

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**“DİABETE BAĞLI KARDİOVASKÜLER
HASTALIKLARDA COX-2 ENZİMİ -765 G/C GEN
POLİMORFİZMİ, İNFLAMASYON MARKERLARI
DÜZEYİNİN İNCELENMESİ”**

KEVSER KUŞAT OL


**DANIŞMAN
PROF.DR.TURGAY İSBİR**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI/MOLEKÜLER TIP
PROGRAMI**

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI




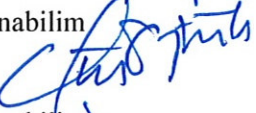
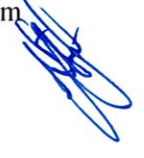
Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

18/08 2009

 Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
 Enstitü Müdürü (Yekil)

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : Moleküler Tıp
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
 Anabilim Dalı : Moleküler Tıp
 Tez Sahibi : Kevser Kuşat Ol
 Tez Başlığı : Diabete Bağlı Kardiyovasküler Hastalıklarda COX-2 Enzimi - 765 G/C Gen Polimorfizmi, İnflamasyon Markerları Düzeyinin İncelenmesi
 Sınav Yeri : İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı
 Sınav Tarihi : 13 / 08 / 2009

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

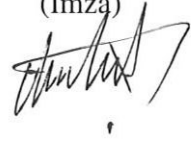
1. Prof. Dr. Turgay İSBİR (Danışman), İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı 
2. Prof. Dr. Ayşen YARAT, Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 
3. Doç. Dr. Bedia AĞAÇHAN, İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı 
4. Doç. Dr. Oğuz ÖZTÜRK, İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı 
5. Doç. Dr. Ümit ZEYBEK, İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla 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.

KEVSER KUŞAT OL

(İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak yapılmıştır. Yüksek lisans eğitimim süresince emeği geçen ve tez hazırlama süresi boyunca gerek hasta örneklerimin toplanmasında gerekse deneysel çalışmalarımın yapılmasında her türlü imkanı sağlayan, desteğini ve ilgisini esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Müdürü , Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Turgay İsbir'e, Tezim için gerekli hasta örneklerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Marmara Üniversitesi Kalp Damar Cerrahisi Bölümü öğretim üyesi sayın Doç.Dr. Selim İsbir'e ve Uzm.Dr. Olcay İsbir'e Yüksek lisansım süresince yardımlarından ve desteklerinden ötürü başta sayın Doç.Dr.Bedia Ağaçhan, Doç.Dr.İlhan Yaylım Eraltan,Doç.Dr.Oğuz Öztürk, Doç.Dr.Hülya Yılmaz, Doç.Dr.Arzu Ergen, Doç.Dr.Ümit Zeybek'e, Yüksek lisansım süresince beni her aşamada destekleyen ve güç veren ve sonsuz sevgileriyle hep yanımda olan sevgili kızım Melis Ol'a, eşim Dr.Murat Ol'a, Tez çalışmam esnasında yardım ve katkılarını esirgemeyen kardeşim Canser Kuşat Lanpir , manevi olarak hep yanımda olan annem ,babam,ve kardeşim Gülser Seyhan'a tesekkür ederim.

Deneylerimin yapılması esnasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen dönem arkadaşlarım Burak Esen, Gökhan Bağcı, Şeyma Sözen ve tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğrencilerine ayrıca teşekkürlerimi ifade etmek isterim

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2737

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. .DİABET VE VASKÜLER SİSTEM	4
2.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus.....	5
2.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus.....	6
2.1.3. Sekonder Diabet.....	9
2.1.4. Gestasyonel diabet:	9
2.2. COX ENZİMİ	12
2.2.1. Araşidonik asit metabolitleri:.....	12
2.2.2. Prostaglandinler:	14
2.2.3. Siklooksijenaz yolu:.....	15
2.2.4. COX stereokimyası:.....	17
2.2.5. Cox Gen Düzeyi :.....	18
2.2.6. COX Ekspresyonu.....	19
2.3. COX -2 DİABET KORONER ARTER HASTALIĞI ARASI İLİŞKİ.....	19
2.4. İNFLAMASYON MARKERLARI	21
2.5. COX-2 VE IL-6 İLİŞKİSİ	22
2.6. COX-2 POLİMORFİZMİ.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1.1. Serumda IL-6 Düzeylerinin Tayini	30

3.1.2. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler	32
4. BULGULAR.....	33
<i>KONTROL</i>	33
<i>KAH HASTA</i>	33
5. TARTIŞMA.....	43
KAYNAKLAR	52
FORMLAR	63
ETİK KURUL KARARI	64
ÖZGEÇMİŞ	65

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4-1. <i>ÇALIŞMA GRUPLARINA AİT BİLGİLER</i>	33
Tablo 4-2 <i>ÇALIŞMA GRUPLARINA AİT -765G-C COX-2 GENOTİP FREKANSLARI</i>	35
<i>Tablo 4-3: IL-6 TAŞIMA AÇISINDAN ÇALIŞMA GRUPLARININ İNCELENMESİ</i>	37
<i>Tablo 4-4. -765 G-C COX-2 G ALLELİ TAŞIMA AÇISINDAN ÇALIŞMA GRUPLARININ İNCELENMESİ</i>	39
Tablo 4-5: Hasta ve kontrol Grubunda -765 G-C COX-2 Genotiplerine Göre IL 6 Düzeyleri.....	40
Tablo 5-1: -765 G-C Gen Polimorfizmi Yapılan Çalışmalar	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1:Tip 1 (insüline bağımlı) DM neden olan β hücre harabiyetinin olası mekanizmaları(56).....	6
Şekil 2-2:Tip 2 DM ‘un patogenezi(56)	7
Şekil 2-3:Yağ hücrelerinin insülin direnci düzenlenmesindeki rolü	9
Şekil 2-4: Araşidonik asit metabolitlerinin oluşumu ve inflamasyondaki etkileri.COX-1 ve COX-2 , SİKLOOKSİJENAZ 1 ve 2 ; HETE, hidroksieikozatetranoik asit; HPETE, hidroperoksieikotetranoik asit (56).....	13
Şekil 2-5:Araşidonik asit metabolitleri(119)	14
Şekil 2-6: COX-2 inhibitörlerinin kardiyovasküler etkileri. Kardiyovasküler homeostazisin sağlanmasında endotelial hücrelerde üretilen prostasiklin ve trombositler de üretilen tromboksan A2 arasındaki dinamik denge gösterilmektedir(120).....	16
Şekil 2-7: Cox-1 ve Cox-2 siklooksijenaz izoformlarının protein yapılarının karşılaştırılması.....	18
Şekil 2-8: Cox-1 ve Cox-2 enzimleri dimerik yapısı ve membranlar arası ilişkisi(120)	19
Şekil 2-9: Kardiyovasküler sistemde COX izoenzimlerinin rolü.ACE:Anjiotensin dönüştürücü enzim; ADP:Adenozindifosfat; aPC:aktive protein C; BK:Bradikinin; eNOS:endotel kaynaklı NO; TM:Trombomodülin(106)	21
Şekil 2-10: Köpük hücre regülasyonunda rol alan inflamatuvar ve kolesterol homeostazisini düzenleyen genler (121).....	22
Şekil 4-1: Hasta ve kontrol grubunda IL-6 düzeyleri dağılımı	34
Şekil 4-2: Çalışma gruplarında CC genotip frekans dağılımı.....	36
Şekil 4-3: Çalışma gruplarında GG genotip frekans dağılımı	37
Şekil 4-4: Çalışma gruplarında -765 G-C COX-2 C alleli frekans dağılımları.....	38
Şekil 4-5: Çalışma gruplarında -765 G-C COX-2 G alleli frekans dağılımları	39
Şekil 4-6: (DM- ve DM+ KAH) genotiplere bağlı il-6 düzeyleri.....	41
Şekil 4-7. -765 G-C COX-2 gen polimorfizmine ait bir örnek.	42

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- DM: Diabetes Mellitus
3'UTR: 3' kodlanmayan bölge
IRS-1: İnsülin Resetör Substrat 1
GDM: Gestasyonel Diabetes Mellitus
TXA₂: Tromboksan A₂
IL-6: İnterlökin- 6
TNF α : Tümör Nekroz Faktör α
CSF: Koloni Stimüle Edici Faktör
IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü
FGF: Fibroblast büyüme faktörü
PGI₂: Prostaglandin
PAF: Trombosit aktive edici faktör
KAH: Koroner Arter Hastalığı
AA:Araşidonik Asit
COX: Siklooksijenaz
NSAİİ: Nonsteroid anti inflamatuvar ilaç
MMP: Matriks Metalloproteinaz
SNP: Tek nükleotit polimorfizmi
PG: Prostaglandin
NFkB: Nükleer faktör kappa B
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÖZET

Kuşat Ol K. Diabete bağlı kardiyovasküler hastalıklarda Cox-2 enzimi -765 G/C gen polimorfizmi, inflamasyon markerları düzeyinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2009.

Koroner arter hastalığı (KAH) batı toplumlarında mortalite ve morbiditenin başında yer alan genetik ve çevresel faktörlerin neden olduğu kompleks bir hastalıktır .

Çalışmamızda -765 Cox-2 polimorfizmi ve inflamasyon markerı olarak serumda interlökin-6 (IL-6) düzeyi diabete bağlı kardiyovasküler hastalıklardaki riski incelenerek üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Hasta grubunu diabetes varlığına ve yokluğuna göre ikiye ayırarak inceledik. Çalışma gruplarına ait -765 G-C Cox-2 genotip frekansları; CC (Kontrol 9 (%11,3), DM- KAH 6 (%8,5), DM+KAH 2 (%4,3)), GG (Kontrol 27 (%33,8), DM- KAH 30 (%42,3), DM+KAH 18(%38,3)), GC (Kontrol 44(%55,0), DM- KAH 35 (%49,3), DM+KAH 27 (%57,4)). Diabeti olmayan koroner arter hasta (DM- KAH) grubunda IL-6 düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olarak bulunmuştur. (p:0,020). Ancak DM+ hasta grubunda IL-6 düzeyleri kontrol grubundan yüksek fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir (p:0,059). İnterlökin 6 düzeyleri hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (p:0.011) GG genotip frekansının kontrolde en düşük KAH larında ise en yüksek frekansta tespit edilmesi bu genotipin hastalık için risk faktörü teşkil ettiğini kanıtlamaktadır (P:0,30 X²:1,06 OR:1,36 %95 CI:0,75-2,46).

Çalışma gruplarında -765 G-C Cox-2 genotiplerine göre IL-6 düzeyleri incelendiğinde kontrol grubunda GG genotipli bireylerde en yüksek il- 6 düzeyi tespit edilirken CC genotipli bireylerde en düşük düzey saptanmış ancak istatistiksel anlamlılık elde edilmemiştir (p>0.05 One way ANOVA). Bu grupta İL-6 düzeyleri GG>GC>CC şeklinde tespit edilmiştir.DM+ KAH grubunda genotiple arası il -6 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır (p>0.05)

Sonuçta Cox 2 varyantlarının ve IL-6 düzeyleri diabetik ve non diabetik kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olabileceği saptanmıştır. Çalışmamızda C alleleline göre G allelinin kardiyovasküler hastalık gelişiminde daha önemli olduğunu tespit ettik.

Anahtar Kelimeler: Cox-2, Gen polimorfizmi , Koroner arter hastalığı, IL-6, Diabet
Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2737

ABSTRACT

Kusat Ol K. The investigation of polymorphism -765 G-C Cox-2 and inflammation marker levels in patients with diabetes dependent cardiovascular disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine Thesis. İstanbul. 2009.

Coronary artery disease which is caused by the interaction of multiple genetic and environmental risk factors, is a complex disease and a major cause of morbidity and mortality in Western population.

In this study; investigation of the effects of IL-6 level as -765 G-C Cox-2 polymorphism and inflammation markers in patients with diabetes dependent CAD is aimed.

We separated the patients into 2 different groups; diabetic and non-diabetic. Study groups of -765 G-C Cox-2 genotype frequencies; CC (Control 9 (%11,3), DM- CAD 6 (%8,5), DM+CAD 2 (%4,3)), GG (Control 27 (%33,8), DM- CAD 30 (%42,3), DM+CAD 18(%38,3)), GC (Control 44(%55,0), DM- CAD 35 (%49,3), DM+CAD 27 (%57,4)). IL-6 levels of the nondiabetic groups were determined dramatically higher than healthy group. The result is statistically significant (p:0.020).Also IL-6 levels of the diabetic groups were determined higher than healthy group but the result was not statistically significant(p:0.059) Interleukin 6 levels of patient group was statistically significant (p:0.011).

In this study, G allele was found as a dependent risk factor. The -765 G/C GG allele frequency is statistically higher in patient groups when compared with control group (p:0.030).

-765 G-C Cox-2 GG genotype and IL-6 levels frequency is lower in the control group when compared with diabetic patient group (p>0.05) whose IL-6 levels determine GG>GC>CC.

These results shows that in non-diabetic patients and diabetic patients there is association between -765 G-C Cox-2 polymorphism and IL-6 levels the development of coronary artery disease. So, G allele has much more importance in the development of cardiovascular disease than C allele.

Key words : Cox-2, ,Gene Polymorphism, Coronary Artery Disease,IL-6,Diabetes

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Batı toplumlarında Tip 2 Diabet pandemik oranlarda artışa neden olarak morbidite ve mortalite ile sonuçlanmaktadır (1,2). Tip 2 diabet; kardiyovasküler risk faktörleri olan hipertansiyon, obezite, artmış plazminojen aktivatör inhibitörü, fibrinojen, dislipidemi, serumda trigliserit seviyesi artması, düşük HDL kolesterol ile ilişkilidir (3,4)).

Diabetin vasküler sistem üzerinde ağır etkileri vardır. Genel popülasyona göre Tip 2 diabetli kişilerde koroner arter riski iki ile dört kat daha fazladır. Daha şiddetli ve daha erken yaşta olması dışında, diabetiklerde görülen aterosklerozun diabetik olmayan hastalarda görülenlerden farkı yoktur. Koroner arterlerin aterosklerozu nedeniyle meydana gelen miyokard infarktüsü, diabetiklerde en sık ölüm nedenidir.(21,22)

Ateroskleroz endotel hasarına karşı damar duvarının geliştirdiği kronik iltihabi bir yanıttır. Diabetik kardiyovasküler komplikasyonlar, ateroskleroz ve aterom plaklarının oluşmasında endotel zedelenmesi temel rol oynar.Bazı sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin de plak gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir. Bunlar arasında interferon y (IFN y), interlökinler 1, 2 ve 6 (IL-1,IL-2; IL-6), TNF, CSF, IGF-1 ve IGF-2, FGF gibi birçok aktif molekül bulunur. (98).

Normal endotel prostasiklin (PGI₂) etkisiyle cAMP salgıladığından trombositlerin endotele yapışması agregasyonu ve düz kas hücre proliferasyonu engellenir. Oysa okside ve perokside lipidlerin etkisiyle endotelde PGI₂ sentezinde oluşan defekt, TXA₂ ve platelet aktive-edici faktör (PAF) aracılığı ile bu bölgede trombosit birikimini ve düz kas hücre proliferasyonunu baslatır. (97)

Siklooksijenaz (Cox) enziminin 3 izoformu bilinmektedir. Cox-1 normal şartlar altında çoğu dokuda eksprese edilir. Cox-2 ekspresyonu ilk olarak growth faktör , mitojen, sitokinler tarafından inflamatuvar stimülasyona cevapta indüklenir. Cox-3 Cox-1 den türemiş bir izoenzimdir. Fonksiyonu hala tam olarak bilinmemektedir(55).

Cox oldukça etkileyici bir şekilde metabolik transformasyonu katalizlediğinden önemli derecede farmakolojik açıdan hedef olmuştur (44). Vane 1971'de prostaglandin oluşumunu inhibe eden non steroid antiinflamatuvar ilaç (NSAİİ)'ler tayin etmiş ve *invivo* antiinflamasyon aktiviteleri ile *invitro* ortamda inhibitör ilişkilerini doğrulamıştır. Bunun yanı sıra NSAİİ'lerin yararlı aktiviteleri, aynı zamanda gastrointestinal toksisite ve koagulyasyonda etkileri belirlenmiştir. Prostaglandin ve ilişkili moleküller (trombosan vb...) fizyolojik ve patofizyolojik cevaplarda belirgin

şekilde ilişkilidir. Cox-2 geninin keşfiyle Cox-1 enziminden farklı protein ürünü olması nedeniyle; Cox-2 NSAİİ'lerle izoform selektif inhibitörler ayrılmıştır (45-48). Bu hipotez sonucu Cox-2 inhibitörlerinin anti inflamasyon ve analjezik olduğu gastrik toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (49-50).

Cox-1 doku homeostazisine katılan ve oldukça yaygın eksprese edilen bir enzimdir. Aksine Cox-2 indüklenebilir izoformdur ve çoğu dokuda düşük seviyelerde eksprese edilir ve lipopolisakkaritler (LPS) tarafından stimüle edilir. Growth faktör ve TNF alfa , IL-6 gibi sitokinler (66,67) inflamasyon olaylarında rol oynar. Bu yönü itibariyle ateroskleroz , romatoid hastalıklar ve karsinojenezde rol alır (68,69). Cox 1 ve Cox 2 koagülasyon , renal fonksiyon ve gastrointestinal sistem gibi fizyolojik olaylarda, inflamasyon, artrit gibi patofizyolojik olaylarda rol alır. Cox-2 ekspresyonu çoğu dokuda düşüktür, fakat sitokin, growth faktör, tümör promotörlerinin de dahil olduğu çeşitli mediatörler tarafından indüklenmektedir. Cox-2 aktivitesi SSS ve inflamasyon hücrelerindeki prostaglandin (PG) sentezinden öncelikle sorumludur. Inf lamasyon, artrit, ağrının da dahil olduğu patofizyolojik cevapları içerir (70).

Prostaglandin ekspresyonu ve aktivitesi kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda etkilidir.

Kardiyovasküler hastalıkların ve inflamasyon gelişiminde prostaglandinler rol almaktadır. Bilindiği gibi prostaglandinler, Prostaglandin endoperoksit H sentaz diğer adıyla siklooksijenaz tarafından üretilirler. Cox-2 tarafından üretilen PGE seviyesi, subklinik ateroskleroz, matriks metalloproteinazların (MMP) salınımı, plak yırtılması, kardiyovasküler hastalıklarda artmaktadır. Koroner arter hastalığı patogenezinde inflamasyon aterom oluşumunda önemli rol oynar (103-105).

İnsandaki aterosklerotik lezyonlarda Cox-2 ekspresyonunda belirgin şekilde artış olduğu gösterilmiştir ve Cox-2 sonucu oluşan PGE2 aterosklerozda artmıştır (73-75). Cox-2 nin indüksiyon oranına bağımlı olarak yararlı ve zararlı etkileri bulunmaktadır, patofizyolojik olaylar ve spesifik hücrelerde PGH2 metabolize edilerek sitoprotektif veya proinflamatuvar olarak kullanılmaktadır (77).

Cox-2 seviyesi aterosklerozun da dahil olduğu kronik inflamatuvar hastalıklarda artmaktadır. Cox -2 ekspresyonu endotel ,düz kas,monositler ve insandaki aterosklerotik lezyonlardaki makrofajlarda saptanmıştır (88,89). Cox-2 enzimi yoluyla bir çok prostaglandin üretilmektedir. Örneğin bir prostaglandin olan tromboksan, uyarılarak; vazokonstriksiyon , trombosit agregasyonu ve lökosit – endotel hücre adhezyonu gibi

etkiler aracılığıyla ateroskleroz ve tromboz oluşumuna katkı sağlamaktadır (90,91). Vazodilatasyon, trombosit agregasyonu inhibisyonu, lökosit aktivasyonunda rol oynayan prostasiklin, başlıca endotel hücrelerinde üretilir (92).

Cox-2 diabete bağlı koroner arter hastalıkları, romatoid hastalıklar , karsinogenez dahil olmak üzere inflamasyon olaylarında rol oynayan TNF α ve IL -6 gibi sitokinler, growth faktörler, LPS tarafından uyarılır. Aterosklerozdaki Cox-2 nin direkt rolü, aterosklerotik lezyonlardaki çalışmalarda gösterilmiştir ve subklinik aterosklerozda arttığı tespit edilmiştir. Oysa son çalışmalarda bu enzimin kardiyomiyositlerle ilgili oksidatif strese koruyucu fonksiyonu olduğu işaret edilmektedir (93).

Biz bu çalışma ile Cox 2 polimorfizmi ve inflamasyon markerları olarak ELISA yöntemiyle IL-6 düzeyi çalışarak diabete bağlı kardiyovaskuler hastalıkardaki etkisini Türk toplumunda araştırmayı amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

Tip 2 Diabet; batı toplumlarında pandemik oranlarda artışa neden olarak morbidite ve mortalite ile sonuçlanmaktadır (1,2). Tip 2 diabet; kardiyovasküler risk faktörleri olan, hipertansiyon, obezite, artmış plazminojen aktivatör inhibitörü, fibrinojen, dislipidemi , serumda trigliserit seviyesi artması ve düşük HDL kolesterol ile ilişkilidir (3,4)).

Diabetin vasküler sistem üzerinde ağır etkileri vardır. Genel popülasyona göre Tip 2 diabetli kişilerde koroner arter riski iki ile dört kat daha fazladır. Aorttan en küçük arterlere ve kapillerlere kadar her boyuttan damar etkilenir. Aortta ve büyük, orta büyüklükteki arterlerde hızlı şiddetli ateroskleroz görülür. Daha şiddetli ve daha erken yaşta olması dışında, diabetiklerde görülen aterosklerozun diabetik olmayan hastalarda görülenlerden farkı yoktur. Koroner arterlerin aterosklerozu nedeniyle meydana gelen miyokard infarktüs, diabetiklerde en sık ölüm nedenidir(21,22). Bu hem diabetik kadınlarda hem de diyabetik erkeklerde sık görülen bir komplikasyondur. Büyük renal arterlerde ağır aterosklerozun görüldüğü damarlardandır, fakat diabetin böbrekler üzerindeki en hasar verici etkileri glomerüller ve mikrodolaşım seviyesindedir. Hipertansiyon ile ilişkili olan hyalen ateroskleroz diabetiklerde hem daha yaygın hem de daha şiddetli olarak görülür ve bazen bu lezyona hipertansiyonu olmayan yaşlı diabetik olmayan hastalarda da rastlanabilir. Arteriollerin duvarlarında, lümenin daralmasına yol açan amorf hyalen bir kalınlaşma mevcuttur. Diabetiklerde, bu lezyon sadece hastalığın süresi ile değil, aynı zamanda kan basıncı seviyesi ile de ilişkilidir. Damarsal değişikliklerin nedeni ve doğası henüz tam olarak açıklanamamıştır (56).

2.1. .DİABET VE VASKÜLER SİSTEM

DM; karbohidrat , yağ ve protein metabolizmasının kronik bir hastalığıdır. Hatalı karbohidrat kullanımına yol açan, defektif ya da eksik insülin salgısı, DM in karakteristik özelliğidir. Bu durum hiperglisemi ile sonuçlanır.

DIABETES MELLİTUSUN SINIFLANDIRMASI

1. Tip 1 diabet
 - a. İmmün aracıklı (tip 1A)
 - b. İdiopatik
2. Tip 2 diabet
3. Diabetin diğer spesifik tipleri
 - a. Beta hücrelerinde aşağıdaki mutasyonlarla karakterli genetik defektler

- i. Hepatosit nükleer transkripsiyon faktörü (HNF) 4 α -kromozom 20 (MODY 1)
 - ii. Glukokinaz- Kromozom (7) (MODY2)
 - iii. Hepatosit nükleer transkripsiyon faktörü (HNF) 1 α - Kromozom 12 (MODY3)
 - iv. Mitokondriyal DNA
 - v. Diğerleri
- b. İnsülin etkisinde genetik defektler (örneğin tip A insülin direnci)
 - c. Ekzokrin pankreas hastalıkları: pankreatit, pankrerektomi, neoplazi, kistik fibrosiz, hemokritosiz
 - d. Endokrinopatiler: Cushing sendromu, akromeli, feokromasitoma, hipertiroidizm, glukagonoma, somatostatinoma
 - e. İlaçlar veya kimyasallar: glukokortikoidler, tiazidler, nikotinik asitler ve diğerleri
 - f. Enfeksiyonlar: konjenital kızamıkçık, sitomegalovirüs, koksakivirüs ve diğerleri
 - g. İmmün aracılıklı diyabetin sık olmayan formları: “Stiff man” sendromu, anti insülin reseptör antiadileri
 - h. Diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar: Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu ve diğerleri
4. Gestasyonel diyabet mellitus (96)

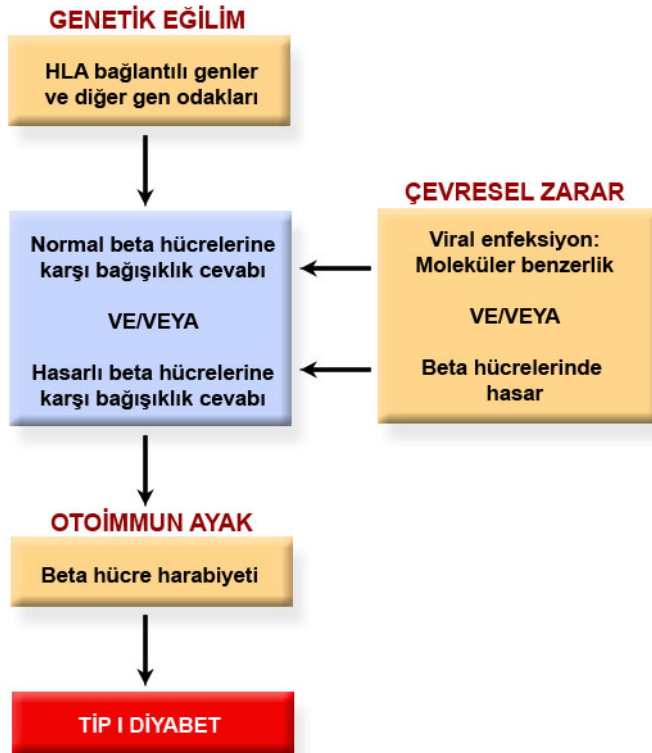
2.1.1. Tip 1 Diyabet Mellitus

İmmün Kaynaklı Diyabet: Pankreas beta hücrelerinin selüler kaynaklı otoimmün yıkımı sonucunda gelişir (5). İmmün hasarın belirleyicileri adacık hücre antikoları, insülin otoantikoları, glutamat dekarboksilaz otoantikoları, tirozin fosfataz IA-2 ve IA-2 Beta otoantikolarıdır (6,7). Bu otoantikoların bir veya birkaçı, açlık hiperglisemisi ilk olarak saptandığında %85-90 hastada mevcuttur. Hastalığın DQA ve DQB genleri ile bağlantılı HLA ilişkilidir. Bu HLA-DR/DQ alelleri hastalığı tetikleyebilmekte veya koruyucu olabilmektedir(8,9,101,102).

İmmün kaynaklı diyabet sıklıkla çocukluk ve adolesan dönemde ortaya çıksada her yaşta başlayabilir. Beta hücre harabiyetinin hızı değişken olup; özellikle yenidoğan ve çocuklarda hızlı, yetişkinlerde ise yavaştır (10).

İdiopatik Diabet : Tip 1 diabetik hastaların çok az bir kısmı bu kategoriye girer, bunların çoğunluğu Afrika veya Asya orjinlidir. Bu diabet tipi kalıtsaldır, otoimmüneye ait kanıt yoktur ve HLA ile ilgili değildir. Hastalar ketoasidoz atakları ve ataklar arasında çeşitli derecelerde insülin eksikliği gösterirler. İnsülin replasman tedavisi ihtiyacı değişiklik gösterir (11).

LADA(Latent Otoimmün Diabetli Erişkin) LADA yeni sınıflandırmada tip 1 otoimmün diabetes mellitus içine girmektedir, fakat onun yavaş ilerleyen bir formudur.

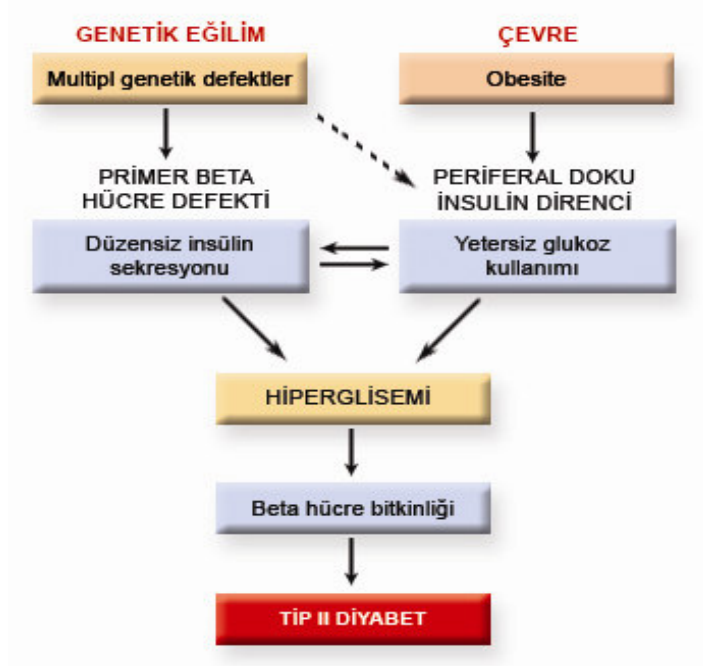


Şekil 2-1:Tip 1 (insüline bağımlı) DM neden olan β hücre harabiyetinin olası mekanizmaları(56).

2.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Önceleri insüline bağımlı olmayan diabet, yetişkin diabet terimleri kullanılan bu tipte, insülin rezistansı ve rölatif bir insülin eksikliği vardır (12,13). Spesifik etyoloji bilinmesede bu tip diabette, β hücrelerinin otoimmün yıkımı yoktur . Tip 2 DM'lu hastalarda görülen proinsülin ve ilişkili diğer peptitlerin dolaşımdaki miktarı 2-4 kat artmıştır. Bu da hiperinsülinemiye rağmen yeterince periferik insülin etkisi elde edilmemesinin nedenlerinden biridir. Tip 2 diabet hastalarında insülin salgısında eksiklik vardır ancak insülin rezistansını kompanse etmek için yetersizdir. Kilo kaybı veya hipergliseminin farmakolojik tedavi ile insülin rezistansında iyileşme olsa da

normale dönmesi nadirdir (14,15). Adacık hücrelerinin sayısındaki azalma hastalığın gidişini etkileyen bir faktördür. Yerleşmiş bir tip 2 diabette β hücre kitlesi %20-40 oranında azalmıştır. Bu azalmadan kronik hipergliseminin yanısıra, pankreas adacıklarında biriken adacık amiloid polipeptidin (amilin) de sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (16). Bunun yanısıra son zamanlarda serbest yağ asitlerinin ve özellikle de postprandiyal hipertrigliserideminin beta hücresi üzerine toksik etki ile insülin sekresyonunu bozduğu fark edilmiştir. Şekil 2.2 de tip 2 DM patogenezi yer almaktadır.



Şekil 2-2:Tip 2 DM 'un patogenezi(56)

İnsülin rezistansı tip 2 DM'un en belirleyici özelliğidir (17). Visseral adipoz dokuda eksprese olan ve kahverengi adipoz dokuda istirahat metabolik hızını ve beyaz adipoz dokuda da lipolizi regüle ettiği bilinen β 3 adrenerjik reseptörünün insülin rezistansı ve tip 2 DM'de rolü vardır (18). Plazma leptin düzeylerinin de obeziteden bağımsız olarak insülin rezistansı ile korele olduğu, invitro olarak hepatositlerde insülinin etkisini inhibe ettiği ve böylece glukoneogenezi arttırdığı saptanmıştır (19).

İnsülin rezistansı kavramı bulunduğu yere göre isimlendirildiğinde;

1)Preresepör alandaki rezistans nedenleri: Pankreas beta hücrelerinden defektif insülin salınımı, glukozun ve insülinin hedef doku ve organlarında kan akımının yeterli veya uygun olmaması, insülinin hedef dokudaki endotelden taşınmasının bozuk olması şeklinde sıralanabilir.

2)Reseptör düzeyindeki rezistans nedenleri: İnsülin reseptör sayısında azalma, otofosforilasyonda azalma ve tirozinkinaz aktivitesinde bozukluk, 19. kromozom üzerinde bulunan insülin geninde değişik tipte mutasyonlar ve insülin reseptör antikörlerinin mevcudiyeti olabilir.

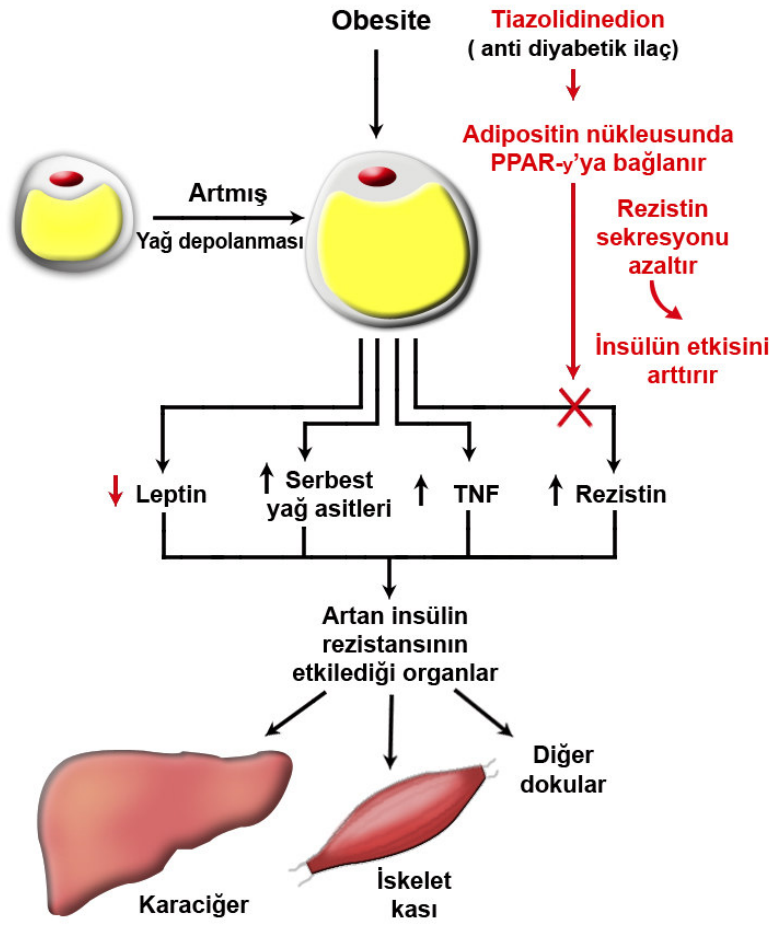
3)Postreseptör alandaki rezistans nedenleri : Glukozun hücre içine taşınmasını sağlayan glukoz transporterlerinden (GLUT) en önemlisi olan GLUT 4 'ün insülin ile aktivasyonunda bozukluk, glukozun hücre içi oksidatif olmayan metabolizmalarında rol oynayan enzim aktivitelerindeki bozukluklardır.

Obezitede adipoz dokudan büyük miktarda salınan adipoz doku kaynaklı TNF α 'nın aşırı üretimini, insülin reseptörünün otofosforilasyonunu azaltarak tirozin kinaz aktivitesini bozması da postreseptör düzeyde insülin rezistansı ve tip 2 DM oluşumuna katkıda bulunur. TNF α fosfotirozin fosfataz aktivasyonu yoluyla IRS-1'in fosforilasyonunu artırıp bunu bir insülin reseptör inhibitörü halinede getirir. Dolaşımda çok düşük konsantrasyonda olması nedeniyle etkilerini endokrin değil, otokrin veya parakrin yolla gerçekleştirerek hücrel insülin rezistansına yol açar (20).

Tip 2 diabetin gelişme sıklığı yaş, obezite ve fiziksel aktivite azlığı ile artar (23,24). Daha önceden gestasyonel diabet öyküsü olan kadınlarda, hipertansiyon veya dislipidemisi olanlarda daha sık görülür. Sıklıkla genetik yatkınlık mevcuttur, ancak genetiği komplekstir ve tam olarak tanımlanamamıştır (25,26).

Tip 2 DM; altta yatan mekanizma ya azalmış insülin sekresyonuna (yani adacık defekti) ya da insülin etkisine karşı artmış dirence (azalmış periferik glukoz alımı veya artmış hepatik glukoz üretimi) bağlıdır (24,27,28).

Tiazolidinedion anti diyabetik ajanlar yağ hücreleri çekirdeğinde eksprese edilen PPAR γ olarak adlandırılan reseptörlere bağlanırlar. PPAR γ iletimini engelleyen mutasyonlar insülin direncini artırır(27). Şekil 2.3 te yağ hücrelerinin insülin direnci düzenlenmesindeki rolü gösterilmiştir.



Şekil 2-3: Yağ hücrelerinin insülin direnci düzenlenmesindeki rolü

2.1.3. Sekonder Diabet

Değişik hastalıklarla diabetin birleştiği bir durumdur. Bunlara örnek olarak pankreas harabiyeti, endokrin hastalıklar (Cushing sendromu, feokromasitoma, akromegali, bazı ilaç ve kimyasal maddeler (diüretikler, glukokortikoidler, oral kontraseptifler, antineoplastik ajanlar) ve bir takım genetik hastalıklar (kistik fibrozis, glikojen depo hastalıkları) gösterilebilir (29).

2.1.4. Gestasyonel diabet:

Gebelik döneminde başlamış olan veya ilk olarak gebelik döneminde tespit edilen glukoz intoleransıdır Bunlar; diabetes mellitus, bozulmuş açlık glukozu (IFG), bozulmuş glukoz toleransı(IGT), normoglisemik durumlardır. Vakaların çoğunluğunda glukoz regülasyonu doğumdan sonra normale döner. GDM, diabet ile komplike olmuş

tüm gebeliklerin %90 'ını temsil eder (30). Glukoz toleransının bozulması normalde gebelik süresi içinde, özellikle 3.trimesterde ortaya çıkar.

Diabetin Kronik Komplikasyonları:

Tip 1 ve Tip 2 diabetiklerde uzun süren metabolik dekompanasyon makro ve mikrovasküler komplikasyonlara neden olur (31).

a)Mikrovasküler Komplikasyonlar: Proteinlerin nonenzimatik glikolizasyonu, polioliyoinositol yolunun yoğun çalışması, hiperfiltrasyon ve hipertansiyon gibi hemodinamik değişiklikler, endotel, endotelin destekçisi dokular ve ekstrasellüler matriksin primer bozuklukları, koagülasyon sistemi ve büyüme faktörlerine ait anormallikler gibi patojenik mekanizmalar diabetik mikrovasküler komplikasyonların oluşmasına yol açar

Diabetik Nefropati:

İlk defa 1936'da Kimmelstiel ve Wilson tarafından tanımlanan diabetik nefropati diabetin en ciddi komplikasyonlarından biridir. Hastaların %35'i son dönem böbrek hastalığı geliştirerek dializ ve renal transplantasyon gerektirirler. Tip 1 DM'u olanlarda proteinürisi olanların 40 yıl sonra sağ kalma olasılıkları %10 iken, olmayanlarda bu olasılık %70'dir. Makroproteinürisi olan diabetik hastaların %50'si 10 yıllık izlemde ölürken, olmayanlarda ölüm oranı %2'dir (32).

Mikroalbuminüri:

Mikroalbuminürinin varlığının Tip 1 DM'ta klinik olarak açık nefropatiye ilerleme oranında artış ve Tip 2 DM'ta mortalite artışı (esas olarak kardiyovasküler hastalık nedeniyle) ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (33). Araştırmalar mikroalbuminürisi olan hastaların %80'inden fazlasının 10 yıl içerisinde klinik nefropati döneminde geçtiğini göstermiştir (34).

Mikroalbuminüri diabet dışındaki bazı klinik durumlarda da ortaya çıkabilir. Bunların en başında HT gelmektedir. Diabetik olmayan hastalarda da mikroalbuminüri mevcudiyeti kardiyovasküler hastalık riskinde artış ile ilişkili bulunmuştur (35).

Diabetik Retinopati:

Hastalığın prevalansı yaşla artar. Damarlarda konstrüksiyon, dilatasyon, kıvrıntılar, nokta şeklinde retinal kanamalar, mikroanevrizmalar, çizgisel veya alev şeklinde preretinal kanamalar ve eksüdatlar vardır. (36).

Diabetik Nöropati :

Diabetik Nöropati'nin mononöropati vazo nervorumların hastalığının neden olduğu, otonom nöropati ve polinöropatinin ise metabolik nedenlerle oluştuğu kabul edilmektedir. Sensoryel bozukluk sonucu, , vibrasyon ve pozisyon duyusunda kusur vardır. Bu durum eklemlerde ve ayak dokularında zedelenmelere neden olarak, diabetik ayak ve Charcot eklemi denilen tablonun oluşmasını sağlar (37).

b) Makrovasküler Komplikasyonlar

Diabetin makrovasküler komplikasyonları ilerlemiş ateroskleroza sekonder olarak olarak gelişirler. Bu kardiyovasküler değişiklikler diabetik hastalarda daha erken yaşlarda ortaya çıkar daha hızlı ve agresif seyirlidir. Tip 2 diabetiklerde makrovasküler komplikasyonlar ölümlerin %80 nedenidir ve bunların da %60 koroner kalp hastalığındandır. Özellikle insülin rezistansının bulunduğu Tip 2 DM'da hiperinsülinemi, düz kas hücresi proliferasyonunu stimüle ederek, makrovasküler hastalık oluşumunda etkili olmaktadır. Hipertansiyon prevalansı tip 2 diabetiklerde daha fazladır. Çünkü bu hastalarda obezite ve insülin rezistansı sıklıkla diabete eşlik eder (38,39). Diabetin makrovasküler komplikasyonları başlığı altında 3 ana patoloji incelenmektedir (27,31).

1) Diabetik kalp hastalığı 2) Periferik arter hastalığı 3) Serebrovasküler hastalık

Diabetin kanıtlanmış etkileri arasında, damar endotelinde oluşturduğu dejenerasyon başta gelmektedir. Damar düz kaslarında ve endotel hücrelerindeki dejenerasyon pek çok organ ve sistemi etkileyerek diabete bağlı ikincil komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır. (97)

Ateroskleroz endotel hasarına karşı damar duvarının geliştirdiği kronik iltihabi bir yanıttır. Diabetik kardiyovasküler komplikasyonlar, ateroskleroz ve aterom plaklarının oluşmasında endotel zedelenmesi temel rol oynar.

Bazı sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin de plak gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir. Bunlar arasında interferon γ (IFN γ), interleükinler 1, 2 ve 6 (IL-1, IL-2; IL-6), TNF, CSF, IGF-1 ve IGF-2, FGF gibi birçok aktif molekül bulunur. (98).

Normal endotel PGI₂ etkisiyle cAMP salgıladığından trombositlerin endotele yapışması/ agregasyonu ve düz kas hücre proliferasyonu engellenir. Oysa okside ve perokside lipidlerin etkisiyle endotelde PGI₂ sentezinde oluşan defekt, TXA₂ ve platelet aktive-edici faktör (PAF) aracılığı ile bu bölgede trombosit birikimini ve düz kas hücre proliferasyonunu başlatır. (97):

- . Kanda ve endotelde LDL oksidasyonu/peroksidasyonu
- . Endotelde PGI₂ defekti
- . Okside/ perokside LDL yüklü monosit/ makrofajların subendotel tabakaya göçü

- . Damar düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve köpük hücrelerine dönüşerek subendotel tabakaya göçü
- . TXA₂ ve PAF aracılığı ile endotel yüzeyinde trombosit agregasyonu
- . Subendotel tabakada kolesterolün serbestleşmesi, hücre artıkları ve Ca ile kompleks oluşturmaları
- . Aterom plak oluşumu (99).

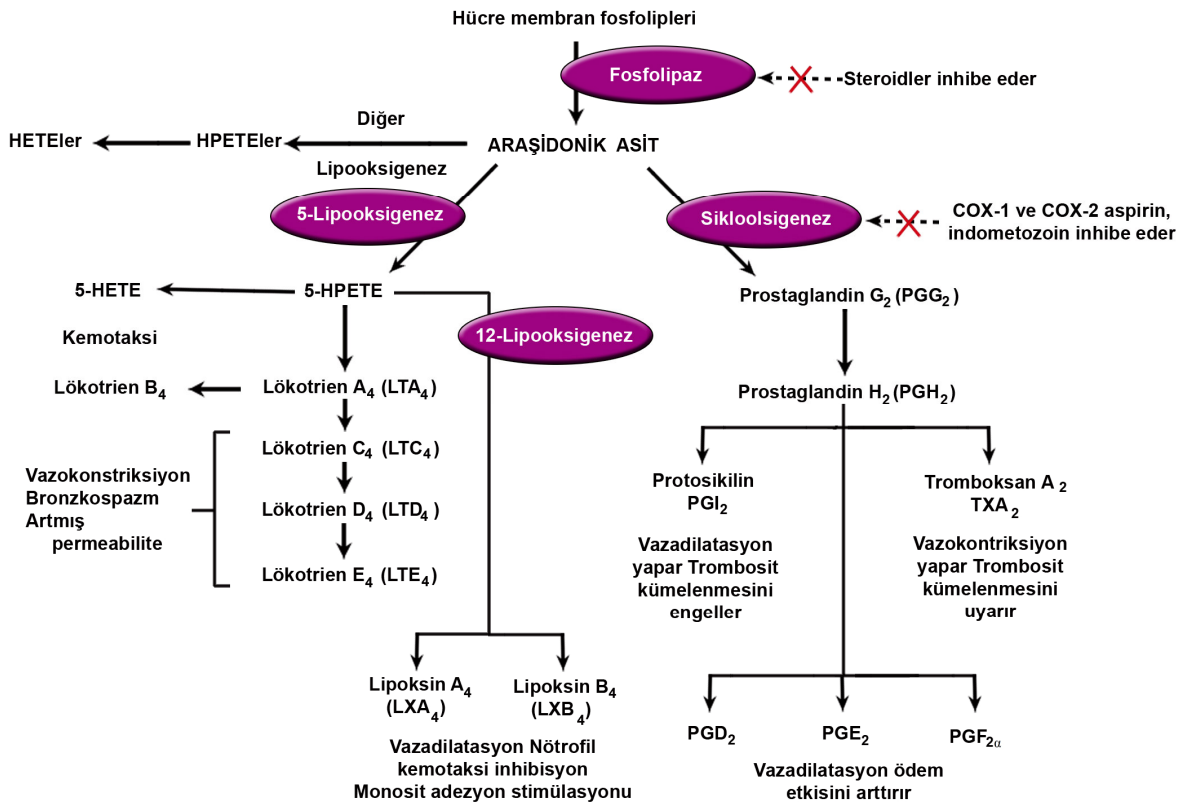
Ateroskleroz iki temel sorun oluşturur. Birincisi, aterom plak zamanla yırtılabilir ve içinden çıkan parçacıklar bu zedelenmiş bölgede oluşan pıhtı ile beraber kan akımına geçerek küçük damarları tıkeleyebilir; ikincisi, aterom plak büyüyerek damarın daralmasına yol açabilir. Her iki durumda da lezyonun geliştiği damar tarafından beslenen organda kan akımı yetersiz hale gelebilmektedir (2,100).

2.2. COX ENZİMİ

2.2.1. Araşidonik asit metabolitleri:

Araşidonik asit (AA) metabolizmasından kaynaklanan ürünler inflamasyon ve hemostaz olmak üzere bir çok biyolojik olay üzerine etkilidir. Bu ürünler kısa zamanlı hormonlar olarak değerlendirilebilirler. Yapıldıkları yerde lokal olarak etki ederler ve daha sonra çok hızlı olarak spontan veya enzimatik olarak yok edilirler.

AA 20 C'lu poliansatüre bir yağ asididir (4 çift bağlı) ve primer olarak diyetdeki linoleik asitten türer ve vücutta yalnızca ester şeklinde hücre membran proteinlerinin bir komponenti olarak bulunur. AA bu fosfolipitlerden hücresel fosfolipazlar yoluyla salınır. Hücresel fosfolipazlar mekanik, kimyasal, fiziksel uyarı veya C5a gibi iltihabi mediyatörlerce aktive edilirler. AA metabolizması reaksiyonu başlatan enzimin adıyla anılan iki ana yol boyunca ilerler: Prostaglandinler ve tromboksanların sentezlendiği siklooksijenaz yolu ve lökotrienler ve lipoksinlerin sentezlendiği lipooksijenaz yolu (Şekil 2.4) (113).

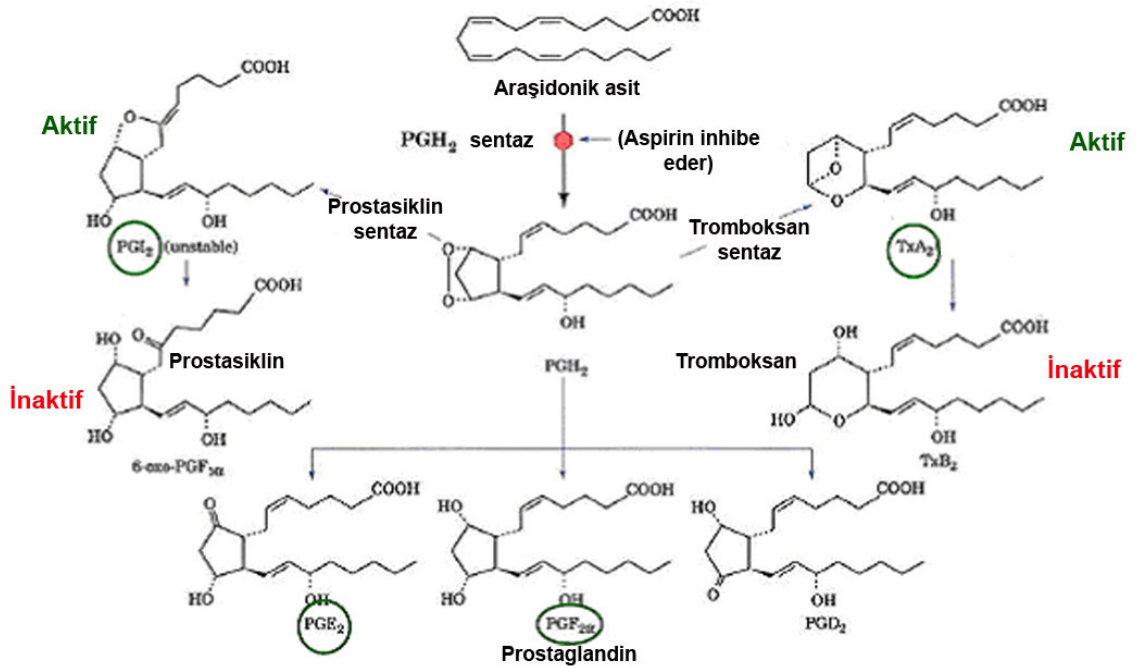


Şekil 2-4: Araşidonik asit metabolitlerinin oluşumu ve inflamasyondaki etkileri. COX-1 ve COX-2, SIKLOOKSİJENAZ 1 ve 2; HETE, hidroksieikozatetranöik asit; HPETE, hidroperoksieikotetranöik asit (56)

AA metabolitleri (eikosanoidler de denir) inflamasyonun neredeyse her basamağında aracılık edebilir. AA lerin sentezi iltihabın olduğu yerlerde artmıştır ve onların sentezini inhibe eden maddeler, iltihabi yanıtı da azaltırlar (42).

2.2.2. Prostaglandinler:

Prostaglandin ilk olarak insan semeninde 1930'da keşfedildi. Fakat onların düşük konsantrasyonları ve instabilitesini imkansızlaştığından yaklaşık 30 yıl sonunda tanımlanmıştır. Kompleks bir çok oksijenasyon siklizasyon ve bir akiral substrat 5 kiral reaksiyonları içeren poliunsature yağ asitlerinden olduğu şeklinde tanımlanmıştır (40). Hamberg ve Samuelsson 1967'de prostaglandin biyosentezinin mekanizmasını ana hatları ile tanımlamıştır (41) ve yeterli çalışma yaparak temel prensiplerini onaylanmıştır.



Şekil 2-5:Araşidonik asit metabolitleri(119)

Poliansature yağ asitlerinin oksijenasyonunun ilk ürünleri olan bisiklik peroksitlerin (endoperoksitler) oluşumu mekanizmada anahtar basamaktır. Komplekste kimyasal transformasyonu sağlayan enzim olarak Cox-1,2 enzimi tanımlanmış ve 1973 te prostaglandin endoperoksitlerinin etkisi belirlenmiştir (42,43).

Poliansature yağ asitleri oksijenasyonunun ilk ürünü mekanizmada anahtar basamak olarak bisiklik peroksitlerin (endoperoksit) oluşumudur. Kompleks kimyasal transformasyon uygulaması olan enzim olarak Cox-1,2 enzimi tanımlanmıştır ve 1973'de prostaglandin endoperoksitlerin izolasyonu sonucu belirlenmiştir.

Cox etkileyici bir şekilde metabolik transformasyonu katalizlediğinden önemli derecede farmakolojik açıdan hedef olmuştur (44). Vane 1971'de prostaglandin oluşumunu inhibe eden NSAİİ'ler tayin etmiş ve *invivo* antiinflamasyon aktiviteleri ile *invitro* ortamda inhibitör ilişkilerini doğrulamıştır. Bunun yanı sıra NSAİİ'lerin yararlı aktiviteleri, aynı zamanda gastrointestinal toksisite ve koagülasyonda etkileri belirlenmiştir. Prostaglandin ve ilişkili moleküller (trombosan vb...) fizyolojik ve patofizyolojik cevaplarda belirgin şekilde ilişkilidir.

Cox-2 geni keşfiyle Cox-1 enziminden farklı protein ürünü olması nedeniyle NSAİİ'lerle izoform selektif inhibitörler ayrılmıştır (45-48). Bu hipotez sonucu Cox-2 inhibitörlerinin anti inflamasyon ve analjezik olduğu gastrik toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (49-50).

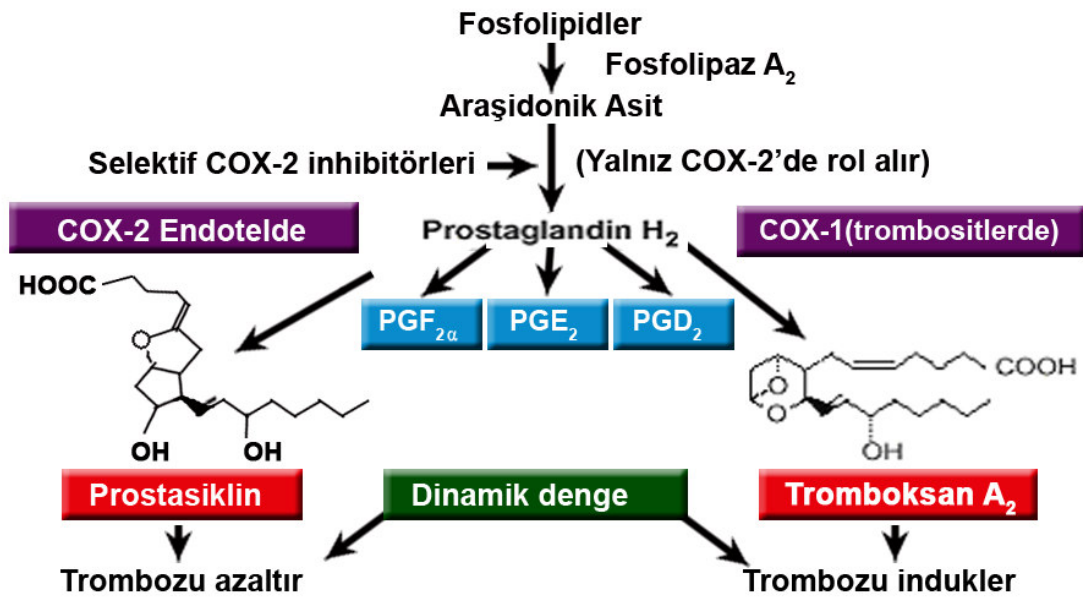
2.2.3. Siklooksijenaz yolu:

Araşidonikasit metabolizmasından prostaglandin G/H sentaz (PGHS sık olarak Cox olarak bilinir), lipooksijenaz epooksijenaz gibi yollar sonucu biyolojik olarak aktif ürünler sentezlenir. Cox-1 ve 2 prostanoid sentezinde hız kısıtlayıcı basamağı katalizler, araşidonik asitten PGH₂ dönüşümü olur ve prekürsor olarak biyoaktif prostanoidler ailesinden tromboksan ve prostaglandinler üretilmektedir. Siklooksijenaz (Cox) enzimleri; bisfonksiyonel proteinler olup, Cox ve hidrojen peroksidaz (HOX) aktivitelerinin bir arada bulunması ile oluşan proste araşidonik asit biyotransformasyonunu katalize ederek PG endoperoksit ara ürünleri PGG₂ ve PGH₂ oluşmasında görev almaktadırlar. Bunlardan izomeraz ve sentazlar aracılığıyla prostaglandinler ve tromboksan A₂ (TXA₂) oluşturulur. Tüm bu ürünler G-protein ilişkili reseptörleri aktive ederler (51-54).

Burada prostaglandin (PG) E₂ (PGE₂), PGD₂, PGF₂α, PGI₂ ve TXA₂ bulunur. Bunların her biri spesifik bir enzim etkisi ile meydana gelir. Bu enzimlerin bazılarının dokulardaki dağılımı sınırlıdır. Örneğin; trombositlerde tromboksan sentetaz enzimi vardır, dolayısıyla güçlü bir trombosit agregan ajan ve vazokonstriktör olan TXA₂ ana prostaglandin ürünü olarak bu hücrelerde bulunur (56).

Diğer yandan endotel tromboksan sentetaz içermez ancak PGI₂ oluşumunu sağlayan prostasiklin sentetaz içerir. PGI₂ güçlü bir trombosit agregasyon inhibitörü ve vazodilatördür. PGD₂, siklooksijenaz yolunun mast hücrelerindeki ana metabolitidir. PGE₂ ve PGF₂α ile birlikte bulunur ve vazodilatasyona neden olur, ödemi artırır.

Prostaglandinler inflamasyonda ağrı ve ateş patogeneğinde de rol oynar. Eikosanoidlerin iltihabi proseslerin merkezinde rol aldıkları gerçeği eikosanoid sentezini bloke eden ajanların klinik kullanımı için esas oluşturmaktadır. Aspirin ve birçok NSAİİ (İbuprofen gibi) siklooksijenaz aktivitesini ve böylece bütün prostaglandin sentezini inhibe ederler (bundan dolayı ağrı ve ateş tedavisinde etkilidirler). Siklooksijenazlardan COX-1 gastrik mukozada mevcuttur (COX-2 gastrik mukozada bulunmaz) ve COX-1 tarafından üretilen prostaglandinler, aside bağlı hasara karşı koruyucudur. Bundan dolayı aspirin ve NSAİİ ler siklooksijenazın inhibisyonu (hem COX-1 hem COX-2 yi inhibe ederler) prostaglandin sentezini bloke ederek iltihabı azaltırken, gastrik ülserde de zemin hazırlarlar. Cox inhibitörlerinin gastrik mukoza üzerine zararlı etkilerini engelleyip, antiinflamatuvar etkilerini koruyacak şekilde selektif Cox-2 inhibitörleri üretilmiştir. Dikkat çekici olarak lipooksijenaz bunlardan etkilenmez ve Cox blokajı lipooksijenaz yoluna giren substratları artırabilir. Güçlü antiinflamatuvar maddeler olan glukokortikoidler, fosfolipaz A2 aktivitesini inhibe etmekte rol oynamaktadır (56).



Şekil 2-6: COX-2 inhibitörlerinin kardiyovasküler etkileri. Kardiyovasküler homeostazisin sağlanmasında endotelial hücrelerde üretilen prostasiklin ve trombositlerde üretilen tromboksan A₂ arasındaki dinamik denge gösterilmektedir(120)

2.2.4. COX stereokimyası:

Cox enziminin 3 izoformu bilinmektedir. Cox -1 normal şartlar altında çoğu dokuda eksprese edilir. Cox-2 ekspresyonu ilk olarak growth faktör , mitojen, sitokinler tarafından inflamatuvar stimülasyona cevapta indüklenir. Cox-3 Cox-1 den türemiş bir izoenzimdir. Fonksiyonu hala tam olarak bilinmemektedir.(55).

Cox ; izoprostanoidlerden prostaglandin oluşumunu artırarak proses yürümektedir. Araşidonik asitin spontane oksidasyonu ile Cox katalizi arasındaki major farklılık yüksek derecede enzimatik reaksiyonun stereokimyasal kontrolü ile yüksek oranda Cox katalizi gerçekleşir. Oksijenasyonun stereokimyasal kontrolü ve 13 – pro- S- hidrojen uzaklaştırılması ile stereospesifiklik sağlanır ve Cox burda önemli sorumluluklar yüklenmektedir. Cox-1 ve 2 kristal yapılarında her ikisinde de yağ asidi substratı ile Tyr 385 pozisyonundaki Tyr ile reaksiyonu sonucu açığa çıkmaktadır (57).

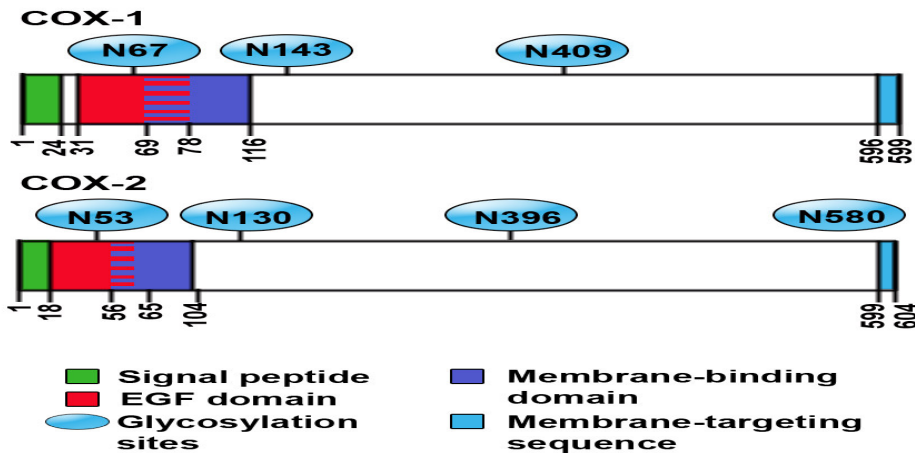
Cox enzimlerinin iki şeklinin aktif bölgeleri, bir kaç özellik haricinde oldukça benzerdir. En belirgin farklılık her iki enzim arasında substrat spesifikliğinin var olmasından kaynaklanmaktadır. Her ikisi de hidrofobik bir tünel aktif bölgede lipid substratı bulundurur. Cox-2 iç kısmında aminoasit artıkları Arg 513, Val 434, Val 523 ten oluşur, Cox-1 de bu aminoasitler yer almaz. Cox-1 de hacimsel olarak daha fazla yer kaplayan İle 434, His 513, İle 532 bulunur. Bu nedenle Cox-2 aktif bölgesine bağlanma daha rahat gerçekleştiği gösterilmiştir. Cox-2 18 C’lu poliansature yağ asitlerini Cox-1 den daha yüksek afinite ile bağlamak daha uygun bir aktif bölgeye sahiptir. Aynı zamanda Cox-2 araşidonik asitten türemiş hidroksietilamidi okside eder oysa Cox-1 bu etkiyi göstermez. Son gözlem ise; Cox-1in R120Q mutanıtı araşidonat için Km’i 100 kat artırmaktadır oysa Cox-2 nin normal tip enzimi araşidonat Km’inde oldukça benzerlik göstermektedir (58-63).

2.2.5. Cox Gen Düzeyi :

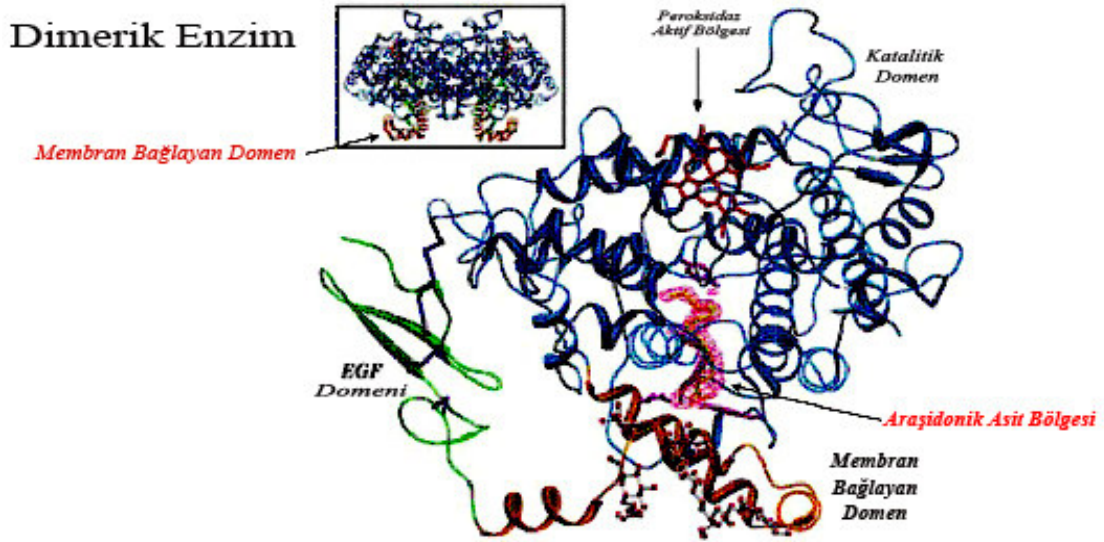
Cox-1 ve Cox-2 aminoasit seviyesi % 60 homoloji gösterir 3 ana domenden oluşmuştur: membran bağlayan domen, EGF ye benzer domen, enzimatik domen. İnsan Cox-1 geni; 9q32-q 33.3 kromozomunda, yaklaşık 22 kilobp büyüklüğünde 11 ekzon içerir. İnsanda Cox-2 geni 1q25.2-q 25.3 kromozomunda yaklaşık 8.3 kilobp büyüklüğünde 10 ekzon içerir (64,65).

Cox-2 8.3 kilobp büyüklüğündedir ve elde edilen verim 4.1 kbp , Cox-1 22 kilobp büyüklüğünde elde edilen verim 2.8 kbp mRNA düzeyidir. Çünkü Cox-2 deki intronlar Cox-1 e göre daha küçüktür. Cox-2 promotor bölgesi 1.7 kbp uzunluğunda, ve TATA Box 31bp lik kısımda transkripsiyon başlama bölgesinde bulunur (114-116). Promotorde Sp1, NFkB, CRE,GRE, PEA3, NF IL-6 bulunur (117). Aynı zamanda AU dan zengin 3' untranslated bölge içerir.

Cox-1 ve Cox-2 arasındaki fark; N-terminal bölgede Cox-2 signal peptidi Cox-1 e göre daha kısa, C-terminal membran bağlayan domende 18 aminoasit eklenen yer,(33) ek olarak Cox-2 de C-terminal kısımda glikolizasyon bölgesi lokalizedir. Şekil 2.7 de Cox-1 ve Cox-2 siklooksijenaz izoformlarının protein yapılarının karşılaştırılması yer almaktadır (118).



Şekil 2-7: Cox-1 ve Cox-2 siklooksijenaz izoformlarının protein yapılarının karşılaştırılması



Şekil 2-8: Cox-1 ve Cox-2 enzimleri dimerik yapısı ve membranlar arası ilişkisi(120)

2.2.6. COX Ekspresyonu

Cox-1 doku homeostazisine katılan yaygın eksprese edilen ana enzimdir. Aksine Cox-2 indüklenebilir izoformdur ve çoğu dokuda düşük seviyelerde eksprese edilir ve LPS ler tarafından stimüle edilir growth faktör ve sitokinler örneğin; TNF α , IL-6 (66,67) inflamasyon olaylarında rol oynar bu yönü itibariyle ateroskleroz, romatoid hastalıklar ve karsinogenezde rol alır (68,69). Cox-1 ve Cox-2 koagülasyon, renal fonksiyon ve gastrointestinal sistemin içinde olduğu fizyolojik olaylarda, inflamasyon, artrit gibi patofizyolojik olaylarda rol alır. Cox-2 ekspresyonu çoğu dokuda düşüktür fakat sitokin , growth faktör , tümör promotorlarının da dahil olduğu çeşitli mediyatörler tarafından indüklenmektedir. Cox-2 aktivitesi, SSS ve inflamasyon hücrelerindeki PG sentezinden öncelikle sorumludur. İnflamasyon, artrit, ağrının da dahil olduğu patofizyolojik cevapları içerir (70).

2.3. COX -2 DİABET KORONER ARTER HASTALIĞI ARASI İLİŞKİ

Prostaglandin ekspresyonu ve aktivitesi kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda etkilidir.

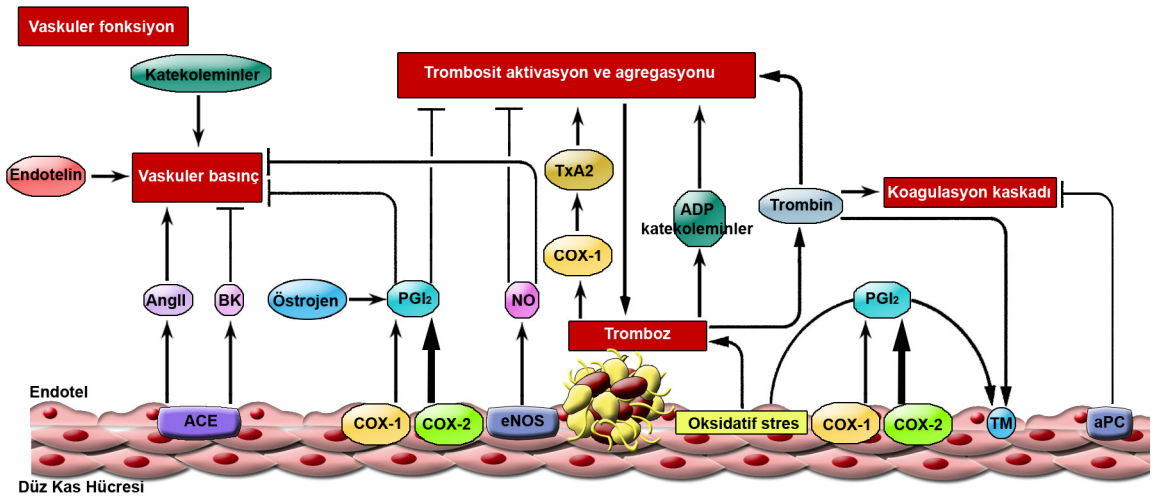
Kardiyovasküler hastalık ve inflamasyon gelişiminde prostaglandinler rol almaktadır. Bilindiği gibi prostaglandinler, Prostaglandin endoperoksit H sentaz diğer adıyla siklooksijenaz tarafından üretilirler. Cox-2 tarafından üretilen PGE, subklinik

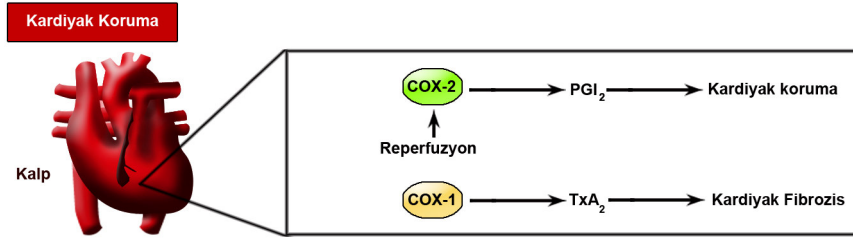
ateroskleroz, MMPLerin salınımı, plak yırtılması, kardiyovasküler hastalıklarda artmaktadır. Koroner arter hastalığı patogeneğinde inflamasyon aterom oluşumunda önemli rol oynar. Bu vasküler diabetik komplikasyonların oluşmasında TXA₂ sentezinin artışına bağlı trombosit adezyonu ve agregasyon eğiliminin artması ve prostasiklin sentezinin azalmasının potansiyel önemi vardır.

Diabetik endotel fonksiyon bozukluğunda endotelin-1 sentezinin artışı, vazokonstrüktör etkinliğin güçlenmesine ve damar düz kasında mitojenik etkiye neden olurken; vazodilatatör etkiye sahip nitrik oksit, damar düz kasında antimitojenik etki gösterir ve trombosit agregasyonunu inhibe eder. Böylece damarlarda vazodilatatör etkinlik azalırken vazokonstrüktör etkinlik artarak doku kan akımında azalma ve doku beslenmesinde bozulma eğilimi gözlenir (103-105).

Cox-2 ekspresyonu, aterosklerotik plaklarda matriks metalloproteinazların üretimindeki artışa bağlı olarak diabete bağlı koroner kalp hastalıklarında endotelial hücrelerde artmaktadır (71,72).

Yapılan çalışmalarda aterosklerotik lezyonların Cox 2 ekspresyonun rolü belirgin şekilde gösterilmiştir. Cox-2 sonucu oluşan PGE₂ subklinik aterosklerozda artmıştır (73-75). Oysa oksidatif strese maruz kalan kardiyomiyositlerde bu enzimin koruyucu fonksiyonu olduğu işaret edilmektedir (76). Cox-2 nin indüksiyon oranına bağımlı olarak yararlı ve zararlı etkileri bulunmaktadır, patofizyolojik olaylar ve spesifik hücrelerde PGH₂ metabolize edilerek sitoprotektif ve proinflamatuvar olaylarda rol almaktadır (77). (Şekil 2.9)





Şekil 2-9: Kardiyovasküler sistemde COX izoenzimlerinin rolü. ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim; ADP: Adenozindifosfat; aPC: aktive protein C; BK: Bradikinin; eNOS: endotel kaynaklı NO; TM: Trombomodülin(106)

2.4. İNFLAMASYON MARKERLARI

Sitokinler lenfositler ayrıca efektör hücreler ve APC'ler tarafından salgılanan düşük molekül ağırlıklı polipeptitlerdir, (tipik olarak 10-40) belli durumlarda , epitelyumyal ve mezanşimal hücrelerde önemli kaynaktır. Her ne kadar bunlar orijinal olarak lenfokin ve monokin olarak sınıflandırılırsalarda günümüzde sitokin olarak bahsedilmektedir.

Sitokinlerin genel sınıfları

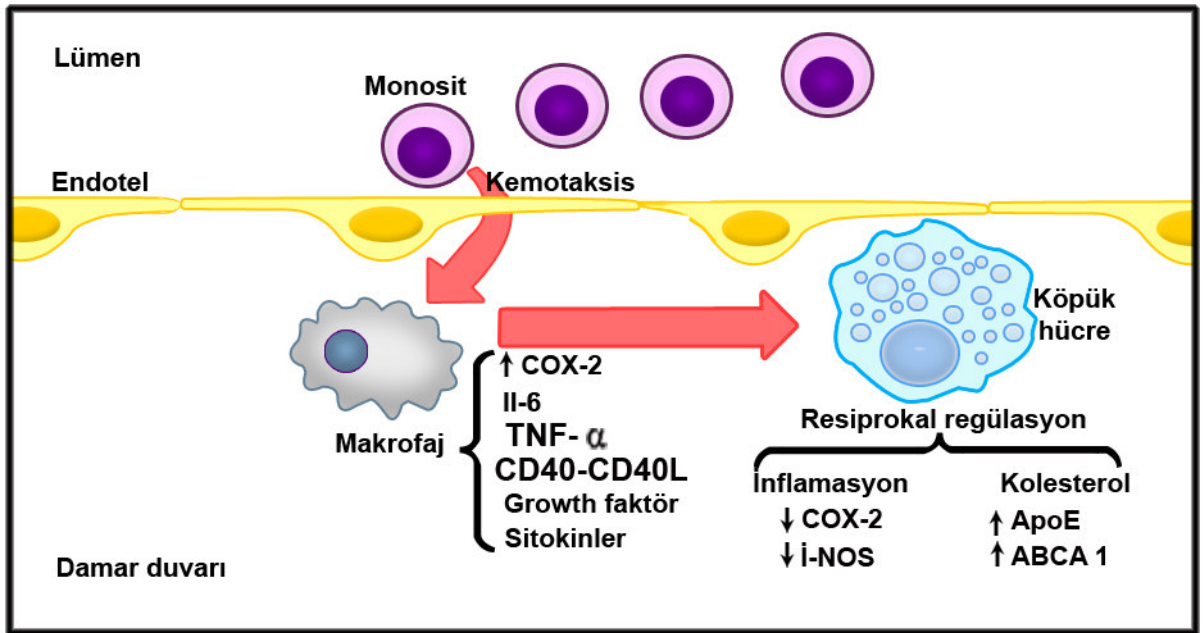
1. Doğuştan immunitiyi sağlayan sitokinler :IL-1, IL-6, TNF,İNERFERON bu sitokinlerin bazıları (inferon gibi) viral enfeksiyonlara karşı korurken , diğerleri IL-1, TNF, IL-6 endotel ve mononükleer iltihap hücrelerinin aktivasyonu ve KC tarafından akut faz reaktan sentezinin sağlanması gibi nonspesifik proinflamatuvar cevapları başlatır.
2. Lenfosit gelişme , aktivasyon ve diferansiyasyonunu regüle eden sitokinler :IL-2,IL-4,IL-5, IL-12, IL-15, TGF alfa
3. İltihabi hücreleri aktive eden sitokinler :IFN γ ,TNF
4. Kemokinler iltihap hücrelerini hasar bölgesine göndermede etkililer: IL-8, MCP-1
5. Hematopoezi stimüle eden sitokinler :GM CSF

Sitokinler ; aktive olmuş lenfositler ve makrofajlar başta olmak üzere birçok hücreden sentezlenen ve diğer hücrelerin fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan polipeptit yapısındaki maddelerdir. Sitokinler kemikiliğindeki immatür öncü hücreleri büyümesini uyaran CSF , ve klasik büyüme faktörlerinin çoğunu , interlökinleri ve lökosit adezyonunu uyaran ve kemotaksiyi yönlendiren kemokinleri içerirler (56).

2.5. COX-2 VE IL-6 İLİŞKİSİ

İnflamasyona neden olan her uyarın AP-1, NF kappa B , T hücrelerini aktive eden NF IL-6 gibi pek çok transkripsiyon faktörü aracılığıyla COX-2 indüksiyonuna neden olur. COX-2'nin aşırı yapımı prostaglandin (PGE2) gibi proinflatuar mediyatörlerin yapımını artırır. PGE2 inflamatuvar reaksiyonlar esnasında en fazla üretilen ve immün fonksiyonların regülasyonunda rol alan bir moleküldür (107,108).

Pankreatik adacık hücrelerinde COX-2 hem bazal durumda hemde IL-1'e yanıt olarak salgılanan dominant izoformdur. PG'ler özellikle PGI2 AC' de de fizyolojik rollere sahiptir. Bunlar arasında pulmoner vasküler tonusun sağlanması, kapiller endotelial ve alveolar endotelial permeabilitenin regülasyonu, surfaktan hemostazisi, bronşial mukus sekresyonu ve transportunun kontrolü yer alır. COX-1 ve 2 AC'de farklı hücre ve dokularda sentezlenir. COX-2 bazal durumlarda makrofaj ve mast hücre benzeri hücrelerde sentezlenir (85).



Şekil 2-10: Köpük hücre regülasyonunda rol alan inflamatuvar ve kolesterol homeostazisini düzenleyen genler (121).

Herhangi bir inflamatuvar uyarana yanıt olarak inflamatuvar pek çok hücre yanında KC kuffer hücrelerinden de IL-1, IL-6, TNF-alfa, TNF-beta ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonu artar.(78-80). COX-2 , IL-1, TBF-alfa, büyüme ve inflamasyonu sitmüle eden diğer pek çok sitokin tarafından sitümüle

edilebilen bir enzimdir. Tüm hücre ve dokularda glukokortikoidler tarafından inhibe edilir(81,82). AP-1, NF-kapa B, aktive T hücre nükleer faktörü, nükleer faktör IL-6 COX-2' nin indüksiyonuna aracılık eder (Şekil 2.10) (83,84).

2.6. COX-2 POLİMORFİZMİ

Ateroskleroz , tromboz ve vasküler biyoloji alanında Papafili ve arkadaşları Cox-2 promotoründe -765G>C varyantını tanımlamış varsayılan sp1 bağlanma bölgesi gösterilmiştir, -765 G alleli ile karşılaştırıldığında promotor aktivitesinde yaklaşık %30 oranında düşüş gözlenmiştir. Cox-2 geni 5' bölgesinde gen transkripsiyonunu düzenleyici TATA kutusu ve CRE, NF kB, NF-IL-6, GRE, PEA3, AP2, C/EBP, TGF beta, sp1 multiple cevap elemanları transkripsiyon faktörleri olarak bağlanır. Özellikle Sp1 G-zengin elementleri içinde Cox-2 transkripsiyonunda aktivatör olarak düşünülür (86). Papafili ve arkadaşları seçilmiş koroner arter bypass graft (CABG) ameliyatı geçirmiş hastalarda C allelinde plazma düzeyindeki CRP de düşüş gözlenmiştir (87). CRP seviyesi >3mg/l iken -765 GC (1.8+-0.3) ve -765 CC(2.1+-0.2)şeklindedir. Cox-2 seviyesi aterosklerozun da dahil olduğu kronik inflamatuvar hastalıklarda artmaktadır. Cox-2 ekspresyonu endotel, düz kas, monositler ve insandaki aterosklerotik lezyonlardaki makrofajlarda saptanmıştır (88,89). Cox-2 enzimi yoluyla bir çok prostaglandin üretilmektedir. Örneğin bir prostaglandin olan tromboksan, uyarılarak; vazokonstriksiyon, trombosit agregasyonu ve lökosit – endotel hücre adhezyonu gibi etkiler aracılığıyla ateroskleroz ve tromboz oluşumuna katkı sağlamaktadır (90,91). Vazodilatasyon, trombosit agregasyonu inhibisyonu, lökosit aktivasyonunda rol oynayan prostasiklin, başlıca endotel hücrelerinde üretilir (92).

İlk çalışmalar C allelinin MI, felç ve serebrovasküler iskemiye karşı koruyucu etki sağladığı olasılığını göstermektedir. C alleli kardiyo ve serebrovasküler, hiperkolesterolemili hastalarda inflamasyon markerları olan CRP ve IL-6 nın seviyelerindeki düşüş ile ilişkilendirilmiştir (87,93).

Ancak ilk yöntemlere karşıt olarak Haegamer ve arkadaşları Cox-2 polimorfizmi /haplotipinde ne MI ne de iskemik felçle bir ilişki bulunmadığını açıkladı (94). Dahası Kohsaka ve arkadaşları Cox 2 -765 G>C polimorfizminin Amerikalı Afrikalılarda felç geçirme açısından gerçekte risk faktörü olduğunu rapor ettiler (95).

Diabete bağlı koroner arter hastalıkları, romatoid hastalıklar, karsinogenez dahil olmak üzere inflamasyon olaylarında rol oynayan TNF α ve IL -6 gibi sitokinler, growth faktörler, LPS tarafından Cox-2 uyarılır. Aterosklerozdaki Cox-2 nin direkt rolü, aterosklerotik lezyonlardaki çalışmalarda gösterilmiştir ve aterosklerozda artmıştır. Oysa son çalışmalar bu enzimin kardiyomiyositlerle ilgili oksidatif strese koruyucu fonksiyonu olduğu işaret edilmiştir. COX-2 genindeki polimorfizmler klinik olarak daha fazla incelenmiştir. CRE ve yanı sıra NF κ B, NF-IL6, gibi farklı nükleer regülatör faktörler COX-2 geninin dokuya spesifik tarzda transkripsiyonunda önemli rol oynamaktadır. Polimorfizm COX-2'nin ekspresyonunu potansiyel olarak değiştiren faktörler için bağlanma bölgelerinin oluşumunu veya ortadan kalkmasını sağlayabilmektedir (109,110).

COX-2 ile yapılan çalışmalarda 124 SNPs (tek nükleotid polimorfizm) belirlenmiştir(111). Bunların çok azında fonksiyonel etki görülür. -765 G-C polimorfizminde in vitro olarak COX-2 promoter aktivitesinde % 30 azalma görülür. COX-2 926 G-C polimorfizmi yüksek seviyede COX-2 artışına neden olmuştur ve in vitro olarak %30 oranında promotor aktivitede azalma olmuştur.V511A (lokalizasyon Exon 10) polimorfizmi Afrikalı Amerikalılar arasında % 5 oranında bulunur ve kolorektal adenom ve karsinoma karşı koruyucu özelliği vardır. Diğer tek gen polimorfizimleri ve lokalizasyonları C-162G Promoter, C645T, T10G 5'-UTR, R228H Exon 6 polimorfizimleridir(112).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Örneklerin Seçimi ve Tanımı

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 16.07.2008 tarihli ve 7 sayılı toplantısında onaylanan tez çalışmasına diabete bağlı kardiyovasküler hastalığı olan ve herhangi bir hastalık hikayesi bulunmayan kontrol grubu bireyleri dahil edilmiş, gönüllü bilgilendirme ve onay formları imzalatılmıştır.

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta 100 kişiden oluşan herhangi bir diabete bağlı koroner arter hastalığı olmayan sağlıklı bireyler kontrol grubuna alınmıştır.

İkinci grup İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Metabolizma Bilim Dalı tarafından takip edilen 100 diabete bağlı kardiyovasküler hastalığı olan kişilerden oluşturulmuştur. Diğer klinik parametrelere ait ayrımlar yukarıda belirtilen klinik tarafından yapılmış ve kan örnekleri bu birim tarafından sınıflandırılarak anabilim dalımıza gönderilmiştir.

3.2.Kimyasal Maddeler

Agaroz (Promega MBG), Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorür (Sigma A-5666), Amonyum sülfat (Sigma A-5132), Asetik asit (Merck K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768), Brom fenol mavisi (Sigma B-6896), Dietileter (Merck), DNA marker (50-100 bp DNA size marker; Fermentas), dNTP seti (Fermentas), EDTA (dihidrat) (Merck K-90602121), Etanol (%99 Tekel), Etidyum bromür (Sigma E-8751), Hidrojen peroksit (%35 Merck K-22035097), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), Metaphor agaroz (FMC 50182), Mineral yağ (Sigma M-5904),Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Potasyum hidroksit (Sigma P-1767), Potasyumdihidrojenfosfat (Merck A-741071), Primer dizileri (Fermentas), Proteinaz K (Merck), Restriksiyon enzimi AciI; (Fermentas), Sodyum dodesil (lauryl) sulfat (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C-754962), Sodyum klorür (Carlo Erba 368257), Sodyumbisülfid (Sigma S-9631), Taq polimeraz (Promega), Trizma baz (Sigma T-1503), Xylene cyanol (Sigma X-4126), Xylene orange (Sigma X-0127).

3.2.1.Kullanılan Primerler

5' AGG CAG GAA ACT TTA TAT TGG 3'

5' ATG TTT TAG TGA CGA CGC TTA 3'

3.3.Cihazlar

Elektroforez için güç kaynağı (Titan plus Helena Laboratories), Elektroforez Sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis), Falkon santrifüj (Hereaus), Hassas terazi (Mettler), Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj (TDX), PCR aleti (MJ Research Techne), pH metre (Hanna), Pipet takımı (Brand), Polaroid kamera (DS34 Direct screen instant camera), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208), Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Vorteks (Nuve mix).

3.4.Çözeltiler

3.4.1.DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.4.1.1.Eritrosit Parçalama Tamponu

8,74 gram Amonyum klorür, 1 gram Potasyum bikarbonat, 200 µl 0,5 molarlık Etilen diamine tetra asetat (EDTA)'ın tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 mililitre ddH₂O eklendi ve çözeltinin pH'sı bir normal sodyum hidroksit çözeltisi ile 7,4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak bir litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılarak 120°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra +4°C'de saklanmıştır.

3.4.1.2. 0,5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH: 8,0)

186,1 gram Etilen diamin tetra asetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldürüldü ve pH'sı sodyum hidroksid çözeltisi ile 8,0'e ayarlanarak ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.3. 4 Molar Sodyum Klorür (NaCl)

233,6 gram Sodyum klorür tartılarak erlene alındı. Üzerine 800 mililitre ddH₂O ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.4.Lökositleri Parçalama Tamponu

25 mililitre 4 molar sodyum klorür ve 50 mililitre 0,5 molar 50 mililitre Etilen diamin tetra asetat (EDTA) direkt balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklandı.

3.4.1.5. 1 Molar Tris tamponu (stok)

121,1 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 42 mikrolitre hidroklorik asit ile yaklaşık 800 mililitre ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra kullanılmıştır.

3.4.1.6. 9,5 Molar Amonyum asetat

73,22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mililitre ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarıldı ve ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlandı. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +4°C'de saklandı.

3.4.1.7. %10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS)

10 gr sodyum dodesil sülfat tartıldı. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek beher içine alındı ve üzerine 80 mililitre ddH₂O eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü ve pH'sı 7,2'ye ayarlandı. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml)

20 miligram proteinaz K tartılarak steril bir gode içinde steril ddH₂O ile 1 mililitreye tamamlandı. -20°C'de saklandı.

3.4.2. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

3.4.2.1. Etidyum Bromür (10 mg/ml)

10 gram etidyum bromür tartılarak steril ddH₂O ile 10 mililitreye tamamlandı.

3.4.2.2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x)

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0,2 mililitre 0,5 molarlık Etilen diamin tetra asetat, 1 mililitre 1 molarlık Tris (pH 8,0), 200 miligram Brom fenol mavisi, 200 miligram Xylen cyanol tartılarak steril ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

3.4.2.3. 50x Tris - Asetik asit - Etilen diamin tetra asetat (TAE) Tamponu

242 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 57,1 mililitre Glasiyal asetik asit ve 100 ml 0,5 molarlık Etilen diamin tetra asetat ve 800 mililitre ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.4.2.4. 5x Tris-Borik asit-Etilen diamin tetra asetat (TBE) Tamponu

54 gram Tris baz ve 27,5 gram Borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0,5 molarlık EDTA (pH'sı 8.0) ve 800 ml ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Çözelti balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı ve 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Hazırlanan çözelti oda ısısında saklandı.

3.5. Yöntem

3.5.1. Kan Örneklerinin Alınması

Cox-2 gen polimorfizmlerinin tayini amacıyla steril EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örnekleri DNA izolasyonu için, en geç bir gün içinde çalışmak üzere oda ısısında saklanmıştır. Serum il-6 tayini amacıyla steril kuru tüplere alınan periferik kan örnekleri ise 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Serum örnekleri analizleri yapılana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.5.2. DNA İzolasyonu

10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de 15 dakika bekletildi. +4°C'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri

tamamen süspanse edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler +4°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılarak pelletleri süspanse edildi. Süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS 50µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 9,4 ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her 1 ml örnek başına 0,37 ml 9,5 M 'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir falkona aktarılarak üzerine 1:2 oranında %99'luk absolü alkol eklendi ve böylece DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklendi ve DNA steril bir mikropipet ucuyla alındı. DNA %70'lik alkolde yıkanarak ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisi içinde çözündürüldü. DNA örnekleri +4°C'de muhafaza edildi (*192*).

3.5.3.DNA Safılık Tayini

DNA örnekleri Tris-EDTA çözeltisi ile 1/100 oranında sulandırıldı. 260 nm'de DNA'nın ve 280 nm'de RNA ve proteinin vermiş olduğu absorbans Tris EDTA çözeltisi ile spektrofotometre sıfırlanarak ölçüldü.

260 nm'de okunan absorbans / 280 nm'de okunan absorbans oranından DNA saflığı saptandı. O.D.₂₆₀ / O.D.₂₈₀ oranı 1,7-1,8 olan DNA'lar temiz olarak kabul edildi. Bu oranın altında bir değere sahip olan DNA'lara temizleme işlemi uygulandı.

3.5.4.DNA Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Çift iplikli DNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 absorbans 50 µg/ml (50 ng/µl)'dir. Bu temel bilgiden faydalanarak DNA formülü aşağıdaki formüle göre hesaplandı (*193*):

DNA Konsantrasyonu (ng/µl): Sulandırma katsayısı (100) x A₂₆₀ x 50.

3.5.5.PZR ile Cox-2 Gen Polimorfizmlerinin Saptanması

Genomik DNA örneklerinde Cox-2 lokusuna ait alleller polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. DNA örneklerinin her birinin amplifikasyonu için toplam 25 µl'lik PZR karışımı hazırlandı. Bu PZR karışımı 100-200 ng DNA, her bir primerden 0,5 µl, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂ ve 1,0 U Taq DNA Polimeraz olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon reaksiyonları Mini Thermal Cycler'da aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

Cox-2 polimorfizmine ait amplifikasyon koşulu:

95°C de 3 dakika başlangıç denatürasyonu,

95°C de 45 sn denatürasyon,

55°C de 45 sn bağlanma,

72°C de 45 sn uzama olmak üzere 35 döngüden oluşan bir PZR programı kullanıldı.

PZR ürünleri AclI restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş ve % 2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. DNA fragmanları etidyum bromid ile boyandıktan sonra UV altında görüntülenip genotipleme yapılmıştır.

C alleli 309 bp, G alleli 209 ve 109 bp'de bant vermektedir.

3.1.1. Serumda IL-6 Düzeylerinin Tayini

Serum örneklerinde IL-6 seviyesi tayini Sandviç ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

1- ELISA Yönteminin Genel Prensipleri

ELISA saptanmak istenen antijen (Ag) veya antikörlerin (Ab) tayininde kullanılan duyarlı bir laboratuvar yöntemidir.

ELISA iki 2 farklı yöntem ile ölçüm yapar:

- 1) Ortamdaki antijenleri tanıyabilen antikörlerin kullanımı ile antijenleri saptar.
- 2) Kullanılan antijenler sayesinde ortamdaki antikörleri saptar.

Antikorlar kullanılan test kitindeki kuyucukların duvarına yapışarak reaksiyona girerler. Antikor veya antijen varlığında bir renk değişimi meydana gelir, bu renk değişimi ışığın kırılma ve emilimi kuralına dayanarak çalışan bir alet sayesinde bize yoğunlaşma ve emilme olarak sonuçlar verir.

ELISA yöntemi 5 basamakta yapılan bir işlemdir:

- 1) ELISA kabındaki kuyucuklar antijen ile kaplanır.
- 2) Yanlış pozitif sonucu önlemek için antijen ile kaplanmamış yerler kapatılır.
- 3) Kuyucuklara antikor eklenir.
- 4) Bir enzime bağlı olan fare veya tavşan karşıtı IgG kuyucuklara eklenir. Bu ortamdaki ikinci antikordur.
- 5) Substratın enzimle reaksiyonu sonucu beklenen renk değişimi olursa bu bir pozitif reaksiyondur ve renk değişiminin ışığı emilimine göre yoğunluk belirlenir.

Kullanılan ELISA kitleri ile hedef protein miktarı fotometrik okuyucu sayesinde saptanan renk değişikliğinin şablon eğriye (standard curve) olan oranından yararlanılarak bulunabilir.

2-Serum IL-6 Düzeyi Tayininde Kullanılan ELISA Yönteminin Basamakları

Serum IL-6 düzey tayininde kullanılan ELISA kiti Biosource firmasına ait olup, katalog numarası KHC0011dir. Kullanılan standart solüsyonlar 0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 pg/ ml olacak şekilde hazırlanmıştır. İşlem aşamaları aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

- a) Tüm ayıraçlar ve örnekler oda sıcaklığına getirilip vortekslenip karıştırılmıştır
- b) ELISA için kullanılacak olan kitin mikrotitre kuyucukları açılıp, kuyucuklara 50 µl standart ve örnekler eklenmiştir
- c) Her bir kuyucuğa 100 µl Biotin konjugatı eklenerek 2 saat inkübe edilmiş ve 4 kez yıkanmıştır
- d) Her bir kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP çalışma solüsyonu eklenerek 30 dakika sıcaklığında bekletilmiş ve 4 kez yıkanmıştır

- e) Her bir kuyucuk içerisindeki sıvılar aspire edilip 100 µl stabilize kromojen ile 30 dakika inkübe edilmiştir
- f) Kuyucukların üzerine 100 µl stop solüsyonu eklenip, iyice karıştırılmıştır
- k) Referans olarak 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okuma yapılmıştır.

3.1.2. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizinde SPSS 11.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

Genotip ve allelerin görülme sıklığının gruplararası farklılıklarının değerlendirilmesinde Ki kare, Fisher Kruskal Wallis ve Mann-Whitney testleri kullanılmıştır.

Genotip ve allellerin aktivite üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için Student's t-testi ve Anova kullanılmıştır. Allel frekansları gen sayma metoduna göre yapılmıştır.

Hasta ve kontrol grubuna ait serum düzeylerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı.

4. BULGULAR

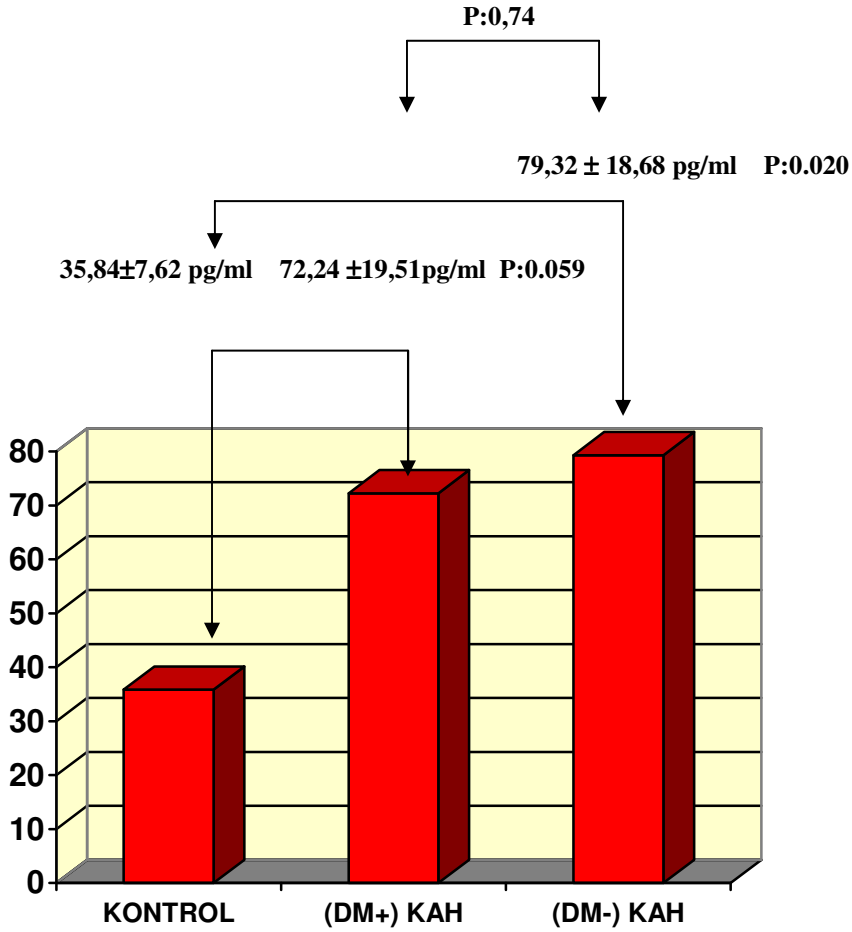
Çalışmamızda kullanılan sağlıklı ve hasta grubuna ait bilgiler Tablo 1’de gösterilmiştir. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş açısından anlamlı fark gözlenmemiştir. ($p>0.05$) İnterlökin 6 düzeyleri hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir ($p:0.011$) (Tablo 4.1.).

Tablo 4-1. ÇALIŞMA GRUPLARINA AİT BİLGİLER

	<i>KONTROL</i>	<i>KAH HASTA</i>
	<i>n=82</i>	<i>n=123</i>
<i>Örnek Sayısı (Kadın/Erkek)</i>	28/ 54	41 / 82
<i>Yaş Ortalamaları (yıl)</i>	54.80±1.75	58,12±0.91
<i>IL-6 düzeyi (pg/ ml)</i>	35.84±7.62	75.97±13.32

Tablodaki değerler $\bar{x}\pm SE$ olarak verilmiştir. n: örnek sayısı

Şekil 4.1.'de hasta ve kontrol grubunda IL-6 düzeyleri görülmekte. Hasta grubunu Diabet varlığına ve yokluğuna göre ikiye ayırarak inceledik. DM- hasta grubunda IL-6 düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olarak bulunmuştur. (p:0,020). Ancak DM+ hasta grubunda IL-6 düzeyleri kontrol grubundan yüksek fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir (p:0,059). Ayrıca hasta grupları arasında da IL-6 düzeyleri açısından fark gözlenmemiştir (p:0,74) (One way ANOVA testi).



Şekil 4-1: Hasta ve kontrol grubunda IL-6 düzeyleri dağılımı

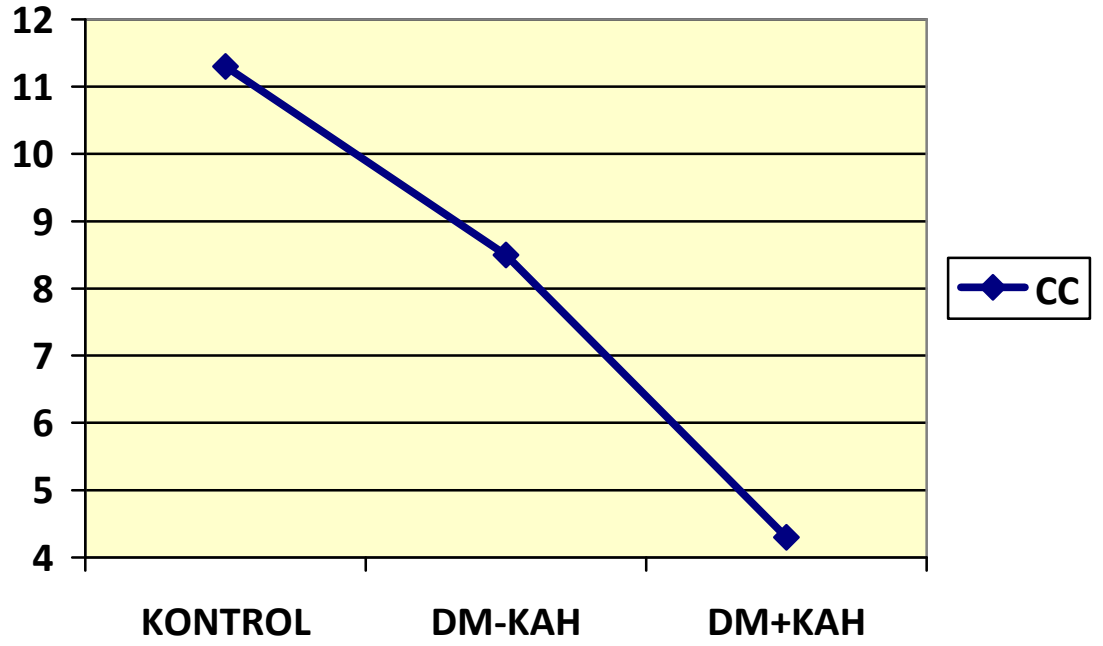
Tablo 4.2.'de çalışma gruplarındaki -765 Cox-2 G-C gen polimorfizmi sonuçlarının dağılımı görülmektedir.

Hasta ve kontrol grubunda genotip dağılımı açısından anlamlı fark gözlenmemiştir (p: 0,58, X^2 : 2,81). Kontrol ve DM- KAH grupları incelendiğinde CC genotipinin hasta grubunda azaldığı ve 1.33 katlık bir koruma sağladığı gözlenmiştir (P:0,56 OR:1,33 %95 CI:0,49-3,55). Kontrol ve DM+ KAH grupları karşılaştırıldığında CC genotipinin 2,58 kat koruyuculuk oluşturduğu tespit edilmiştir (P:0,18 X^2 :1,74 OR:2,58 %95 CI:0,58-11,46).

Tablo 4-2 ÇALIŞMA GRUPLARINA AİT -765G-C COX-2 GENOTİP FREKANSLARI

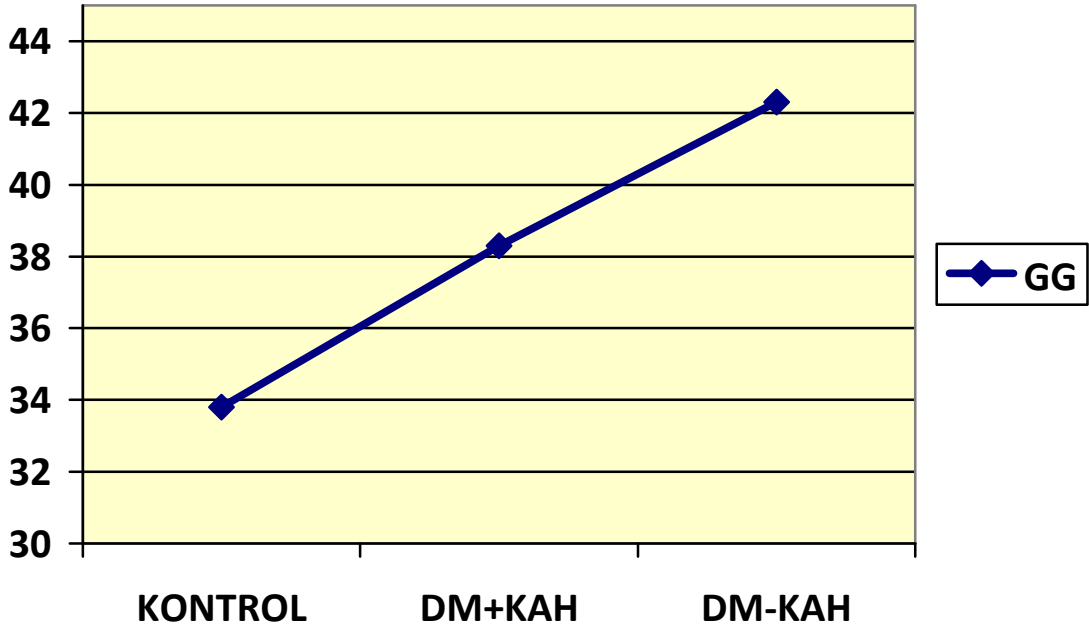
	<i>KONTROL</i>	<i>DM- KAH</i>	<i>DM+ KAH</i>
	<i>80</i>	<i>71</i>	<i>47</i>
-765G-C COX-2			
GENOTİPİ			
<i>CC</i>	9 (%11,3)	6 (%8,5)	2 (%4,3)
<i>GG</i>	27 (%33,8)	30 (%42,3)	18 (%38,3)
<i>GC</i>	44 (%55,0)	35 (%49,3)	27 (%57,4)

Şekil 4.2 de CC genotip frekansının kontrolde en yüksek DM+KAH larda ise en düşük olarak tespit edilmesi bu genotipin koruyuculuğunu kanıtlamaktadır (P:0,27 X^2 :1,17 OR:1,64 %95 CI:0,66-4,08).



Şekil 4-2: Çalışma gruplarında CC genotip frekans dağılımı

Şekil 4.3 de GG genotip frekansının kontrolde en düşük KAH larında ise en yüksek frekansta tespit edilmesi bu genotipin hastalık için risk faktörü teşkil ettiğini kanıtlamaktadır (P:0,30 X^2 :1,06 OR:1,36 %95 CI:0,75-2,46).



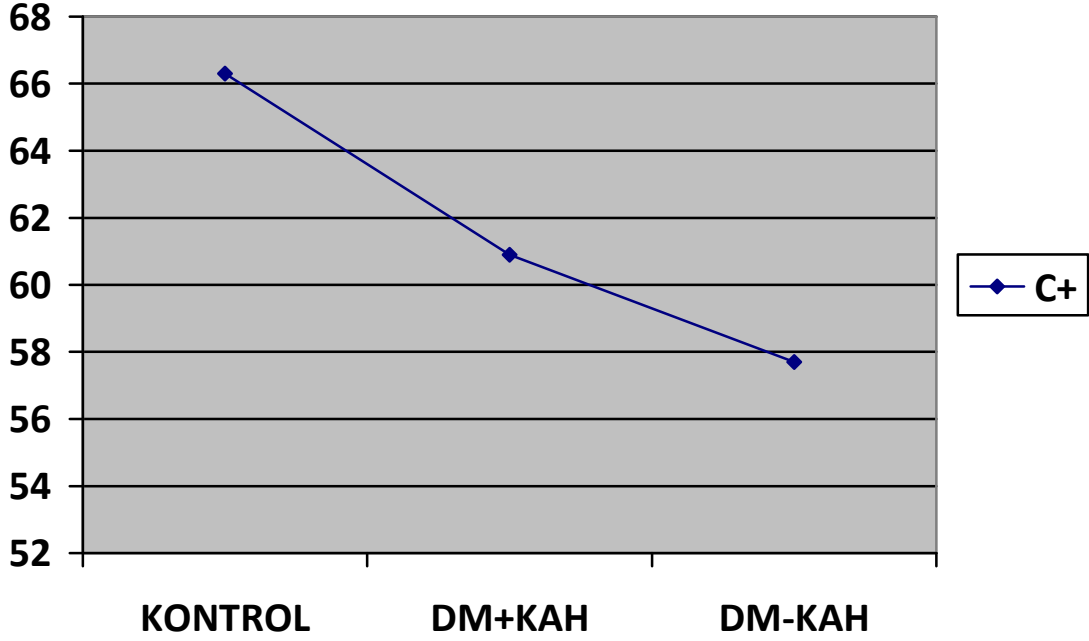
Şekil 4-3: Çalışma gruplarında GG genotip frekans dağılımı

Tablo 4.3.'te IL-6 C taşıma açısından kontrol ve DM- KAH grupları incelendiğinde C taşıyanların hasta grubunda azaldığı gözlenmiş ancak herhangi bir anlamlılık tespit edilmemiştir. (P:0,28 X^2 :1,15 Odds oranı:0,69 %95 Güven Aralığı:0,36-1,34) Benzer şekilde kontrol ve DM+ KAH grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p:0,54 X^2 :0,36) (Tablo4.3.).

Tablo 4-3: IL-6 TAŞIMA AÇISINDAN ÇALIŞMA GRUPLARININ İNCELENMESİ

	<i>KONTROL</i>	<i>DM- KAH</i>	<i>DM+ KAH</i>
	<i>80</i>	<i>71</i>	<i>47</i>
IL-6 C Taşıma			
C-	27 (%33,8)	30 (%42,3)	18 (%39,1)
C+	53 (%66,3)	41 (%57,7)	28 (%60,9)

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir.



Şekil 4-4: Çalışma gruplarında -765 G-C COX-2 C alleli frekans dağılımları

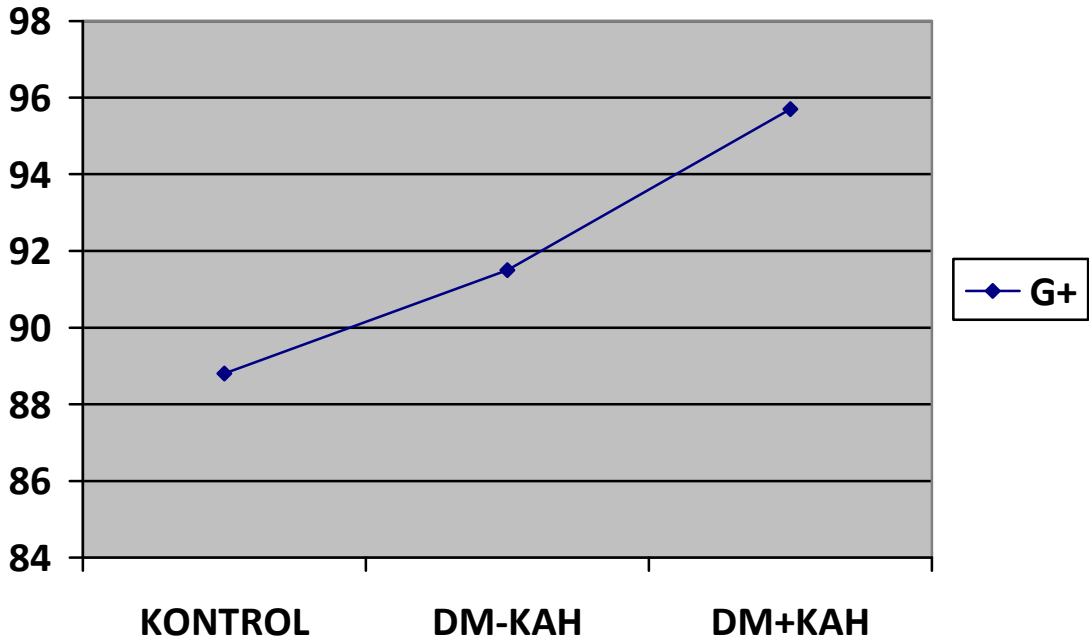
-765 G-C COX-2 G alleli taşıma açısından çalışma gruplarına ait bilgiler Tablo 4.4. te verilmiştir. Kontrol ve DM- KAH grupları incelendiğinde G alleli taşıyanların frekansının hasta grubunda arttığı ve 1,37 kat hastalık riski oluşturduğu gözlenmiştir (p:0,56 X^2 :0,32 Odds oranı: 1,37 %95 Güven Aralığı: 0,46-4,07) (Tablo 4.4)

Benzer şekilde kontrol ve DM+ KAH grupları incelendiğinde G alleli taşıyanların hasta grubunda 2,78 kat arttığı tespit edilmiştir (p:0,18 X^2 :1,74 Odds oranı: 2,78 %95 Güven Aralığı: 0,57-13,50) (Tablo4.4.)

Tablo 4-4. -765 G-C COX-2 G ALLELİ TAŞIMA AÇISINDAN ÇALIŞMA GRUPLARININ İNCELENMESİ

-765G-C COX-2	KONTROL	DM- KAH	DM+ KAH
G Taşıma	80	71	47
G-	9 (%11,3)	6 (%8,5)	2 (%4,3)
G+	71 (%88,8)	65 (%91,5)	44 (%95,7)

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir



Şekil 4-5: Çalışma gruplarında -765 G-C COX-2 G alleli frekans dağılımları

Çalışma gruplarında -765 G-C Cox-2 genotiplerine göre IL-6 düzeyleri incelendiğinde kontrol grubunda GG genotipli bireylerde en yüksek il- 6 düzeyi tespit edilirken CC

genotipli bireylerde en düşük düzey saptanmış ancak istatistiksel anlamlılık elde edilmemiştir ($p>0.05$ One way ANOVA). Bu grupta İL-6 düzeyleri GG>GC>CC şeklinde tespit edilmiştir. DM+ KAH grubunda genotiple arası il -6 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). (Tablo 4.5)

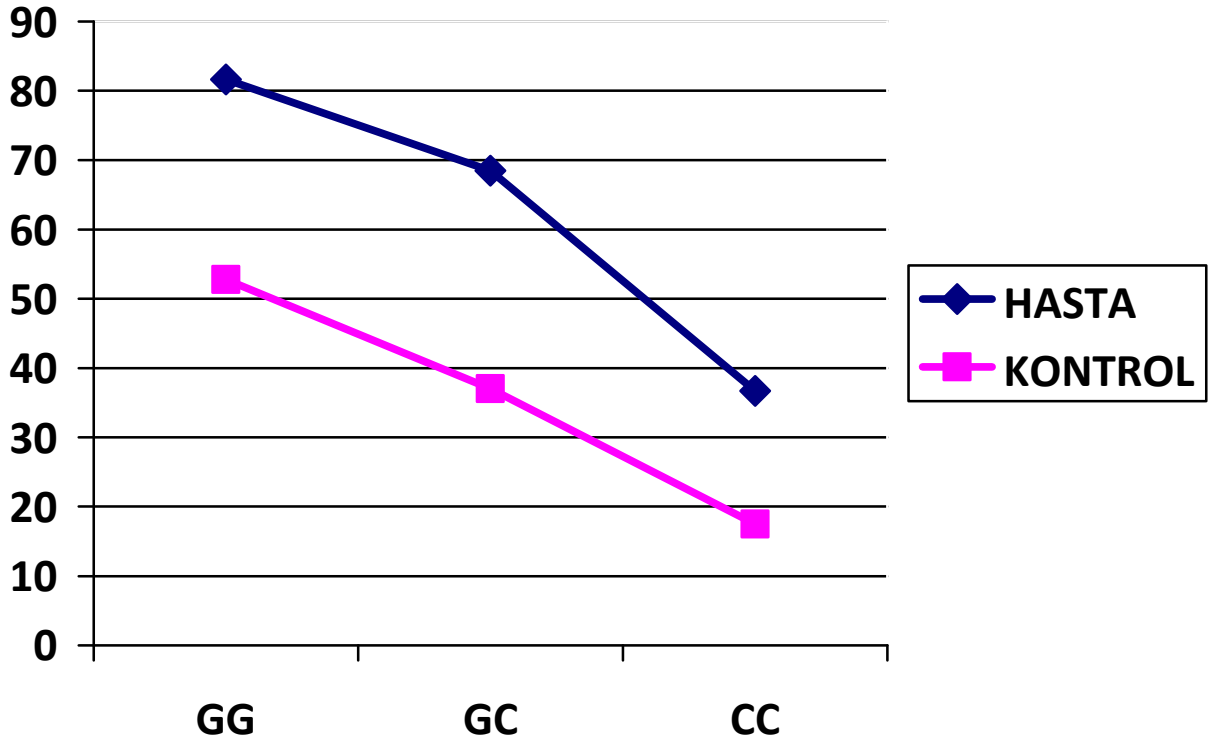
Tablo 4-5: Hasta ve kontrol Grubunda -765 G-C COX-2 Genotiplerine Göre İL 6 Düzeyleri

	<i>KONTROL</i>	<i>DM- KAH</i>	<i>DM+ KAH</i>
CC	17,53±3,79	55,2±6,23	18,4±4,36
GG	52,8±34,09	105,2±34,11	46,26±19,44
GC	37,02±8,93	63,84±22,13	75,40±35,18

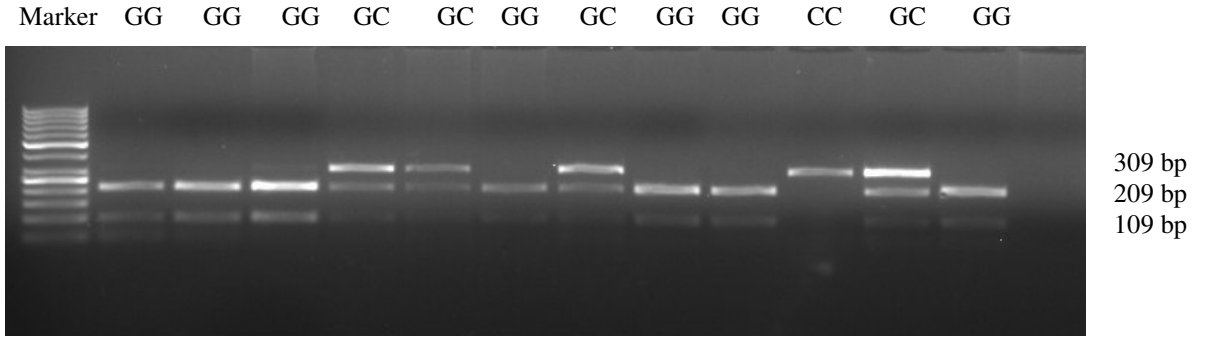
Tablodaki değerler $\bar{x} \pm SE$ olarak verilmiştir

Hasta grupları birleştirilerek (DM- ve DM+ KAH) genotiplere bağlı il-6 düzeyleri incelendiğinde GG genotipli bireylerde $81,63 \pm 22,63$, GC genotipli bireylerde $68,46 \pm 18,63$, CC genotipli bireylerde ise $36,70 \pm 18,30$ olarak tespit edilmiştir. İL-6 düzeylerinin GG>GC>CC şeklinde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6)

İL 6 DÜZEYLERİ



Şekil 4-6: (DM- ve DM+ KAH) genotiplere bağlı il-6 düzeyleri



Şekil 4-7. -765 G-C COX-2 gen polimorfizmine ait bir örnek.

C alleli 309, G alleli 209 ve 109 bp de bant vermektedir.

5. TARTIŞMA

Batı toplumlarında Tip 2 Diabet pandemik oranlarda artışa neden olarak morbidite ve mortalite ile sonuçlanmaktadır (1,2). Tip 2 diabet; kardiyovasküler risk faktörleri , hipertansiyon , obezite ,artmış plazminojen aktivatör inhibitörü, fibrinojen, dislipidemi , serumda trigliserit seviyesi artması , düşük HDL kolesterol ile ilişkilidir (3,4)).

Diabetin vasküler sistem üzerinde ağır etkileri vardır. Genel popülasyona göre Tip 2 diabetli kişilerde koroner arter riski 2 ile 4 kat daha fazladır.Aorttan en küçük arterlere ve kapillerlere kadar her boyuttan damar etkilenir. Aortta ve büyük , orta büyüklükteki arterlerde hızlı şiddetli ateroskleroz görülür. Daha şiddetli ve daha erken yaşta olması dışında , diabetiklerde görülen aterosklerozun non diyabetiklerde görülenlerden farkı yoktur. Koroner arterlerin aterosklerozu nedeniyle meydana gelen myokardiyal enfarktüs , diyabetiklerde en sık ölüm nedenidir.(21,22)

Ateroskleroz endotel hasarına karşı damar duvarının geliştirdiği kronik iltihabi bir yanıttır. Diabetik kardiyovasküler komplikasyonlar, ateroskleroz ve aterom plaklarının oluşmasında endotel zedelenmesi temel rol oynar.Bazı sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin de plak gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir. Bunlar arasında interferon γ (IFN γ), interlökinler 1, 2 ve 6 (IL-1,IL-2; IL-6), TNF, CSF, IGF-1 ve IGF-2, FGFgibi birçok aktif molekül bulunur. (98).

Poliansature yağ asitleri oksijenasyonunun ilk ürünü mekanizmada anahtar basamak olarak bisiklik peroksitlerin (endoperoksit) oluşumudur. Kompleks kimyasal transformasyon uygulaması olan enzim olarak cox-1,2 enzimi tanımlanmıştır ve 1973'de prostaglandin endoperoksitlerin izolasyonu sonucu belirlenmiştir.

Ek olarak Cox oldukça etkileyici bir şekilde metabolik transformasyonu katalizlediğinden önemli derecede farmakolojik açıdan hedef olmuştur (44). Vane 1971'de prostaglandin oluşumunu inhibe eden NSAİİ'ler tayin etmiş ve invivo antiinflamasyon aktiviteleri ile invitro ortamda inhibitör ilişkilerini doğrulamıştır. Bunun yanı sıra NSAİİ'lerin yararlı aktiviteleri, aynı zamanda gastrointestinal toksisite ve koagülasyonda etkileri belirlenmiştir. Prostaglandin ve ilişkili moleküller (tromboksan vb...) fizyolojik ve patofizyolojik cevaplarda belirgin şekilde ilişkilidir.Cox-2 geni keşfiyle Cox-1 enziminden farklı protein ürünü olması nedeniyle NSAİİ'lerle izoform selektif inhibitörler ayrılmıştır (45-48). Bu hipotez sonucu Cox-2

inhibitörlerinin anti inflamasyon ve analjezik olduğu gastrik toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (49-50).

Cox ; izoprostanoidlerden prostaglandin oluşumunu artırarak proses yürümektedir. Araşidonik asitin spontane oksidasyonu ile Cox katalizi arasındaki major farklılık yüksek derecede enzimatik reaksiyonun stereokimyasal kontrolü ile yüksek oranda Cox katalizi gerçekleşir. Oksijenasyonun stereokimyasal kontrolü ve 13 – pro- S- hidrojen uzaklaştırılması ile stereospesifiklik sağlanır ve Cox burda önemli sorumluluklar yüklenmektedir. Cox-1 ve 2 kristal yapılarında her ikisinde de yağ asidi substratı ile Tyr 385 pozisyonundaki Tyr ile reaksiyonu sonucu açığa çıkmaktadır (57).

Cox-1 doku homeostazisine katılan oldukça yaygın eksprese edilen ana enzimdir. Aksine Cox-2 indüklenebilir izoformdur ve çoğu dokuda düşük seviyelerde eksprese edilir ve LPS ler tarafından stimüle edilir growth faktör ve sitokinler örneğin; TNF alfa , IL-6, adiponektin, adipsin, C-peptid, Ghrelin, GIP, GLP-1, Glukagon, IL-6, İnsulin, Leptin, PAI-1, Resistin, Visfatin (66,67) inflamasyon olaylarında rol oynar bu yönü itibariyle ateroskleroz , romatoid hastalıklar ve karsinogenezde rol alır (68,69). Cox 1 ve Cox 2 koagülasyon , renal fonksiyon ve gastrointestinal sistemin içinde olduğu fizyolojik olaylarda , patofizyolojik olaylar olan inflamasyon , artritde rol alır. Cox-2 ekspresyonu çoğu dokuda düşüktür fakat sitokin , growth faktör , tümör promotorlarının da dahil olduğu çeşitli mediatörler tarafından indüklenmektedir. Cox-2 aktivitesi SSS ve inflamasyon hücrelerindeki PG sentezinden öncelikle sorumludur. Bu patofizyolojik cevapları (inlamasyon , artrit , ağrının da dahil olduğu) içerir (70).

Prostaglandin ekspresyonu ve aktivitesi kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda etkilidir.

İnflamasyon gelişimi ve kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde prostaglandinler rol almaktadır. Bilindiği gibi prostaglandinler , Prostaglandin endoperoksit H sentaz diğer adıyla siklooksijenaz tarafından üretilirler.Cox-2 tarafından üretilen PGE , subklinik ateroskleroz , MMPLerin salınımı , plak yırtılması , kardiyovasküler hastalıklarda artmaktadır. Prostaglandin E aktivitesinde oldukça etkilidir. Koroner arter hastalığı patogenezinde inflamasyon aterom oluşumunda önemli rol oynar(103-105)

Cox-2 ekspresyonu aterosklerotik plaklarda matriks metalloproteinazların üretimindeki artışa bağlı olarak diabete bağlı koroner kalp hastalıklarında endotelial hücrelerde artmaktadır. Tartışmaya yol açacak şekilde aterojenezde regüle edilen Cox-2 fonksiyonu inhibisyonu söz konusudur (71,72).

Aterosklerozda Cox-2 nin direkt rolü insandaki aterosklerotik lezyonların ekspresyonunda belirgin şekilde çalışmalarla gösterilmiştir. Cox-2 sonucu oluşan PGE2 subklinik aterosklerozda artmıştır (73-75). Paradoksal olarak oksidatif strese maruz kalan kardiyomyositlerde bu enzimin koruyucu fonksiyonu olduğu işaret edilmektedir ve aynı zamanda iskemi/reperfüzyon hasarı hazırlama özelliğine sahiptir (76). Cox-2 nin indüksiyon oranına bağımlı olarak yararlı ve zararlı etkileri kullanılmaktadır, patofizyoloji ve spesifik hücrelerde PGH2 metabolize edilerek sitoprotektif veya proinflamatuvar prostanoitler uygun şekilde kullanılmaktadır (77).

Ateroskleroz , tromboz ve vasküler biyoloji alanında Papafili ve arkadaşları Cox-2 promotöründe -765G>C varyantını tanımlamış varsayılan sp1 bağlanma bölgesi gösterilmiştir, -765 G alleli ile karşılaştırıldığında promotör aktivitesinde yaklaşık %30 oranında düşüş gözlenmiştir. Cox-2 geni 5' bölgesinde gen transkripsiyonunu düzenleyici TATA kutusu ve CRE, NF kB, NF-IL-6, GRE, PEA3, AP2, C/EBP, TGF beta, sp1 multiple cevap elemanları transkripsiyon faktörleri olarak bağlanır. Özellikle Sp1 G-zengin elementleri içinde Cox-2 transkripsiyonunda aktivatör olarak düşünülür (86). Papafili ve arkadaşları seçilmiş koroner arter bypass graft (CABG) ameliyatı geçirmiş hastalarda C allelinde plazma düzeyindeki CRP de düşüş gözlenmiştir (87). CRP seviyesi >3mg/l iken -765 GC (1.8+0.3) ve -765 CC(2.1+0.2)şeklindedir. Cox-2 seviyesi aterosklerozun da dahil olduğu kronik inflamatuvar hastalıklarda artmaktadır. Cox-2 ekspresyonu endotel ,düz kas,monositler ve insandaki aterosklerotik lezyonlardaki makrofajlarda saptanmıştır (88,89) Ateroskleroz ve tromboz oluşumuna katkısı olan ; tromboksan stimülasyonu ile vazokonstriksiyon , trombosit agregasyonu ve lökosit – endotel hücre adhezyonu Cox-2 enzimi yoluyla çoğu prostaglandin üretilmektedir (90,91). Ancak vazodilatasyon , trombosit agregasyonu inhibisyonu, lökosit aktivasyonunda rol oynayan prostasiklin , ana prostaglandin olarak endotel hücrelerinde üretilir (92).

İnflamasyona neden olan her uyarın AP-1, NF kapa B , T hücrelerini aktive eden nükleer faktör, IL-6 gibi pek çok transkripsiyon faktörü aracılığıyla COX-2 indüksiyonuna neden olur. COX-2' nin aşırı yapımı prostoglandin (PGE2) gibi proinflamatuvar mediatörlerin yapımını artırır. PGE2 inflamatuvar reaksiyonlar esnasında en fazla üretilen ve immün fonksiyonların regülasyonunda rol alan bir moleküldür (107,108)

W.R.Leifert ve arkadaşları; sağlıklı kişilerde multifonksiyonel pro-inflamatuvar sitokin olan Interlökin-6 (IL-6) düşük seviyede tespit edilmiştir. Ateroskleroz,

kardiyovasküler hastalıklar (obezite, MI ve tip II diabet) IL-6 seviyesinde artış gözlenmiştir . IL-6, TNF α , akut faz protein CRP ve fibrinojen bu hastalıkların gelişiminde biyokimyasal risk faktörü olarak anahtar rol oynamaktadır. (124)

Johansson ve ark. Tip 2 diabetli hastalarda inflamasyon faktörleri arasında ilişki araştırılmıştır.Yaptıkları çalışmada hs CRP ve IL-6 ($r=0.27$, $p<0.0001$) tip 2 diabetli hastalarda pozitif korelasyon gözlenmiştir.(122)

Bizde yaptığımız çalışmamızda hasta grubunu Diabet varlığına ve yokluğuna göre ikiye ayırarak inceledik. DM- hasta grubunda IL-6 düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olarak bulunmuştur. ($p:0,020$). Ancak DM+ hasta grubunda IL-6 düzeyleri kontrol grubundan yüksek fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p:0,059$). Ayrıca hasta grupları arasında da IL-6 düzeyleri açısından fark gözlenmemiştir ($p:0,74$)(One way ANOVA testi)

Yaptığımız çalışmada hasta ve kontrol grupları arasında yaş açısından anlamlı fark gözlenmemiştir. ($p>0.05$) İnterlökin 6 düzeyleri hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir ($p:0.011$)

İlk çalışmalar C allelinin MI ,felç ve serebrovasküler iskemiye karşı koruyucu etki sağladığı olasılığını göstermektedir. C alleli kardiyo ve serebrovasküler, hiperkolesterolemili hastalarda inflamasyon markerları olan CRP ve IL-6 nın seviyelerindeki düşüş ile ilişkilendirildi (87,93)

Çalışmamızda IL-6 C taşıma açısından kontrol ve DM- KAH grupları incelendiğinde C taşıyanların hasta grubunda azaldığı gözlenmiş ancak herhangi bir anlamlılık tespit edilmemiştir. ($P:0,28$).Benzer şekilde kontrol ve DM+ KAH grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.($p:0,54$)

Tablo 5-1: -765 G-C Gen Polimorfizmi Yapılan Çalışmalar

Yazar	İrk	Sonuç
	<i>Pozitif ilişkili çalışmalar</i>	
Papafili ve arkadaşları	İngilizler	C alleli varlığında düşük promotör aktivitesi ve klinik ve subklinik aterosklerozlu hastalarda inflamasyon sistemik markerı olan CRP düzeyinde azalma
J.orbe ve arkadaşları		C alleli taşıyıcılarında daha az Cox 2 ekspresyonu ,inflamasyon markerlarında azalma CRP,IL-6;p<0,05 olduğunu göstermiştir.
F.Cippollone ve arkadaşları	İtalyan	C alleli taşıyanlarda hsCRP daha düşük, MI ve felç azaltıcı etkisi gözlenmiştir.
Shigetako ,Furukado ve arkadaşları	Japon	C alleli taşıyanlarda karotid plak oluşumunda ve IL-6 düzeyinde azalış olduğu tespit etmişlerdir.
	<i>İlişkili Bulunmayan Çalışmalar</i>	
Haegermer ve arkadaşları		MI ve Felçle ilişkisi bulunamamıştır
Kohsaka ve arkadaşları(ARIC Study)	Afrikalı Amerikalılar	felçte risk faktörü olduğunu rapor ettiler

M.E.Rudock ve arkadaşları	Beyaz ırk	Diabetiklerde kardiyovasküler hastalık gelişiminde varyantlarda daha yüksek risk oluşturabileceği tespit edilmiştir
K.H.Huuskonen ve ark	Beyaz ırk	Koroner arter hastalık gelişiminde C alleli riskli

Papafili ve ark. -765 G-C Cox2 polimorfizmi bypass geçirmiş koroner arter hastaları ile sağlıklı kontrol arası CRP seviyesinin genotipe güçlü şekilde bağlı olduğu bulundu.C allel taşıyanların belirgin şekilde daha düşük olduğu tespit edildi($p<0,05$)

Ancak ilk yöntemlere karşıt olarak Haegamer ve arkadaşları Cox-2 polimorfizmi /haplotipinde ne MI nede iskemik felçle bir ilişki bulunmadığını açıkladı (94).

Dahası Kohsaka ve arkadaşları Cox 2 -765 G>C polimorfizminin Amerikalı Afrikalılarda felçte gerçekte risk faktörü olduğunu rapor ettiler (95).).ARIC çalışmasında Afrikalı Amerikalılarda C allel tehlikeli bir şekilde felçe neden olduğu saptandı ($p=0,03$).

Kohsaka ve Hagemer in tespit ettikleri bulguların oldukları aksine bizim çalışmamızda kontrol ve DM+ KAH grupları incelendiğinde G alleli taşıyanların hasta grubunda 2,78 kat arttığı tespit edilmiştir ($p:0,18$).

Papafili ve arkadaşları invitro ortamda 5' yönündeki Cox-2 gen bölgesinde – 765 G>C ilişkili C alleli varlığında düşük promotor aktivitesi ve klinik ve subklinik aterosklerozlu hastalarda inflamasyon sistemik markerı olan CRP düzeyinde azalma tanımlandı. Single nükleotit polimorfizminin de (SNP) gelecekteki klinik kardiyovasküler olaylarda azalışı ilişkilendirildi (87,93).

2004 yılında 1728 italyanda F.Cipollone,yaptığı çalışmada -765GC prevalansı 2,41 kat hastalara göre kontroller daha fazla(43,3% ve 17,9%; $p<0,001$),-765 CC 5,81 kat daha fazla(6,4%ve 1,1%; $p=0,04$), MI ve felç geçirenlerin -765 GC ,-765CC prevalansı 0,48(95% CI,0,36-0,68) ve 0,33(95%CI, 0,24-0,55), -765 C alleli taşıyanlarda hsCRP daha düşük (SD0,78(0,1) ve 2,56(0,4)mg/l; $p=0,04$) -765G-C polimorfizmi MI ve felç azaltıcı etkisi gözlenmiştir(71,74,125).

Çalışmamızda Kontrol ve DM- KAH grupları incelendiğinde G alleli taşıyanların frekansının hasta grubunda arttığı ve 1,37 kat hastalık riski oluşturduğu gözlenmiştir (p:0,56 Benzer şekilde kontrol ve DM+ KAH grupları incelendiğinde G alleli taşıyanların hasta grubunda 2,78 kat arttığı tespit edilmiştir (p:0,18).

Orbe, 2005 yılında yaptığı çalışmasında rs 20417 -765 G-C Cox2 polimorfizmi hiperkolesterolemili Calleli taşıyıcılarında daha az Cox 2 ekspresyonu $p<0,05$,inflamasyon markerlarında azalma CRP,IL-6;p<0,05 olduğunu göstermiştir.En düşük COX-ekspresyonu hiperkolesterolemili kişilerde CC genotipi (0.10 T0.04), GC(0.13 T0.02) ve GG (0.14T0.01) genotipleri ile karşılaştırıldığında 765C allel taşıyanlarda COX-2 ekspresyonu (0.11T 0.06)belirgin şekilde than in GG homozigot taşıyanlardan daha düşüktür (p =0.04).

CC(7,7%) ,CG(34,5%),GG(57,7%) Hiperkolesterolemili kişi (n=140), C allel taşıyanlarda GG homozigotla karşılaştırıldığında düşük Cox-2 ekspresyonu(p<0,05),karotid IMT azaltıcı (p<0,01) ve inflamasyon markerları seviyesinde düşme (CRP, vWF, IL-6 p=0,05) tespit etmişlerdir (93).

Yaptığımız çalışmada hasta grupları birleştirilerek (DM- ve DM+ KAH) genotiplere bağlı il-6 $68,46\pm 18,63$, CC genotipli bireylerde ise $36,70\pm 18,30$ olarak tespit edilmiştir. IL-6 düzeylerinin GG>GC>CC şeklinde azaldığı tespit edilmiştir.

Shigetaka Furukado ve arkadaşları hasta grubunda C allelinin (n=44) ,G alleleline(n=425)göre daha az rastlamışlardır(p:0.017)Aterosklerotik risk faktörlerinden plak kalınlığı, Il-6 serumda seviyesi(p:0.027) -765 GG genotipine göre belirgin şekilde varyant genotipine daha az rastlanmıştır(123)

M.E. Rudock ve arkadaşları 977 beyaz ırkta (%83T2DM) 8 Cox 2 polimorfizmini koroner, karotid arteriyel aort yataklarında , vasküler kalsifiye plaklar da çalıştılar. Bunlardan 3 tane SNP (rs 689466,rs2066826, rs20417) koroner ve kalsifiye plaklarda ilişkili buldular. Diabetik hastalarda bu varyantların kardiyovasküler hastalık gelişiminde daha yüksek risk taşıyabileceğini tespit ettiler (125).

K.H.Huuskonen ve ark; C allel taşıyanlarda (p:0.024) G allel taşıyanlara göre koroner arter daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (55).

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda genotip dağılımı açısından anlamlı fark gözlenmemiştir (p: 0,58). Kontrol ve DM- KAH grupları incelendiğinde CC genotipinin hasta grubunda azaldığı ve 1.33 katlık bir koruma sağladığı gözlenmiştir (P:0,56). Kontrol ve DM+ KAH grupları karşılaştırıldığında CC genotipinin 2,58 kat koruyuculuk oluşturduğu tespit edilmiştir (P:0,18). CC genotip frekansının kontrolde en yüksek DM+KAH larda ise en düşük olarak tespit edilmesi bu genotipin koruyuculuğunu kanıtlamaktadır (P:0,27)GG genotip frekansının kontrolde en düşük KAH larında ise en yüksek frekansta tespit edilmesi bu genotipin hastalık için risk faktörü teşkil ettiğini kanıtlamaktadır (P:0,30).

Biz çalışmamızda 123 hasta, 82 kontrol ile çalışma yaptık

Bizim çalışmamızda bulduğumuz C alleli koruyuculuğu ve il-6 ilişkisi Orbe, Cipollone,Papafili , Shigetaka Furukado bulgularıyla uyumlu iken; Kohsaka, Haegamer, M.E.Rudock ,K.H.Huuskonen bulgularıyla çelişmektedir.

Çalışma gruplarında -765 G-C Cox-2 genotiplerine göre IL-6 düzeyleri incelendiğinde kontrol grubunda GG genotipli bireylerde en yüksek il- 6 düzeyi tespit edilirken CC genotipli bireylerde en düşük düzey saptanmış ancak istatistiksel anlamlılık elde edilmemiştir (p>0.05 One way ANOVA). Bu grupta IL-6 düzeyleri GG>GC>CC şeklinde tespit edilmiştir.DM+ KAH grubunda genotiple arası il -6 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır (p>0.05). Bu bulgumuzu daha büyük örnek sayılı hem DM+ koroner arter , hem DM- Koroner arter hasta gruplarını inceleyerek güçlendirmeyi hedefliyoruz.

Sonuç olarak söyleyecek olursak; tez çalışmamız Türk toplumunda diabete bağlı kardiyovasküler hastalıklarda -765 G-C Cox-2 geninin varyasyonlarının incelendiği ilk araştırmadır. Çalışmamızda çalışma gruplarında -765 G-C Cox-2 genotiplerine göre IL-6 düzeyleri incelendiğinde kontrol grubunda GG genotipli bireylerde en yüksek il- 6 düzeyi tespit edilirken CC genotipli bireylerde en düşük düzey saptanmış ancak istatistiksel anlamlılık elde edilmemiştir (p>0.05 One way ANOVA). Bu grupta IL-6 düzeyleri GG>GC>CC şeklinde tespit edilmiştir.DM+ KAH grubunda genotiple arası il -6 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır (p>0.0 Kontrol ve DM- KAH grupları incelendiğinde CC genotipinin hasta grubunda azaldığı ve 1.33 katlık bir

koruma sağladığı gözlenmiştir (P:0,56). Kontrol ve DM+ KAH grupları karşılaştırıldığında CC genotipinin 2,58 kat koruyuculuk oluşturduğu tespit edilmiştir (P:0,18).CC genotip frekansının kontrolde en yüksek DM+KAH larda ise en düşük olarak tespit edilmesi bu genotipin koruyuculuğunu kanıtlamaktadır (P:0,27). Benzer şekilde kontrol ve DM+ KAH grupları incelendiğinde G alleli taşıyanların hasta grubunda 2,78 kat arttığı tespit edilmiştir (p:0,18)

Sonuçta ; diabete bağlı kardiyovasküler hastalıklarda Cox-2 polimorfizmi ve inflamasyon markerları düzeyinin daha kapsamlı olarak araştırılmaya gereksinimi vardır.Daha büyük örnek gruplu bir araştırmada incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Cox-2 gen varyantlarının diabete bağlı kardiyovasküler hastalıklarda gen gen etkileşimi olduğu ve inflamasyon markerları düzeyi etkileşiminin etkili olabileceği gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Sjöholm A, Nyström T. Endothelial inflammation in insulin resistance. *Lancet*. 2005; 365: 610-2.
2. Biondi-Zoccai GGL, Abbate A, Liuzzo G, Biasucci LM. Atherothrombosis, inflammation, and diabetes. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 1071-7.
3. Laakso M, Lehto S, Penttilä I, Pyörälä K Lipids and lipoproteins predicting coronary heart disease mortality and morbidity in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Circulation* 1993; 88: 1421±1430
4. Laakso M, Voutilainen E, Sarlund H, Aro A, Pyörälä K, Penttilä I Serum lipids and lipoproteins in middleaged non-insulin-dependent diabetics. *Atherosclerosis* 1985 ;56: 271±281
5. Atkinson MA, Maclaren NK: The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *N.Engl J. Med.* 1994 ; 331:1428-1436,
6. Baekkeskov S, Neilsen JH, Marnier B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A: Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children with immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* ,1982 ;298:167-169
7. Lu J, Li Q, Xie H, Chen Z, Borovitskaya AE, Maclaren NK, Notkins AL, Lan MS: Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase IA-2 Beta, as an autoantigen insulin dependent diabetes mellitus : precursor of the 37-kDa tryptic fragment *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ;93:2307-2311.
8. Cantor AB, Krischer JP, Cuthbertson DD, Schatz DA, Riley WJ, Malone J, Schwartz S, Quattrin T, Maclaren NK: Age and family relationship accentuate the risk of IDDM in relatives of patients with insulin dependent diabetes *J. Clin Endocrinol Metab* ,1995 ;80:3739-3743
9. Huang W, Connor E, Dela Rosa T, Muir A, Schatz D, Silverstein J, Crockett S, She JX, Maclaren NK: Although DR3-DRQB1 may be associated with multiple component disease of autoimmune polyglandular syndromes, the human leukocyte antigen DR4-DRQB1*10302 haplotype is implicated only in beta cell autoimmunity, 1996 *J Clin Endocrinol Metab* 81:1-5
10. Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay R, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, Lang DA: Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid

decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency . *Diabet Med* ,1994; 11:299-303

11. Banerji M, Lebovitz H:Insulin sensitive and insulin resistant variants in IDDM , *Diabetes* 1989 ;38:784-792

12, Reaven GM, Bernstein R, Davis B, Olefsky JM:Nonketotic diabetes :insulin deficiency or insulin resistance . , *AM J Med* 1976 ;60:80-88

13. Turner RC, Holman RR, Matthews D, Hockaday TDR,Peto J:Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes :estimation of their relatives contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose consentrations .,*Metabolism* ,1979 ;28:1086-1096

14. Scarlett JA, Gray RS, GriffinJ, Olefsky JM, Kolterman OG:Insülin teatment reverses the insülin resistance of type IIdiabetes mellitus . *Diabetes Care* ,1982 ;5:353-363

15. Wing RR, Blair EH, Bononi P, Marcus MD, Watanabe R, Bergman RN:Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients .*Diabetes Care* ,1994;17:30-36

16. Clark A, Charge SB, Badman MK, et al.”Islet amyloid polypeptide:actions and role in the pathogenesis of diabetes “*Biochem Soc Trans* 1996;24(2):594-9

17 Kissebah AH, Vydellingum N, Murray R, Evans DF, Hartz AJ, Kalkoff RK, Adams PW:Relationship of body fat distribution to metabolic complication of obesity .*J Clin Endocrinol Metab* ,1982;54:254-260 .

18 Sakane N, Yoshida T, Umekawa T and et al.”Effects of Trp 64 Arg mutation in the beta3 adrenergic receptor gene on weight loss,body fat distrubition ,glysemic control and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients”.*Diabetes Care* 1997;20(12):1887-90

19 Girard J:Leptin links obesity and insülin resistance .*Diabetes and Metabolism* 1997;23(supp3):16-24 *Endocrinology* 1998;139(12):4832-7

20 Uysal KT, Wiesbrock SM and Hotamisligil GS: Functional analysis of TNF receptors in TNF-alfa mediated insulin resistance in genetic obesity.

21. Barrett-Connor, E. L., Cohn, B. A., Wingard, D. L. And Edelstein, S. L. Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 1991 ; 265, 627±631

22. Manson, J. A. E., Colditz, G. A., Stampfer, M. J. et al. A prospective study of maturity-onset diabetes mellitus and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Arch. Intern. Med.* 1991;151, 1141±1147

- 23 Haris MI, Couric CC, Reiber G, Boyko E, Stern M, Bennet P (Eds) :Diabetes in America . 2nd ed. Washington DC, U.S.Govt. Printing Office ,1995(NIH publ.no.95-1468)
- 24 Newman B, Selby JV, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman GD: Concordance for type 2 diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 1987;30:736-738,
- 25 Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA: Diabetes in identical twins. *Diabetologia* 1981;20:87-93,
- 26 *Diabetologia* , 1985;28:412-419
27. Usitupa MIJ, Niskanen LK, Sitonen O, Voutilainen E, Pyörala K: Ten year cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipoprotein composition in type 2 diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia* 1993 ;11:1175-1184,
28. Zimmet PZ: Kelly West Lecture 1991: challenges in diabetes epidemiology: from west to the rest. *Diabetes Care* 1992; 15:232-252,
- 29, Haris MI: Impaired glucose tolerance in the U.S. population. *Diabetes Care* 1989. ;12:464-474,
30. Couston DR: Gestational diabetes in diabetes in America. 2nd ed. Washington DC, U.S.Govt. Printing Office, 1995(NIH publ.no.95-1468),p.703-717
31. Fujimoto WY, Leonetti DL, Kinyoun JL, Shuman WP, Stolov WC, Wahl PW: Prevalence of complications among second –generation Japanese –American men with diabetes , impaired glucose tolerance or normal glucose tolerance . *Diabetes* 1987;36:730-739,
32. Parving HH et al. Prognosis in diabetic nephropathy *BMJ* 299,1989
33. Parving HH; Microalbuminuria in essential hypertension and diabetes mellitus, *Journal of Hypertension* ; 1996;14:89-93
34. Elving LD, Bakkeren JAJM, Jansen MJH, Kat angelino CM, Nobel E, Munster PJJ; Screening for microalbuminuria in patients with diabetes mellitus: Frozen storage of urine sample decreases their albumin content. *Clin Chem* ;1989;35(2):308-310
35. Hobbs K: Laboratory evaluation .Rheumatology Secrets .Ed by Starling G West 2nd edition .Hanley –Belfus Inc.,Philadelphia ,2003,p.52
36. 66) Graziella Bruno, MD; Paolo Cavallo-Perin, MD; Giuseppe Bargero, MD; Milena Borra, MD; Nicola D’Errico, MD; and Gianfranco Pagano, MD; Association of fibrinogen with Glycemic Control and Albumin Excretion Rate in Patients with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Annals of Internal Medicine* 15 Oct 1996 Volume 125 Issue 8 pages 653-657

37. Taskiran M; Feldt Rasmussen B; Jensen GB; Jensen JS: Urinary albumin excretion in hospitalized patients with acute myocardial infarction: *Scand Cardivasc j*, 1998;163-6
38. Mc Kenna K, Thompson C: Microalbuminuria a marker to increased renal and cardiovascular risk in diabetes mellitus: *Scott Med J*, 1997 ;42(4):99-104
39. Rutter MK, Mc Comb JM, Brady S, Marshall SM; Silent myocardial ischemia and microalbuminuria in asymptomatic subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus: *Am J Cardiol* 1983(1): 27-31
40. Bindra, J. S., and Bindra, R. Prostaglandin Synthesis, 1977 pp. 7-22, Academic Press, New York
41. Hamberg, M., and Samuelsson, B. *J. Biol. Chem.* 1967 ;242, 5336 -5343
42. Hamberg, M., and Samuelsson, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1973 ; 70,899 - 903
43. Nugteren, D. H., and Hazelhof, E. *Biochim. Biophys. Acta* 1973;326, 448 - 461
44. Vane, J. R. *Nat. New Biol.* 1971; 231, 232-235
45. Fu, J.-Y., Masferrer, J. L., Seibert, K., Raz, A., and Needleman, P. *J. Biol. Chem.* 1990;265, 16737-16740
46. Xie, W., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L., and Simmons, D. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991; 88, 2692-2696
47. Kujubu, D. A., Fletcher, B. S., Varnum, B. C., Lim, R. W., and Herschman, H. R. *J. Biol. Chem.* 1991;266, 12866 -12872
48. O'Banion, M. K., Sadowski, H. B., Winn, V., and Young, D. A. *J. Biol. Chem.* 1991; 266, 23261-23267
49. Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C., and Seibert, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994;91, 3228 - 3232
50. Simon, L. S., Lanza, F. L., Lipsky, P. E., Hubbard, R. C., Talwalker, S., Schwartz, B. D., Isakson, P. C., and Geis, G. S. *Arthritis Rheum* 1998
51. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97 - 120.
52. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med* 2002;53:35 - 57.
53. Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001;107:1491 - 5.

54. Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68 - 69:95 - 114.
55. Kati H. Huuskonen, Tarja A. Kunnas, Minna M. Tanner, Jussi Mikkelsen, Erkki Ilveskoski, Pekka J. Karhunen, Seppo T. Nikkari. COX2 gene promoter polymorphism and coronary artery disease in middle-aged men: The Helsinki sudden death study. *HPCM of inflammation volume 2008*, article ID 289453,5
56. V.Kumar, R.S.Cotran, S.L.Robbins *Basic Pathology* 2003, 7.edition 48-50, 643-650
57. Karthein, R., Dietz, R., Nastainczyk, W., and Ruf, H. H. *Eur. J. Biochem.* 1988 ; 171, 313-320
58. Bhattacharyya, D. K., Lecomte, M., Rieke, C. J., Garavito, R. M., and Smith, W. L. *J. Biol. Chem.* 1996;271, 2179 -2184
59. Laneuville, O., Breuer, D. K., Xu, N., Huang, Z. H., Gage, D. A., Watson, J. T., Lagarde, M., DeWitt, D. L., and Smith, W. L. *J. Biol. Chem.* 1995 ;270, 19330 -19336
60. Yu, M., Ives, D. and Ramesha, C. S. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 21181-21186
61. Picot, D., Loll, P.J. and Garavito, M. The X ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature.* 1994 ;367:243-249
62. Kurumbail, R.G., et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature.* 1996;384:644-648
63. Luong, C, et al. flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase -2. *Nat.Struct.Biol.* 1996 ;3:927-933
64. Yokoyama C, Tanabe T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem Biophys Res Comm.* 1989;165:888 - 894.
65. Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem.* 1994;221:889 - 897.
66. Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:M69 - 78.
67. Pisetsky DS, St. Clair EW. Progress in the treatment of rheumatoid arthritis. *JAMA* 2001;286:2787 - 90.
68. Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid*

Mediat 2002;68 - 69:165 - 75.

69. Vane JR, Bakhle YS, and Botting RM Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998 ;38:97-120.

70. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, and Lipsky PE Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*1998; 12:1063-1073.

71. Cipollone F, Prontera C, Pini B, et al. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* 2001;104(8):921-7.

72. Egan KM, Wang M, Fries S, et al. Cyclooxygenases, thromboxane and atherosclerosis: plaque destabilization by cyclooxygenase-2 inhibition combined with thromboxane receptor antagonism. *Circulation* 2005;111(3):334-42.

73. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *AmJ Pathol* 1999;155:1281 - 91.

74. Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, et al. Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans. *Circulation* 2003;107:1479 - 85.

75. Paramo JA, Rodriguez JA, Belouqui O, Orbe J. Monocyte cyclooxygenase-2 activity: a new therapeutic target for atherosclerosis? *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005;5:303 - 11.

76. Shinmura K, Tang XL, Wang Y, et al. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10197 - 202.

77. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999;5:698 - 701.

78. Jingushi S, Heydemann A, Kana S K, Macey L R, Bolander M E. Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *J Orthop Res* 1990; 8 (3): 364-71.

79. Einhorn T A, Majeska R J, Rush E B, Levine P M, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995; 10 (8): 1272-81.

80. Gerstenfeld L C, Cho T J, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, Graves B D, Einhorn T A. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues Organs* 2001; 169 (3): 285-94.
81. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol* 1997;24 Suppl 49:15-9.
82. Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, Remmers EF, Epps HR, Hla T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues: effects of interleukin-1b, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 1994;93:1095-101.
83. Iniguez, M. A., S. Martinez-Martinez, C. Punzon, J. M. Redondo, and M. Fresno. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem* 2000; 275:23627-23635.
84. O. C. Trifan, T. Hla Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *J. Cell. Mol Med.* Vol 7, No 3, 2003 pp. 207-222.
85. Sorli CH, Zhang H-J, Armstrong MB, Rajotte RV, Maclouf J, Robertson RP. Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin 1 in the pancreatic islet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1788-93.
86. Suske G. The sp-family of transcription factors. *Gene.* 1999;238:291-300.
87. Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, Laurent G. A common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence for a role in the acute phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Bi.* 2002;22:1631-1636.
88. C. S. R. Baker, R. J. C. Hall, T. J. Evans, et al., "Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 19, no. 3, 1999; pp. 646-655.
89. U. Schonbeck, G. K. Sukhova, P. Graber, S. Coulter, and P. Libby, "Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions," *American Journal of Pathology*, vol. 155, no. 4, 1999; pp. 1281-1291,.
90. P. Needleman, J. Turk, B. A. Jakschik, A. R. Morrison, and J. B. Lefkowitz, "Arachidonic acid metabolism," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 55, 1986; pp. 69-

102,.

91. M. F. Linton and S. Fazio, "Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 4, no. 2, , 2004; pp. 116-123.
92. S. Bunting, R. Gryglewski, S. Moncada, and J. R. Vane, "Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation," *Prostaglandins*, vol. 12, no. 6, 1976; pp. 897-913.
93. J. Orbe, O. Beloqui, J. A. Rodriguez, M. S. Belzunce, C. Roncal, and J. A. P áramo, "Protective effect of the G-765C COX-2 polymorphism on subclinical atherosclerosis and inflammatory markers in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors," *Clinica Chimica Acta*, vol. 368, no. 1-2, , 2006; pp. 138-143.
94. H. H. Hegener, K. A. Diehl, T. Kurth, J. M. Gaziano, P. M. Ridker, and R. Y. L. Zee, "Polymorphisms of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene, and prostaglandin-E receptor 2 gene, C-reactive protein concentrations and risk of atherothrombosis: a nested case-control approach," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 4, no. 8, ,2006; pp. 1718-1722.
95. S. Kohsaka, K. A. Volcik, A. R. Folsom, et al., "Increased risk of incident stroke associated with the cyclooxygenase 2 (COX-2) G-765C polymorphism in African-Americans: the atherosclerosis risk in communities study," *Atherosclerosis*, vol. 196, no. 2, , 2008; pp. 926-930.
96. World Health Organization: Diabetes Mellitus: Report of a WHO Study Group. Geneva, World Health Org., 1985 (Tech. Rep. Ser., no. 727)
97. Davis SN, Granner DK. Hardman JG, Limbird LE editor. *Insulin*, oral hypoglycemic agents and pharmacology of endocrin pancreas- Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics., 11th ed., New York: The McGraw-Hill Companies Inc; 2006
98. Wackers FJTH. Diabetes and coronary artery disease: The role of stress myocardial perfusion image. *Cleveland Clin J Med* 2005; 72: 21-33.
99. Spronk HMH, van der Voort D, Cate HT. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. *Thrombosis Journal* 2004; 2: 12.
100. Orchard TJ et al. Type 1 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care* 2006; 29(11): 2528-2538.

101. 48. Broadbent HM et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Human Molecular Genetics* 2007; 17(6): 806-814.
102. Expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005; 26.1: S5
103. Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and 2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 2000;102:840–5.
104. Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res* 2001;89:650–60.
105. Antman EM, DeMets D, Loscalzo J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation* 2005;112:759–70.
106. A.R.Marks,Ushma S.Neill,Jones and Barlett, Science in Medicine , The JCI Textbook of Molecular Medicine,2007. SCIENCE IN MEDICINE
107. Iniguez, M. A., S. Martinez-Martinez, C. Punzon, J. M. Redondo, and M. Fresno. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem* 2000; 275:23627–23635.
108. Williams, C. S., M. Mann, and R. N. DuBois. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999;18:7908–7916.
109. Potter S, Mitchell MD, Hansen WR, Marvin KW. NF-IL6 and CRE elements principally account for both basal and interleukin-1 beta-induced transcriptional activity of the proximal 528 bp of the PGHS-2 promoter in amnion-derived AV3 cells: evidence for involvement of C/EBP beta. *Mol Hum Reprod* 2000;6:771–778.
110. Sansbury LB, Bergen AW, Wanke KL, Yu B, et al. Inflammatory cytokine gene polymorphisms, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk of adenoma polyp recurrence in the polyp prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 Mar;15(3):494-501.
111. Jing Shen1, Marilie D Gammon, Mary Beth Terry, et al. Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-2 gene, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk *Breast Cancer Research* 2006; Vol 8 No 6.

112. Lin HJ, Lakkides KM, Keku TO, et al. Prostaglandin H synthase 2 variant (Val511Ala) in African Americans may reduce the risk for colorectal neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1305 – 15.
113. Ellen Fritsche, Seung Joon Baek, Lorraine M. King. Et al.: Functional Characterization of Cyclooxygenase-2 Polymorphisms *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*. 2001 Nov;299(2):468-76.
114. Tazawa, R. et al. Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203, 190-199, PubMed: 94354801
115. Appleby, S.B. et al. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J*, 1994 ; 302, 723-727, PubMed: 95031910
116. Morteau, O. et al. Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 2000; 105, 469-478, PubMed: 20148865
117. Meade, E.A. et al. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 1999;274, 8328-8334, PubMed: 99175220

118. Kulmacz, R.J, Pendleton, R.B. and Lands, W.E. Interaction between peroxidase and cyclooxygenase activities in prostaglandin endoperoxide synthase. Interpretation of reaction kinetics. *J Biol Chem* 1994 ;269, 5527-5536, PubMed: 94164892
119. Garret Grisham *Biochemistry with a human focus*,2002
120. Professor Mesecar Pharmacy 408 Principles of Drug Action and Therapeutics VIII Lecture 1- NSAIDS in Rheumatology Mechanism-of-action & Chemistry April 11th, 2007
121. MacRae F Linton_ and Sergio Fazio, Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis,2004.
122. Rytter E, Vessby B, Asgård R, Johansson C, Sjödin A, Abramsson-Zetterberg L, Möller L, Basu S. Glycaemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well-controlled type 2 diabetes subjects . 2009 May;101(10):1423-6 PMID: 19459227 (PubMed)
123. S Furukado, M.Sakaguchi , Hiroshi Yamagami ,Yoshiki Yagita ,Taku Hoshi ,Yuko Abe , Hidetaka Hougaku , Masatsugu Hori ,Saburo Sakoda .Kazuo Kitagawa . Cyclo-Oxygenase-2 -765G -C Promoter Variants Are Associated with Lower Carotid Plaque Echogenicity in Japanese Cerebrovasc Dis 2009;27:91–98
124. Mahinda Y. Abeywardena, Wayne R. Leifert, Kirsty E. Warnes, Jose N. Varghese, Richard J. Head. *Cardiovascular Biology of Interleukin-6* pp.1809-1821
125. Megan E. Rudock, Yongmei Liu, Julie T. Ziegler, Stewart G. Allen, Allison B. Lehtinen, Barry I. Freedman, J. Jeffrey Carr, Carl D. Langefeld, Donald W. Bowden. Association of polymorphisms in cyclooxygenase (COX)-2 with coronary and carotid calcium in the Diabetes Heart Study 2008

FORMLAR

HASTA ARAŞTIRMA FORMU

Form No:	Tarih :
Adı Soyadı :	
Yaş :	
Cinsiyet :	
Ağırlık:	
Boy:	

Öyküsü:**Öz geçmişi:**

Sigara tüketimi (süre, miktar)
İlaç kullanımı
Kardiyovasküler hastalıklar
Diabetes Mellitus
Malign Hastalıklar
Hiperlipidemi

Diğer

Öz geçmişinde hastalığı ile ilgili yakınma / daha önce geçirilen ilişkili hastalık:

Soy geçmişi:

Sigara tüketimi (süre, miktar)
İlaç kullanımı
Kardiyovasküler hastalıklar
Diabetes Mellitus
Malign Hastalıklar
Hiperlipidemi

Diğer

ETİK KURUL KARARI






 İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
 YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

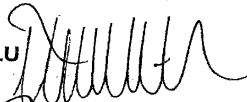
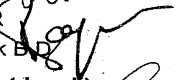
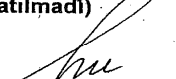

Toplantı Tarihi : 16/07/2008

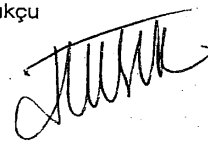
Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 7

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Turgay İSBİR'in, üstlendiği Yüksek Lisans Öğrencisi Biyokimyager Kevser KUŞAT OL'un yürüteceği 20081810 protokol numaralı "Diabete Bağlı Kardiyovasküler Hastalıklarda COX-2 Enzimi-765 G/C Gen Polimorfizmi, İnflamasyon Markerleri Düzeyinin İncelenmesi" başlıklı araştırma kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI 
 Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)
Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN (Katılmadı)
 Farmakoloji ve Kli.F. A.D
Prof.Dr. Ahmet GÜL 
 İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı
Prof.Dr. Berrin UMMAN 
 Kardiyoloji A.D.
Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ (Katılmadı)
 Anesteziyoloji A.D.
Prof.Dr. Sevinç EMRE 
 Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D.
Prof.Dr. Nuran YILDIRIM (Katılmadı)
 Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.
Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN (Katılmadı)
 Nöroloji A.D.
Prof.Dr. Pınar SAİP (Katılmadı)
 İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKÖĞLU 
 Biokimya A.D
Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR 
 Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D.
Prof.Dr. Yeşim ERBİL (Katılmadı)
 Genel Cerrahi A.D.
Prof.Dr. Neşe ÇOLAK 
 İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.
Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR
 Farmakoloji ve Kli.F. A.D
Fatma Ceyda DÖNMEZER 
 Sivil Toplum Örgütü Üyesi
Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
 Hukukçu



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	KEVSER	Soyadı	KUŞAT OL
Doğ.Yeri	ESKİŞEHİR	Doğ.Tar.	03.03.1981
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	33922469334
Email	kkusat@hotmail.com	Tel	05057570881

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	2009
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Biyokimyagerlik opsiyonu	2007
Ön Lisans	Osmangazi Üniversitesi - Sağlık Hizmetleri Meslek Y.O.- Tıbbi Laboratuvar Bölümü	2000-2001
	Hacettepe Üniversitesi - Sağlık Hizmetleri Meslek Y.O.- Tıbbi Laboratuvar Bölümü	1999-2000
Lise	Eskişehir Sağlık Meslek Lisesi	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Laborant	S.B. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi-Acil Biyokimya Lab.	10/2007-
2.	Laborant	S.B. Bakırköy İl Halk Sağlığı Laboratuvarı	03/2007-10/2007-
3.	Laborant	S.B. İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi- Mikrobiyoloji ve Acil Laboratuvarı	09/2002 – 03/2007
4.	Laborant	Eskişehir SSK Dispanseri Laboratuvarı	02/2001 – 09/2002

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	iyi	iyi	61.250	

--	--	--	--	--	--

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	80.350	79.902	78.877
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
Web	İyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Microsoft sertifikasyon programları – Vatan Bilgisayar Kursu M.E.B: Onaylı 14/08-05/10/2000
- 2-İstanbul Üniversitesi –II. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu Katılım ve PCR Çalışma Belgesi 18-21/03/2005
3. Klinikte ve Tedavide Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi 29-05/01-06/2008 ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Metodlara Giriş Uygulamalı Kursu(Real time PCR Kursu)

Özel İlgi Alanları (Hobileri):