücreleri, artan geçirgenlikleri yüzünden makromoleküllerin rahatlıkla subendotelyal matrikse geçişine izin verir ve böylece aterosklerotik lezyon oluşumu görülmeye başlar. Özellikle LDL'lerin kandaki artışı, hem LDL'lerin taşınımını hem de matriksteki birikimi artırır. LDL'lerin yanı sıra apolipoprotein B (apoB) içeren diğer lipoproteinlerde intimada birikebilir ve ateroskleroza tetiklemeye yardımcı olur.

Doğal LDL'ler modifiye olmuş LDL'ler kadar hızlı makrofajlar tarafından alınıp köpük hücreye dönüştürülemediği için LDL'ler hücre duvarında modifikasyona uğrarlar (18). Oksidasyon, lipoliz, proteoliz ve agregasyon gibi modifikasyonlar inflamasyonun artışına neden oldukları gibi köpük hücre oluşumunu da katkı sağlarlar.

Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) ise lipoproteinlerin oksidasyonunu engelleyerek ve çevresel dokulardan kolesterolü uzaklaştırarak ateroskleroza karşı güçlü bir savunma oluştururlar.

Okside LDL'nin birikmesi monosit ve lenfositlerin arter duvarına göçüne yol açar. OxLDL ayrıca endotel hücrelerinin adezyon moleküllerinin yer aldığı proinflamasyon moleküller ile makrofaj koloni-uyarıcı faktörleri (M-CSF)'nin yer aldığı büyüme faktörlerini üretmesine neden olur. Bunların yanında, modifiye olan LDL nitrik oksit üretimini de inhibe edebilir. Üretimi artan M-CSF sitokinleri, makrofajların proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyardığı gibi çöpçü reseptör ekspresyonu gibi çeşitli makrofaj fonksiyonlarını da etkiler (16).

Makrofajlar tarafından LDL'lerin alınıp köpük hücreleri oluşturması için yüksek derecede okside olmuş LDL gerekir. Bu modifikasyon ve sonrasında modifiye olmuş LDL'lerin agregasyonu ve makrofajlar tarafından alınması miyeloperoksidaz, sfingomiyelinaz ve sekretuar fosfolipaz gibi enzimler aracılığıyla gerçekleşir. SR-A ve CD36 gibi çöpçü reseptörlere bağlanan oxLDL makrofajlar tarafından köpük hücrelere dönüştürülür (19).

Köpük hücrelerin oluşmasından sonraki basamak fibröz plak oluşumudur. Bu oluşum çoğunlukla kolesterol ve onun esterlerinin ekstrasellüler alanda artmasıyla karakterizedir.

Bunun yanında düz kas hücreleri (SMC) ve bu hücreler aracılığıyla ekstraselüler matriksin artması da fibröz plak oluşumuna işarettir. Makrofajlar ve T-hücreler tarafından salınan sitokinler ve büyüme faktörleri SMC taşınımında, çoğalmasında ve ekstraselüler matriks oluşumunda önemli bir yere sahiptir (16).

Yapılan çalışmalarda CD40 ve onun ligandıyla (CD154) etkileşiminin ilerlemiş lezyonların gelişmesinde önemli katkı yaptığı gösterilmiştir (20). CD40 ve CD154 etkileşimi; inflamatuvar sitokinlerin, matriks degradasyon proteazlarının ve adezyon moleküllerinin üretimini sağlar. Hormonlar, yüksek tansiyon ve yüksek homosistein düzeyi de ilerlemiş lezyonların gelişiminde etkilidir. Hasarlı endotel hücrelerindeki yüksek homosistein düzeyi, vasküler SMC proliferasyonunu uyarır (21). Hipertansiyon ise renin-anjiyotensin yolağı üzerinden anjiyotensin 2'nin direkt olarak SMC gelişimini ve ekstraselüler matriksin üretimini tetiklemesini sağlar. Çoklu anti-aterojenik etkiye sahip olan östrojen ise plazma lipoprotein düzeyini etkileyerek ve prostasiklin ile NO üretimini uyararak bu süreçte rol oynar (22).

2.2 ENDOTELYAL FONKSİYON BOZUKLUĞU

Endotel damar sistemi içinde yer alan kan ve damar duvarı arasına sınırlandırılmış, tek katlı yassı epitelyum dokudur. Endotelyum, vasküler homeostazın ana düzenleyicisidir. Endotel hücreleri; vasküler tonusu ayarlar. NO, prostasiklin (PGI₂) ve endotelin (ET-1) araçları sayesinde oksidatif stresi düşük seviyede tutar. Ayrıca bu hücreler lokal anjiyotensin II aktivitesini kontrol eder ve aktif bir şekilde vasküler geçirgenliği, lökosit adezyonunu ile agregasyonunu ve trombozu düzenlemektedirler (23). Endotel fonksiyon bozukluğunda ise adezyon moleküllerinin ekspresyonunda artış, pro-inflamatuvar ve pro-trombotik faktörlerin sentezinde artış, oksidatif streste artış ve vasküler tonusta anormal bir modülasyon görülür

(24). Bütün bu etkilerinden ötürü endotelial disfonksiyon, aterosklerotik plakların oluşumu, ilerlemesi ve komplikasyonlarında etkili bir süreçtir.

Endotel disfonksiyonunun ana sebebi nitrik oksit (NO) biyoyararlanımındaki azalmadır (2). Bütün bilinen kardiyovasküler risk faktörleri (dislipidemi, arteriyel hipertansiyon, hiperglisemi ve diyabet) endotel disfonksiyonla ilişkilidir. ve oksidize LDL, renin-anjiyotensin ekseni ve insülin direnci endotel fonksiyon bozukluğu patogenezinde önemli rol oynar (23).

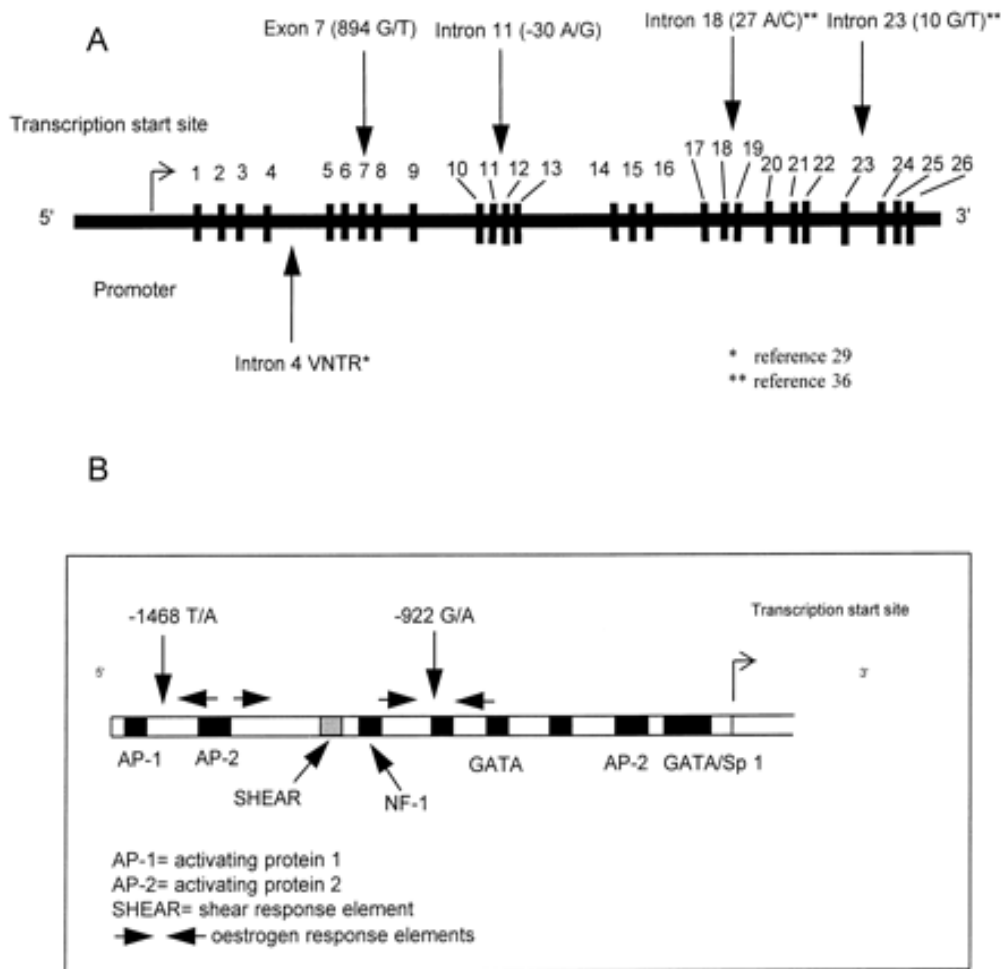
Hiperkolesterolemi, L-arjinin ve NO yolağını çeşitli mekanizmalarla bozabilir. Renin-anjiyotensin sistemi (RAS) de endotelial disfonksiyonda önemli bir role sahiptir. Anjiyotensin II-tip1 reseptörünün (AT₁R) aktivasyonu, vazokonstriksiyon ve nörohumoral aktivasyona yol açar. Bu aktivasyon aynı zamanda, reaktif oksijen türlerinin salınımı ile oxLDL reseptörünün ekspresyonundaki artışla, vasküler hücre apoptozuyla (25) ve adezyon molekülleri, kemotaktik faktörler ve proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerindeki artışla da ilişkilidir (23) .

Farelerde yapılan çalışmalarda NO üreten endotelial nitrik oksit sentetaz enzimini kodlayan eNOS genindeki modifikasyonların endotel disfonksiyona yol açtığını gösterilmiştir (26). Buna ek olarak, eNOS gen ekspresyonunda azalma, L-Arginin eksikliği (27), endotelialdaki mekanik hasar ve NO'nin superoksitle hızlı reaksiyonunun da endotelial fonksiyon bozukluğuna neden olabileceği bildirilmiştir (28).

2.4 ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTETAZ (eNOS) VE NİTRİK OKSİT (NO)

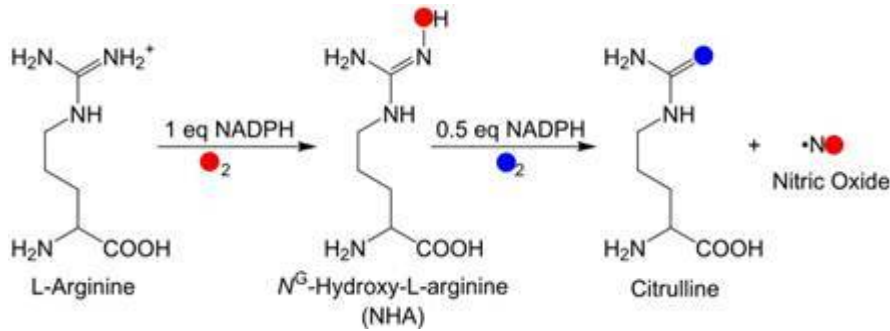
eNOS geni (*NOS3*) kromozomun 7q35-36 bölgesinde bulunan 26 ekzon içeren 21kb büyüklüğünde bir gen olup 1203 aminoasitli 135-kDa büyüklüğünde bir protein kodlamaktadır (29).

NOS3 geni tarafından kodlanan eNOS proteini “N-terminal oksijenaz” ve “C-terminal reduktaz” olmak üzere iki domene sahiptir (31). Bu iki domen arasında Ca^{2+} /Kalmmodulin (CaM)-bağlanma bölgesi bulunur (32). Endotelial hücrelerde; Cav-1 proteini eNOS’a oksijenaz domaininden direkt olarak bağlanarak eNOS’u inaktif hale dönüştürürken, Ca^{2+} /CaM’de aynı enzimi aktiveleştirmekle görevlidir (33). Ayrıca eNOS proteini adenozin, vasküler endotelial büyüme faktörü, serotonin ve bradikinin gibi çeşitli sinyal molekülleri yardımıyla da aktiveleşebilir (34) ve NO üretimine devam edebilir.



Şekil 2.1: A: İnsan NOS3 geni Intron-ekzon yerleşimi ve polimorfizmleri B:İnsan NOS3 geninin promotor bölgesi ,polimorfizmleri ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri gösterilmiştir (30).

NO, nitrik oksit sentetaz (NOS) enzim ailesi tarafından L-arjinin aminoasitinden üretilen (37), kardiyovasküler homeostazı düzenleyen, endojen yapılı vazodilatör bir gazdır (35). 1980 yılında endotelial hücrelerin asetilkoline yanıt olarak EDRF (endotel kaynaklı gevşetici faktör) molekülü ürettiği bulunduğundan sonra (36), endotelial kaynaklı NO'nun EDRF'nin biyolojik özelliklerinin çoğunu taşıdığı ve EDRF'nin NO olduğu keşfedilmiştir.

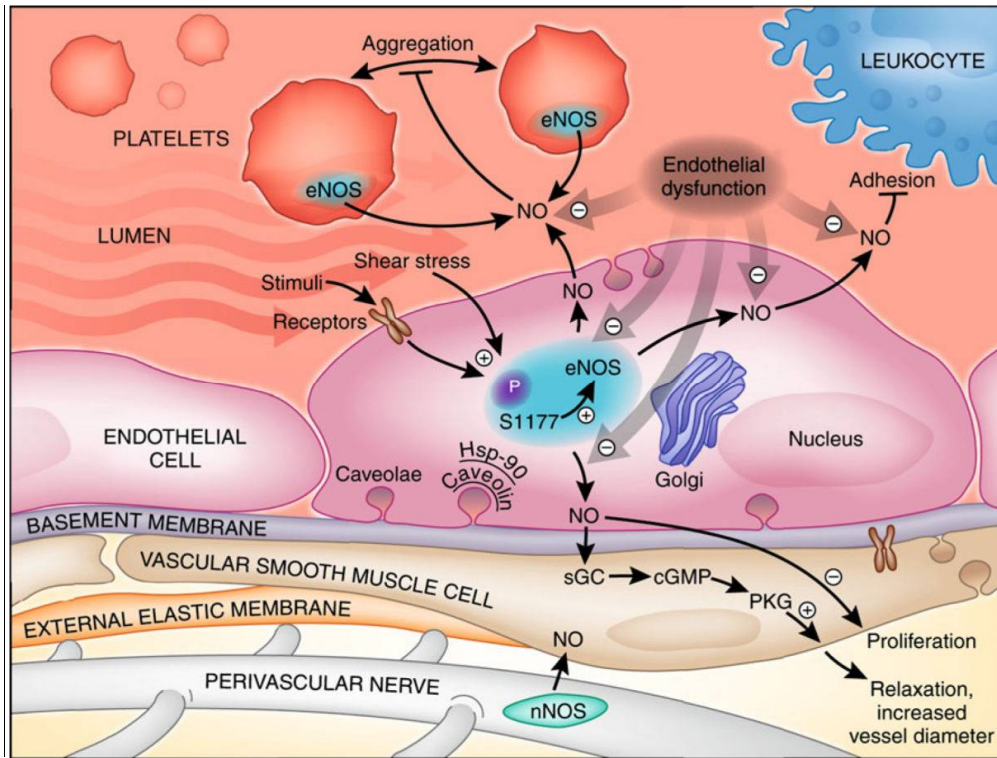


Şekil 2.2: NO Sentez Reaksiyonu: eNOS, L-Arginin ve NADPH kullanarak NO ve L-Sitrülin üretir (37).

Endotel nitrik oksit sentaz (NOS3) ve nöral izoformu (NOS1), kalsiyuma bağlı olarak düşük seviyede bazal NO üretirlerken, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS2) kalsiyumdan bağımsız olarak, uygun fizyolojik sinyallerin varlığında yüksek seviyede NO üretir (38). Endotel hücrelerde üretilen NO; vasküler tonusu, kan akışını, lökosit-endotelial etkileşimini, platelet adezyonunu ve agregasyonunu ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu düzenlemektedir (39).

Kan akış gerilimi, fizyolojik ve metabolik sinyallerle uyarılan endotel hücredeki eNOS, NO üretmeye başlar ve vasküler düz kas hücresinde çözülmüş haldeki guanilat siklazı (sGC) aktive eder. sGC, siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretimini arttırarak düz kas hücrelerinde gevşemeye neden olurken, NO aynı zamanda vasküler düz kas hücrelerinin

proliferasyonunu da inhibe eder. Bununla birlikte platelet agregasyonunu ve lökosit adezyonunu da engellemektedir (Şekil 2.3).



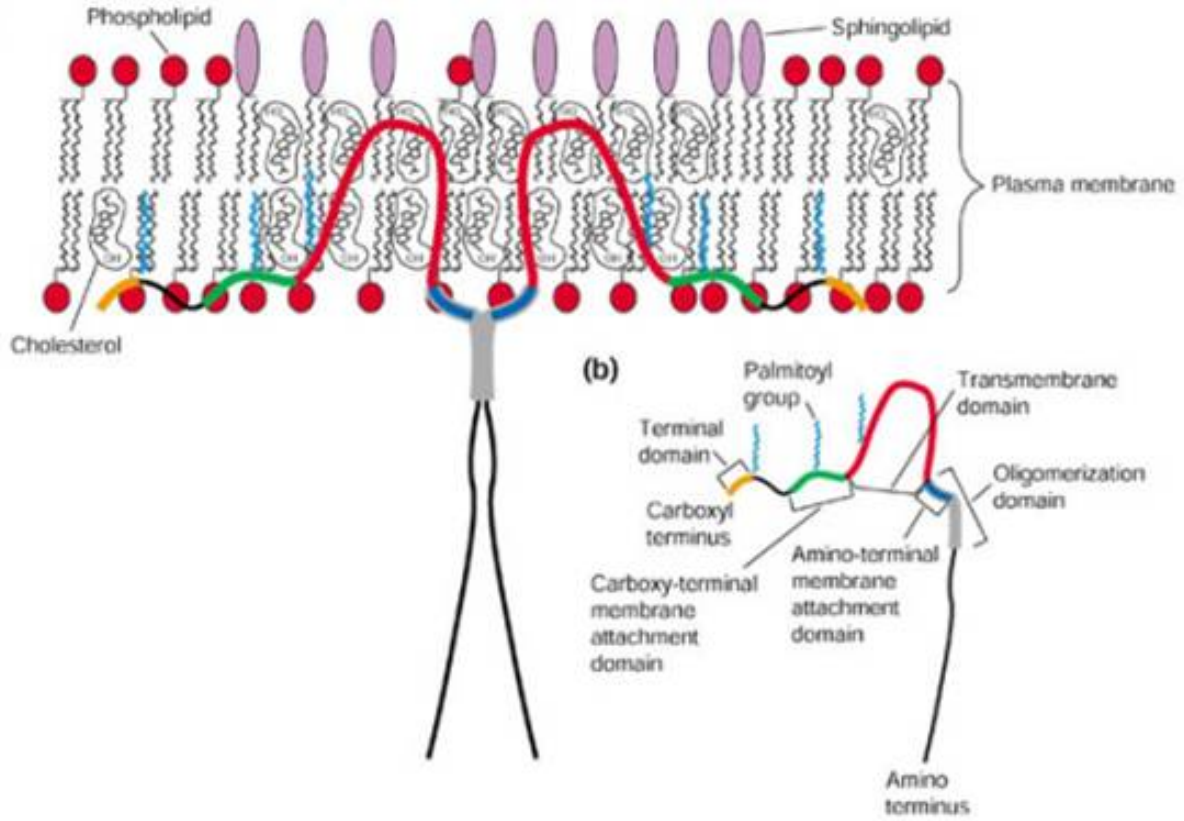
Şekil 2.3:Endotelyal Nitrik Oksitin biyolojik rolü: Vasküler tonusu, kan akışını ,lökosit-endotelyal etkileşimini, platelet adezyonunu ve agregasyonunu ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu düzenler (39).

2.4 KAVEOLİN-1 (CAV-1) VE PROTEİNİ (CAV-1)

1950'lerin başında keşfedilen kaveolalar, birçok doku ve hücre çeşidinde bulunan plazma membranı invajinasyonlarıdır (40). 50-100nm büyüklüğünde olan bu yapılar deney tüpü görünümünde, kolesterol ve sfingolipidlerce zengin oluşumlardır. Kaveolalar plazma zarında platform görevi görür ve çeşitli sinyal moleküllerini bölümlere ayırırlar. Ayrıca bu özel invajinasyonlar çeşitli sinyal yollarıyla transsitoz, endositoz, hücre farklılaşması ve proliferasyonuyla apoptozda görevlidir (41). Aterosklerozun başlangıç aşamasında, oxLDL

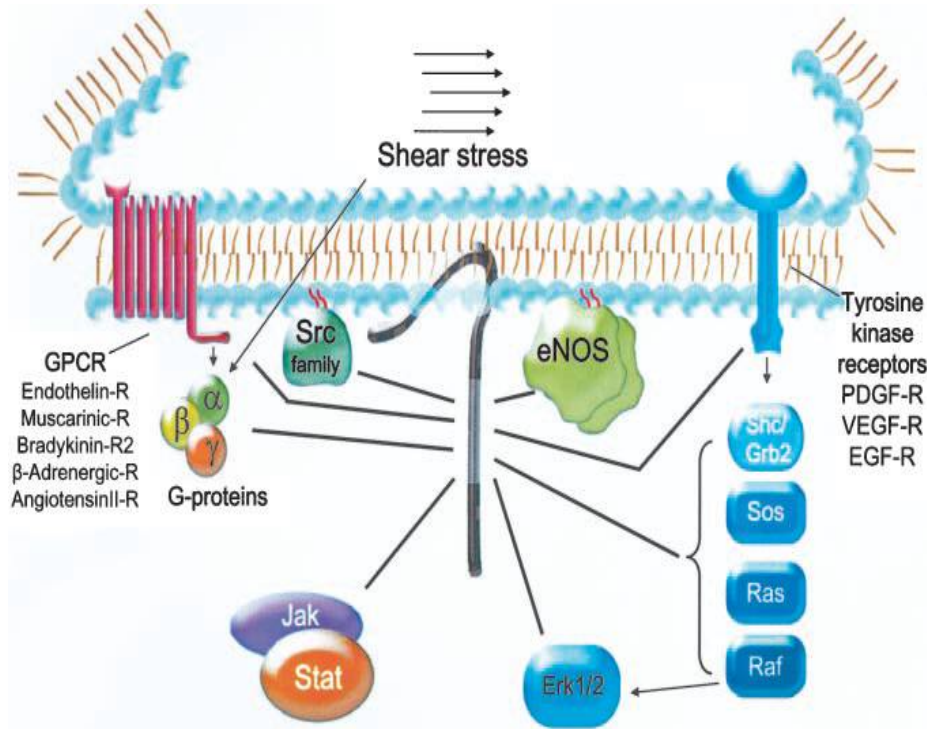
veya normal LDL'lerin endotel hücre kaveoları tarafından transitoz yoluyla iletimi veya alınması elektron mikroskop çalışmalarında açıkça gösterilmiştir (42,43).

Kaveolaların oluşmasında en önemli rol oligomerik kaveolinlerin olsa da kavin adlı diğer protein gruplarıyla birlikte çalışırlar (44). Kaveolinler 21-24k-Da büyüklüğünde integral membran protein ailesine dahildirler (40). Kaveolaların yapısal proteinlerinden olan kaveolinlerin memeli hücrelerinde 3 izoformu bulunur (8). Cav-1, bir çok kassız hücre tipinde kaveola oluşumu ve Cav-2'nin membran lokalizasyonu için gerekliken (45), Cav-3 iskelet, kalp ve düz kas hücrelerinde kaveola oluşumundan sorumludur (46). Kaveolin proteinleri, sinyal iletiminin geçici ve konumsal düzenlenmesinde, kaveolalardaki sinyal molekülleri için şaperon ve iskele proteinleri gibi davranırlar (8). Kaveolinlerin ayrıca vezikül transportu, kolesterol ve kalsiyum hemostazı ile t-tübül oluşumunda görevli oldukları bildirilmiştir (47, 48).



Şekil 2.4: Cav-1 proteininin birincil yapısı ve topolojisi (8)

Cav-1 proteini 21kD büyüklüğünde bir protein olup farklılaşmasını tamamlamış adipositler, endotel hücreleri, epitelyum hücreleri, fibroblastlar ve miyositlerde eksprese edilir. Cav-1 proteini, eNOS enzim aktivitesinin daimi düzenleyicilerinden biridir (49) ve 7.kromozomun 7q31.1 bölgesinde bulunan *CAVI* geninde kodlanmaktadır (50). Bu protein kaveola zarında Src-like Kinaz, G proteinleri ve eNOS gibi proteinlerle organize olmak ve bir arada yerleşim amacıyla iskele protein gibi davranır (Şekil 2.3) (51, 52). Bundan başka Cav-1 proteininin; Src kinaz ailesini, G-proteini, G-protein-kaplı reseptörü, eNOS'u, integrinleri ve çeşitli büyüme faktörlerini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (53).



Şekil 2.5: Kaveolada sinyal iletimi: G-protein–coupled reseptör (GPCR), G-proteinler ve Tirozin kinaz reseptör kaveola içinde veya çevresinde bulunur. Kaveolin-1, kaveolaların birincil proteinidir ve direk olarak protein fonksiyonunu ya da dolaylı yoldan Ras-Stat, Erk ve (Jak)-Stat sinyal yolağını düzenler. eNOS proteini ve Src kinaz ailesi, Cav-1 ile etkileşimi sayesinde kaveolalara bağlanır (54).

Kolesterole bağlanan ve endoplazmik retikulumdan plazma membrana kolesterol taşıyan Cav-1 proteini (55) aynı zamanda HDL ve çöpçü reseptör SR-B1 için ana reseptördür (56). Cav-1 proteininin son çalışmalarda LDL'nin modifiye formları ve CD36 için çöpçü reseptör görevi üstlendiği bildirilmiştir (57).

2.5.KAVEOLİN-1 VE LİPOPROTEİN METABOLİZMASI

Kaveolalar, kolesterolce zengin yapılardır. Kaveolinler ise kolesterollere sıkıca ve spesifik olarak bağlanan birkaç proteinden biridir (58,59). Serbest kolesterolün hem kaveolaların düzgün oluşumu için gerekli olduğu (60,61,62) hemde CAV-1 promoter bölgesini de düzenlediği bildirilmiştir (63). Başka bir deyişle, kaveolaların oluşumu ve Cav-1

proteininin ekspresyonu kolesterole bağlıdır. Ayrıca hücre içi kolesterol dengesinde de kaveolin proteinlerinin rolü vardır (64). Cav-1 proteini endoplazmik retikulumdan yeni sentezlenen kolesterolün plazma membranına taşınmasında görevli olan sterol taşıyıcı protein-2 (SCP-2) ile etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir (65). Kaveolaların kolesterolün ters taşınımında da fonksiyonu bulunmaktadır. Plazmaya salınan fazla serbest kolesterolün HDL'ler tarafından alınması sürecinde kaveolalar işlev görmektedir. Ayrıca kolesterol esterlerinin plazmadan alınmasında da etkili oldukları gösterilmiştir (8).

2.6. ENDOTELYAL DİSFONKSİYONDA eNOS VE CAV-1 MOLEKÜLLERİ

eNOS ve Cav-1 proteinleri kaveola membranında direkt olarak etkileşime girerler. Bu etkileşime, Cav-1 proteininin sitoplazmik domenindeki N- ve C-sonları katılırken, eNOS'un sadece oksijenaz domeni katılır. Cav-1 proteininin eNOS'a bağlanması eNOS katalitik aktivitesini önemli ölçüde düşürür. Bu inhibisyon, eNOS'un Ca^{2+} /CaM ile etkileşimiyle tersine dönebilir. Sonuç olarak eNOS aktivitesinin Cav-1 proteiniyle negatif olarak kontrol edilirken, Ca^{2+} /CaM ile de pozitif olarak düzenlendiği bildirilmiştir (33).

Hücre içinde Ca^{2+} konsantrasyonu arttığında kaveolin ve eNOS arasındaki düzenleyici döngü başlar. Ca^{2+} -CaM, eNOS ve kaveolin arasındaki heteromerik kompleksi kırarak eNOS'u aktif hale dönüştürür. Aktif eNOS kaveolada yer değiştirir. Ca^{2+} bazal seviyesine döndüğünde CaM eNOS'tan ayrılır, "Kaveolin-eNOS kompleksi" tekrar oluşur ve eNOS inaktif duruma geçer. Kaveolin-eNOS immunopresipitasyon deneylerinde kaveolinin upregülasyonunun, dengeyi kaveolin-eNOS kompleksinin oluşması yönünde değiştirdiği bildirilmiştir. Ayrıca kaveolin-eNOS immün kompleksi üzerinde yapılan CaM titrasyonu deneyleri hiperkolesterolemik seruma maruz kalan endotel hücrelerindeki fazla miktardaki kaveolinin eNOS ile etkileşimiyle rekabet için daha fazla Ca^{2+} -CaM gerektirdiğini göstermiştir (66).

Endotelial disfonksiyon eNOS ekspresyonunun azalmasından kaynaklanabilir. Fakat birçok çalışmada kardiyovasküler risk faktörlerinin eNOS ekspresyonunu azaltmadığı, aksine arttığını göstermiştir (67). Vasküler hastalıklardaki eNOS'un bu artışı aşırı üretilen hidrojen peroksitten (H_2O_2) kaynaklanmaktadır. O_2^- nin dismutantı olan H_2O_2 , eNOS ekspresyonunu transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel olarak arttırabilir (68). Öte yandan hızlanmış NO (O_2^- ile reaksiyona girerek) degradasyonu vasküler hastalıklarda sıklıkla gerçekleşen bir durumdur. NO ve O_2^- etkileşime geçerek $ONOO^-$ oluştururlar. Bu durum eNOS enziminin disfonksiyonuna yol açmaktadır (69).

2.7. NOS3 VE CAV-1 GEN VARYASYONLARI VE HASTALIKLARI

eNOS bağımlı NO salınımı; kofaktör birleşimi, fosforilasyon, protein-protein etkileşimi, substrat varlığı gibi durumlarla düzenlenir. Ayrıca NO üretimi NOS3 genindeki DNA varyantlarından da etkilenir (70). Çok sayıda popülasyon çalışmasında eNOS gen varyantlarının çeşitli hastalıklarla ilişkisi araştırılmıştır. Bu varyasyonlardan aşağıda tanımladıklarımız aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklarla en çok ilişkili olduğu bildirilmiş bölgelerdir.

eNOS geninin 5'flanking bölgesindeki nokta mutasyonu T-786-C tanımlanmıştır. Bu mutasyonun eNOS geninin promotor aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğü ve koroner spazm riski oluşturduğu gösterilmiştir (71). *eNOS* geninin diğer bir varyantı ise 4.introndaki 27 baz çiftinin tekrar polimorfizmidir. Şener ve ark. (2014) Türkiye'de yaptıkları çalışmada bu varyantı kronik böbrek yetmezliğiyle ilişkili bulmuşlardır (72). Diğer bir eNOS polimorfizmi de tez projemizde araştırdığımız 7.ekzondaki G>T değişimidir. Bu değişim 298.kodonda glutamin aminoasidinin aspartat aminoasidine dönüşmesine neden olur (73). Bu varyant çeşitli popülasyonlarda araştırılmıştır. Hingorani ve ark. İngiliz popülasyonunda Asp298 homozigot genotipinin koroner arter hastalığı ve myokardiyal infarktüs için bir risk faktörü

olduğunu bildirmiştir (30). Granath ve ark. (2001) ise Avusturyalı beyaz populasyonda eNOS geninin çeşitli varyantlarının koroner kalp hastalığı gelişimi üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında; hasta ve kontrol grubu arasında Glu298Asp (G894T) polimorfizminin görülme sıklığı açısından herhangi bir istatistiksel anlamlı farklılık bulmamışlardır ve eNOS Glu298Asp varyasyonunun KKH riski ile ilişkili olmadığını önermişlerdir (74).

Düz kas hücreleri ve endotel hücrelerde kaveola oluşumu için gerekli olan Cav-1 proteinleri en çok adiposit ve endotel hücrelerde bulunur. eNOS'un aktivitesini bastırmak, tetiklemek ve sonlandırmak gibi fonksiyonlar kaveolaların karmaşık rolüne dahil edilir. Moleküler seviyede, Cav-1 proteini eksikliği sinyal yollarını bozarak kardiyak hipertrofiye neden olur (75).

Makrofajlar, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri ateroskleroz gelişiminde rol oynayan hücrelerdir (16). Üç hücre tipinde de cav-1 proteini bulunmaktadır. Bu proteinin endotel hücrelerinde eNOS'u inaktive ederek ateroskleroza neden olabileceği fareler üzerinde yapılan çeşitli deneylerle gösterilmiştir. ApoE^{-/-} Cav-1^{-/-} double knockout farelerde yapılan çalışmada aterosklerotik lezyon bölgesinde dikkate değer ölçüde azalma gözlenmiştir (76). Düz kas hücrelerinde ise Cav-1 proteinin anti-aterojenik etkili olduğu düşünülmektedir. Bulunduğu hücre tipine ve düzenlediği metabolik yollara bağlı olarak Cav-1 proteininin pozitif veya negatif olarak vasküler hastalık gelişimini etkilediği düşünülmektedir (77).

Cav-1 geni varyasyonlarıyla ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Teranishi ve ark.(2013) yaptıkları çalışmada Cav1 rs3840634 varyantını Ménière hastalığıyla ilişkili bulmuşlardır (78). Literatürde CAV1 gen varyasyonlarının kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisini inceleyen bir araştırma bulunmamaktadır. Ayrıca protein etkileşimi gösterilmesine

karşın eNOS ve CAV1 gen varyasyonlarının kombine etkilerini inceleyen bir araştırmaya da rastlanmamıştır.

Çalışmamızda koroner kalp hastalığında risk faktörü olarak eNOS G298A polimorfizmi ile son zamanlarda hücrel yerleşimi açısından eNOS aktivitesi ile etkileşimde olduğu bildirilen Kaveolin-1 proteinini kodlayan CAV1 genindeki 22375 AC insersiyon/delesyon (rs3840634) ve 22285 C>T (rs3807990) varyasyonları incelenmiştir. Tez projemizde araştırdığımız CAV-1 rs3807990 ve rs3840634 varyantları CAV-1 geninin 2.intronundaki değişimlerdir. rs3807990 varyantı DNA dizisinde sitozin nükleotidinin timin nükleotidiyle değişimiye, rs3840634 varyantı arka arkaya gelen adenin ve sitozin nükleotidlerinin delesyonudur.

Yukarıda kapsamlı olarak bilgi verdiğimiz “Ateroskleroz- eNOS- Kaveolin-1” üçgeninde literatürdeki eksikliği göz önüne alarak planladığımız tez projemiz kapsamında, endotelyal nitrik oksit sentetaz geni (eNOS) ile Keveolin-1 genlerindeki (CAV1) kritik varyasyonlar ve bu varyasyonların koroner kalp hastalığının komplikasyonlarındaki bireysel ve kombine etkileri araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez projemizde araştırılan polimorfizmlerin analizi için ilk kademede aşağıda belirlenen klinik kriterlere dayanılarak olgular çalışmaya dahil edilmiştir. Proje kapsamında bu örnekler için DNA'lar hazırlandı, saflık tayinleri yapıldı ve DNA düzeyleri hesaplandı. Elde edilen DNA örneklerinde CAV-1 genindeki varyasyonlardan rs3840634 (AC delesyonu) polimorfizmi real-time PZR yöntemi ile ve NOS3 genindeki varyasyonlardan rs1799983 G>T ve CAV-1 genindeki varyasyonlardan rs3807990 C>T polimorfizmlerinin incelenmesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), agaroz jel elektroforezi ve restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RFUP) teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında genotip ve allel dağılımları istatistiksel analizle incelendi ve hastalık gelişiminde risk oluşturup oluşturmadıkları tespit edilmeye çalışıldı.

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılacaktır. Birinci grupta 91 kişiden oluşan yüksek tansiyon ve kalp rahatsızlığı hikayesi olmayan sağlıklı kadın ve erkek bireyler kontrol grubuna dahil edildi.

İkinci grup İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Bölümü tarafından takip edilen 76 koroner kalp hastalığı tanısı konmuş hastadan oluşturuldu. Diğer klinik parametrelere ait ayrımlar yukarıda belirtilen klinik tarafından yapılmış ve kan örnekleri bu birim tarafından sınıflandırılarak anabilim dalımıza gönderilmiştir.

Kontrol ve hasta seçiminde izlenen kriterler aşağıda özetlenmiştir.

Kontrol Grubu: Herhangi bir iskemik kalp hastalığı bulgusu, hipertansiyon, lipid anomalisi, metabolik rahatsızlık (DM, KC yetersizliği, böbrek yetersizliği vs.), ailede bilinen erken yaş iskemik kalp hastalığı lipid metabolizma bozukluğu ve hipertansiyon bulgusu olmayanlar kontrol grubuna alınmıştır.

Koroner kalp hastalığı: Eğer hasta MI geçirmişse veya anjina var fakat MI geçirmemişse tanı amacıyla farmakolojik stres testi veya myokard perfüzyonuna bakılmıştır. Sonuç negatifse, çalışma grubuna dahil edilmiş, pozitifse hasta Koroner kalp hastası kabul edilip anjiyografi önerilerek çalışma grubuna alınmıştır.

3.1. KULLANILAN MATERYAL

3.1.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

- Agaroz (Sigma)
- Etil alkol (Merc)
- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma)
- Etidyum Bromid (Sigma)
- İzopropanol (Sigma)
- Tris Baz (BioChemika)
- Dimetil sülfoksit (DMSO)
- 6X DNA yükleme boyası (Fermentas)
- dNTP (Fermentas)
- Taq DNA polimeraz (Fermentas)
- Primerler (Integrated DNA Technologies)
- MgCl₂ (Fermentas)
- 10X Taq tamponu (Fermentas)
- Restriksiyon enzimleri (Fermentas ve New England Biolabs)
- LightSNip rs3840634 CAV1(TIB MOLBIOL)

3.1.2. KULLANILAN KİTLER

- High pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics)

- Light Cycler FastStart DNA Master Hyprobe (Roche Diagnostics)

3.1.3. KULLANILAN MARKIRLAR

- 100 bç DNA marker (Thermo Scientific),
- pUC 19 DNA/MspI(HpaII) Marker (Thermo Scientific)

3.1.4. KULLANILAN CİHAZLAR

- Thermal Cycler cihazı (BioRad T100)
- LightCycler 480II RT- PCR cihazı (Roche)
- Etüv (Heraeus)
- Isı bloğu (Fisher scientific)
- Jel görüntüleme sistemi (BioRad)
- Elektroforez için güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation),
- Elektroforez Sistemi (E-C 350 MIDICELL)
- Hassas terazi (SHIMADZU)
- Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Elektromag)
- Mikrodalga fırın (Bosch)
- Santrifüj (Palex NF048)
- Pipet takımı (Eppendorf)
- Nanodrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific)
- Bilgisayar (ACER)
- Buzdolapları (-20 °C ve +4 °C) (Bosch)
- Flow Kabini (Laminar), Digital Karıştırıcı (VWR)

3.1.5.KULLANILAN TAMPON SOLÜSYONLARI, ÇÖZELTİLER

EDTA (0.5 M)

86.1 g EDTA

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlandı. Oda ısısında saklandı.

1X (TBE) pH: 8.0:

108gr Tris

55gr Borik asit

40ml EDTA (0.5M pH:8)

Distile su ile 2000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

%70'lik Etil Alkol:

70 ml etil alkol

Steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.2. KİT İLE DNA İZOLASYONU

Steril EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri kitteki prosedüre göre işleme tabi tutularak genomik DNA izole edildi.

- 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpü içerisinde:
 - 200 µl Kan
 - 200 µl Binding Buffer
 - 40 µl Proteinaz K
- Vorteksenerek, 10 dakika +70°C'de bekletildi.
- Üzerine 100 µl izopropanol eklendi ve iyice çalkalandı.
- Filtreli tüpe aktarıldı.
- 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı. Yeni toplama tüpü kondu.
- Üzerine 500 µl Inhibitor Removal Buffer eklendi.
- 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı. Yeni toplama tüpü kondu.
- Üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi.

- 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı. Yeni toplama tüpü kondu.
- Üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi.
- 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı. Yeni toplama tüpü kondu.
- 13000 x g'de 10 saniye spin yapıldı.
- Toplama tüpleri atıldı. Filtreli tüplerin altlarına 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpü kondu.
- Filtreli tüplerde filtrenin tam ortasına gelecek şekilde 200 µl elution buffer (70°C) eklendi.
- 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreye takılı DNA alttaki mikrosantrifüj tüpüne geçti ve elde edilen DNA +4°C'de saklandı.

3.3. DNA KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

DNA konsantrasyonunun ve saflığının tespit edilmesi için NanoDrop spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda ışığı soğurma (OD) ölçümü yapıldı. 260nm'deki OD/280 nm'deki OD oranı hesaplanarak DNA'nın saflık derecesi bulundu.

3.4. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

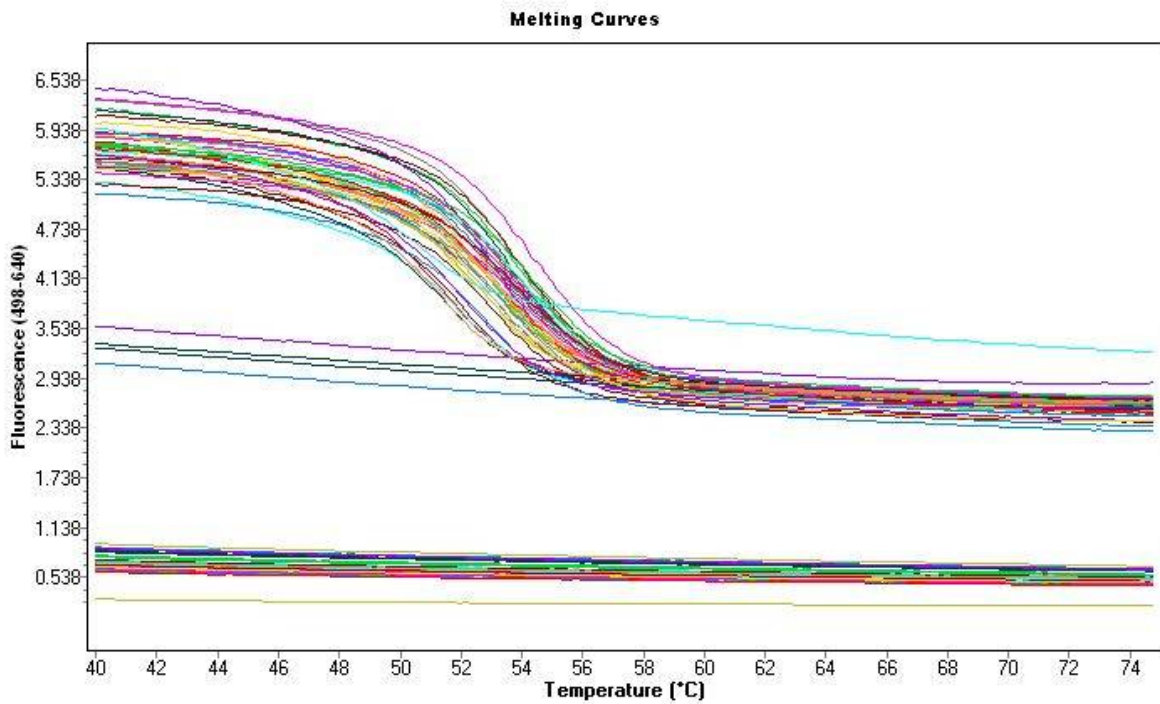
- Hazırlanacak jelin yoğunluğu yürütülecek DNA dizisinin uzunluğuna göre belirlendi.
- Uygun miktardaki toz agaroz 1X TBE solüsyonu içerisine eklenerek mikrodalga fırında ısıtıldı ve çözünmesi sağlandı.

- Çeker ocak altında, üzerine 3 µl etidyum bromid eklenerek karıştırıldı. Jel kabına hava kabarcığı bırakmayacak şekilde döküldü ve örnek sayısına uygun taraklar yerleştirilerek katılaşması için beklendi.
- Katılaştıran jel, içerisinde 1X TBE solüsyonu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Taraklar yavaşça çıkartılarak yüklemeler yapıldı.
- Örnekler yükleme boyası ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi.
- Uygun markırda yüklendikten sonra 80 volt elektrik akımında yürütüldü.
- Bu işlemin sonunda jelde ilerlemiş olan ürünler ultraviole ışığı altında görüntüledi.

3.5. REAL TIME(RT) PZR İLE GENOTİPLEME

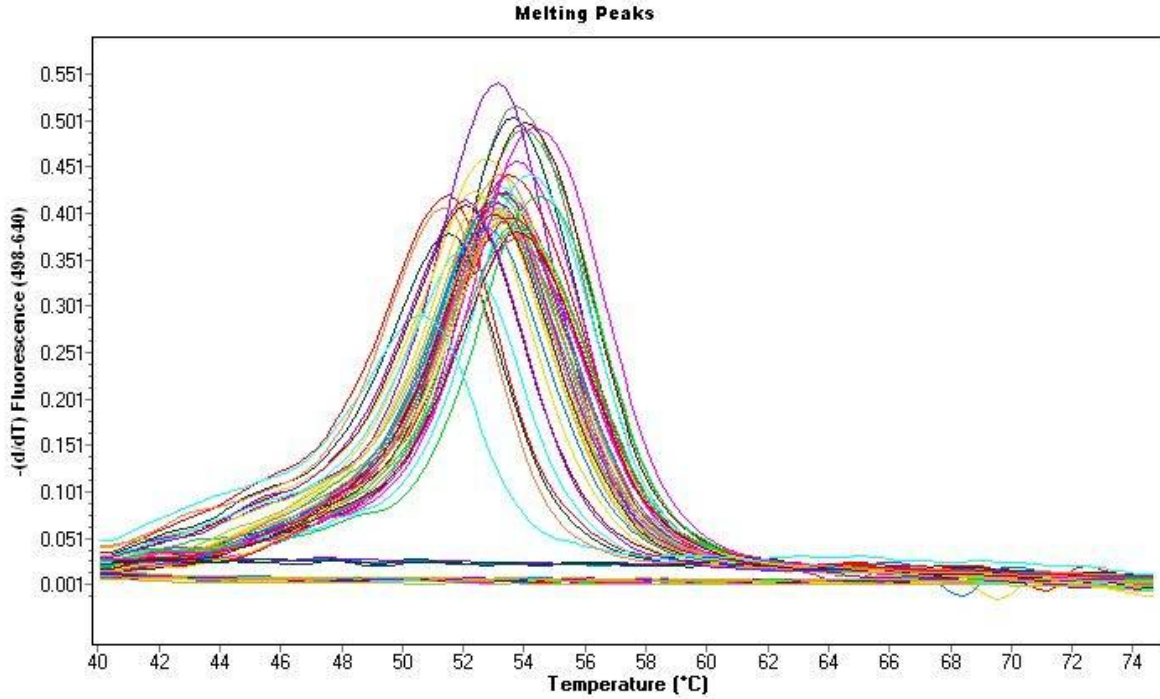
RT PZR tekniği kullanılarak CAV-1 genindeki varyasyonlardan rs3840634 (AC delesyonu) polimorfizmi incelenmiştir. rs3840634 polimorfizminin tespiti amacıyla bu bölgeye özgü primerler tasarlanmıştır. Gelen kanlardan Kit (Roche Diagnostics) protokolüne uygun olarak spin column ile genomik DNA izolasyonu yapılmış ve daha sonra Nano Drop Spektrofotometre kullanılarak, elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ölçülmüştür. DNA'ların konsantrasyonları 100 ng/ul olacak şekilde dilüe edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu, total hacim 10.5 ul olacak şekilde hazırlandı ve 0.5 ul Reagent Mix , 0.8 ul 25mM MgCl₂, 1 ul FastStart DNA Master , 1ul genomik DNA içermesi sağlanmıştır. rtPZR kondüsyonları 10' 95 °C'de ilk denatürasyondan sonra 45 döngüden oluşan döngü aşamasında 95 °C'de 10", 60 °C'de 10" ve 72 °C'de 15" olacak şekilde, erime eğrisi aşamasında 1 siklus 95 °C'de 30", 40 °C'de 2 dk. ve soğuma aşamasında da 1 siklus 40 °C'de 30" olarak düzenlenmiştir (Tablo 3-1).

RT PZR deneyinde rs3840634 gen varyantının belirlenmesi için SYBR Green I boyası kullanıldı. Bu boya çift iplikli DNA'ya (araştırılan DNA bölgesi) bağlanır ve ışımaya yarar. İstenilen DNA bölgesi arttıkça, bağlanmış SYBR Green I'ın verdiği ışımada artar. RT PZR sonucu elde edilen ürünlerin istenilen ürün olup olmadığı erime eğrisi "melting curve" değerine göre belirlenir (Şekil 3-1).



Şekil 3-1 : rs3840634 gen varyantının belirlenmesi için elde edilen erime eğrileri

Erime Sıcaklığı (TM), genin istenen bölgesinin çoğalmasıyla oluşan ürünün %50'sinin denatüre olduğu sıcaklık değeridir. Bu değer genin dizisine ve %GC oranına bağlı olarak farklılık gösterir. Gerçek zamanlı PZR yöntemi erime tepe noktalarında gen bölgesinde tek nükleotid değişimi (SNP) olup olmadığının belirlenmesini sağlar (Şekil 3-2).



Şekil 3-2 : rs3840634 TT Genotipi

rs3840634 polimorfizmi için kullanılan LightSNiP protokolüne göre ; T alleli için olması gereken T_m değeri 56.98 , C alleli için olması gereken T_m değeri ise 63.77'dir. Gerçek zamanlı PZR çalışmasının sonucunda elde edilen verilere göre kontrol ve hasta gruplarının tamamında araştırılan bölgede T alleleline sahiptir.

3.6. PZR İLE GENOTİPLEME

3.6.1. PZR Yöntemi İle CAV1 rs3807990 Gen Polimorfizminin Araştırılması

CAV-1 geninde rs3807990 (C>T) varyantının gözlemlendiği bölgenin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri:

İleri primer : 5'-GAGAACAGTGTCTGATCACAAC- 3'

Geri primer :5'- GCAATGGTCATCCATGACTG- 3'

DNA örneklerinden rs3807990 gen polimorfizminin gözlemlendiği bölgenin çoğaltılması için buz üzerinde ve steril kabin içerisinde PZR karışımı hazırlandı.

PZR içeriği

	Miktar
ddH ₂ O	16.7 µl
10X Taq tamponu (KCl'li)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer karışımı	1 µl
Taq DNA polimeraz	0,3 µl
Toplam	24µl

Taq DNA polimeraz eklendikten sonra tüp içine konan bileşenlerin iyice karışması için pipetleme işlemi yapıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik PZR tüplerine 24 µl reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 1 µl DNA (150-200 ng) eklenerek yeniden pipetleme yapıldı. PZR cihazına (Thermal Cycler) örnekler yerleştirildi ve PZR işlemi başlatıldı. rs3807990 için kullanılan amplifikasyon koşulu Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

Tablo 0-1: rs3807990 varyantı için uygulanan PZR şartları

	Sıcaklık	Zaman
Ön Denatürasyon	94°C	5 dk
Denatürasyon	94°C	30 saniye
Primer Bağlanması	60.5°C	45 saniye
Zincir Uzaması	72°C	30 saniye
Son Zincir Uzaması	72°C	5 dk

} 35 döngü

3.6.2.PZR Yöntemi İle NOS3 rs1799983 (G>T) Gen Polimorfizminin Araştırılması

NOS3 geninde rs1799983 (G>T) varyantının gözlemlendiği bölgenin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri:

İleri primer: 5'-CACGGAGACCCAGCCAATGAG-3'

Geri primer : 5'-CTTCTTGAGAGGCTCAGGGATG-3'

DNA örneklerinden rs1799983 gen varyantının gözlemlendiği bölgenin çoğaltılması için buz üzerinde ve steril kabin içerisinde PZR karışımı hazırlandı.

PZR içeriği

	Miktar
ddH ₂ O	14,7 µl
10X Taq tamponu (KCl'li)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
DMSO	1,5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer karışımı	1 µl
Taq DNA polimeraz	0,3 µl
Toplam	23.5µl

Taq DNA polimeraz eklendikten sonra tüp içine konan bileşenlerin iyice karışması için pipetleme işlemi yapıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 23,5 µl reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 1,5 µl DNA (150-200 ng) eklenerek yeniden pipetleme yapıldı, PZR cihazına (Thermal Cycler) örnekler yerleştirildi ve PZR işlemi başlatıldı. rs1799983 için kullanılan amplifikasyon koşulu Tablo 3-3'de gösterilmiştir.

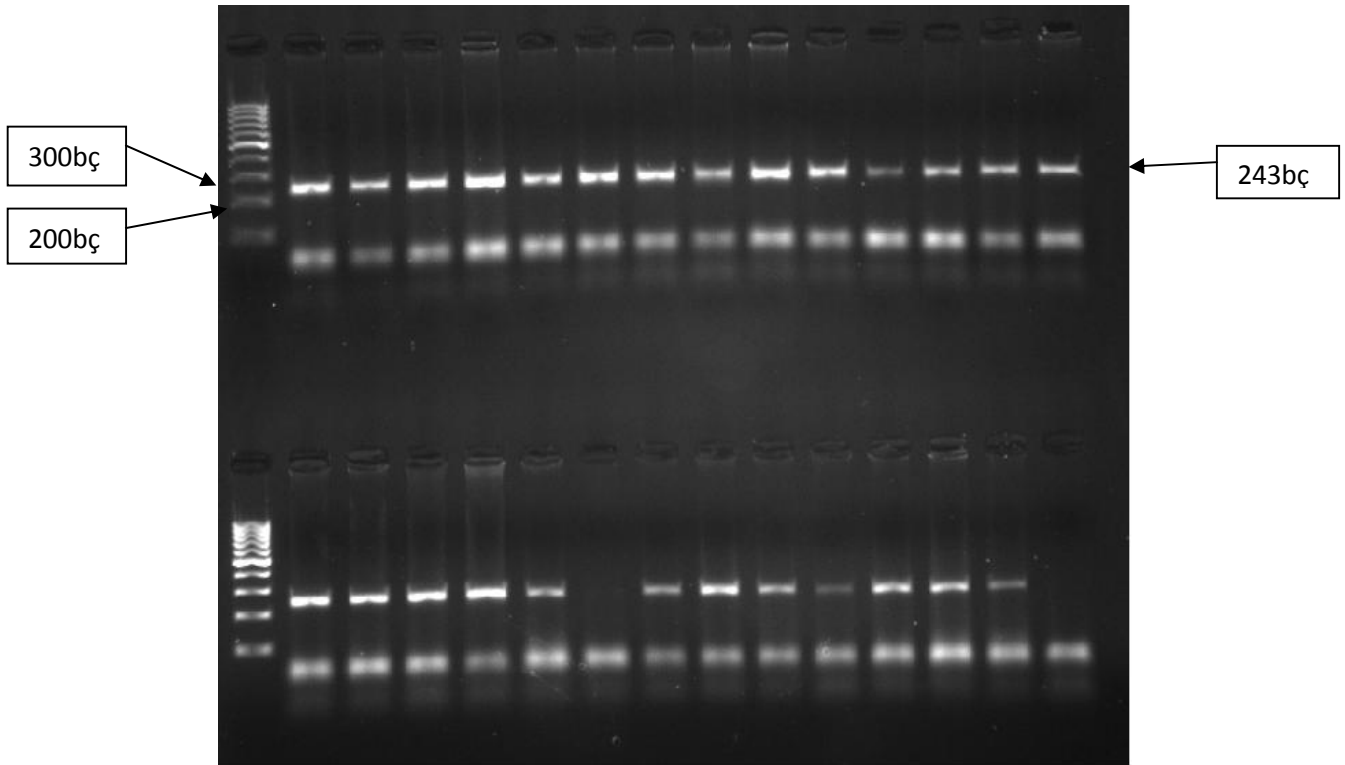
Tablo 3-3: rs1799983 varyantı için uygulanan PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön Denatürasyon	94°C	5 dk
Denatürasyon	94°C	30 saniye
Primer Bağlanması	58.4°C	45 saniye
Zincir Uzaması	72°C	30 saniye
Son Zincir Uzaması	72°C	5 dk

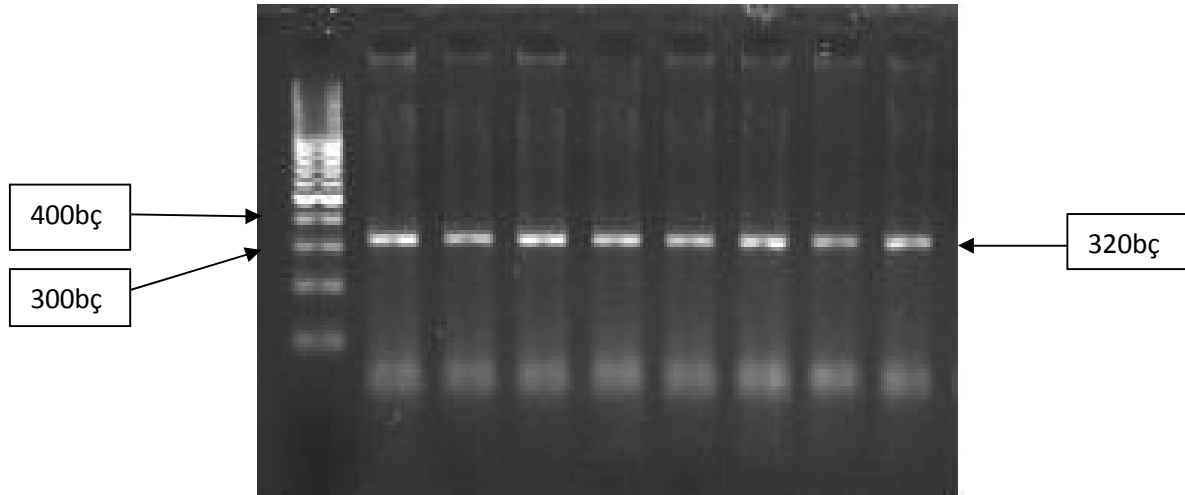
} 35 döngü

3.6.3 PZR Ürünlerinin Kontrolü

PZR ürünlerinin kontrolü için %2'lük agaroz jel hazırlandı. 7 µl PZR ürünü, 3 µl yükleme boyası ile karıştırıldı. Jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Ürünler 100 bp'lik DNA markeri (Fermentas) ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bandlar UV ışık altında incelendi.(Şekil 3-3 ve Şekil 3-4)



Şekil 3-3: CAV-1 rs3807990 için 243 bç'lik PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü (Markır: 100 bç DNA marker).



Şekil 3-4: NOS3 rs1799983 için 320 bç'lik PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü (Markır: 100 bç Thermo Scientific DNA marker).

3.7. RFUP ANALİZİ

3.7.1 MspI Restriksiyon Endonükleaz Enzimi İle CAV-1 rs3807990 varyantının RFUP Analizi

RFUP analizi için PZR ürünleri,

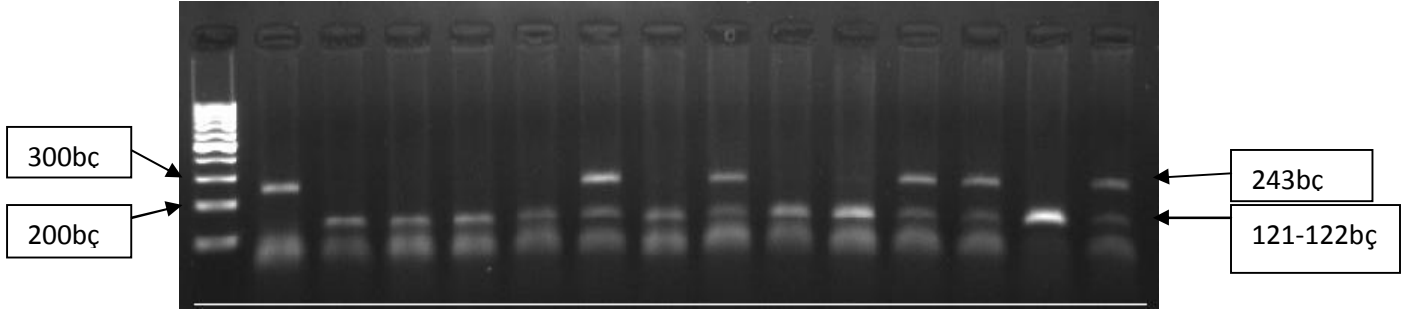


bölgesinde selektif kesim yapan MspI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi.

Kesim Karışımı İçeriği

	Miktar
ddH ₂ O	8 µl
10X Tango Tampon	2 µl
MspI enzimi	1 µl
Toplam	11µl

11 µl kesim karışımı ile 10 µl PZR ürünü 37°C sıcaklıkta 4 saat inkübe edildi. Kesim ürününün tamamı %2'lük agaroz jeldeki kuyulara yüklendi ve 80 voltluk elektrik akımında yürütüldü. Yürütme sonrası, UV ışık altında jelin fotoğrafı çekilerek kesim ürünleri incelendi. (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: MspI enzim kesimi sonucunda ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsü. (Markır: 100 bç Thermo Scientific DNA markır).

3.7.2 BanII Restriksiyon Endonükleaz Enzimi İle NOS3 rs1799983 varyantının RFUP Analizi

RFUP analizi için PZR ürünleri,

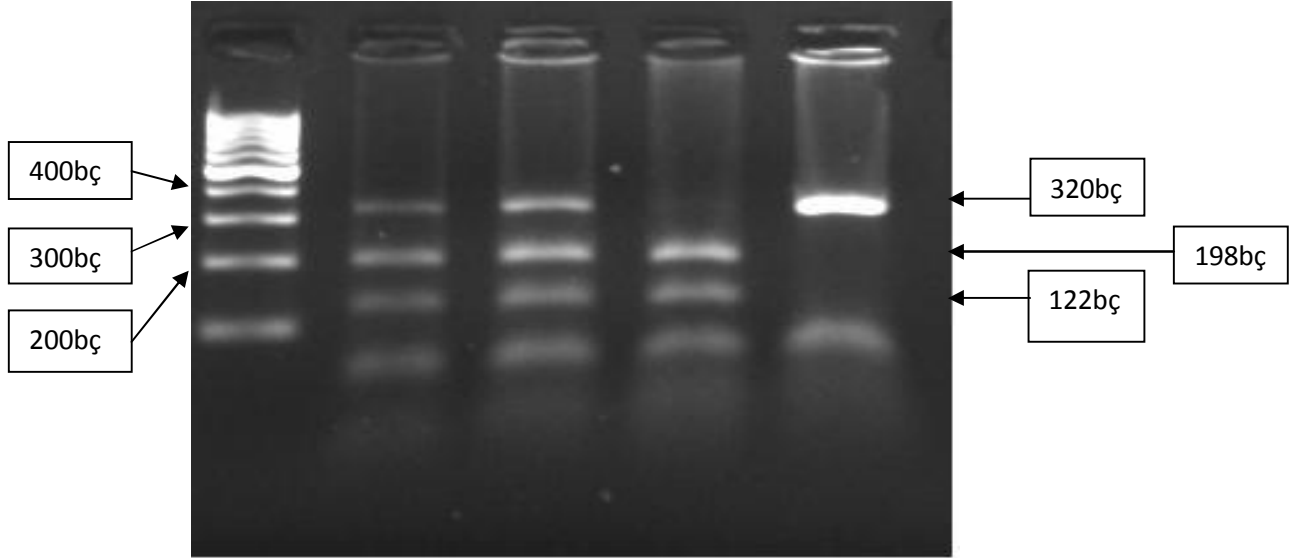


bölgesinde selektif kesim yapan BanII restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi.

Kesim Karışımı İçeriği

	Miktar
10X BanII Tampon	1,5 µl
BanII enzimi	0,5 µl
Toplam	2µl

2 µl kesim karışımı ile 10 µl PZR ürünü 37°C sıcaklıkta 60 dak. inkübe edildi. 10 µl kesim ürünü, 3 µl 6X yükleme boyası ile karıştırılıp %2'lük agaroz jeldeki kuyulara yüklendi ve 80 voltluk elektrik akımında yürütüldü. Yürütme sonrası, UV ışık altında jelin fotoğrafı çekilerek kesim ürünleri incelendi (Şekil 3-6).



Şekil 3-6: BanII enzim kesimi sonucunda ürünlerin jeldeki görüntüsü

(Markır: 100 bç Thermo Scientific DNA marker).

3.8. PZR VE RFUP YÖNTEMLERİYLE ELDE EDİLEN SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

3.8.1. CAV-1 rs3807990 varyantının PZR ve RFUP Analizi

rs3807990 varyantı için primer dizisi belirlenirken Sanal PZR yapıldı ve PZR sonucunda elde edilecek olan ürünün uzunluğunun 243bç olacağı belirlendi. Yaptığımız PZR sonucunda elde ettiğimiz jel görüntülerindeki bant boyları öngörülerimizle örtüştü ve 243bç uzunluğunda PZR ürünleri elde edildi.

rs3807990 varyantı için RFUP yönteminde, MspI restriksiyon enzimi kullanıldı. Polimorfik bölgede C alleli varlığında MspI restriksiyon enzimi için kesim bölgesi oluşur, T alleli varlığında ise kesim gerçekleşmez. Homozigot CC genotipine (normal) sahip PZR

ürünleri 122bç ve 121bç büyüklüğünde iki bant verirken, homozigot TT genotipine (mutant) sahip PZR ürünleri enzim kesimi sonrası 243 bç boyunda tek bant verdi. Heterozigot CT genotipine sahip PZR ürünlerinden, enzim kesimi sonrası 243 bç, 122 bç ve 121 bç olmak üzere üç bant elde edildi.

3.8.2. NOS3 rs1799983 varyantının PZR ve RFUP Analizi

rs1799983 varyantı için primer dizisi belirlenirken sanal PZR yapıldı ve PZR sonucunda elde edilecek olan ürünün uzunluğunun 320bç olacağı belirlendi. Yaptığımız PZR sonucunda elde ettiğimiz jel görüntülerindeki bant boyları öngörülerimizle örtüştü ve 320bç uzunluğunda PZR ürünleri elde edildi.

rs1799983 varyantı için RFUP yönteminde , BanII restriksiyon enzimi kullanıldı. Polimorfik bölgede G alleli varlığında BanII restriksiyon enzimi için kesim bölgesi oluşur, T alleli varlığında ise kesim gerçekleşmez. Homozigot GG genotipine (normal) sahip PZR ürünleri 198 bç ve 122 bç büyüklüğünde olmak üzere iki bant verirken, homozigot TT genotipine (mutant) sahip PZR ürünleri, enzim kesimi sonrası 320 bç uzunluğunda tek bant verdi. Heterozigot GT genotipine sahip PZR ürünlerinden, enzim kesimi sonrası 320 bç, 198 bç ve 122 bç olmak üzere üç bant elde edildi.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 13,0 paket programı kullanılmıştır. Sonuçlar %95 güven aralığında, istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak değerlendirilmiştir.

Kan basınçları, serum lipid düzeyleri ve vücut kitle indeksi gibi tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra niceliksel verilerin gruplararası karşılaştırılmasında student's t testi; , Genotip ve allel karşılaştırmaları, Hardy-Weinberg dengesine uyum gibi niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki kare (χ^2) testi kullanılmıştır.

Klinik ve klinik olmayan parametrelerin allellerle karşılaştırılmasında Kikare metodu ve Student's t-testi ikiden fazla değişkenin olduğu genotip karşılaştırmalarında ANOVA testi kullanılmıştır. Gruplar arası risk etkeninin belirlenmesi için Odds oranı (OR) ve % 95 güven aralığı (% 95 GA) verilmiştir. Allel frekansı hesaplamalarında gen sayma yöntemi kullanılmıştır.

Koroner kalp hastalığında risk kabul edilen hiperkolesterol (total kolesterol düzeylerinin 5,18 mmol/L'den yüksek olması) gelişiminde, çalışmamızda risk olarak belirlediğimiz değişkenlerin etkileri değerlendirilmiştir. Koroner kalp hastası olan kişiler arasında hiperkolesterol için yapılan risk analizinde CAV1 rs3807990 T alleli, cinsiyet, tip 2 diyabet varlığı ve sigara kullanımı kategorik parametreler olarak belirlenmiştir. Bu şekilde logistik regresyon analizinde $p < 0,05$ 'ten küçük anlamlılık değerine sahip faktörlerin KKH hasta grubunda hiperkolesterol gelişiminde risk oluşturduğu kabul edilmiştir..

4.BULGULAR

Tez projemize ait çalışma grupları İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kardiyoloji kliniğinde takip edilen 76 koroner kalp hastası (KKH) ve 91 gönüllü sağlıklı kontrolden oluşturulmuştur. Çalışmamıza dahil edilen koroner kalp hastalığı olan hasta ve kontrol grubuna ait özellikler Tablo 4-1 'de verilmiştir.

Buna göre hasta ve kontrol grubu arasında yaş ortalaması ve cinsiyet açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Hasta ve kontrol grubu arasında ayrıca serum Triglicerid, VLDL-kolesterol (VLDL-K), vücut kitle indeksi (VKİ) ve aile koroner arter hastalığı hikayesi açısından istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Yapılan istatistiksel analizde hasta grubunu oluşturan bireylerin % 43,4'ünün hipertansif, % 43,4'ünün tip 2 diyabetik olduğu ve hastaların % 39,6'sında sol ventrikül hipertrofisi bulunduğu tespit edilmiştir.

Hasta ve kontrol grubu arasında sistolik ve diastolik kan basınçları ile total-kolesterol, LDL-kolesterol ve HDL-kolesterol (HDL-K) değerleri açısından anlamlı farklılık gözlenmiştir. Koroner kalp hasta grubunda sistolik ($p=0,003$) ve diastolik ($p=0,001$) kan basıncı düzeyleri ile total-kolesterol ($p=0,003$) ve LDL-kolesterol ($p=0,006$) değerleri kontrol grubuna kıyasla yüksek iken HDL-K değeri düşük bulunmuştur ($p < 0,001$).

Sigara ve alkol tüketimi açısından hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında; KKH grubunda kontrol grubuna göre sigara ve alkol kullanımı yüksek gözlenmiştir (Sigara kullanımı: hasta grubunda %59,5, kontrol grubunda %21,8, $p=0,001$; alkol kullanımı; hasta grubunda %16,7, kontrol grubunda %4,7, $p=0,03$).

Tablo 0-2: Çalışma Gruplarının Karakteristik Özellikleri

	Gruplar		P değeri
	Kontrol (n=91)	KKH Hasta (n=76)	
Yaş (yıl)	59,10±9,85	59,49±12,38	0,822
Cinsiyet (Kadın/Erkek) (n)	38/53	24/52	0,175
SKB (mmHg)	123,99±12,27	135,95±32,38	0,003
DKB (mmHg)	73,91±8,54	83,99±17,18	0,000
Total-K (mmol/L)	4,72± 0,96	5,28± 1,40	0,003
TG (mmol/L)	1,45± 0,66	1,77± 1,80	0,123
HDL-K(mmol/L)	1,22± 0,34	1,03± 0,21	0,000
LDL-K(mmol/L)	2,86± 0,87	3,23± 0,81	0,006
VLDL-K(mmol/L)	0,71± 0,39	0,72± 0,32	0,819
VKİ (kg/m ²)	25,83± 2,33	25,58± 4,20	0,669
Sigara Kullanımı (%)	%21,8	%59,5	0,000
Alkol kullanımı (%)	%4,7	%16,7	0,03
Aile koroner arter hastalığı hikayesi varlığı (%)	%21,7	%33,9	0,285
Hipertansiyon varlığı (%)	-	%43,4	-
Tip 2 Diabet varlığı (%)	-	%43,4	-
SVH varlığı (%)	-	%39,6	-

Tablodaki yaş, serum lipid, VKİ ve kan basınçları değerleri X+SD olarak verilmiştir. Gruplararası önemlilik derecesi student's t testi ile incelenmiştir. KKH: Koroner kalp hastalığı, VKİ : Vücut kitle indeksi, Total-K: total-kolesterol, TG: Trigliserid, HDL-K: HDL-kolesterol, LDL-K:LDL-kolesterol, VLDL-K:VLDL-kolesterol, SVH: sol ventrikül hipertrofisi, n : örnek sayısı.

Koroner kalp hasta ve kontrol gruplarında CAV-1 ve eNOS genlerinde incelenen polimorfizmlere ait genotip, allel dağılımları ve Hardy-Weinberg Eşitliği (HWE)'ne uyumları Tablo 4-2'de gösterilmiştir. CAV-1 rs3807990 varyantının kontrol grubu HWE'ye uyumlu ($p>0,05$) iken, hasta grubu uyumsuz bulunmuştur ($p<0,05$). eNOS rs1799983 varyantı çalışma gruplarında incelendiğinde ise hem kontrol hem de hasta grubu bu eşitliğe uyumsuz bulunmuştur ($p<0,05$). CAV1 rs3840634 varyantında kontrol ve hasta gruplarında nadir C alleleline rastlanmamış, tüm bireylerde normal TT genotipi tespit edilmiştir. Bu nedenle HWE'ye uyum CAV1 rs3840634 varyantı açısından araştırılmamıştır.

CAV1 rs3807990 kontrol grubunda normal C allel frekansı %72,5, nadir T allel frekansı %27,5 iken, KKH hasta grubunda kontrol grubu değerlerine yakın olarak sırasıyla %78,1 ve %21,9 bulunmuştur. Kontrol grubunda NOS3 rs1799983 normal G allel frekansı

%69,9, nadir T allel frekansı %30,1 iken KKH hasta grubunda yine kontrol grubu değerlerine yakın olarak sırasıyla %66,6 ve %33,3 bulunmuştur.

Tablo 0-3:Çalışma gruplarında CAV-1 ve NOS3 Genotiplerinin Dağılımı

CAV-1	Çalışma Grupları	
rs3807990 Genotipleri	Kontrol (n=91)	KKH Hasta (n=73)
CC	49 (%53,8)	46 (%63)
TT	8 (%8,8)	5 (%6,8)
CT	34 (%37,4)	22 (%30,1)
HWE	p=0,37 (p>0,05)	p=0,007 (p<0,05)
rs3807990 C/T Alleleri		
C	132 (%72,5)	114(%78,1)
T	50(%27,5)	32 (%21,9)
rs3840634 Genotipleri	Kontrol (n=44)	KKH Hasta (n=73)
TT	44 (%100)	73 (%100)
CC	0 (%0)	0 (%0)
CT	0 (%0)	0 (%0)
HWE	Hesaplanamadı	Hesaplanamadı
rs3840634 T/C Alleleri		
T	88 (%100)	146 (% 100)
C	0 (%0)	0 (% 0)
NOS3	Çalışma Grupları	
rs1799983 Genotipleri	Kontrol (n=73)	KKH Hasta (n=75)
GG	35 (%47,9)	33 (%44)
TT	6 (%8,2)	8 (%10,7)
GT	32 (%43,8)	34 (%45,3)
HWE	p=0,007 (p<0,05)	p=0,012 (p<0,05)
rs1799983 T/C Alleleri		
G	102 (%69,9)	100 (% 66,6)
T	44(%30,1)	50 (% 33,3)

n : örnek sayısı, HWE: Hardy-Weinberg Eşitliği.

CAV-1 rs3807990 genotiplerinin çalışma gruplarında serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi incelendiğinde; kontrol grubunda vücut kitle indeksi değerleri CT genotipinde TT'lere göre yüksek gözlenirken ($p= 0,046$), CAV-1 rs3807990 normal C allelinde diastolik kan basıncı değerleri TT'lere göre düşük gözlenmiştir (C allel: $73,42\pm 8,65$, TT genotipi: $79,67\pm 4,32$, $p=0,014$). Hasta grubunda ise CT genotipi taşıyan bireylerde serum total-kolesterol ve LDL-K değerleri CC genotipli bireylere göre yüksek gözlendi (sırasıyla $p=0,008$ ve $p=0,054$). Hasta grubunda allel etkisi incelendiğinde T alleli taşıyanlarda CC genotiplilere kıyasla total-kolesterol (T allel: $5,78\pm 1,88$, CC genotipi: $4,98\pm 0,90$, $p=0,017$) ve LDL-K (T allel: $3,44\pm 0,70$, CC genotipi: $3,07\pm 0,82$, $p=0,053$) değerleri yüksek bulunmuştur (Tablo 4-3). Dolayısı ile hasta grubunda CT genotipinde gözlenen total-kolesterol ve LDL-K seviyelerindeki yükseklik T alleleline atfedilebilir.

NOS3 rs1799983 genotiplerinin çalışma gruplarında serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi incelendiğinde; kontrol grubunda vücut kitle indeksi değerleri TT genotipli bireylerde GG ve GT genotiplerine (Her iki karşılaştırma için $p=0,003$) ve G alleleline ($p=0,002$) kıyasla yüksek gözlendi. Hasta grubunda ise NOS3 rs1799983 genotiplerinin incelenen klinik ve biyokimyasal parametreler üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir etkisi gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 4-4).

CAV1 rs3840634 genotipi 44 sağlıklı kontrol ve 73 KKH hasta grubunda incelenmiş ve Tablo 4-2 belirttiğimiz gibi her iki çalışma grubumuzda sadece normal TT genotipi tespit edilmiştir. Bu grupları oluşturan bireylere ait serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi değerleri Tablo 4-5'te gösterilmiştir.

Tablo 0-4: CAV-1 rs3807990 Genotiplerinin Çalışma Gruplarında Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi

GRUP	rs3807990				
	CC	CT	TT	CC/CT	TT/CT
KONTROL	n=49	n=34	n=8	n=132	n=50
Yaş	59,78±10,36	58,71±9,60	56,63±8,02	59,34±10,01	58,31±9,27
Glikoz	94,64±10,10	96,94±12,19	105,00±7,55	95,48±10,85	98,04±11,87
Total-K (mmol/L)	4,66±1,06	4,84±0,88	4,59±0,61	4,74±0,99	4,80±0,84
TG (mmol/L)	1,38±0,55	1,57±0,80	1,41±0,62	1,46±0,66	1,54±0,77
HDL-K (mmol/L)	1,20±0,28	1,19±0,36	1,42±0,52	1,20±0,31	1,23±0,40
LDL -K(mmol/L)	2,79±0,91	3,03±0,84	2,47±0,56	2,89±0,88	2,93±0,82
VLDL -K(mmol/L)	0,69±0,42	0,74±0,38	0,70±0,34	0,71±0,40	0,73±0,37
VKİ (kg/m²)	25,94±1,96	26,05±2,51*	24,23±3,17	25,99±2,19	25,71±2,71
SKB (mmHg)	123,29±12,84	125,27±12,11	122,67±9,93	124,09±12,50	124,83±11,67
DKB (mmHg)	73,02±7,50	74,00±10,19	79,67±4,32	73,42±8,65[¥]	74,97±9,65
KKH HASTA	n=46	n=22	n=5	n=114	n=32
Yaş	61,46±10,75	58,50±14,30	54,60±15,82	60,50±11,99	57,78±14,35
Glikoz	179,35±121,15	174,72±130,63	223,33±184,81	177,83±123,13	181,67±134,99
Total-K (mmol/L)	4,98±0,90	5,92±2,04^{&}	5,13±0,63	5,29±1,43	5,78±1,89^Σ
TG (mmol/L)	1,55±0,67	2,23±3,13	1,89±1,10	1,77±1,9	2,16±2,85
HDL-K (mmol/L)	1,03±0,20	1,06±0,16	1,12±0,21	1,04±0,19	1,07±0,17
LDL -K(mmol/L)	3,07±0,82	3,47±0,69[#]	3,33±0,81	3,20±0,79	3,44±0,70^Ω
VLDL -K(mmol/L)	0,72±0,31	0,72±0,30	0,72±0,49	0,72±0,30	0,72±0,34
VKİ (kg/m²)	25,75±4,07	24,96±3,43	22,91±3,70	25,47±3,85	24,52±3,51
SKB (mmHg)	133,64±25,78	145,0±41,94	116,0±37,82	137,42±32,30	139,62±42,10
DKB (mmHg)	82,84±17,13	88,41±17,42	74,0±15,17	84,69±17,29	85,74±17,68

* , p=0,046; [¥] , p=0,014; [&] , p=0,008; ^Σ , p=0,017; [#] , p=0,054; ^Ω , p=0,053.

Tablo 0-4: NOS3 rs1799983 Genotiplerinin Çalışma Gruplarında Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi

GRUP	rs1799983				
	GG	GT	TT	GG/GT	TT/GT
KONTROL	n=35	n=32	n=6	n=102	n=44
Yaş	58,49±9,96	59,66±9,66	56,67±12,48	59,04±9,76	59,18±10,02
Glikoz	97,06±11,96	94,73±12,62	99,00±7,53	95,80±12,20	95,48±11,87
Total-K (mmol/L)	4,65±1,15	4,80±0,64	4,95±1,00	4,72±0,94	4,82±0,69
TG (mmol/L)	1,35±0,49	1,48±0,78	1,36±0,81	1,41±0,64	1,46±0,76
HDL-K (mmol/L)	1,29±0,35	1,20±0,38	1,15±0,31	1,25±0,36	1,19±0,37
LDL -K(mmol/L)	2,84±0,99	2,94±0,62	2,80±0,95	2,89±0,83	2,91±0,67
VLDL -K(mmol/L)	0,62±0,25	0,74±0,42	0,85±0,82	0,67±0,34	0,76±0,49
VKİ (kg/m²)	25,44±1,99	25,35±2,70	28,59±2,19*	25,40±2,34[¥]	25,86±2,89
SKB (mmHg)	122,72±11,80	125,13±13,14	113,60±10,71	120,03±12,50	123,48±13,33
DKB (mmHg)	72,40±7,65	77,03±9,37	72,60±9,15	74,92±8,86	76,40±9,34
KKH HASTA	n=33	n=34	n=8	n=100	n=50
Yaş	61,09±11,84	59,24±13,63	56,38±6,93	60,15±12,72	58,69±12,61
Glikoz	194,48±134,92	191,19±140,49	135,50±71,01	192,86±136,36	180,75±131,22
Total-K (mmol/L)	5,29±1,64	5,24±1,27	5,35±1,07	5,27±1,45	5,27±1,23
TG (mmol/L)	1,65±0,81	1,94±2,54	1,50±0,67	1,80±1,90	1,85±2,31
HDL-K (mmol/L)	1,01±0,23	1,05±0,19	1,12±0,17	1,02±0,21	1,06±0,18
LDL -K(mmol/L)	3,26±0,95	3,20±0,72	3,15±0,59	3,23±0,84	3,19±0,69
VLDL -K(mmol/L)	0,74±0,36	0,68±0,27	0,75±0,34	0,72±0,32	0,70±0,28
VKİ (kg/m²)	26,16±4,48	24,98±4,00	26,46±4,03	25,53±4,23	25,32±4,00
SKB (mmHg)	142,34±31,90	134,09±33,66	121,25±26,42	138,15±32,82	131,59±32,49
DKB (mmHg)	86,72±16,29	83,18±16,85	78,13±22,35	84,92±16,55	82,20±17,86

*, p=0,003; [¥], p=0,002;

Tablo 0-5: CAV-1 rs3840634 Genotiplerinin Çalışma Gruplarında Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi

GRUP	r-s3840634					
	KONTROL (n=44)			KKH HASTA (n=73)		
	TT	CT	CC	TT	CT	CC
Yaş	54,95±8,39	-	-	59,82±12,44	-	-
Glikoz	100,37±19,01	-	-	180,97±124,7 7	-	-
Total-K (mmol/L)	4,82±1,23	-	-	5,28±1,39	-	-
TG (mmol/L)	1,51±0,70	-	-	1,81±1,82	-	-
HDL-K (mmol/L)	1,15±0,38	-	-	1,109±0,19	-	-
LDL -K(mmol/L)	3,07±1,08	-	-	3,20±0,79	-	-
VLDL -K(mmol/L)	0,70±0,36	-	-	0,73±0,32	-	-
VKİ (kg/m ²)	25,06±2,73	-	-	25,34±3,87	-	-
SKB (mmHg)	119,97±10,62	-	-	135,77±32,88	-	-
DKB (mmHg)	71,73±8,84	-	-	83,73±17,41	-	-

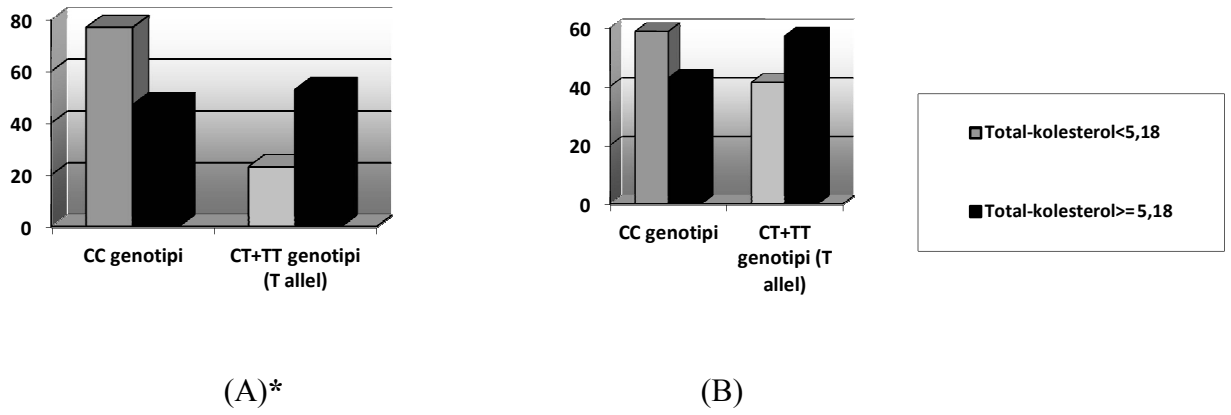
Tablo 4-6'da CAV-1 rs3807990 ve NOS3 rs1799983 genotiplerinin çalışma gruplarında serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerinde kombine etkisi gösterilmiştir. KKH hasta grubunda CAV-1 rs3807990 nadir T allel ve NOS3 rs1799983 nadir T allelini birlikte taşıyan alt grupta HDL-kolesterol değeri CAV-1 rs3807990 normal CC/ NOS3 rs1799983 normal GG genotipi taşıyan alt gruba göre yüksek bulunmuştur (1,12±0,12 vs. 1,01± 0,22, p=0,013). Kontrol grubunda ise her iki varyasyonun nadir allelini birlikte taşıyan grupta her iki varyasyonun normal genotiplerini birlikte taşıyan gruba (NOS3 rs1799983 GG CAV-1 rs3807990 GG) kıyasla herhangi bir farklılık tespit edilememiştir (Bu veriler Tablo 4-6'da yer almamaktadır).

Tablo 0-6: CAV-1 rs3807990 ve NOS3 rs1799983 Genotiplerinin Çalışma Gruplarında Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerinde kombine etkisi

GRUP	CAV-1 rs3807990 ve NOS3 rs1799983		P değeri
	eNOS T allel/CAV-1 T allel	eNOS GG/CAV-1 CC	
KONTROL	n=20	n=65	
Glikoz	99,36±13,37	95,05±10,07	0,250
Total-K (mmol/L)	4,77±0,66	4,75±1,04	0,943
TG (mmol/L)	1,62±0,91	1,39±0,54	0,288
HDL-K (mmol/L)	1,19±0,44	1,23±0,30	0,586
LDL -K(mmol/L)	2,91±0,62	2,89±0,94	0,920
VLDL -K(mmol/L)	0,79±0,43	0,68±0,39	0,293
VKİ (kg/m²)	25,27±3,14	25,87±2,01	0,432
SKB (mmHg)	126,26±14,77	123,27±11,81	0,380
DKB (mmHg)	76,53±10,94	73,65±7,29	0,206
KKH HASTA	n=16	n=58	
Glikoz	194,75±141,84	186,02±132,13	0,842
Total-K (mmol/L)	5,81±1,60	5,12±1,34	0,084
TG (mmol/L)	2,44±3,66	1,57±0,71	0,357
HDL-K (mmol/L)	1,12±0,12	1,01±0,22	0,013
LDL -K(mmol/L)	3,53±0,64	3,13±0,84	0,089
VLDL -K(mmol/L)	0,70±0,32	0,71±0,32	0,885
VKİ (kg/m²)	25,25±3,62	25,75±4,43	0,693
SKB (mmHg)	129,38±39,41	139,75±30,38	0,313
DKB (mmHg)	81,56±18,05	85,27±17,01	0,451

*, p=0,048.

Şekil-4.1’de CAV1 rs3807990 SNP’nin hiperkolesterol ile ilişki grafiği gösterilmiştir. KKH hasta grubunda T alleli istatistiksel olarak anlamlı derecede hiperkolesterolemi ile ilişkili gözlenirken (kikare=6,951 p=0,008), kontrol grubunda bu ilişki tespit edilememiştir (kikare=1,963, p=0,161).



Şekil 4.1: (A) hasta ve (B) kontrol gruplarında CAV1 rs3807990 SNP’nin hiperkolesterolemi ile ilişkisi.

*, kikare= 6,951, p=0,008.

Tablo 4-7’de lojistik regresyon analizini kullanarak koroner kalp hastalığı gelişiminde risk kabul edilen hiperkolesterolemi gelişiminde bu çalışmada risk olarak belirlediğimiz parametrelerin etkileri değerlendirilmiştir. Bu şekilde KKH hasta grubunda hiperkolesterolemi (total kolesterol düzeylerinin 5,18 mmol/L’den yüksek olması) için yapılan risk analizinde CAV1 rs3807990 T alleli, cinsiyet, tip 2 diyabet varlığı ve sigara kullanımı kategorik değişkenlerde yer almıştır. Sonuç olarak yapılan lojistik regresyon

analizinde CAV1 rs3807990 varyasyonunun hasta grubunda hiperkolesterol gelişiminde risk oluşturduğu doğrulanmıştır.

Tablo 0-7: Koroner kalp hasta grubunda hiperkolesterol ile ilişkili risk faktörlerinin lojistik regresyon analizinde değerlendirilmesi

Değişkenler	P değeri	B	SE	Exp (B)	OR (95% CI) for Exp (B)
Cinsiyet	0,353	0,582	0,627	1,790	0,524-6,114
Tip 2 Diyabet	0,480	-0,448	0,553	0,639	0,184-2,217
Sigara	0,850	0,133	0,700	1,142	0,290-4,504
CAV1 rs3807990 T allel	0,011	-1,412	0,726	0,244	0,082-0,721

5.TARTIŞMA

Gelişmiş toplumlarda başlıca ölüm nedenlerinden biri koroner kalp hastalığıdır. TEKHARF (Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri) çalışması ülkemizde KKH kaynaklı ölümleri 20 yıllık süreçte takip etmiş ve değerli veriler elde etmiştir. Bu çalışmaya göre ülkemizde yılda binde 7,4 erkek ve 4,1 kadın KKH'ndan dolayı hayatını kaybetmektedir (79).

İlk olarak lipid depolarının damarları tıkamasıyla oluşan KKH, hasar ve enfeksiyona cevap olarak kronik inflamasyonla seyreden bir hastalıktır (80). KKH yıllar boyu süren bir süreç olup, temelinde ateroskleroz ve endotelial fonksiyon bozukluğu yer almaktadır.

Kolesterol içeren LDL'lerin endotel hücrelerden geçip çeşitli modifikasyonlara uğradıktan sonra makrofajlar tarafından alınıp, köpük hücre oluşumuyla başlayan ateroskleroz patogenezi, kolesterol ve esterlerinin ekstrasellular alanda artması ve böylece fibröz plakların oluşmasına yol açmasıyla ilerlemektedir. Fonksiyonu bozulmuş endotel hücrelerindeki yetersiz NO üretimi ateroskleroz patogenezindeki kilit noktalardandır.

Temelinde NO'nun biyoyararlanımındaki azalmanın yattığı endotelial disfonksiyon, dislipidemi, arteriyel hipertansiyon, hiperglisemi ve diyabet gibi kardiyovasküler risk faktörleriyle ilişkilidir. Endotel hücre membranındaki eNOS enzimi tarafından L-arginin kullanılarak üretilen NO, ateroskleroz patogenezi engelleyen önemli bir etkidir. eNOS enzim aktivitesi birçok basamakta düzenlenir; transkripsiyonel olarak, substrat varlığıyla, kalsiyum, kalmodulin, FAD, FMN, NADPH ve BH4 gibi enzim kofaktörleri ile, hsp90 ve caveolinler gibi proteinlerle etkileşimiyle düzenlenir (4).

Çeşitli çalışmalarda eNOS geninin endotel disfonksiyon ve ateroskleroz patogenezi etkisini araştırmak için bütün olarak eNOS geni çıkarılmış fareler üzerinde araştırmalar yapılmıştır. eNOS geninin yokluğu farelerde EDRF (Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör)

aktivitesi eksikliğine ve hipertansiyona (81), platelet agregasyonunda artışa (82) lökosit – endotel adezyonuna (83) vasküler düz kas hücre proliferasyonunda artışa (84) tromboz eğiliminde artışa (83) felç (85,86) ve ateroskleroz (87) eğiliminde artışa yol açtığı gösterilmiştir.

Cav-1 eksikliği oluşturulan fareler üzerinde yapılan çalışmalarda Cav-1 ve eNOS arasındaki etkileşimin yarattığı inhibisyonun ortadan kalkmasıyla eNOS aktivitesinin arttırdığı gösterilmiştir (88,89,90).

Bu bilgilerden yola çıkarak tez projemizde, Türk toplumunda koroner kalp hastaları ve sağlıklı kontrollerde eNOS rs1799983 ve CAV-1 rs3840634,rs3807990 varyantlarının dağılımını belirleyerek sözkonusu varyantların koroner kalp hastalığı riskine olan etkisini belirlemeye çalıştık.

Yaptığımız çalışmada yaş ortalaması ve cinsiyet bakımından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Benzer şekilde trigliserid, VLDL-kolesterol (VLDL-K), vücut kitle indeksi (VKİ) ve aile koroner arter hastalığı hikayesi bakımından da anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Yapılan analizlerin sonunda hipertansif hasta oranı % 43.4, tip 2 diyabetik hasta oranı % 43.4 ve sol ventrikül hipertrofisi bulunan hastaların oranı % 39.6 olarak tespit edilmiştir.

Parra ve ark. (1992) yaptıkları ECTIM (Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde) çalışmasında, Kuzey İrlanda ve Fransa'dan olmak üzere 498 miyokard infarktüsü vakası ve 642 koroner kalp hastası olmayan erkek bireyleri incelemiştir. Her iki populasyonda da hasta ve kontrol grupları arasında yaş, vücut kitle indeksi ve alkol tüketimi bakımından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. HDL-kolesterol ve sigara tüketimi değerleri ise hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel bir anlamlılık göstermektedir. Hem Kuzey İrlandalı hem de Fransız hastalarda HDL-kolesterol değerleri kontrollere göre düşükken, sigara tüketimi HDL değerlerinin aksine hastalarda yüksek tespit edilmiştir (91).

Yalçın ve ark. (2014) koroner arter ektazi hastası (aterosklerotik koroner arter hastalığının bir formu) ve sağlıklı kontrollerle yaptıkları çalışmada bizim bulgularımıza benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş, cinsiyet, VKİ ve aile koroner arter hastalığı hikayesi açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemişlerdir. Ayrıca diyabet hastalığı görülme sıklığını, alkol ve sigara kullanımını hasta ve kontrol gruplarında benzer oranda tespit etmişlerdir (92).

Bizim çalışmamızda ise Yalçın ve ark.nın çalışmasının aksine hasta ve kontrol grupları kıyaslandığında, sigara ve alkol kullanımında anlamlı bir farklılık tespit edildi. Hasta grubu kontrol grubuna göre daha fazla oranda sigara ve alkol tüketmektedir. Koroner kalp hastalarında sistolik ve diastolik kan basıncı düzeyleri ile total-kolesterol ve LDL-kolesterol değerleri kontrol grubuna kıyasla yüksek gözlenirken, HDL-K değeri düşük bulunmuştur.

Başka bir büyük çalışmada McQuenn ve ark.(2008) 52 ülkeden 9345 miyokard enfarktüs hastası ve 12120 sağlıklı bireyin plazma lipid ve kolesterol değerlerini sunmuşlardır. Hasta grubunda HDL-kolesterol değeri kontrol grubuna göre düşükken, total-kolesterol değeri yüksek gözlenmiştir (93).

Zee ve ark.(2006) da 570 miyokard enfarktüslü veya iskemik felçli erkekler ile 570 sağlıklı erkek bireylerden oluşan çalışmalarında kan basınç değerleri, hiperlipidemi, hipertansiyon ve diyabet görülme oranının hasta grubunda anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu belirlemişlerdir (94).

Hardy-Weinberg Eşitliği (HWE) açısından yapılan analizde CAV-1 rs3807990 polimorfizmi için kontrol grubundaki genotip dağılımı uyumluyken hasta grubu HWE'ye uyum göstermemiştir ($p < 0.05$). Eğer kontrol grubu HWE ile uyumlu iken hasta grubunun genotip dağılımı HWE'den sapma gösteriyorsa, bu söz konusu hastalıkla genetik varyasyonun ilişkisi için destek sağlayabilir. Bu durum CAV-1 geninde araştırdığımız rs3807990 polimorfizminin KKH riski açısından anlamlı veriler sunacağını gösterir. NOS3 genindeki

rs1799983 varyasyonunun hem kontrol hemde KKH hasta gruplarındaki genotip dağılımları HWE'ye uyumlu bulunmadı ($p < 0.05$). Hasta grubu için istenen bu durum kontrol grubu açısından istenmeyen bir veridir. Bu durumun örnek sayısının arttırılması ile aşılacağı kanaatindeyiz. CAV-1 geninde araştırdığımız diğer bir polimorfizm olan rs3840634 varyasyonu ise hem kontrol hem de hasta grubunda heterozigot ve homozigot nadir genotip göstermediğinden HWE uyum analizi yapılamadı.

Yaptığımız analizler sonunda NOS3 rs1799983 varyantının serum lipid profili, kan basınçları gibi çeşitli değerleri incelendiğinde; hem kontrol grubunda hem de hasta grubunda farklı genotipe sahip bireyler arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık tespit edilmedi. Sadece kontrol grubunda TT genotipli bireylerin vücut kitle endeksi GT ve GG genotipli ve G alleli taşıyan bireylere göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Sonuç olarak çalışmamızda NOS3 rs1799983 varyantının ne KKH ne de onun risk faktörlerine yol açtığını belirledik.

Tablo 5.1'de çeşitli populasyonlarda eNOS polimorfizmlerinin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilerinin incelendiği çalışmalar yer almıştır. Bu araştırmaların bazılarında NOS3 rs1799983 varyantının kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu sonucu çıkarken, diğerlerinde herhangi bir risk oluşturmadığı gösterilmiştir. Türkiye populasyonunda yapılan çalışmaların çoğunda NOS3 rs1799983 polimorfizmi çeşitli kardiyovasküler hastalıklar için risk oluşturmazken; Yalçın ve ark.'nın çalışmasında koroner arter ektazisine neden olduğu tespit edilmiştir. Luo ve ark.yaptıkları meta-analizde, aynı varyantın Asya populasyonunda miyokard enfarktüs için risk faktörü olduğunu belirlerken; Andrikopoulos ve ark. Yunanistan populasyonu için tam tersi sonuçları göstermişlerdir. Tablo 5'te yer almayan Casas ve ark.(2004) 26 çalışma ve toplamda 23028 kişiyi inceledikleri meta-analiz çalışmalarında, eNOS geninin Asp298 ve intron-4a homozigot genotiplerini birlikte taşıyan bireylerde iskemik kalp hastalığı riskinin yüksek olabileceğini ileri sürmüşlerdir (95). Sonuç olarak

yapılan çalışmaların birbirinden farklı bulguları, populasyonlar arasındaki etnik farklılıklardan ve G894T polimorfizminin diğer polimorfizmlerle ilişkiden kaynaklanıyor olabilir. Ek olarak eNOS enzim aktivitesini belirleyen diğer etkenler, populasyonlar arasında farklılık gösterebileceğinden, çalışmalardan farklı bulgular elde edilmesine neden olabilir.

Çalışmamızda CAV-1 rs3807990 varyantının dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılıklar tespit ettik. Genotip dağılımlarının kontrol grubunda HWE uyumlu iken, KKH hasta grubunda HWE uyumlu olmaması bu varyasyonun KKH riski açısından önemini desteklemektedir. Kontrol grubunda VKİ değerleri, CT genotipli bireylerde TT genotiplilere göre yüksek tespit edilmiş ($p=0,046$); normal C allelinin ise düşük diastolik kan basıncı ile ilişkili gözlenmiştir ($p=0,014$). Hasta grubunda ise CT genotiplilerde serum total-kolesterol ($p=0,008$) ve LDL-K değerleri ($p=0,054$) CC genotipli hastalara kıyasla yüksek tespit edilmiştir. Mutant T allelinin hasta grubundaki etkisini araştırmak için CC genotipli hastalarla çeşitli değerler açısından karşılaştırma yapılmış ve T allelinin koroner kalp hastalarında yüksek total kolesterol ($p=0,017$) ve LDL-K ($p=0,053$) değerleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Yapılan istatistiksel analizler, koroner kalp hastalarındaki yüksek total-kolesterol ve LDL-K değerlerinin mutant T allelinin katkısı olabileceğine işaret etmektedir.

Bizim çalışmamızda yüksek total-kolesterol ve LDL-K seviyeleri ile ilişkili bulunan CAV-1 rs3807990 mutant T allelini, Grilo ve ark.'nın 2006 yılında yaptıkları çalışmada yüksek sistolik kan basıncı ile ilişkili gösterilmiştir. Bu araştırmacılar serum lipid ve lipoprotein seviyeleri ile ilişki gösterememişlerdir (108).

Tablo 5-1:Çeşitli populasyonlarda eNOS polimorfizmlerinin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi

Yazar	Yıl	Toplum	Polimorfizm	Sonuç	HWE uyum
Yalçın ve ark.(92)	2014	Türkiye	G894T	Koroner arter ektazisi	
Çağlayan ve ark.(96)	2009	Türkiye	G894T	Yavaş koroner akımı riski yok	
Güldiken ve ark.(97)	2008	Türkiye	G894T	İskemic felç riski yok	P=0.09
Afrasyap ve ark.(98)	2004	Türkiye	G894T	Koroner arter hastalığı riski yok	P>0.05
Ragia ve ark.(99)	2010	Yunanistan	G894T T786C	Koroner arter hastalığı riski yok	P>0.05
Andrikopoulos ve ark.(100)	2008	Yunanistan	G894T	Akut miyokard enfarktüs riski yok	P>0.05
Luo ve ark.(101)	2014	Meta-analiz	G894T	Asya populasyonu için miyokard enfarktüsü riski var	P>0.05
Fedele ve ark.(102)	2013	Kafkasya orjinli	G894T	Koroner mikrovasküler disfonksiyon	P<0.05
Heltianu ve ark.(103)	2005	Romanya	G894T	Endotelial disfonksiyon	
Karvonen ve ark.(104)	2002	Finlandiya	G894T	Kardiyovasküler değişim riski yok	P>0.05
Hingorani ve ark.(105)	1999	Birleşik Krallık	G894T	Koroner arter hastalığı riski var	Chaos 1(KAH) kontrol P>0.05 Hasta P<0.05 Chaos 2 (MI) P>0.05
Lin ve ark.(106)	2008	Doğu Tayvan	G894T	Kardiyo vasküler hastalık	
Colombo ve ark.(107)	2003	İtalya	G894T , T786C	Koroner arter hastalığı	P>0.05

CAV1 rs3840634 varyasyonundaki AC delesyonunu, Grilo ve ark.(2006) yukarıda bahsedilen çalışmalarında sistolik ve diasistolik kan basıncı ve bazal gliseminin düşük

değerlerinden sorumlu tutmuşlardır (108). Bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda gözlenmediği için istatistiksel herhangi bir değerlendirme yapılamamaktadır.

Tez projemizde NOS3 ve CAV-1 genlerindeki polimorfizmlerin kombine etkilerini belirlemek amacıyla yaptığımız analizlerde anlamlı bulgular elde ettik. KKH hasta grubunda CAV-1 rs3807990 nadir T allel ve NOS3 rs1799983 nadir T allelini birlikte taşıyan alt grupta HDL-kolesterol değeri CAV-1 rs3807990 normal CC/ NOS3 rs1799983 normal GG genotipi taşıyan alt gruba göre yüksek bulunmuştur ($1,12 \pm 0,12$ vs. $1,01 \pm 0,22$, $p=0,013$). Benzer analizler kontrol grubu içinde yapıldı. Ancak kontrol grubunda herhangi anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p>0,05$).

Serum total-kolesterol eşik değeri olarak 5.18 mmol/l'yi alarak KKH hasta grubunda CAV-1 rs3807990 mutant T allelinin hastalarda hiperkolesterol ile ilişkili olduğunu belirledik ($p=0,008$). Koroner kalp hastalığında hiperkolesterol gelişiminde risk faktörü olarak çalışmamızda gözlenen risk parametrelerinin (CAV1 rs3807990 T alleli, cinsiyet, tip 2 diyabet varlığı ve sigara kullanımı) etkilerini logistik regresyon analizinde değerlendirdiğimizde; CAV1 rs3807990 varyasyonunun koroner kalp hastaları için hiperkolesterol gelişiminde risk oluşturduğu gösterilmiştir.

Razani ve ark. Cav-1^{-/-} farelerle normal genotipli fareleri karşılaştırdıkları çalışmalarında plazma trigliserid seviyesinin Cav-1^{-/-} farelerde yüksek olduğunu belirlemişlerdir (109). Frank ve ark. (2004) çalışmalarında Cav-1^{-/-} / ApoE^{-/-} farelerde plazma LDL-kolesterol seviyesinin Cav-1^{+/+} / ApoE^{-/-} farelere göre iki kat arttığını göstermişlerdir (110). Frank ve ark. (2006)'nın Cav-1 ve hücrel kolesterol homeostazı arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmanın sonunda Cav-1 molekülünün HDL ve Apolipoprotein A-I aracılıklı kolesterol akışında minimal bir etkisinin olduğunu göstermişlerdir (111). Aynı çalışmada hücrel kolesterol homeostazı düzenlenmesinde ise Cav-1 molekülünün önemli bir etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir. Smart ve ark. benzer şekilde Cav-1 molekülünün hücre içi kolesterol

taşıyıcısı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (64). Bu araştırmaların bulguları Kaveolin-1'in serum lipid/lipoprotein düzeyleri üzerinde etkili olabileceğini doğrulamaktadır. Bu bağlamda bizim çalışmamızda bu gendeki varyasyonlarla özellikle serum kolesterol düzeylerinin ilişkisini tespitimiz bu ilişkiyi destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, ateroskleroz patogeneğinde endotelial disfonksiyonun daha iyi anlaşılması, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için elzemdir. Bu bakımdan endotelial fonksiyon sürecinde yer alan NO üretimini, eNOS ve CAV-1 genlerindeki kritik varyasyonların KKH risk faktörleriyle ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla yaptığımız tez çalışmamızda, eNOS ve CAV-1 genlerine ait hedef SNP'leri inceledik. Nispeten düşük örnek grubuna karşın CAV-1 rs3807990 polimorfizminin KKH gelişiminde risk faktörü olarak kabul edilen hiperkolesterol üzerine etkili olduğunu gözlemledik. Bulgularımızın daha geniş ölçekte çalışma grubunda daha anlamlı ve somut veriler sunacağı ve ileride bu kapsamda yapılacak çalışmalara yol gösterici olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Foy D, Grant P, Genes and the development of vascular disease. *Postgrad Med J* 1996; **73 (859)**: 271-278.
2. Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Miana M, de las Heras N, Cachofeiro V, Luño J. Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem*. 2007;**14(2)**:243-8.
3. Tritto I, Ambrosio G. The multi-faceted behavior of nitric oxide in vascular “inflammation”: catchy terminology or true phenomenon? *Cardiovasc Res* 2004;**63**:1-4
4. Atochin DN, Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelia dysfunction. *Pflugers Arch*. 2010 ; **460**: 965–974.
5. Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem*. 1999 ;**274**:32512-32519.
6. Mathew R. Pulmonary hypertension and metabolic syndrome: Possible connection, PPAR γ and Caveolin-1. *World J Cardiol* 2014 August 26; **6(8)**: 692-705.
7. Puglielli L, Rigotti A, Greco AV, Santos MJ, and Nervi F. Sterol carrier protein-2 is involved in cholesterol transfer from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1995;**270**: 18723–18726.
8. Williams TM and Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome Biol* 2004; **5(3)**:214.
9. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> Erişim (9.12.2014)
10. Pasternak RC, Grundy SM, Levy D. Spectrum of Risk Factors for Coronary Heart Disease. *JACC* 1996;**27**:978-87.
11. Davies MJ. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation*. 1990 Sep; **82(3 Suppl)**: II38-46.

12. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992;**339**:883-7.
13. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1993;**92**:1004-8.
14. Zengin H. Ateroskleroz patogenezi. *J. Exp. Clin. Med.*, 2012; **29**:101-106.
15. Düzgün N, Atilla E. Aterosklerozis ve Sistemik Otoimmün İnflamatuvar Hastalıklar. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2008; **28** :508-512.
16. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000 Sep 14;**407(6801)**:233-41.
17. Stojanovich L. Autonomic dysfunction in autoimmune rheumatic disease. *Elsevier. Autoimmunity Reviews.* 2009; **8(7)**: 569–572.
18. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding sites on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1979;**76**:333–337.
19. Podrez EA, et al. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J. Clin. Invest* 2000;**105**:1095–1108.
20. Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000;**97**:7458–7463
21. Gerhard GT, Duell PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol* 1999;**10**:417–429.

22. Nathan L, Chaudhuri G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 1997;**37**:477–515.
23. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P, Picano E, Cortigiani L, Bevilacqua M, Milazzo L, Cusi D, Barlassina C, Sarzi-Puttini P, Turiel M. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2010 Oct;**9**(12):830-4.
24. Tritto I, Ambrosio G. The multi-faceted behavior of nitric oxide in vascular “inflammation”: catchy terminology or true phenomenon? *Cardiovasc Res* 2004;**63**:1–4.
25. Matsuura E, Hughes GR, Khamashta MA. Oxidation of LDL and its clinical implication. *Autoimmun Rev* 2008;**7**:558–66.
26. Atochin DN, Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction. *Pflugers Arch.* 2010 ; **460**(6): 965–974.
27. Bode-Boger SM, Boger RH, Kienke S, Junker W, Frolich JC. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;**219**:598–603.
28. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;**271**:1424–1437.
29. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;**268**:17478-17488.

30. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A Common Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu298Asp) Is a Major Risk Factor for Coronary Artery Disease in the UK. *Circulation*. 1999; **100**:1515-1520.
31. Chen PF, Tsai AL, Berka V, Wu K K. Endothelial Nitric-oxide Synthase Evidence for Bidomain Structure and Successful Reconstitution of Catalytic Activity from Two Separate Domains Generated by A Baculovirus Expression System. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**:14631–14635.
32. Venema RC, Sayegh HS, Kent JD, Harrison DG. Identification, Characterization and Comparison of the Calmodulin-binding Domains of the Endothelial and Inducible Nitric Oxide Synthases. *J. Biol. Chem.* 1996 ; **271**:6435–6440.
33. Ju H, Zou R, Venema VJ , Venema RC. Direct Interaction of Endothelial Nitric-oxide Synthase and Caveolin-1 Inhibits Synthase Activity. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**:18522-18525.
34. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; **280**:F193–F206.
35. Sessa WC. eNOS at a glance. *Journal of Cell Science.* 2004; **117**: 2427-2429.
36. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; **288(5789)**:373-6.
37. <http://www.scripps.edu/marletta/research/research2.html> Erişim 11.08.2014.
38. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, Ramani R, Janosko K, Mathier M, MacGowan GA, Murali S, Feldman AM, London B. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation.* 2003 Apr 1; **107(12)**:1598-602.

39. Atochin DN, Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelia dysfunction. *Pflugers Arch.* 2010 ; **460(6)**: 965–974.
40. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of Caveolae and Caveolins in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2004 ; **84**:1341-1379.
41. Mathew R. Pulmonary hypertension and metabolic syndrome: Possible connection, PPAR γ and Caveolin-1. *World J Cardiol* 2014 August 26; **6(8)**: 692-705.
42. Vasile E, Simionescu M, Simionescu N. Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. *J Cell Biol.* 1983; **96**:1677–1689.
43. Kim M-J, Dawes J, Jessup W. Transendothelial transport of modified low-density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 1994; **108**:5–17.
44. Parton RG, del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 ; **14**:98-112.
45. Parolini I, Sargiacomo M, Galbiati F, Rizzo G, Grignani F, Engelman JA, Okamoto T, Ikezu T, Scherer PE, Mora R, Rodriguez-Boulan E, Peschle C, Lisanti MP. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J Biol Chem.* 1999 ; **274**:25718-25725.
46. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem.* 1996 ; **271**:15160-15165.
47. Hardin CD, Valloje J. Caveolins in Vascular Smooth Muscle: Form Organizing Function. *Cardiovasc Res.* 2006; 69: 808–815).

48. Minetti C, Bado M, Broda P, et al. Impairment of Caveolae Formation and T-System Disorganization in Human Muscular Dystrophy with Caveolin-3 Deficiency. *Am J Pathol.* 2002; **160**: 265–270.
49. Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem.* 1999 ;**274**:32512-32519.
50. Grilo A, Fernandez ML, Beltrán M, Ramirez-Lorca R, González MA, Royo JL, Gutierrez-Tous R, Morón FJ, Couto C, Serrano-Rios M, Saez ME, Ruiz A, Real LM. Genetic analysis of CAV1 gene in hypertension and metabolic syndrome. *Thromb Haemost.* 2006;**95**:696-701.
51. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem.* 1997;**272**:6525-6533.
52. Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 1996 ;**271**:29182-29190.
53. Mathew R. Pulmonary hypertension and metabolic syndrome: Possible connection, PPAR γ and Caveolin-1. *World J Cardiol* 2014 August 26; **6(8)**: 692-705.
54. Gratton JP, Bernatchez P, Sessa Wc. Caveolae and Caveolins in the Cardiovascular System. *Circ Res.* 2004;**94**:1408-1417.
55. Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP: Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**: 1161–1168.

56. Hnasko R, Lisanti MP: The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol Interv* 2003; **3**: 445–464.
57. Sessa WC: Atheroprotection in the absence of ‘caves’: is it the fat, the vessels, or both? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* .2004; **24**: 4–6.
58. Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K: VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:10339-10343.
59. Li S, Song KS, Lisanti MP: Expression and characterization of recombinant caveolin: Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J Biol Chem* 1996, **271**:568-573.
60. Smart EJ, Anderson RG: Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae. *Methods Enzymol* 2002, **353**:131-139.
61. Hailstones D, Sleer LS, Parton RG, Stanley KK: Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J Lipid Res* 1998, **39**:369-79.
62. Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG: Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1999, **1**:98-105.
63. Bist A, Fielding PE, Fielding CJ. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low-density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, **94**:10693-10698.
64. Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG: A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 1996, **271**:29427-29435.

65. Puglielli L, Rigotti A, Greco AV, Santos MJ, and Nervi F. Sterol carrier protein-2 is involved in cholesterol transfer from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1995;**270**: 18723–18726.
66. Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1999 Mar;**103(6)**:897-905
67. Li H, Wallerath T, Münzel T, Förstermann U. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide Biol Chem.* 2002;**7**:149 –164.
68. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res.* 2000;**86**:347–354.
69. Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation* 2006;**113**:1708-1714.
70. Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, Wang XL. Genotype-Dependent Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and Its Regulatory Proteins in Cultured Endothelial . *DNA Cell Biol.* 2005 April ; **24(4)**: 218–224.
71. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* 1999 Jun 8;**99(22)**:2864-70.
72. Şener EF, Emiroğulları ÖN, Serhatlıoğlu F, Özkul Y. The role of endothelial nitric oxide synthase gene G894T and intron 4 VNTR polymorphisms in hemodialysis

- patients with vascular access thrombosis. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2014 May;**14(3)**:239-43.
73. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense glu298-to-asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 1998; **103**:65–69.
74. Granath B, Taylor RR, van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J Cardiovasc Risk.* 2001;**8(4)**:235-41.
75. Page C, Doubell AF. Mitogen-activated protein kinase (mapk) in cardiac tissue. *Mol Cell Biochem* 1996 ;**157**:49-57.
76. Frank PG, Lisanti MP: Caveolin-1 and caveolae in atherosclerosis: differential roles in fatty streak formation and neointimal hyperplasia. *Curr Opin Lipidol* 2004; **15**: 523–529.
77. Hassan GS, Jasmin JF, Schubert W, Frank PG, Lisanti MP: Caveolin-1 deficiency stimulates neointima formation during vascular injury. *Biochemistry* 2004; **43**: 8312–8321.
78. Teranishi M, Uchida Y, Nishio N, Kato K, Otake H, Yoshida T, Suzuki H, Sone M, Sugiura S, Ando F, Shimokata H, Nakashima T. Polymorphisms in genes involved in the free-radical process in patients with sudden sensorineural hearing loss and Ménière's disease. *Free Radic Res.* 2013 Jul;**47(6-7)**:498-506.

79. Onat A, Murat SN, Çiçek G, Ayhan E, Örnek E, Kaya H, Gümrükçüoğlu H.A, Doğan Y, Can G. Türkiye’de ölüm ve koroner hastalık insidansının bölgesel dağılımları: TEKHARF 2010 taraması sonuçları. *Türk Kardiyol. Dern. Arş.* 2011; **39**: 263-268.
80. Chilton RJ. Pathophysiology of Coronary Heart Disease: A Brief Review *JAOA* 2004; (Supplement 7);**104(9)**:S5-S8.
81. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995;377:239–242.
82. Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL, Loscalzo J. Deficient platelet derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res*1999;**84**:1416–1421.
83. Lefler DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 1999;**276**:H1943–H1950.
84. Huang PL. Lessons learned from nitric oxide synthase knockout animals. *Semin Perinatol* 2000;**24**:87–90.
85. Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;**16**:981–987.
86. Atochin DN, Wang A, Liu VW, Critchlow JD, Dantas AP, Looft-Wilson R, Murata T, Salomone S, Shin HK, Ayata C, Moskowitz MA, Michel T, Sessa WC, Huang PL. The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia in vivo. *J Clin Invest* 2007;**117**:1961–1967.

87. Kuhlencordt PJ, Rosel E, Gerszten RE, Morales-Ruiz M, Dombkowski D, Atkinson WJ, Han F, Preffer F, Rosenzweig A, Sessa WC, Gimbrone MA Jr, Ertl G, Huang PL. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;**286**:C1195–C1202.
88. Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., Schedl, A., Haller, H. & Kurzchalia, T.V. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001;**293**:2449–2452.
89. Razani, B., Engelman, J.A., Wang, X.B., Schubert, W., Zhang, X.L., Marks, C.B., Macaluso, F., Russell, R.G., Li, M., Pestell, R.G. et al. 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 2001;**276**, 38121–38138.
90. Zhao, Y.Y., Liu, Y., Stan, R.V., Fan, L., Gu, Y., Dalton, N., Chu, P.H., Peterson, K., Ross, J., Jr & Chien, K.R. 2002. Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**, 11375–11380.
91. Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, Cambou JP, Amouyel P, Bingham A, McMaster D, Schaffer P, Douste-Blazy P, Luc G. A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1992;**12**:701-707.
92. Arif Yalcin A, Faruk Akturk I, Celik O, Erturk M, Sabri Hancer V, Yalcin B, Isiksacan N, Uzun F, Ozbey Ozyilmaz S, Biyik I. Coronary artery ectasia is associated with the c.894G>T (Glu298Asp) polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Tohoku J Exp Med.* 2014;**232**(2):137-44.

93. McQueen MJ, Hawken S, Wang X, Ounpuu S, Sniderman A, Probstfield J, Steyn K, Sanderson JE, Hasani M, Volkova E, Kazmi K, Yusuf S; INTERHEART study investigators. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case-control study. *Lancet*. 2008;**19**;372(9634):224-33.
94. Zee RY, Diehl KA, Ridker PM. Complement factor H Y402H gene polymorphism, C-reactive protein, and risk of incident myocardial infarction, ischaemic stroke, and venous thromboembolism: A nested case-control study. *Atherosclerosis*. 2006 Aug;**187**(2):332-5.
95. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation*. 2004;**109**:1359-1365.
96. Caglayan AO, Kalay N, Saatci C, Yalcın A, Akalın H, Dundar M. Lack of association between the Glu298Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase and slow coronary flow in the Turkish population. *Can J Cardiol*. 2009 Mar;**25**(3):e69-72.
97. Guldiken B, Sipahi T, Guldiken S, Ustundag S, Budak M, Turgut N, Ozkan H. Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in Turkish patients with ischemic stroke. *Mol Biol Rep*. 2009 Jul;**36**(6):1539-43.
98. Afrasyap L, Ozturk G. NO level and endothelial NO synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in the patients with coronary artery disease from the Turkish population. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2004 Oct;**36**(10):661-6.
99. Ragia G, Nikolaidis E, Tavridou A, Arvanitidis KI, Kanoni S, Dedoussis GV, Bougioukas G, Manolopoulos VG. Endothelial nitric oxide synthase gene

- polymorphisms -786T > C and 894G > T in coronary artery bypass graft surgery patients. *Hum Genomics*. 2010 Aug;**4(6)**:375-83.
100. Andrikopoulos GK, Grammatopoulos DK, Tzeis SE, Zervou SI, Richter DJ, Zairis MN, Gialafos EJ, Sakellariou DC, Foussas SG, Manolis AS, Stefanadis CI, Toutouzas PK, Hillhouse EW; GEMIG study investigators. Association of the 894G>T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with risk of acute myocardial infarction. *BMC Med Genet*. 2008 May **21**:9:43.
101. Luo JQ, Wen JG, Zhou HH, Chen XP, Zhang W. Endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and myocardial infarction: a meta-analysis of 34 studies involving 21,068 subjects. *PLoS One*. 2014 Jan 30;**9(1)**:e87196.
102. Fedele F, Mancone M, Chilian WM, Severino P, Canali E, Logan S, De Marchis ML, Volterrani M, Palmirota R, Guadagni F. Role of genetic polymorphisms of ion channels in the pathophysiology of coronary microvascular dysfunction and ischemic heart disease. *Basic Res Cardiol*. 2013 Nov;**108(6)**:387.
103. Heltianu C, Costache G, Gafencu A, Diaconu M, Bodeanu M, Cristea C, Azibi K, Poenaru L, Simionescu M. Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. *J Cell Mol Med*. 2005 Jan-Mar;**9(1)**:135-42.
104. Karvonen J, Kauma H, Kervinen K, Rantala M, Ikäheimo M, Päivänsalo M, Savolainen MJ, Kesäniemi YA. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and blood pressure, left ventricular mass and carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort. *J Intern Med*. 2002 Feb;**251(2)**:102-10.
105. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of

- the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999 Oct 5;**100(14)**:1515-20.
106. Lin NT, Lee MJ, Lee RP, Hong AI, Chen HI. Analysis of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with cardiovascular diseases in eastern Taiwan. *Chin J Physiol*. 2008 Feb 29;**51(1)**:42-7.
107. Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Biagini A, Clerico A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem*. 2003 Mar;**49(3)**:389-95.
108. Grilo A, Fernandez ML, Beltrán M, Ramirez-Lorca R, González MA, Royo JL, Gutierrez-Tous R, Morón FJ, Couto C, Serrano-Rios M, Saez ME, Ruiz A, Real LM. Genetic analysis of CAV1 gene in hypertension and metabolic syndrome. *Thromb Haemost*. 2006 Apr;**95(4)**:696-701.
109. Razani B, Combs TP, Wang XB, Frank PG, Park DS, Russell RG, Li M, Tang B, Jelicks LA, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolin-1 deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hyper-triglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem*. 2001; **277**: 8635–8647.
110. Frank PG, Lee H, Park DS, Tandon NN, Scherer PE, Lisanti MP. Genetic Ablation of Caveolin-1 Confers Protection Against Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;**24**:98-105.
111. Frank PG, Cheung MW, Pavlides S, Llaverias G, Park DS, Lisanti MP. Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Aug;**291(2)**:H677-86.

HAM VERİLER

ETİK KURUL KARARI



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



Sayı : 745

Tarih : 21.06.2013

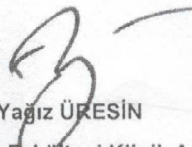
Konu : Prof. Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN hk,

Sayın Prof. Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN
DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı

İlgi :23/05/2013 tarihli yazınız.

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2011/1276-643 dosya numaralı ve kurulumuzun 27.07.2011 tarihli 10 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olan " Endotelial Nitrik Oksit Sentaz ve Kaveolin-1 Gen Varyasyonlarının Bireysel ve Kombine Etkilerinin Koroner Kalp Hastalığında İncelenmesi " başlıklı çalışmanın yürütücüsünün Serap İLİKAY olması ilgi yazınız ile istenmesi üzerine kurulumuzun 07/06/2013 gün ve 11 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


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

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	23/05/2013		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	<input type="checkbox"/>	Açıklama			
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>				
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:11	Tarih: 07/06/2013				
	İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Ana Bilim Dalında görevli Prof. Dr.Hülya YILMAZ AYDOĞAN'ın sorumluluğunda ve Serap İLİKAY 'ın yürüteceği yukarıda bilgileri veren araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *	Katılım **	İmza		
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Sevda ÖZEL	Biyoistatistik	İ.U. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda bulunma

Bu karar araştırma projesinin etik açıdan değerlendirme sonucunu bildirmektedir. Klinik ilaç araştırması projeleri için, etik kurulu onayı sonrasında, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin 5/a maddesi gereğince, Sağlık Bakanlığına da başvurulması ve gerekli izin alınması gerekmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Serap	Soyadı	İlikay
Doğ.Yeri	Elazığ	Doğ.Tarihi	18.02.1983
Uyruğu	TC	TC Kim.No	16645965406
Email	serapilikay@gmail.com	Tel.	5438293260

Eğitim Durumu

	Mezun Olduğu kurumun Adı	Mez.Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü DETAE Moleküler Tıp ABD.	
Lisans	B.Ü Fen-Edebiyat Fak.Moleküler Biyoloji ve Genetik	2011
Lise	Balakgazi Lisesi	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

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

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma *	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	Diğer Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
Ales Puanı	84.9	82.5	67.0
Diğer Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Sinema,yüzme,müzik