

**RAYNAUD FENOMENİ OLGULARINDA K_{ATP} PROTEİNLERİNİ KODLAYAN
GENLERDE RASTLANAN VARYASYONLARIN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERİH AKKAPULU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BIYOKİMYA
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
ARALIK-2017**

**RAYNAUD FENOMENİ OLGULARINDA K_{ATP} PROTEİNLERİNİ KODLAYAN
GENLERDE RASTLANAN VARYASYONLARIN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERİH AKKAPULU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI**

Danışman

Doç. Dr. A. Erdinç YALIN




Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2016-1-TP2-1417 nolu proje olarak desteklenmiştir.

MERSİN

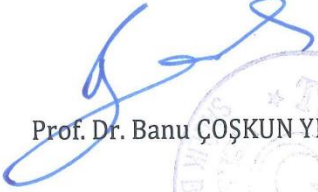
ARALIK-2017

ONAY

Merih AKKAPULU tarafından Doç. Dr. A. Erdinç YALIN danışmanlığında hazırlanan "Raynaud Fenomeni Olgularında K_{ATP} Proteinlerini Kodlayan Genlerde Rastlanan Varyasyonların Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Doç. Dr. A. Erdinç YALIN	
Üye	Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ	
Üye	Prof. Dr. Serap YALIN	

Yukarıdaki jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 27.12.2017 tarih ve 2017/449 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Banu ÇOŞKUN YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Bu tezde uygulanan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgelerin akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversiteden başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi' ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' Works.
- I used all of the referred Works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

Tarih/ Date

06/12/2017

İmza/ Signature

Öğrenci Adı ve Soyadı/ Student Name and Surname

Merih AKKAPULU

ÖZET

Raynaud Fenomeni, soğuk ve strese bağlı olarak gelişen el ve ayak parmaklarında siyanoz ve solukluk ile karakterize, vazospastik bir damar hastalığı olarak tanımlanabilir. ATP bağımlı K^+ (K_{ATP}) kanalları üzerine yapılan çalışmalarda çeşitli hücre tiplerinde membran eksitabilitesi ile hücre metabolizması arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu genlerin susturulduğu fare modellerinde vasküler düz kasda ifade edilen K_{ATP} kanal aktivitesindeki kaybın vazospazmdan sorumlu olduğu hipotezi ileri sürülmüştür. Çalışmamızda; Raynaud Fenomeni olgularında, KCNJ8/ABCC9 genlerinde meydana gelen varyasyonlar (S422L/V734I) ile vazospazm arasında olası ilişki incelenmiştir. Raynaud Fenomeni tanısı almış 50 birey (hasta grubu) ve bu tanıyı almamış 50 sağlıklı birey (kontrol grubu) çalışmaya dahil edilmiştir. Varyasyonlar, Tetra-Primer ARMS PCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Raynaud Fenomeni ile olası ilişkisini araştırmak istediğimiz analiz edilen K_{ATP} kanal proteini varyasyonları hasta ve kontrol gruplarında gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Raynaud Fenomeni, K_{ATP} Kanal Proteinleri, KCNJ8/ABCC9 Genleri, S422L/V734I Varyasyonları.

Danışman: Doç. Dr. A. Erdinç YALIN, Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

Studies on ATP-dependent K^+ (K_{ATP}) channels have shown a correlation between membrane metabolism and membrane excitability in various cell types. From studies on mice with targeted gene disruptions, it was hypothesized that the loss of K_{ATP} channel activity in arterial vascular smooth muscle was responsible for coronary artery spasm. In our study; the cases with Raynaud's phenomenon, the relation between the variation in the KCNJ8/ABCC9 genes (S422L/V734I) was examined. 50 subjects who were diagnosed with Raynaud's phenomenon (patient group) and 50 healthy subjects (control group) were included in the study. Variations were determined using the Tetra-Primer ARMS PCR method. K_{ATP} channel protein variants analysed for possible correlations among Raynaud's phenomenon were not observed in patient and control groups.

Keywords: Raynaud Phenomenon, K_{ATP} Channel Proteins, KCNJ8/ABCC9 Genes, S422L/V734I Variations.

Advisor: Doç. Dr. A. Erdiñç YALIN, Mersin University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Mersin.

TEŞEKKÜR

Değerli bilgileri ile çalışmama yön veren, çalışmamın her aşamasında bana yardım eden, manevi desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. A. Erdinç YALIN'a,

Bilgi paylaşımları ve desteklerinden dolayı değerli bölüm hocalarım Prof. Dr. Serap YALIN'a, Doç. Dr. Necmiye CANACANKATAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Nil Zeynep ÜNAL'a,

Hasta kanlarının toplanması sırasında gerekli yardımlarından dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp-Damar Cerrahisi çalışanları ve Prof. Dr. Nehir SUCU'ya, Mersin Devlet Hastanesi Kalp-Damar Cerrahisi çalışanları ve özellikle Dr. Özden VEZİR'e,

Tez çalışmalarım sırasında deneyimlerini benimle paylaşan Metin YILDIRIM'a,

Çalışmalarına verdiği desteklerden dolayı Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Mesafelere rağmen her zaman yanımda olan, bana yol gösteren, sevgilerini esirgemeyen Karanfil ve Ergün YÖRÜK'e, her sorunda ilk danıştığım ve her zaman yanımda bulduğum kardeşim Tolga AKKAPULU'ya,

Son olarak bugünlere gelmemde en büyük desteği sağlayan, sabır ve sevgiyle yanımda olan çok değerli anne ve babama sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1.Raynaud Fenomeni	3
2.1.1.Tanım	3
2.1.2.Epidemiyolojisi	4
2.1.3.Sınıflandırma	4
2.1.3.1.Primer Raynaud Fenomeni (Raynaud Hastalığı)	5
2.1.3.2.Sekonder Raynaud Fenomeni (Raynaud Sendromu)	6
2.1.4.Patogenez	7
2.1.4.1.Vasküler Anormallikler	7
2.1.4.2. İntravasküler Anormallikler	8
2.1.4.3.Nöral Anormallikler	8
2.1.4.4.Diğer Faktörler	9
2.1.5.Tanı	10
2.1.5.1.Anamnez ve Fizik Tedavi	10
2.1.5.2. Laboratuvar	11
2.1.6.Ayırıcı Tanı	13
2.1.7.Tedavi	15
2.1.7.1.Önleyici Yöntemler	15
2.1.7.2. Farmakolojik Tedavi	15
2.1.7.3. Cerrahi Tedavi	19
2.1.8.Prognoz	19
2.2.Potasyum Kanalları	20
2.2.1.Potasyum Kanal Çeşitleri	20
2.2.1.1.Ca ²⁺ ile Aktive Olan K ⁺ Kanalları (K _{Ca})	20
2.2.1.2.Voltaja Duyarlı K ⁺ Kanalları	21
2.2.1.3.İçerik Yönelik Doğrultucu K ⁺ Kanalları	22
2.2.1.4.ATP'ye Duyarlı K ⁺ Kanalları (K _{ATP})	22
2.2.2.K _{ATP} Kanalları	22
2.2.2.1.K _{ATP} Kanallarının Özellikleri	23
2.2.2.2.K _{ATP} Kanal Yapısı ve Moleküler Düzenlenmeleri	23
2.2.2.3.K _{ATP} Kanallarının Fizyolojik Fonksiyonları	25
2.2.2.4. K _{ATP} Kanallarının Regüle Eden Hücresel Mekanizmalar	26
2.2.3.K _{ATP} ve Kalp- Damar Hastalıkları	27
2.2.3.1.Kir6 Genleri ve Hastalıkları	28
2.2.3.2.SUR Genleri ve Hastalıkları	29
2.2.4.Kalp-Damar Hastalıkları ve K _{ATP} Mutasyonları	30
2.2.5.Kalp-Damar Hastalıkları K _{ATP} Aktivitesinin Terapötik Olarak Düzenlenme Potansiyeli	32
2.3. Raynaud Fenomeni Olgularında Çalışılacak Olan K _{ATP} Proteini Kodlayan Genler ve Varyasyonları	33

2.3.1.KCNJ8 Geni	33
2.3.1.1. p.Ser422Leu Varyasyonu	34
2.3.2. ABCC9 Geni	35
2.3.2.1. p.V734I Varyasyonu	36
3. MATERYAL ve YÖNTEM	37
3.1. Çalışma Grubu ve Örnek Alımı	37
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	37
3.2.1. Kullanılan Cihazlar	37
3.2.2. Kullanılan Kimyasallar	38
3.3. Genotiplendirme	39
3.3.1. Primerlerin Tasarımı	39
3.4. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler	42
3.5. Kullanılan Yöntemler	43
3.5.1. DNA İzolasyonu	43
3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	44
3.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi	45
3.5.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Yüklenmesi	45
4. BULGULAR	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	63

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1.3.1. Primer ve Sekonder formların temel özellikleri	5
Tablo 2.1.3.2.1. Sekonder Raynaud Fenomenine sebep olan hastalıklar	6
Tablo 2.1.5.2.1. Sekonder Raynaud Fenomeni Tanısı İçin Yapılabilecek Tetkikler	12
Tablo 2.1.7.2.1. Raynaud Fenomeni Tedavisinde Sıklıkla Kullanılan Farmakolojik Ajanlar	18
Tablo 2.2.3.1. K _{ATP} Kanal Mutasyonlarının İlişkili Olduğu Hastalıklar	30
Tablo 2.2.5.1. Çeşitli K _{ATP} Kanal Aktivatör ve Blokörlerinin Kullanıldıkları İndikasyonlar	32
Tablo 3.3.1.1. Kontrol Amplikonu	40
Tablo 3.3.1.2. Yabanıl Amplikonu	40
Tablo 3.3.1.3. Mutant Amplikonu	40
Tablo 3.3.1.4. KCNJ8, rs72554071 Varyasyonu : T-ARMS PCR Primerleri	41
Tablo 3.3.1.5. Kontrol Amplikonu	41
Tablo 3.3.1.6. Yabanıl Amplikonu	42
Tablo 3.3.1.7. Mutant Amplikonu	42
Tablo 3.3.1.8. ABCC9, rs61688134 Varyasyonu: T-ARMS PCR Primerleri	42
Tablo 3.5.2.1. T-ARMS PCR Yönteminde Kullanılacak Bileşen Miktarları	44
Tablo 3.5.2.2. rs72554071 İçin PCR Koşulları	45
Tablo 3.5.2.3. rs61688134 İçin PCR Koşulları	45
Tablo 4.1. Çalışmaya Katılan Bireylerin Demografik Verileri	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1.4.4.1. Raynaud Fenomeni patogenezinde rol oynayan mekanizmalar	9
Şekil 2.1.5.1.1. Soğuk uygulama sonrasında elde görülen solukluk ve siyanoz	10
Şekil 2.1.5.1.2. Sistemik sklerozise bağlı gelişen sekonder formdaki hastalarda görülen siyanotik cilt nekrozları	11
Şekil 2.1.5.2.1. Soğuk stimülasyon testinde uygulanan ölçüm tekniği	11
Şekil 2.1.5.2.2. Raynaud Fenomeni ayırıcı tanısında kullanılan pletismografik dalga formları	13
Şekil 2.1.6.1. Akrosiyanoz tanılı bir hastada ellerin görünümü	14
Şekil 2.1.6.2. Livedo retikularis tanılı bir hastada sol alt ekstremiterin görünümü	14
Şekil 2.2.1.2.1. V- kapılı K ⁺ kanalı (K _v 1.1)	21
Şekil 2.2.2.2.1. A) 4 Kir6 ve 4 SUR alt birimlerinin oluşturduğu oktomerik kompleks. B) Kanalin metabolik olarak kontrol geçişi sitoplazmik ATP tarafından hızlı ve tersinir bir şekilde kapatılması ve nükleotid tri- ve di- fosfatlar tarafından açılabilmesi. C) İnsan K _{ATP} gen yapısı. KCNJ11 (Kir6.2) ve ABCC8 (SUR1) genleri 11. kromozom üzerinde bulunurken; KCNJ8 (Kir6.1) ve ABCC9 (SUR2) 12. kromozom üzerinde bulunması.	24
Şekil2.3.1.1.1. S422L varyasyonun K _{ATP} kanalı üzerindeki yeri	34
Şekil2.3.2.1.1. SUR2'nin topoloji modeli	36
Şekil 4.1. rs72554071 varyasyonunun alellerinin belirlenmesi için çoğaltılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	47
Şekil 4.2. rs61688134 varyasyonunun alellerinin belirlenmesi için çoğaltılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma/Simge	Tanım
%	Yüzde
>	Büyüktür
<	Küçüktür
α	Alfa
β	Beta
mg	Miligram
mcg	Mikrogram
kg	Kilogram
dk	Dakika
mM	Milimolar
pH	Hidrojen Gücü
IV	İntravenöz
ANA	Antinükleer Antikor
NO	Nitrik Oksit
PSKB	Parmak BasıncıKan Sistolik
AST	Aspartat Aminotransferaz
ALT	Alanin Aminotransferaz
TSH	Tiroid Uyarıcı Hormon
ASO	Antistreptolizin O
CRP	C-Reaktif Protein
RF	Romatoid Faktör
ANCA	Anti-Nötrofil Sitoplazmik Antikor
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
ACE	Anjiotensin Converting Enzim
ARB	Anjiotensin Reseptör Blokerleri
K ⁺	Potasyum İyonu
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
Mg ²⁺	Magnezyum İyonu
Ba ²⁺	Baryum İyonu
ATP	Adenozin Trifosfat
ADP	Adenozin Difosfat
K _{ATP}	ATP' ye Duyarlı Potasyum Kanalları
K _{Ca}	Ca ²⁺ İle Aktive Olan Potasyum Kanalları
K _V	Voltaja Duyarlı Potasyum Kanalları
K _{IR}	İçe Yönelik Doğrultucu Potasyum Kanalları
Kir6.x	K _{ATP} Kanallarının Gözenek Oluşturan Alt Birimleri
SUR2x	Sülfonilüre Rereptör Alt Ünitesi
KCNJ	İçe Doğru Reaktifiye Edici Potasyum Kanalı Gen Ailesi
ABCC	ATP' ye Bağlanan Protein Kasetleri Ailesi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
M1, M2	Kir6 Alt Birimlerinin Transmembran Heliksleri
TMD1, TMD2	SUR Alt Birimlerinin Transmembran Bölgeleri
NBF1, NBF2	SUR Alt Birimlerinin Nükleotide Bağlanan Kıvrımları
FRET	Floresans Rezonans Enerji Transferi
CGRP	Kalsitonin Geni İle İlişkili Peptid
PKA	Protein Kinaz A
PKC	Protein Kinaz C
PGI ₂	Prostaglandin I 2

EDHF	Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör
EKG	Elektrokardiyografi
BrS	Brugada Sendromu
ERS	Erken Repolarizasyon Sendromu
VF	Ventriküler Fibrilasyon
AF	Atriyal Fibrilasyon
SIDS	Ani Bebek Ölümü Sendromu
GOF	İşlev Kazanma
LOF	İşlev Kaybetme
AV	Atriyoventriküler
MI	Myokard Enfarktüsü
ark	Arkadaşları
ROMK	KCNJ1 Geninin Protein Ürünü
GIRK	G Proteine Bağlı İçer Doğru Reaktifite Potasyum Kanalları
IRK	İçer Doğru Reaktifite Potasyum Kanalları
NG	Analizi Tamamlanmamış Genomik Bölgeler
Ser-S	Serin
Leu-L	Lösin
Val- V	Valin
Ile-I	İzolösin
A	Adenin
T	Timin
G	Guanin
C	Sitozin
NIDDM	İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus
kD	Kilo Dalton
kb	Kilo Baz
bç, bp	Baz Çifti
MA	Molekül Ağırlığı
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
T-ARMS	Tetra-PrimerAmplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi
FWD	Forward
REV	Reverse

1. GİRİŞ

Raynaud Fenomeni, soğuk ve strese bağlı olarak oluşan epizodik vazospazm ve buna bağlı olarak gelişen el veya ayak parmaklarında siyanoz ve solukluk ile karakterize bir hastalıktır [1]. Güçlü vazospastik etkisi damar hastalığı olarak tanımlanmasını sağlamaktadır. Raynaud Fenomeni; primer ve sekonder form olmak üzere ikiye ayrılır. Altta yatan bir sebep bulunmadığında primer (Raynaud Hastalığı veya idiopatik form), başka bir hastalık veya sebebe bağlı ise sekonder (Raynaud Sendromu) form olarak adlandırılır [2]. Bu iki formun ayrımı önemlidir, nedeni ise her iki formun da prognoz, şiddet ve tedavileri farklılık göstermektedir [3]. Primer formun prognozu genelde benign olup kangren veya doku kaybı çok nadir görülmektedir [4]. Sekonder formda ise, sebep veya eşlik eden hastalıkların olması, bu formda birçok organ ve sistemleri aynı anda etkileyebilmektedir [5].

Kardiyovasküler sistem ve kalp tutulumu, migren, H sendromu, herediter vasküler retinopati ve skleroderma gibi birçok hastalık çoğunlukla bu fenomenle birlikte incelenmiştir. Raynaud Fenomeninin patofizyolojik mekanizmaları ile ilgili önemli araştırmalar yapılmış olmasına rağmen altta yatan anormal vazospazmı açıklayan çok az kesin veri vardır. Damar duvarında gerçekleşen anormallikler, damar tonusu nöral kontrolü vedolaşım sistemi medyatörleri bu Fenomenin patofizyolojisinin parçası olarak öngörülmüş ve incelenmiştir. Vazospazm eğilimi, genetik faktörlere ek olarak, hemostazda edinsel değişiklikler veya edinsel ve genetik faktörler arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkabilir. Raynaud Fenomeni patogenezinde kalıtsal vasküler bozuklukların varlığı konusunda artan kanıtlar vardır [6].

Raynaud Fenomeninin tanısında basit tanımının kullanıldığı dikkatli klinik değerlendirme en güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Laboratuvar yöntemleri ile mikrovasküler fonksiyonlarının değerlendirilmesi hala özgün veya bireysel hasta değerlendirme için yeterince duyarlı değildir. Kalıtsal vasküler bozuklukların patogenezinde yer alan mekanizmaların açıklandığı çalışmaların Raynaud Fenomeninin ve ilişkili diğer hastalıkların erken patojenik evrelerinin incelenmesi ve tanı içeren iyi olan ağı sunacağına inanılmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda FVLeiden, protrombin G20210A, metilentetrahidrofolat redüktaz C677T, FXIII-A V34L, SLC29A3, LBR R372C genetik polimorfizmleri incelenmiş ve açıklayıcı veya çelişkili sonuçlara ulaşılmıştır.

Kir6.1 ve SUR2 proteinlerini içeren ATP bağımlı potasyum kanalları özellikle koroner arterlerde olmak üzere damar tonusu düzenlenmesinde kritik bir öneme sahiptir ve eksikliği veya fonksiyonundaki bozukluklar vazospazm ilişkili Prinzmetal anjinaya neden olabilmektedir. K_{ATP} kanalları her ne kadar Tip II diyabet, hiperinsülinizm, neonatal diyabet gibi hastalıklarda her yönüyle geniş kapsamlı olarak çalışılmış olsa da kalıtsal vasküler bozukluklarda yapılan

araştırmalar aynı düzeeye ulaşamamıştır.Kir6.1/SUR2 genlerinin üzerinde yapılan çalışmalar vasküler işlevler konusunda dikkat çekmektedir. Bu genlerin susturulduğu fare modelleri bu alt birimlerin özellikle koroner sirkulasyonda olmak üzere kardiyovasküler sistemde oynadığı kritik rollere dikkat çekmektedir [7, 8]. Vasküler K_{ATP} kanal protein (Kir6.1/SUR2) genlerinde (KCNJ8/ABCC9) olası mutasyonlar ve bu mutasyonların etki mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Var olanlarda ise tanımlanan mutasyonlar yetersizdir.

Bu çalışmayla birlikte, K_{ATP} kanalını kodlayan genlerde rastlanan varyasyonların vazospazm ile ilişkili Raynaud Fenomeni hastalarında karakterizasyonu ve araştırılmış olan varyasyonların görölme sıklığı belirlenmeye çalışılmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Raynaud Fenomeni

İlk kez 1862 yılında tıp öğrencisi olan Maurice Raynaud, 25 hasta üzerinde yaptığı “Local Asphyxia and Symmetrical Gangrene of the Exremities” doktora tezinde bu hastalığı tanımlamıştır. 20. yüzyılın başlarında Hutchinson, altta yatan başka bir sistemik patolojiye sekonder gelişen tabloyu Raynaud Fenomeni olarak tanımlarken, etiyolojisi bilinmeyen tabloları Raynaud Hastalığı olarak tanımlamıştır [1, 9]. Sir Thomas Lewis, primer ve sekonder Raynaud hastalığının klinik ve fizyolojik farklılıklarını ortaya koymuştur [10]. Allen ve Brown Primer Raynaud Fenomeninin hastalığa dönüşüm kriterlerini, LeRoy ve Medsger ise tanı kriterlerini belirlemiştir [11, 12].

2.1.1. Tanım

Raynaud Fenomeni, soğuk ve strese bağlı olarak oluşan epizodik vazospazm ve buna bağlı olarak gelişen el veya ayak parmaklarında siyanoz ve solukluk ile karakterize bir hastalıktır [1]. Nadir de olsa burun ucu ve kulak kepçesinin de etkilenmesi görülebilmektedir [13].

Raynaud Fenomeninin üç aşaması bulunmaktadır:

1. Beyazlaşma: Solukluk Evresi: Dijital arterin spazmının oluşumu ile bu evre meydana gelmektedir.
2. Morarma: Siyanoz: Arterlerdeki vazokonstrüksiyon azalırken kapiller damarlar ve venlerde dilatasyon olur, kan desatüre olur ve bu evre meydana gelmektedir.
3. Kızarma: Hiperemi: Bu evrede vazospazm ortadan kalkar. Arteriollerdeki dilatasyon sonucu kızarıklık meydana gelmektedir [14].

Bu üç renk değişikliği bu hastalık için özgündür ve bu renk değişiklikleri genelde bir saat içerisinde sonlanmaktadır [15]. Hastalarda bu üç evre ardışık görülebilmektedir. Renk değişikliğinin yanında parmaklarda uyuşukluk ve ağrı da görülebilmektedir [14].

2.1.2. Epidemiyoloji

Raynaud Fenomenine rastlanma sıklığı ve diğer hastalıklarla birlikte görülme özelliğinden dolayı klinik olarak önemli bir yere sahiptir [16]. Fakat gerçek prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte %3,3 ile %22 gibi bir aralıkta değişmektedir [9]. Yapılan çalışmalarda Raynaud Fenomeni prevalansı ve insidansı kadınlarda daha fazla saptanmıştır. Populasyon temelli yapılan çalışmalarda prevalans; kadınlarda %6-20, erkeklerde ise %3-12,5 olarak saptanmıştır [17]. ABD' de yapılan bir çalışmada ise prevalans kadınlar için %11 erkekler içinse %8 olarak saptanmıştır. Yine aynı çalışmada insidans kadınlar için %2,2 iken erkeklerde %1,5 olarak saptanmıştır [18].

Carpentier ve arkadaşları tarafından Fransa'da yapılan 14 yıllık bir çalışmada, prevalans kadınlar için %20 erkekler için %14,5 olarak saptanmıştır [3, 19]. Raynaud Fenomeninin yıllık insidansı ise %0,25 olduğu, insidansın da yaşla birlikte azaldığı ve zamanla hastaların yaklaşık %33' ünde semptomların gerilediği bildirilmiştir. Semptomların gerilemesine nelerin etki ettiği tam olarak bilinmemekle birlikte, yaş ile birlikte artmış vasküler reaktivite üzerinde durulmaktadır [3].

2.1.3. Sınıflandırma

Raynaud Fenomeni; primer ve sekonder form olmak üzere ikiye ayrılır. Altta yatan bir sebep bulunmadığında primer (Raynaud Hastalığı veya idiopatik form), başka bir hastalık veya sebebe bağlı ise sekonder (Raynaud Sendromu) olarak adlandırılır [2]. Bu iki formun ayrımı önemlidir, nedeni de bu iki formun ayrımı prognoz, şiddet ve tedavileri farklılık gösterdiğinden önemlidir [3].

Primer formun ayırıcı tanı kriterleri 1992 yılında LeRoy ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. Primer Raynaud Fenomeninin tanı kriterlerini şu şekilde sıralamışlardır:

- Epizodik akral siyanoz ve polar atakları,
- Periferik vasküler hastalığının olmayışı,
- Doku nekrozunun olmaması,
- Normal kapilleroskopik bulgular,
- Negatif antinükleer antikor (ANA) testi,
- Normal sedimentasyon değerleri [20].

Primer ve sekonder formun temel özellikleri Tablo 2.1.3.1.'de özetlenmiştir [5].

Tablo 2.1.3.1. Primer ve Sekonder formların temel özellikleri

FORM	CİNSİYET	ÖZELLİKLER
Primer	Sıklıkla kadın	<30 yaş Ağrı nadir Parmak tutulumu simetrik Çok sayıda parmak tutulumu Kapiller yatak normal Trofik bozukluk/Ülserasyon nadir Negatif/Düşük titrede antikor Vazospazm primer Oda ısısında normal cilt muayene bulguları Normal laboratuvar sonuçları
Sekonder	Erkek/Kadın	>30 yaş Ağrı sık Parmak tutulumu asimetrik Genelde tek parmak tutulumu Kapiller yatak bozulmuş, dilate venüller Trofik bozukluk/Ülserasyon sık Yüksek titrelerde antikor Obstruksiyon primer Pozitif serolojik testler Anormal laboratuvar sonuçları

2.1.3.1. Primer Raynaud Fenomeni (Raynaud Hastalığı)

Raynaud Fenomeni görülen hastaların çoğunda bu form bulunmaktadır. Hastaların yaklaşık % 85' i bu formdadır ve altta yatan başka hiçbir hastalık bulunmamaktadır. Soğuk ve strese karşı yanıtta ortaya çıktığı kabul edilmektedir [21]. Fonksiyonel bozukluk bulunup, vasküler yapısal bozukluk bulunmamaktadır. Sıklıkla kadınlarda görülür ve aile öyküleri bulunmaktadır [22]. Sıklık süresi ve atak ciddiyetleri değişkenlik göstermektedir. Bazen yılda birkaç atak olurken, bazen de kış aylarında 2-3 atak gelişmektedir. Primer formun prognozu genelde benign olup kangren veya doku kaybı çok nadir görülmektedir [4]. 1039 Raynaud Fenomenli hastada yapılan ve 10 yıl süren gözlemlerde hastaların % 6,3' ünde bağ dokusu hastalığının eşlik ettiği saptanmıştır [23].

2.1.3.2. Sekonder Raynaud Fenomeni (Raynaud Sendromu)

Başka bir hastalık veya sebebe bağlı olmasıyla ortaya çıkmakta ve primer forma göre daha az rastlantmaktadır [4]. Sekonder Raynaud Fenomeni kısmen de olsa daha ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır [5]. Sekonder form daha ciddi seyrederek, iskemik değişiklikler ve dijital ülserlerle sonuçlanabilir [4]. Sekonder forma en sık neden olan hastalık sistemik sklerozdur ve bunu diğer romatolojik hastalıklar takip etmektedir. Serolojik çalışmalar diğer romatolojik hastalıklarda olduğu gibi bu hastalıkta da ayırıcı tanı da önemli yer tutmaktadır [5]. Sekonder Raynaud Fenomenine sebep olan hastalıklar Tablo 2.1.3.2.1.'de özetlenmiştir [5].

Tablo 2.1.3.2.1. Sekonder Raynaud Fenomenine sebep olan hastalıklar

1-Romatolojik hastalıklar	İlerleyici sistemik skleroz Sistemik lupus eritematozus Bağ dokusu hastalıkları Romatoid artrit Sjögren sendromu Dermatomiyozit Polimiyozit Dev hücreli arteritler
2-Tıkkayıcı damar hastalıkları	Ateroskleroz Buerger hastalığı Tromboembolik hastalıklar
3-Mesleksel hastalıklar	Hipotenar çekiç sendromu Titreşim bağımlı Donma
4-İlacı bağımlı vazospazm	Beta-blokörler Vazopressör ajanlar Ergot alkaloidler Kokain Amfetaminler Vinblastin/Bleomisin/Siklosporin
5-Hematolojik hastalıklar	Alfa interferon Polistemia vera Paraproteinemi Kriyoglobulinemi Soğuk aglutinin hastalığı Protein C, S, antitrombin III eksikliği Faktör V Leiden mutasyonu
6-Maligniteler	Multiple miyelom Lösemiler Adenokarsinomlar
7-Enfeksiyonlar	Astrofitomlar Hepatit B ve C Parvovirüs enfeksiyonları Mikoplazma enfeksiyonları
8-Anatomik sendromlar	Purpura fulminans Skalenius antikus sendromu Servikal kot sendromu

2.1.4. Patogenez

Maurice Raynaud hastalığının tanımını ilk oluşturduğunda, hastalığın patogenezinde vasküler hiperaktiviteyi sorumlu tutuyordu. Yaklaşık 70 yıl sonra farmakolojik ve cerrahi olarak yapılan çalışmalarda Raynaud Fenomenine santral sinir sistemi dışında lokal faktörlerinde etkisi olduğu ortaya atılmıştır [1]. Günümüzde Raynaud Fenomeninin patogenezini hala tam açıklanamıyoruz. Fakat birtakım patofizyolojik mekanizmalar sorumlu tutulmuş ve problemin multifaktöriyel olduğu düşünülmüştür [5]. Raynaud Fenomeninin patogenezinde asıl mesele vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon arasındaki dengenin bozulmasıdır [6].

Herrick, Raynaud Fenomeninin patogenezini aşağıdaki gibi incelemiştir [6].

- 1) Vasküler anormallikler
- 2) İntravasküler anormallikler
- 3) Nöral anormallikler
- 4) Diğer faktörler

2.1.4.1. Vasküler Anormallikler

Vasküler anormallikler yapısal ve fonksiyonel olarak incelenmektedir. Yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin her ikisinin sekonder form da görüldüğü, primer form da ise sadece fonksiyonel anormalliklerin görüldüğü kabul edilmektedir [24].

Fonksiyonel anormallikler; bozulmuş vazodilatasyon, bozulmuş endotel-bağımlı vazodilatasyon, vazodilatör üretiminde azalma ve vazokonstriksiyonda artış olarak görülebilmektedir. Primer formdaki defekt endotelidir. Endotel, vazoaaktif ürünler üretmekte ve bariyer görevini üstlenmektedir. Patogenezde denge durumunda olması gereken vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon için endotelin aktif veya hasarlı olması durumunda denge vazokonstriksiyon lehine kaymaktadır. Endoteldeki hasar; vazodilatör molekül olarak geçen nitrik oksit (NO) ve prostasiklin üretimini azaltırken, vazokonstrüktif molekül olan endotelin-1 salgılanmasını artırmaktadır [4].

2.1.4.2. İnvasküler Anormallikler

Raynaud Fenomeni patogeneğinde sorumlu tutulan invasküler anormallikler; trombosit aktivasyonu, bozulmuş fibrinoliz, beyaz kan hücresi aktivasyonu, düşük alyuvar deformabilitesi, artmış vizkosite ve oksidatif stres' dir [6].

Özetle, patogeneğinde sempatik hiperaktividen ziyade, adrenerjik aktivite ve lokal doku faktörleri önemli yer tutmaktadır. Primer formda bozukluk parmak ve cilt damarlarında α_2 -adrenerjik cevaplarda artışa bağlıdır. Sekonder formda ise (skleroderma ve el-kol vibrasyon sendromu) mikrovasküler sistemde meydana gelen fibrozis ve endotelial fonksiyon bozukluğuna bağlıdır [6].

2.1.4.3. Nöral Anormallikler

Nöral anormalliklerde; periferal mekanizmalar, bozulmuş vazodilatasyon, artmış vazokonstrüksiyon ve santral mekanizmanın etkili olduğu düşünülmektedir [6].

Termoregülasyonda en önemli görevi sempatik sinir sistemi yapmaktadır. Hem primer hem sekonder formda periferal ve santral mekanizmalar rol oynamaktadır. Sonuç olarak, dijital damar tonusunu otonom ve duyu aferent sinirlerden salınan nörotransmitterler sağlamaktadır. Santral mekanizma da vazospazma bu şekilde neden olabilmektedir [6, 9].

Vazodilatör peptidler; kalsitonin ilişkili peptit, P maddesi, nörokinin A ve vazointestinal peptitdir. Skleroderma veya Primer Raynaud Fenomenili hastaların cilt biyopsileri alınarak yapılan çalışmalarda kalsitonin ilişkili peptidi salan nöronların azalmış olduğu gözlemlenmiştir [25].

Termoregülasyonda en önemli reseptör α_{2c} - adrenerjik reseptördür. Vazokonstrüksiyon sağlayan noradrenalinin bu reseptöre etki ettiği, bu reseptörün inhibisyonu ile soğukta indüklenen vazokonstrüksiyonun ortadan kalktığı gözlemlenmiştir [26].

2.1.4.4. Diğer Faktörler

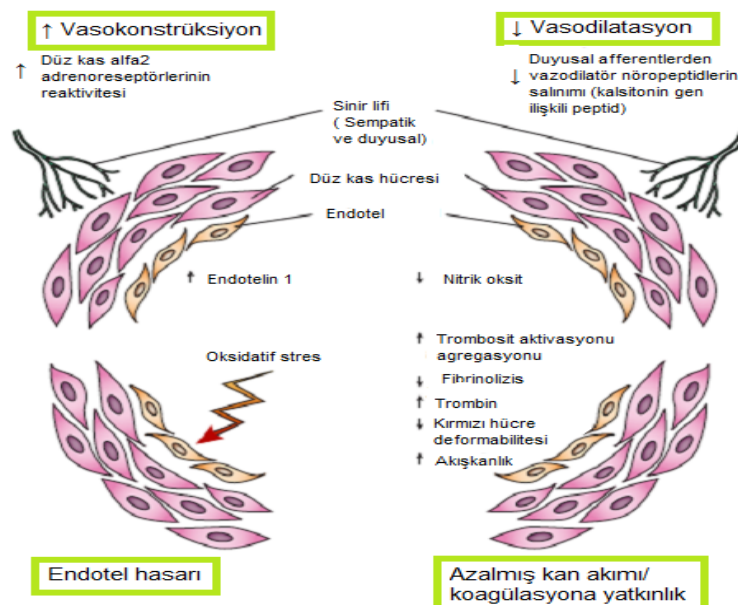
Henrick'e göre diğer faktörlerin içerisinde; sigara tüketimi, genetik ve hormonal faktörler girmektedir [6].

Sigara Tüketimi: Tütün içerisinde bulunan nikotin ve diğer kimyasallar arterlerde vazokonstrüksiyona ve sertleşmelere neden olmaktadır. Bu nedenle de cilt sıcaklığının düşmesine ve atakların başlamasına neden olmaktadır [2].

Genetik Faktör: Primer Raynaud Fenomenli hastaların dörtte birinde birinci derece akrabalarında bu hastalığa rastlanmıştır. Bunun üzerine 2007 yılında Cherkas ve arkadaşları ikizler üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonunda Raynaud Fenomenini tek yumurta ikizlerinde çift yumurta ikizlerine oranla iki kat daha fazla rastlanmıştır [27].

Hormonal Faktör: Raynaud Fenomenini kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülmesinin, kadın cinsiyet içerisinde de menarş ve menapoz arasındaki dönemde yoğunlaşması hormonal faktörlerin incelenmesi için çalışmaları başlatmıştır. Yapılan bir çalışmada östrojenin postsinaptik α_2 adrenoreseptörlerin gen ifadelerinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir [28]. Yapılan başka bir çalışmada östrojenin NO ve sitokrom P450 aktivitesi üzerinde vazodilatasyon sağladığı iddia edilmiştir [29]. Tüm bu çalışmalara rağmen hala östrojenin Raynaud Fenomeniyle ilişkisi tam olarak bilinmemektedir.

Raynaud Fenomeninin patogenezinde rol oynayan mekanizmalar Şekil 2.1.4.4.1.'de özetlenmiştir:



Şekil 2.1.4.4.1. Raynaud Fenomeni patogenezinde rol oynayan mekanizmalar [30]

2.1.5. Tanı

Tanı, tipik atakların tarifleriyle konulabilmektedir. Anamnez alınmakta ve fizik muayene yapılmaktadır. Raynaud Fenomenini belirlemek için poliklinik şartlarında uygulanabilir birçok test bulunmaktadır. Bu testler kullanılarak tanı yüksek doğrulukta konulabilmektedir.

2.1.5.1. Anamnez ve Fizik Muayene

Anamnezde; ilaç öyküsü, hastanın mesleği, bulaşıcı hastalıkların varlığı, ağız-göz kuruluğu, oral aft varlığı, kas güçsüzlüğü, yutma güçsüzlüğü, eklem şikayetleri, ishal, hipertansiyon, çarpıntı, alopesi, fotosensitivite, kilo kaybı, ateş, gece terlemesi sorgulanmalıdır [4]. Tanının konulabilmesi için tipik yakınmalardan lenmelidir. Raynaud Fenomeninde tipik yakınmalar soğuk havalarda artan bir veya her iki ekstremitte parmaklarında morarma, uyuşma, solukluk veya ağrı şeklindedir [31]. El parmaklarında ayak parmaklarına göre daha fazla görülmektedir. Bu durum içerisinde başparmaklar çok etkilenmemektedir [32]. Fizik muayenede ise, Raynaud Fenomeninden etkilenen bölgede genellikle üç farklı renk gözlenmektedir yani üç evre bulunmaktadır. Soğuk ile temastan sonra gelişen vazospazmla ellerde solukluk (1. evre) görülmektedir. Solukluk ardından biriken desatüre oksijenli kan nedeniyle siyanoz (2. evre) oluşmaktadır [Şekil 2.1.5.1.1.]. Vazospazmın sonrasında da akımın tekrar sağlanmasıyla bölgede hiperemi yani kızarıklık (3. evre) oluşmaktadır [5].



Şekil 2.1.5.1.1. Soğuk uygulama sonrasında elde görülen solukluk ve siyanoz [5].

Renk değişikliği, ağrı gibi bulguların dışında uyuşma, karıncalanma ve yanma hissi gibi bulgularda bulunabilmektedir. Sekonder formda olan hastalarda bunların dışında cilt

değişiklikleri de görülebilmektedir. Cilt elastikiyetini ve kalınlığını kaybedebilmekte, deforme olabilmekte, distal ülserasyon ve nekroz gelişebilmektedir[Şekil 2.1.5.1.2.] [5].



Şekil 2.1.5.1.2. Sistemik sklerozise bağlı gelişen sekonder formdaki hastalarda görülen siyanotik cilt nekrozları [5].

2.1.5.2. Laboratuvar

Raynaud Fenomeni tanısında en basit uygulanacak test soğuk stimülasyon testidir. Bu testin özgüllüğü %100 iken hassaslığı %50 civarındadır [9]. Kesin bir fikir birliği bulunmayan fakat daha çok kabul görmüş olan test yöntemi aşağıdaki gibidir.

Hastalar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra bir sıcaklık probu yardımıyla 1. ve 2. parmak distal falanks pulpları arasından başlangıç sıcaklığı ölçülerek kayıt altına alınmaktadır [Şekil 2.1.5.2.1.]. Daha sonra ölçüm yapılan ekstremitelere, +4° C'deki buzlu suyun içerisinde 20 saniye tutulmakta ve bu sürenin sonunda eller kurumaya bırakılmaktadır (diğer el veya başka bir ortamla teması önlenir.). 5, 10, 15 ve 20. dakikalarda parmak sıcaklıkları tekrardan ölçülmektedir [5].



Şekil 2.1.5.2.1. Soğuk stimülasyon testinde uygulanan ölçüm tekniği [5].

Normal bireylerde el sıcaklığı 10 dakikada başlangıç sıcaklığına dönmesi gerekmektedir. 20 dakikanın sonunda başlangıç sıcaklığına dönmeyen bireylerde test pozitif kabul edilmektedir. 15-20 dakika arasında başlangıç sıcaklığına döndüğünde bireylerde hafif derecede fenomenin varlığı kabul edilebilmektedir [5].

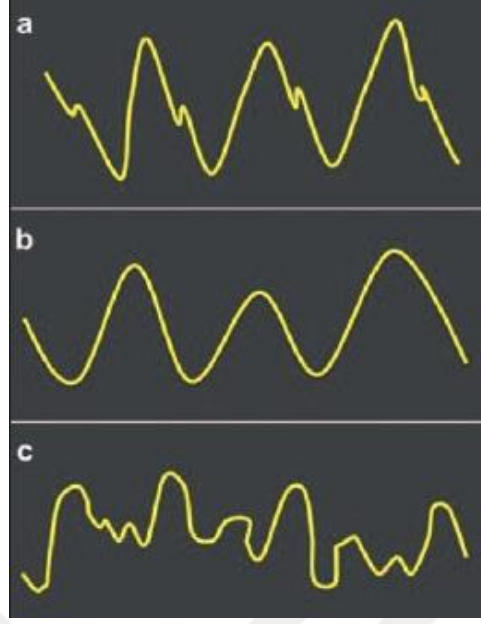
Raynaud Fenomeni için kullanılacak diğer test ise, parmak sistolik kan basıncı (PSKB) ölçümüdür. Sonrasında parmak-brakiyal indeks ölçümüdür. Her iki ölçüm sonucunun oranlanması ile elde edilen indeksin normal değeri 0,8-1,3 arasındadır [33].

Raynaud Fenomeni bazen bağ dokusu hastalığına sekonder olabilmekte veya bu hastalıkların ilk bulguları olarak karşımıza çıkabilmektedirler. Bu nedenle sekonder formun altında yatan hastalığa yönelik serolojik ve biyokimyasal parametrelere bakılmalıdır. Tablo 2.1.5.2.1.'de bu tetkikler yazmaktadır [5].

Tablo 2.1.5.2.1. Sekonder Raynaud Fenomeni Tanısı İçin Yapılabilecek Tetkikler

	BİYOKİMYA	İMMÜNOLOJİK
	Glukoz	Sedimentasyon
	Üre/Kreatinin	ASO
	AST/ALT	CRP
	Bilirubin profili	RF
	Lipit profili	Anti-dsDNA
	Elektrolitler	ANA
	B12, Folat, Ferritin	p-ANCA
	Demir	c-ANCA
	Demir bağlama kapasitesi	Anti-ro antikor
		Anti-Sentromer antikor
		Anti-Scl-70 antikor
ENDOKRİN	Serbest T3	Direkt Coombs
	Serbest T4	İndirekt Coombs
	TSH	Soğuk agglutinin tarama
	HbA1c	

Tanıda kullanılacak diğer bir ölçüm ise, pletismografik ölçümlerdir. Özellikle primer ve sekonder formların ayırımına yardımcı olabilmektedir. Sekonder olan bireylerde obstrüktif patern izlenmekte iken, primer olan bireylerde iniş trasesinde çok sayıda çentik bulunan bir dalga formu oluşmaktadır. Raynaud Fenomeninin ayırıcı tanısında kullanılacak dalga formları Şekil 2.1.5.2.2.'de gösterilmiştir [34].



Şekil 2.1.5.2.2. Raynaud Fenomeni ayırıcı tanısında kullanılan pletismografik dalga formları: a) Normal form, b) Sekonder formda görülen obstrüktif dalga formu, c) Primer formda görülen vazospastik dalga formu [34].

Primer ve sekonder formların ayırıcı tanısında önemli yer tutan diğer bir tetkik, tırnak yatağı kapilleroskopisidir. Normal tırnak yatağında ince kapiller lupların kavşak şeklinde dağılımı gözlenmektedir. Gözlemi, ışık mikroskobu aracılığıyla yapabilmekte ve inceleme sonucunda özellikle skleroderma ve dermatomiyozit gibi sekonder formun ayırıcı tanısını belirlemektedir (32).

2.1.6. Ayırıcı Tanı

Normal koşullarda soğukta el-ayak üşümesi Raynaud Fenomeninden ayırt edilmelidir. Sağlıklı bireylerde el-ayak üşümesinde, vasküler akımda düzelme fazında gecikme ve renk değişiklikleri olmaz [4]. Raynaud Fenomeni, akrosiyanoz ve livedo retikularis gibi vazospastik bozukluklarla da karıştırılmamalıdır.

Akrosiyanoz, ellerde ağrısız, sürekli devam eden soğukluk ve siyanoz ile karakterize olan ve yine Raynaud Fenomeninde olduğu gibi sıklıkla kadınlarda görülen bir hastalıktır [Şekil 2.1.6.1.]. Nedeni ve patolojisi tam olarak bilinmeyen ancak en çok kabul görülen teorisi, lokal bir bozukluktan kaynaklanan küçük arteriyollerdeki vazomotor tonus artışı, kapiller düzeyde ve küçük venlerde anormal dilatasyonun neden olduğudur. Akrosiyanozu Raynaud Fenomeninden ayıran özelliği de, trifazik renk değişikliğinin oluşmamasıdır [9, 35].



Şekil 2.1.6.1. Akrosiyanoz tanılı bir hastada ellerin görünümü [5].

Livedo retikularis ise, yine Raynaud Fenomeninde olduğu gibi sıklıkla kadınlarda görülmektedir. Mavimsi yer yer lekeli kırmızımsı cilt rengi ile karakterize bir hastalıktır [Şekil 2.1.6.2.]. Fizyopatolojisi tam olarak bilinmemekte ancak, arteriyollerin daralmasının ve kapiller ve venüllerdeki dilatasyonun yer aldığı düşünülmektedir [36].



Şekil 2.1.6.2. Livedo retikularis tanılı bir hastada sol alt ekstremiterin görünümü [5]

2.1.7. Tedavi

Raynaud Fenomeni tedavisinde standart bir yöntem bulunmamaktadır. Genellikle ampirik ve destekleyici tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Tedavinin amacı, atakların sıklığını ve şiddetini azaltmaya yönelik olmalıdır. Böylelikle, doku hasarı önlenmeye çalışılmaktadır [5, 13]. Tedavide primer veya sekonder form dikkate alınmalıdır ve ona göre plan yapılmalıdır. Primer form genellikle tedavi gerektirmemektedir. Sekonder form da ise, altta yatan hastalığın türüne ve varsa doku hasarına ve derecesine göre tedavi belirlenmelidir [37]. Tedaviyi üç grup altında ele alabiliriz [4]:

- 1) Önleyici yöntemler
- 2) Farmakolojik tedavi
- 3) Cerrahi tedavi

2.1.7.1. Önleyici Yöntemler

Temelde ilaçsız hastanın yaşam tarzı değişikliklerini içermektedir. Öncelikle, hastaların el ve ayaklarını travmadan korumaları gerektiği vurgulanır. En önemli şey ise, sadece ekstremitelerin değil tüm vücut sıcaklığının korunmasıdır. Bunun için yapılması gerekenler ise; çorap, eldiven, şapka ve kalın giysilerin giyilmesidir. Nikotin ve içerdiği kimyasalların vazokontrüksiyona neden olabileceğinden sigara kullanımından uzak durulması önerilmelidir. Vazospazma neden olabilecek ergotamin, amfetamin, beta bloker gibi ilaçların kullanılmasından uzak durulması gerektiği bildirilmelidir [14]. Strese karşı psikolojik davranış biçimleri öğretilmelidir. Kısacası stres, soğuk ve sigaradan uzak durulması gerektiği anlatılmalıdır [4].

2.1.7.2. Farmakolojik Tedavi

Primer formda olan hastalar için önleyici yöntemler yeterli olabilmektedir. Sekonder formulu hastalarda ise rahatsız edici belirtilerin olmasından dolayı farmakolojik tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Farmakolojik tedavi vazodilatörler, vazokonstrüksiyonu azaltanlar, antikoagülan-antitrombotik tedavi ve antioksidanlar olarak ayrılabilirler. Özellikle, vazodilatörler geçmişten bu yana en çok kullanılan ajanlardır [1].

Kalsiyum kanal blokerleri, Raynaud Fenomeninde en sık kullanılan vazodilatör ajandır. Bu ilaçlar, kalsiyumun hücre içine girişini önleyerek arter duvarındaki kalsiyum bağımlı düz kas kontraksiyonunu azaltmakta ve dilatasyona neden olmaktadır. Bir dihidropiridin türevi olan nifedipin en çok kullanılan ajandır. Bununla beraber, yeni dihidropiridinler (amlodipin,

nicardipin, felodipin, isradipin gibi) de etkili sonuçlar verdiği bildirilmiştir [9]. Kalsiyum kanal blokerlerine kişisel tepki ve tolerans hastalar arasında değişir, bu nedenle ilacın etkinliğine göre bireysel olarak ayarlanma yapılmalıdır [4, 5].

Nitrik oksitin tedavide kullanılmasına dair henüz net bir fikir birliği bulunmamaktadır. Nikrik oksit ve diğer nitrat preparatları, vasküler düz kas kasılmasını cGMP üzerinden azaltarak vazodilatasyonu sağlamaktadır. Bu preparatlar, oral, topikal ve intravenöz olarak kullanılabilir [1]. Semptomatik rahatlatma ve atak sıklık ve şiddetini azaltabilmektedir. Bu preparatların sistemik dolaşıma geçerek baş ağrısı ve hipotansiyon gibi yan etkileri bulunmasından dolayı kullanım alanı çok bulunmamaktadır [38].

Selektif α_1 blokerler ve bu gruptan en çok çalışılan prazosin, sistemik skleroza bağlı sekonder form başta olmak üzere hem primer hem de sekonder formlu hastalarda atak şiddet ve sıklığını azalttığı kanıtlanmıştır. Fakat yan etkisi çok olduğundan kullanımı da kısıtlıdır [39].

Anjiotensin converting enzim (ACE) inhibitörleri ve anjiotensin reseptör blokerleri (ARB) gibi renin-anjiotensin sistem üzerine etki gösteren moleküller, güçlü bir vazokonstriksiyon azaltıcı etki göstermektedirler. Bunu da anjiotensin II oluşumunu engelleyerek yapmaktadırlar. ACE inhibitör tedavisi, sklerodermada atakların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilacın primer formdaki hastalar üzerindeki kullanımı konusunda net bir fikir birliği olmamasına rağmen, günlük 50 mg dozda uygulanan losartanın hem primer hem de sistemik sklerozda semptomların rahatlatılmasında etkili olduğu, bu etkinin de nifedipin tedavisinden daha etkin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [40].

Sistemik skleroza bağlı olarak gelişen sekonder formda, prostaglandinler vazodilatör etkisi ile etkin rol oynamaktadırlar. Bu etkiyi, vasküler tonusu azaltarak göstermektedirler. İntravenöz iloprost (prostasiklin analogu) kullanımının atak ve şiddetleri azalttığı gösterilmiştir [41]. Prostaglandin ve analogları özellikle sekonder formda, iskemik ve ülserasyon tedavisinde kullanılmaktadır. İloprost, yapılan çalışmalar sonucunda nifedipine oranla semptomlardaki ciddiyeti daha çok azalttığı saptanmıştır [42].

Patogeneizde rolü tam olarak anlaşılmamış olan, serotonin geri alım inhibitörlerinin (fluoksetin, ketanserin gibi) etkinliği konusunda birçok görüş bulunmaktadır. Fluoksetin, yapılan çalışmalar sonucunda, primer formda olan bireylerde atakların sıklığını ve şiddetini azalttığı, sekonder formda ise faydasının az olduğu belirlenmiştir [43]. Ketanserin ile yapılan başka bir çalışmada ise sistemik skleroza bağlı olarak gelişen sekonder forma etkisi olmadığı belirlenmiştir [44].

Fosfodiesterazlar, hücre içi nükleotidlerin (cAMP, cGMP) yıkımını regüle etmektedirler. Bu enzimlerin inhibisyonu sonucu hücre içi cGMP artar ve vazodilatasyon belirginleşmektedir. Yapılan bir çalışmada, sildenafil uygulanan hastalarda atak sayısında ve şiddetinde azalma saptanmıştır [45]. Bununla birlikte sildenafilin primer formdaki hastalarda etkinliği gösterilememiştir [9].

Antiplatelet ajanların primer formdaki hastalarda rolleri yok iken sekonder formdaki hastalarda kullanılabilirliği belirlenmiştir. Aspirinin vazokonstrüksiyon oluşturma özelliğinden bahsedilse de, sekonder formdaki hastalarda 80-350 mg aspirin kullanımı önerilmektedir. Antikoagülan tedavi veya trombolitik tedavi ise, akut iskemik olgularda daha fazla düşünülmektedir. Heparin tedavileri, selektif hastalarda, emboli ve ülserasyon öyküsü bulunduğu vakit önerilmektedir [1]. Warfarin tedavi ise, kalsinozis ile beraber bulunan sistemik sklerozu olan hastalarda, antikoagülan tedavinin yanında birçok fayda sağladığı bildirilen çalışmalar bulunmaktadır [46].

Günümüzde hipotansif seyretmesi nedeniyle vazodilatör tedavi kullanamayan hastalarda uygulanacak tedavi yönteminden en etkin olanı pentoksifilindir. Günlük 2 veya 3 defa kullanılan, toplam dozu 1200 mg olan bir moleküldür. Bu etkinliğinin yanında yan etkileri de bulunmaktadır. Bu yan etkiye en iyi örnek taşikardi olarak bildirilmiştir [47].

Tüm bahsedilen bu ajanlar dışında, bosentan gibi endotelin reseptör antagonistlerinin, fasudil gibi Rho-kinaz inhibitörlerinin, çeşitli antioksidan ajanların ve hatta Botulinum toksinin de Raynaud Fenomeni tedavisinde kullanılabilceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [1].

Raynaud Fenomeninde kullanılacak ajanlar Tablo 2.1.7.2.1.'de özetlenmiştir [1].

Tablo 2.1.7.2.1. Raynaud Fenomeni Tedavisinde Sıklıkla Kullanılan Farmakolojik Ajanlar

TERAPOTİK AJANLAR		DOZAJ	AÇIKLAMALAR
Kalsiyum kanal blokörleri	Nifedipin	10-30 mg, 3×1	En sık kullanılan, en az kardiyoselektif
	Amlodipin	2,5-10 mg/gün	Orta kardiyoselektif
	Diltiazem	120-300 mg/gün	En kardiyoselektif
	Verapamil	40-120 mg/gün	Etkinliği gösterilememiş
Vazodilatörler	Nitrogliserin	%1 lik topikal	Etkinliği gösterilmiş, Ciddi yan etki
		%2 lik topikal	Sistemik emilim nedeni Ciddi yan etki
	Sodyum nitroprusiad	0,3 mcg/kg/dk IV	Kritik iskemide endike
Prostaglandinler	İloprost	0,5-2 mcg/kg/dk IV	Kritik iskemide endike
Fosfodiesteraz inhibitörler	Sildenafil	50 mg 2×1	Bir çalışmada yararı gösterilmiş.
	Cilostazil	50-100 mg, 2×1	Bir çalışmada yararı gösterilememiştir.
ACE/ARB inhibitörleri	Enalapril	2,5-20 mg/gün	Bir çalışmada yararı gösterilmiş.
	Kaptopril	6,5-25 mg/gün, 3×1	
	Losartan	50 mg/gün	
Serotonin geri alım inhibitörleri	Fluoksetin	20 mg/gün	Bir çalışmada yararı gösterilmiş.
Endotelin reseptör antagonistleri	Bosentan	62,5-125 mg, 2×1	Yeni ülser oluşumunu azaltır, eski ülser iyileşmesini hızlandırmaz, hepatotoksik etki
Sempatolitikler	Prazosin	1,5 mg, 2×1	Etkisi geçici, yan etkisi nedeniyle kısıtlı
Antikoagülan/Antitrombotik	LMWH		Akut/kritik iskemide endike
	Warfarin		Kritik iskemide endike
	Aspirin t-PA	80-325 mg/gün	Sistemik sklerozda etkili Kritik/akut iskemide endike
Diğer	Pentoksifilin	400 mg, 3×1	Kan basıncı düşük olan hastalarda etkin
	Fasudil	600 mg, 2×1 30 mg/dk 30 dk IV infüzyon	Sekonder formda etkili

2.1.7.3. Cerrahi Tedavi

Medikal tedavinin yetersiz veya başarısız olmasıyla girişimsel yöntemlere başvurulabilir. Girişimsel yöntemler cerrahi tedavi olarak düşünülebilir. Ciddi, inatçı dijital iskemi ve ülserasyon gözleniyorsa cerrahi tedavi uygulanabilir. Şiddetli vakalarda, sempatik tonusun kaldırılmasında sempatektomi denilen yöntem kullanılabilir. Damar spazmını önlemek için, damar konstrüksiyonundan sorumlu olan sempatik sinirlerin kesilmesi gerekebilir. Günümüzde bu yöntem, dijital ülserasyona neden olan ciddi Raynaud Fenomenli hastalara uygulanmaktadır. Sempatektominin etkisi, bağ dokusu hastalığına bağlı gelişen hastalarla sınırlıdır. Bu yöntemle hastalarda sempatik tonus kısa sürede geri dönmektedir [1, 2, 34].

Sempatektomi yöntemi iki şekilde uygulanabilmektedir. Bunlar torakal ve dijital sempatektomi olarak adlandırılır. Torakal sempatektomi, torakal sempatik zincirin kesilmesi veya çıkarılması işlemidir. Genel anestezi altında gerçekleştirilir ve torakotomi gerektirir. Büyük bir cerrahi girişim olduğundan, iskemik ülser veya kangren gibi semptomları gösteren hastalarda tercih edilir [48-51]. Dijital sempatektomi ise, skleroderma ile birlikte gelişen hastalarda tercih edilir. Yapılan bu yöntemle, atak sayısının ve şiddetinin azaldığı gözlenmiştir [48]. Dijital sempatektomi, el ve ayak köklerinde yapılan insizyonlarla, arterin etrafındaki fibrotik adventisyanın ve sempatik sinirlerin kesilerek çıkarılması şeklinde uygulanmaktadır [52, 53].

2.1.8. Prognoz

Raynaud Fenomeni, primer ve sekonder formları bulunduğundan prognozları da farklılık göstermektedir. Bu tanıyı almış hastaların yaşam kalitesini bozabilecek etkileri bulunmaktadır. Primer formda prognoz mükemmeldir ve hastaların %10' unda atakların kaybolduğu gözlenmiştir. Dijital vasküler bozukluklar çok nadir görülmekte, primer formda olan hastaların çok azında 10 yıl sonra bağ dokusu hastalığına yakalandığı belirtilmiştir [23]. Sekonder formda ise, prognoz altta yatan hastalık veya duruma bağlıdır. Dijital ülserler sık görülür, şiddetli ağrılar oluşabilir. Şiddetli, ağır dijital iskemi de acil tedavi gerektirmektedir. Öncelikle farmakolojik tedaviler denenmektedir. Farmakolojik yöntemler yetersiz veya başarısız olduğunda cerrahi yöntemler uygulanmaktadır [1].

2.2. Potasyum Kanalları

Potasyum kanalları, damar düz kasında membran potansiyeli ve vasküler tonusun düzenlenmesi ve sürdürülmesi, düz kas hücrelerindeki baskın iyon geçiş yolağı olmaları nedeniyle önemlidirler. K^+ kanalının açılması, bu katyonun hücre dışına çıkması ve membran hiperpolarizasyonu ile gerçekleşmektedir. Kapanması ise, ters etkiye sahiptir. Bu durum bize K^+ kanal aktivitesinin düz kas kasılmasıyla bağlantılı olduğunu göstermektedir. Birçok tonik düz kaslarda, örneğin arterlerde, dinlenim membran potansiyelini etkileyen K^+ kanalları kontraktıl tonusun düzenleyicisi olarak görev yapmaktadırlar [54].

2.2.1. Potasyum Kanal Çeşitleri

İyon kanalları başlarda geçirgen oldukları iyon, elektrofizyolojik özellik ve fonksiyonlara göre sınıflandırılmışlardır. Sonrasında birçok kanalın protein dizileri hakkında bilgilerin artması, kanalların bir seri moleküler ailelerden meydana geldiğı ortaya çıkmıştır. Bunun sonucunda da kanalların sınıflandırılması moleküler yapılarına göre olmuştur. Potasyum kanalları ise, içe yönelik doğrultucu kanal gen ailesi ve bu ailenin alt türleri sınıfının bir üyesi olduğu bildirilmiştir [54].

Vasküler düz kasta başlıca dört çeşit K^+ kanalı bulunmaktadır. Bunlar [55]:

1. İntraselüler Ca^{2+} seviyelerindeki değışiklikle uyarılan Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanalı.
2. Voltaja duyarlı K^+ kanalı.
3. Küçük arterlerde intraselüler K^+ değışikliklerine aracılık eden içe yönelik doğrultucu K^+ kanalları.
4. Hücrel metabolik değışimlere karşı yanıt veren ATP' ye duyarlı K^+ kanalları.

2.2.1.1. Ca^{2+} İle Aktive Olan K^+ Kanalları (K_{Ca})

K_{Ca} kanallarının ortak özellikleri, kanalın açılması için intraselüler kalsiyuma bağılıktır. Bu tipteki kanallar ilk defa omurgasız sinir hücrelerinde tespit edilmiştir. Daha sonra birçok memeli sinir hücrelerinde elektriksel sinyal oluşumundan sorumlu olduğu ortaya çıkmıştır [56].

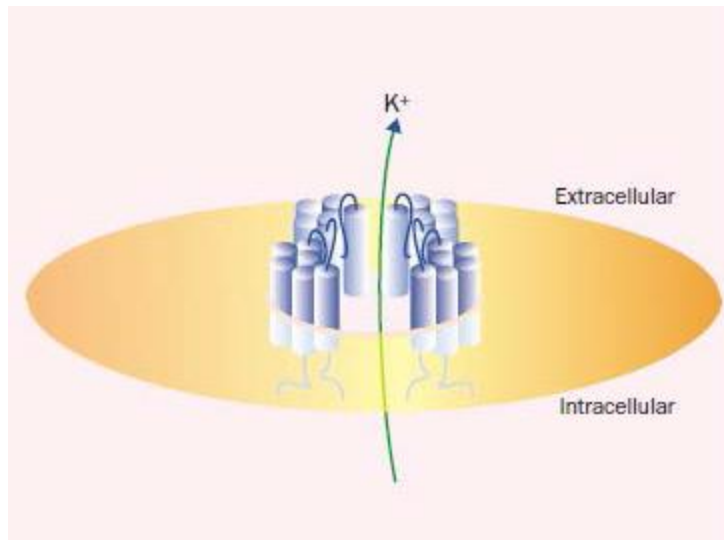
Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanalları tek kanal iletkenliklerine göre; düşük, orta ve yüksek olarak üçe ayrılmaktadır. Yüksek iletkenlikli K_{Ca} kanalları intraselüler Ca^{2+} değışikliklerine cevap verebildikleri için önemli bir role sahiptirler. Böylelikle, hücre uyarılmasında görev alırlar. İntraselüler Ca^{2+} artışı ve membran depolarizasyonu ile aktive olurlar. Bu kanal α ve β alt

ünitelerinden oluşmaktadır. α alt ünitesinin yedi transmembran segmentinden oluşması ve bunun altısının voltaja duyarlı K^+ kanallarıyla ortak olması, kalsiyumun olmadığı durumlarda bile kanalın aktive olmasını sağlamaktadır. β alt ünitesi ise, toksinlerin kanala bağlandığı bölgedir. Bu alt ünitenin ekstraselüler kısmındaki aminoasitlerin toksin bağlanmasında rollerinin olduğu düşünülmektedir. Bu kanalların aktif vazokonstrüksiyonu sınırlamada ve vazospazmı önlemede negatif feedback rol oynadıkları düşünülmektedir [57, 58].

2.2.1.2. Voltaja Duyarlı K^+ Kanalı (K_V)

Voltaj kapılı potasyum kanalları membran depolarizasyonu ile aktive olmaktadır. Bu kanalların bir kere bile açılmasıyla derişimgradyanı boyunca potasyum iyonlarını elektrik alana karşı iletmektedir. Dışa yönelen bu akım membranın repolarizasyonuna neden olmaktadır[59].

K_V kanallarının alt tiplerinden birinin dört α ve dört β alt ünitesinden oluşan tetramerik yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Kanalın α alt ünitesi K^+ geçirgenliğinden sorumludur [Şekil 2.2.1.2.1.]. K_V kanalı intrinsik voltaj sensörlerine sahiptir. Bu intrinsik voltaj sensörleri membran depolarizasyonunu algılamaktadır. Bu kanalların vasküler tonusun düzenlenmesinde katkıda bulunduğu düşünülmektedir. K_V kanalları hem vazodilatörlerin hem de vazokonstrüktörlerin etki mekanizmalarına katılmaktadırlar. Vasküler kasta bu kanalların selektif inhibitörleri bulunmaması *in vivo* rollerinin araştırılmasını engellemiştir [57, 58, 60].



Şekil 2.2.1.2.1. V- kapılı K^+ kanalı ($K_V1.1$) [59].

2.2.1.3. İçe Yönelik Doğrultucu K⁺ Kanalı (K_{IR})

Bu kanal ilk olarak iskelet kasında bulunmuştur. Daha sonra uyarılabilen ve uyarılamayan hücrelerde varlıkları gösterilmiştir. Bu iyon kanalları fizyolojik iyon gradyanında dışa yönelik akımdan çok içe yönelik akımı daha fazla ve daha kolay iletebilmektedir. Ekstraselüler K⁺ derişimindeki artışlarda ise yönlendirmenin gözleendiği potansiyelde sağa doğru paralel kaymayla birlikte, iletkenlikte büyük bir artış gözlenmektedir. Bu kanallar, dinlenim potansiyelini ve dinlenim durumu K⁺ iletkenliğini kontrol etmektedirler. Kanalin K⁺ geçirgenliğinden, K_V kanallarında olduğu gibi, α alt ünitesi sorumludur. K_V kanalları ile K_{IR} kanalları arasında por oluşumu ve yapıları bakımından da benzerlikler bulunmaktadır. Bu benzerliklere rağmen bu kanalların açılma mekanizmaları farklılık göstermektedir. Bu kanalların içe yönelik doğrultucu özellikleri poliaminlerin oluşturduğu intraselüler blokaja bağlıdır [57, 60, 61].

2.2.1.4. ATP'ye Duyarlı Potasyum Kanalları (K_{ATP})

ATP'ye duyarlı K⁺ kanalları ayrıntılı bir biçimde 2.2.2. konu başlığında ve alt başlıklarında anlatılmıştır.

2.2.2. K_{ATP}Kanalları

K_{ATP} kanalları ilk olarak 30 yıl önce Noma tarafından kalpte, kardiyak miyositlerde bulunmuştur. Sonra yapılan çalışmalarda vasküler düz kas hücreleri dahil birçok hücre tipinde bu kanalların varlığına rastlanmıştır. Noma'nın yaptığı çalışmalarda, siyanür tarafından oluşturulan metabolik inhibisyon ile normalde ATP tarafından inhibe edilen K⁺ kanalları açılmıştır. Bu nedenle bu kanala K_{ATP} adı verilmiştir [62].

K_{ATP} kanalları diyabet, hipertansiyon ve anjinanın içinde bulunduğu birçok hastalık için terapötik hedeflerindedir. Bunun nedeni kanalların uyarılmasının vazodilatasyon aracılığı ile iskemiye karşı myokardı koruyucu etki sağlaması ve inhibisyonlarının insülin sekresyonunu kolaylaştırmasıdır. Yüksek hücre içi ATP derişimi K_{ATP} kanallarını kapalı tutmaktadır. Fakat iskemi gibi durumlarda, hücre içi ATP derişimini düşüreceğinden K_{ATP} kanalları açılmaktadır. K⁺ akımlarının dışa yönelik artması aksiyon potansiyelinin süresinin azalmasına, Ca²⁺ hücre girişinin azalmasına ve kasılmaların da azalmasını sağlayıp ATP tasarrufu sağlamaktadır. İskemik hasara karşı koruyucu etkisini bu şekilde göstermektedir [63].

K_{ATP} kanallarının ATP ile inhibe edilmesinin yanısıra diğeri bir inhibe edici ajan sülfonilürelerdir. Stimüle edici ajanlar ise, nükleotid difosfat ve K^+ kanal açıcı ilaçlardır. Pankreas, vasküler düz kas ve kalp gibi farklı dokularda bulunan K_{ATP} kanallarının özellikleri aynı olsa bile anlatılan bu ajanlara karşı farklı dokularda oluşan cevapların özellikleri farklılık göstermektedir. Önceden yapılan çalışmalarda, glibenklamidin, K_{ATP} kanal blokörü, çeşitli türlerde mikrosirkülasyon yataklarında arterioler kasılmaya yol açtığı belirlenmiştir. Sonuç olarak K_{ATP} kanalları dinlenme durumunda aktif olacağı hipotezini desteklemektedir [63].

2.2.2.1. K_{ATP} Kanallarının Özellikleri

K_{ATP} kanallarının iletkenlikleri, çeşitli damarlarda değişkenlik göstermesine rağmen düşük/orta ve yüksek iletkenlik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Genellikle K_{ATP} kanallarının iletkenlikleri dokularda bu iki grubun ortasına denk düşmektedir. Yapılan çalışmalarda sıçanların aortlarında ise yüksek iletkenlikli kanalların bulunduğu gözlemlenmiştir.

K_{ATP} kanallarının hücre içi ATP tarafından inhibe edilmesiyle ATP'ye duyarlı K^+ kanalı olarak adlandırılmalarına rağmen sitoplazmadaki ATP düzeyleri çok iyi ayarlanmakta, milimolar düzeylerde sabit tutulmaktadır. Şiddetli metabolik tehlike durumlarında ise azalmalar görülmektedir. Bu durumda K_{ATP} kanallarının ATP'ye ek olarak başka faktörlerin de ko-regülasyonu düşünülmektedir. Bu metabolitler arasında adenosin difosfat (ADP) ve diğeri difoslatlarda bulunmaktadır. Bunun yanında, hücre içi pH ve kanalların çalışabilir halde olması açısından fosforilasyon da kanal aktivitesinde rol oynamaktadır.

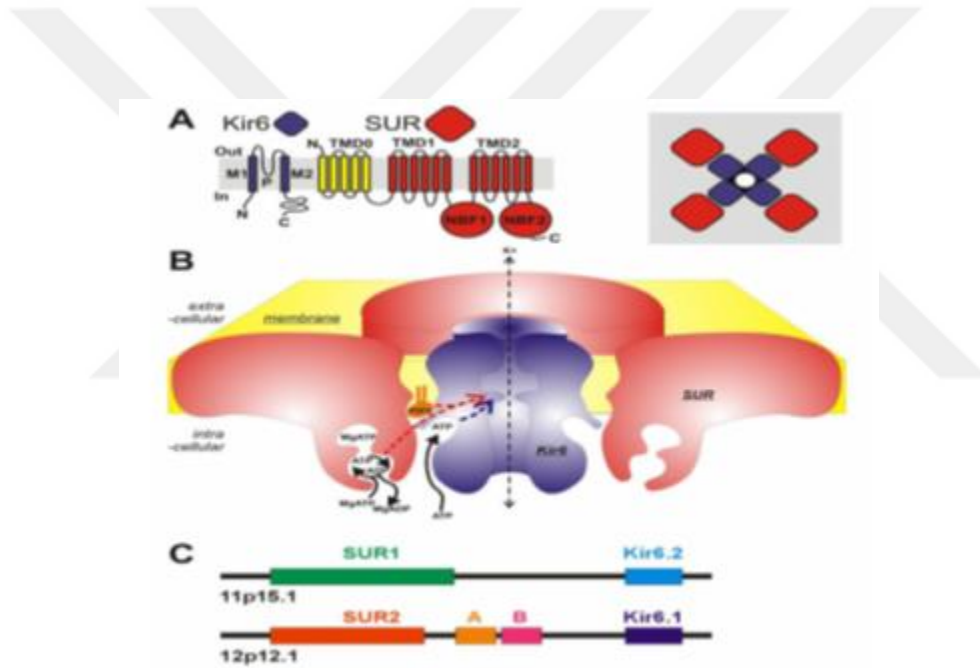
Kalp ve iskelet kasında yapılan çalışmalarda, K_{ATP} kanallarının kinetik davranışlarının karmaşık olduğu gözlenmiştir, fakat vasküler düz kasda hücre kinetiklerine ait bilgiler pek bulunmamaktadır [54].

2.2.2.2. K_{ATP} Kanal Yapısı ve Moleküler Düzenlemeleri

Standart K_{ATP} kanalları, iki tip alt ünitelerden oluşmaktadır: SUR adı verilen ATP bağlama kaseti (ABC) taşıyıcı protein ailesinden olan sülfonilüre reseptör alt ünitesi ve Kir6 kanal oluşturucu alt üniteleridir. K_{ATP} kanalları, bu alt ünitelerin oluşturduğu heterooktomerik bir kompleks halindedir. K_{ATP} kanalları Kir6 ve SUR alt birimleri KCNJ8 (Kir6.1), KCNJ11 (Kir6.2), ABCC8 (SUR1) ve ABCC9 (SUR2) genleri tarafından kodlanmaktadır. Ancak, alternatif RNA birleştirme işlemleri kanal komplekslerine birbirinden farklı fizyolojik ve farmakolojik

özellikler verdiği için SUR2 proteini alt birimleri (örneğin; SUR2A ve SUR2B) oluşturmaktadır [64-69].

Fonksiyonel bir K_{ATP} kanalı oluşumu için her iki alt ünitenin de varlığına ihtiyaç vardır. İlginç bir şekilde Kir6.2 ve SUR1 genleri insan kromozomu 11p15.1' de ortak regülasyonu işaret edecek şekilde birbirlerinin yanında bulunmaktadır. Fakat mevcut olan bu durum araştırılmamıştır [65]. Bunun yanı sıra Kir6.1 ve SUR2 genleri, evrimsel bir duplikasyonu işaret edecek şekilde kromozom 12p12.1'de de yan yana bulunmaktadır [67, 70]. İşlevsel K_{ATP} kanalını oluşturabilmek için Kir6.2 ve SUR1 alt birimleri 4:4 sitokiyometriyle bir araya gelirler [65, 71-73]. Benzer şekilde, yapılan biyokimyasal çalışmalarda SUR2A ve SUR2B protein varyantlarının Kir6 alt birimleriyle muhtemel benzer oktomerik düzenleme ile birleşebildikleri gösterilmiştir [64, 74-76].



Şekil 2.2.2.2.1.A) 4 Kir6 ve 4 SUR alt birimlerinin oluşturduğu oktomerik kompleks. B) Kanalın metabolik olarak kontrol geçişi sitoplazmik ATP tarafından hızlı ve tersinir bir şekilde kapatılması ve nükleotid tri- ve di- fosfatlar tarafından açılabilmesi. C) İnsan K_{ATP} gen yapısı. KCNJ11 (Kir6.2) ve ABCC8 (SUR1) genleri 11. kromozom üzerinde bulunurken; KCNJ8 (Kir6.1) ve ABCC9 (SUR2) 12. kromozom üzerinde bulunmaktadır. [77].

Prokaryotik ve ökaryotik Kir kanalları üzerinde gerçekleştirilen kristolografik çalışmalarda, bu kanalların, gözenğin dar kısmını oluşturan ve iyon seçiciliğini sağlayan hücre dışı bir döngü ile birbirine bağlanan iki transmembran heliksden (M1, M2) oluşan korunmuş bir yapıya sahip olduğu ortaya konmuştur [78, 79]. Diğer ABCC ailesinin üyeleri gibi, SUR'lar TMD1 ve TMD2 olmak üzere iki altı heliks içeren transmembran bölgesi bulundurlar. Ancak SUR'lar

aynı zamanda beş transmembran heliksten oluşan, Kir6.x hareketi ve bu hareketin sınırlandırılması için hayati olan, N-ucu TMD0 bölgesi de içerir [80]. SUR'lar ayrıca TMD1 ve TMD2'nin arasında bir nükleotide bağlanan kıvrım (NBF1) ve TMD2'nin arkasında ikinci nükleotide bağlanan kıvrım (NBF2) içerirler. Bakteriyel ABC proteinlerinde kristalize edilen NBF'ler "baş kısmından son kısma bağlanmış" dimerler şeklinde kristalize edilmişlerdir. Bu durum SUR' da NBF1 ve NBF2 arasındaki işlevsel yapıyı da yansıtmaktadır [81]. Kir6 ve SUR alt birimlerinin nasıl bağlandığı hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak elektron mikroskopisi ve alt birimler arası FRET çalışmaları tamamlanmış K_{ATP} komplekslerinin 4 SUR ve 4 Kir6 alt birimlerinin sıkı bir şekilde paketlenmiş bir yapıyı işaret etmektedir [Şekil 2.2.2.2.1.] [82, 83].

K_{ATP} kanallarındaki en önemli düzenleyici özellikler, kanalların sitoplazmik ATP tarafından hızlı ve tersinir bir şekilde kapatılması ve nükleotid tri- ve di- fosfatlar tarafından açılabilmesidir [81]. Başka nükleotidlerin eksikliğinde, yarı maksimum kanal inhibisyonuna neden olan serbest ATP derişimi mikromolar aralıktadır. Sitolik ATP'nin hücresel seviyeleri milimolar aralıkta (1-5mM) olduğu çok az metabolizma aktivitesiyle değişebildiği için, muhtemelen [ATP] kanal faaliyetini her zaman tamamen inhibe edecek miktarda olacaktır. Kanal faaliyetlerinin aktifleştirilmesi özellikle SUR alt birimlerinin üzerinde bulunan MgADP olmak üzere MG-nükleotidlerinden kaynaklanacaktır. Nükleotid regülasyonu K_{ATP} kanallarının aktivitelerinin, her ne kadar başka ikincil mesaj sistemleri ve regülatörler de kanal aktivitesini kontrol etmede ve kanallar bile bağlantılı patolojiler yol açmada rol oynuyor olabilese de, temel regülatörüdür [84, 85].

2.2.2.3. K_{ATP} Kanallarının Fizyolojik Fonksiyonları

K_{ATP} kanalları birçok vazoaktif faktörün hedefidir. Kan akımının metabolik düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Hipoksi gibi kan ihtiyacının arttığı durumlarda komşu dokulardan vazodilatörlerin salınması ya da hipoksinin direkt etkisi sonucunda bu kanallar aktif hale gelmektedir. Koroner arterlerde olduğu gibi, vazodilatörler ortamda bulunmasa ve oksijen seviyesi normal olsa bile bu kanalların aktivasyonu için kanalların membran potansiyelinin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır.

K_{ATP} kanalları depolarizasyon ve kasılmaya yol açan vazokonstriktörler tarafından inhibe edilebilirler [54].

Vazodilatörlere karşı yanıt: Peptidler, özellikle kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) K_{ATP} kanallarının aktif hale getirirler. β_1 ve β_2 adrenerejik reseptörlerin aktivasyonu düz kas gevşemesine neden olur ve bu reseptörlerin agonistleri glibenklamide duyarlı vazodilatasyona neden olurlar. Artan intraselüler cAMP derişimi ve bunu takip eden PKA aktivasyonu düz kas β -

adrenerjik dilatasyon mekanizmasıdır ve bu yolak vasküler K_{ATP} kanallarını aktif hale getirmektedir.

Adenozin metabolik ihtiyaca göre kan akımının ayarlanmasından önemli bir rol oynamaktadır. K_{ATP} kanalları da adenozinin bu etkisine katılmaktadır.

Endotelyum tabakası, NO, PGI_2 ve EDHF gibi vazodilatör faktörler salıvermektedir. Bütünbu faktörlerin K_{ATP} kanallarını aktif hale getirdiğini destekleyen bulgular mevcuttur. PGI_2 ve PGD_2 ve PGE_2 gibi prostanoidler düz kası gevşetmektedirler. Stabil bir PGI_2 analoguolan iloprostun endojen K^+ kanallarını açtığı ve etkisinin bir kısmının K_{ATP} kanalaktivasyonu yoluyla olduğu bilinmektedir. NO ve nitro vazodilatörlerin, K_{ATP} kanallarını cGMP'nin PKA'yı aktif hale getirmesi sonucunda aktif hale getirdiği düşünülmektedir [54].

Hipoksinin neden olduğu gevşeme yanıtı: Çeşitli vasküler yataklarda metabolik ihtiyaç ile oksijen ve metabolik substratların sağlanması arasında ilişki karakteristiktir. Kan akımı ve metabolik ihtiyaç arasındaki ilişkide farklı mekanizmalar rol oynamaktadır:

- 1) Oksijen gerilimi düz kas hücreleri üzerinde direk etkili olması,
- 2) Endotel hücrelerinden çeşitli vazodilatörlerin salınması,
- 3) Düz kas üzerinde vazodilatör etkileri bulunan metabolitlerin komşu dokulardan salınmasıdır.

Hipoksinin damar düz kasındaki K_{ATP} kanallarının aktif hale getirdiği mekanizmayı selüler metabolizma ile etkileşip hücre içinde nükleotid seviyelerinin değiştirilmesi olarak açıklanabilir. Aortta da hipoksinin total hücresele ATP derişimini değiştirmeden gevşettiği düşünüldüğünde vazodilatasyon için yeni bir mekanizma gündeme gelmektedir. İyon kanallarının hipoksi esnasında düzenlenmesinde kanal ile ilişkili oksijen sensöründen bahsedilebilir. Kısacası, K_{ATP} kanal aktivitesi hipoksit yanıtla çeşitli vazodilatör uyarıların ortak integrasyon noktasıdır [54].

Vazokonstrüktörler: Anjiyotensin II, vazopressin ve endotelin damar düz kasındaki K_{ATP} kanallarının inaktif hale gelmesine neden olur. Muskarinik reseptör uyarılması, fenilefrin, nöropeptid Y, serotonin ve histamin K_{ATP} kanallarını PKC' nin uyarılması ile inaktif hale getirirler [54].

2.2.2.4. K_{ATP} Kanallarını Regüle Eden Hücresele Mekanizmalar

Hücrenin metabolik faaliyetleri sonucunda, ATP'nin azalması, ADP ve diğer nükleotid difosfatların derişimlerinin artması gibi intraselüler metabolit miktarında meydana gelen

değişikliklerin K_{ATP} kanal aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Hücre metabolizmasının metabolik zehirlerle inhibisyonu, substrat azalması veya hipoksi K_{ATP} akımlarını arttırmaktadır.

Vazoaktif maddeler, genellikle düz kas hücresindeki iyon kanallarını modüle ederek vasküler tonusu değiştirmektedirler. Birçok vazokonstriktör PKC'yi aktive ederek K_{ATP} kanallarını kapatmaktadırlar. Birçok vazodilatör de; ya cAMP'ye bağımlı protein kinazı (PKA), ya da cGMP'ye bağımlı protein kinazı (PKG) aktive ederek K_{ATP} kanallarını açmaktadırlar. K_{ATP} kanal aktivitesinin son durumunu da bu kinazların aktiviteleri arasındaki denge belirlemektedir. Ayrıca bu ikinci mesajcı sistemlerinin aktivasyonu diğer düz kas iyonkanallarının aktivitesinin koordine regülasyonu ile de sonuçlanmaktadır [54].

2.2.3. K_{ATP} ve Kalp-Damar Hastalıkları

K_{ATP} kanallarının kardiyak miyositlerinin, aynı zamanda vasküler düz kasların, endotelyumun yüzey membranlarında ve belki de birçok hücrenin mitokondriyal iç membranlarında çok büyük bir iyonik ileti potansiyeli sunduğu uzun zaman önce fark edilmiştir. Normal metabolik koşullarda, kardiyak sarkolemma K_{ATP} kanalları çoğunlukla kapalıdır ve hücre uyarılmasında önemli katkıları bulunmaz. Ancak, bu kanallar anoksi, metabolik inhibisyon veya iskemi gibi ciddi metabolik stres kaynaklarına maruz kaldıklarında açılabilirler. Kas hücrelerinde, aksiyon potansiyelinin kısılması kalsiyum girişini engellemekte ve kasılmayı inhibe etmektedir [86]. Dolayısıyla enerji tüketimi azalmakta ve potansiyel olarak hücreyi korumaktadır. Bu enerji koruyucu 'strateji' tabii ki öz kısıtlayıcıdır. Eğer çok fazla miyosit büzülme bırakırsa, kalp pompalanmayı bırakmakta ve hayvan ölmektedir. Ancak bu strateji aksi kanıtlanmadığı sürece akla yatkındır.

Damar sisteminde, K^+ kanalı faaliyetinin inhibisyonu membran potansiyelinin depolarizasyonu, L-tipi voltaja duyarlı Ca^{2+} kanallarının aktivasyonu, Ca^{2+} girişi ve vazokonstriksiyona neden olma eğilimindedir. Bu durumun aksine, K^+ kanallarının aktivasyonu membran hiperpolarizasyonuna, voltaja bağlı Ca^{2+} girişinin azalması ve vazodilatasyona neden olmaktadır [87]. Membran potansiyeli ve Ca^{2+} akışı arasındaki ilişki özellikle düz kaslarda keskin şekilde gerçekleşir, sadece birkaç milivoltluk membran depolarizasyonu $[Ca^{2+}]_i$ 'de birkaç katlık artışlar ve azalışlara neden olabilmektedir [88, 89]. Endotelyal hücrelerde voltaja bağlı Ca^{2+} kanalları bulunmaz ve seçici olmayan kanallarda hücreye Ca^{2+} girişi uyarılan hücrelerin aksine hiperpolarize olmuş voltaj seviyelerinde gerçekleşmektedir [90, 91]. K_{ATP} kanallarının aktive edilmesi, hücreleri genellikle hiperpolarize eder ve bu durum artan $[Ca^{2+}]_i$ seviyeleri ve EDHF ve endotelin de dahil olmak üzere artan vazoaktif madde salınımı ile sonuçlanmaktadır.

2.2.3.1. Kir6 Genleri ve Hastalıkları

Aşağıda detaylı bir şekilde ifade edildiği gibi, K_{ATP} genlerinin farede genetik manipülasyonu, belirgin kardiyovasküler patolojilere neden olabilmektedir. Ancak yakın zamana kadar K_{ATP} gen mutasyonlarının insanlarda neden olduğu kardiyovasküler hastalıklar ile ilgili çok az kanıt bulunmaktadır [Tablo 2.2.3.1.] [77]. KCNJ11 geni baskın K_{ATP} kanal gözenek oluşturucu alt birimini (Kir6.2) hem pankreatik β hücrelerinde hem de kardiyak miyositlerde kodlamaktadır [92]. Bu gende ortaya çıkan işlev kazanma veya kaybetme mutasyonlarının şu an sırasıyla diyabet ve konjenital hiperinsülinizmin ardında yatan nedenleri olduğu çok iyi anlaşılmaktadır [93]. Ancak bu hastalardaki kardiyolojik problemler ile ilgili yayınlanmış kanıtlar bulunmamaktadır.

KCNJ8 geni düz kaslarda ifade edilen temel kanal oluşturucu alt birim olan ve kardiyomiyositlerde ifade edilmesi muhtemel olan Kir6.1'i kodlamaktadır [92, 94]. Güncel çalışmalarda Kir6.1'deki S422L nokta mutasyonunun EKG'nin J noktasında, Brugada Sendromu (BrS) ve erken repolarizasyon sendromu (ERS) da dahil olmak üzere anomaliler ile karakterize edilen "J-dalgası" fenomeni ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. İlk olarak Haissaguerre ve arkadaşları'nın bildirdiği durumda, S422L varyantına sahip olan bir hastanın J-noktası artışı birden fazla (>100) yanıt vermeyen, güçlü erken repolarizasyon ile bağlantılı ventriküler fibrilasyon (VF) yenilenmesi ile tespit edilmiştir [95]. Bu konu hakkında ilave çalışmalar arasında, erken repolarizasyon ile bağlantılı iki (325 probant arasından) atriyal fibrilasyon (AF) probandı bildiren Delaney ve arkadaşları, 101 analiz edilmiş hasta arasından aynı S422L varyantının taşıyan bir Brugada Sendromu hastasının ve bir erken repolarizasyon hastasının bildiren Medeiros-Domingo ve arkadaşları, ve 3 ayrı varyantı içeren 3 ilave BrS ve 1 ERS probandı bildiren Barajas-Martinez ve arkadaşları vardır [96-98]. Bu varyant herhangi bir kontrol alelinde tespit edilmemiştir. Son iki çalışmanın her ikisinde de, ERS'nin ve dolayısıyla AF'nin altında yatan Kir6.1 aktivitesinin işlev kazanma sonucu ortaya çıktığını öne süren bir şekilde S422L varyantı için artan kanal faaliyetini bildirmişlerdir. Bu durum aksine, 292 birbiriyle akrabalığı bulunmayan ani bebek ölümü sendromu (SIDS) nekropsi örneklerinde gerçekleştirilen DNA dizilimi analizinde, 2 kişide özgün bir KCNJ8 varyantı ve her ikisinde Kir6.1'in distal ucunda bulunan bir çerçeve delesyonu (E332del) ve bir de nokta mutasyonu (V346I) tespit edilmiştir. Bu çalışmada, rekombinant olarak ekspres edilen mutant kanallarda, çalışmalara göre SIDS'e neden olan mutasyonu henüz açıklanamamış Kir6.1'de gerçekleşen işlev kaybı mutasyonları olduğu sonucuna ulaştıran, azalan kanal aktivitesi bildirilmiştir.

2.2.3.2. SUR Genleri ve Hastalıkları

ABCC8 geni, pankreatik β hücrelerinde baskın sülfonilüre reseptörü olan ve aynı zamanda kemirgenlerin özellikle atrium olmak üzere kalplerinde bulunan ve potansiyel olarak insanlarda daha da yaygın olarak bulunan SUR1'i kodlar [99, 100]. Pankreatik K_{ATP} kanallarına dahil olduğu için bu gendeki işlev kazancı ve kaybı mutasyonları aynı zamanda sırasıyla neonatal diyabete ve konjenital hiperinsülizme neden olurlar. Ancak bu hastalarda kardiyolojik problemler bulunduğu dair herhangi bir rapor bulunmamaktadır [101-103]. ABCC9 ikinci SUR2 alt birimlerini kodlar ve bu muhtemelen hem kardiyak hem de vasküler kaslardaki temel SUR izoformudur. SUR2 işlev kaybı mutasyonlarının kardiyolojik hastalıklara neden olması ile ilgili, her ikisi de Andre Terzic ve arkadaşları tarafından yayınlanan iki rapor vardır [104, 105]. Her iki durumda da mutasyonlar C-ucu ekzonlarında meydana gelmiştir ve SUR2A'da bulunan ikinci nükleotide bağlanan kıvrımın bozulmasına ve dolayısıyla SUR2B'yi etkilemeden kanal aktivitesinin nükleotidler tarafından uyarılmasının azalmasına neden olmaktadır. İlk raporda sunulan mutasyonu taşıyan normal kardiyolojik morfoloji ve kasılma gösteren, Marshall damarından kaynaklanan uzun süreli atriyal fibrilasyona sahip olan bir hasta bildirilmiştir [105]. Hasta radyo frekanslı ablasyon uygulanarak başarıyla tedavi edilmiştir. İkinci raporda, idiyopatik dilate kardiyomyopati nedeniyle ortaya çıkan kalp yetmezliği ile ortaya çıkan iki farklı mutasyon taşıyan 2 kişi bildirilmiştir [104].

Birden fazla organı etkileyen bir hastalık olan Cantu Sendromu ile bağlantılı ABCC9 geninin mutasyonlarını bildiren iki yeni akademik makale bağlantılı sonuçların açık bir resmini ortaya koymakta ve araştırma için yeni yollar açmaktadır. İlk çalışma Cantu Sendromu teşhisi konmuş 14 kişinin genetik analizini içermektedir ve bu kişilerin 11'in ABCC9 geninde mutasyonlar tespit edilmiştir [106, 107]. Bu kişilerden 6'sında mutasyonlar *de novo* olarak ortaya çıkmıştır ve bu hastalıklardan etkilenen akrabaları bulunmamaktadır. Bu durumun aktarımının otozomal dominant olduğunu gösteren, bir baba ve kızının mevcut olduğu iki aile de ayrıca bildirilmiştir. Bu çalışmada ilave olarak rekombinant kanal işlevinin analizi gerçekleştirilmemiştir, ancak bu mutasyonların hepsinin kanal işlevi kazanımı için sonuçlandığına varılmıştır [108]. Bu çalışmanın sonuçları, ilave 16 hastanın 14'ünde ABCC9 genindeki mutasyonunun sonuçlarının gözlemlendiği ikinci bir çalışmayla da desteklenmiştir [109]. Bu çalışmada mutant kanal proteinlerinin rekombinant ekspresyonu, 3 örnek mutantın ATP'ye karşı, nerede bulunursa bulunsun artan K_{ATP} aktivitesine neden olacak şekilde daha düşük hassasiyet ortaya çıktığını açık bir şekilde göstermiştir.

Tablo 2.2.3.1. K_{ATP} Kanal Mutasyonlarının İlişkili Olduğu Hastalıklar

GENLER	KLİNİK DURUMU	ÖZELLİKLERİ	ETKİLENEN BİREYLER
KNCJ8 (Kir6.1)	J-Dalga Sendromu	S422L mutasyonu. Rapor edilen GOF. EKG' de J noktasındaki anormallik BrS ve ERS ile birlikte VF ve AF içermektedir.	9
	SIDS	Çerçeve delesyonu (E332del) ve nokta mutasyon (V346I). Mekanizması tam olarak açıklanamamıştır.	2
KCNJ11 (Kir6.2)	Neonatal Diyabet	Çoklu GOF mutasyonları insülin segresyonunun inhibisyonuna sebep olmaktadır. Kardiyovasküler Fenotipi bulunmamaktadır.	>100
	Tip 2 Diyabet	E23K varyasyonu, hafif GOF , T2DM ile ilişkili potansiyel olarak HF ile ilişkili	30% Kafkasyalılar
	Konjenital Hiperinsülimizm	LOF mutasyonları insülinin hipersekresyonuna sebep olmaktadır. Kardiyovasküler Fenotip bulunmamaktadır.	>10
ABCC9 (SUR1)	Neonatal Diyabet	Çoklu GOF mutasyonları insülin segresyonunun inhibisyonuna sebep olmaktadır. Kardiyovasküler Fenotip bulunmamaktadır.	>100
	Konjenital Hiperin	Çoklu LOF mutasyonları insülin hipersegregasyonuna sebep olur. Kardiyovasküler fenotip bulunmamaktadır.	>100
ABCC9 (SUR2)	AF	LOF mutasyonlarının izole edilmesiyle Marshall damarındaki atriyal fibrilasyon ile ilişkili	1
	İdiyopatik Açılan Kardiyomiopati	İki farklı LOF mutasyon içermektedir. Kalp yetmezliği ile ilişkili	2
	Cantu Sendromu	GOF mutasyonlar birçok organı etkileyen kompleks bir hastalıkla ilişkilidir.	25

2.2.4. Kalp-Damar Hastalıkları ve K_{ATP} Mutasyonları

Genetik Olarak Değiştirilmiş Hayvanlardan Elde Edilen Bilgiler:

Her 4 K_{ATP} kanal geni susturulmuş fare modelleri geliştirilmiş ve modeller derinlemesine analiz edilmiştir. Kir6.2 nakavt faresinde insüline bağlı glukoz salgılanmasının yok olduğu gözlemlenmiştir ve bu modelleme insanlardaki hiperinsülinemiyi ifade etmektedir [110]. SUR1 susturulmuş fare modeli temel olarak Kir6.2^{-/-} ile aynı özellikleri göstermektedir ve bu fareyle benzer şekilde önemli etkiler pankreas hücrelerinde gözlemlenmektedir. Yapılan çalışmalarda, Kir6.2 ve SUR1 nakavt fareleri kardiyolojik fenotipleri karmaşık olarak göstermişlerdir.

Kir6.1/SUR2 susturulmuş fare modelleri ise vasküler işlevler konusunda dikkat çekmektedir. Bu genlerin susturulduğu fare modelleri bu alt birimlerin özellikle koroner sirkülasyonda olmak üzere kardiyovasküler sistemde oynadığı kritik rollere dikkat çekmektedir [7, 8]. Kir6.1^{-/-} ve SUR2^{-/-} farelerinin kardiyovasküler fenotipleri benzerdir ve bu fenotiplerin

arasında hipertansiyon, koroner arter vazospazmları ve ani kardiyak ölüm bulunmaktadır. Her iki hayvandan da elde edilen elektrokardiyamlar, ani ölümün nedeni olabilecek ST segmenti artışını ve atriyoventriküler (AV) bloğu göstermektedir. Önemli olarak Ca^{2+} kanalı bloklayıcısı nifedipin verilen SUR2^{-/-} farelerde, hiperkontraktilite nedeninin hiperpolarize edici K_{ATP} akımının kaybolması nedeniyle ortaya çıkan anormal şekilde yüksek $[Ca^{2+}]_i$ seviyelerinin olduğuna işaret edecek şekilde koroner arter vazospazmlarında azalma gözlemlenmiştir [8]. Bu K_{ATP} yoksunu fare, bir insan hastalığı olan Prinzmetal Anjina' nın (veya bir varyantı) özelliklerini göstermektedir. Ancak çeşitli çalışmalarda, insan koroner vazospazmları ile veya hipertansiyonu ile Kir6.1 veya SUR2 işlev kaybı mutasyonları arasında bir bağlantı kurmakta, her ne kadar bağlantı analizi Kir6.1 ve SUR2'nin bulunduğu lokusta bağlantılı genlerin bulunduğunu işaret etse de başarısız olmuştur [111-113].

Kir6.1 transkripleri kalpte, akciğerlerde, beyinde, pankreasta ve endotelyumda ve SUR2 transkripleri de iskelet ve kalp kaslarında (SUR2A), beyinde (SUR2A) ve endotelyumda (SUR2B) tespit edilmiştir [64, 67, 114, 115]. Dolayısıyla, Kir6.1^{-/-} ve SUR2^{-/-} farelerinin (veya Cantu Sendromu hastalarının) kardiyovasküler fenotiplerinin, düz kas veya başka dokulardaki K_{ATP} kaybını (veya kazancını) yansıtan fenotiplerin mevcut olması mümkündür [116]. Bulgular ile desteklenen kardiyovasküler hemeostazın sağlanmasında düz olmayan kas K_{ATP} 'lerinin oynadığı rol endotelial K_{ATP} 'lerin (Kir6.1/SUR2B), transjenaz ile baskılanmak için hedeflendiği ve bu durum sonucunda artan koroner perfüzyon basıncının ve koroner kan akışında azalmanın gerçekleştiği ile ilgili bulgular tespit edilmiştir [115, 117, 118]. Buna benzer bir fenotip olan Kir6.1^{-/-} farelerinde de tespit edilmiştir [7]. İlginç bir şekilde, vazokonstrüktör endotelin-1'in salgılanması endotelial K_{ATP} 'lerin baskılanması ile potansiyel olarak vazokonstrüksiyonun nedeni artan dolaşımdaki endotelin-1 seviyesini işaret edecek şekilde artmaktadır [119]. Bu çalışmalar endotelial hücreler ve bunların üzerinde bulunan vasküler düz kas hücreleri arasındaki, endotelial K_{ATP} 'nin endotelin-1 salınımını regüle ettiği bir K_{ATP} 'ye bağlı parakrin sinyalizasyonunun varlık ihtimaline işaret etmektedir. Vasküler düz kas, K_{ATP} akımlarını özgün olarak ifade edilerek transjenik olarak düzeltilmesi koroner arter vazospazmlarını, atriyoventriküler (AV) kalp bloğunu veya SUR2^{-/-} farelerinde görülen ani kardiyak ölümleri, vasküler olmayan düz kasların vasküler tonusu ayarlamada muhtemel bir rol oynadığını işaret edecek şekilde düzeltmemektedir [120].

2.2.5. Kalp-Damar Hastalıkları K_{ATP} Aktivitesinin Terapötik Olarak Düzenlenme Potansiyeli

K_{ATP} kanallarının aktivitelerinin genel ve belki de dokuya özel bir şekilde düzenlenmesinde, sadece kanal inhibitörlerini değil aynı zaman da kanal açıcılarını da kapsayan zengin bir farmakoloji mevcuttur. Bu kanal açıcılar iki temel klinik amaçla kullanılmaktadır:

1. Hiperinsülinemi koşullarında insülin salgılanmasını engellemek,
2. Antihipertansifler olarak.

Şimdiye kadar, sülfonilürelerin klinikte kullanımı tip 2 diyabetin tedavisi ile sınırlı kalmıştır ve bunların olumsuz kardiyovasküler etkileri ile ilgili tartışmalar mevcuttur. Sülfonilürelerin diyabet tedavisinde kullanılmasıyla oluşan etki: Bu bileşikler artmış ekstraselüler glukozun pankreas β hücresindeki etkisini taklit ederler. Membran depolarizasyonuna neden olurlar. Aksiyon potansiyeli tetiklenir ve hücreye Ca^{2+} girişi ile insülin sekresyonuna neden olurlar [54].

Tablo 2.2.5.1.'de kullanılan aktivatör ve blokörler gösterilmiştir [54].

Tablo 2.2.5.1. Çeşitli K_{ATP} Kanal Aktivatör ve Blokörlerinin Kullanıldıkları İndikasyonlar

K_{ATP} Kanal Aktivatörleri	Terapötik İndikasyonlar	Bileşikler
	Hipertansiyon, İskemik Kalp Hastalığı, Kalp Hastalığı	Pinasidil, Diazoksit, Nikorandil
	Astım	Aprikalim, Bimekalim, Kromakalim, Celikalim, Emakalim, NIP 121, RO 316930, RWJ 29009, SDZ PCO 400, Rimakalim, Simakalim, YM-099, YM-934
	Myokard İskemisi	BMS 180448, U 89232
	Alopesi	P1075, Minoksidil
	Üriner İnkontinens	ZM244085, ZD6169, WAY151616, ZD0947
	Eretil Disfonksiyon	PNU83757
K_{ATP} Kanal Blokörleri	Ventriküler Aritmi, Kalp Hastalığı, Kardiyak Arrest	HM1098, HMR1883
	Tip II Diyabet	Tolbutamid, Klorpropamid, Glibenklamid, Glipizid, Nategliniid, Repagliniid

Minoksidil, saç büyümesini sağlayan ve ticari olarak topikal uygulamalı saç büyümesi ürünlerinde kullanılan bildirilmiş en aktif kanal açıcıdır [121, 122]. Cantu sendromunun hipertrikoz, yüz dismorfolojisi ve perikardiyal efüzyon da dahil olmak üzere etkilerinin hepsi değilse bile bir çoğu yüksek doz minoksidil kullanımı ile ortaya çıkmaktadır [123]. Bu özellikler başka kanal açıcılar içinde bildirilmişti; diazoksit tedavisi sonucu perikardiyal efüzyon ile ilgili raporda mevcuttur [124]. İlgili çekici bir şekilde, spesifik bir SUR2A aktivatörü olan nikorandil' in akut MI da kullanımı sonucunda tedavi uygulanmayan hastalara göre daha düşük perikardiyal efüzyonun oluştuğu gözlenmiştir [125].

Her ne kadar, literatürde kanal açıcıları ve inhibitörlerinin spesifikliği ile ilgili bariz bir dogma mevcut olsa da, dikkatle, klonlanmış SURlar üzerinde gerçekleştirilen bağlanma analizlerinde, bağlanmanın karmaşıklığı ve değişik SUR hedeflerine *in vivo* bağlanmanın etkinliğinin öngörülebilirliğini zorlaştıran nükleotitlere bağımlılığını ortaya koymaktadır. Farklı kanal açıcılarının kan basınçlarını düşürme kabiliyetleri, bunların akut ve refrakter hipertansif durumlarda kullanımına yol açacak kadar iyi bir şekilde tespit edilmiştir. Yukarıda da bahsedildiği gibi, sülfonilürelerin K_{ATP} kanallarını inhibe etmesiyle tip 2 diyabet tedavisinde glukoz azaltıcı maddeler olarak kullanılmasıdır Bu durumda geniş bir terapötik aralık mevcuttur ve en yaygın olarak tespit edilen yan etki hipoglisemidir. Ancak kardiyovasküler alanda K_{ATP} kanalını inhibe edici ilaçların potansiyel yan etkilerinin klinik olarak kabul edilmediği ile ilgili uzun süredir süren tartışmalar mevcuttur [126, 127].

2.3. Raynaud Fenomeni Olgularında Çalışılacak Olan K_{ATP} Proteini Kodlayan Genler ve Varyasyonları

2.3.1. KCNJ8 Geni (Potasyum Kanalı, Reaktif Edici, J Altfamilya, 8. Üye)

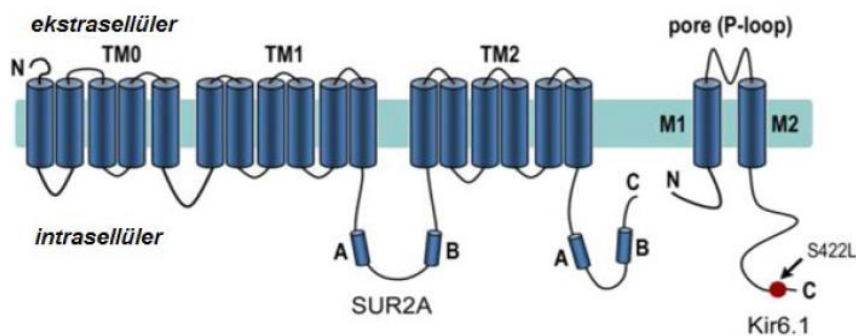
Inagaki ve ark. 1995 yılında içe dönük rektifiye edici potasyum kanalı ailesinin bir üyesi olan KCNJ8 geninin sitogenetik lokasyonunu *in situ* hibridizasyon yöntemi ile 12p12.1 olarak belirlemişlerdir. Üç eksona sahip ve yaklaşık 10kb uzunluğunda bir gene sahip olan bu genin nükleotid veritabanlarında (NCBI, GenomeReference Consortium Human Build 38, GRCh38) genomik koordinatları ise 21.764.954-21.775.592 olarak belirlenmiştir. Inagaki ve ark. Kir 6.1 proteini geninin cDNA'sını fare pankreatik adacık hücrelerinden izole ettiler. uKATP-1 olarak adlandırılan; 424 amino asit içeren, 2 transmembran domaine sahip ve ROMK1, IRK1, GIRK1 ve cKATP-1 de dahil olmak üzere diğer içe dönük potasyum kanallarıyla %43 ile %46 özdeşliğe sahip olduğunu belirlediler. Northern blot tekniğinin kullanıldığı çalışmalarda bu genin mRNA'sının sıçanlarda çeşitli dokularda geniş oranda ifade edildiğini gösterildi. Inagaki ve

ark.,KCNJ8 olarak adlandırdıkları insan genini klonlamışlardır. Tahmin edilen insan proteini sıçaninkine %98 özdeştir.

Hayvan Modeli: Miki ve ark., Kir6.1 geninden yoksun olan farelerin, elektrokardiyogramda görüldüğü gibi spontan ST elevasyonu ve bunun ardından atriyoventriküler blok ile ilişkili ani ölüm oranının yüksek olduğunugöstermişlerdir. Potasyum kanalı açıcı pinasidil, Kir6.1-boş farelerin vasküler düz kas hücrelerinde potasyum kanalları indüklenmediği ve pinasidil için vazodilatasyon cevabı oluşmadığı görüldü. Bir vazokonstriktif ajan olan metilergometrin verilmesi, Kir6.1-boş farelerde kardiyak ölüm ile takiben ST yükselmesine neden olduğu belirlendi. Ancak vahşi tip farelerde bu durum ortaya çıkmadı, bu da koroner arterlerin hiperkontraktitesi ile karakterize edilen ve insanlarda Prinzmetal (veya varyant) anjina benzeyen bir fenotipe işaret etmektedir. Prinzmetal angina sadece dinlenme sırasında ortaya çıkar ve atak esnasında EKG'de ST segmentlerinin yükselmesi ile ilişkilidir. Çoğu durumda atak kendiliğinden kaybolmasa da koroner vazospazmın uzaması miyokard enfarktüsü, şiddetli AV bloğu, hayatı tehdit eden ventriküler taşikardi ve ani ölüme yol açabilir. Atak sırasında EKG'de yükselen ST segmentleri diagnostiktir, çünkü ergot alkaloidler veya asetilkolin ile koroner spazmın induksiyonu vardır. Vazospastik angina, Japonya'da Kafkasyalılara göre daha fazla görülür. Miki ve ark., Kir6.1 içeren potasyum kanalının damar tonusunun düzenlenmesinde, özellikle koroner arterlerde kritik olduğuna karar vermiş ve bozulması durumunda Prinzmetal angina'ya neden olabileceğini düşünmüşlerdir. Ayrıca, Kir6.1 genindeki genetik farklılıkların çeşitli popülasyonlarda Prinzmetal angina ile ilişkili olup olmadığını öğrenmenin önemli olacağını önermişlerdir [128, 129].

2.3.1.1. p.Ser422Leu Varyasyonu

424 amino asitten oluşan proteinin 422. Pozisyonunda Serin (S) ile Lösin'in (L) yerdeğiştirmesi (S422L, p.Ser422Leu, SNP ID:rs72554071) polimorfik varyasyona neden olmaktadır. Polar ve küçük boyutlu olan S'nin, hidrofobik ve orta boylu L'ye dönüşümüdür. J-dalga sendromlarına yatkınlıkla birlikte; mutant kanal, yabancıla göre, glibenklamide duyarlı potasyum akımlarında bir artış sergilemektedir.



Şekil2.3.1.1.1. S422L varyasyonun K_{ATP} kanalı üzerindeki yeri [130]

2.3.2. ABCC9 Geni (ATP Bağlama Kasedi, C Altfamilya, 9. Üye)

Sülfolüre reseptör-2 (SUR2)

Sitogenetik lokasyon: 12p12.1

Genomik Kordinasyon: (GRCh38): 12:21,797,388-21,941,868

Klonlama ve Ekspresyon: ATP'ye duyarlı potasyum kanalları, sitoplazmik hücre yüzeyindeki ATP derişimi artmasıyla kanal açılmasının önlenmesi ile karakterizedir. Inagaki ve ark., insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM) tedavisinde oral hipoglisemik ajanlar olarak yaygın olarak kullanılan maddelerin sülfolürelerin K_{ATP} kanallarının aktivitesini inhibe ettiğini kaydetmişlerdir. Yüksek afiniteli sülfolüre reseptörü olan SUR'a karşılık gelen bir cDNA Aguilar-Bryan ve ark. tarafından klonlanmıştır. Inagaki ve ark., pankreatik beta hücreli K_{ATP} kanalının en az 2 alt birim olan BIR ve SUR'dan oluştuğunu göstermişlerdir. Sülfolüre reseptörü-2 (SUR2) olarak adlandırılan bir SUR izoformu Inagaki ve ark. tarafından sıçan beyin cDNA'sından klonlanmıştır. 5,300 kb cDNA dizisi, SUR ile %68 özdeşliği paylaşan 1,545 amino asitten oluşan bir polipeptidi kodlamaktadır. Northern blot analizi, SUR2'nin doku dağılımının SUR'un doku dağılımından farklı olduğunu göstermiştir.

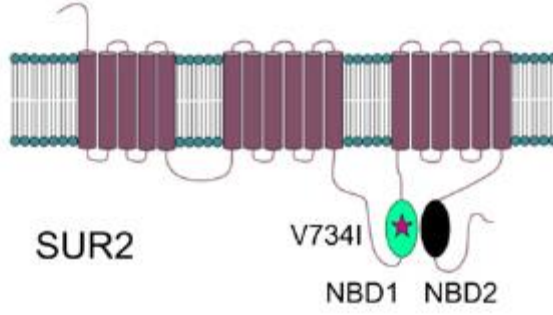
Sıçan SUR2'yi prob olarak kullanan Chutkow ve ark., bir iskelet kası cDNA dan SUR2'yi klonlamıştır. Northern blot analizi, yaklaşık 9.4, 7.6 ve 5.6 kb'lik 3 SUR2 transkriptini tespit etmişlerdir. Kalp ve iskelet kasında en uzun transkriptin en yüksek seviyesiyle bulmuşlardır. İncelenen diğer dokularda az veya yok denilecek miktarda SUR2 ifadesi tespit edilmiştir. Chutkow ve ark., hesaplanan moleküler kütleleri sırasıyla 170 ve 174 kD olan, 1,512 ve 1,547 amino asitten türetilmiş proteinleri kodlayan 2 alternatif olarak birleştirilmiş fare SUR2 cDNA'larını klonlamışlardır. Fare SUR2, 13 transmembran alana ve hücre içi Walker A ve B ATP'ye bağlanma alanlarına sahiptir. İnsan SUR2 ekspresyonunun aksine, fare SUR2, 9.4 kb transkript olarak her yerde ifade edildi. İskelet kası ve kalpte ve aorta ve mesane alt seviyelerinde en yüksek seviyede 8.6 kb'lik bir transkript tespit edildi.

Gen Yapısı:ABCC9 geni 146306 bç ve 38 eksondan oluşmaktadır. (NCBI Referans Dizisi: NG_012819.1)

Gen Fonksiyonu: Inagaki ve ark., sıçan SUR2 ve BIR'in COS-1 hücrelerindeki ko-ekspresyonunun, kardiyak ve iskelet kasında tanımlanan K_{ATP} kanallarının özelliklerini yeniden oluşturduğunu bulmuşlardır. Ancak, SUR2/BIR kanalı hem ATP hem de sülfolüre glibenklamide için SUR/BIR kanalından daha az duyarlıydı. SUR2/BIR kanalı kardiyak K_{ATP} kanal açıcıları olan kromakalim ve pinasidil tarafından aktive edilirken, diazoksit tarafından aktive edilmediği belirlendi. Çalışmalar sonucu, SUR2'nin sülfolüre için afinitesinin, SUR'un 500 kat daha düşük olduğunu kaydetmişlerdir [133, 134].

2.3.2.1. p.V734I Varyasyonu

Protein sekansı üzerindeki amino asit değişikliği 734. noktadadır. Aminoasit değişimi, 734 konumundaki Valin (V) ile İzolösin (I) yerdeğiştirmesidir (V734I, p.Val734Ie SNP ID: rs61688134).



Şekil2.3.2.1.1. SUR2'nin topoloji modeli. (NBD1 ve NBD2 sırasıyla yeşil ve siyah olarak gösterilir. NBD1 içindeki V734I yıldız olarak temsil edilir.) [135].

3.MATERYAL ve YÖNTEM

2.2. Çalışma Grubu ve Örnek Alımı

Çalışmamız Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 22/10/2015 tarihli 2015/324 sayılı Kurul Kararı ile onaylanmıştır.

Çalışmamızın hasta grubunu Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp-Damar Cerrahisi Anabilim Dalı ve Mersin Devlet Hastanesi Kalp-Damar Cerrahisine başvurmuş, rutin tetkikler sonucunda Raynaud Fenomeni tanısı almış 50 hasta birey oluşturmaktadır. Kontrol grubunu ise, Mersin Devlet Hastanesi Kalp-Damar Cerrahisine başvurmuş ve tetkikler sonucunda Raynaud Fenomeni tanısını almamış bireyler oluşturmaktadır. Hasta grubu 21 erkek (%42) ve 29 (%58) kadın bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubunun erkek ve kadın oranları hasta grubu ile aynıdır. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalamaları sırasıyla 25,7 ve 25,9 olarak hesaplanmıştır.

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerden rutin analizler için EDTA'lı tüplere alınan kanlardan 2mL'si genetik analizlerin yapılacağı Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarına soğuk zincir kurallarına uyularak taşındı. Kanlar bekletilmeden lökositlerinden DNA izolasyonları "High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Almanya, Catalog#11796828001)" kullanılarak gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'ların derişimleri İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (MEİTAM) bulunan nanodrop marka spektrofotometre kullanılarak belirlendi. DNA'lar daha sonra kullanılacağı güne kadar +4°C'de saklandı. Tüm bu çalışmalar Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

2.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

2.3.2. Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı (Regal, Türkiye)
- Santrifüj (Eppendorf, Hamburg, Almanya)
- Vorteks (REAX, Almanya)
- Isıtıcı (VWR, Pensilvanya, ABD)
- Mikropipet seti (Gilson-Pipetman-P2-P10-P20-P100-P200-P1000, Middleton, ABD)
- Hassas Terazi (Mettler Toledo, Ohio, ABD)
- Thermal Cycler (SimpliAmp, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, ABD Catalog#A24811)
- Elektroforez Güç Kaynağı (BIO-RAD, Kaliforniya, ABD)
- Elektroforez Tankı (BIO-RAD, Kaliforniya, ABD)

- Mikrodalga Fırın (Arçelik, Türkiye)
- Jel Görüntüleme Sistemi (DNR Bio-Imaging System, Jerusalem, İsrail)
- pH Metre (Mettler Toledo, Ohio, ABD)
- Distile Su Cihazı (Millipore, Massachusetts, ABD)

2.3.3. Kullanılan Kimyasallar

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Almanya, Catalog#11796828001)
- 10X PCR Buffer((NH₄)₂SO₄) (Thermo Fisher Scientific, Van Allen Way, Carlsbad, Catalog#EP0402)
- 25 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, Van Allen Way, Carlsbad, Catalog#EP0402)
- 2 mM dNTPs (Thermo Fisher Scientific, Van Allen Way, Carlsbad, Catalog#R0191)
- 10 µM Primer (1, 2, 3, 4) (macrogen, Güney Kore)
- ddH₂O (Invitrogen, Kaliforniya, ABD, Catalog#10977-035, Lot#1838065)
- Taq DNA Polimeraz (Thermo Fisher Scientific, Van Allen Way, Carlsbad, Catalog#EP0402)
- Agaroz (Sigma Aldrich, Missouri, ABD, Catalog#A9539, Lot#SLBR6299V)
- 10X TBE (Tris Borik asit EDTA) Elektroforez Tampon Çözeltisi(Thermo Fisher Scientific, Van Allen Way, Carlsbad, Catalog#B52)
- Tris-Baz (Sigma Aldrich, Missouri, ABD, CAS#77-86-1)
- Borik Asit (CARLO ERBA, Barselona, İspanya, CAS#10043-35-3)
- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit(EDTA)(Sigma Aldrich, Missouri, ABD, CAS#60-00-4)
- Etidyum Bromür (Thermo Fisher Scientific, Van Allen Way, Carlsbad, Catalog#15585-011)
- 100 bp DNA Ladder (100 bp DNA Ladder, Includes Gel Loading Dye, Purple-Blue-Orange (6X), NEW ENGLAND Biolabs Inc,Massachusetts, ABD Catalog# N3231S, Lot#1091506)
- 6X Jel Yükleme Boyası (100 bp DNA Ladder, Includes Gel Loading Dye, Purple-Blue-Orange (6X), NEW ENGLAND Biolabs Inc,Massachusetts, ABD Catalog# N3231S, Lot#1091506)

3.3. Genotiplendirme

KCNJ8 ve ABCC9 genlerinde yerleşik rs72554071 (NG_041794.1:g.14089C>T) ve rs61688134(NG_012819.1:g.77219G>A) dbSNP veritabanı kayıt numaralarına sahip varyasyonlarının saptanması için Tetra-Primer ARMS (T-ARMS)yöntemi tercih edildi. Bu metodolojide, konvansiyonel ARMS metodolojisinden farklı olarak tek bir PCR reaksiyonunda yabancı, mutant ve kontrol ampikonları amplifiye edilebilmektedir. Konvansiyonel ARMS yönteminin önemli problemlerinden birisi olan bir örnek için 2 farklı reaksiyon gerektirmesi bu yöntemle giderilmiş olmaktadır. T-ARMS metodolojisinde alelleri belirleyebilmek için dört farklı primer kullanılmaktadır. Bu primerlerden “outer” olarak adlandırılan iki tanesi “Frwouter” ve “Revouter” kontrol ampikonunu, “Frwouter” ve “Revinner” primerleri yabancı ampikonu, “Revouter” ve “Frwinner” primerleri de mutant ampikonu amplifiye eder. Outer primerleri polimorfik nükleotidden farklı mesafelere (asimetrik) yerleştirerek mutant ve yabancı alelleri temsil eden ampikonlar farklı uzunluklarda olacağından agaroz jel elektroforezinde farklı ebatlarıyla ayırt edilebilirler [138].

3.3.1. Primerlerin Tasarımı

Çalışmada, her iki SNP'nin (rs72554071 ve rs61688134) alellerinin varlıklarının belirlenmesinde kullanılacak T-ARMS metodolojisinin primerleri, çevrimiçi primer tasarım aracı olan PRIMER1 kullanılarak tasarlandılar [139]. Tasarlanan primerlerin PCR başarıları, kimyasal ve kinetik özellikleri ve özgünlüklerisıraıyla Vector NTI 11.0 paket programı, çevrimiçi IDT ve NCBI-BLAST araçları kullanılarak kontrol edildi [140-142].

KCNJ8 geni nükleotid dizisi, 16867 bç uzunluğunda doğrusal DNA olan NG_041794.1 numarası ile kayıtlı NCBI Nükleotit veritabanından elde edildi.

GeneID:3764

HGNC:HGNC:6269

MIM:600935

NG_041794.1:g.14089C>T FWD/bottom

SNP ID: rs72554071

Tablo 3.3.1.1.-3.3.1.4.'de KCNJ8 geni için tasarlanan kontrol, yabancı ve mutant primerleri ve primerlerin Vector NTI paket programı kullanılarak elde edilen fizikokimyasal özelliklerinin birer listesi bulunmaktadır.

Tablo 3.3.1.1. Kontrol Amplikonu	
Sense Primer (KCNJ8 FWD Outer)	AAACTACTGGCATCACCACACAAG
Benzerlik (%)	100
Uzunluk	24
Tm (°C)	54,9
GC	45,8
dH (kcal/mol)	-171,3
dS (cal/mol)	-443,3
dG (kcal/mol)	-37,4
Antisense Primer (KCNJ8 REV Outer)	TTTTGTGCTCAAGGCTGTACTA
Benzerlik (%)	100
Uzunluk	24
Tm (°C)	55,0
GC	41,7
dH(kcal/mol)	-181,2
dS (cal/mol)	-471,4
dG (kcal/mol)	-38,9
Tm Farkı	0,1
GC Farkı	4,2

Tablo 3.3.1.2. Yabani Amplikonu	
Sense Primer (KCNJ8 FWD Outer)	AAACTACTGGCATCACCACACAAG
Benzerlik (%)	100
Uzunluk	24
Tm (°C)	54,9
GC	45,8
dH (kcal/mol)	-171,3
dS (cal/mol)	-443,3
dG (kcal/mol)	-37,4
Antisense Primer (KCNJ8 REV Inner)	GGTTATCTTGCTGTCATGATTACG
Benzerlik (%)	96
Uzunluk	25
Tm (°C)	55,8
GC	44,0
dH(kcal/mol)	-185,2
dS (cal/mol)	-481,6
dG (kcal/mol)	-39,8
Tm Farkı	1,0
GC Farkı	1,8

Tablo 3.3.1.3. Mutant Amplikonu	
Sense Primer (KCNJ8 FWD Inner)	TCCAGAAGGAAATCAAAACACCTT
Benzerlik (%)	91,7
Uzunluk	24
Tm (°C)	55,0
GC	37,5
dH (kcal/mol)	-181,5
dS (cal/mol)	-472,2
dG (kcal/mol)	-38,9
Antisense Primer (KCNJ8 REV Outer)	TTTTGTGCTCAAGGCTGTACTA
Benzerlik (%)	100
Uzunluk	24
Tm (°C)	55,0
GC	41,7
dH(kcal/mol)	-181,2
dS (cal/mol)	-471,4
dG (kcal/mol)	-38,9
Tm Farkı	0,0
GC Farkı	4,2

Tablo 3.3.1.4. KCNJ8, rs72554071Varyasyonu : T-ARMS PCR Primerleri

KCNJ8FWDOuter:5'-AACTACTGGCATCACACACAAG-3'	Kontrol ampliconu:692 bç
KCNJ8REVOuter :5'-TTTTGTGCTCAAGGCCTGTTACTA-3'	
KCNJ8FWDInner :5'-TCCAGAAGGAAATCAAAACACCTT-3'(T Alel)	T alel ampliconu:352bç
KCNJ8REVInner:5'-GGTTATCTTGCTGTCATGATTACG-3' (C Alel)	C alel ampliconu:388bç

ABCC9geninükleotid dizisi, 146306 bç uzunluğunda doğrusal DNA olan NG_012819 numarası ile kayıtlı NCBI Nükleotit veritabanındanelde edildi.

GeneID:10060

HGNC:HGNC:60

MIM:601439

NG_012819.1:g.77219G>A FWD/Bottom

SNP ID:rs61688134

Tablo 3.3.1.5.-3.3.1.8.'de ABCC9 geni için tasarlanan kontrol, yabancı ve mutant primerleri ve primerlerin Vector NTI paket programı kullanılarak elde edilen fizikokimyasal özelliklerinin birer listesi bulunmaktadır.

Tablo 3.3.1.5. Kontrol Ampliconu

Sense Primer (ABCC9 FWD Outer)	AGCAATTATTTCTAGCTGATGAA
Benzerlik (%)	100
Uzunluk	24
Tm (°C)	51,5
GC	33,3
dH (kcal/mol)	-181,9
dS (cal/mol)	-478,7
dG (kcal/mol)	-37,4
Antisense Primer (ABCC9 REV Outer)	GTTGGAAATATGCTAGCACACTTT
Benzerlik (%)	100
Uzunluk	24
Tm (°C)	51,6
GC	37,5
dH(kcal/mol)	-179,6
dS (cal/mol)	-471,8
dG (kcal/mol)	-37,2
Tm Farkı	0,2
GC Farkı	4,2

Tablo 3.3.1.6. Yabanıl Amplikonu

Sense Primer (ABCC9 FWD Outer)	AGCAATTATTTTCCTAGCTGATGAA
Benzerlik (%)	100
Uzunluk	24
Tm (°C)	51,5
GC	33,3
dH (kcal/mol)	-181,9
dS (cal/mol)	-478,7
dG (kcal/mol)	-37,4
Antisense Primer (ABCC9 REV Inner)	AAAGAAGGCTCAGATTCATTGAC
Benzerlik (%)	95,7
Uzunluk	23
Tm (°C)	51,2
GC	39,1
dH(kcal/mol)	-167,9
dS (cal/mol)	-438,6
dG (kcal/mol)	-35,4
Tm Farkı	0,2
GC Farkı	5,8

Tablo 3.3.1.7. Mutant Amplikonu

Sense Primer (ABCC9 FWD Inner)	GAACATTGTTTGCTATACTTGCATTA
Benzerlik (%)	92,3
Uzunluk	26
Tm (°C)	52,0
GC	30,8
dH (kcal/mol)	-190,3
dS (cal/mol)	-502,1
dG (kcal/mol)	-38,8
Antisense Primer (ABCC9 REV Outer)	GTTGGAAATATGCTAGCACACTTT
Benzerlik (%)	100
Uzunluk	24
Tm (°C)	51,6
GC	37,5
dH(kcal/mol)	-179,6
dS (cal/mol)	-471,8
dG (kcal/mol)	-37,2
Tm Farkı	0,4
GC Farkı	6,7

Tablo 3.3.1.8. ABCC9, rs61688134 Varyasyonu: T-ARMS PCR Primerleri

ABCC9FWDOuter:5'-AGCAATTATTTTCCTAGCTGATGAA-3'	Kontrol amplikonu:369 bç
ABCC9REVOuter :5'-GTTGGAAATATGCTAGCACACTTT-3'	
ABCC9FWDInner :5'-GAACATTGTTTGCTATACTTGCATTA-3' (A Alel)	A alel amplikonu:193 bç
ABCC9REVInner :5'-AAAGAAGGCTCAGATTCATTGAC-3' (G Alel)	G alel amplikonu:224 bç

3.4. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Çözeltisi

- Tris (MA:121,14 g/mol) 108 g
- Borik Asit (MA:61,8 g/mol) 55 g
- EDTA (MA:292,24 g/mol) 5,85 g

Tartılarak son hacim 1 L olacak şekilde saf suda çözüldü ve pH 8,3'e ayarlandı.

Elektroforez Tampon Çözeltisi (1XTBE)

10X TBE stok çözeltisi distile suyla seyreltilerek 1XTBE tampon çözeltisi hazırlandı. Elektroforez tankı hazırlanan 1XTBE tampon çözeltisi kullanılarak dolduruldu.

%2 (w/v) Agaroz Jel Çözeltisi

- 1XTBE Buffer 100mL
- Agaroz 2g
- Etidyum Bromür 0,8µg/mL

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. DNA İzolasyonu

Çalışmada genomik DNA'nın izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Almanya, Catalog#11-976-828-001) kullanıldı. Uygulanan prosedür aşağıdaki gibidir:

- EDTA'lı tüpe alınan kandan 200 µL alınarak 1,5 mL'lik ependorf tüpüne konuldu.
- Üzerine 40 µL proteinaz K ve 200 µL binding buffer (6 M guanidin-HCl, 10mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton-X-100 (v/v), pH 4.4 (+25°C)) eklendi ve karıştırıldı. 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 100 µL izopropanol eklendi ve karıştırıldı.
- Sonrasında, karışım ependorf tüplerinden filtre kolonlarına alındı ve 8,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtre kolonu üzerinde bulunan karışımın santrifüj sonrasında koleksiyon tüpüne geçmesiyle yeni bir koleksiyon tüpüne geçildi.
- 500 µL inhibitor removal buffer (5 M guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (+25°C), 20 mL etanol) eklendi ve 8,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Koleksiyon tüpü tekrardan değiştirildi ve 500 µL wash buffer (20 mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7.5 (+25°C), 80 mL etanol) eklendi. 8,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Koleksiyon tüpü değiştirildi ve yeniden 500 µL wash buffer eklendi. 8,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Koleksiyon tüpü değiştirildi ve 13,000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi.
- 1,5 µL'lik ependorf tüpüne filtreler takıldı ve üzerine 200 µL elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (+25°C)) eklendi ve karıştırıldı. 8,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

- DNA izole edildi ve çalışılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

KCNJ8 ve ABCC9 genlerinin rs72554071 ve rs61688134 varyasyonlarını saptayabilmek için T-ARMS PCR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde kullanılacak primerler yukarıda anlatıldığı gibi biyoinformatik araçlar kullanılarak tasarlandı. Tasarlanan primerler:

- KCNJ8, rs72554071 Varyasyonu: T-ARMS PCR Primerleri

KCNJ8FWDOuter	:5'-AACTACTGGCATCACCACACAAG-3'	
KCNJ8REVOuter	:5'-TTTTGTGCTCAAGGCCTGTTACTA-3'	
KCNJ8FWDInner	:5'-TCCAGAAGGAAATCAAAACACCTT-3'	T Alel
KCNJ8REVInner	:5'-GGGTTATCTTGCTGTCATGATTACG-3'	C Alel

- ABCC9, rs61688134 Varyasyonu: T-ARMS PCR Primerleri

ABCC9FWDOuter	:5'-AGCAATTATTCCTAGCTGATGAA-3'	
ABCC9REVOuter	:5'-GTTGGAAATATGCTAGCACACTTT-3'	
ABCC9FWDInner	:5'-GAACATTGTTTGCTATACTTGCATTA-3'	A Alel
ABCC9REVInner	:5'-AAAGAAGGCTCAGATTCATTGAC-3'	G Alel

T-ARMS metodolojisinde kullanılan PCRbileşenlerinin miktarları Tablo 3.5.2.1'de gösterilmiştir:

Tablo 3.5.2.1. T-ARMS PCR Yönteminde Kullanılacak Bileşen Miktarları

Reaktif	Stok Derişimi	Final Derişimi	Hacim (µL)
Taq Polimeraz	5,0 U/µL	1,25 U	0,25
DNA Örnekleri	100,0 ng/µL	200,0 ng	2,0
Mastermiks İçindekileri			
Reaktif	Stok Derişimi	Final Derişimi	Hacim (µL)
PCR Buffer	10,0X	1,0X	2,5
Mg ²⁺ Çözeltisi	25,0 mM	1,5 mM	1,5
dNTP	2,0 mM	0,2 mM	2,5
Primer 1	10,0 µM	0,3µM	0,8
Primer 2	10,0 µM	0,3µM	0,8
Primer 3	10,0 µM	0,3µM	0,8
Primer 4	10,0 µM	0,3µM	0,8
Toplam			9,7
ddH ₂ O			13,05
Mastermiks Toplam			22,75
Genel Toplam			25,0

Çalışılacak örnek sayısı kullanılan miktarlarla çarpılarak mastermiksler hazırlandı. Her bir reaksiyon 25 µL'lik hacimlerde gerçekleştirildi. 200µL'lik PCR tüplerine 2 µL DNA önekleri yüklendi. Üzerlerine, önceden hazırlanan mastermikse birlikte Taq DNA Polimeraz karışımı

(23 µL) eklenerek karıştırıldı ve cihaza yerleştirildi. Tablo 3.5.2.2. ve 3.5.2.3.'de çalışılacak genlerdeki varyasyonlar için PCR koşulları bulunmaktadır:

Tablo 3.5.2.2. rs72554071 için PCR Koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	4 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	
Primer Bağlanması (Annealing)	61	45sn	30
Zincir Uzaması (Elongation)	72	45 sn	
Final Uzaması	72	8 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

Tablo 3.5.2.3. rs61688134 için PCR Koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	4 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	
Primer Bağlanması (Annealing)	50	45sn	30
Zincir Uzaması (Elongation)	72	45 sn	
Final Uzaması	72	8 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

3.5.3. Agaroz Jel Elektrofrez

KCNJ8 ve ABCC9 genlerindeki rs72554071 ve rs61688134 varyasyonlarının belirlenmesi amacıyla çoğaltılan T-ARMS ampliconları agaroz jel elektrofrez kullanılarak kontrol edildi. Hazırlanan jelde yürütülen ampliconların bç uzunlukları DNA ladder (100 bp DNA Ladder, Includes Gel Loading Dye, Purple-Blue-Orange (6X), NEW ENGLAND Biolabs Inc, Massachusetts, ABD Catalog# N3231S, Lot#1091506) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar yorumlandı.

3.5.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Yüklenmesi

%2'lik (w/v) agaroz jel hazırlamak amacıyla 2 g agaroz(Sigma Aldrich, Missouri, ABD, Catalog#A9539, Lot#SLBR6299V) tartıldı ve 100 mL 1X TBE tamponu ile 250 mL'lik bir erlende karıştırıldı. 5-10 dakika bekledikten sonra mikrodalga fırında homojen ve şeffaf olacak şekilde 2 dakika ısıtılarak kaynatıldı. Mikrodalga fırından alınan jel çeşme suyaltında yaklaşık 50-60°C'ye kadar soğutuldu. Soğuyan jel üzerine 0,8 µg/mL etidyum bromür (Ethidium Bromide Solution, Thermo Fisher Scientific, Van Allen Way, Carlsbad, Catalog#15585-011) eklendi ve hava kabarcığı oluşmayacak şekilde hafifçe karıştırıldı. Hazırlanan jel tarakların yerleştirildiği elektrofrez kaseti içerisine yavaşça döküldü. Dökme işlemi sırasında jel içerisinde hava kabarcıkları oluşmamasına dikkat edildi. Jelin polimerleşmesi için yaklaşık yarım saat beklendi.

Jelin polimerleşmesi sonrası, jel kaseti ile birlikte tank içerisine tamponun (1X TBE) tamamen içinde kalacak şekilde yerleştirildi ve taraklar dikkatlice çıkarıldı.

Yürütülecek olan PCR ürünlerinin üzerlerine 10 µL jel yükleme boyası (100 bp DNA Ladder, Includes Gel Loading Dye, Purple-Blue-Orange (6X), NEW ENGLAND Biolabs Inc, Massachusetts, ABD Catalog# N3231S, Lot#1091506) eklendi ve mikropipet kullanılarak karıştırıldı. Markerdan ise 1 µL alınarak üzerine 15 µL jel yükleme boyası eklendi ve karıştırıldı. Marker ve tüm örnekler jel üzerinde bulunan kuyucuklara yüklendi. PCR ürünleri, 10 volt/cm elektriksel potansiyel farkı uygulanarak 45-50 dk yürütüldü. Elektroforez sonrası, jel UV transuliminatör (DNR Bio-Imaging System, Jerusalem, İsrail) kullanılarak görüntülendi ve sonuçlar yorumlandı.



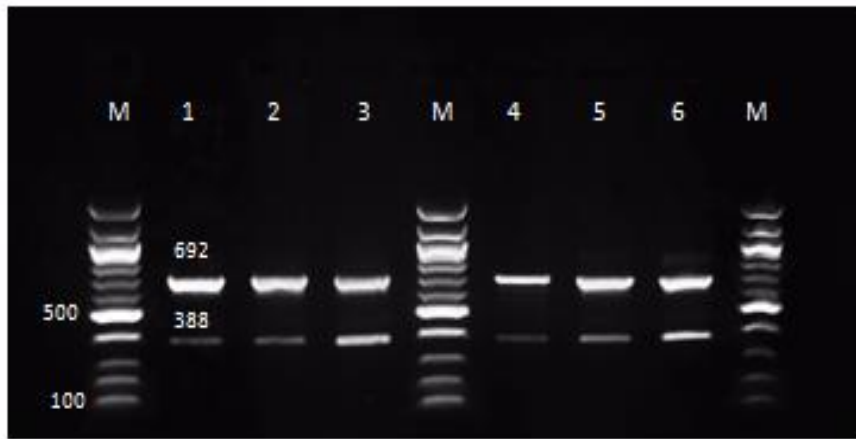
4. BULGULAR

Çalışmamıza, kontrol grubunu oluşturan 50 sağlıklı birey, hasta grubunu oluşturan Raynaud Fenomeni tanısını almış 50 birey dahil edilmiştir. Tablo 4.1.'de yaş ortalamaları ve kadın-erkek yüzdelerini gösteren demografik veriler bulunmaktadır:

	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
Yaş	25,7	25,9
Kadın (%)	58	58
Erkek (%)	42	42

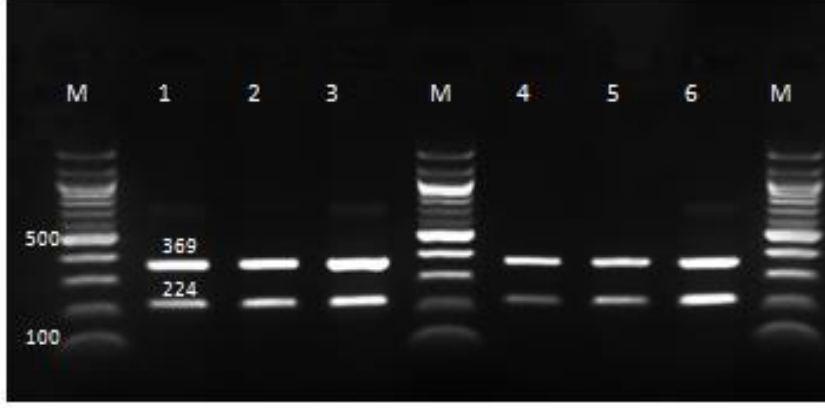
50 kontrol ile 50 hasta bireyde KCNJ8 ve ABCC9 geninde rs72554071 ve rs61688134 varyasyonları araştırıldı. Aşağıdaki şekillerde elektroforez sonrası jel UV transuliminator (DNR Bio-Imaging System, Jerusalem, İsrail) kullanılarak görüntülendi ve sonuçlar yorumlandı.

Kullanılan T-ARMS metodolojisine göre kontrol ve hasta grubunu oluşturan bireylerde yabancı olan C aleli homozigot olarak (CC) taşıdığı belirlendi. KCNJ8 geninde rs72554071 varyasyonunun analiz edildiği agaroz jel görüntüsünde 692 bp uzunluğundaki bant PCR başarısını garanti eden kontrol ampikonunu, 388 bp uzunluğundaki bant ise yabancı ampikonunu temsil etmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. rs72554071 varyasyonunun alellerinin belirlenmesi için çoğaltılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü (M: Marker; 1, 2, 3, 4, 5, 6: Olgular)

Kullanılan T-ARMS metodolojisine göre kontrol ve hasta grubunu oluşturan bireylerde yabancı olan G aleli homozigot olarak (GG) taşıdığı belirlendi. ABCC9 geninde rs61688134 varyasyonunun analiz edildiği agaroz jel görüntüsünde 369 bp uzunluğundaki bant PCR başarısını garanti eden kontrol amplikonunu, 224 bp uzunluğundaki bant ise yabancı amplikonunu temsil etmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. rs61688134 varyasyonunun alellerinin belirlenmesi için çoğaltılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü (M: Marker; 1, 2, 3, 4, 5, 6: Olgular)

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

K_{ATP} kanalları ilk olarak 30 yıl önce kalpte, kardiyak miyositlerinde bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda vasküler düz kas hücreleri dahil birçok hücre tipinde bu kanalların varlığına rastlanmıştır [62].

Her 4 K_{ATP} kanal geni için susturulmuş fare modelleri geliştirilmiştir. Kir6.2 susturulmuş fare modellerinde insüline bağlı glukoz salgılanmasının yok olduğu gözlemlenmiştir ve bu modelleme insanlardaki hiperinsülinemiyi ifade etmektedir [110]. SUR1 susturulmuş fare modeli temel olarak neredeyse Kir6.2/- ile aynı özellikleri göstermektedir. Kir6.1/SUR2 susturulmuş fare modelleri ise vasküler işlevler konusunda dikkat çekmektedir. Bu genlerin susturulduğu fare modelleri bu alt birimlerin özellikle koroner sirkülasyonda olmak üzere kardiyovasküler sistemde oynadığı kritik rollere dikkat çekmektedir [7, 8].Oluşturulan fare modellerinin incelenip, vasküler işlevler konusunda Kir6.1/SUR2 proteinlerinin öne çıkması, bu çalışmada bu proteinlerden kodlanan KCNJ8/ABCC9 genlerindeki S422L/V734I varyasyonlarının çalışılmasına karar verilmesini sağlamıştır.

Ermis ve ark. tarafından yapılan çalışmada, Erken Repolarizasyon Sendromu (ERS) tanısı almış kişilerde KCNJ8 geni S422L varyasyonunun varlığı araştırılmıştır. Erken repolarizasyon ve kontrol grubu olarak 2 grup çalışılmıştır. Erken repolarizasyon tanısı almış olan grupta;78 erkek, 22 kadın bulunmakla birlikte çalışılan yaş aralığı 33,1±9,7'dir. Kontrol grubunda ise;70 erkek, 30 kadın bulunmaktadır. Yaş aralığı ise, 35,8±9,9'dur. Her iki grupta da bakılan varyasyonun hasta grubunda hiç olmaması kontrol grubunda bulunan bir örnekte bulunması istatistiksel olarak ERS ile KCNJ8 geni S422L varyasyonu ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [143].

Fedele ve ark., İskemik kalp hastalığı ve koroner mikrovasküler disfonksiyonun patolojisinde iyon kanallarındaki genetik polimorfizmlerin rolünü incelemişlerdir. Çalışmada; koroner arter hastalığı bulunan 155 kişi 1. grubu, endotelyuma bağlı ve/veya bağlı olmayan mikrovasküler disfonksiyon bulunan 46 kişi 2. grubu ve normal koroner arterlere sahip 41 kişi 3. grubu oluşturmaktadır. K_{ATP} kanal protein genlerinden KCNJ8/KCNJ11 gen varyasyonları çalışılmıştır. KCNJ8 genindeki S422L varyasyonu ile çalışılan 3 grup arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [144].

Veeramah ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise, KCNJ8 genindeki S422L varyasyonu Eskenazi Yahudilerinde yüksek frekansta görülen J Dalga Sendromu ile ilişkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmada; Avrupa, Ortadoğu, Eskenazi Yahudi ve Eskenazi Yahudi olmayan popülasyondan 722 kişide S422L varyantını genotiplendirmişlerdir. Sonucunda ise, S422L varyasyonu Eskenazi Yahudileri hariç çalışılan tüm popülasyonda hemen hemen hiç

olmadığı, Eskenazi Yahudisi olan 291 bireyden 23'ünün(%7,9) heterozigot olduğu ve genel alel sıklığının %4 olduğu belirlenmiştir. Bu sonucun tek istisnası Eskenazi olmayan Yahudiler'in bulunduğu 48 Romalı arasından 3 tanesinde S422L alelinin heterozigot varlığıdır. Bununla birlikte, Eskenazi Yahudilerindeki alel frekansı diğer Yahudi olmayan popülasyondan ve daha önce kontrol edilenlerden anlamlı derecede yüksek çıkmıştır, değişiklik heterozigot olarak kaydedilmiştir [145].

Minorette ve ark., ABCC9 geninde kodlanan V734I varyasyonun Miyokardiyal enfarktüs (MI) ile ilişkili olup olmadığını incelemişlerdir. Çalışmaya 60 yaş öncesi 584 hasta ve 873 kontrol grubu dahil edilmiştir. Genetik çalışmalar sonucunda, ABCC9 geninde 734I alelinin popülasyondaki erken dereceli MI' a duyarlılığı etkileyebileceğine dair ilk önemli kanıtı sağlamışlardır [146].

Smith ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise, 60 yaşından önce 6.4 kat daha yüksek Akut Miyokardiyal Enfarktüs (AMI) riski oluşturduğu tahmin edilen, ABCC9 geninin 17. ekzonunda bulunan V734I varyasyonunun patofizyolojik mekanizmasını incelemişlerdir. ABCC9'daki 734I aleli, vasküler yanıtın bozulması ile AMI'ya duyarlılığı etkileyebileceğini ve AMI ile ilgili bir iyon kanalı geninde bulunan bu alelin ilk insan mutasyonu olduğunu belirlemişlerdir [147].

Yukarıda anlatılan çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da S422L varyasyonu ile Raynaud Fenomeni arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Veeraman ve ark. yaptığı çalışmada Türkiye'nin içinde bulunduğu Ortadoğu ve Eskenazi Yahudisi olmayan toplumlarda S422L varyasyonu ile J Dalga Sendromu arasında yine anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Çalışılan diğer varyant olan V734I, Raynaud Fenomeni ile ilişkili bulunamamıştır. V734I varyasyonunun gelecekte yapılacak olan çalışmalarla hayati tehdit eden kardiyak hastalıkları ile ilişkili K_{ATP}kanallarındaki genetik defektlerin önemli kanıtları arasında olacağı belirlenmiştir.

Raynaud Fenomeni, soğuk ve strese bağlı olarak oluşan epizodik vazospazm ve buna bağlı olarak gelişen el veya ayak parmaklarında siyanoz ve solukluk ile karakterize bir hastalıktır [1]. Güçlü vazospastik etkisi damar hastalığı olarak tanımlanmasını sağlar. Kardiyovasküler sistem ve kalp tutulumu, migren, H sendromu, herediter vasküler retinopati ve skleroderma gibi birçok hastalık çoğunlukla bu fenomenle birlikte çalışılmış veya Raynaud Fenomeninde farklı genler üzerine polimorfizm çalışmaları yapılmıştır.

Shemirani ve ark., yapmış olduğu çalışmada primer formda bulunan Raynaud Fenomeni olan hastalarda, anormal mikrovasküler tromboza yatkın hale getirebilecek pıhtılaşma faktörleri için genetik olarak riskli olup olmadığını çalışmışlardır. Macar kökenli 200 kontrol ve 200 hasta bireyle çalışmışlardır. Hasta grubunun 158'si kadın 42'si erkektir. Yaş ortalamaları ise, 42,47±13,7'dir. Faktör V G1691A (FVLeiden), protrombin G20210A, metilentetrahidrofolat

redüktaz (MTHFR) C677T varyasyonları araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, FVLeiden, protrombin G20210A varyasyonlarının primer formdaki Raynaud Fenomeni etiyolojisi üzerinde belirli bir etkisi olmadığı ortaya çıkmıştır. Hastalarda homozigot olan MTHFR genindeki C677T varyasyon frekansının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük çıkmıştır [147].

Takats ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise, primer formda bulunan Raynaud Fenomeni ve migren hastalarında kalıtsal protrombotik risk faktörlerinin prevalansını ve olası ilişkisi incelenmiştir. Migren ve Primer Raynaud Fenomeni olan 142 hasta (101 kadın, 41 erkek) ve sadece Primer Raynaud Fenomeni olan 58 hasta (57 kadın, 1 erkek) çalışmaya dahil edilmiştir. FVLeiden, protrombin G20210A, MTHFR C677T VE FXIII-A V34L varyasyonlarını saptayabilmek için Real-time PCR kullanmışlardır. Çalışmanın sonucu olarak, Primer Raynaud Fenomeni ve migren olan hastalarda MTHFR genindeki C677T'nin anlamlı derecede yüksek alel frekansı gösterebileceği belirlenmiştir. Primer Raynaud Fenomeni'de migren oluşumu üzerinde FVLeiden, G20210A, V34L varyasyonlarının belirgin bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir [148].

Gaudy-Marqueste ve ark., Raynaud sendromlu 76 yaşındaki bir Kafkas kadında Lamin B Reseptör (LBR) geninin 9. ekzonunda heterozigot bir varyasyon tespit ettiler. Hastanın lenfoblastoid hücrelerindeki çalışmalar anormallik göstermediği, ancak hasta fibroblastlarında, LBR'nin azaldığı ve lamin proteinlerin seviyesinin azaldığı ve ayrıca benekli kromatin ile dismorfik çekirdekler olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular sonucunda, Arg372Cys (R372C) varyasyonunun, muhtemelen mutant proteininin azalmış stabilizasyonundan ve artmış proteazom aracılı bozunumdan kaynaklanan, LBR etkileşen proteinlere dominant-negatif bir etki yaptığını göstermişlerdir [150].

Fujita ve ark., akraba evliliği ebeveynleri olan 48 yaşında H Sendromu olan erkek hastada SLC29A3 geninde yeni bir mutasyonun varlığını kanıtlamışlardır. Bu hastanın ayrıca masif cilt tutulumu, retroperitoneal fibroz ve Raynaud Fenomeni bulunduğu da rapor edilmiştir. Uzun bir takip süresinden sonra hastanın genomik DNA'sı elde edilmiştir ve 5. ekson da, c. 625G>A glisinin arjinine dönüştüğü homozigot mutasyon saptanmıştır. 50 sağlıklı birey de bu mutasyon saptanamamıştır [151].

Raynaud Fenomeni ile ilişkili olarak KCNJ8/ABCC9 genlerinde rastlanan mutasyonların araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dünya genelinde ve ülkemizde yapılan çalışmalarla Raynaud Fenomenine rastlanma sıklığı kadınlarda %6-20, erkeklerde ise %3-12,5 olarak saptanmıştır [17]. Bu oldukça yüksek bir sıklıktır. Raynaud Fenomeninin hem bu yüksek rastlanma sıklığı hem de birçok hastalıkla birlikte görülme özelliği onu klinik olarak önemli bir yere koymaktadır [16].

Çalışmamızda, Mersin İlinde Devlet Hastanesinde Raynaud Fenomeni tanısı almış olgularda ve kontrol grubunda daha önce araştırılmamış olan iki mutasyon araştırılmıştır. Yürütülen genetik analizler sonucunda çalışılan iki gendeki iki mutasyona hiçbir olguda rastlanmamıştır. Çalışılan örnek sayısı bu mutasyonlar ile Raynaud Fenomeni arasında bir ilişki yoktur diyebilmek için yetersizdir. Bu nedenle, daha yüksek olgu sayısının ve daha fazla mutasyonun kapsandığı çalışmaların K_{ATP} kanalları ile Raynaud Fenomeni arasında bir ilişki olup olmadığını gösterebilmesine ve Raynaud Fenomenini genetik etmenleri açısından aydınlatılmasına katkıda bulunacağına inanmaktayız.



KAYNAKLAR

- [1]. Bakst, R., Merola, J. F., Franks, A. G. Jr, and Sanchez, M. Raynaud's Phenomenon: Pathogenesis and Management. *J Am Acad Dermatol*, 2008;59(4):633-53.
- [2]. Canbaz, S., Ege, T., Halıcı, Ü., ve Duran, E. Raynaud Fenomeni. *T. Klin. J. Kardiovaskuler Surgery*, 2004; 5:49-58.
- [3]. Carpentier, P. H., Satger, B., Poensin, D., and Maricq, H. R. Incidence and Natural History of Raynaud's Phenomenon: A Longterm follow-up (14 years) of a Random Sample from the General Population. *J Vasc Surg*, 2006;44(5):1023-8.
- [4]. Cansu, Ü.D., ve Korkmaz, C. Raynaud Fenomenli Hastalara Yaklaşım. *Türkiye Klinikleri J. Immunol Rheumatol-Special Topics*, 2009;2(3):15-17.
- [5]. Kadan, M., Karabacak, K., ve Kaya, E. Vazospastik Damar Hastalıkları. *Damar Cer. Der.*, 2013; 22(2):225-237.
- [6]. Herrick, L. A. Pathogenesis of Raynaud's Phenomenon. *Rheumatology*, 2005;44:587-596.
- [7]. Miki, T., Suzuki, M., Shibasaki, T., Uemura, H., Sato, T., Yamaguchi, K., Koseki, H., Iwanaga, T., Nakaya, H., and Seino, S. Mouse Model of Prinzmetal Angina by Disruption of the Inward Rectifier Kir6.1. *Nat Med*, 2002; 8:466-472.
- [8]. Chutkow, W.A., Pu, J., Wheeler, M.T., Wada, T., Makielski, J.C., Burant, C.F., and McNally, EM. Episodic Coronary Artery Vasospasm and Hypertension Develop in the Absence of SUR2 K(ATP) Channels. *Journal of Clinical Investigation*, 2002; 110:203-208.
- [9]. Moneta, G. L., and Landry, G. J. Vasospastic Disease of the Upper Extremity: Primary Raynaud's Syndrome. In: *Ascher E, ed. Haimovici's Vascular Surgery. 6th ed. Oxford:Wiley-Blackwell*; 2012. p. 949-61.
- [10]. Lewis, T. Experiments Relating to the Peripheral Mechanism Involved in Spasmodic Arrest of the Circulation in the Fingers, a Variety of Raynaud's Disease. *Heart*, 1929;15:7-101.
- [11]. Allen, E. V., and Brown, G. E. Raynaud's Disease: A Critical Review of Minimal Requisites for Diagnosis. *Am J Med Sci*, 1932;183:187-200.
- [12]. LeRoy, E. C., and Medsger, T. A. Jr. Raynaud's Phenomenon: A Proposal for Classification. *Clin Exp Rheumatol*, 1992;10:485-8.
- [13]. O'connor, C. M. Raynaud's Phenomenon. *J Vasc Nurs*, 2001;19 (3): 87-92.
- [14]. Block, J. A., and Sequeira, W. Raynaud's Phenomenon. *Lancet*, 2001;357:2042-8.
- [15]. Wigley, F. M. Raynaud's Phenomenon. *N Engl J Med*, 2002;347:1001-8.
- [16]. Tse, S., Lubelsky, S., Gordon, M., and et al. The Arthritis of Inflammatory Childhood Myositis Syndromes. *J Rheumatol*, 2001;28:192-7.
- [17]. Fraenkel, L. Raynaud's Phenomenon: Epidemiology and Risk Factors. *Curr Rheumatol Rep.*, 2002;4:123-8.
- [18]. Suter, L. G., Murabito, J. M., Felson, D. T., and Fraenkel, L. The Incidence and Natural History of Raynaud's Phenomenon in the Community. *Arthritis Rheum*, 2005;52:1259-63.

- [19]. Maricq, H. R., Carpentier, P.H., and Weinrich, M. C. Geographic Variation in the Prevalence of Raynaud's Phenomenon: A 5 Region Comparison. *J Rheumatol*, 1997;24:879-89.
- [20]. LeRoy, E. C., and Medsger, T. A. Jr. Raynaud's Phenomenon: A Proposal for Classification. *Clin Exp Rheumatol*, 1992;10(5):485-8.
- [21]. Gayraud, M. Raynaud's Phenomenon. *Joint Bone Spine*, 2007;74:e1-e8.
- [22]. Planchon, B., Pistorius, M. A., Beurrier, P., and deFaucal, P. Primary's Raynaud's phenomenon. Age of Onset and Pathogenesis in a Prospective Study of 424 Patients. *Angiology*, 1994;45:677-86.
- [23]. Landry, G. J., Edwards, J. M., McLaafferty, R. B., Taylor, LM. Jr., and Porter, J. M. Long-term Outcome of Raynaud's Syndrome in a Prospectively Analyzed Patient Cohort. *J. Vasc. Surg.*, 1996;23:76-86.
- [24]. Ziegler, S., Zöch, C., Gschwandtner, M., Eckhardt, G., Windberger, U., and Minar, E. et al. Thermoregulation and Rheologic Properties of Blood in Primary Raynaud's Phenomenon and Vibration-Induced White-Finger Syndrome. *Int Arch Occup Environ Health*, 2005; 78(3):218-22.
- [25]. Bunker, C. B, Reavley, C., O'Haughnessy, D. J., and Dowd, P. M. Calcitonin Gene-Related Peptide in Treatment of Severe Peripheral Vascular Insufficiency in Raynaud's Phenomenon. *Lancet*, 1993;342:80-3.
- [26]. Chotani, M.A., Flavahan, S., Mitra, S., Daunt, D., and Flavahan, N. A. Silent Alpha (2C)-Adrenergic Receptors Enable Cold-Induced Vasoconstriction in Cutaneous Arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000;278:1075-83.
- [27]. Cherkas, L. F., Williams, F. M., Carter, L., Howell, K., Black, C. M, and Spector, T. D. Heritability of Raynaud's Phenomenon and Vascular Responsiveness to Cold: A Study of Adult Female twins. *Arthritis Rheum*, 2007;57(3):524-8.
- [28]. Eid, A. H., Maiti, K., Mitra, S., Chotani, M. A., Flavahan, S., Bailey, S. R., and et al. Estrogen Increases Smooth Muscle Cell Expression of Alpha2c-Adrenoreceptors and Cold Induced Constriction of Cutaneous Arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007;293(3):H1955-61.
- [29]. Cooke, J. P., Creager, S. J., Scales, K. M., Ren, C., Tsapatsaris, N. P, Beetham, W. P. Jr., and et al. Role of Digital Artery Adrenoreceptors in Raynaud' s Disease. *Vasc Med.*, 1997;2(1):1-7.
- [30]. Erdoğan, T. (2013). *Raynaud Fenomeni Olan Kişilerde Allerjik Hastaların Sıklığı*.Yayınlanmamış Yan Dal Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- [31]. Kadan, M., Doğançlı, S., Kaya, E., Erol, G., ve Demirkılıç, U. [Reflex Sympathetic Distrophy Syndrome Developed on Vasospastic Disorders: Case Report and Differential Diagnosis]. *Damar Cer Derg.*, 2012;21(2):153-7.
- [32]. Chikura, B., Moore, T. L., Manning, J. B., Vail, A., and Herrick, A.L. Sparing of the Thumb in Raynaud's Phenomenon. *Rheumatology (Oxford)*, 2008;47(2):219-21.
- [33]. Greenfield, L. J., Rajagopalan, S., and Olin, J. W. Upper Extremity Arterial Disease. *Cardiol Clin.*, 2002;20(4):623-31.
- [34]. Yetkin, U., ve Gürbüz, A. Raynaud Fenomenine Güncel Yaklaşım. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer. Derg.*,2002;10:56-59.
- [35]. Kurklinsky, A. K., Miller, V. M., and Rooke, T. W. Acrocyanosis: The Flying Dutchman. *Vasc Med*, 2011; 16(4):288-301.

- [36]. Haunson, G. T., Judy, D. W., Prall, N. C., and Miller, R. A. Livedoid Vasculopathy: Review of Pathogenesis, Clinical Presentation, Diagnostic Workup, and Treatment. *Cutis*, 2012;90(6):302-6.
- [37]. Belch, J. J, and Ho, M. Pharmacotherapy of Raynaud's Phenomenon. *Drugs*, 1996;52:682-95.
- [38]. Teh, L. S., Manning, J., Moore, T., Tully, M.P., O'Reilly, D., and Jayson, M. I. V. Sustained-Release Transdermal Glyceryl Trinitrate Patches as Treatment for Primary and Secondary Raynaud's Phenomenon. *Br J Rheumatol*, 1995;34:636-41.
- [39]. Pope, J., Fenlon, D., Thompson, A., Shea, B., Furst, D., Wells, G., and Silmon, A. Prazosin for Raynaud's Phenomenon in Progressive Systemic Sclerosis. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2000; (2):CD000956.
- [40]. Dziadzio, M., Denton, C. P., Smith, R., Howell, K., Blann, A., Bowers, E., and et al. Losartan Therapy for Raynaud's Phenomenon and Scleroderma: Clinical and Biochemical Findings in a Fifteen Week, Randomized, Parallel Group, Controlled Trial. *Arthritis Rheum*, 1999;42(12):2646-55.
- [41]. Stratton, R., Shiwen, X., Martini, G., Holmes, A., Leask, A., Haberberger, T., and et al. Iloprost Suppresses Connective Tissue Growth Factor Production in Fibroblasts and in the Skin of Scleroderma Patients. *J Clin Invest*, 2001; 108(2): 241-50.
- [42]. Scorza, R., Caronni, M., Mascagni, B., Berruti, V., Bazzi, S., Micallef, E., and et al. Effects of Long-term Cyclic Iloprost the Rapy in Systemic Sclerosis with Raynaud's Phenomenon: A Randomized, Controlled Study. *Clin Exp Rheumatol*, 2001; 19(5):503-8.
- [43]. Coleiro, B., Marshall, S. E., Denton, C.P., Howell, K., Blann, A., Welsh, K. I., and et al. Treatment of Raynaud's Phenomenon with the Selective Serotonin Reuptake İnhibitor Fluoxetine. *Rheumatology (Oxford)*, 2001;40(9):1038-43.
- [44]. Pope, J., Fenlon, D., Thompson, A., Shea, B., Furst, D., Wells, G., and et al. Ketanserin for Raynaud's Phenomenon in Progressive Systemic Sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2000;(2): CD000954.
- [45]. Fries, R., Shariat, K., von Wilmowsky, H., and Bohm, M. Sildenafil in the Treatment of Raynaud's Phenomenon Resistant to Vasodilatory Therapy. *Circulation*, 2005;112(19):2980-5.
- [46]. Cukierman, T., Elinav, E., Korem, M., and Chajek-Shaul, T. Low Dose Warfarin Treatment for Calcinosi s in Patients with Systemic Sclerosis. *Ann Rheum Dis.*, 2004;63(10):1341-3.
- [47]. Karabacak, K., Genç, G., Kaya, E., Kadan, M., and Doğancı, S. [Retrospective Evaluation of Clinical Experiences with Raynaud' s Phenomenon in Young Age Group]. *Damar Cer Derg*, 2012;21(2):110-4.
- [48]. Rivers, S. P, and Porter, J. M. Raynaud's Syndrome, Upper Extremity Vasospastic Disorders, and Small Artery Occlusive Disease. In: *Wilson SE, Veith FJ, Hobson II RW, editors. Vascular Surgery: principles and practise. New York: McGraw-Hill Book Company; 1987: 696-708.*
- [49]. Ertürk, M., Özısık, K., Peker, R. O., Emir, M., and Kerimođlu, B. Raynaud Hastalığında ve Hiperhidrozisde Cerrahi Yaklaşım. *Türkiye Klinikleri Kalp-Damar Cerrahisi Dergisi*, 2001 ; 2 (3): 145-8.
- [50]. Urschel, H. C., and Patel, A. Thoracic Outlet Syndromes. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2003; 5 (2): 163-8.
- [51]. Welch, E., and Geary, J. Current Status of Thoracic Dorsal Sympathectomy. *J Vasc Surg*, 1984; 1 (1): 202-14.
- [52]. Porter, J. M., and Edwards, J. M. Occlusive and Vasospastic Diseases Involving Distal Upper Extremity Arteries- Raynaud's Syndrome. In: *Rutherford RB, editor. Vascular Surgery. Philadelphia: W.B.Saunders Company; 2000: 1170-83.*

- [53]. Flat, A. E. Digital Artery Sympathectomy. *J Hand Surg*, 1980; 5: 550-6.
- [54]. Quayle, M.J., Nelson, M.T., and Standen, N.B. ATP-Sensitive and Inwardly Rectifying Potassium Channels in Smooth Muscle. *Physiological Reviews*, 77, 4, (1997), 1165-1232.
- [55]. Ferrer, M., Marin, J., Encabo, A., Alonso, M.J., and Balfagon, G. Role of K⁺ Channels and Sodium Pump in the Vasodilation Induced by Acetylcholine, Nitric Oxide, and Cyclic GMP in the Rabbit Aorta. *Gen. Pharm.*, 1999; 33:35-41.
- [56]. Meech RW, and Standen NB. Potassium Activation in Helix Aspersa Neurones Under Voltage Clamp: A Component Mediated by Calcium Influx. *J. Physiol. (Lond.)*, 1975; 249: 211-259.
- [57]. Jackson, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. *Hypertension*, 35[part 2], (2000), 173-178.
- [58]. Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. Pharmacology of Voltage-Gated and Calcium-Activated Potassium Channels. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999; 3:448-458.
- [59]. Akay, A., Turanlıgil, C. N., ve Uyanıkgil, Y. İyon Kanalları ve Epilepsi Patogenezindeki Rollerini. *Ege Üniversitesi, Arşiv*, 2010; 19:72.
- [60]. Jan, L.Y., and Jan, Y.N. Voltage-Gated and Inwardly Rectifying Potassium Channels. *Journal of Physiology*, 1997; 505, 2, 267-282.
- [61]. Quayle, M.J., Nelson, M.T., and Standen, N.B. ATP-Sensitive and Inwardly Rectifying Potassium Channels in Smooth Muscle. *Physiological Reviews*, 1997; 77, 4, 1165-1232.
- [62]. Noma, A. ATP-Regulated K⁺ Channels in Cardiac Muscle. *Nature*. 1983; 305:147-148.
- [63]. Yokoshiki, H., Sunagawa, M., Seki, T., and Sperelakis, N. ATP-sensitive K⁺ Channels in Pancreatic, Cardiac, and Vascular Smooth Muscle Cells. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol)*, 1998; 274, 43, C25-C37.
- [64]. Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J. P., Wang, C. Z., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., and Seino, S. A Family of Sulfonylurea Receptors Determines the Pharmacological Properties of ATP-Sensitive K⁺ channels. *Neuron*, 1996; 16:1011-1017.
- [65]. Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J. Pt., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., and Bryan, J. Reconstitution of IKATP: an Inward Rectifier Subunit Plus the Sulfonylurea Receptor. *Science*, 1995; 270:1166-1170.
- [66]. Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W, Clement, J.Pt., Boyd, A. E. 3rd, Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., and Nelson, D. A. Cloning of the Beta Cell High-Affinity Sulfonylurea Receptor: A Regulator of Insulin Secretion. *Science*, 1995; 268:423-426.
- [67]. Chutkow, W. A., Simon, M. C., Le Beau, M. M., and Burant, C. F. Cloning, Tissue Expression, and Chromosomal Localization of SUR2, the Putative Drug-Binding Subunit of Cardiac, Skeletal Muscle, and Vascular K_{ATP} Channels. *Diabetes*, 1996; 45:1439-1445.
- [68]. Shi, Y., Wu, Z., Cui, N., Shi, W., Yang, Y., Zhang, X., Rojas, A., Ha, B. T., and Jiang, C. PKA Phosphorylation of SUR2B Subunit Underscores Vascular K_{ATP} Channel Activation by Beta-Adrenergic Receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007; 293:R1205-1214.
- [69]. Chutkow, W. A., Makielski, J. C., Nelson, D. J, Burant, C. F., and Fan, Z. Alternative Splicing of SUR2 Exon 17 Regulates Nucleotide Sensitivity of the ATP-Sensitive Potassium Channel. *Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274:13656-13665.

- [70]. Inagaki, N., Gono, T., Clement, J. P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., and Bryan, J. Reconstitution of $I_{K_{ATP}}$: an Inward Rectifier Subunit Plus the Sulfonylurea Receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 1995; 270:1166–1170.
- [71]. Shyng, S., and Nichols, C. G. Octameric Stoichiometry of the K_{ATP} Channel Complex. *J Gen Physiol*, 1997; 110:655–664.
- [72]. Clement, J. Pt., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. Association and Stoichiometry of $K(ATP)$ Channel Subunits. *Neuron*, 1997; 18:827–838.
- [73]. Inagaki, N., Gono, T., and Seino, S. Subunit Stoichiometry of the Pancreatic Beta-Cell ATP-Sensitive K^+ Channel. *FEBS Lett.*, 1997; 409:232–236. [PubMed: 9202152]
- [74]. Yamada, M., Isomoto, S., Matsumoto, S., Kondo, C., Shindo, T., Horio, Y., and Kurachi, Y. Sulphonylurea Receptor 2B and Kir6.1 form a Sulphonylurea-Sensitive but ATP-Insensitive K^+ Channel. *Journal of Physiology*, 1997; 499:715–720.
- [75]. Okuyama, Y., Yamada, M., Kondo, C., Satoh, E., Isomoto, S., Shindo, T., Horio, Y., Kitakaze, M., Hori, M., and Kurachi, Y. The Effects of Nucleotides and Potassium Channel Openers on the SUR2A/Kir6.2 Complex K^+ Channel Expressed in a Mammalian Cell Line, HEK293T Cells. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 1998; 435:595–603.
- [76]. Babenko, A. P., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. Reconstituted Human Cardiac K_{ATP} Channels: Functional Identity with the Native Channels from the Sarcolemma of Human Ventricular Cells. *Circ Res.*, 1998; 83:1132–1143.
- [77]. Nichols, G. C., Singh, K. G., and Grange, K. D. K_{ATP} Channels and Cardiovascular Disease: Suddenly a Syndrome. *NIH Public Access*, 2013; 112(7):1059-1072.
- [78]. Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., and Doyle, D. A. Crystal Structure of the Potassium Channel KirBac1.1 in the Closed State. *Science*, 2003; 300:1922–1926.
- [79]. Tao, X., Avalos, J. L., Chen, J., and MacKinnon, R. Crystal Structure of the Eukaryotic Strong Inwardrectifier K^+ Channel Kir2.2 at 3.1 Å Resolution. *Science*, 2009; 326:1668–1674.
- [80]. Bryan, J., Vila-Carriles, W. H., Zhao, G., Babenko, A. P., and Aguilar-Bryan, L. Toward Linking Structure with Function in ATP-Sensitive K^+ Channels. *Diabetes*, 2004; 53(Suppl 3):S104–112.
- [81]. Nichols, C. G. K_{ATP} Channels as Molecular Sensors of Cellular Metabolism. *Nature*, 2006; 440:470–476.
- [82]. Mikhailov, M. V., Campbell, J. D., de Wet, H., Shimomura, K., Zadek, B., Collins, R. F., Sansom, M. S., Ford, R. C., and Ashcroft, F. M. 3-D Structural and Functional Characterization of the Purified K_{ATP} Channel Complex Kir6.2-SUR1. *Embo J.*, 2005; 24:4166–4175.
- [83]. Wang, S., Makhina, E. N., Masia, R., Hyrc, K. L., Formanack, M. L., and Nichols, C. G. Domain Organization of the ATP-Sensitive Potassium Channel Complex Examined by FRET. *J Biol Chem*.
- [84]. Nichols, C. G., Makhina, E. N., Pearson, W. L., Sha, Q., and Lopatin, A. N. Inward Rectification and Implications for Cardiac Excitability. *Circ Res.*, 1996; 78:1–7.
- [85]. Beguin, P., Nagashima, K., Nishimura, M., Gono, T., and Seino, S. PKA-Mediated Phosphorylation of the Human $K(ATP)$ Channel: Separate Roles of Kir6.2 and SUR1 Subunit Phosphorylation. *EMBO Journal*, 1999; 18:4722–4732.

- [86]. Lederer, W. J., Nichols, C. G., and Smith, G. L. The Mechanism of Early Contractile Failure of Isolated Rat Ventricular Myocytes Subjected to Complete Metabolic Inhibition. *Journal of Physiology*, 1989; 413:329–349.
- [87]. Nelson, M. T., and Quayle, J. M. Physiological Roles and Properties of Potassium Channels in Arterial Smooth Muscle. *American Journal of Physiology*, 1995; 268:C799–822.
- [88]. Nelson, M. T., Patlak, J. B., Worley, J.F., and Standen, N. B. Calcium Channels, Potassium Channels, and Voltage Dependence of Arterial Smooth Muscle Tone. *Am J Physiol*, 1990; 259:C3–18.
- [89]. Nelson, M. T., Standen, N. B., Brayden, J. E., and Worley, J. Fd. Noradrenaline Contracts Arteries by Activating Voltage-Dependent Calcium Channels. *Nature*, 1988; 336:382–385.
- [90]. Daut, J., Standen, N. B., and Nelson, M. T. The Role of the Membrane Potential of Endothelial and Smooth Muscle Cells in the Regulation of Coronary Blood Flow. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1994; 5:154–181.
- [91]. Coleman, H. A., Tare, M., and Parkington, H. C. Endothelial Potassium Channels, Endothelium-Dependent Hyperpolarization and the Regulation of Vascular Tone in Health and Disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004; 31:641–649.
- [92]. Miki, T., and Seino, S. Roles of K_{ATP} Channels as Metabolic Sensors in Acute Metabolic Changes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 2005; 38:917–925.
- [93]. Nichols, C. G., Koster, J. C., and Remedi, M. S. Beta-Cell Hyperexcitability: From Hyperinsulinism to Diabetes. *Diabetes Obes Metab.*, 2007; 9(Suppl 2):81–88.
- [94]. Bao, L., Kefaloyianni, E., Lader, J., Hong, M., Morley, G., Fishman, G. I., Sobie, E. A., and Coetzee, W. A. Unique Properties of the ATP-Sensitive K^+ Channel in the Mouse Ventricular Cardiac Conduction System. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2011; 4:926–935.
- [95]. Haissaguerre, M., Chatel, S., Sacher, F., Weerasooriya, R., Probst, V., Loussouarn, G., Horlitz, M., Liersch, R., Schulze-Bahr, E., Wilde, A., Kaab, S., Koster, J., Rudy, Y., Le Marec, H., and Schott, J. J. Ventricular Fibrillation With Prominent Early Repolarization Associated with a Rare Variant of KCNJ8/ K_{ATP} Channel. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2009; 20:93–98.
- [96]. Delaney, J. T., Muhammad, R., Blair, M. A., Kor, K., Fish, F. A., Roden, D. M., and Darbar, D. A KCNJ8 Mutation Associated with Early Repolarization and Atrial Fibrillation. *Europace*, 14:1428–1432.
- [97]. Medeiros-Domingo, A., Tan, B. H., Crotti, L., Tester, D. J., Eckhardt, L., Cuoretti, A., Kroboth, S. L., Song, C., Zhou, Q., Kopp, D., Schwartz, P. J., Makielski, J. C., and Ackerman, M. J. Gain-of-Function Mutation S422L in the KCNJ8-Encoded Cardiac $K(ATP)$ Channel Kir6.1 as a Pathogenic Substrate for J-Wave Syndromes. *Heart Rhythm*, 2010; 7:1466–1471.
- [98]. Barajas-Martinez, H., Hu, D., Ferrer, T., Onetti, C.G., Wu, Y., Burashnikov, E., Boyle, M., Surman, T., Urrutia, J., Veltmann, C., Schimpf, R., Borggrefe, M., Wolpert, C., Ibrahim, B.B., Sanchez-Chapula, J.A., Winters, S., Haissaguerre, M., and Antzelevitch, C. Molecular Genetic and Functional Association of Brugada and Early Repolarization Syndromes with S422L Missense Mutation in KCNJ8. *Heart Rhythm*.
- [99]. Flagg, T. P., Kurata, H. T., Masia, R., Caputa, G., Magnuson, M. A., Lefer, D. J., Coetzee, W. A., and Nichols, C. G. Differential Structure of Atrial and Ventricular K_{ATP} : Atrial K_{ATP} Channels Require SUR1. *Circ Res*, 2008; 103:1458–1465.

- [100]. Fedorov, V. V., Glukhov, A. V., Ambrosi, C. M., Kostecky, G., Chang, R., Janks, D., Schuessler, R. B., Moazami, N., Nichols, C. G., and Efimov, I. R. Effects of K_{ATP} Channel Openers Diazoxide and Pinacidil in Coronary-Perfused Atria and Ventricles From Failing and Non-Failing Human Hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 2011; 51:215–225.
- [101]. Babenko, A.P., Polak, M., Cave, H., Busiah, K., Czernichow, P., Scharfmann, R., Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., Vaxillaire, M., and Froguel, P. Activating Mutations in the ABCC8 Gene in Neonatal Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*, 2006; 355:456–466.
- [102]. Proks, P., Arnold, A.L., Bruining, J., Girard, C., Flanagan, S.E., Larkin, B., Colclough, K., Hattersley, A.T., Ashcroft, F.M., and Ellard, S. A Heterozygous Activating Mutation in the Sulphonylurea Receptor SUR1 (ABCC8) Causes Neonatal Diabetes. *Hum Mol Genet.*, 2006; 15:1793–1800.
- [103]. Ellard, S., Flanagan, S.E., Girard, C.A., Patch, A.M., Harries, L.W., Parrish, A., Edghill, E.L., Mackay, D.J., Proks, P., Shimomura, K., Haberland, H., Carson, D.J., Shield, J.P., Hattersley, A.T., and Ashcroft, F.M. Permanent Neonatal Diabetes Caused by Dominant, Recessive, or Compound Heterozygous SUR1 Mutations with Opposite Functional Effects. *Am J Hum Genet.*, 2007; 81:375–382.
- [104]. Bienengraeber, M., Olson, T.M., Selivanov, V.A., Kathmann, E.C., O’Cochlain, F., Gao, F., Karger, A.B., Ballew, J.D., Hodgson, D.M., Zingman, L.V., Pang, Y.P., Alekseev, A.E., and Terzic, A. ABCC9 Mutations Identified in Human Dilated Cardiomyopathy Disrupt Catalytic K_{ATP} Channel Gating. *Nature Genetics*, 2004; 36:382–387.
- [105]. Olson, T.M., Alekseev, A.E., Moreau, C., Liu, X.K., Zingman, L.V., Miki, T., Seino, S., Asirvatham, S.J., Jahangir, A., and Terzic, A. K_{ATP} Channel Mutation Confers Risk for Vein of Marshall Adrenergic Atrial Fibrillation. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2007; 4:110–116.
- [106]. Van Bon, B.W., Gilissen, C., Grange, D.K., Hennekam, R.C., Kayserili, H., Engels, H., Reutter, H., Ostergaard, J.R., Morava, E., Tsiakas, K., Isidor, B., Le Merrer, M., Eser, M., Wieskamp, N., de Vries, P., Steehouwer, M., Veltman, J.A., Robertson, S.P., Brunner, H.G., de Vries, B.B., and Hoischen, A. Cantu Syndrome is Caused by Mutations in ABCC9. *Am J Hum Genet.*, 2012; 90:1094–1101.
- [107]. Cantu, J.M., Garcia-Cruz, D., Sanchez-Corona, J., Hernandez, A., and Nazara, Z. A Distinct Osteochondrodysplasia With Hypertrichosis-Individualization of a Probable Autosomal Recessive Entity. *Hum Genet.*, 1982; 60:36–41.
- [108]. Grange, D.K., Lorch, S.M., Cole, P.L., and Singh, G.K. Cantu Syndrome in a Woman and Her Two Daughters: Further Confirmation of Autosomal Dominant Inheritance and Review of the Cardiac Manifestations. *Am J Med Genet A*, 2006; 140:1673–1680.
- [109]. Harakalova, M., van Harssele, J.J., Terhal, P.A., van Lieshout, S., Duran, K., Renkens, I., Amor, D.J., Wilson, L.C., Kirk, E.P., Turner, C.L., Shears, D., Garcia-Minaur, S., Lees, M.M., Ross, A., Venselaar, H., Vriend, G., Takanari, H., Rook, M.B., van der Heyden, M.A., Asselbergs, F.W., Breur, H.M., Swinkels, M.E., Scurr, I.J., Smithson, S.F., Knoers, N.V., van der Smagt, J.J., Nijman, I.J., Kloosterman, W.P., van Haelst, M.M., Van Haften, G., and Cuppen, E. Dominant Missense Mutations in ABCC9 Cause Cantu Syndrome. *Nat Genet.*, 2012; 44:793–796.
- [110]. Seino, S., Iwanaga, T., Nagashima, K., and Miki, T. Diverse Roles of $K(ATP)$ Channels Learned From Kir6.2 Genetically Engineered Mice. *Diabetes*, 2000; 49:311–318.
- [111]. Ellis, J.A., Lamantia, A., Chavez, R., Scurrah, K.J., Nichols, C.G., and Harrap, S.B. Genes Controlling Postural Changes in Blood Pressure: Comprehensive Association Analysis of ATP-Sensitive Potassium Channel Genes KCNJ8 and ABCC9. *Physiol Genomics*, 2009; 40:184–188.

- [112]. Duan, R., Cui, W., and Wang, H. Mutational Analysis of the Kir6.1 Gene in Chinese Hypertensive Patients Treated with the Novel ATP-Sensitive Potassium Channel Opener Iptakalim. *Exp Ther Med*, 2:757–760.
- [113]. Harrap, S.B., Cui, J.S., Wong, Z.Y., and Hopper, J.L. Familial and Genomic Analyses of Postural Changes in Systolic and Diastolic Blood Pressure. *Hypertension*, 2004; 43:586–591.
- [114]. Isomoto, S., Kondo, C., Yamada, M., Matsumoto, S., Higashiguchi, O., Horio, Y., Matsuzawa, Y., and Kurachi, Y. A Novel Sulfonylurea Receptor Forms with BIR (Kir6.2) a Smooth Muscle Type ATP-Sensitive K⁺ Channel. *Journal of Biological Chemistry*, 1996; 271:24321–24324.
- [115]. Yoshida, H., Feig, J.E., Morrissey, A., Ghu, I.A., Artman, M., Coetzee, and W.A. K ATP Channels of Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells Consist of a Heteromultimeric Complex of Kir6.1, Kir6.2, and SUR2B Subunits. *J Mol Cell Cardiol*, 2004; 37:857–869.
- [116]. Gendron, M.E., Thorin, E., and Perrault, L.P. Loss of Endothelial K_{ATP} Channel-Dependent, NO-Mediated Dilatation of Endocardial Resistance Coronary Arteries in Pigs with Left Ventricular Hypertrophy. *Br J Pharmacol*, 2004; 143:285–291.
- [117]. Janigro, D., West, G. A., Gordon, E. L., and Winn, H. R. ATP-Sensitive K⁺ Channels in Rat Aorta and Brain Microvascular Endothelial Cells. *American Journal of Physiology*, 1993.
- [118]. Mederos, Y., Schnitzler, M., Derst, C., Daut, J., and Preisig-Muller, R. ATP-Sensitive Potassium Channels in Capillaries Isolated From Guinea-Pig Heart. *J Physiol*, 2000; 525(Pt 2):307–317.
- [119]. Malester, B., Tong, X., Ghu, I., Kontogeorgis, A., Gutstein, D. E., Xu, J., Hendricks-Munoz, K. D., and Coetzee, W. A. Transgenic Expression of a Dominant Negative K_{ATP} Channel Subunit in the Mouse Endothelium: Effects on Coronary Flow and Endothelin-1 Secretion. *Faseb J*, 2007 Published online March 6, 2007.
- [120]. Kakkar, R., Ye, B., Stoller, D.A., Smelley, M., Shi, N.Q., Galles, K., Hadhazy, M., Makielski, J.C., and McNally, E.M. Spontaneous Coronary Vasospasm in K_{ATP} Mutant Mice Arises From a Smooth Musclextrinsic Process. *Circ Res*, 2006; 98:682–689.
- [121]. Goldberg, M.R. Clinical Pharmacology of Pinacidil, a Prototype for Drugs That Affect Potassium Channels. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1988; 12(Suppl 2):S41–47.
- [122]. Buhl, A.E., Waldon, D.J., Conrad, S.J., Mulholland, M.J., Shull, K.L., Kubicek, M.F., Johnson, G.A., Brunden, M.N., Stefanski, K.J., Stehle, R.G., and et al. Potassium Channel Conductance: A Mechanism Affecting Hair Growth Both In Vitro and In Vivo. *J Invest Dermatol*, 1992; 98:315–319.
- [123]. Kaler, S.G., Patrinos, M.E., Lambert, G.H., Myers, T.F., Karlman, R., and Anderson, C.L. Hypertrichosis and Congenital Anomalies Associated with Maternal Use of Minoxidil. *Pediatrics*, 1987; 79:434–436.
- [124]. Avatapalle, B., Banerjee, I., Malaiya, N., and Padidela, R. Echocardiography Monitoring For Diazoxide Induced Pericardial Effusion. *BMJ Case Rep*. 2012.
- [125]. Ito, H., Taniyama, Y., Iwakura, K., Nishikawa, N., Masuyama, T., Kuzuya, T., Hori, M., Higashino, Y., Fujii, K., and Minamino, T. Intravenous Nicorandil Can Preserve Microvascular Integrity and Myocardial Viability in Patients with Reperfused Anterior Wall Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*, 1999; 33:654–660.

- [126]. Schramm, T.K., Gislason, G.H., Vaag, A., Rasmussen, J.N., Folke, F., Hansen, M.L., Fosbol, E.L., Kober, L., Norgaard, M.L., Madsen, M., Hansen, P.R., and Torp-Pedersen, C. Mortality and Cardiovascular Risk Associated With Different Insulin Secretagogues Compared With Metformin in Type 2 Diabetes, with or Without a Previous Myocardial Infarction: A Nationwide Study. *Eur Heart J*, 32:1900–1908.
- [127]. Gore, M.O., and McGuire, D.K. Resolving Drug Effects From Class Effects Among Drugs For Type 2 Diabetes Mellitus: More Support For Cardiovascular Outcome Assessments. *Eur Heart J*, 32:1832–1834.
- [128]. OMIM, <http://omim.org/entry/600935>.
- [129]. NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3764>.
- [130]. Ermiş, E. (2012). *Erken Reppolarizasyon Bulunan Kişilerde Ani Ölüm ve Aritmi Belirteci Testlerin Değerlendirilmesi ve KCNJ8-S422L Gen Mutasyonu İlişkisi*, Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi, İstanbul.
- [131]. UniprotKB/SwissProt, http://web.expasy.org/variant_pages/VAR_065225.html.
- [132]. Ensembl, http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=12:21765233-21766233:v=rs72554071:vdb=variation:vf=13618051.
- [133]. OMIM, <https://www.omim.org/entry/601439?search=abcc9&highlight=abcc9>.
- [134]. NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10060>.
- [135]. Smith, J. K., Chadburn, J. A., Adomaviciene, A., Minoretti, P., Vignali, L., Emanuele, E., and Tammaro, P. Coronary Spasm and Acute Myocardial Infarction Due to a Mutation(V734I) in the Nucleotide Binding Domain 1 of ABCC9. *International Journal of Cardiology*, 2013; 168 : 3506–3513.
- [136]. NCBI, dbSNP, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=61688134.
- [137]. Kaya, Y. (2009). *Seyhan Baraj Gölü'nde İzole Edilen Enterobacteraceae Grubu Bakterilerde Antibiyotik Dirençliliği ve Plazmid Profillerinin Belirlenmesi*, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- [138]. Medrano, R. F. V., and de Oliveira, C. A. Guidelines for the Tetra-Primer ARMS–PCR Technique Development. *Mol Biotechnol*, 2014.
- [139]. Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins A. R., and Ian, N. M. Day An Efficient Procedure for Genotyping Single Nucleotide Polymorphism. *Nucleic Acid Research*, 2001; 29(17):E88-8.
- [140]. Guoqing, L., and Etsuko, M. Vector NTI, A Balanced All-In-One Sequence Analysis Suite. *Briefings in Bioinformatics*, 2004; 5 (4): 378–388.
- [141]. Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., and et al. IDT SciTools: A Suite for Analysis and Design of Nucleic Acid Oligomers. *Nucleic Acids Res. 36 (Web Server issue)*, 2008; W163–9.
- [142]. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. Primer-BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction. *BMC Bioinformatics*, 2012; 13:134.
- [143]. Ermiş, E., Yolcu, M., Demirelli, S., İpek, E., Çiftçi, C., ve Hançer, S. Investigation of Arrhythmia Markers and KCNJ8-S422L Gene Mutation In A Population With Early Repolarization Pattern On ECG. *Türk Girişimsel Kardiyoloji Dergisi*, 2013; 17(3):73-80.

- [144]. Fedele, F., Mancone, M., Chilian, M. W., Severino, P., Canali, E., Logan, S., De Marchis, L. M., Volterrani, M., Palmirotta, R., and Guadagni, F. Role of Genetic Polymorphisms of Ion Channels in the Pathophysiology of Coronary Microvascular Dysfunction and Ischemic Heart Disease. *Basic Res Cardiol*, 2013;108:387.
- [145]. Veeramah, R. K., Karafet, M. T., Wolf, D., Samson, A. R., and Hammer, F. M. The KCNJ8-S422L Variant Previously Associated With J-Wave Syndromes Is Found At An Increased Frequency In Ashkenazi Jews. *European Journal of Human Genetics*, 2014;22:94-98.
- [146]. Minoretti, P., Falcone, C., Aldeghi, A., Olivieri, V., Mori, F., Emanuele, E., Calcagnino, M., and Geroldi, D. A Novel Val734Ile Variant in the ABCC9 Gene Associated with Myocardial Infarction. *Clinica Chimica Acta*, 2006;124-128.
- [147]. Smith, K. J., Chadburn, A. J., Adomaviciene, A., Minoretti, P., Vignali, L., Emanuele, E., and Tammore, P. Coronary Spasm and Acute Myocardial Infarction due to a Mutation (V734I) in the Nucleotide Binding Domain 1 of ABCC9. *International Journal of Cardiology*, 2013;3506-3513.
- [148]. Shemirani, A.H., Szomjak, E., Balogh, E., Andras, C., Kovacs, D., Acs, J., and Csiki, Z. Polymorphism of Clotting Factors in Hungarian Patients With Raynaud's Phenomenon. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2011; 22:56-59.
- [149]. Takáts, A. T., Shemirani, A. H., Zsóri, K. S., András, C., and Csiki, Z. Prothrombotic Polymorphisms in Patients With Raynaud's Phenomenon and Migraine. *Acta Physiologica Hungarica*, 2012;99(4):430-435.
- [150]. Gaudy-Marqueste, C., Roll, P., Esteves-Vieira, V., Weiller, J. P., Grob, J. J., Cau, P., Levy, N., and De Sandre-Giovannoli, A. LBR Mutation and Nuclear Envelope Defects in a Patient Affected With Reynolds Syndrome. *J Med Genet*, 2010;47:361-370.
- [151]. Fujita, E., Komine, M., Tsuda, H., Adachi, A., Murata, S., Kamata, Y., Minota, S., and Ohtsuki, M. Case of H Syndrome With Massive Skin Involvement, Retroperitoneal Fibrosis and Raynaud's Phenomenon With a Novel Mutation in the SLC29A3 Gene. *Journal of Dermatology*, 2015; 42: 1-3.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Merih AKKAPULU

Doğum Tarihi : 24.09.1990

E- mail : ylebik201305@mersin.edu.tr

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya	Mersin Üniversitesi	2008-2013
Yüksek Lisans	Eczacılık Biyokimyası	Mersin Üniversitesi	2013-2017

ESERLER (Makale ve Bildiriler)

1. Vezir, Ö., Çömelekoğlu, Ü., Sucu, N., Yalın, A. E., Yılmaz, Ş. N., Yalın, S., Söğüt, F., Yaman, S., Kibar, K., Akkapulu, M., Koç, M. İ., Seçer, D. N -Acetylcysteine-Induced Vasodilatation is Modulated by KATP Channels, Na⁺/K⁺-ATPase Activity and Intracellular Calcium Concentration: An in Vitro Study. *ELSEVIER BV*,2017, 69, 738-745.
2. Bekfelavi, E., Yılmaz, Ö., Şimşek Kuş, N., Akkapulu, M., Kızmaz, B., Küce, P., Coral, G. Siklitol Sentezleri: Sentezlenen Siklitol Türevlerinin Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. 1. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya, Türkiye, 2013.
3. Yıldırım, M., Berköz, M., Çömelekoğlu, Ü., Akkapulu, M., Yalın, A., Yalın, S. Investigation of the Effect of Rheum Ribes L. on Oxidative Stress in Diabetic Rats. 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, Türkiye, 2016.
4. Akkapulu, M., Yaman, S., Seçer, D., Söğüt, F., Yalın, A. E., Vezir, Ö., Çömelekoğlu, Ü., Sucu, N., Yılmaz, N., Yalın, S. The role of Na⁺K ATPase Activity in the Vasodilatory Effect of N-Acetylcysteine.. 41. FEBS Congress, İzmir, Türkiye, 2016.
5. Söğüt, F., Çömelekoğlu, Ü., Vezir, Ö., Sucu, N., Yalın, A., Yalın, S., Yılmaz, N., Yaman, S., Karagül, M. İ., Kibar, K., Akkapulu, M., Seçer, D. The Role of ATP-Sensitive Potassium Channels in the Vasodilatory Effect of N-Acetylcysteine. 41. FEBS Congress, İzmir, Türkiye, 2016.
6. Atınç, T. H., Akkapulu, M., Yalın, A. Antioksidan Korunma Mekanizmaları. İVEK 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, İstanbul, Türkiye, 2017.