

T. C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**eNOS T786C VE G894T POLİMORFİZMLERİNİN KORONER  
ARTER HASTALIĞINDA RİSK OLARAK  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Şenay BALCI FİDANCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Lülüfer TAMER GÜMÜŞ

MERSİN – 2012

T. C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**eNOS T786C VE G894T POLİMORFİZMLERİNİN KORONER  
ARTER HASTALIĞINDA RİSK OLARAK  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Şenay BALCI FİDANCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Lülüfer TAMER GÜMÜŞ

Tez No:218

Bu tez, Mersin Üniversitesi araştırma Projeleri Birimi tarafından  
BAP-SBE TTB (ŞBF) 2011-3 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

MERSİN-2012

## Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “eNOS T786C ve G894T Polimorfizmlerinin Koroner Arter Hastalığında Risk Olarak Değerlendirilmesi” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 03.07/ 2012



Prof. Dr. Gürbüz Polat  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Lülüfer TAMER GÜMÜŞ  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Dilek ÇİÇEK YILMAZ  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kardiyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun..10.07.2012.....tarih ve 202/202 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Müdürü

Prof. Dr. Elkin ÇÖMELEKOĞLU

## TEŞEKKÜR

Akademik eğitimim süresi boyunca ve tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım başta danışman hocam Prof. Dr. Lülüfer Tamer Gümüş'e, Prof. Dr. Gürbüz Polat, Doç. Dr. Gülçin Eskandari, Doç. Dr. Burak Çimen ve Doç. Dr. Necati Muşlu'ya,

Tezime ait çalışma grubu örneklerinin toplanması ve tezimin klinik sürecinde rol alan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Nehir Sucu'ya, Kardiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Ahmet Çamsarı'ya ve Dr. Pınar Özmen Yıldız'a,

Bu çalışmam sırasında fikirleri ve her türlü destekleri ile katkıda bulunan Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Tezimin istatistikleri konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı Arş. Gör. Didem Derici'ye,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışmam sırasında da beni sürekli olarak manevi açıdan destekleyen babama, anneme ve eşime teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
EŞİTLİKLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
ÖZET.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENELBİLGİLER.....	3
2.1. Endotel.....	3
2.1.1. Endotel Fonksiyonları.....	5
2.1.2. Endotel Disfonksiyonu.....	13
2.2. Nitrik Oksit.....	15
2.2.1. Tarihçe.....	15
2.2.2. Nitrik Oksitin Yapısı ve Genel Özellikleri.....	16
2.2.3. Nitrik Oksit Sentezi.....	17
2.2.4. Nitrik Oksitin Etki Mekanizması ve Fonsiyonları.....	19
2.3. Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri.....	30
2.4. Endotelyum Nitrik Oksit Sentaz Enzimi ve Varyasyonları.....	35
2.4.1. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Genindeki Varyasyonları.....	39
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	43
3.1. Araç ve Gereçler.....	43
3.1.1. Kimyasal Madde ve Çözücüler.....	43
3.1.2. Alet ve Gereçler.....	43
3.1.3. Kullanılan Kitler.....	43
3.2. Kullanılan Ayraçlar.....	44
3.2.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Ayraçların Hazırlanması.....	44

3.3. Çalışma Grubu ve Örnek Alımı.....	45
3.4. Yöntemler.....	46
3.4.1. Koroner Anjioplasti.....	46
3.4.2. Lipit Profili Ölçümleri.....	46
3.4.3. Açlık Kan Şekeri Ölçümü.....	48
3.4.4. Nitrik Oksit Ölçümü.....	49
3.4.5. eNOS T786C ve eNOS G894T Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi...50	
3.4.5.1. DNA İzolasyonu.....	50
3.4.5.2. eNOS T786C ve eNOS G894T Gen Polimorfizmleri için Primer ve Prob Dizaynı.....	51
3.4.5.3. eNOS T786C ve G894T Gen Polimorfizmlerine Ait Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları.....	53
3.4.5.4. eNOS T786C ve G894T Gen Polimorfizmlerine Ait Genotip Belirlenmesi (Melting Curve Analizi).....	55
3.5. İstatistiksel Yöntemler.....	57
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>58</b>
4.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Bireylerin Tanımlayıcı Bilgilerine Ait Bulgular.....	58
4.2. Kontrol ve KAH Gruplarında AKŞ, Lipid Profili ve NO Düzeylerine Ait Bulgular.....	59
4.3. Nitrik oksit Düzeylerinin KAH'lardaki Tıkalı Damar Sayısı ile İlişkisine Ait Bulgular. ....	60
4.4. Kontrol ve KAH Gruplarının eNOS T786C Genotiplerinde Hardy-Weinberg Dengesine Ait Bulgular.....	61
4.5. Kontrol ve KAH Gruplarında eNOS T786C Genotip ve Allel Dağılımına Ait Bulgular.....	62
4.6. Kontrol ve KAH Gruplarında eNOS T786C Genotiplerine Göre NO Düzeylerine Ait Bulgular.....	63
4.7. KAH Grubunda eNOS T786C Genotipleri ve Tıkalı Damar Sayısı Arasındaki İlişkiye Ait Bulgular.....	63

4.8. Kontrol ve KAH Gruplarında eNOS G894T Genotiplerinde Hardy-Weinberg Dengesine Ait Bulgular.....	64
4.9. Kontrol ve KAH Gruplarında eNOS G894T Genotip ve Allel Dağılımına Ait Bulgular.....	65
4.10. Kontrol ve KAH grublarında eNOS G894T Genotiplerine Göre NO Düzeylerine Ait Bulgular.....	66
4.11.KAH Grubunda eNOS G894T Genotipleri ve Tıkalı Damar Sayısı Arasındaki İlişkiye Ait Bulgular.....	67
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>68</b>
<b>6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>	<b>77</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>78</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>91</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Endotelyumdan salınan vazoaktif mediyatörler .....	8
Şekil 2.2. Endotel disfonksiyonu.....	14
Şekil 2.3 Nitrik oksitin şematik görünümü .....	16
Şekil 2.4. Nitrik oksitin sentezi.....	17
Şekil.2.5 Nitrik oksit sentaz ekspresyonunun düzenlenme mekanizması .....	18
Şekil 2.6. Nitrik oksitin etki mekanizması.....	19
Şekil 2.7. Sinir sisteminde nitrik oksit .....	22
Şekil 2.8. Nitrik oksitin kardiyovasküler sistem üzerine olan etkileri.....	24
Şekil 2.9. Normal arter yapısı.....	25
Şekil 2.10. Aterosklerozun zamana göre seyri.....	26
Şekil 2.11. Normal koroner arter ve plaklı koroner arterin kesit görünümü.....	27
Şekil 2.12. Temel ateroskleroz süreci.....	28
Şekil 2.13 Nitrik oksit sentaz enziminin yapısı.....	30
Şekil 2.14 Nitrik oksit sentaz enziminin bağlanma bölgeleri.....	32
Şekil 2.15 İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin makrofajlardaki indüksiyonu ve ürettiği nitrik oksitin etkileri .....	33
Şekil 2.16 Endotelyal nitrik oksitin oluşumu ve etki mekanizması.....	34
Şekil 2.17 Nöronal nitrik oksit sentaz enziminin NMDA ile ilişkisi ve sinir sistemindeki etkileri.....	35
Şekil 2.18 Endotelyal nitrik oksit sentaz enziminin dimerik yapısı.....	36
Şekil 2.19 Endotelyal nitrik oksit sentaz enziminin etki mekanizması.....	37
Şekil 2.20 Endotelyal nitrik oksit sentaz enziminin sinyal mekanizmasının hücre membranının kaveolünde gösterilmesi.....	38
Şekil 2.21 Endotelyal nitrik oksit sentaz geni ve bilinen polimorfizm bölgeleri.....	39
Şekil 3.1. eNOS T786C mutasyonuna ait Melting Curve analizi.....	56
Şekil 3.2. eNOS G894T mutasyonuna ait Melting Curve analizi.....	56
Şekil 4.1. Koroner arter hastalarının tıkalı damar sayısına göre dağılımları.....	59
Şekil 4.2. Koroner arter hastalarının tıkalı damar sayısına göre NO düzeyleri.....	61
Şekil 4.3. Koroner arter hastalarının tıkalı damar sayısına göre eNOS T786C genotip dağılımı.....	64



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Endotelden salgılanan aracı moleküller ve işlevleri.....	5
<b>Çizelge 2.2.</b> Endotel ve lökosit kaynaklı adezyon molekülleri, ligandları ve bu reseptör ligand ilişkisini kullanan lökosit türleri.....	12
<b>Çizelge 2.3.</b> Nitrik oksit sentaz enziminin izoformları ve genel özellikleri.....	31
<b>Çizelge 2.4.</b> İnsan endotelyal nitrik oksit sentaz geni polimorfizmleri ile kardiovasküler hastalıklar arasındaki ilişkiler.....	40
<b>Çizelge 3.1.</b> DNA izolasyonunda kullanılan kitin içeriği.....	44
<b>Çizelge 3.2.</b> Nitrik oksit ölçümünde kullanılan araç, gereç ve çözeltiler.....	49
<b>Çizelge 3.3.</b> eNOS T786C mutasyon analizi için kullanılan primer ve prob dizileri.....	52
<b>Çizelge 3.4.</b> eNOS G894T mutasyon analizi için kullanılan primer ve prob dizileri.....	52
<b>Çizelge 3.5.</b> eNOS T786C mutasyon analizinde kullanılan materyallerin konsantrasyon ve miktarları.....	53
<b>Çizelge 3.6.</b> eNOS T786C mutasyon analizi için PZR koşulları.....	54
<b>Çizelge 3.7.</b> eNOS G894T mutasyon analizinde kullanılan materyallerin konsantrasyon ve miktarları.....	54
<b>Çizelge 3.8.</b> eNOS G894T mutasyon analizi için PZR koşulları.....	55
<b>Çizelge 4.1.</b> Kontrol ve KAH gruplarına ait risk faktörlerinin dağılımı ve tanımlayıcı bilgiler.....	58
<b>Çizelge 4.2.</b> Kontrol ve KAH gruplarına ait AKŞ, lipit profili ve NO düzeyleri.....	60
<b>Çizelge 4.3.</b> KAH hastalarında tıkalı damar sayısına göre NO düzeyleri.....	60
<b>Çizelge 4.4.</b> Kontrol ve KAH gruplarında eNOS T786C varyantları için Hardy-Weinberg dengesi.....	61
<b>Çizelge 4.5.</b> Kontrol ve KAH gruplarında eNOS T786C genotiplerinin dağılımı ve oluşturdukları riskler.....	62
<b>Çizelge 4.6.</b> eNOS T786C genotiplerine göre kontrol ve KAH gruplarına ait NO düzeyleri.....	63
<b>Çizelge 4.7.</b> KAH grubunda eNOS T786C genotipleri ve tıkalı damar sayısı arasındaki ilişki.....	64
<b>Çizelge 4.8.</b> Kontrol ve KAH gruplarında eNOS G894T varyantları için Hardy-Weinberg dengesi.....	65

<b>Çizelge 4.9.</b> Kontrol ve KAH gruplarında eNOS G894T genotiplerinin dağılımı ve oluşturdukları riskler.....	65
<b>Çizelge 4.10.</b> eNOS G894T genotiplerine göre kontrol ve KAH gruplarına ait NO düzeyleri.....	66
<b>Çizelge 4.11.</b> Koroner arter hasta grubunda eNOS G894T genotip ve tıkalı damar sayısı ilişkisi.....	67

## EŞİTLİKLER DİZİNİ

<b>Eşitlik 3.1.</b> Total kolesterolün ölçümünde yer alan tepkime denklemi.....	47
<b>Eşitlik 3.2.</b> HDL-Kolesterol ölçümünde yer alan tepkime denklemi.....	47
<b>Eşitlik 3.3.</b> Trigliserit ölçümünde yer alan tepkime denklemi.....	48
<b>Eşitlik 3.4.</b> Friedwald Eşitliği.....	48
<b>Eşitlik 3.5.</b> Açlık kan şekeri ölçümünde yer alan tepkime denklemi.....	49

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>4-AAP</b>	4-aminoantiprin
<b>Ang II</b>	Anjiotensin II
<b>Angiotensinase</b>	Anjiotensin dönüştürücü enzim
<b>ADMA</b>	Asimetrik dimetil arjinin
<b>ADP</b>	Adenozin difosfat
<b>AKŞ</b>	Açlık kan şekeri
<b>AMI</b>	Akut miyokard infarktüsü
<b>APC</b>	Aktifleşmiş protein C
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>BH4</b>	Tetrahidrobiopterin
<b>CA</b>	Sitozin-Adenozin
<b>CaM</b>	Kalmudilin
<b>Cav-1</b>	Kaveolin-1
<b>CE</b>	Kolesterol esteraz
<b>DAG</b>	1,2-diaçil gliserol
<b>DHAP</b>	Dihidroksiaseton fosfat
<b>DM</b>	Diyabetes mellitus
<b>EDRF</b>	Endotel kökenli gevşeme faktörü
<b>EDTA</b>	Etilendiamin tetraasetik asit
<b>EET</b>	Epoksieikosatrienoik asit
<b>EKHF</b>	Endotel kökenli hiperpolarize edici faktör
<b>eNOS</b>	Endotelyal nitrik oksit sentaz
<b>EPC</b>	Endotel progenitör hücre
<b>ET</b>	Endotelin
<b>FAD</b>	Flavin adenin dinükleotid
<b>FMN</b>	Flavin mononükleotid
<b>FRET</b>	Floresan rezonans enerji transferi
<b>G6PDH</b>	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
<b>GK</b>	Gliserokinaz
<b>GPO</b>	Gliserol fosfat oksidaz

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>HDL</b>	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
<b>HDL-K</b>	HDL-Kolesterol
<b>HK</b>	Heksokinaz
<b>ICAM-1</b>	İnterselüler adezyon molekülü-1
<b>IL-8</b>	İnterlökin-8
<b>IP3</b>	Fosfatidil inositol 1,4,5- trifosfat
<b>iNOS</b>	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>KAH</b>	Koroner arter hastalığı
<b>KKY</b>	Konjestif kalp yetmezliği
<b>KVH</b>	Kardiyovasküler hastalık
<b>L-arg</b>	L-arjinin
<b>LDL</b>	Düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>LPL</b>	Lipoprotein lipaz
<b>MCP-1</b>	Monosit kemoatraktan protein
<b>Myr</b>	Myristoilasyon
<b>NADP</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NANC</b>	Nonadrenarjik nonkolinerjik
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartat
<b>nNOS</b>	Nöronal nitrik oksit sentaz
<b>NO<sup>+</sup></b>	Nitrozonyum katyonu
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>NO<sup>-</sup></b>	Nitroksil anyonu
<b>NO<sub>2</sub></b>	Nitrit
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrojen dioksit
<b>NO<sub>3</sub></b>	Nitrat
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>OH•</b>	Hidroksil radikali
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroksinitrit
<b>PAF</b>	Trombosit aktive edici faktör
<b>PAI-1</b>	Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
<b>PECAM-1</b>	Trombosit endoteliyal hücre adezyon molekülü-1

<b>PEG</b>	Polietilen glikol
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostoglandin I <sub>2</sub>
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidil inositol bifosfat
<b>POD</b>	Peroksidaz
<b>PSGL</b>	P-Selektin glikoprotein ligand
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SOR</b>	Serbest oksijen radikali
<b>TG</b>	Trigliserit
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	Transforme edici büyüme faktörü $\alpha$
<b>TK</b>	Total kolesterol
<b>TM</b>	Trombomodulin
<b>T<sub>M</sub></b>	Erime ısısı
<b>tPA</b>	Doku plazminojen aktivatörü
<b>VCAM-1</b>	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
<b>VLA</b>	Çok geç dönem antijen
<b>VLDL</b>	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>VNTR</b>	Değişken ardışık tekrar polimorfizmi
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikro litre
<b><math>\mu</math>M</b>	Mikro molar

## ÖZET

Hayatın erken evrelerinde başlayarak orta yaş ve sonrasında koroner arter hastalığı (KAH) ile sonuçlanan ateroskleroz, birçok nedene bağlı bir hastalıktır. Endotel disfonksiyonu, aterosklerozun yapısal değişikliklerinden önce oluşur ve gelecekteki kardiovasküler olayları öngörmeye yardım eden bağımsız bir faktördür. Endotel disfonksiyonuna neden olan çeşitli mekanizmaların içinde en belirgin olanı nitrik oksit azalmasıdır. Bu durumun nedeni nitrik oksidin biyolojik aktivitesinin veya eNOS enzim aktivitesinin azalmasıdır. Azalmış nitrik oksit salınımının ateroskleroz gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesiyle eNOS enzimini kodlayan gende çeşitli mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonların bozulmuş nitrik oksit salınımına, sonuç olarak da koroner arter hastalığına neden olabileceği bildirilmiştir. Çalışmamızda, KAH'lılarda eNOS T786C ve eNOS G894T polimorfizmlerinin olası rolünün belirlenmesi amaçlandı.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji AD'ında koroner anjiyografi uygulanan 175 birey çalışmaya dahil edildi. Koroner arterlerinde herhangi birinde %70 ve fazlası darlığı olan 89 birey koroner arter hastası (hasta grubu), herhangi bir darlık ya da lezyon tespit edilmeyen 86 birey kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

Kontrol ve KAH grubunda nitrik oksit düzeyi ELISA (Organo Teknika, Avusturya), lipid profili ve açlık kan şekeri düzeyi Cobas Integra 800 otoanalizör (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya) ile belirlendi. Kontrol ve KAH grubuna ait genomik DNA'lar tam kandan izole edildi. eNOS T786C ve eNOS G894T polimorfizmleri, mutasyon belirleme kitleri kullanılarak gerçek-zamanlı PZR cihazı (LightCycler480 II, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya) ile saptandı.

Nitrik oksit düzeyinde kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0,246$ ). eNOS T786C polimorfizminin, KAH grubunda TT, TC ve CC genotipi sıklığı sırasıyla %42.7, 41.6 ve 15.7, kontrol grubunda ise %62.8, 29.1 ve 8.1 olarak saptandı. TT genotipiyle karşılaştırıldığında, TC genotipine sahip olanların 2.100 kat ( $p=0,026$ ), CC genotipine sahip olanların ise 2,842 kat ( $p=0,040$ ), ayrıca C alleleline sahip olanların, T alleleline sahip olanlara göre 1,964 kat ( $p=0,005$ ) daha fazla KAH oluşturma riskine sahip olduğu belirlendi. eNOS G894T polimorfizminde, kontrol grubu ve KAH grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).

Sonuç olarak, eNOS T786C varyantlarının KAH için risk faktörü olarak değerlendirilebileceği düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Nitrik oksit, eNOS T786C, eNOS G894C, Koroner Arter Hastalığı

## ABSTRACT

Atherosclerosis is a disease develops due to many reasons begins in the early stages of life and after middle age, results in coronary artery disease. Endothelial dysfunction is an independent factor that helps to predict the future cardiovascular events and occurs before the structural changes of atherosclerosis. The most prominent of the various mechanisms that cause endothelial dysfunction is reduction of nitric oxide. The reason for this situation is the reduction in biological activity of nitric oxide or the reduction in eNOS enzyme activity. With the determination of the effect of decreased release of nitric oxide on the development of atherosclerosis, various mutations was detected in the gene encoding the enzyme eNOS. It has been reported these mutations may lead impaired the release of nitric oxide and eventually to coronary artery disease.

In our study, we aimed to determine the possible role of eNOS polymorphisms T786C and G894T in coronary artery disease.

175 individuals who underwent coronary angiography in Mersin University Medical Faculty Department of Cardiology were included. 89 individuals with 70% or more stenosis in any coronary arteries were grouped as coronary artery disease group and 86 person with not detected any stenosis or lesion is classified as a control.

Fasting blood sugar, lipid profiles were determined by enzymatic colorimetric method (Cobas Integra 800 otoanalizör, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya) and nitric oxide levels detected by ELISA (Organo Teknika, Avusturya) in control and CAD group. Genomic DNA was isolated from whole blood in control and CAD groups. eNOS T786C and G894T polymorphisms of eNOS, were determined by real-time PCR (LightCycler480 II, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya) with mutation detection kits.

Nitric oxide level was not significantly different between patients and control group ( $p=0.246$ ). In T786C polymorphism of eNOS, TT, TC and CC genotype frequencies are 42.7%, 41.6 and 15, respectively, in CAD group and 62.8%, 29.1 and 8.1, respectively in the control group. Compared with the TT genotype, those with TC genotype has 2100-fold ( $p = 0.026$ ), and those with the CC genotype has 2.842-fold ( $p=0.040$ ) and C allele has 1,964-fold ( $p=0,005$ ) were determined to have greater risk of developing CAD. eNOS G894T polymorphism, showed no significant difference between CAD group and control group.

In conclusion, the eNOS G894T genotypes were not associated with CAD and the eNOS T786C variants was be evaluated as a risk factor for CAD.

**Key words:** Nitric oxide, eNOS T786C, G894C eNOS, Coronary Artery Disease



## 1.Giriş

Endotel, vazoaktif maddelerin sekresyonunda ve düzenlenmesinde, vasküler düz kasların kontraksiyon ve gevşemesinde, koagülasyonun düzenlenmesinde, lökosit adhezyonunda ve maddelerin transvasküler difüzyonunda bir bariyer olarak görev alan, vasküler düz kas ile damar lümeni arasında uzanan bazal membran üzerinde yerleşmiş tek sıralı yassı epitel hücrelerden oluşan bir dokudur. Endotelin birçok hastalıktaki önemi, endotel kaynaklı bir vazodilatatör faktör olan nitrik oksitin keşfedilmesiyle anlaşılmıştır. Nitrik oksit (NO), vasküler endotelde endotelyal nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-argininden sentezlenen vazoaktif bir maddedir ve vasküler düz kas gevşetici etkisi ile endotel bağımlı vazodilatasyonun ana mediyatörüdür (1).

Nitrik oksit, kalp-damar fiziolojisinin düzenlenmesinde önemli rol oynar ve nitrik oksitin vasküler endotelde ateroskleroz gelişimini önleyici çeşitli etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu etkileri arasında; trombosit ve lökositlerin endotele yapışmasını önler, vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu azaltır; LDL oksidasyonunu kısıtlayarak LDL'nin aterojenik LDL'ye dönüşümünü engeller (2,3).

Nitrik oksit oluşumunu sağlayan nitrik oksit sentaz enziminin (NOS); nNOS (nöronal), iNOS (indüklenebilir) ve eNOS (endotelyal) olmak üzere üç izoformu vardır. Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) hem in vivo hem de in vitro şartlarda sürekli sentez edilen tek NOS izoformudur. eNOS geni 7 no'lu kromozomun terminal bölgesinde yer alır. nNOS geni ise 12. kromozomda bulunur. eNOS geni 26 ekson içerir ve yaklaşık olarak 21 kilobazlık genomik DNA'dan oluşur. eNOS geninin kodladığı mRNA 4052 nükleotid içerir ve haploid genomda tek kopya olarak bulunur (4).

Son yıllarda eNOS enzimini kodlayan gende çeşitli mutasyonlar saptanmıştır. eNOS geninde belirlenen mutasyonlardan biri, nükleotid 786'da timidin ile sitozinin yer değiştirmesi (T786C) sonucu ortaya çıkarken, bir diğeri nükleotid 894'de guanin ile timinin yer değiştirmesi (G894T) şeklinde görülür. Bu mutasyonların bozulmuş NO

salınımına, sonuç olarak da koroner arter hastalığına neden olabileceği bildirilmiştir (5,6).

Koroner arter hastalığı, kalp kaslarına giden kan akışının azalması nedeniyle oluşan miyokard iskemisi ile sonuçlanan bir hastalıktır. İskemi, genellikle ateroskleroz, tromboz, spazm ya da emboli gibi nedenlerle kan kaynağının kalbin bir bölümüne az ulaşması ya da anemi, karboksihemoglobinemi ya da hipotansiyon gibi nedenlerle kan akımının azalmasıyla gelişen ve doku hasarıyla sonuçlanan patolojik bir durumdur. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisindeki büyük gelişmelere rağmen, ateroskleroz bir çok ülkede kadın ve erkeklerde ölüm nedeni olarak başta gelmekte ve aynı derecede önemli olarak yaşamı kısıtlamaktadır. Hayatın erken evrelerinde başlayarak orta yaş ve sonrasında koroner arter hastalığı ile sonuçlanan ateroskleroz birçok nedene bağlı bir hastalıktır (7).

Aterosklerozun gelişiminde sigara kullanımı, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diyabet, yaş, cinsiyet ve genetik yatkınlık gibi geleneksel risk faktörleri vardır. Kişilerin yaşam kalitesinin artırılması açısından koroner arter hastalığına yatkınlığının olup olmadığını erkenden öğrenebilmek ve ona göre önlem alabilmek için koroner arter hastalıklarının genetik alt yapısının belirlenmesi önemlidir. eNOS enziminin kronik inhibisyonunun aterosklerozu hızlandığı ve kan basıncında yükselmeye neden olduğu hayvan deneyleriyle ortaya konmuştur. Vazospastik anginalı hastaların koroner arterlerinde NO aktivitesinin düşük olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, azalmış NO salınımının ateroskleroz gelişimi üzerindeki etkisini desteklemektedir (1,8).

Aterosklerozun gelişmiş ülkelerde en sık görülen hastalıklardan biri olmasına da bağlı olarak son yıllarda özellikle ateroskleroz patogenezinde rol oynayan genetik faktörler üzerine yapılan çalışmalara ilgi artmıştır. NO'nun kalp damar fizyolojisinde önemli bir rol alması nedeni ile bu çalışmada, Mersin bölgesinde NO sentezini sağlayan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) T786C ve G894T gen polimorfizmlerinin koroner arter hastalığı olan hastalarda olası rolünün belirlenmesi, ayrıca kontrol grubu sonuçları değerlendirilerek sağlıklı kişilerde eNOS T786C ve G894T gen polimorfizmlerinin allel sıklığı bulunarak toplumda görülme sıklığının belirlenmesi amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Endotel

Endotel, damarların iç yüzeyini döşeyen tek katlı yassı epitel tabakadır. Endotelin hücre tabakası, vasküler düz kas ile damar lümeni arasında uzanan, bazal membran üzerine yerleşmiştir. Endotel, tüm vasküler sistemi kaplaması nedeniyle vücuttaki en yaygın ve en büyük doku olarak kabul edilir. 19. yüzyılın başında sadece kan ile organlar arasında bir bariyer olduğu düşünülen endotelin, bugün yapılan çalışmalarla, vasküler tonusun kontrolünü sağladığı, hücre çoğalmasında görev aldığı, trombositlerin ve lökositlerin damar duvarı ile etkileşimini düzenlediği, tromboregülatör molekülleri ve büyüme faktörlerini sentezleyebildiği, fiziksel ve kimyasal uyarılara yanıt verebildiği gösterilmiştir (1,9,10).

Erişkin bir insanda, hücre sayısı 1 trilyonu bulan, yaklaşık 1-7 m<sup>2</sup>'lik bir yüzey alanı ve 1800 gram ağırlığına sahip olan endotel, aktivitesi oldukça yüksek olan metabolik bir dokudur. Ayrıca, vazodilatatör ve vazokonstriktör substratların yapımında etkili olarak, vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan endokrin bir organdır (11,12).

Endotelin esas görevi normal kan akışını korumaktır. Endotel normal kan akışını, prostoglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) ve endotel kökenli gevşeme faktörü (EDRF) olan nitrik oksit (NO), endotel kökenli hiperpolarizan faktör (EKHF), C tip natriüretik peptid gibi çeşitli vazoaaktif maddelerin salınımı yoluyla gerçekleştirir. PGI<sub>2</sub> ve NO ana vazodilatatörler olmalarının yanında plateletler üzerinde antiagregan etkiye de sahiptirler. Vazodilatasyonu dengelemek için endotelden endotelin-1, anjiotensin II (AII), tromboksan A<sub>2</sub> gibi vazokonstriktör bileşenler de salınır. Arteriyel homeostaziste vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon arasındaki dengede NO çok önemli roller oynar ve vasküler açıklığın sağlanması ve perfüzyonun devam ettirilmesi esas olarak endotelden NO ve PGI<sub>2</sub> salınımı ile gerçekleşir (13).

Endotelin hasarı durumunda belirgin hale gelen prokoagülan özellikleri de vardır. Fibrin pıhtıların parçalanmasında gerekli olan plazminojen gibi ajanların yanı sıra, von Willebrand faktör gibi prokoagülanları ve hem doku hem de ürokinaz-tipi

plazminojen aktivatörlerini de salgılar (14,15).

Endotel hücreleri yapısal benzerliklerine rağmen, farklı anatomik bölgelerde farklı özellikler gösterirler. Örneğin, kapiller endotel hücrelerinin yüzeyinde platelet kaynaklı büyüme faktörü için reseptörler bulunurken, arteriyel endotelde bulunmaz. Bunun yanı sıra, arteriyel sistemin farklı bölgelerinde de farklı endotel hücreleri yer alabilmektedir. Bu durum, değişik hasarlara oluşan yanıtların farklılığını da açıklar (14,15).

Endotel hücreleri, ortak bir kökenleri olmasına rağmen damar gelişimi esnasında aldıkları farklı sinyallerle spesifik karakteristiklerini kazanırlar. Endotel hücrenin heterojenitesi hem çevresel uyaranlara, hem de gelişim esnasında edinilen epigenetik özelliklere bağlıdır. Son bulgular, arteriyel duvarın çeşitli bölümlerini oluşturan hücrelerin embriyolojik dönem dışında, postnatal yaşamda da, kemik iliğinden kaynaklandığını göstermektedir. Özellikle periferik kan, endotel deskuamasyon alanlarının tamirine yardımcı olan endotel progenitör hücrelerini (EPC) içerir. Ayrıca, kemik iliği kökenli düz kas hücreleri de, hasarlı yada transplante arterlerin intima yada mediasına yerleşebilirler. EPC, CD133, CD34 ve vasküler endotel büyüme faktörü gibi karakteristik belirteçler gibi davranır. İn vitro çalışmalarda, dolaşımdaki EPC sayısının bireysel farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Ateroskleroz için yüksek risk faktörü taşıyan bireylerde, EPC sayısı düşüktür. Aterosklerotik hastalarda, EPC sayısı hastalığın prognozuyla korelasyon gösterebilir. İleri yaş hastalarda EPC sayısının azalmasına bağlı olarak intimal bütünlüğün tamir yeteneği de azalır (15).

Endotelde hasara neden olan faktörler arasında hiperlipidemi, hipertansiyon, diabetes mellitus, sigara, hiperfibrinojenemi, hiperhomosisteinemi, Herpes infeksiyonu ve immun mekanizmalar yer alır. Ateroskleroza ait histolojik özelliklerin saptanmasından önce endotel hücrelerine ait fonksiyon bozuklukları gözlenir. Endotel hücrelerin hasarı sonunda subendotel intimada makrofaj birikimi oluşur. Makrofaj ve endotel hücrelerinden açığa çıkan büyüme faktörleri sonucunda düz kas hücrelerinde aktivasyon veya proliferasyon görülmektedir (16).

Aterosklerozun ilk basamağı endotel hasarıdır. Hasarla birlikte, endotel geçirgenlikte artış, trombosit agregasyonu, lökosit adhezyonu ve sitokin üretimi gözlenir. NO üretimindeki ya da aktivitesindeki azalma, endotel hücrelerinin vazodilatasyon kapasitesinde bozulmaya ve LDL kolesterol oksidasyonuna yol açar.

Bozulma, endoteldeki hasarın en erken bulgularından biri iken, oksidasyon da aterosklerozun en önemli basamağıdır (10,17).

Endotel, vasküler sağlıkta yaşamsal öneme sahip anti-inflamatuar ve antikoagülan özellikleriyle merkezi bir role sahiptir ve bu etkilerinin birçoğu NO aracılı gerçekleşir (10).

### 2.1.1. Endotel Fonksiyonları

Endotel tek katlı basit yapısına rağmen, dolaşımdaki kanın tüm içeriğine karşı bir bariyer olmasının yanında, kan ve diğer dokular ile aktif biyolojik etkileşim içindedir. Fizyolojik ve patolojik uyarılara karşı damar düz kas hücrelerinin tonüsünü ayarlar ve damarı dilate durumda tutmak yönünde işlev görür. Bununla birlikte endotel, damar içindeki kan ve potansiyel trombojenik subendotel dokular arasında pıhtı önler bir tabaka oluşturur. Çizelge 2.1’de endotelden salgılanan aracı moleküller ve işlevleri verilmiş olup bu moleküller; prostasiklin, NO, ekto-ADPaz, heparin benzeri proteoglikan, trombomodulin, doku plazminojen aktivatörü (tPA), ürokinaz, plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1), EKHF, anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE), endotelin, transforme edici büyüme faktörü  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), platelet kökenli büyüme faktörü, endositik reseptörler, hücre yüzeyi glikokaliksi, selektinler, interselüler adezyon molekülü, vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1), monosit kemoatraktan protein (MCP-1) ve interlökin-8 (IL-8)’dir (Çizelge 2.1) (18-20).

**Çizelge 2.1.** Endotelden salgılanan aracı moleküller ve işlevleri (20)

Moleküller	İşlevler
Prostasiklin, NO, Ekto-ADPaz	Antiplatelet
Heparin benzeri proteoglikan, Trombomodulin	Antikoagülan
tPA, Ürokinaz	Profibrinolitik
PAI-1	Antifibrinolitik
Prostasiklin, NO, EKHF, ADE, Endotelin	Vasküler tonusun düzenlenmesi
Heparin benzeri moleküller, NO, TGF $\alpha$ , PDGF	Düz kas hücre büyümesinin kontrolü
Endositik reseptörler, Hücre yüzeyi glikokaliksi	Selektif geçirgen bariyer özelliği
Selektinler, ICAM-1, VCAM-1 MCP-1, IL-8	İnflamasyon ve hücre adezyonu

\*NO; nitrik oksit, tPA; doku plazminojen aktivatörü, PAI-1; plazminojen aktivatör inhibitörü, EKHF; endotel kökenli hiperpolarize edici faktör, ADE; anjiotensin dönüştürücü enzim, TGF $\alpha$ ; transforme edici büyüme faktörü  $\alpha$ , PDGF; platelet kökenli büyüme faktörü, ICAM-1; interselüler adezyon molekülü, VCAM-1; vasküler hücre adezyon molekülü, MCP-1; monosit kemoatraktan protein, IL-8; interlökin-8

Bu genel fonksiyonlara ilaveten endotel, büyüme ve inflamasyonu düzenleme, akciğerlerde gaz değiş tokuşu, kalpte miyokardiyal fonksiyonun kontrolü, karaciğer ve dalakta fagositoz gibi vücudun farklı bölümleri için farklılaşmış, organ spesifik rollere de sahiptir (18-20).

#### **a- Endotelin Seçici Bariyer Özelliği**

Endotel, dolaşım ve damar duvarı arasında selektif geçirgen bir bariyer oluşturur. Sıvı dengesinin sürdürülebilmesi için bu yarı geçirgen bariyer gereklidir. Aynı zamanda, inflamasyon, immun cevap ve yara iyileşmesi için intertisiyel alana antikorlar, hormonlar, sitokinler v.b. moleküllerin geçişi için de bu bariyer önemlidir (21).

Endotel hücreleri arasında, endositoz yoluyla her iki yönde madde geçişine olanak sağlayan, sıkı bağlantılar ve aralıklı bağlantılar olmak üzere iki tip bağlantı vardır. Kapiller endotelde de gözlenen transendotel kanalların arteriyel dokuda makromolekül taşınmasındaki rolü henüz çok açık değildir. Endotel hücrelerinin üzerine oturduğu bazal membran, proteoglikan molekülleriyle karışmış kollajen (tip IV kollajen) içerir. Bu konnektif doku moleküllerinin sentezi endotel hücre tarafından yapılır. Bazal membran kaba bir filtre görevi de görür (14).

#### **b- Endotelin Tromborezistans Özelliği**

Endotel, trombositlerin adezyonuna dirençli ve koagülasyonu aktive etmeyen bir yüzey sağlar. Trombin oluşumunun kontrolü, endotelin antitrombotik ve protrombotik aktivitesinin dengelenmesinde anahtar basamaktır (22). Endotel, hemostaz ve tromboz mekanizmasında çok önemlidir. Trombin üretiminin kontrolü, endotel hücrelerin antikoagülan ve prokoagülan aktiviteyi dengelemesiyle sağlanır. Normal endotel, pıhtılaşmayı önleyici bir yüzey oluştururken, hasarlandığında veya inflamatuvar durumlarda prokoagülan olabilir (23).

Arteriyel sistemde, endotel hücreleri düzgün ve kesintisiz bir yüzey oluştururken, kan elementleri ve arter duvarı arasında ise seçiciliği oldukça yüksek bir bariyer teşkil ederler. Nontrombojenik bir yüzey oluştururlar. Endotelin nontrombojenik

yüzey oluşturmada yüzeyini kaplayan heparan sülfat ve prostaglandin türevlerinin (özellikle prostasiklin) rolü vardır. Bu moleküller, antitrombin III için kofaktör olarak görev yaparak trombinin inaktive ederler (14,15).

Endotel yüzeyi ayrıca trombine bağlanarak protein C ve S'i aktive etme yoluyla anti trombotik etki gösteren trombomodülin (TM) de içerir. Trombomodülin faktör Xa'yı inhibe eder. Oluşan Trombin-TM kompleksi, faktör V ve faktör XIII'u aktive eden enzimleri inhibe eder. TM'e bağlanan trombin hızlıca inaktive edilir. Trombin-TM kompleksi, antikoagülan bir faktör olan protein C'yi aktive eder. Aktive olmuş protein C (APC)'nin aktivitesi ise endotelden de salınan protein S ile artırılır. APC'de faktör V ve VII'i inhibe eder (22).

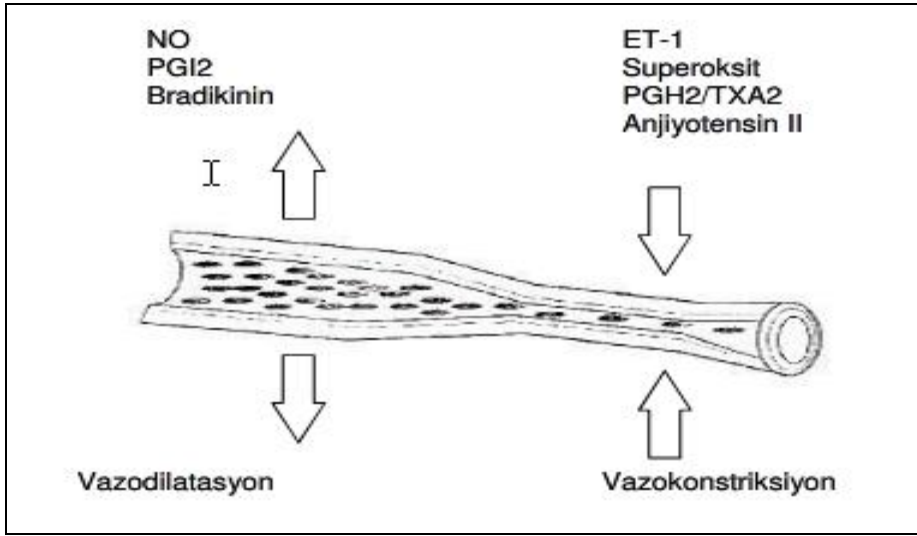
Endotel hücrelerine trombosit adezyonu, prostasiklin ile inhibe edilir. Prostasiklin, araşidonik asit metabolizmasının bir ürünü olarak damar endotel ve düz kas hücreleri tarafından sentez edilir. Prostasiklin, platelet aktivasyonu, sekresyonu, ve agregasyonunu ayrıca monositlerin endotel ile etkileşimini inhibe eder. Aynı zamanda düz kas hücrelerinin gevşemesine neden olur. NO'da benzer şekilde platelet adezyon, aktivasyon ve agregasyonunu inhibe eder. Bir kısım NO ise lümenine geçerek plateletleri etkiler (24).

Ayrıca endotel, trombolitik ajan olan doku plazminojen aktivatörü (tPA) de salgılar. Endotel hücrelerin yüzeyinde yer alan plazminojen ve tPA reseptörleri etkin sınıflandırılmış fibrinolitik aktiviteye sahiptir (25).

### **c- Endotelin Vasküler Tonus Kontrolündeki Rolü**

Endotel, dolaşım ile çevre dokular arasında bariyer olma özelliği göstermesinin yanında fizyolojik durumlarda vasküler hemodinamiyi etkileyen hem relaksasyona hem de kontraksiyona neden olan vazoaaktif mediyatörler salgılar (Şekil 2.1) (18). Başlıca vazodilatör olarak NO salgılayan endotel, bununla birlikte daha az vazodilatör etkisi olan prostasiklin ( $PGI_2$ ) ve endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EKHF) salgılamaktadır. Endotel ayrıca vazokonstriktör anjiotensinojen, vazokonstriktör prostoglandinler, trombosit aktive edici faktör (PAF) salgılar. Robert Furchgott ve arkadaşları tarafından tavşan aortu üzerinde yapılan deneyle asetilkolin ile endotel dokudan NO salınımının gösterilmesinin ardından, bradikinin, serotonin, adenozin

difosfat (ADP), adenozin trifosfat (ATP), vasopresin, endotelin, substans-P, trombin gibi birçok farmakolojik ajanın endotel dokudan NO, EKHF, PGI2 salgılatığı gösterilmiştir. Bu ajanlar aynı zamanda damar düz kasları üzerinde de reseptörlere sahiptirler. Düz kaslar üzerindeki bu reseptörlerin söz konusu ajanlarla uyarılması damarda kasılmaya yol açar (26,27).



Şekil 2.1. Endotelyumdan salınan vazoaktif mediyatörler (18).

\*NO; Nitrik oksit, PGI2;Prostasiklin, ET-1;Endotelin-1, PGH2;Prostaglandin H2, TXA2;Tromboksan A2

### Endotelden Salınan Vazodilatör Mediyatörler

**Nitrik Oksit;** Endotelden salgılanan en önemli vazodilatör mediyatördür. Endotel disfonksiyonda ilk görülen, NO aracılığı ile olan endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulmasıdır. NO üretimi veya aktivitesindeki bozukluk endotel disfonksiyonun ana mekanizması olduğu ve ateroskleroza tetiklediği öne sürülmektedir (28).

**Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör;** Endotel kaynaklı hiperpolarizan factor (EKHF), NO ve PGI2 dışında endotel kaynaklı vazodilatör olarak tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalarda nitrik oksit sentaz (NOS) ve siklooksijenaz inhibitörleri ile engellenemeyen vazodilatatör yanıtın bradikinin, substant P ve shear stres'e karşı da elde edildiği gösterilmiştir (29). Bu vazodilatör yanıtın potasyum kanallarının bloke



edilmesi ile ortadan kalktığı gösterilmiştir. Vazodilatasyon, düz kaslardaki K<sup>+</sup> kanallarının açılması ile hücre dışına K<sup>+</sup> çıkması sonucu hücrenin hiperpolarize olması ve bunun sonucunda da voltaj bağımlı Ca<sup>+2</sup> kanallarının kapanması ile hücre içine Ca<sup>+2</sup> akışının durmasından kaynaklanır (30,31). İnsan koroner arterlerinde bradikinin ile oluşan vazodilatör yanıtta sorumlu olan EKHF'nin, NO'nun tersine küçük damarlar (rezistan arterler) üzerine olan etkisi, büyük damarlardan fazladır. NO, EKHF üretimini inhibe eder. İleri yaş ve uzun süreli hiperkolesterolemi, periferik arteriyollerde NO gibi EKHF'nin de azalmasına neden olur (32).

Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörün hangi molekül veya moleküllerden oluştuğu tam olarak açıklanamamakla birlikte farklı damar yatakları üzerinde farklı etkiler göstermesi birden çok EKHF molekülü olabileceğini akla getirmiştir (33). Bu moleküllerden bir tanesi araşidonik asit metabolitlerinden olan Epoksieikosatrienoik asittir (EET). Hayvan koroner arterlerinde yapılan deneylerde, asetilkolin, bradikinin ve araşidonik asitin endotelden EET salarak vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir (31). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin endoteli soyulmuş damarda hiperpolarizasyon ve vazodilatasyon yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca araşidonik asit sentezinde fonksiyonu olan "anandamit" molekülünün ve potasyum iyonunun EKHF aktivesi saptanmıştır (34).

**Prostasiklin;** Prostasiklin (PGI<sub>2</sub>), endotel kaynaklı güçlü bir vazodilatördür. İskelet kasında kan akımı ve metabolik vazodilatasyonu düzenlemede büyük önemi vardır. Araşidonik asitten sentezlenen PGI<sub>2</sub>, trombositlerin agregasyonunu ve endotel yüzeyine tutunmalarını engeller (35). Siklooksijenaz enzim aktivasyonu ile endotelden kaynaklanan prostasiklinin koroner damarlar üzerine etkisi açık değildir. Siklooksijenaz inhibitörü indometazinin koroner kan akımını azalttığı fakat bu etkinin sentezinin engellenmesine bağlı olmadığı bildirilmiştir (36).

Prostasiklin salınımını uyarıcı faktörler pulsatil basınç, bradikinin, trombin, serotonin ve trombosit kökenli büyüme faktörüdür. Fizyolojik şartlarda prostasiklin üretimi düşük düzeyde olmasına rağmen ateroskleroz varlığında üretimi artmaktadır. Koroner ateroskleroz yada risk faktörü olan hastalarda prostasiklinin, istirahat epikardiyal ve rezistans arterlerin tonusunda, akıma bağlı dilatasyon ve metabolik vazodilatasyonda önemli rol oynadığı ortaya konmuştur (37-39). Bu nedenle prostasikline bağlı koroner vazodilatasyon, NO eksikliği olan ortamda önemli bir

kompanstatuar mekanizma olarak rol oynar (39).

**Adenozin;** Adenin nükleozit (adenozin) ve nükleotidler (ATP ve ADP), akım artışı veya trombüs gibi uyanlarla endotelden salgılanırlar. Pürinoseptörler P1 ve P2 olmak üzere iki kategoriye ayrılır ve adenozin gibi nükleozitler ile aktive olan pürinoseptörler P1 tipi, ATP gibi nükleotidler gibi aktive olan pürinoseptörler ise P2 tipi olarak adlandırılır. Adenozinin düz kaslardaki reseptörü P1'e bağlanmasıyla cAMP üretimi olur ve bunun sonucunda vazodilatasyon oluşur. Adenozinin hem endotel hücresinde hemde düz kas hücresindeki reseptörü P2'dir. Endoteldeki P2 reseptörü uyarıldığında EDRF/ PGI<sub>2</sub> üretimi gerçekleşir ve vazodilatasyon olur. Düz kastaki P2 reseptörünün uyarılması ise vazokonstriksiyon ile sonuçlanır. Endotel dokunun ATP ve ADP'yi adenozine çeviren ve böylece lokal konsantrasyonu kontrol eden, ekstrasellüler ektonüleotidaz enzim sistemi vardır. Bu fonksiyon sayesinde, trombüslerden salgılanan ADP'nin adenozine çevrilerek etkisi engellenmiş olur. Adenozin, ATP ve ADP'ye damarın vereceği vasküler cevabı, bu moleküllerin miktarı ve fonksiyonel endotelin varlığı belirler. Miyokardiyal oksijen arz-talep arası dengesizlik ve koroner kan akımı artışına bağlı olarak adenozin üretiminde artış meydana gelir (40).

### **Endotelden Salınan Vazokonstrüktör Mediyatörler**

**Endotelin:** Endotelin (ET), endotelden salınan en iyi tanımlanmış vazokonstrüktördür. Endotelinin üç izoformu arasında (ET-1, ET-2 ve ET-3) endotelden sadece endotelin-1 (ET-1) salınır. ET-1, preproendotelin olarak bilinen öncü bir molekülden sentezlenir ve daha sonra büyük endoteline dönüşür. Son olarak da endotelin dönüştürücü enzim vasıtasıyla aktif ET-1'e dönüşür. ET için ET-A ve ET-B olmak üzere iki reseptör tanımlanmıştır. ET-A reseptörleri daha çok damar düz kaslarında bulunur. Düz kas proliferasyonu ve vazokonstriksiyonu sağlar. ET-B reseptörleri ise endotel hücrelerinde bulunur ve endotele bağlı vazodilatasyonundan sorumludur (41,42). ET-1'in endoteldeki ET-B reseptörüne bağlanması endotelden NO salınımına ve vazodilatasyona yol açar. Hiperkolesterolemi gibi patolojik durumlarda ET-B'nin uyarılmasının toplam etkisi vazokonstriksiyondur (43,44).

Vazodilatör uyanlara cevap olarak hızla salınıp saniyeler içinde inaktive olan

NO'nun tersine, ET-1 bağımlı konstrüksiyon yavaş başlangıçlıdır ve uzun süre devam eder. ET-1 vazokonstriktör etkisine ilaveten düz kas hücre çoğalmasını uyarır, vasküler yeniden yapılanma ve lökosit adhezyonuna katkıda bulunur. Böylece inflamasyon ve aterogeneizde önemli rol oynar (10,22,40).

**Anjiyotensin II:** Anjiyotensin II, damar düz kasında pek çok hücrel ve hücreler arası olayları etkileyerek vazokonstriksiyona ve arter duvarında yapısal değişliklere neden olmaktadır. Endotel hücrelerinde iki tip anjiyotensin II reseptörü saptanmıştır. Anjiyotensin II'nin tip-1 reseptörü özellikle damar düz kas hücrelerinin kontraksiyonunda rol oynamaktadır. Anjiyotensin II reseptör blokerleri endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aracılığıyla NO ve prostoglandinlerin salınımını arttırmaktadırlar. Anjiyotensin II tip-II reseptörleri ve anjiyotensin I'in metaboliti olan anjiyotensinin ise endotelde gevşemeyi sağlamaktadır (45,46)

#### **d- Endotelin Kan Hücreleri İle Etkileşimi**

Normal arteriyel endotel doku, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasına karşı dirençlidir. İnflamasyonun olduğu dokuda ekstravasküler alana lökosit geçişi arterlerden değil postkapiller venüllerden olur (47). Fakat aterosklerotik diyet ile beslenmenin hemen ertesinde, arteriyel endotel hücreleri lökositleri bağlamak için özel adezyon molekülleri sentezler. Endotel dokunun sentezlediği bu adezyon molekülleri immunglobulin ailesi üyeleri ( VCAM ve ICAM ) ve E-selektindir (48). Endotel hücreleri kendi sentezlediği E-selektin dışında trombosit tarafından sentezlenen P-selektini de kendi hücre zarlarına alırlar (22). Ayrıca endotel hücre zarlarında lökositlerdeki L-selektine bağlanan moleküller vardır. Endotel ve lökosit hücre zarında gerçekleşen reseptör ligand hücre ilişkisi Çizelge 2.2.'de özetlenmiştir (49).

**Çizelge 2.2.** Endotel ve lökosit kaynaklı adezyon molekülleri, ligandları ve bu reseptör ligand ilişkisini kullanan lökosit türleri (49)

Adezyon molekülü (reseptör)		Sentezleyen Hücre	Bağlanan molekül( ligand)	Bağlanan hücre
İmmunglobulin ailesi	VCAM-1	Endotel	VLA-4	Monosit, Lenfosit.
	ICAM1,2	Endotel	CD11a (FLA-1) CD11b (Mac-1)	Bir çok lökosit türü
Selektinler	E-Selektin (ELAM-1)	Endotel	Sialyn-Lewis X	Granulosit> Monosit> T hücresi.
	P-Selektin (GMP-140)	Trombosit	PSGL-1	Monosit =Lenfosit=Granulosit.
	L-Selektin	Lökosit	PSGL-1	Endotel

\*VCAM : Vasküler hücre adezyon molekülü ICAM : İnterselüler adezyon molekülü VLA : Çok geç dönem antijen PSGL : P-Selektin glikoprotein ligand

Bir lökositin transmigrasyonu altı aşamada gerçekleşir (22,47):

- 1- Endotel hücrenin aktivasyonu: Endotel hücre zarında E-selektin ve P-selektin düzeyi artar.
- 2- Lökositin endotele geri dönüşümlü yapışması: Selektin- reseptör etkileşimi sonucu gerçekleşir.
- 3- Lökositin endotel üzerinde yuvarlanması: Selektin-reseptör etkileşimi ile gerçekleşir.
- 4- Lökositin aktivasyonu: Kemokinlerle aktive olan lenfosit yüzeyinde VCAM-1 ile bağlanan ligandların miktarı artar.
- 5- Lökosit, endotel bağlantısının güçlendirilmesi: Lökositlerdeki ligandların, VCAM ve ICAM ile etkileşmesi ile gerçekleşir.
- 6-Lökositin iki endotel hücresi arasından dokuya geçmesi: PECAM-1 (platelet endotelial hücre adezyon molekülü) ve diğer birçok molekül görev alır.

Herhangi bir inflamatuvar uyarı olmadığında, nötrofiller serbestçe dolaşır ve endotel ile etkileşmeye girmezler. Buna karşılık monosit ve lenfositlerin damar duvarının iki tarafına doğru düşük seviyede trafiği vardır. Kan akımından göç eden monositler, doku ve organa özgü fonksiyonları olan makrofajları oluştururlar. Doku bağışıklığının sürdürülebilmesi için lenfositler, kan ve lenfatikler arasında dolaşırlar. Konakçı korunması ve tamiri için kritik öneme sahip olmakla birlikte bazı koşullarda lökosit endotel hücresi etkileşimi damar ve doku hasarına neden olur. Sıkı olarak endotele bağlanmış ve aktive olmuş lökositler geçirgenliği değiştiren araçlar salgırlar

veya endotel hasarına neden olarak trombozise neden olabilecek toksik ürünler üretirler. Benzer şekilde göç etmiş lökositler de komşu dokularda hasara neden olabilirler (50).

### **2.1.2. Endotel Disfonksiyonu**

Endotel disfonksiyonu, aterosklerozun yapısal değişikliklerinden önce oluşur ve gelecekteki kardiovasküler olayları öngörmeye yardım eden bağımsız bir faktördür. Endotel yaralanma, fiziksel travma ya da hafif hücrel zedelenme olarak tanımlanan endotel disfonksiyon, aynı zamanda NO üretiminde bozulma, ET-1, angiotensin ve oksidanlar gibi gevşeme ve kasılma faktörlerin arasındaki dengesizliği ifade eder (7). Çeşitli mekanizmaların içinde en belirgin olanı NO azalmasıdır. Bu durumun nedeni NO'nun biyolojik aktivitesinde azalma veya endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin aktivitesinin azalmasıdır (51).

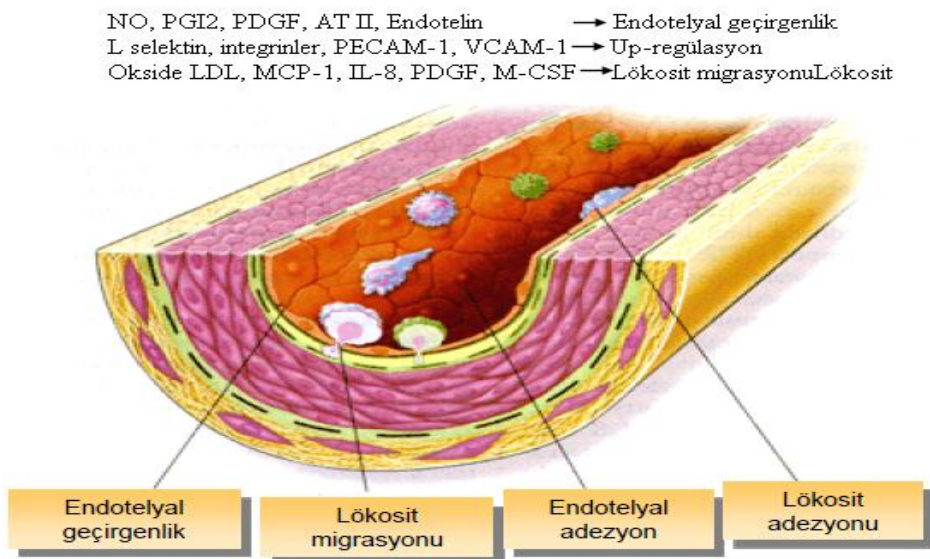
Endotelial nitrik oksit sentaz aktivitesinin azalmasının nedenlerinden biri peroksinitrit artışıdır. NO ile serbest oksijen radikallerinin (SOR) reaksiyona girmesiyle oluşan ve sitotoksik oksidan olan peroksinitrit, endotel disfonksiyonuna yol açar. Bu etkisini proteinlerin nitrasyonu yoluyla hücrel proteinlerin fonksiyonunu bozarak gösterir. Aynı zamanda, LDL'nin oksidasyonuna yol açarak proatrogenik rol oynar. Peroksinitrit, eNOS'un kofaktörü olan tetrahidrobiopterin ile etkileşerek enzimin aktivitesini azaltır. Oksidatif stres artışı eNOS enziminin redüktaz fonksiyonunu aktif hale getirir ve daha fazla SOR oluşumuna neden olur. Bu da damar duvarında proinflamatuvar olayları başlatır ve SOR, adezyon moleküllerini (VCAM-1 ve ICAM-1) ve kemotaktik molekülleri (makrofaj kemotaktik peptid; MCP-1) artırır. İnflamasyonun başlaması NO'nun aktivitesini azaltır. C reaktif proteinin de eNOS aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (51).

Nitrik oksit azalmasına yol açan başka bir mekanizma ise eNOS enziminin endojen kompetitif inhibitörü olan asimetrik dimetil arjinin (ADMA) düzeylerindeki artıştır. ADMA, protein katabolizması sırasında ortaya çıkan bir üründür, böbrekler yoluyla atılır veya sitrülline metabolize edilir. Hiperkolesterolemik bireylerde ADMA düzeylerindeki artış ile endotele bağımlı vazodilatasyon arasında negatif korelasyon bulunmuş, eNOS enziminin substratı ve ADMA'nın kompetitif inhibitörü olan L-arjinin infüzyonunun endotel fonksiyonlarını düzelttiği gösterilmiştir (51).

Vazoaktif maddelerin dengesinin bozulması trombojenik ve aterojenik bir ortam oluşturmaktadır. Endotel disfonksiyonun önemli bir sonucu inflamasyona eğilimin artmasıdır (52).

Normal endotel fonksiyon bozukluğu kendini aşağıdaki durumlarla gösterir;

- a) Endotele bağımlı vazodilasyon bozulur (53).
  - b) Nitrik oksit yapımı ve salgılanması azalır ve sonucunda trombosit agregasyonu kolaylaşır (54).
  - c) Endotelin düzeyi artar ve vazokonstrüksiyon gelişir (55).
  - d) Endotel hücrelerinde, yıkımın azalması nedeni ile ADMA düzeyi artar ve bu da NO sentezini inhibe eder (56).
  - e) Yüksek kolesterol düzeyi, endotelden serbest oksijen radikallerin salgılanmasına neden olur ki bunlar da NO'ya bağlanarak aktivitesini bozar (57).
  - f) Hücre yüzeyinde VCAM-1, ICAM-1 ve platelet/endotel hücre adezyon molekülü (PECAM-1) gibi adezyon moleküllerinin düzeyi artar ve endotel disfonksiyonunun olduğu bölgelerde lökositlerin tutunmasını kolaylaştırır (58).
  - g) PGI<sub>2</sub> üretiminin azalması, endotel hücresine bağlı protein kinaz C etkinleşmesinde azalma ile tromboplastin üretiminin ve platelet aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) salgılanmasının artışına ve trombüs oluşumuna eğilimin artması ile sonuçlanır (58).
- Endotel disfonksiyon oluşumu şekil 2.2. de gösterilmiştir (59).



Şekil 2.2. Endotel disfonksiyonu (59)

Koroner arter hastalığında endotel disfonksiyonunun kötü prognoz göstergesi olduğu da bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda endotel fonksiyonlarındaki bozulmaların aterosklerozun, akabinde aterosklerotik plakların ve en sonunda aterosklerotik plak komplikasyonlarının gelişmesinde ana element olduğu anlaşılmıştır (16,60). Bunlara ek olarak, sigara içenlerde, yaşlı kişilerde, menopozdaki kadınlarda, hipertansiyon ve hiperhomosistinemisi bulunan olgularda da endotel fonksiyon bozukluğu saptanmıştır (61,62).

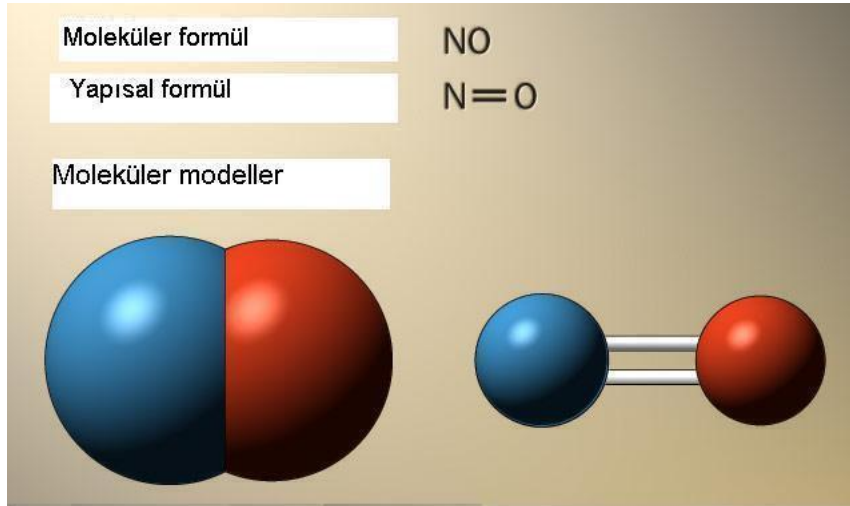
## **2.2. Nitrik Oksit**

### **2.2.1.Tarihçe**

Nitrik oksit (NO), ortam havasında belli bir oranda yer alan atmosferik bir gazdır. NO sigara dumanı, egzoz gazı ve kirli havada daha yoğun olarak bulunmaktadır. İlk olarak 1980 yılında Furchgott ve Zawadski tarafından tavşan aort halkasında sağlam bir endotel varlığında asetilkoline gevşeme şeklinde yanıt verilmesiyle fark edilmiştir. Asetilkolinle oluşan bu gevşeme, arteriyel endotel uzaklaştırıldığında veya harap edildiğinde görülmemiştir (26). Bundan dolayı bu faktör endotel kaynaklı gevşeme faktör (EDRF) olarak adlandırılmış, ardından EDRF ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır. Başlangıçta EDRF, araşidonik asidin lipooksijenaz kolundaki bir ara ürün olarak değerlendirilmiştir. 1987 yılında, Ignarro ve ark (63) ve Moncada ve ark (64) iki ayrı çalışma ile, EDRF'yi damar endotelinden izole etmişler ve bu yapının dominant kısmının NO olduğunu tespit etmişlerdir. 1988 de Palmer ve arkadaşlarının EDRF ile ilgili yaptıkları araştırmada, bu molekülün yarı ömrünün çok kısa olduğu, aktivitesinin saniyeler içinde oluşup, bir başka forma dönüşerek sona erdiğini de göstermişlerdir (64). Yine araştırmalar sırasında, önemli bir EDRF olan ve biyolojik ve kimyasal özellikleri benzeyen NO'nun L-argininden sentezlendiği keşfedilmiş ve NO sentezi reaksiyonunu gerçekleştiren enzime ise nitrik oksit sentaz adı verilmiştir (64,65). İlerleyen yıllarda NO'ya olan ilgi artmış, buna paralel olarak NO ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır ve NO'nun fizyolojik ve patolojik olaylardaki rollerinin boyutları genişlemiş ve 1992'de ise yılın molekülü seçilmiştir. NO'in kardiyovasküler fizyolojideki rolünü ortaya çıkaran çalışmaları nedeniyle 1998'de Furchgott, Ignarro ve Murad Nobel ödülünü kazanmışlardır (66).

## 2.2.2.Nitrik Oksitin Yapısı ve Genel Özellikleri

Nitrik oksit (NO), molekül ağırlığı 30.006 gr/mol olup renksiz ve son derece toksik bir gazdır. IUPAC adı:Nitrik oksit, sistematik adı: Oksidonitrojen, diğer isimleri: Nitrojen monoksit, Nitrojen (II) oksit'dir. Şekil 2.3'de şematik görünümü verilen NO, serbest radikal yapısındadır ve yarı ömrü çok kısa olup 20-30 saniyedir. NO lipofilik özellikte olup, yüksek konsantrasyonlardaki NO oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda erime özelliği gösterir. Düşük konsantrasyonlarda ise, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilir. Havadaki NO, kısa sürede oksijenle oksitlenerek nitrojen dioksit dönüşür. Nitrojen dioksit dokular için oldukça zararlı bir bileşiktir. Düşük konsantrasyonlarda iken NO toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevlerin gerçekleşmesinde rol alır. NO'nun, üzerinde yük taşımaması ve eşlenmemiş elektron bulundurması onu önemli bir mesajcı yapar. Yani yüksüz olduğu için hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçer ve eşlenmemiş bir elektrona sahip olması nedeni ile hızlı reaksiyona girer. Radikal bir molekül olarak isimlendirilmesine rağmen, diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır (67-69).



Şekil 2.3. Nitrik oksit şematik görünümü (69).

Nitrik oksit bir elektron kaybederek nitrozonyum kationuna (NO<sup>+</sup>), bir elektron



olarak nitroksil anyonuna (NO-) dönüşebilir (70).

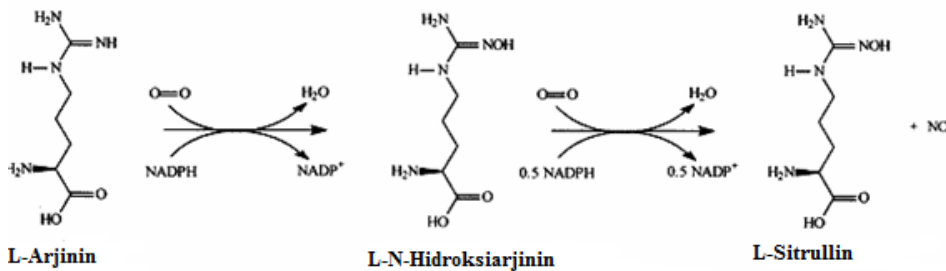
Nitrik oksit ve tekrar NO'ya dönüşebilen nitrojen oksitleri (NO<sub>2</sub>•, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> vb), güçlü nitroze edici ajanlardır ve primer ile sekonder aminleri nitrozleyerek, nitrozaminleri oluştururlar. R<sub>2</sub>-NH + NO<sub>x</sub> → R<sub>2</sub>N-N=O -----> Nitrozamini simgeler ve potansiyel bir karsinojeniktir. Çünkü bu bileşikler DNA'da, nitrozilasyon, deaminasyon yapabilir ve alkil nükleofillerin oluşumuna neden olabilirler. Bu şekilde oluşan mutasyonlar onkojenleri aktifleyerek malign transformasyonlara neden olabilir (71).

Düşük konsantrasyondaki NO'nun hemoglobine bağlanma affinitesi oksijene göre oldukça yüksektir. Hemoglobin oksijen formunda ise NO'yu önce nitrit (NO<sub>2</sub>)'e ardından nitrat (NO<sub>3</sub>)'a oksitler. Görüldüğü gibi dolaşımdaki oksihemoglobin NO için kuvvetli bir oksidan olup onun etkilerini engelleyen bir inhibitördür (72,73).

### 2.2.3. Nitrik Oksit Sentezi

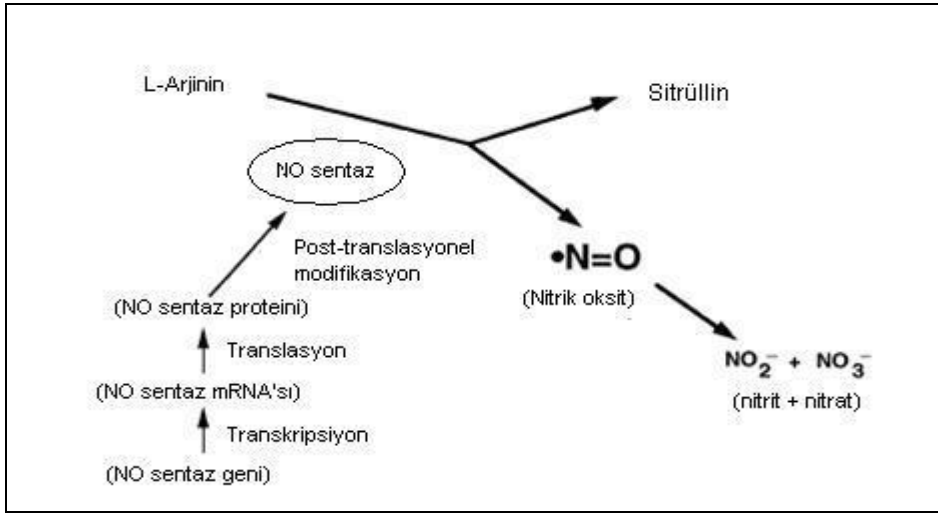
Nitrik oksit (NO), pek çok hücrede nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından katalizlenen reaksiyon ile sentezlenmekte ve L-arginin ile oksijen molekülleri, NO ve sitrüllin moleküllerine dönüştürülmektedir. NO sentez reaksiyonu sırasında moleküler O<sub>2</sub>'nin yanı sıra kofaktör olarak flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) ve hem kullanılır. Bu kofaktörler arasında elektron transferleri gerçekleşmektedir. (49,66,67,74,75).

Nitrik oksit sentezinin iki basamağı vardır: Birinci basamak, L-argininin NG-hidroksi-L-arginine hidroksilasyonudur. İkinci basamak ise, NG-hidroksi-L-argininin, L-sitrüllin ve NO'ya oksidasyonudur (Şekil.2.4) (75).



Şekil 2.4. Nitrik oksitin sentezi (75)

Reaksiyon sonunda, oksijen molekülünden bir atomunun argininin terminal guanidin nitrojeni ile birleşmesiyle NO oluşmaktadır ( $O + \text{Guanidin} = \text{NO}$ ). Yarılanma ömrü kısa olduğundan NO,  $\text{NO}_2$  ve  $\text{NO}_3$ 'e okside olur (75). NOS ekspresyonu ve aktivitesi transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel mekanizmalarla düzenlenir (Şekil 2.5) (75).



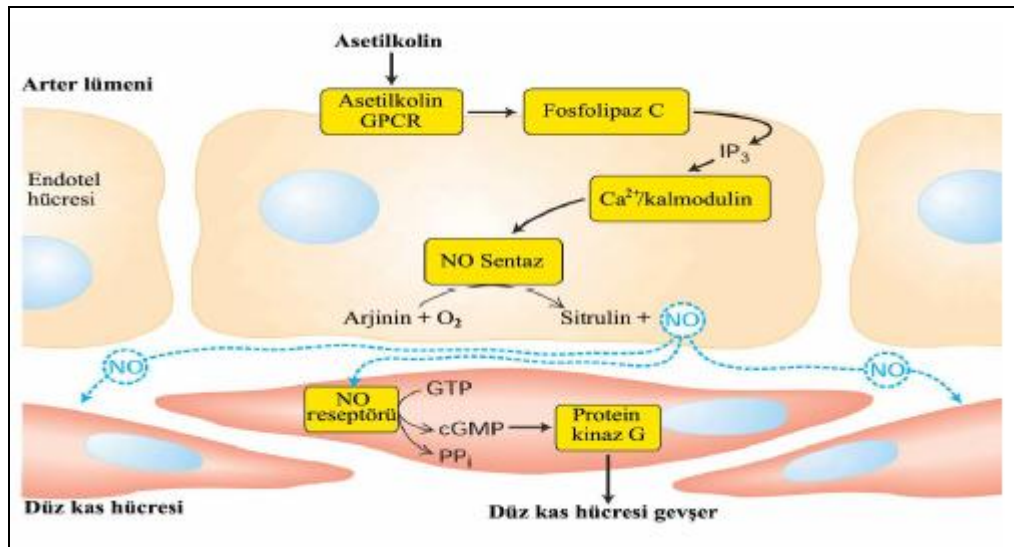
Şekil 2.5. Nitrik oksit sentaz ekspresyonunun düzenlenme mekanizması (75)

Nitrik oksit salınımı, damarlarda başlıca shear stres ile tetiklenir. Bu, kalbin her sistolde kanı damarlara göndermesi sonucu damar endoteli yüzeyinde oluşturduğu mekanik etki olarak ifade edilir. Bu etki ile endotel hücreleri şekil değişikliğine uğrarken hücre iskeleti aracılığıyla hücre içine sinyaller gönderir. Bunun sonucunda Protein kinaz B aktive olur ve eNOS'u fosforile ederek aktive olmasını sağlar. Endotel hücrelerin shear strese maruz kalması sürekli NO salınımı ile sonuçlanır (76-78). Diğer taraftan hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  düzeylerini arttıran asetilkolin, histamin, trombin, serotonin, ADP, bradikinin, norepinefrin, substant P gibi çeşitli bileşikler de, vasküler endotelden kalsiyuma bağımlı bir enzim olan eNOS enzimini aktive ederek, NO sentez ve salınımını arttırabilmektedirler. NO, nitrejik nöronlarda, epitel hücrelerde ve çizgili kaslarda kalsiyuma bağımlı bir enzim olan nöronal NOS (nNOS) aracılığı ile de üretilir ve salınır. Ayrıca NO,  $\text{Ca}^{+2}$  dan bağımsız olarak immün sistem hücreleri tarafından üretilir ve bu hücrelerin selektif olmayan sitotoksik etkilerine aracılık eder. Fizyolojik

önemi henüz bilinmemekle birlikte NO, non-enzimatik olarak ultraviyole ışığı etkisiyle hücre içi depolarından da salınır (78,79).

#### 2.2.4. Nitrik Oksit Etki Mekanizması ve Fonksiyonları

Nitrik oksit (NO), bir haberci veya düzenleyici molekül olarak ve konak savunmasında yararlıken, potansiyel olarak toksik bir moleküldür. NO, farklı konsantrasyonlarda değişik etkilere sahiptir. Şekil 2.6'da etki mekanizması verilen NO'nun konsantrasyonu ve etkileri, aynı zamanda ortamda NO ile etkileşen diğer maddelerin varlığına da bağlıdır. Asetilkolin, endotel hücre yüzeyinde bulunan G proteine bağlı reseptöre bağlanır. G proteininde oluşan konformasyonel değişiklikle fosfolipaz-C aktive olur. Aktifleşen fosfolipaz-C, fosfatidil inositol bifosfat'ı (PIP<sub>2</sub>) fosfatidil inositol 1,4,5- trifosfat (IP<sub>3</sub>) ve 1,2-diaçil gliserol'e (DAG) dönüştürür. Sitoplazmada IP<sub>3</sub> seviyesinin artışı endoplazmik retikulumda depolanan Ca<sup>+2</sup>'un sitoplazmaya geçişini tetikler. Sitozolde oluşan Ca<sup>+2</sup>/ kalmodulin kompleksinin NOS enzimini aktive etmesi sonucu L-Arginin ve O<sub>2</sub>'den, sitrulin ve NO sentezlenir (80).



Şekil 2.6. Nitrik oksit etki mekanizması (80)

Hücrelerarası iletişimi sağlayan moleküller (hormonlar, nörotransmitterler, büyüme faktörleri vb.) bu etkilerini daha çok plazma membranındaki spesifik

proteinlere bağlanıp, hücre içi cAMP miktarını artırarak gerçekleştirirler. Buna karşın kan akımının damar üzerinde oluşturduğu basınç, asetilkolin ve bradikinin gibi uyarılarla sentezlenen NO ise üretildiği hücreden dışarı çıkarak sitozolik cGMP düzeyini artırır veya direk hedef hücrelerine yönelir. Sonuçta hedef molekülüne bağlanarak direkt olarak veya enzim aktivitesini değiştirerek amaçlanan etkiyi oluşturur. Buna eNOS'un vazodilatasyon, nNOS'un sinaptik transmisyon ve makrofaj iNOS'un savunmayla ilgili etkileri örnek olarak verilebilir (72,81,82).

Nitrik oksitin karakterize edilmiş en önemli hedef molekülleri; demir, kükürt ve oksijen türevi yapılarıdır (72,81,82). Makrofajlardaki NO, tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak antimikrobiyal ve antitümöral sitotoksik etki gösterir. Aynı mekanizmayla mitokondriyal elektron transport zinciri enzimlerinin aktivitesini de azaltır (71). Ayrıca NO, tümör hücresinde, hız kısıtlayıcı enzim olan ribonükleotid redüktazı inhibe ederek DNA sentezini engeller ve hücre DNA'sının deaminasyonu ile bu hücrelerde sitostatik etki meydana getirir. Bu durum kanser tedavisinde kullanılmaktadır (83). NO ferritinle reaksiyona girerek serbest demir salınımına yol açar ve bu serbest demir ise lipid peroksidasyonunu başlatır (84). NO'nun bir diğer hedefi sülfhidril (-S-H) grubudur. -S-H ile reaksiyona girerek S- nitrozilasyon yapar ve plazminojen aktivatörü gibi bazı enzimlerin katalitik fonksiyonlarını artırır. NO'nun önemli bir diğer hedefi de bir oksijen radikali olan süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ) molekülüdür. Bu ikisinin ( $NO^{\bullet}$  ve  $O_2^{\bullet-}$ ) tepkimesiyle oluşan peroksinitrit ( $ONOO^-$ )-den, nitrojen dioksit ( $NO_2^-$ ) ile hidroksil ( $OH^{\bullet}$ ) radikali oluşur. Yine NO'nun lipidler üzerine olan direkt etkisiyle lipid peroksidasyonu başlatılır ve çeşitli peroksitler üretilir (71).

Nitrik oksitin immün sistemde, sinir sisteminde, kardiyovasküler sistemde önemli görevleri vardır. Bunlar; endotel kaynaklı vazokonstriktörlerin etkilerine karşı koymak, trombosit adhezyon ve agregasyonunu, lökosit adhezyon ve infiltrasyonunu ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu engellemek ve LDL oksidatif modifikasyonunu önlemek olarak özetlenebilir (85). Ateroskleroz oluşumunun ana mekanizmalarından biri LDL'nin oksidasyonu olarak kabul edilmektedir. Ayrıca oksidatif stress, okside LDL dışındaki başka yollar aracılığı ile de NO sentezini azaltır (86). Vazokonstriksiyon, trombosit agregasyonu ve aktivasyonunda artma, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu, lökosit adhezyonu, oksidatif stresde

artma ve okside LDL, Kaveolin-1'in sentezini arttırarak eNOS'u inaktive eder ve NO üretimini azaltır. NO üretimindeki azalma ateroskleroz gelişimine veya komplike olmasına yol açan olayların artması ile sonuçlanır (29).

Nitrik oksit, antiagregan etkisiyle trombositlerin endotel yüzeyinde kümeleşmesini engelleyerek ve antiinflamatuvar etkisiyle de, aterosklerozu her evrede engelleyerek endotelin koruyucu işlevinde önemli roller üstlenmektedir. NO adhezyon moleküllerinin endotel yüzeyinde belirmesini, lipitlerin endoteli geçişini ve düz kas hücrelerinin proliferasyonunu önler (10,87). Yapılan çalışmalarda aterosklerozu kolaylaştırdığı bilinen hipertansiyon, diyabetes mellitus, sigara ve superoksit düzeyi artışı gibi durumlarda, endotelden NO yapımının azaldığı ya da yıkımının arttığı gösterilmiştir (88).

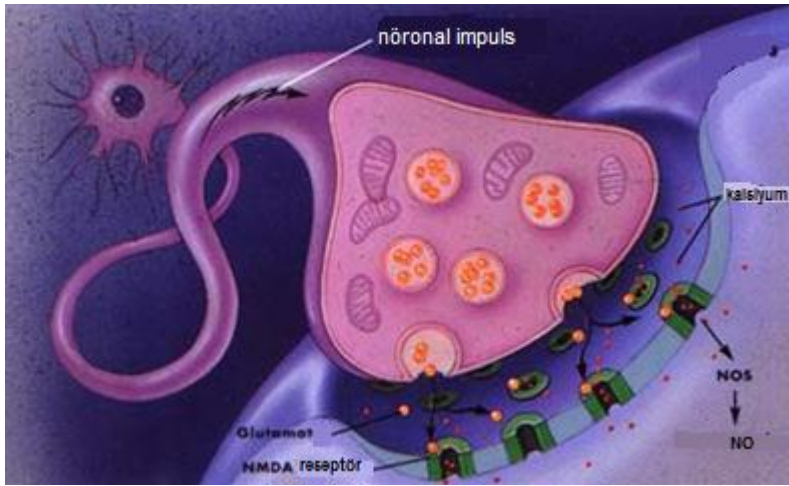
#### **a. İmmün sistemde nitrik oksit**

Makrofaj kaynaklı NO sentezinin uzun süreli ve çok miktarda üretilmesi sonucunda aşırı biriken NO, makrofaj ve diğer hücrelerde hasar meydana getirir. Ancak NO, bakteri, parazit gibi birçok patojenin ve tümör hücrelerinin ATP üreten oksidatif fosforilasyonunu (ubikinon redüktaz), glikolizi (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz), TCA siklusunun Fe içeren bazı enzimlerini (cis-akonitaz) inhibe etmekte ve sonuçta bakteri, parazit, tümör hücrelerini öldürmektedir. Antikor veya sitotoksik T lenfositler, spesifik patojenleri veya infekte hücreleri ilk tanıyan ve onları tahrip edici ajanlar olarak görev almaktadırlar. Buna bağlı olarak NO fonksiyonlarının geniş bir hücre spektrumunda nonspesifik etkiler gösterdiği ve lenfositlerin kompleks ve spesifik etkileşimleri öncesinde görev alan birincil immün sistem olduğu belirtilmektedir (49,66). NO'nun otoimmün hastalıklarda, normal hücrelerin yapısını bozduğu da belirtilmektedir. Ayrıca NO'in bazı virüslerde viral replikasyonu inhibe ederek antiviral etki oluşturduğu bildirilmiştir. (66,74).

#### **b. Sinir sisteminde nitrik oksit**

Nitrik oksit sentaz, insan ve hayvanların beyin dokusunda değişen oranlarda yaygın olarak bulunur. NO özellikle serebellar nöronlarda bulunur. Bu sebeple koordinasyon ve denge sağlanmasında görev aldığı belirtilmektedir (66). NO,

nöronlardaki presinaptik terminallerden salgılanan glutamat ile sıkı ilişkisi vardır. Salgılanan NO komşu nöronlara diffüze olmakta ve daha sonra perisinaptik nöronlarda bulunan glutamatın daha fazla salınmasına neden olmaktadır. Glutamat, NMDA (N-Metil-D-Aspartat) reseptörüne bağlandığında, membran  $Ca^{+2}$  kanalları açılarak hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyi artar. Bunun sonucunda nNOS aktivasyonu gerçekleşir ve cGMP seviyelerinin değişimine neden olur. Böylece perisinaptik ve postsinaptik nöronlar arasında sinyal iletimi gerçekleşir (Şekil 2.7) (89-91). Glutamat beyin gelişimi, bellek ve öğrenme fonksiyonları için önemlidir. NO'nun glutamatla ilişkisi nedeniyle hafıza ile ilgili çalışmaların sonucunda öğrenme fonksiyonunun bozulduğu durumlarda NOS'un inhibe olduğu ve NO düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (92). Ayrıca görme işlevi, koku alma, ağrı duyusu ve beslenme gibi diğer fizyolojik işlevlerde de rol almaktadır (93,94).



Şekil 2.7. Sinir sisteminde nitrik oksit (91)

Yüksek konsantrasyonda NO, nörotoksik bir döngüyü başlatır. Alzheimer ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda NO'nun NMDA reseptörlerini etkileyerek fazla miktarda glutamat oluşumu ve bunun sonucunda hücre ölümünde etkili olduğunu gösteren bulgular mevcuttur (95).

Nitrik oksit, periferik sinirlerden nonadrenarjik nonkolinerjik (NANC) sinirler olarak bilinen bazı sinirlerde transmitter ya da düzenleyici olarak rol oynar. NOS gastrointestinal ve ürogenital sistemde NANC sinirlerinde bulunurlar. Mide içindeki basınçtaki artışlara karşı uyum sağlamaya yönelik mide gevşemesine yol açar. Bunun

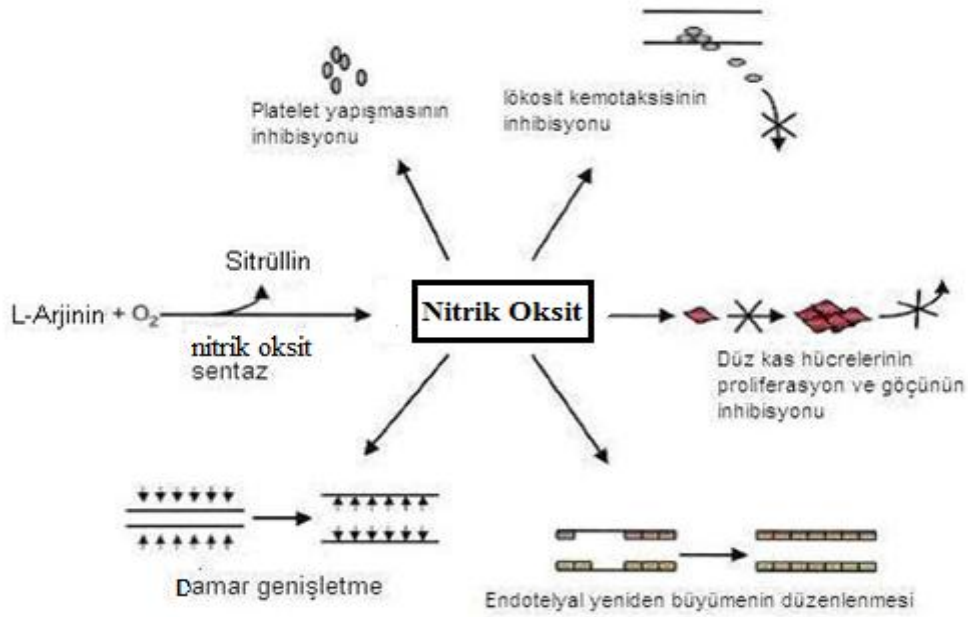
dışında, penisin ereksiyonunda rol alır. NO, vazodilatör etkisi yanında brankodilatör etkiye de sahiptir. Bu etkisini doğrudan bronş düz kası içindeki cGMP oranını artırarak ve dolaylı olarakta inhibitör NANC nöronlarının bir nörotransmitteri olarak gösterir. NO'nun mesane kapasitesinin düzenlenmesinde de nörotransmitter olarak fonksiyon yaptığı gösterilmiştir (82,96,97).

### **c. Kardiyovasküler sistemde nitrik oksit**

Nitrik oksit, eNOS aracılığıyla endotelde üretilip salgılanır ve damar düz kasına difüzyonla geçerek vasküler düz kas hücrelerinin direkt olarak gevşemesini sağlayarak kan damarlarının genişlemesine sebep olmaktadır. NO, vasküler denge için esansiyeldir ancak yarı ömrü kısa olduğundan, vazodilatasyon etkisi kendiliğinden kaybolmakta ve tekrar önceki konumuna dönmektedir. Hücre dışı alanda lokal etkiye sahiptir (37,98-100). NO, dolaşım sisteminin bazı bölgelerinde lokal değişikliklere cevap şeklinde otomatik olarak kan akışını ve kan basıncını düzenlemektedir. Yine beyin, kalp, akciğer, gastrointestinal sistem ve böbrek kan akımı da bazal NO düzeyleri ile düzenlenmektedir (101,102).

Nitrik oksitin tespit edilen kardiyovasküler sistemdeki fonksiyonları;

- 1- Vazomotor tonusun düzenlenmesi,
- 2- Miyokardial kasılmanın modülasyonu,
- 3- Hücre proliferasyonunun kontrolü,
- 4- Platelet aktivasyonu, adezyon ve agregasyonun inhibisyonu şeklinde özetlenebilir (Şekil 2.8) (5,66,74,102-104).



**Şekil 2.8.** Nitrik oksitin kardiyovasküler sistem üzerine olan etkileri (104)

Kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümler, dünya genelinde son 30 yılda azalmakla birlikte Kuzey Amerika ve Avrupa’da halen en sık ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle NO’nun damarlar ve dolaşım sistemindeki önemli fonksiyonlarının ve kardiyovasküler hastalıklardaki yerinin anlaşılması önemlidir. Yine ABD istatistiklerine göre yüksek kan basıncı, koroner arter hastalığı (KAH), inme ve romatizmal kalp hastalığı gibi kardiyovasküler hastalıklara bağlı her yıl bir milyon ölüm görülmektedir ve bunun 500.000’ini sadece KAH oluşturmaktadır (14). Ülkemizdeki KAH sıklığı ise, 2000 yılındaki TEKHARF çalışması ile erişkin nüfusunda %3.8 iken, risk grubu olan 60-69 yaş arasında %14 olarak belirlenmiştir (105).

Aterosklerozun, koroner arterlerde meydana gelmesi ile oluşan hastalığa Koroner Arter Hastalığı (KAH) denilmektedir. KAH, koroner arterlerin ateromatöz bir plakla daralması veya tıkanması sonucunda kalp kaslarına kan akışının azalması nedeniyle oluşan miyokard iskemisi ile sonuçlanan bir hastalıktır (106). İskemi, genellikle ateroskleroz, tromboz, spazm ya da emboli gibi nedenlerle oluşsa da, konjenital koroner arter anomalileri, miyokardiyal köprüleşme ve radyasyonla indüklenen inflamatuvar koroner arterit de miyokardiyal iskemiyeye neden olabilmektedir (7,107).



Koroner arter hastalığı ve buna bağlı kalp kası beslenme bozukluklarının nedenleri arasında;

1-Ateroskleroz (%99),

2-Arteritler (Sistemik lupus eritematozus, Pan arteritis nodoza, Takayasu),

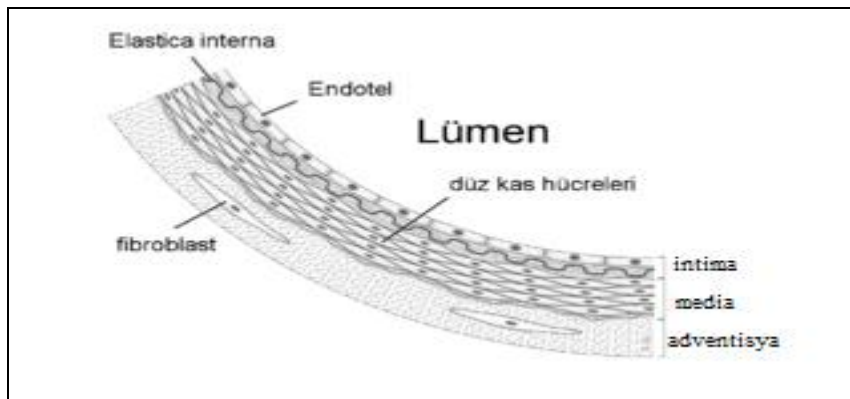
3-Embolizm,

4-Koroner damarda kalınlaşma (Amiloidoz, radyasyon),

5-Diğer nedenler (Spazm, aort diseksiyonu),

6-Doğumsal koroner arter hastalıkları (Arteriovenöz fistüller, koroner arter çıkış anomalileri) yer almaktadır (108).

Koroner arterler, aort damarından sağ ve sol ana koronerler olarak çıkan kalp dokusuna temiz kan taşıyan damarlardır. Kalbin epikardiyal bölgesinde seyrederek ve bu ana dallardan çıkan daha küçük damarlarla kalp hücrelerine ulaşırlar. Normal arter yapısı Şekil 2.9'da verilmiş olup, sağlıklı arterin lümenal yüzü endotelle, dış yüzü ise gevşek bağ dokusuyla kaplıdır. Orta tabakada ise elastik laminalar arasında yer alan, çevresi kollajen ve proteoglikanlarla dolu düz kas hücreleri yer alır. Düz kas hücreleri sistol ve diyastol sırasında kan akımını sağlayan arteriyel duvar tonusundan sorumludurlar. Endotel, damarın kan hücreleriyle temas eden yüzeyidir ve bu hücrelerle etkileşir ve uygun koşullarda da aterosklerotik lezyonların gelişiminde rol oynar (14).

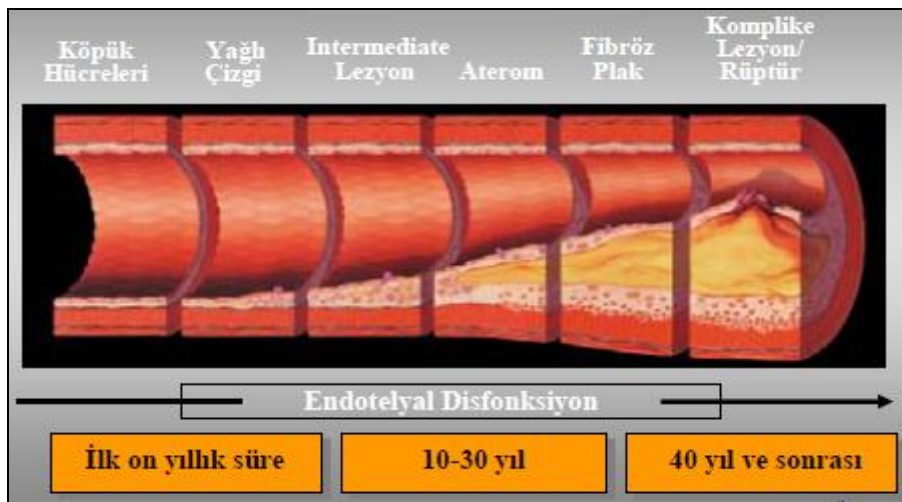


Şekil 2.9. Normal arter yapısı (14)

Ateroskleroz, çocukluk çağında başlayıp, orta ve ileri yaşlarda klinik belirti veren progresif bir hastalıktır. Hastalık süreci öncelikle elastik arterlerin intima tabakasında gelişir. Bu tabaka lipitler ve inflamatuvar hücreler tarafından infiltre olur ve bu hücrelerde değişik derecelerde fibrozis gelişir. İlerlemiş aterosklerotik lezyonlarda üç temel biyolojik olay vardır (14,15). Bunlar;

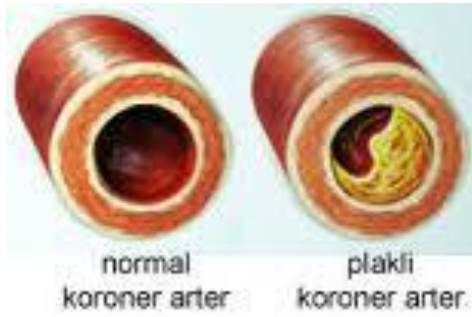
1. İntimada düz kas hücreleri ve değişik sayıda makrofaj ve T-lenfositlerin birikimi,
2. Çoğalan düz kas hücreleri tarafından kollajen, elastik lif ve proteoglikanları içeren konnektif doku matriksinin bol miktarda yapılması,
3. Konnektif doku çevresinde ve hücre içinde özellikle kolesterol ester ve serbest kolesterol tarzında lipit birikimidir.

Zamana göre seyri şekil 2.10'da verilen ateroskleroz, arterleri düzenli bir şekilde tutmaz, fokal bir hastalıktır. Aterosklerotik plaklar düşük shear stresi bulunan dallanma bölgelerine yakın yerlerde yerleşirler. Aterosklerozda lezyonların çoğu fibrotik iken, geri kalanlar büyük miktarlarda lipit ve nekrotik doku içerir. Lipit ve konnektif dokunun lezyonlardaki dağılımı lezyon stabilitesini, rüptür, trombus ve klinik sekel oluşturma riskini belirlemektedir (14,15,109).



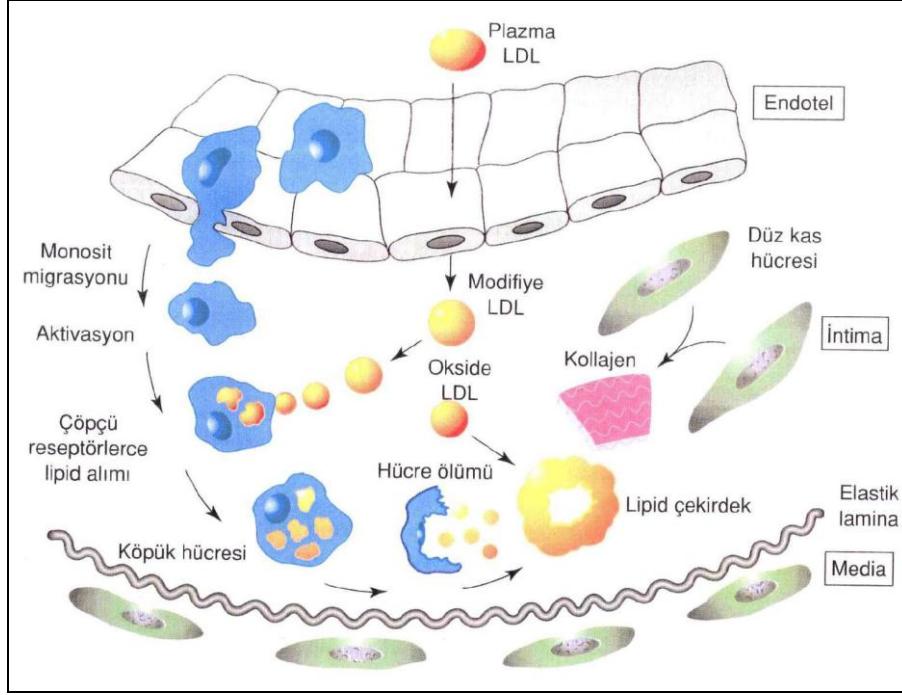
Şekil 2.10. Aterosklerozun zamana göre seyri (109)

Aterosklerotik lezyonlar iki şekilde gelişebilir. Klinik sekel yaratan tipte, genellikle intimada asimetrik bir kalınlaşma vardır. Kalınlaşma lümeni daraltarak, kan akımını azaltır. Şekil 2.11’de normal koroner arter ve plaklı koroner arterin kesit görünümü verilmiş olup aterosklerotik lezyon yeterince büyürse arter lümenini tıkayarak, doku yada organa kan akımında azalmaya neden olur. Bu azalma, iskemi yada nekroza neden olur ve bu durumda miyokart infarktüsü, serebral infarktüs, extremitelerde gangren veya ani kardiyak ölüm gibi olaylarla sonuçlanır (14,15).



Şekil 2.11. Normal koroner arter ve plaklı koroner arterin kesit görünümü (14)

İntimal kalınlaşmanın diğer formu ise, kalınlaşmaya arteriyal dilatasyonun eşlik ettiği formdur. Böylelikle arter lümen çapında önemli bir değişiklik oluşmaz ve nadiren klinik sekel görülür. Temel ateroskleroz süreci şekil 2.12’de verilmiş olup, plazmadaki LDL intimaya girer, modifiye olur ve endotelde monosit migrasyonu ile sonuçlanan değişiklikleri başlatır. Intimada daha da fazla okside olan LDL, makrofajlar tarafından aktif biçimde alındığında köpük hücreleri oluşur. Makrofaj ölümüyle, lipidler serbest kalarak çekirdeği oluşturur. Endotel hücreleri ve makrofajlar tarafından salınan büyüme faktörleri, düz kas hücresinde büyümeyi ve bağ dokusu matriksinde sentezi uyarırlar (14,15,110).



Şekil 2.12. Temel ateroskleroz süreci (110)

Nitrik oksitin ateroskleroz oluşumunda koruyucu etkilerinin olduğu bilinmektedir. NO antiaterosklerotik etkilerini;

- 1- Endotel hasarı sırasında gelişen hücre aktivasyonunu inhibe edip indirekt olarak monosit ve lökositlerin endotele yapışmasını engelleyerek (111),
- 2- Trombosit aktivasyonunu baskılayarak (112),
- 3- Damar düz kas hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu engelleyerek (113),
- 4- Ateroskleroz patogenezinde olumsuz etkileri olan endotelin-1 üretimini ve endotelin-1'in mitojenik etkilerini baskılayarak gerçekleştirir (114).

Endotel yaralanma, aterogenez başlatan temel olaydır. Ateroskleroza olan insan ve deneysel ateroskleroz oluşturulmuş hayvan modellerinde endotele bağımlı gevşeme belirgin biçimde azalmaktadır. Ancak beklenen plak ve yırtık alanlardaki gevşemenin azalması olsa da aterosklerozlu hastaların normal damar kısımlarında da bu azalma görülmektedir. Yapılan araştırmalar bunun nedeninin endotel disfonksiyonu olduğunu göstermektedir. Bu duruma; NO'nun süperoksit radikalleri tarafından yıkımının artması, hücrelerin reseptör fonksiyonlarının bozulması ve endotel hücrelerinin NO prokürsörü olan L-arginin'i alma veya metabolize etme fonksiyonlarındaki bir aksaklık yol açabilir

(115,116).

Trombositlerde de eNOS enzimi ve guanilat siklaz bulunmuştur. cGMP'nin trombosit içindeki konsantrasyonu arttıkça, trombositlerin adezyon ve agregasyon özellikleri azalır. Bu durum, kollajen, trombin, ADP ve araşidonik asit aracılığıyla tetiklenen trombosit agregasyonunu dengelemeye yarar. Aynı zamanda bu mekanizma, aterosklerozun fizyolojik engelleyicileri arasında önemli bir rol alır. Endotelde oluşan mekanik bir hasar sonucu, lokal NO yetmezliği gelişir ve bu bölgelerde kısa sürede, trombosit trombüsleri oluşur (117,118)

Nitrik oksit üretiminin azalması ve biyoaktivitesinin kaybı, ateroskleroz için risk faktörleri olarak kabul edilen hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diyabet ve sigara içimi gibi farklı durumların fizyopatolojisinde de önemli rol oynamaktadır (119).

Hiperkolesterolemi, NO biyoaktivitesini azaltır, süperoksit üretimini ve endotelin aktivitesini arttırır. Okside-LDL, L-arginin hücre içine alımını bozar ve dalayısıyla NO sentezi azalır. Bunun sonucunda endotel bağımlı vazodilatasyonda azalma olur. Bu durum sadece LDL konsantrasyonu ile bağılı olmayıp, esas olarak LDL oksidasyonu ile ilişkilidir. Hiperkolesterolemik hayvanlara ve insanlara L-arginin verilmesi, bozulmuş olan endotelden kaynaklanan NO üretimini düzeltmekte ve bu hastalıkla ilişkili vasküler lezyonları azaltmaktadır (119).

Hipertansiyon, endotel işlev bozukluğunun nedeni değil sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu durumun sebepleri arasında, NO'nun artmış üretimi ile birlikte süperoksit anyonları üretimine bağılı NO biyoaktivitesinin azalması, artmış AII ve azalmış bradikinin seviyelerinin NO üretimi ve aktivitesini baskılaması sayılabilir. Hafif koroner aterosklerozlu hastalarda hipertansiyon ve bozulmuş asetilkolin ile azalmış koroner NO salınımı arasında kuvvetli bir birliktelik bulunmaktadır (119).

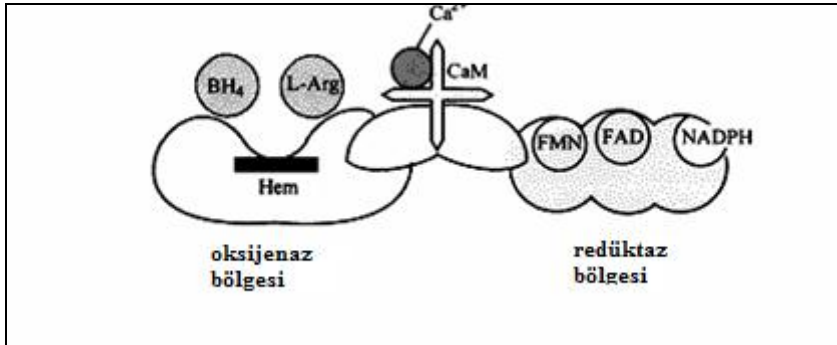
Hiperglisemi ile proteinler ve fosfolipitler glikolizasyona uğrayarak hücre içi oksidatif stres oluşmaktadır. Glikozun enzimatik olmayan yollarla oksidasyonu sonucu oluşan glikolizasyon ürünleri LDL oksidasyonunu arttırır. Bu durumda endotel hasara yol açar. Dislipoproteinemi ve reaktif oksijen radikallerinde artış olur. İnsülin bağımlı diyabeti olan hastalarda NO düzeylerindeki azalma tromboza yol açar (119, 120).

Sigara içimi, oksijen kaynaklı serbest radikaller aracılığıyla endotel işlev bozukluğuna yol açar. Sigara dumanı içindeki O<sub>2</sub> radikali damar endoteline ulaştığında NO ile etkileşip vazoaktif seviyesini azaltabilir. İleri yaşa bağılı olarak, endotelin

yaşlanması ve daha az fonksiyon görmesi veya NO sentaz genlerinin ekspresyonunda da azalma olabileceği düşünülmektedir. (119).

### 2.3. Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri

İlk kez 1989'da tanımlanan nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi, memelilerde NO üretimini düzenlemektedir. Sitokrom P<sub>450</sub> redüktaz enzim ailesi ile benzerlik gösteren NOS, 'hem' grubu içermektedir ve sitokrom P<sub>450</sub> için tipik olan indirgenme ve CO ile muamele ile 450 nm'de maksimum absorptans gösterme özelliğine sahiptir. Bununla birlikte sitokrom P<sub>450</sub>'de olduğu gibi, moleküler oksijen protoporfirine bağlanmadan önce, Fe<sup>+3</sup>'ün Fe<sup>+2</sup>'ye redüksiyonu gerekmektedir. Şekil 2.13'de yapısı verilen NOS enzimi ayrıca kofaktör olarak hem, FAD, FMN ve BH<sub>4</sub> e ihtiyaç duyar (73,121-123).



Şekil.2.13.Nitrik oksit sentaz enziminin yapısı (73)

1991 ve 1994 yılları arasında, NOS enziminin üç izoformu tanımlanmış olup, ikisi yapısal, üçüncüsü ise sitokin ve diğer bileşikler tarafından uyarılabilen formdur. NOS enziminin izoformlarının, aralarında %51-57 arasında homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Bu izoformlarının, farklı hücre tiplerinde bulunduğu, farklı yerlerde lokalize olduğu, regülasyonları, katalitik özellikleri ve inhibitör duyarlılıklarının farklı olduğu bildirilmiştir (73,104). NOS izoformlarını sentezleyen 3 gen bölgesi bulunur ve bu genler sırasıyla kromozom 12, 7 ve 6'da lokalizedir (95).

Nitrik oksit sentaz, vücudun çok değişik dokularından (damar endoteli, beyin,

makrofaj, üriner sistem dokuları vb.) izole edilerek fizikokimyasal ve kinetik özellikleri incelenmiştir (81). NOS enziminin izoformları, yapısal veya indüklenebilir olmaları, kalsiyum bağımlı veya bağımsız olmaları, hücresele lokalizasyonları, sitozolik veya partikül halde olmaları ve alt ünitelerinin büyüklükleri gibi çeşitli karakteristik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır (49,73). (Çizelge 2.3).

Buna göre, NOS enziminin izoformları;

1. Endotelyal NOS (eNOS, NOS3),
2. Nöronal NOS (nNOS, NOS1),
3. İndüklenen NOS (iNOS, NOS2) olmak üzere 3 gruba ayrılır (5).

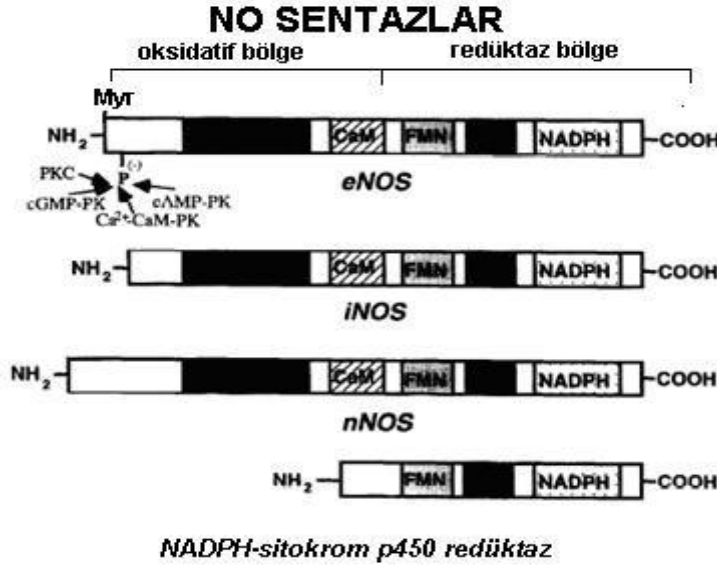
Pek çok hücrede infeksiyon ve inflamasyon gibi durumlarla uyarılabilen iNOS, indüklenen izoform olarak adlandırılırken, eNOS ve nNOS konstitüf (yapısal) izoform olarak adlandırılır (5).

**Çizelge 2.3.** Nitrik oksit sentaz enziminin izoformları ve genel özellikleri (49)

Enzim	Alternatif isimler	Hücre tipi	Moleküler ağırlık(kDa) ve aa sayısı	Kromozomal lokalizasyonu	Gen Büyüklüğü ve yapısı
eNOS	Konstitüf NOS, endotelyal tip, ecNOS, NOS3	Endotel hücreler	133 kDa, 1203 aa	7q35-7q36	21 kb, 26 ekzon, 25 intron
nNOS	Konstitüf NOS, nöronal tip, ncNOS, NOS1, Beyin NOS	Nöronlar, iskelet kas hücreleri, kardiyak kas hücreler	161 kDa, 1434 aa	12q24-12q24	160 kb, 29 ekzon, 28 intron
iNOS	İndüklenebilir NOS, NOS2, makrofaj NOS	Makrofaj, nötrofil, hepatosit	130 kDa, 1153 aa	17q11.2	37 kb, 26 ekzon, 25 intron

Nitrik oksit sentaz enziminin bağlanma bölgeleri şekil 2.14'de verilmiş olup enzimin bir ucunda C terminali diğer ucunda ise NH2 terminali bulunur (102). NOS enziminin C terminali sitokrom P<sub>450</sub> ile benzer kofaktör bağlanma yerleri vardır. Bu nedenle, C terminali kısmı, redüktaz kısım olarak adlandırılır. C terminalinin ilerisinde

NADPH bağlanan kısmı tüm NOS'larda vardır ve sitokrom P<sub>450</sub> redüktaz ile aynıdır. NADPH bağlanma bölgesinden sonra FAD ve FMN bağlanma bölgesi gelir. NOS enzimi, sitokrom p450'den farklı olarak substratını kendisi oksijene eder. Substratı olan L-arjinin, NH<sub>2</sub> terminalinin hem kısmında okside olur. Hem'e katalitik aktive için ihtiyaç vardır ve bu kısım L-arjininin bağlanma kısmıdır. Redüktaz ve oksijenaz kısımları elektron akışını düzenlerler. Kalsiyuma bağımlı NOS izoformları kalmoduline bağımlı değildir ama kalsiyum varlığında kalmoduline yüksek afinite ile bağlanma göstererek enzim aktivasyonunu gerçekleştirir. Buna karşın iNOS kalmoduline çok sıkı olarak bağlıdır. Bu yüzden aktivitesi kalsiyumdan bağımsızdır (73,102).



Şekil 2.14. Nitrik oksit sentaz enziminin bağlanma bölgeleri (102)

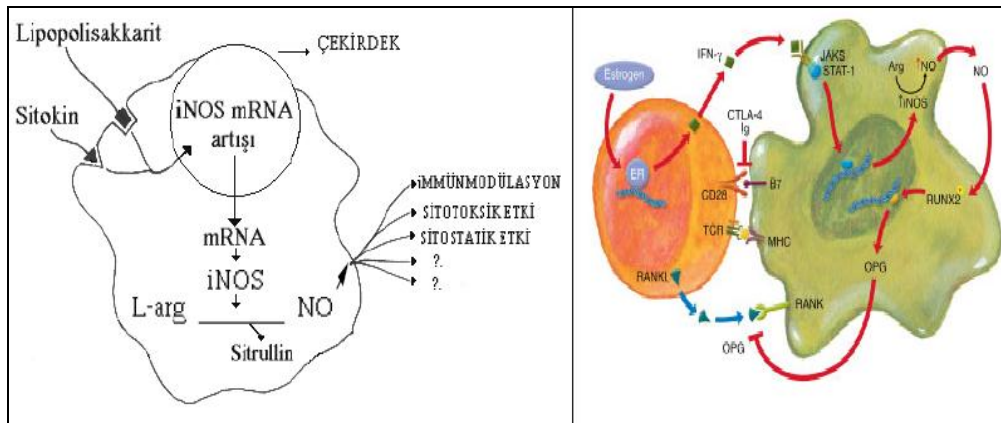
Nitrik oksit sentaz izoformlarının farklı regülasyon mekanizmaları ve farklı aktivitelelerin olduğu bilinmektedir. Konstitüf izoformlar, damar endoteli, idrar yolu dokuları, periferik ve santral sinir sistemi gibi dokularda bulunurlar ancak inaktif durumdadırlar. İntraselüler kalsiyum konsantrasyonu arttığında ise, kalsiyum bağlayan bir protein olan kalmodülin kalsiyumla birleşerek kalsiyum-kalmodülin kompleksi oluşmakta ve bu NOS izoformlarını aktive etmektedir. Yapısal NOS izoformları kalsiyum seviyeleri düşene kadar az miktarda NO'yu sentezlemeye devam etmektedirler. Sentez süresinin kısa olması, sentezlenen NO miktarının çok düşük



olmasına neden olmaktadır. NO'nun düşük konsantrasyonlardaki ara ürünleri sinyal iletiminde rol oynamaktadır (81,82,122,123).

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz izoformu hücre içinde bulunmaz. Makrofaj ve hepatositlerde sentez edilir, fakat bu hücreler kalsiyuma bağımlı olmadan spesifik bir sitokinle aktive edildiklerinde, NOS'un indüksiyonu ve NO sentezi gerçekleşir. Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri, interferon gama veya yüksek konsantrasyonda lipopolisakkaritle uyarılan makrofajlar, çok miktarda NO üreterek yabancı hücrelerde sitotoksik veya sitostatik etki meydana getirirler. İlk ürün oluşumunu takip eden süreçte daha da artan miktarlarda NO sentezi gerçekleşmektedir. İndüksiyon sonrası NO sentezi saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Ancak aşırı miktarda NO sentezi makrofajlarda ve diğer dokularda harabiyete yol açar (81,82,122,123).

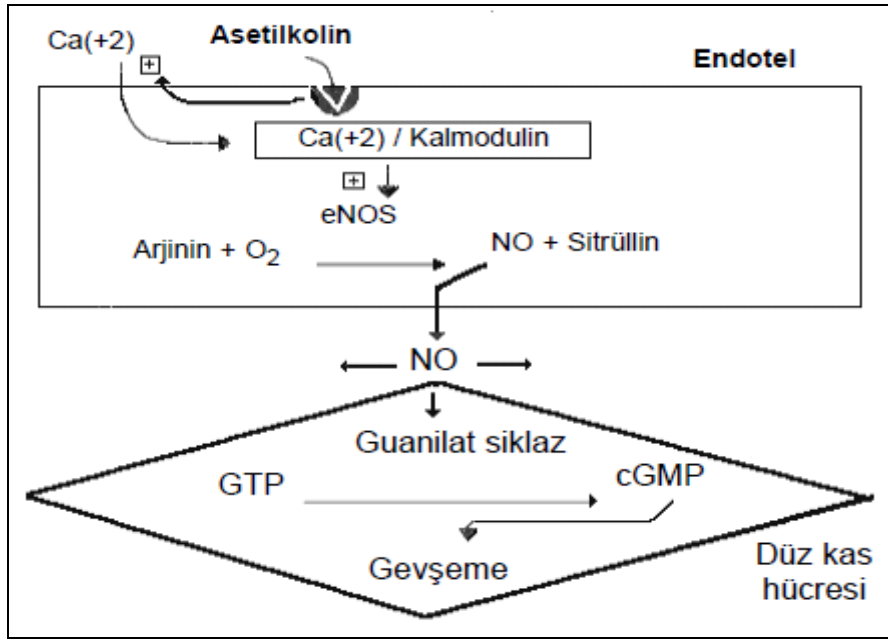
İndüklenebilir nitrik oksit sentaz, özellikle non spesifik immünyetede önemli rol oynar. Şekil 2.15'de indüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin makrofajlardaki indüksiyonu ve ürettiği nitrik oksitin etkileri verilmiş olup bakteri, mantar, virüs ve tümör hücreleri ile protozoonlara sitotoksik veya sitostatik etki oluşturur. İnflamatuvar ve otoimmün hastalıklar (transplantın reddi, artritis, multipl sklerozis, astma vb.) da rol oynadığı bildirilmiştir (81,83,124-126).



Şekil 2.15. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin makrofajlardaki indüksiyonu ve ürettiği nitrik oksitin etkileri (81).

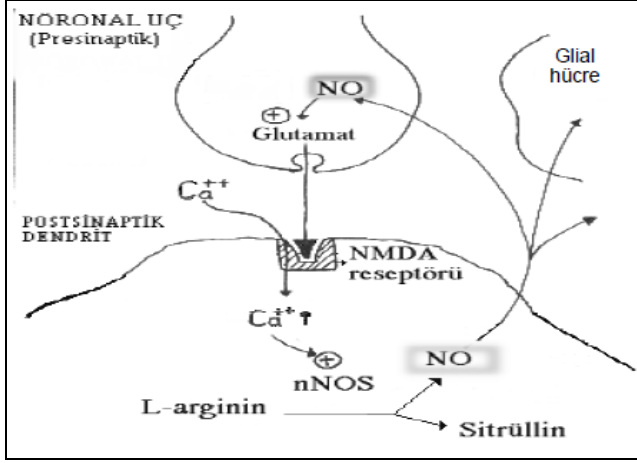
Endotelial nitrik oksit sentaz, asetilkolin gibi bir haberci endotel üzerindeki reseptörüne bağlandığında artan kalsiyum düzeyi ve ardından kalsiyum-kalmodulin

kompleksinin oluşmasıyla uyarılır. Endotelden sentezlenen NO, komşu düz kas hücrelerinin sitozolindeki guanilat siklaz enziminin hem grubundaki demire bağlanır, onu aktifleştirir ve GTP'den cGMP oluşumunun artmasına neden olur (Şekil 2.16). Sonuç olarak, artan cGMP ise düz kasların gevşemesine ve damarlarda vazodilatasyona neden olur. Kan basıncını, kan akış hızını ve kalp kasılmasını düzenler. Trombositlerin adezyon ve agregasyonlarını inhibe eder (82,116,122,123,127) .



Şekil 2.16. Endotelial nitrik oksit oluşumu ve etki mekanizması (82).

Nöronal nitrik oksit sentaz kaynaklı NO, santral sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar. Presinaptik uçtan salgılanan glutamatın etkisiyle (glutamat NMDA reseptörlerine bağlanır), postsinaptik uçtaki hücrenin NOS'nu aktifleştirir ve oluşan NO ile hedeflenen etki oluşur. Şekil 2.17’de nöronal nitrik oksit sentazın NMDA ile ilişkisi ve sinir sistemindeki etkileri verilmiş olup nNOS nöronal sinapsların şekillenmesine yardımcı olur, koku alma, görme, ağrıyı algılama ve hafıza oluşması gibi işlevlerde rol oynar. Aynı zamanda, periferik sinir sisteminde, nonadrenerjik nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak rol oynar. Bununla birlikte, solunum fonksiyonlarında, penis ereksiyonunda, gastrointestinal sistem motilitesinde ve tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde rol alır (115,122,128-130).



Şekil 2.17. Nöronal nitrik oksit sentaz enziminin NMDA ile ilişkisi ve sinir sistemindeki etkileri (122).

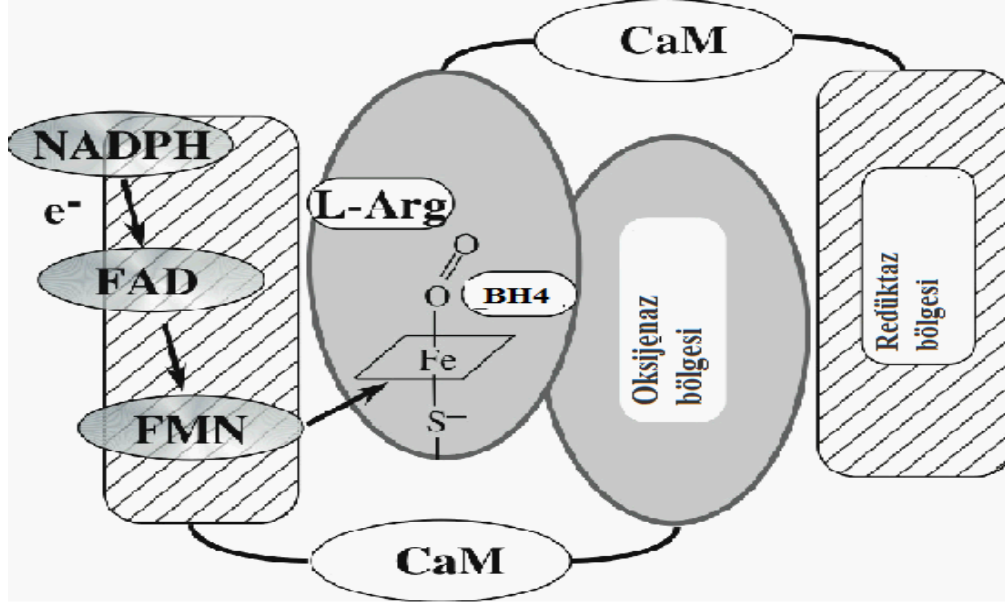
Nitrik oksit sentaz, L-NMMA gibi L-arginin analogları ve L-argininin guanidyum kısmına benzeyen pek çok amino asit bileşiği tarafından inhibe edilir. Ayrıca glukokortikoidler de NOS'u inhibe ederler (95).

#### 2.4. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Enzimi ve Varyasyonları

1992 yılında, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimini kodlayan gene ait genomik klonlar tespit edilmiştir. İnsan eNOS geni kromozom 7q35-7q36 bölgesinde lokalizedir ve 26 ekzon ve 25 introndan oluşmaktadır. Genomda yaklaşık 21 kilobaz büyüklüğünde olan bu gen, haploid insan genomunda bir kopya olarak bulunur ve 4052 nükleotidlik bir mRNA kodlamaktadır. eNOS geninin cDNA'ları sığır ve insan endotel hücrelerinden klonlanmış ve 3609 nükleotidlik açık okuma çerçevesine sahip olduğu gösterilmiştir. Yaklaşık 133 kDa moleküler ağırlığında, 1203 amino asitten oluşan eNOS enziminin transkripsiyonundan ve sentezinden sorumludur (4,131). Genin 5' flanking bölgesi TATA kutusu içermez ve bunun görevini proksimal elementler üstlenmiştir. Bu proksimal promoter elementler endotel hücrelerde bulunan yapısal olarak eksprese edilen gen ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Sterol düzenleyici cis elementleri, SP1, CRE, GATA, NF-1, AP-1, AP-2 ve p53, eNOS geninin proksimal promotör elementleridir (4,131,132). Shear stresin hemodinamik gücünün ve kronik egzersizin, eNOS mRNA ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiş olup bu durum promoter bölgesinde shear stres cevap elementinin düzenleyici rolü olduğunu düşündürmektedir

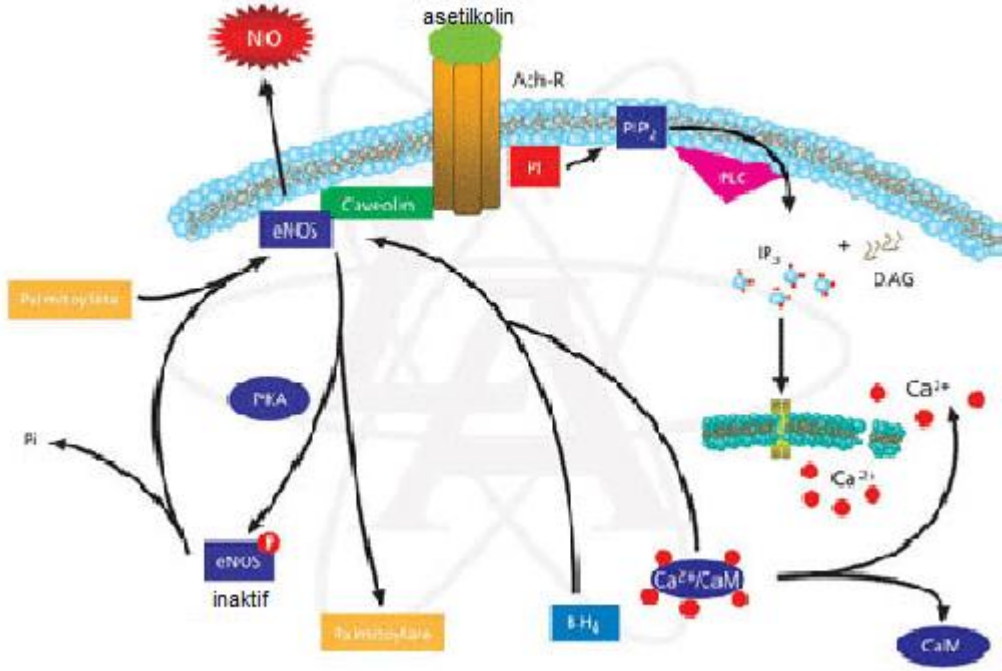
(49,132).

Endotelial nitrik oksit sentaz, 134 kD'luk iki benzer monomerden oluşan bir dimerdir ve sadece dimerik formda tam olarak fonksiyoneldir (Şekil 2.18) (75,97).



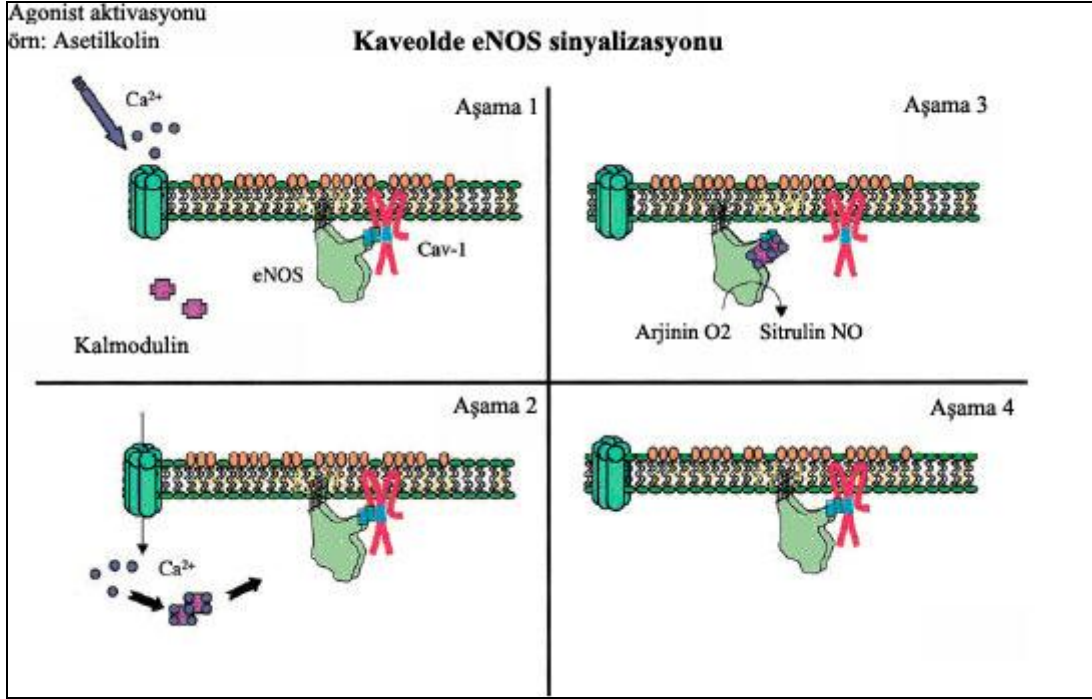
Şekil.2.18. Endotelial nitrik oksit sentaz enzimi dimerik yapısı (97).

Endotelial nitrik oksit sentazın redüktaz bölgesi, NADPH, FAD ve FMN flavinleri ve kalmodulin için bağlanma bölgeleri içerir. NO için gerekli elektronları redükte olmuş NADPH'ı dehidrojenize ederek üretir. Üretilen elektronlar daha sonra katalitik bölge içeren N-terminal oksijenaz bölgesine geçerler. Bu elektron transferi kalsiyum bağımlı kalmodulin bağlanması ile aktive olur. NO üretim yeri olan oksijenaz bölgesi L-arjinin, BH<sub>4</sub> ve hem için bağlanma bölgeleri içerir. Şekil 2.19'da etki mekanizması verilen eNOS enziminin, dimerik hale gelmesi hem molekülünün bağlanması ile başlar ve dimerik haldeki enzime BH<sub>4</sub> bağlanmasıyla enzim kararlı hale getirilir (133). Kararlı hale geçiş aynı zamanda çinko iyonları ile de sağlanır. BH<sub>4</sub> bağlanmamış bir eNOS dimeri O<sub>2</sub> üretmeye eğilimli iken yüksek seviyede BH<sub>4</sub> varlığı ise doymuş bir dimer oluşturarak yalnızca NO sentezleyen bir enzim oluşmasını sağlar (75).



Şekil.2.19. Endotelial nitrik oksit sentaz enziminin etki mekanizması (133)

Enzimin aktifleşmesi için, hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyelerinde artış sonucunda, kalsiyum/kalmodulin kompleksinin oluşumu ve bu kompleksin kaveolinle yer değiştirerek, NOS enzimidaki kalmodulin bölgesine bağlanması gerekmektedir. Kaveola kolesterol ve sfingolipidden zengin, fosfolipidden fakirdir. Kaveola, birçok dokuda G proteini, protein kinaz gibi birçok reseptörün kümelendiği bir yapıdır. Hiperkolesterolemi gibi hücre membranının lipid kompozisyonunda değişikliğe yol açan faktörler kaveolanın fonksiyonunu bozarak NOS aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilir. Kaveolin-1 (Cav-1) ile etkileşmeyen, kaveollere lokalize olmuş eNOS optimal enzimatik fonksiyona sahiptir. Kaveoldeki eNOS lokalizasyonu maksimum eNOS aktivitesi için gerekli olduğu halde, Cav-1, bu aktiviteyi eNOS ile etkileşime girerek inhibe edebilir. Cav-1 eNOS aktivitesini kuvvetli bir şekilde inhibe eder. Asetilkolinin agonist aktivasyonu ile  $Ca^{+2}$  sitozole geçer ve kalmoduline bağlanır.  $Ca^{+2}$  ile aktive olmuş kalmodulin eNOS'a bağlanır. Böylece Cav-1' in kuvvetli inhibisyonu hafifletilerek NO üretilir. Cav-1 eNOS' a tekrar bağlanarak döngü tamamlanır (Şekil 2.20) (134).



**Şekil 2.20.** Endotelial nitrik oksit sentaz enziminin sinyal mekanizmasının hücre membranının kaveolünde gösterilmesi (134)

Endotelial nitrik oksit sentaz endotelden sürekli salınır. Yapılan deneylerde eNOS sentezinin birçok faktör tarafından artırılıp, azaltıldığı gösterilmiştir. eNOS sentezini arttıran faktörler shear stres, lizofosfotidilkolin, siklik GMP analoglarıdır. eNOS aktivitesini azaltan faktörler ise TNF- $\alpha$ , okside LDL ve hipoksidir. Bu durumlarda mRNA posttransripsiyonel ömrünün kısılması, eNOS sentezinin azalmasında önemli rol oynar (134).

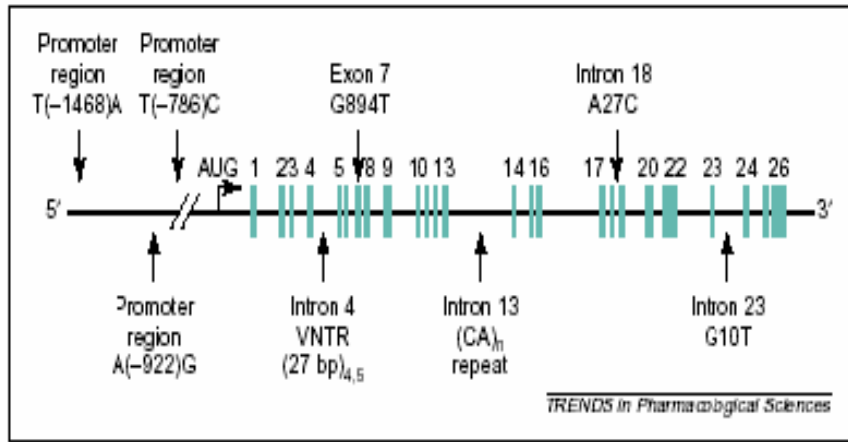
Endotelial nitrik oksit sentaz geninde meydana gelecek bir varyasyon eNOS enziminde fonksiyon değişikliğine yol açar ve bu durumun vasküler hastalıklar da arasında olmak üzere birçok hastalıkla ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Bugüne kadar koroner arter hastalığı, miyokard enfaktüsü, hipertansiyon, inme ve renal hastalıklar gibi pek çok vasküler bozukluk eNOS gen polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur (135). Yapılan araştırmalarda ırklar arasında değişiklik olduğundan spesifik genetik varyantların sadece belli ırklara özgü olduğu düşünülebilir. eNOS geninin, fonksiyonel olarak polimorfik olduğu gösterilmiş ve eNOS sentezinde ve salınımında düzensizliğe yol açan çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır (6).

### 2.4.1. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Genindeki Varyasyonlar

Endotelial nitrik oksit sentaz geninin özellikleri 1990'ların ortasında bulunduğundan beri bu genin pek çok spesifik allel varyasyonları tespit edilmiştir. DNA dizi çalışmalarıyla promotör bölgede, ekzonlarda ve intronlarda dizi varyasyonları tespit edilmiştir. Bunun üzerine temel olarak,

- a. İtron bölgesinde olan varyasyonlar
- b. Ekson bölgesinde olan varyasyonlar
- c. Promotor bölgesinde olan varyasyonlar olmak üzere üç çeşit varyasyon tanımlanmıştır (6).

Endotelial nitrik oksit sentaz geni ve bilinen polimorfizm bölgeleri şekil 2.21'de verilmiştir (6).



Şekil 2.21. Endotelial nitrik oksit sentaz geni ve bilinen polimorfizm bölgeleri (6)

Bu varyasyonlar ile çeşitli kardiovasküler hastalıklar arasındaki muhtemel bağlantıları gösteren araştırmalar Çizelge 2.4'de gösterilmiştir. (5,6,136,137).

**Çizelge 2.4.** İnsan endotelial nitrik oksit sentaz geni polimorfizmleri ile kardiovasküler hastalıklar arasındaki ilişkiler (6)

<u>Polimorfizm</u>	<u>Lokalizasyon</u>	<u>Hastalık</u>	<u>Populasyon</u>	<u>Sonuç</u>
<b>İntron bölgesinde tek nükleotid polimorfizmi</b>				
Ala27Cys	İntron 18	Hipertansiyon	Beyaz ırk	Anlamsız
Gly10Thy	İntron 23	Hipertansiyon	Japon	Anlamsız
<b>İntron bölgesinde VNTR polimorfizmi</b>				
VNTR (CA) <sub>n</sub>	İntron 13, 23	Diabetik retinopati	Beyaz İrk	Anlamsız
	İntron 13	Migren	Beyaz İrk	Anlamsız
		Hipertansiyon	Beyaz İrk	Anlamsız
VNTR (27 bc)	İntron 4	Plazma NO düzeyi	Beyaz İrk	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
		Hipertansiyon	Japon	Anlamlı
			Beyaz İrk	Anlamsız
		Koroner arter hast	Beyaz İrk	Anlamlı
			Beyaz İrk	Anlamsız
			Japon	Anlamsız
		Miyokart enfaktı	Zencileri	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
			Köre	Anlamlı
		Primer glomerulonefrit	Beyaz İrk	Anlamsız
		Kr. Böbrek yetmezliği	Japon	Anlamlı
		Dializle ilgili HT	Japon	Anlamlı
		İskemik SVH	Japon	Anlamsız
			Türk	Anlamlı
		Venöz tromboembolizm	Zencileri	Anlamlı
		Derin ven trombozu	Türk	Anlamsız
<b>5' Promotor bölge varyasyonları</b>				
Thr-786Cys	786bc	Koroner arter hastalığı	Japon	Anlamlı
			Beyaz İrk	Anlamsız
<b>Eksondaki varyasyonlar</b>				
Gly894Thr	Ekson(Glu298Asp)	Koroner arter hastalığı	Beyaz İrk	Anlamlı
			Beyaz İrk	Anlamsız
			Japon	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
		Hipertansiyon	Beyaz İrk	Anlamsız
			Japon	Anlamsız
			Japon	Anlamlı
		Miyokardial enfakt	Beyaz İrk	Anlamsız
			Beyaz İrk	Anlamlı
		Preeklamsi	Beyaz İrk	Anlamlı
		İskemik SVH	Türk	Anlamsız

#### a. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Genine Ait İntron Bölgesindeki Varyasyonlar

Endotelial nitrik oksit sentaz geninde tanımlanmış varyasyonların büyük çoğunluğu intronlar içindedir. İntron 2, intron11, intron 12, İntron 18 (ala 27 cys), intron 22 ve intron 23 (gly 10 thr)'de tek nükleotid varyasyonları ile intron 2, intron 8, intron 13 ve intron 4 bölgelerinde VNTR (değişken ardışık tekrar polimorfizmleri) polimorfizmi



tanımlanmıştır (5, 138). Yapılan çalışmalarla intron 18’de ‘Ala 27 Cys’ ve intron 23 ‘Gly 10 Tyr’ tek nükleotid varyasyonları esansiyel hipertansiyonla ilişkilendirilmiştir (139). İtron 13’te 37 kopyadan fazla CA (sitozinadenozin) tekrarına sahip Kafkasyalılar’da koroner arter hastalığı riskinin arttığı gösterilmiştir (140). Diğer bir VNTR polimorfizmi; intron 4’de, 5 (major alel) veya 4 (minör alel) kopyalı bir 27 bç tekrar olması ile tanımlanmıştır. Bu VNTR’ın kardiovasküler hastalıklarla ilişkisi belirsizdir. Ancak yapılan çalışmalar eNOS geni intron 4 polimorfizmi ile plazma NO düzeyini ilişkili olduğunu göstermektedir (141).

#### **b. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Genine Ait Promotor Bölgesindeki Polimorfizimler**

Endotelial nitrik oksit sentaz geninin 5' flanking bölgesinde bağlantılı 3 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Bunlar; ‘Thr 786 Cys’, ‘Ala 922 Gly’, ‘ Thr 1468 Ala’ varyasyonlarıdır. Promotor bölgesinde keşfedilen bu varyant tipinin, transkripsiyonu ve dolayısı ile enzim seviyelerini direkt olarak etkileme potansiyeli vardır (142).

#### **c. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Genine Ait Ekson 7 Tek Nükleotid Polimorfizmi**

Endotelial nitrik oksit sentaz geninin ekson 7’de tanımlanan polimorfizmi ise, proteinin pirimer yapısını değiştirir ve direkt olarak enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel özelliğini değiştirme potansiyeli vardır. Bu tek nükleotid polimorfizmi, pozisyon 894’te guanin yerine timin geçişi ile oluşmaktadır. Bu amino asit pozisyon 298’de glutamik asidin aspartik aside değişimiyle uyumludur. Bu varyantın diğer eNOS varyasyonlarına göre kardiyovasküler hastalık riskiyle nisbeten daha fazla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (138,142).

Koroner arter hastaları için geleneksel risk faktörlerinin yetersiz kalması nedeni ile son zamanlarda belirlenmiş geleneksel olmayan risk etkenleri de önem kazanmıştır. Kişilerin yaşam kalitesinin artırılması açısından KAH’lığına yatkınlığının olup olmadığını erkenden öğrenebilmek ve ona göre önlem alabilmek için koroner arter hastalıklarının genetik alt yapısının belirlenmesi önemlidir. Azalmış NO salınımının ateroskleroz gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesiyle eNOS enzimini kodlayan

gende saptanan mutasyonların, bozulmuş NO salımına sonuç olarak da koroner arter hastalığına neden olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, eNOS T786C ve G894T polimorfizmi ile koroner arter hastalığı arasındaki ilişkisini ortaya koymayı hedefleyerek hastalığın genetik alt yapısının aydınlatılmasına katkı sağlamayı amaçladık.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Araç ve Gereçler

##### 3.1.1. Kimyasal Madde ve Çözücüler

Mutlak etil alkol (Reidel-Haen, Almanya)

2-propandiol (Merck, Almanya)

Bidistile su

##### 3.1.2. Alet ve Gereçler

Santrifüj (Sigma k-15-1, Almanya)

Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)

-20 °C Derin dondurucu (Uğur Derin Dondurucu, Türkiye)

-80 °C Derin dondurucu (Jouan, Danimarka)

+4 °C Soğutucu (Bosch, Almanya)

1,5 ml'lik kapaklı ependorf tüp (Isolab, Almanya)

Otomatik ayarlanabilir pipet (Eppendorf, Almanya)

Cobas Integra 800 otoanalizör (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)

Gerçek zamanlı PCR cihazı (LightCycler480 II, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)

ELİSA okuyucu (Organo Teknika, Avusturya)

Distile su cihazı (Milli pore, Fransa )

3 ml'lik %7,5 EDTA'lı tüp (BD, Vacutainer, İngiltere)

10 ml'lik içeriksiz biyokimya tüpü (BD, Vacutainer, İngiltere)

##### 3.1.3. Kullanılan Kitler

Total Kolesterol: (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)

HDL Kolesterol: (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)

Trigliserit: (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)

Açlık Kan Şekeri: (Roche Diagnostics Mannheim, GmbH, Almanya)

NO: (Cat. No: 11 756 281 001, Nitric oxide colorimetric assay, Roche Diagnostics Mannheim, GmbH, Almanya)

High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat. No. 11 796 828 001, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)

### 3.2. Kullanılan Ayıraçlar

#### 3.2.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Ayıraçların Hazırlanması

DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit kullanılmıştır. Kit içeriği çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan kitin içeriği

Kimyasal	Miktarı	İçeriği
Bağlayıcı tampon	20 ml	6 M guanidin HCl, 10mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH:4,4
Proteinaz K	90 mg	Liyofilize preparat
İnhibitör uzaklaştırıcı tampon	33 ml	5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl pH:6,6
Yıkama tamponu	20 ml	20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH:7,5
Elüsyon tamponu	40 ml	10 mM Tris, pH:8,5

Yukarıda belirtilen kit içeriklerinden bağlayıcı tampon ve elüsyon tamponu doğrudan hiçbir işlem yapılmadan kullanıldı. Diğer içerikler ise kit prospektüsünde verilen uygulama talimatına göre aşağıda verilen şekilde hazırlandı.

**Proteinaz K:** Liyofilize proteinaz K (liyofilize halde oda sıcaklığında saklandı) 4,5 ml steril bidistile su ile sulandırıldı ve 500 µL’lik porsiyonlar halinde -20°C’de korundu.

**İnhibitör Uzaklaştırıcı Tampon:** 33 ml tampona 20 ml mutlak etil alkol eklendi.

**Yıkama Tamponu:** 20 ml yıkama tamponunun üzerine 80 ml mutlak etil alkol eklendi.

Ayrıca DNA izolasyon kitinin içerisinde bulunmayan fakat uygulama da gerekli olan 2-

propandiol herhangi bir hazırlığa gerek duyulmadan, stok çözeltiden doğrudan kullanıldı.

### 3.3. Çalışma Grubu ve Örnek Alımı

Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji ve Kalp Damar Cerrahisi polikliniklerine göğüs ağrısı ile başvuran ve koroner anjiyografi ile koroner arterlerinde %70 ve fazlası darlığı olan, yaşları 37 ile 83 arasında değişen 18'i kadın, 71'si erkek 89 koroner arter hastası (hasta grubu) ve koroner anjiyografi sonucu normal koroner tespit edilen yaşları 33 ile 88 arasında değişen 38'i kadın, 48'i erkek 86 birey (kontrol grubu) olmak üzere toplam 175 birey dahil edildi. Çalışma Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 02.03.2011 ve 2011/41 nolu kararınca onaylandı ve çalışmaya katılan tüm bireyler çalışma hakkında bilgilendirilerek yazılı onanmaları alındı.

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol gruplarına ait yaş, cinsiyet, boy, kilo, sigara, alkol, aile öyküsü ve ilaç kullanımı ile ilgili bilgiler kaydedildi. Hastalar ateroskleroz risk faktörleri açısından sorgulandı. Diyabet öyküsü olan, insülin veya oral antidiyabetik ajan kullanan, ya da daha önce bu ajanları kullanmış olup, şu an diyetle kontrol altında olan hastalar veya özgeçmişinde diyabeti olmayıp ardışık birden fazla ölçümde açlık kan şekeri (AKŞ)  $\geq 126$  mg/dl olan hastalar diyabet hastası olarak değerlendirildi. Özgeçmişlerinde hipertansiyon öyküsü olan, antihipertansif ilaç alan hastalar veya özgeçmişinde hipertansiyon öyküsü olmayıp, ardışık yapılan üç ölçüm sonrasında tansiyon değeri 140/90 mmHg'nın üzerinde olan hastalar, hipertansiyon hastası olarak değerlendirildi. Çalışma grubunu oluşturan hasta ve kontrol grubuna ait bu değerlendirmeler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji ve Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyeleri tarafından yapıldı.

Hasta ve kontrol grubundan etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içerikli tüplere ve serumları ayrılmak üzere ise düz biyokimya tüplerine periferik venöz kanları alındı. Hasta ve kontrol gruplarından eNOS T786C ve eNOS G894T gen polimorfizmi saptamak için EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri DNA izolasyonu için çalışma gününe kadar +4 °C'de saklandı. Lipid profili, AKŞ düzeyleri için içeriksiz biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri ise, takiben 10 dakika sonra 3000 rpm'de 10 dakika

santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve Cobas Integra 800 otoanalizöründe çalışıldı. Nitrik oksit düzeyleri için içeriksiz tüplere alınan periferik venöz kan örnekleri ise 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı.

### **3.4. Yöntemler**

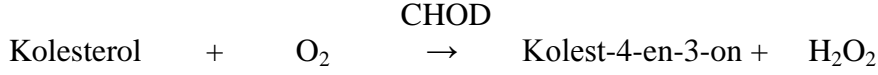
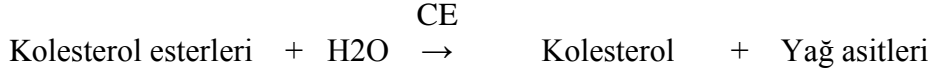
#### **3.4.1. Koroner Anjioplasti**

Koroner anjioplasti standart Judkin tekniği kullanılarak femoral girişimle gerçekleştirildi. Koroner anjioplasti esnasında kontrast ajanı olarak Lopromide (Ultravist-370, Schering AG) manuel olarak (her pozisyonda 6-8 ml kontrast ajanı) kullanıldı. Yatay ekseninde her iki sağ ve sol yerleşimli koroner arterlerin kranial ve kaudal açıları gösterildi. Koroner anjioplasti işlemi Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri tarafından gerçekleştirildi. Anjiyografi sonrası hastaların tıkalı damar sayıları, Anabilim Dalı Öğretim üyelerince hesaplandı ve değerlendirildi. Koroner anjiyografi sonuçlarına göre koroner arterlerinden en az birinde  $\geq$  %70 darlık belirlenen koroner arter hastaları (KAH) ateroskleroz tanısı almıştır.

#### **3.4.2. Lipit Profili Ölçümleri**

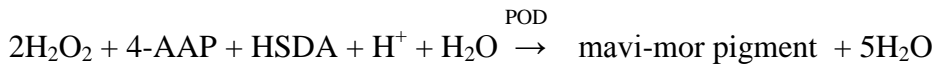
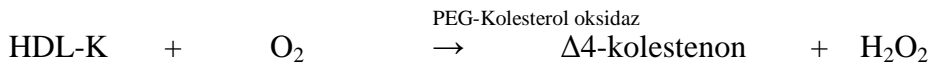
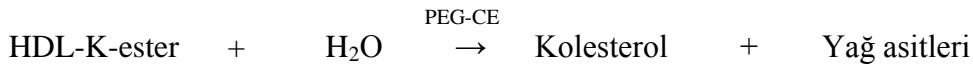
**a) Total Kolesterol Ölçümü:** Total kolesterol (TK) düzeyleri enzimatik kolorimetrik metod (CHOD/PAP) ile çalışıldı. Yöntemde prensip, kolesterol esterlerinin kolesterol esteraz (CE) enzimi ile açığa çıkan serbest kolesterolün, kolesterol oksidaz varlığında hidrojen peroksida ( $H_2O_2$ ) oksidasyonu ve oluşan  $H_2O_2$ 'nin ise peroksidaz (POD) ile fenol ve 4-aminoantiprin (4-AAP) varlığında, kinonimine dönüşümü ve oluşan kinoniminin 520 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır (Eşitlik 3.1).

**Eşitlik 3.1.** Total kolesterolün ölçümünde yer alan tepkime denklemi



**b) HDL Kolesterol Ölçümü:** HDL-Kolesterol (HDL-K) ölçümünde homojen enzimatik kolorimetrik yöntem kullanıldı. Yöntemin prensibinde magnezyum sülfat ve dekstran sülfat varlığında, polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş enzimlere dirençli, suda çözünen LDL, VLDL ve şilomikron kompleksleri oluşturulur. HDL-K kolesterol içeriği PEG ile modifiye edilmiş (%40 oranında) kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz tarafından enzimatik kataliz ile belirlenir. Kolesterol esterleri kolesterol esteraz tarafından serbest kolesterol ve yağ asitlerine yıkılır (Eşitlik 3.2). Oksijen varlığında kolesterol, kolesterol oksidaz tarafından  $\Delta^4$ -kolestenon ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye okside olur. Hidrojen peroksit, POD tarafından 4-AAP ve sodyum-N (2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoksianilin (HSDA) varlığında mavi-mor pigment oluşturur. Oluşan mavi-mor pigmentin 582 nm dalga boyundaki absorbansı spektrofotometrik olarak belirlenir.

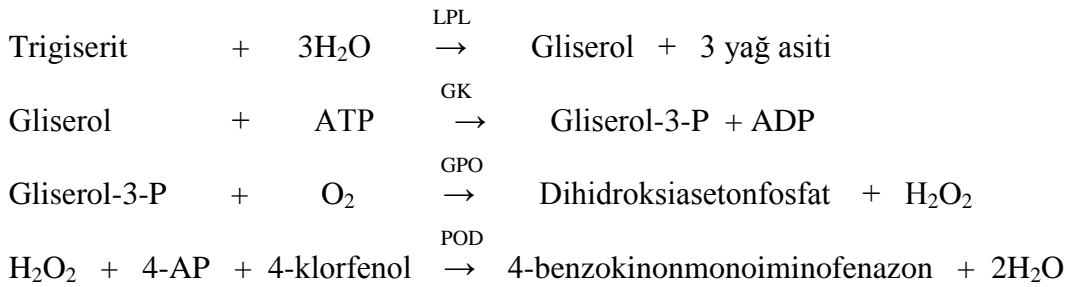
**Eşitlik 3.2.** HDL-Kolesterol ölçümünde yer alan tepkime denklemi



**c) Trigliserit Ölçümü:** Trigliserit (TG) düzeyleri enzimatik kolorimetrik (gliserolfosfat oksidaz-peroksidaz) yöntem ile ölçüldü. Yöntemin prensibi, trigliseritlerin lipoprotein

lipaz (LPL) tarafından serbest yağ asitleri ve gliserole hidrolizini, gliserolün gliserokinaz (GK) ile gliserol-3-fosfata katalizini, gliserol-3-fosfatın da gliserol fosfat oksidaz (GPO) tarafından dihidroksiaseton fosfata (DHAP) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e oksidasyonunu ve oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in POD katalizi eşliğinde fenol ve 4-aminofenazon ile tepkimesi sonucu 4-benzokinonmonoiminofenazon oluşumuna dayanmaktadır. Oluşan kinon bileşiğinin 520 nm'de verdiği absorbans HDL-kolesterol ile doğru orantılıdır (Eşitlik 3.3).

**Eşitlik 3.3.** Trigiserit ölçümünde yer alan tepkime denklemleri



**d) LDL ve VLDL Ölçümü:** LDL ve VLDL düzeyleri oransal olarak Friedwald eşitliğine göre hesaplandı (Eşitlik 3.4) (143).

**Eşitlik 3.4.** Friedwald Eşitliği

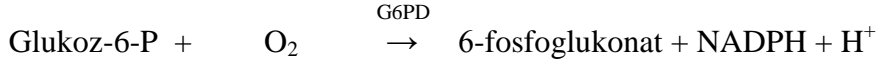
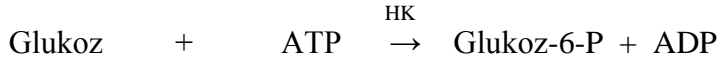
$$VLDL = \frac{\text{Trigliserit}}{5}$$

$$LDL = \text{Total} \cdot \text{kolesterol} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

**3.4.3. Açlık Kan Şekeri Ölçümü:** Açlık kan şekeri düzeyleri enzimatik heksokinaz metodu ile çalışıldı. Yöntemin prensibi, heksokinaz (HK) ve Mg<sup>+2</sup> varlığında glukozun ATP ile fosforile olmasına dayanır. Oluşan glukoz-6-P, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) ve NADP<sup>+</sup> varlığında okside olarak 6-fosfoglukonata dönüşür. Oluşan NADPH miktarı örnekteki glukoz konsantrasyonu ile direk orantılıdır ve 340 nm'deki artan absorbans değeri ölçülerek hesaplama yapılır (Eşitlik 3.5)

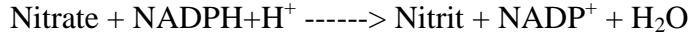


**Eşitlik 3.5.** Açlık kan şekeri ölçümünde yer alan tepkime denklemleri



#### 3.4.4. Nitrik Oksit Ölçümü

Nitrik oksit düzeyinin belirlenmesinde kolorometrik yöntem kullanılmış olup kullanılan araç, gereç ve çözeltiler Çizelge 3.2’de verilmiştir. Yöntemin prensibi, nitrat redüktaz varlığında, nitratın NADPH kullanarak nitrite indirgenmesi esasına dayanmaktadır.



Oluşan nitrit sülfamit ve N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorür ile reaksiyona girer ve kırmızı-mor diazo boyasını verir.



Bu renk 550 nm de ölçülürerek elde edilen absorbans standart eğri kullanılarak nitrik oksit konsantrasyonu hesaplandı.

**Çizelge.3.2.** Nitrik oksit ölçümünde kullanılan araç, gereç ve çözeltiler

Şişe no	İçerik	Miktar
1	Potasyum fosfat tampanu, pH 7.5, hazır	22 ml
2	Koenzim tabletleri: her tablet 0.5 mg NADPH ve 0.01 mg FAD içerir	10 tablet
3	Nitrat redüktaz	2 şişe
4	Renk solüsyonu 1: sülfanilamid	8 ml
5	Renk solüsyonu 2 : N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorür	8ml
6	Potasyum nitrat standardı	80 mM
7	Plate	1 adet

**Nitrik oksit düzeyinin belirlenmesinde kullanılan ayıraçların hazırlanması;**

**Rekasyon karışımı 2'nin hazırlanışı:** Her üç koenzim tableti 1 ml potasyum fosfat tamponunda çözüldü.

**Solüsyon 3'ün hazırlanışı:** İçerisinde nitrat redüktaz bulunan her bir şişeye 0.6 ml distile su eklendi.

**Standart çözeltilerinin hazırlanması:** Liyofilize halde olan standart solüsyonundan 80, 16, 8, 4, 1.60, 0.8, 0.4, 0.25 µM'lik standartlar hazırlandı.

**Çalışma prosedürü;**

- Standart ve örneklerden 500 µl eppendorf tüplerine konuldu. Kör içinde bir eppendorfa 500 µl distile su konuldu.
- Bütün eppendorflara içerisinde koenzim bulunan reaksiyon karışımı 2 den 50 µl eklendi ve karıştırıldı.
- Her eppendorfa içerisinde enzim bulunan solüsyon 3 ten 20 µl eklendi ve karıştırıldı. 30 dakika 20 °C de inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra hazırlanan solüsyonlardan (kör, standart, örnek) her bir kuyucuğa 150 µl konuldu.
- Bütün kuyucuklara 75 µl renk solüsyonu 1 ve 2 eklendi ve karıştırıldı.
- 20 °C'de 5 dakika inkübasyondan sonra 550 nm de ölçüm yapıldı.

### **3.4.5. eNOS T786C ve eNOS G894T Gen Polimorfizmlerinin Belirlemesi**

#### **3.4.5.1. DNA İzolasyonu**

- Prensip;** Hücreler, tüm nükleazları hemen inhibe eden bir kaotropik tuz (guanidin HCl) varlığında proteinaz K ile kısa bir inkübasyon sonunda parçalanır. Hücresel nükleik asitler pürifikasyon filtre tüplerinde bulunan özel fiber cam yapıya seçici olarak bağlanır. Bağlı nükleik asitler kontamine edici hücresel elemanlardan hızlı yıkama ve çevirme işlemleri ile arındırılır. Bu işlemin gerçekleşmesinde çizelge 3.1'de içeriği verilen inhibitör temizleyici tampon ile yıkama tamponu kullanılmaktadır. Son olarak düşük tuz elüsyonu ile nükleik asitlerin fiber cam yapıdan ayrılmaları sağlanır.

**b) Prosedür;**

1. Steril bir tüpe (1,5 ml'lik kapaklı) 200 µL tam kan alındı ve üzerine sırası ile 200 µL bağlayıcı tampon ve 40 µL proteinaz K eklendi. Proteinaz eklenmesini takiben tüplerin kapakları kapatılarak hemen karıştırıldı.
2. Tüpler 10 dakika 72°C'de inkübe edildi.
3. İnkübasyonun ardından 100µL izopropanol eklenir, iyice karıştırılır ve karışım filtre tüpüne aktarıldı.
4. Bir dakika 8000 g'de santrifüj edildi.
5. Toplama tüpü değiştirildi ve tüpe 500 µL inhibitör uzaklaştırıcı tampon eklendi. 1 dakika 8000 g'de santrifüj edildi ve toplama tüpü tekrar değiştirildi.
6. Ardından tüpe 500µL yıkama tamponu eklendi ve 1 dakika 8000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildi. Yıkama işlemi 2 defa tekrar edilir.
7. Tüpe herhangi bir çözelti eklenmeden 10 saniye 13000 g'de tekrar santrifüj edildi.
8. Filtreli tüpler, 1,5 ml'lik kapaklı DNA saklama tüplerine yerleştirilir ve 72°C'de bekletilen elüsyon tamponundan 200 µL eklenerek 1 dakika 8000 g'de santrifüj edildi.
9. Son olarak DNA elüsyon tamponunun yardımı ile 1,5 ml'lik kapaklı DNA saklama tüplerine geçtiği için filtre tüpleri uzaklaştırılır ve DNA eldesi tamamlanmış olur.

**3.4.5.2. eNOS T786C ve eNOS G894T Gen Polimorfizmleri için Primer ve Prob**

**Dizaynı**

Bütün amplifikasyon primerleri standart fosforamid kimyası (Ella Biotech GmbH) ve tüm flurofor-işaretli proplar Metabion tarafından sentezlenmiş ve ters-faz HPLC ile saflaştırılmıştır. Amplifikasyonda eNOS T786C ve eNOS G894T için bir set primer kullanıldı.

**eNOS T786C Mutasyon Analizi için Primer ve Prob Dizaynı:** eNOS T786C mutasyon analizi için kullanılan primer ve prob dizileri çizelge 3.3'de verilmiştir. Primerler T786C varyantın yer aldığı 170 bp'lik ampikon eldesi için kullanılmıştır.

T786C mutasyonun belirlenmesi için vic prob ve fam probu kullanılmıştır. Vic probun 5'ucu yakıma yellow ile işaretlenmiştir. Fam prob 13-mer oligonükleotiddir.

**Çizelge 3.3.** eNOS T786C mutasyon analizi için kullanılan primer ve prob dizileri

<b>Primer ve Problar</b>	<b>Primer ve Prob Dizileri</b>
Forward Primer	5'-CCACCAGGGCATCAAGCT- 3'
Reverse Primer	5'-CGCAGGTCAGCAGAGAGACTA- 3'
Vic Probu	5'-yakıma yellow-CTGGCTGGCTGAC- 3'
Fam Prob	5'-Fam-TCCCTGGCCGGCT- 3'

**eNOS G894T Primer ve Prob Dizaynı:** eNOS G894T mutasyon analizi için kullanılan primer ve prob dizileri çizelge 3.4'de verilmiştir. Primerler G894T varyantın yer aldığı 164 bç'lik ampikon eldesi için kullanılmıştır. G894T mutasyonun belirlenmesi için çapa prob ve belirleme probu kullanılmıştır.

Belirleme probu 164 bç'lik ampikonda G alleli ile komplementerdir. Probun 5'ucu LCRed 640 ile işaretlenmiş, (Taq polimeraz tarafından olası uzamanın engellenmesi için) 3' ucu fosforile edilmiş 23-mer oligonükleotid dizisidir.

Çapa probu belirleme probundan iki baz uzaklıktaki bölgeye komplementer 3' ucu floresanlanmış 23-mer oligonükleotiddir.

**Çizelge 3.4.** eNOS G894T mutasyon analizi için kullanılan primer ve prob dizileri

<b>Primer ve Problar</b>	<b>Primer ve Prob Dizileri</b>
Forward Primer	5'-CACTCCCCACAGCTCTGCAT- 3'
Reverse Primer	5'-CAATCCCTTTGGTGCTCACG- 3'
Belirleme Probu	5'-CCCCAGATGATCCCCCAGAACTC-FL- 3'
Çapa Prob	5'-LC-CCTTCTGCCCCCGAGCTGGTCC-PH- 3'

### 3.4.5.3. eNOS T786C ve G894T Gen Polimorfizmlerine Ait Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları

İnsan genomik DNA'sından elde edilen spesifik primerlerle hedef gen bölgesinden uygun baz çifti uzunluğunda gen fragmanı amplifiye edilir. Amplikon özel bir çift hibridizasyon probu aracılığı ile işaretlenir. Hibridizasyon problemleri, polimeraz zincir tepkimesinin (PZR) yapışma fazı esnasında amplifiye fragmanın iç dizilerine bağlanan iki farklı oligonükleotidden oluşur. Problemlerden biri 5' ucundan LightCycler-Red ile işaretli, 3' ucundan ise fosforile edilmiştir. Diğeri ise 3' ucundan floresanlanmıştır. Problemler dizi üzerinde birbirlerinden en fazla iki baz uzak olarak yerleşirler. İki floresan birbirine oldukça yakın konumlanırlar (maksimum 2 baz) ve aralarında, cihaz ışık kaynağı tarafından uyarılması ile floresan rezonans enerji transferi (FRET) gerçekleşir. Bu işlemde ışık kaynağından gelen uyarı Floresan probu uyarır ve oluşan rezonans enerjisi LightCycler-Red'i uyarır. Emilen floresan LightCycler cihazı tarafından ölçülür.

eNOS T786C mutasyon analizi için kullanılan materyallerin konsantrasyon ve miktarları çizelge 3.5'de, PZR koşulları ise çizelge 3.6'de verilmiştir.

**Çizelge 3.5.** eNOS T786C mutasyon analizinde kullanılan materyallerin konsantrasyon ve miktarları

İçerik	Konsantrasyon	Miktar
Forward primer	0,5 µM	2 µL
Reverse primer	0,5 µM	2 µL
Çapa prob	0,3 µM	2 µL
Belirleme probu	0,3 µM	2 µL
Hibridizasyon tamponu 10X*		2 µL
MgCl <sub>2</sub>	3 mM**	1,6 µL
Örnek DNA	50 ng	3 µL
Distile su		6,4 µL
Toplam tepkime hacmi		20 µL

\*10 kat yoğun hibridizasyon tamponu nükleotidler, Taq polimeraz, 10 mM Mg<sup>2+</sup> içerir.

\*\* 3 mM MgCl<sub>2</sub> 20 µL toplam hacimdeki final konsantrasyondur.

**Çizelge 3.6.** eNOS T786C mutasyon analizi için PZR koşulları

PZR aşamaları		Hedef ısı	Bekleme süresi (sn)	Isı geçiş oranı (°C/sn)	Floresan okuma
Denatürasyon		95°C	10	4,4	Yok
Amplifikasyon (45 Döngü)	Denatürasyon	95°C	10	4,4	Yok
	Yapışma	57°C	20	2,2	Tek
	Uzama	72°C	10	20	Yok
Melting Curve	Dinlenme 1	95°C	30	4,4	Yok
	Dinlenme 2	40°C	0	0,1	Yok
	Okuma	80	0	0,14	Sürekli
Soğuma		40°C	30	2,2	Yok

eNOS G894T mutasyon analizi için kullanılan materyallerin konsantrasyon ve miktarları çizelge 3.7’de, PZR koşulları ise çizelge 3.8’de verilmiştir.

**Çizelge 3.7.** eNOS G894T mutasyon analizinde kullanılan materyallerin konsantrasyon ve miktarları

İçerik	Konsantrasyon	Miktar
Forward primer	100 µM	2 µL
Reverse primer	100 µM	2 µL
Çapa prob	100 µM	2 µL
Belirleme probu	100 µM	2 µL
Hibridizasyon tamponu 10X*		6 µL
MgCl <sub>2</sub>	3 mM**	1,6 µL
Örnek DNA	50 ng	3 µL
Distile su		1,4 µL
Toplam tepkime hacmi		20 µL

\*10 kat yoğun hibridizasyon tamponu nükleotidler, Taq polimeraz, 10 mM Mg<sup>2+</sup> içerir.

\*\* 3 mM MgCl<sub>2</sub> 20 µL toplam hacimdeki final konsantrasyondur.

**Çizelge 3.8.** eNOS G894T mutasyon analizi için PZR koşulları

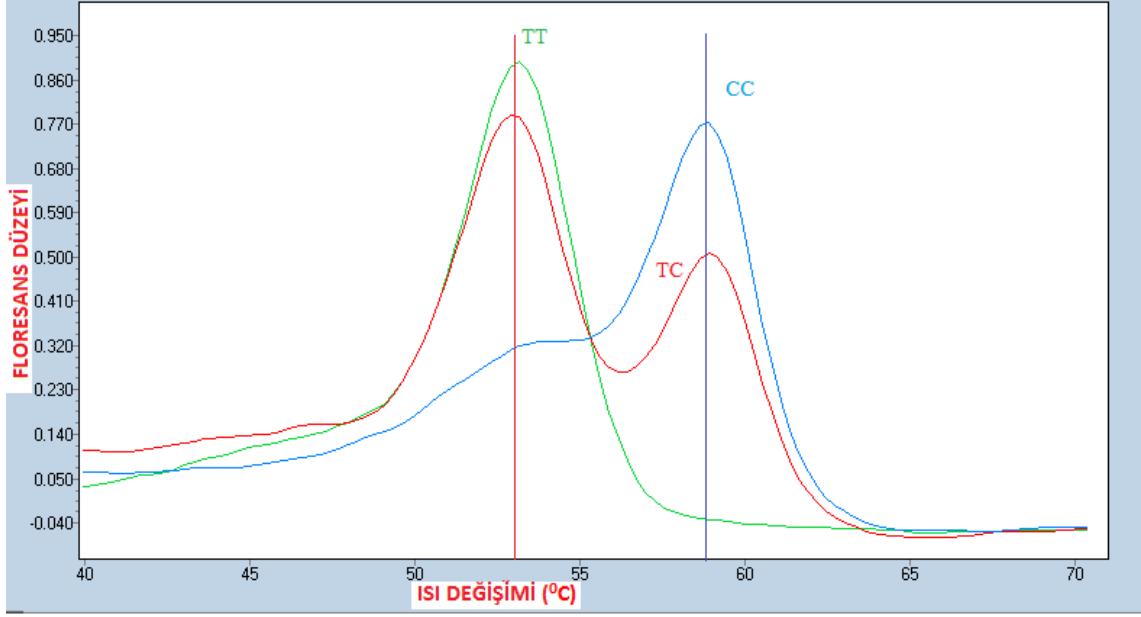
<b>PZR aşamaları</b>	<b>Hedef ısı</b>	<b>Bekleme süresi (sn)</b>	<b>Isı geçiş oranı (°C/sn)</b>	<b>Floresan okuma</b>	
<b>Denatürasyon (1 Döngü)</b>	95°C	600	4,4	Yok	
<b>Amplifikasyon (45 Döngü)</b>	<b>Denatürasyon</b>	95°C	5	4,4	Yok
	<b>Yapışma</b>	62°C	10	2,2	Tek
	<b>Uzama</b>	72°C	15	4,4	Yok
<b>Melting Curve (1 Döngü)</b>	<b>Dinlenme 1</b>	95°C	5	4,4	Yok
	<b>Dinlenme 2</b>	40°C	60	2,2	Yok
	<b>Okuma</b>	80°C	0	0,14	Sürekli
<b>Soğuma (1 Döngü)</b>	40°C	30	2,2	Yok	

#### **3.4.5.4. eNOS T786C ve G894T Gen Polimorfizmlerine Ait Genotip Belirlenmesi (Melting Curve Analizi)**

Genotip belirlemede hibridizasyon problemleri kullanılır ve problemlerin erime ısıları farkından faydalanılarak yapılır. Problemlerden birisi (çapa prob) mutasyonlu yöreye bağlanır. Diğer prob ise çapa probdan en fazla iki baz uzaklıkta aynı dizinin devamına bağlanır. Mutasyonlu ve doğal tip dizi arasındaki baz farkı bağlanan problemlerin artan ısı ile birlikte farklı zamanlarda ayrılmasına neden olur. Melting Curve analizi bu farktan faydalanarak doğal ve mutant tipleri birbirinden ayırır.

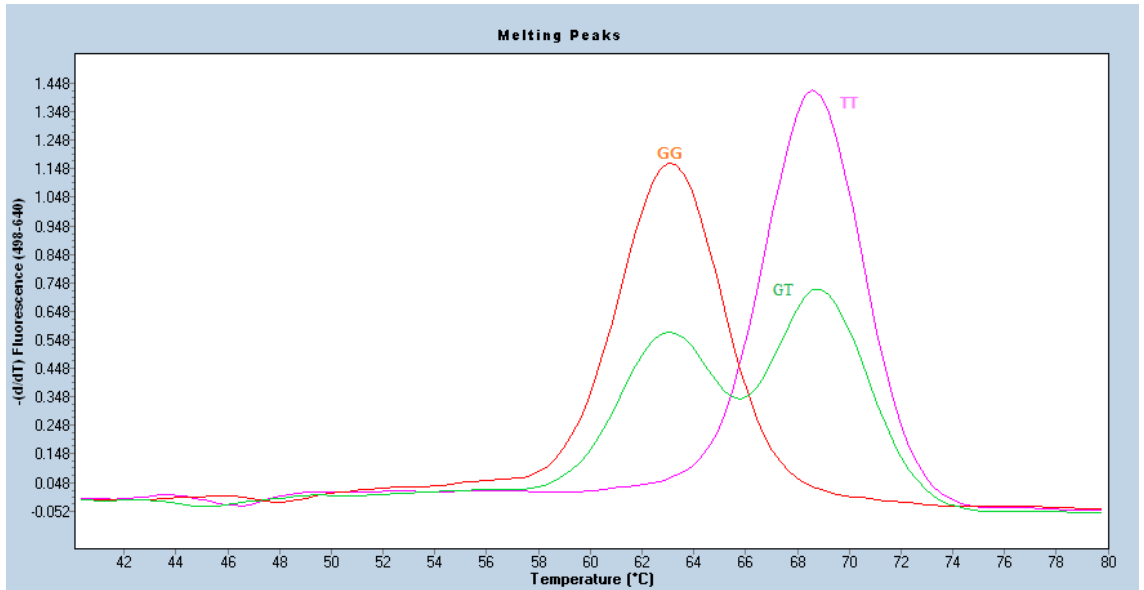
Ayrılma işleminde yani Melting Curve analizinde ısı belirli bir alt seviyeden (genellikle 40°C) belirli bir üst seviyeye (genellikle 75-85°C) kadar saniyede yaklaşık 0,1°C artar. Problemler bağlı buldukları diziden ayrıldıklarında iki prob arasındaki FRET kesilir ve sinyal üretimi olmaz.

eNOS T786C mutasyonuna ait Melting Curve analiz görüntüleri ve değerlendirmeleri şekil 3.1’de verilmiştir. Şekil 3.1’de eNOS T786C varyantlarının erime ısıları da verilmiş olup TT genotipi için erime ısı (T<sub>M</sub>) 52 °C, TC genotipi için 52 ve 59 °C ve CC genotipi için ise 59 °C’dir.



Şekil 3.1. eNOS T786C mutasyonuna ait Melting Curve analizi

eNOS G894T mutasyonuna ait Melting Curve analiz görüntüleri ve değerlendirmeleri ise şekil 3.2’de verilmiştir. Şekil 3.2’de eNOS G894T varyantlarının erime ısıları da verilmiş olup GG genotipi için erime ısısı ( $T_M$ ): 62 °C, GT genotipi için 62 ve 69 °C ve TT genotipi için ise 69 °C’dir.



Şekil 3.2. eNOS G894T mutasyonuna ait Melting Curve analizi



### 3.5. İstatistiksel Yöntemler

Sürekli verilerin (AKŞ, TK, LDL, VLDL, TG ve NO değerleri) normal dağılıma uygun olup olmadıkları Shapiro Wilk testi ile incelendi. Normal dağılıma sahip sürekli değişkenler ortalama±standart sapma şeklinde, normal dağılıma uygun dağılmayan değişkenler ise medyan (çeyreklikler) şeklinde verildi. Bağımsız iki grup karşılaştırmalarında normal dağılım varsayımı sağlandığı durumda Independent sample t testi, normal dağılım varsayımı sağlanmadığı durumda Mann Whitney U testinden yararlanıldı. İki den fazla grup karşılaştırmalarında normallik varsayımı sağlanmadığından Kruskal Wallis testinden yararlanıldı. Allellerin genotiplere dağılımı ve bu dağılımın beklenen değerlerle uyumunun (Hardy-Weinberg dengesi) incelenmesinde ki-kare testi uygulandı. Genotiplerin ve allelerin olası riskleri odds oranı hesaplanarak belirlendi. Genotiplerin diğer parametrelerle karşılaştırılması için Ki-kare testi kullanılarak belirlendi. Sonuçlar için  $p < 0.05$  anlamlılık değeri olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Bireylerin Tanımlayıcı Bilgilerine Ait Bulgular

Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kardiyoloji ve Kalp Damar Cerrahisi polikliniklerine başvurmuş 56'sı kadın, 119'u erkek olmak üzere toplam 175 birey dahil edildi. Koroner anjiyografi ile majör epikardiyal damarlarda veya dallarında çapa göre en az  $\geq$  %70 darlık tespit edilen 89 birey hasta grubu (KAH) olarak, normal koroner tespit edilen 86 birey ise kontrol grubu olarak belirlendi. Kontrol ve KAH gruplarına ait risk faktörlerinin dağılımı ve tanımlayıcı bilgileri çizelge 4.1'te verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kontrol ve KAH gruplarına ait risk faktörlerinin dağılımı ve tanımlayıcı bilgiler

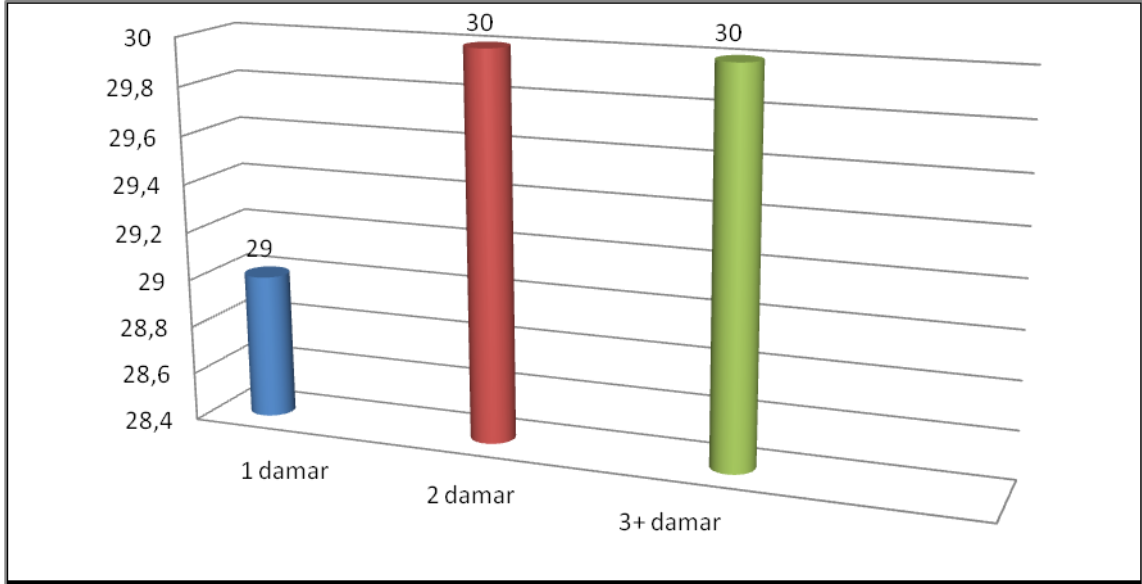
		<b>Kontrol</b>	<b>Hasta</b>	<b>p değeri</b>
<b>Yaş</b>		56,6±12,9	60,9±10,9	0,018
		<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
<b>Cinsiyet</b>	<b>Kadın</b>	38 (44,2)	18 (20,2)	0,001
	<b>Erkek</b>	48 (55,8)	71 (79,8)	
<b>HT</b>	<b>Var</b>	52 (60,5)	69 (77,5)	0,023
	<b>Yok</b>	34 (39,5)	20 (22,5)	
<b>Sigara kullanımı</b>	<b>Var</b>	23 (26,7)	27 (30,3)	0,720
	<b>Yok</b>	63 (73,3)	62 (69,7)	
<b>DM</b>	<b>Var</b>	30 (34,9)	35 (39,3)	0,652
	<b>Yok</b>	56 (65,1)	54 (60,7)	
<b>Tıkalı damar sayısı</b>	<b>1</b>	-----	29 (32,6)	
	<b>2</b>	-----	30 (33,7)	
	<b>3</b>	-----	30 (33,7)	

n:hasta sayısı, p: gruplar arası anlamlılık derecesi

\*HT; hipertansiyon, DM; Diyabetes mellitus

İlk olarak Shapiro Wilk testinden yararlanılarak verilerin normal dağılıma uygun olup olmadıkları incelendi. Yaş değerleri normal dağılıma uygun bir dağılım gösterdiği belirlendi ( $p=0,133$ ). Yaş değerleri bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptandı ( $p=0,018$ ). Cinsiyet dağılımı bakımından KAH grubundaki erkek hasta sayısı kontrol grubuna oranla yüksek olarak belirlendi ( $p=0,001$ ). Hipertansiyonun (HT) KAH oluşturması açısından risk taşıdığı bulundu ( $p=0,023$ ). Sigara tüketimi ( $p=0,720$ ) ve diyabet (DM) ( $p=0,652$ ) değişkeni ile KAH arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Şekil 4.1’de damar tıkanıklıklarına göre dağılımları verilen koroner arter hastalarının 29’unda 1 damar, 30’unda 2 damar ve 30’unda ise 3 damar tıkanıklığı saptandı.



Şekil 4.1. Koroner arter hastalarının tıkalı damar sayısına göre dağılımları

#### 4.2. Kontrol ve KAH Gruplarında AKŞ, Lipid Profili ve NO Düzeylerine Ait Bulgular

Kontrol ve KAH grubunu oluşturan tüm bireylerin AKŞ, lipid profili ve NO düzeylerine ait değerler çizelge 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Kontrol ve KAH grublarına ait AKŞ, lipit profili ve NO düzeyleri

	<b>Kontrol</b>	<b>Hasta</b>	<b>p değeri</b>
<b>Açlık Kan Şekeri</b>	101,00 [93,27-124,85]	106,20 [91,46-136,97]	0,630
<b>Total Kolesterol†</b>	185,70 [160,00-217,20]	182,06 [140,00-219,80]	0,396
<b>HDL-Kolesterol†</b>	42,45±13,18	42,35±13,29	0,965
<b>LDL-Kolesterol†</b>	104,00 [91,00-139,00]	100,01 [74,32-129,58]	0,099
<b>VLDL-Kolesterol†</b>	33,00 [24,00-43,15]	32,02 [21,03-49,55]	0,887
<b>Trigliserit*</b>	128,60 [94,70-192,75]	153,10 [109,82-220,80]	0,121
<b>NO</b>	39,24 [29,48-73,96]	38,09 [25,61-61,16]	0,246

† Sürekli değişkenler ortalama±standart sapma olarak verilmiş olup konsantrasyon birimleri mg/dl'dir

\* Değişkenlik katsayıları %20'den fazla olan parametreler medyan değerleri ile değerlendirilmiştir.

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

Shapiro Wilk testinden yararlanılarak veriler incelendiğinde HDL (p=0,629) dışında, serum AKŞ, TK, LDL, VLDL, TG ve NO değerlerinin normal dağılıma uygun dağılış göstermediği saptandı (p<0,001).

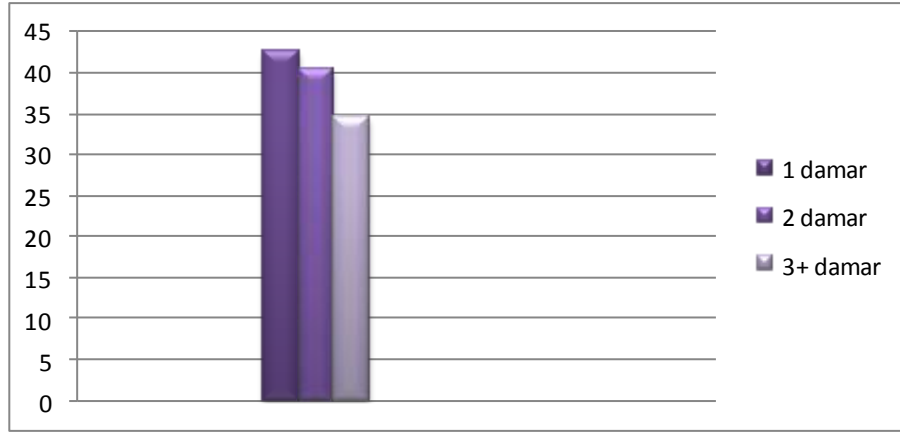
AKŞ (p=0.630), TK (p=0.396), HDL (p=0.965), LDL (p=0.099), VLDL (p=0.887), TG (p=0.121) ve NO (p=0.246) değerleri bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0.05).

### **4.3. Nitrik oksit Düzeylerinin KAH'lardaki Tıkalı Damar Sayısı ile İlişisine Ait Bulgular**

Koroner arter hastalarının tıkalı damar sayısına göre NO düzeyleri çizelge 4.3 ve şekil.4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** KAH hastalarında tıkalı damar sayısına göre NO düzeyleri

	<b>Tıkanık Damar Sayısı</b>			<b>p değeri</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
<b>NO</b>	42,61 [25,19-69,55]	40,42 [28,50-64,12]	34,57 [24,41-44,62]	0,406



Şekil 4.2. Koroner arter hastalarının tıkalı damar sayısına göre NO düzeyleri

KAH şiddeti tıkalı büyük damar (Sol ana koroner arter, sol anterior inen arter, sirkumfleks arter ve sağ koroner arter) sayısına göre 1 damar, 2 damar ve 3 damar ve üstü olarak 3 alt gruba ayrılmıştır. NO değerleri ile tıkalı damar sayıları arasında anlamlı bir fark olmadığı bulundu ( $p=0.406$ )

#### 4.4. Kontrol ve KAH Gruplarının eNOS T786C Genotiplerinde Hardy-Weinberg Dengesine Ait Bulgular

Çalışma grubunu oluşturan kontrol ve KAH grubunda eNOS T786C varyantına ait olan T/C allellerin oluşturduğu genotiplerle olması beklenen genotipler arasındaki uyum (Hardy-Weinberg dengesi) çizelge 4.7’de verilmiştir. Her iki grup için de popülasyonun dengede olduğu saptandı ( $p>0.05$ )

Çizelge 4.4. Kontrol ve KAH gruplarında eNOS T786C varyantları için Hardy-Weinberg dengesi

	Genotipler	Gözlenen değer	Beklenen değer	Ki kare	p değeri
<b>Kontrol</b>	<b>TT</b>	54	51,42	2,515	0,113
	<b>TC</b>	25	30,16		
	<b>CC</b>	7	4,42		
<b>Hasta</b>	<b>TT</b>	38	35,87	0,950	0,329
	<b>TC</b>	37	41,26		
	<b>CC</b>	14	11,87		

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

#### 4.5. Kontrol ve KAH Gruplarında eNOS T786C Genotip ve Allel Dağılımına Ait Bulgular

Kontrol ve KAH grupları arasındaki genotip ve allellerin oluşturduğu riskler binary logistik regresyon analizi ile yapılmış olup, eNOS T786C genotipleri ve allellerin dağılımı ve oluşturdukları riskler çizelge 4.4'de verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Kontrol ve KAH gruplarında eNOS T786C genotiplerinin dağılımı ve oluşturdukları riskler

Genotip	Kontrol n (%)	Hasta n (%)	OR	Güven Aralığı (%95)	p değeri
TT	54 (62,8)	38 (42,7)	-----		
TC	25 (29,1)	37 (41,6)	2,100	1,092-4,051	0,026
CC	7 (8,1)	14 (15,7)	2,842	1,048-7,708	0,040
TT	54 (62,8)	38 (42,7)	----		
TC+CC	32 (37,2)	51 (57,3)	2,265	1,235-4,153	0,008
<b>Allel sıklığı</b>					
T	133 (77,3)	113 (63,4)	-----		
C	39 (22,7)	65 (36,6)	1,964	1,227-3,137	0,005

n: hasta sayısı, p: gruplar arası anlamlılık derecesi, OR: odds oranı

Bu çalışmada eNOS T786C için, TT, TC ve CC üç farklı genotip belirlenmiştir. Hesaplamalar yapılırken TT genotipi referans olarak alınmıştır. TT genotipiyle karşılaştırıldığında, TC genotipine sahip olanlar 2,1 kat (OR=2,100 (1,092- 4,051)), CC genotipine sahip olanlar 2,842 kat (OR=2,842 (1,048-7,708)), TC+CC genotipine sahip olanlar ise 2,265 kat (OR=2,265 (1,235-4,153)) koroner arter hastalığı oluşturma riskine sahip olduğu saptandı. Ayrıca eNOS T786C polimorfizminde C alleli taşıyan bireylerde hastalık oluşturma riski T alleli taşıyan bireylere göre 1,964 kat daha fazla bulundu (p=0,005).

#### 4.6. Kontrol ve KAH grubların eNOS T786C Genotiplerine Göre NO Düzeylerine Ait Bulgular

Kontrol ve KAH grubların eNOS T786C genotiplerine göre NO düzeylerine ait bulgular çizelge 4.4’de verilmiştir.

**Çizelge 4.6.** eNOS T786C genotiplerine göre kontrol ve KAH gruplarına ait NO düzeyleri

		<b>Kontrol</b>	<b>Hasta</b>	<b>p değeri</b>
<b>NO</b>	<b>TT</b>	39,24(31,89-66,27)	38,52(23,14-56,25)	0,260
	<b>TC</b>	42,70 (20,82-95,41)	36,12(26,17-76,39)	0,693
	<b>CC</b>	33,07(23,27-98,96)	39,43(25,50-59,39)	1,000
<b>p değeri</b>		0,913	0,886	

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

Nitrik oksit düzeylerinin, hem kontrol (p=0,913) hem de hasta (p=0,886), grubunda, eNOS T786C polimorfizmi açısından farklılık göstermediği saptandı. TT genotipi (p=0,260), TC genotipi (p=0,693) ve CC genotipi (p=1,000) için de, kontrol ve hasta grubu arasında NO değerleri bakımından anlamlı bir fark saptanmadı.

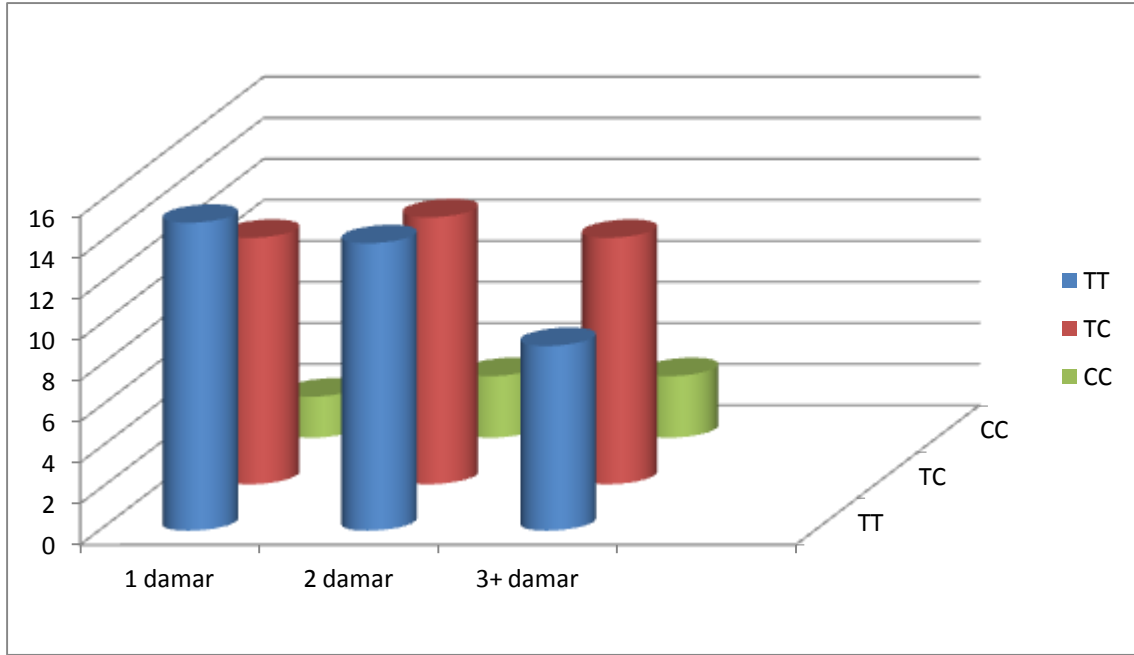
#### 4.7. KAH Grubunda eNOS T786C Genotipleri ile Tıkalı Damar Sayısı Arasındaki İlişkiye Ait Bulgular

Koroner hasta grubunda eNOS T786C genotipleri ve tıkalı damar sayıları arasındaki ilişki çizelge 4.6 ve şekil 4.3’de verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** KAH grubunda eNOS T786C genotipleri ve tıkalı damar sayısı arasındaki ilişki

Damar	Genotip			
	TT	TC	CC	
1	15 (39,5)	12 (32,4)	2 (14,3)	p=0,110
2	14 (36,8)	13(35,2)	3 (21,4)	
3	9 (23,7)	12 (32,4)	9 (64,3)	

p: gruplar arası anlamlılık derecesi



**Şekil 4.3.** Koroner arter hastalarının tıkalı damar sayısına göre eNOS T786C genotip dağılımı

Tıkalı damar sayısı ile eNOS T786C TT, TC, CC genotipleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,110).

#### **4.8. Kontrol ve KAH Gruplarının eNOS G894T Genotiplerinde Hardy-Weinberg Dengesine Ait Bulgular**

Çalışma grubunu oluşturan kontrol ve KAH grubunda eNOS G894T varyantına ait olan G/T allellerin oluşturduğu genotiplerle olması beklenen genotipler arasındaki uyum (Hardy-Weinberg dengesi) çizelge 4.11’de verilmiştir. Her iki grup için de



populasyonun dengede olduğu saptandı. ( $p>0.05$ )

**Çizelge 4.8.** Kontrol ve KAH gruplarında eNOS G894T varyantları için Hardy-Weinberg dengesi

	Genotipler	Gözlenen değer	Beklenen değer	Ki kare	p değeri
<b>Kontrol</b>	<b>TT</b>	8	6,42	0,735	0,391
	<b>GT</b>	31	34,16		
	<b>GG</b>	47	45,42		
<b>Hasta</b>	<b>TT</b>	10	7,02	2,441	0,118
	<b>GT</b>	30	35,96		
	<b>GG</b>	49	46,02		

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

#### 4.9. Kontrol ve KAH Gruplarında eNOS G894T Genotip ve Allel Dağılımına Ait Bulgular

Kontrol ve KAH grupları arasındaki genotip ve allellerin oluşturduğu riskler binary logistik regresyon analizi ile yapılmış olup, kontrol ve hasta gruplarında eNOS G894C genotipleri ve allellerin dağılımı ve oluşturdukları riskler çizelge 4.8’de verilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Kontrol ve KAH gruplarında eNOS G894T genotiplerinin dağılımı ve oluşturdukları riskler

Genotip	Kontrol n (%)	Hasta n (%)	OR	Güven Aralığı (%95)	p değeri
<b>GG</b>	49 (55,1)	47 (54,7)	-----		
<b>GT</b>	30 (33,7)	31 (36,0)	1,077	0,566-2,047	0,820
<b>TT</b>	10 (11,2)	8 (9,3)	0,834	0,303-2,295	0,725
<b>GG</b>	49 (55)	47 (54,7)	----		
<b>GT+TT</b>	40 ( 45)	39 (45,3)	1,016	0,560-1,844	0,957
<b>Allel sıklığı</b>					
<b>G</b>	128 (71,9)	125 (72,7)	-----		
<b>T</b>	50 (28,1)	47 (27,3)	0,962	0,602-1,537	0,873

n: hasta sayısı, p: gruplar arası anlamlılık derecesi

Bu çalışmada eNOS G894T GG, GT ve TT üç farklı genotip belirlenmiştir. Hesaplamalar yapılırken GG genotipi referans olarak alınmıştır. Burada odds oranlarını yorumlaması yapılmamıştır çünkü  $p > 0.05$  olduğundan anlamsızdır. T alleleline ya da TT genotipine sahip olmanın koroner arter hastalığı için bir risk oluşturmadığı saptandı.

#### 4.10. Kontrol ve KAH gruplarında eNOS G894T Genotiplerine Göre NO Düzeylerine Ait Bulgular

Kontrol ve KAH grubların eNOS G894T genotiplerine göre NO düzeylerine ait bulgular çizelge 4.9’da verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** eNOS G894T genotiplerine göre kontrol ve KAH gruplarına ait NO düzeyleri

		<b>Kontrol Grubu</b>	<b>Hasta Grubu</b>	<b>p değeri</b>
<b>NO</b>	<b>GG</b>	45,57(31,55-84,43)	38,66(23,14-52,76)	0,181
	<b>GT</b>	38,14 (26,15-90,68)	36,47 (26,77-77,43)	0,535
	<b>TT</b>	32,73 (21,75-48,28)	36,19 (27,51-54,31)	0,594
<b>p değeri</b>		0.431	0,925	

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

eNOS G894T polimorfizmi açısından, hem kontrol ( $p=0.431$ ) hem de hasta ( $p=0.925$ ) grubunda, NO değerleri bakımından anlamlı bir fark saptanmadı. GG genotipi ( $p=0.181$ ), GT genotipi ( $p=0.535$ ) ve TT genotipi ( $p=0.594$ ) için de, kontrol ve hasta grubu arasında NO değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunmadı.

#### 4.11. KAH Grubunda eNOS G894T Genotipleri ile Tıkalı Damar Sayısı Arasındaki İlişkiye Ait Bulgular

Koroner hasta grubunda eNOS G894T genotipleri ve tıkalı damar sayıları arasındaki ilişki çizelge 4.10 verilmiştir. Tıkalı damar sayısı ile eNOS G894T GG, GT ve TT genotipleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,110).

**Çizelge 4.11.** KAH grubunda eNOS G894T genotip ve tıkalı damar sayısı ilişkisi

Damar	Genotip			
	TT	GT	GG	
1	3 (30,0)	9 (30,0)	17 (34,7)	p=0,539
2	2 (20,0)	9 (30,0)	19 (38,8)	
3	5 (50,0)	12 (40,0)	13 (26,5)	

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde önemli bir mortalite ve morbidite sebebi olan koroner arter hastalığının (KAH) patogeneğinde, ateroskleroz önemli bir yere sahiptir. Ateroskleroz, kan damarlarının subendotel aralığında, arter duvarının tüm yapısal elemanları, trombosit, lökosit, özellikle monosit, makrofaj gibi çeşitli inflamatuvar hücreler ile lipit ve lipoproteinlerin birikimi içeren kronik inflamatuvar bir hastalıktır (144,145).

Endotel fonksiyonların bozulmasıyla başlayan ve değişik risk faktörlerinin de etkisiyle progresif olarak ilerleyen aterosklerozun patogeneğinde, nitrik oksit önemli bir rol oynamaktadır.

Kardiyovasküler hastalıklara (KVH) bağlı ölümler dünya genelinde son 30 yılda azalmakla birlikte Kuzey Amerika ve Avrupa'da halen en sık ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Amerika'da her yıl yaklaşık bir milyon kişi akut miyokard infarktüsü (AMI) tanısıyla hastanelere kabul edilmekte, buna ek olarak 200.000-300.000 kişi ise AMI nedeniyle hastaneye ulaşmadan hayatını kaybetmektedir. Yine ABD istatistiklerine göre yüksek kan basıncı, KAH, inme ve romatizmal kalp hastalığı gibi kardiyovasküler hastalıklara bağlı her yıl bir milyon ölüm görülmektedir ve bunun 500.000'ini sadece KAH'ları oluşturmaktadır (14).

Ülkemizdeki KAH sıklığı ise, 2000 yılındaki TEKHARF çalışması ile erişkin nüfusunda %3.8 iken, risk grubu olan 60-69 yaş arasında %14 olarak belirlenmiştir (105).

Kardiyovasküler hastalıklar mortaliteye neden oldukları kadar önemli ölçüde morbiditeye de neden olmaktadır. ABD'de 13,5 milyon kişide AMI veya anjina pektoris vardır. Bunun yedi milyonu anjina pektorisdir ve kadınlarda erkeklerden iki kat daha fazladır (14).

Konjestif kalp yetmezliği 65 yaş üstü kişilerde önemli mortalite ve hospitalizasyon nedenlerinden birisi olup, esas olarak önceden hipertansiyon veya KAH olmasına bağlıdır (14).

Önemli ekonomik yükü de beraberinde getiren KVH'nın önlenmesi ve tedavisi için 1997 yılında 259,1 milyar dolar harcanmıştır ve bunun büyük kısmını KAH'ları oluşturmaktadır. KVH'daki mortalite ve morbidite azalmasının yaklaşık %30'u

hiperlipidemisinin tedavi edilmesine, % 24'ü sigaranın kesilmesine ve % 9,5'u hipertansiyonun kontrol altına alınmasına bağlı olduğu için risk faktörlerinin modifikasyonu ve hayat tarzı değişikliklerinin önemi büyüktür (14).

Koroner arter hastalığı risk faktörleri arasında sigara kullanımı, dislipoproteinemi, diabetes mellitus ve arter kan basıncı yüksekliğinin yanı sıra, ailede miyokard infarktüsü öyküsü, dolayısıyla genetik eğilim de önemli bir yere sahiptir (8). Günümüzde aterosklerozun okside LDL, hipertansiyon, sigara gibi genetik, metabolik ve çevresel hasarlara yanıt olarak gelişen kronik inflamatuvar bir hastalık olduğu kabul edilmekte ve koroner aterosklerozun doğuracağı klinik sonuçlar açısından lümen daralmasının derecesinden ziyade inflamasyonun şiddetinin daha önemli olduğu ileri sürülmektedir (8, 60).

Günümüzde aterosklerozun sigara, okside LDL, hipertansiyon gibi genetik, metabolik ve çevresel hasarlara yanıt olarak gelişen kronik inflamatuvar bir hastalık olduğu kabul edilmekte ve koroner aterosklerozun doğuracağı klinik sonuçlar açısından lümen daralmasının derecesinden ziyade inflamasyonun şiddetinin daha önemli olduğu ileri sürülmektedir (8,60).

Koroner arter hastalığında önemli bir risk faktör olan yaş ile birlikte hastalık insidansı ve prevalansı da artar. Örneğin 40 yaşından 60 yaşına kadar miyokard infarktüsü insidansında 5 kattan fazla artış vardır. KAH'lığı prevalansı kadınlarda erkeklere oranla daha fazla yaşa bağımlı olup 65 yaşına kadar erkeklerde daha fazlayken, kadınlarda ise 65 yaştan sonra prevalansı artmaktadır. Orta yaş grubunda AMI insidansı erkeklerde, kadınlara göre 3-4 kat daha fazladır. Son 20-30 yılda KVH'lara bağlı ölümler erkeklerde yaklaşık %19, kadınlarda ise %15 oranında azalmıştır. Mortalite azalması büyük ölçüde revaskülarizasyon girişimleri, trombolitik tedavi, aspirin ve beta-bloker gibi AMI tedavisindeki modern modalitelerin yanı sıra AMI sonrası yaşayan kişilerin takip ve tedavisindeki ilerlemelere bağlıdır (10).

Erkeklerde 45 yaş, kadınlarda 55 yaş üzeri koroner kalp hastalığı için güçlü bir risk faktörüdür. Kadınlar menopoza kadar aterosklerozdan bir miktar korunurlar. Diğer risk faktörleri eşitse, erkekler ateroskleroza kadınlardan çok daha fazla eğilimlidirler (146).

Çalışmamızda, KAH ve kontrol grubunun özgeçmişlerinin sorgulanması ile elde edilen risk faktörlerine ait veriler değerlendirildi ve yapılan çalışmalara paralel olarak

(10, 146). KAH grubunun yaş ortalamalarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlendi ( $p=0,018$ ). Yine aynı şekilde çalışmalarda tek başına risk faktörü kabul edilen erkek cinsiyeti oranı KAH grubunda % 71, kontrol grubunda ise % 48 olarak bulundu (Çizelge 4.1,  $p=0,001$ ).

Hipertansiyon, koroner arter hastalığı için çok önemli bir risk faktörüdür. Bütün aterosklerotik kardiyovasküler olayların %35'inden hipertansiyon sorumludur. Hipertansiyon, bozulmuş endotel fonksiyonu, endotel lipoprotein geçirgenliğinin artışı, artmış oksidatif stres, akut plak rüptürünü tetikleyen hemodinamik stres ve artmış myokardiyal oksijen ihtiyacı gibi mekanizmalarla koroner olaylara neden olur (147). Çalışmamızda kontrol grubunun % 60,5'inin, KAH grubunun % 77,5'inin hipertansiyona sahip olduğu ( $p=0,023$ ) belirlendi (Çizelge 4.1).

Koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olan diyabetin ateroskleroza yol açma mekanizmaları, düşük HDL, yüksek trigliserid/ artmış lipoprotein kalıntı partikülleri, artmış LDL, yüksek Lp(a) konsantrasyonu, artmış lipoprotein oksidasyonu, LDL glikasyonu, artmış fibrinojen, artmış trombosit agregasyonu, artmış PAI-1, bozulmuş fibrinoliz, yüksek von Willebrand faktör seviyeleri, hiperinsülinemi ve bozulmuş endotel fonksiyonlarını içerir (148). Bu bağımsız risk faktörü değerlendirildiğinde, çalışmamızda kontrol grubunda % 34,9 oranında ve hasta grubunda % 39,3 oranında diyabet sıklığı gözlemlendi. (Çizelge 4.1,  $p=0,161$ ).

Çalışmamızdaki KAH için diğer önemli bir risk faktörü olan sigara kullanımına ait bulgular incelendiğinde KAH grubunun % 26,7'sinin, kontrol grubunun ise % 30,3'ünün sigara kullandığı belirlendi (Çizelge 4.1,  $p=0,720$ ). TEKHARF çalışması, sigara içiminin ülkemizde en yaygın risk faktörü olduğunu ortaya koymaktadır. Sigara içiciliğinin koroner kalp hastalığına neden olmasının etkenleri arasında okside LDL de dahil olmak üzere oksidasyon ürünlerinde artışa neden olmak ve HDL'nin kardiyoprotektif etkilerini ortadan kaldırmak yer alır. Bu etkiler, karbonmonoksit ve nikotinin direk etkileri ile birlikte endotel hasarı oluşturur (61).

Koroner arter hastalığının risk faktörleri arasında lipit risk faktörleri önemli bir yerdedir. Kanda total kolesterol ve LDL kolesterol düzeyleri yükseldikçe kardiyovasküler risk artar. Yapılan çalışmalarda serum LDL ve bununla ilgili lipoprotein seviyelerinin yüksekliğinin aterogenezi başlattığı ve devam ettirdiği gösterilmiştir (149). Endotel disfonksiyonu, plak formasyonu ve büyümesi, kararsız

plak, plak yırtılması ve tromboz gibi aterosklerozun tüm evrelerinde yüksek LDL seviyeleri rol almaktadır (150). Bu olayların bir sonucu okside LDL tarafından endotel hücre fonksiyonlarının bozulması ve bunun sonucunda nitrik oksit üretiminin azalmasıdır (151). TEKHARF çalışması, toplumumuzda total kolesterol düzeylerinin batılı toplumlarla karşılaştırıldığında genelde düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Türk erkek ve kadını erişkin hayata iyi kolesterol değerleri ile başlamakta, ancak bu düşük kolesterol değerleri zaman içinde korunamamakta, ilerleyen yaşla total kolesterol değerleri her iki cinsiyette de hızla yükselmektedir (105). Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, plazma HDL kolesterol düzeyi ile, daha sonra koroner olay gelişme riski arasında güçlü bir ters ilişki bulunmaktadır (152). KAH'lığı riskinin belirlenmesinde, değişik plazma lipidlerinin bir aradaki etkisini hesaba katmak ve KAH'lığı riskinin önceden kestirilmesinde plazma total kolesterol/HDL kolesterol oranını hesaplamak önemlidir. Normal olarak bu oranın 5'in altında olması istenir ve total kolesterol düzeyleri 200-250 mg/dl olanlarda girişim gereksiniminin belirlenmesinde özel önem taşır (153). TEKHARF çalışması, total kolesterol/HDL kolesterol oranının, halkımızda koroner kalp hastalığının en iyi lipid öngörücüsü olduğunu ortaya koymuştur. Aynı çalışmanın sonuçlarına göre total kolesterol / HDL kolesterol oranında 2 birimlik artış, koroner olay ve olum riskini bağımsız biçimde % 68 oranında yükseltmektedir (105). Trigliserit ve koroner arter hastalığı arasındaki ilişki, büyük oranda diyabet, obezite, hipertansiyon, yüksek LDL kolesterol ve düşük HDL kolesterol gibi diğer faktörlerle ilişkilidir (154).

Çalışmamızda açlık kan şekeri ( $p=0.630$ ), total kolesterol ( $p=0.396$ ), HDL ( $p=0.965$ ), LDL ( $p=0.099$ ), VLDL ( $p=0.887$ ) ve trigliserit ( $p=0.121$ ) değerleri bakımından kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Çizelge 4.2). KAH için önemli risk faktörleri arasında sayılan bu parametrelerde istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmamasının nedeninin ilaç kullanımı olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmaya dahil edilen bireyler, belirli risk faktörlerini taşıdıkları ve bu yüzden ateroskleroz tanısı koymak amaçlı anjiyo yapılmasına karar verilen hastalar olduğundan KAH için önemli olan risk faktörleri açısından kontrol ve hasta grubu arasında belirgin bir fark bulunamamıştır.

Uzun dönem Framingham Kalp Çalışması, kardiyovasküler hastalık gelişiminde kolesterolü majör bir risk faktörü olarak ortaya koyarak, aterosklerozun patogenezi için

kullanılabilecek ilk biyomarkırı tanımlamıştır (155). Gerçekten de, birçok klinik çalışmada, kardiyovasküler olaylar açısından risk altında olan kişilerde total ve LDL kolesterolün düzeylerinin arttığı ve bir farmakolojik tedavi uygulanarak bunların seviyelerinin azaltılmasının yararlı etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ancak normal lipoprotein konsantrasyonlarına sahip oldukça fazla sayıdaki insanda da hala ateroskleroz gelişmeye devam etmektedir ve bu nedenle, bu hastalığın gelişiminde diğer başka faktörlerinde rol aldığını akıllara getirmektedir. Aterosklerotik plak oluşumunun altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılması, hastalık oluşum sürecinin, kolesterol ve lipitlerin arteriyel duvarlarda birikmesinden öte, belirgin bir enflamatuvar yanıtın yer aldığı kompleks mekanizmalar içerdiğini ortaya koymuştur (156,157). Bu nedenle, kardiyovasküler hastalığı olan genel populasyonda tanının çok daha doğru konulabilmesi ve prognozun çok daha iyi belirlenebilmesi ve akut koroner sendromlardan etkilenen hastaların, medikal ve girişimsel tedavi rejimlerinden daha fazla fayda görebilmeleri amacıyla yönelik olarak ayrımlaşabilmesi için yeni biyolojik markırlara ihtiyaç duyulmaktadır (158).

Endotel kaynaklı bir vazodilatatör faktör olan nitrik oksit (NO), kalp-damar fizyolojisinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. NO'in vasküler endotelde ateroskleroz gelişimini önleyici çeşitli etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu etkileri arasında; trombosit ve lökositlerin endotele yapışmasını önler, vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu azaltır; LDL oksidasyonunu kısıtlayarak LDL'nin aterojenik LDL'ye dönüşümünü engeller (2,3). Vasküler endotelde NO'nun sentezlenmesinde görevli olan enzim eNOS'tur. Son yıllardaki çalışmalarda, bu enzimi kodlayan gendeki çeşitli mutasyonların bozulmuş NO salınımına, sonuç olarak da koroner arter hastalığına neden olabileceğini vurgulamaktadır (5,6).

Akarasereenont ve ark. (159), anjiyografi ile koroner lezyonun varlığı gösterilen hastalarda NO düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Yoon ve ark. (160)'nın koroner arter hastalarında, plazma NO seviyesi ve eNOS gen polimorfizmlerinin arasındaki ilişkiyi araştırdıkları bir çalışmada intron 4a/b ve Glu298Asp değişimlerini incelemişlerdir. Yoon ve ark.'nın bu çalışmasında, NO plazma seviyelerinin koroner arter hastalığı olan bireylerde kontrollere göre daha yüksek düzeyde olduğu belirtmişlerdir. Srivastava ve ark. (161) tarafından yapılan bir çalışmada ise Hindistanlı bireylerde G894T polimorfizmi ile NO seviyeleri arasında



ilişki olmadığı bildirilmiştir. Buna karşılık, Metzger ve ark. (162) ise Brezilyalı sağlıklı bireylerde NO seviyeleri ve eNOS gen polimorfizmi arasında ilişki olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda, kontrol ve hasta grubu arasında, NO düzeyinde anlamlı farklılık bulunmadı (Çizelge 4.2,  $p=0.246$ ). Bunun dışında KAH'larının tıkalı damar sayısına göre NO düzeyleri de incelendi ve anlamlı bir fark olmadığı bulundu ( $p=0.406$ ).

Ayrıca çalışmamızda eNOS T786C polimorfizmi ile NO seviyeleri arasındaki ilişki incelendi. NO düzeylerinin, kontrol ( $p=0,913$ ) ve hasta ( $p=0,886$ ) grubunda eNOS T786C polimorfizmi açısından farklılık göstermediği saptandı (Çizelge 4.5). eNOS T786C TT genotipi ( $p=0,260$ ), TC genotipi ( $p=0,693$ ) ve CC genotipi ( $p=1,000$ ) için de, kontrol ve hasta grubu arasında NO değerleri bakımından anlamlı bir fark saptanmadı (Çizelge 4.5).

Aynı şekilde eNOS G894T polimorfizmine göre NO düzeylerinde de, kontrol ( $p=0.431$ ) ve hasta ( $p=0.925$ ) grubunda, NO değerleri bakımından anlamlı bir fark saptanmadı (Çizelge 4.9). eNOS G894T GG genotipi ( $p=0.181$ ), GT genotipi ( $p=0.535$ ) ve TT genotipi ( $p=0.594$ ) için, kontrol ve hasta grubu arasında NO değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunmadı (Çizelge 4.9).

Bizim çalışmamızda dahil olmak üzere nitrik oksit seviyesi ve eNOS gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen araştırmalarda (159-162) benzerlik bulunmamaktadır. Bu durum; etnik ve coğrafik farklılık, çevresel faktörler ya da NO analizinde kullanılan yöntemlerdeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Çünkü NO'nun yarı ömrü oldukça kısa bir moleküldür. Çalışmalar arasındaki farklılıkların diğer bir nedeni olarak ta koroner arter hastalığı tanısı için kullanılan anjiyografi sonucuna göre koroner arterlerdeki darlık kriterlerinin (koroner arterlerinden en az birinde  $\geq \%70$  veya  $\geq \%50$ ) farklılıklarında kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

KAH risk faktörleri arasında sigara kullanımı, dislipoproteinemi, diabetes mellitus ve arter kan basıncı yüksekliğinin yanı sıra, ailede miyokard infarktüsü öyküsü, dolayısıyla genetik eğilim de önemli bir yere sahiptir (8).

Koroner arter hastalığına sahip olan hastaların önemli bir kısmında geleneksel risk faktörlerinin olmayışı nedeni ile son yıllarda ateroskleroz patogenezinde rol oynayan genetik ve çevresel faktörler üzerindeki çalışmalar, araştırmacıların odak noktası haline gelmiştir. Kişilerin yaşam kalitesinin artırılması açısından koroner arter

hastalığına yatkınlığının olup olmadığını erkenden öğrenebilmek ve ona göre önlem alabilmek için koroner arter hastalıklarının genetik alt yapısının belirlenmesi önemlidir (14).

Koroner arter hastalığı multifaktöriyel bir hastalık olup, prevalansı ırklar ve etnik gruplar arasında farklılık gösterebilir. Aynı şekilde KAH ile ilişkilendirilen eNOS gen polimorfizminin de çeşitli etnik gruplar arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Birçok çalışmada, farklı toplumlarda kardiyovasküler hastalıklar için eNOS genotip ilişkisi incelenmiş olmasına rağmen, kardiyovasküler hastalık riski üzerine eNOS mutasyonun etkileri tutarlı değildir (163-167).

Colombo ve ark. (163) eNOS genindeki T786C mutasyonunun İtalyan nüfusunda KAH ve yaygınlığı ile olan ilişkisini incelemişler ve CC homozigot bireylerin TT homozigotlara göre 2.5 kat daha fazla KAH'ye yakalanma riski gösterdiklerini ve koroner ateroskleroz yaygınlığının da bu bireylerde artmış olduğunu bildirmişlerdir.

Alvarez ve ark. (164) KAH grubunda eNOS T786C CC genotipini kontrollere kıyasla daha yüksek sıklıkta bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmada, eNOS T786C CC genotipine sahip KAH ve kontrol sıklıklarını sırasıyla %22 ve %14 (p=0.039) olarak bildirmişlerdir.

Rossi ve ark. (165) Kafkas populasyonunda, koroner arter hastalarını bir, iki ve üç damar hastası şeklinde sınıflandırmış ve eNOS T786C mutasyonu ile istatistiksel olarak anlamlılık sınırında bir ilişki saptamışlardır.

Colombo ve ark. (166) eNOS G894T gen polimorfizmi ile ilgili yaptıkları çalışmada, koroner arter hastaları ve kontrollerde GG, GT ve TT genotip sıklıklarını sırasıyla % 45.3, 38.8, 15.9 ve 42.1, 51.8, 6.1 olarak saptamışlardır. Bunun sonucunda eNOS G894T polimorfizmini, İtalyan toplumunda KAH oluşumu ve ciddiyeti için majör risk faktörü olarak bildirmişlerdir. Jeerooburkhan ve ark. (167) ise aynı polimorfizmi KAH için risk faktörü olarak bulmamıştır.

Bae ve ark. (168) Kore halkında yaptıkları çalışmada eNOS T786C ve G894T polimorfizmleri ve KAH hastaları arasındaki ilişkiyi değerlendirmiş ve KAH için bağımsız risk faktörü olmadıklarını bildirmişlerdir. Zhang ve arkadaşları (169) ABD'de diyabetli erkeklerde eNOS varyantları ve koroner kalp hastalığı risklerini incelemişler ve eNOS T786C ve G894T genotip dağılımları ile koroner kalp hastalığı olan veya

olmayan erkekler arasında anlamlı bir farklılık bulmamışlardır. Rittig ve ark (170) Alman popülasyonunda, bozulmuş endotel fonksiyonu ile 4a4b polimorfizmi arasında bağımsız ilişki olduğunu, ancak eNOS T786C ve G894T polimorfizmleri için geçerli olmadığını bildirmişlerdir.

Yaptığımız literatür taramasında Türkiye’de KAH ve eNOS polimorfizmi arasında ilişkiyi inceleyen bir çalışmaya rastlanılmıştır ve Tangürek ve ark. (171) tarafından yapılan bu çalışmada, C dominant bireylerde KAH’nın 2.9 kat fazla olduğu gösterilmiş olup ve eNOS T786C gen polimorfizminin KAH varlığı ve yaygınlığı için bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceğini bildirmişlerdir.

eNOS T786C ve G894T polimorfizmlerinin KAH’da olası rolünü belirlemeyi amaçladığımız bu çalışmada ayrıca kontrol grubu sonuçlarını kullanarak eNOS T786C ve G894T polimorfizmlerinin bölgemizdeki dağılımını incelemeyi de amaçladık.

Kontrol ve KAH grubunda eNOS T786C varyantına ait olan TC allellerin oluşturduğu genotiplerde Hardy-Weinberg dengesine ait bulgular incelendiğinde, her iki grup için de popülasyonun dengede olduğu saptandı (Çizelge 4.3,  $p>0.05$ ). Genotip ve allel dağılımına göre, kontrol ve KAH gruplarında eNOS T786C TT, TC ve CC genotipleri sırasıyla kontrol grubunda % 62.8, 29.1, 8.1 ve hasta grubunda ise % 42.7, 41.6, 15.7 olarak bulundu. Hasta grubunda, TT genotipine sahip olanlarla karşılaştırıldığında TC genotipine sahip olanlar 2,100 kat ( $p=0,026$ ), CC genotipine sahip olanlar 2,842 kat ( $p=0,040$ ) ve TC+CC genotipine sahip olanlar 2,265 kat daha fazla ( $p=0,008$ ) KAH oluşturma riskine sahip oldukları saptandı (Çizelge 4.4). Ayrıca eNOS T786C C alleli kontrol grubunda %22.7, KAH grubunda %36,6 sıklıkta bulundu. Çalışmamızda, C alleleline sahip olmanın 1,964 kat daha fazla hastalık için risk olabileceği bulundu ( $p=0,005$ ).

Çalışmamızda kontrol ve KAH grubunda eNOS G894T varyantına ait olan GT allellerin oluşturduğu genotiplerin de Hardy-Weinberg dengesine göre, her iki grup için de popülasyonun dengede olduğu saptandı (Çizelge 4.7,  $p>0.05$ ). eNOS G894T GG, GT ve TT genotipleri sırayla kontrol grubunda % 55.1, 33.7, 11.2 ve hasta grubunda % 5.7, 36, 9.3 olarak bulundu. GG genotipine göre karşılaştırıldığında GT ( $p= 0,820$ ) genotipinin, TT genotipinin ( $p=0,725$ ) ve GT+TT ( $p=0,957$ ) genotipinin hastalık riski içermediği saptandı. Bu sonuçlar ışığında eNOS G894T polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı (Çizelge 4.8,  $p>0.05$ ).

Yaptığımız çalışmada, koroner arter hastaları, bir, iki, üç ve üstü damar şeklinde tıkalı damar sayısına göre sınıflandırıldı. Bu gruplar ile eNOS T786C polimorfizmi (Çizelge 4.6, p=0,110) ve eNOS G894T polimorfizmi (Çizelge 4.10, p=0,539) arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Bütün çalışmalar ele alındığında, eNOS geninde bulunan polimorfizmlerin etkili olduğuna dair çalışmaların yanı sıra etkili olmadığını savunan çalışmalar da bulunmaktadır. Aterosklerozun patolojik gelişiminde NO seviyelerinin etkili olduğu bilinmekle birlikte literatürdeki eNOS genine ait polimorfik genotip dağılımı hastalık ve biyokimyasal değerler arasındaki bu çelişkili bulgular, bu genlerin her birinin tek başına fonksiyonel olmasından ziyade farklı genlerin ve çevresel faktörlerin de bu etkiye katılabileceğini düşünmekteyiz.

Bulgular değerlendirildiğinde, KAH ile ilişkili eNOS polimorfizmleri ilgili farklılıklar olsa da Mersin bölgesinde yapılan bu çalışmada, eNOS T786C polimorfizminde, TT ve TC genotipleri ve C alleli taşıyan hastalar için KAH riskinin arttığını düşünmekteyiz.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda;

- ✓ Çalışmaya katılan kontrol ve KAH grubunda erkek olma ve yaş gibi KAH için risk faktörleri değerlendirilmesinde, bu faktörler KAH gelişimi için risk oluşturduğu saptandı.
- ✓ Nitrik oksit düzeyi, kontrol ve KAH grubu arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı.
- ✓ Nitrik oksit düzeyi ile KAH grubundaki tıkalı damar sayısı arasında anlamlı bir fark bulunmadı.
- ✓ eNOS G894T polimorfizmi ile KAH arasında ilişki saptanmadı.
- ✓ eNOS T786C polimorfizminde ise TT, TC ve CC şeklinde belirlenen üç farklı genotip için, TT genotipine sahip olanlarla karşılaştırıldığında;
- ✓ TC genotipine sahip olanlar 2,100 kat,
- ✓ CC genotipine sahip olanlar 2,842 kat
- ✓ TC+CC genotipine sahip olanlar 2,265 kat daha fazla KAH oluşturma riskine sahip olduğu belirlendi.
- ✓ eNOS T786C polimorfizminde C alleleline sahip olmak 1,964 kat daha fazla KAH riskini arttırdığı belirlendi.
- ✓ Koroner arter hastalığı grubunda eNOS T786C ve G894T genotipi ile NO düzeyleri ile karşılatırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı.

Yukarıda sıraladığımız sonuçlar doğrultusunda, eNOS G894T genotipleri ile KAH arasında ilişkili bulunmazken, eNOS T786C varyantlarının KAH için risk faktörü olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

eNOS gen polimorfizmi ile ateroskleroz arasındaki ilişkiyi daha ayrıntılı ortaya koymak için, ateroskleroz hastalarının hastalık seyrine göre sınıflandırılarak ve hasta sayısı artırılarak bu polimorfizmin araştırılacağı ileri araştırmalar önermekteyiz.

## Kaynaklar

1. **Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A.** Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2003**;23:168-175
2. **Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM.** Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by Cgmp. *Am J Physiol*, **1994**; 267: 1405-1413.
3. **Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, Groot PG, Sixma JJ.** Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation*, **1992**; 85: 2284-2290
4. **Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT.** Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, **1993**, 268:17473-17488.
5. **Wang XL, Wang J.** Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Molecular genetic and metabolism*, **2000**;70:241-251.
6. **Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bayer JA.** Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2001**;22:361-368.
7. **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis. *Nature*, **1993**; 362:801-809.
8. **Libby P, Theroux P.** Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, **2005**;111:3481-3488.
9. **Furchgott RF, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **1980**;288:273-276.
10. **Libby P.** The vascular biology of atherosclerosis. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Braunwald E. Eds. *Braunwald's heart disease, a textbook of cardiovascular medicine*, 8<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2008**: 985-1026.
11. **Vane JR, Anggard EE, Botting RM.** Regulatory functions on the vascular endothelium. *N Eng J Med*, **1990**;323:27-36.
12. **Aird WC.** Endothelium as an organ system. *Crit Care Med*, **2004**;32:271-279.
13. **Hartge M, Pharm B, Kintscher U, Unger T.** Endothelial dysfunction and its role in diabetic vascular disease. *Endocrinol Metab Clin N Am*, **2006**;35:551-560.

14. **Libby P** (Bölüm çevirisi: Karasu Ç.). Aterosklerozisin önlenmesi ve tedavisi. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Eds. (Çeviri Editörü: Sağlık Y). *Harrison iç hastalıkları prensipleri*, 15. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2004**: 1382-1386.
15. **Libby P, Bonow RO, Zipes DP, Mann DL, Zipes DP, Braunwald E.** *Braunwald's Heart Disease*. 8. Baskı, Philadelphia: Elsevier, Saunders, **2008**: 985-1026
16. **Kinlay S, Ganz P.** Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol*, **1997**; 80:111-61.
17. **Drexler H.** Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol*, **1998**; 82:3-4.
18. **Khrbanda RK, Deanfield J.** Functions of the healthy endothelium. *Coron Arter Disease*, **2001**; 12:485-491.
19. **Loscalzo J.** Nitric oxide and vascular disease. *N Eng J Med*, **1995**;333:251-253.
20. **Torun E, Bayram F.** Endokrin bir organ olarak endotel ve endotelinin hipertansiyondaki rolü. *Erciyes Tıp Dergisi*, **2004**;26:126-131.
21. **Siflinger-Birboim A.** Regulation of endothelial permeability by second messengers. *New Horiz*, **1996**;4:87-98.
22. **Douglas B.** Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, **1998**; 91:3527-3561.
23. **Bombeli T, Mueller M, Haerberli A.** Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost*, **1997**;77:408-23.
24. **Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH.** The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest*, **1997**;15:99:1351-60.
25. **Lijnen HR, Collen D.** Endothelium in hemostasis and thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis*, **1997**;39:343-50.
26. **Furchgott RF, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nature*, **1980**;228:376-376.
27. **Anderson TJ.** Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol*, **1999**;34:631-638.

28. **Todd J.** Systemic Nature of Endothelial Dysfunction in atherosclerosis. *Am. J. Cardioj*, **1995**;75:71B-74B.
29. **Endres M, Laufs U, Huang Z.** Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998**;95:8880-8885.
30. **Kinlay S, Libby P, Ganz P.** Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol*, **2001**;12:383-389.
31. **William B.C, David R.** Endothelial-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrom P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circ. Res*, **1999**; 84:484-488.
32. **Nagao T, Vanhoutte PM.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium dependent relaxation. *Am. J. Resip. Cell: Mol. Biol*, **1993**;8: 1-6.
33. **Shimokawa H.** The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium dependent relaxation in rat mesenteric circulation. *J Card.Pharmacol*, **1996**;28 703-711.
34. **Matoba T.** Hydrogen peroxide is an endothelial derived hyperpolarizing factor in mice. *J. Clin. Invest*, **2000**; 106,1521-1530.
35. **Duffy SJ.** Relative contribution of vasodilator prostanoid and NO to metabolic vasodilatation in the human forearm. *Am. J. Physiol*, **1990**;276:663-670.
36. **Dai XZ.** Effect of indomethacin on coronary blood flow during graded treadmill exercise in dog. *Am J Physiol*, **1984**;247:452-458.
37. **Edlund A.** Coronary flow regulation in patients with ischemic heart disease: release of purines and prostacyclin and effect of inhibitors of prostaglandin formation. *Circulation*, **1985**;71:1113-1120.
38. **FitzGerald GA.** Increased prostacyclin biosynthesis in patient with severe atherosclerosis and platelet activation. *N. Engl. J Med*, **1984**;310:1065-1068.
39. **Duffy SJ.** Contribution of vasodilator prostanoid and nitric oxide to resting flow, metabolic vasodilatation, and flow mediated dilation in human coronary circulation. *Circulation*, **1999**;100:1951-1957.
40. **Alexander W, Schland RC.** *Hurst's the Heart*, 9<sup>nd</sup>. Ed., Chapter: 4 page 132. **1998**.
41. **Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T.** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **1988**;332: 411-5.



42. **Barton M, Kiowski W.** The therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep*, **2001**; 3: 322-30.
43. **Patricia J.M.** Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. *Circulation*, **1999**;99:1747-1752.
44. **Zouki C, Baron C, Fournier A.** Endothelin –1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells. Role of ET(A) receptors and platelet-activating factor. *Br J Pharmacol*, **1999**; 127:969-79.
45. **Ghiadoni L, Virdis A, Magagna A, Taddei S, Salvetti A.** Effect of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan on endothelial function in patients with essential hypertension. *Hypertension*, **2000**; 35: 501-6.
46. **Zhuo JL, Mendelsohn FA, Ohishi M.** Perindopril alters vascular angiotensin-converting enzyme, AT(1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease. *Hypertension*, **2002**; 39: 634-8.
47. **Lilly LS.** *Braunwald Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular medicine.* 6<sup>nd</sup>. Ed., **2001**; 996-999.
48. **Libby P.** Inflammation end atherosclerosis. *Circulation*, **2002**;105:1135-1143.
49. **Geller DA, Billiar TR.** Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*, **1998**;17:7-23.
50. **Vestweber D.** Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr Opin Cell Biol*, **2002**;14:587-93.
51. **Endemenn DH, Schiffrin EL.** Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, **2004**;15:1983-92.
52. **Öngen Z.** *Aterosklerotik Kalp Hastalıkları.* 1<sup>nd</sup>. Ed., Ankara ;Nobel **2004**;1-15.
53. **Kuhn FE, Mohler ER, Satler LF, Reagan K, Lu DY, Rackley CE.** Effects of high-density lipoprotein on acetylcholine-induced coronary vasoreactivity. *Am J Cardiol*, **1991**;68:1425-30.
54. **Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC.** Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*, **1997**;95:2068-74.
55. **Wenzel RR, Duthiers N, Noll G, Bucher J, Kaufmann U, Lüscher TF.** Endothelin and calcium antagonists in the skin microcirculation of patients with coronary artery disease. *Circulation*, **1996**;94:316-22.

56. **Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP.** Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*, **1998**;98:1842-7.
57. **Vergnani L, Hatrik S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, Brovkovych V, Fellin R, Malinski T.** Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. *Circulation*, **2000**;101:1261-6.
58. **Libby P.** The vascular Biology of Atherosclerosis. In: Braunwald E, Bonow RO, Libby P, Zipes DP. Eds. *Braunwald's Heart Disease*. 7<sup>nd</sup> Ed. Philadelphia: Sanders, **2005**;921-939.
59. <http://www.evgn.org/endothelial-dysfunction-for-general-public> (erişim tarihi: 17/02/2012)
60. **Ross R.** Atherosclerosis; an inflammatory disease. *N Engl J Med*, **1999**; 340:115–126.
61. **Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE.** Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*, **1993**;88:2149-55.
62. **Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, Brownlee M, Bones C, Newcombe RG, Lewis MJ.** Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation*, **1998**;98(18):1848-52.
63. **Ignarro JJ, Byrns RE, Wood KS.** Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radicals in vasodilatation. Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium. (Ed: Vanhoutte PM) Raven Press, New York. **1988**: 427-36.
64. **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Biosynthesis of nitric oxide from L-arginin: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem pharmacol*, **1989**;38:1709-15.
65. **Palmer RMJ, Moncada S.** A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **1989**;158: 348-52.
66. **Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, **2001**;1;357:593-615.
67. **Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH.** Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med*, **1994**; 120: 227-37.
68. **Star RA.** Nitric oxide. *Am J Med Sci (USA)*, **1993**;306:348-58.
69. [www.deu.edu.tr/DEUWeb/Icerik.php](http://www.deu.edu.tr/DEUWeb/Icerik.php) (erişim tarihi: 21/03/2012)

70. **Grisham MB.** Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**; 169: 70-5.
71. **Marletta MA.** Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide and N-Nitrosating agents. *Chem Res Toxicol*, **1987**; 249-57.
72. **Yallampalli DVM, Smith MB, Sharon MS.** Steroid hormones modulate the production of NO and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology*, **1994**;134:1971-4.
73. **Hegesh E, Sniloah J.** Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin Chim Acta*, **1982**; 125: 107-15.
74. **Lucas L, Soriano FG and Szabó C.** Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med*, **2000**; 28:37-52.
75. **Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, Van Goor H.** Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*, **2003**;199:8-17.
76. **Cannon RO.** Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem*, **1998**; 44:1809-19.
77. **Carr A, Frei B.** The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium derived nitric oxide. *Free Radical Biology Medicine*, **2000**;28:1806-14.
78. **Sessa WC.** Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2005**;1:15-8.
79. **Crabos M, Coste P, Paccalin M, Tariosse L, Daret D, Besse P, Bonoron-Adele S.** Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol*, **1997**;29:55- 65.
80. **Weller R.** Nitric Oxide A Newly Discovered Chemical Transmitter in Human Skin. *Br J Dermatol*, **1997**; 137: 665-72.
81. **Knowles RG, Moncada S.** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, **1994**; 298: 249-58.
82. **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A.** Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharm Rev*, **1991**; 43: 109-41.
83. **Kwon NS, Stuehr DS, Nathan CF.** Inhibition of tumor cells ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, **1991**;179: 442-8.
84. **Lancaster JR, Hibbs Jb JR.** EPR demonstration of ironnitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1990**; 87:1223-7.

85. **Radak D, Cvetkovic Z, Petrovic B, Lackovic V, Djordjevic-Denic G.** The content of copper and zinc in human ulcerated carotid plaque. *Srp Arh Celok Lek*, **2004**;132:80-4.
86. **Steinberg D, Witztum JL.** Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? *Circulation*, **2002**;105:2107-2111.
87. **De Caterina R, Libby P, Peng HB.** Nitric oxide decreases cytokine induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, **1995**; 96:60-68.
88. **Li Hi, Forsterman U.** Nitric oxide in pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*, **2000**;190:244-54.
89. **Stadler J, Billiar TR, Curran RD.** Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am J Physiol*, **1991**; 260:C910-6.
90. **Palmer RMJ, Hickery MS, Charles IG.** Induction of NOS in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Com*, **1993**;193(1):398-405.
91. [www.sfn.org/index.cfm?pagename=brainBriefings\\_nitricOxid](http://www.sfn.org/index.cfm?pagename=brainBriefings_nitricOxid) (erişim tarihi: 23/09/2011)
92. **Olesen J, Thomsen LL, Iversen H.** Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vasculer headaches. *Trends Pharmacol Sci*, **1994**;15:149-53.
93. **Güray A, Samancı N, Ovalı F, Dağoğlu T.** Nitrik Oksit, Fizyolojisi ve Klinik Önemi. *T. Klin Tıp Bilimleri*, **1997**; 17: 115-119
94. **Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U.** Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2000**; 1: 52-58.
95. **Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İ.H.** Nitrik Oksit ve Nörofizyopatolojik Etkileri. *T. Klin Tıp Bilimleri*, **2000**; 20: 107-111.
96. **Anggard E.** Nitric oxide: Mediyatör, Murderer, and Medicine. *Lancet*, **1994**; 343: 1199-1206.
97. **Moncada S, Higgs A.** The L-arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med*, **1993**; 329: 2002-12.
98. **Lüscher TF, Noll G.** Is it all in genes? Nitric oxide synthase and coronary vasospazm. *Circulation*, **1999**;99: 2855-2857.
99. **Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF.** Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*, **1998**;30:2494-2498.

100. **Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE.** A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*, **1996**;2:41–45.
101. **Napoli C, Ignarro LJ.** Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide*, **2001**;5:88-97.
102. **Marin J, Rodríguez-Martínez MA.** Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther*, **1997**;75:111-134.
103. **Andrew PJ, Mayer B.** Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, **1999**;15;43:521-531.
104. **Barbato JE, Tzeng E.** Nitric oxide and arterial disease, *J Vasc Surg*, **2004**;40:187-193.
105. **Onat A.** *Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı, yeni koroner olaylar ve kalpten ölüm sıklığı.* Onat A, TEKHARF, Ohan matbaacılık, İstanbul. **2000**; 16-23
106. **Braunwald E.** Harrison Kardiyolojide Gelişmeler. Kabakçı G, Güneş kitabevi. **2005**
107. **Kürüm T, Doğutan H.** Nonatherosclerotic causes of coronary artery disease. *Anadolu Kardiyol Derg*, **2003**; 3(4): 348-52.
108. <http://www.kalpvedamar.com/khnedir.html>
109. **Stary HC.** A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, **1995**;92:1355-1374.
110. **Davies MJ,** Atlas of Coronary Artery Disease, atherosclerosis, Lippincott Raven Publishers **1998.**
111. **Kubes P, Suzuki M, Granger DN.** Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **1991**; 88:4651-4655.
112. **Provost P, Tremblay J, Merhi Y.** The antiadhesive and antithrombotic effects of the nitric oxide donor SIN-1 are combined with a decreased vasoconstriction in a porcine model of balloon angioplasty. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, **1997**; 17:1806-1812.
113. **Holm AM, Anderson CB, Hauns S, Hansen PR.** Effects of L-arginine on vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis after balloon injury. *Scand Cardiovasc J*, **2000**; 34:28-32.
114. **Boulanger C, Lüscher TF.** Release of endothelin from the porcine aorta: inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*, **1990**; 85(2):587-590.

115. **Burnett Al, Lowenstien CJ, Brecht DS.** Nitric oxide a physiologic mediator of penil erection. *Science*, **1992**; 257: 401-3.
116. **Bossenge E.** Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. *Cardiovasc Drug Ther (USA)*, **1994**; 8: 601-10.
117. **Muuruganandam A, Mutus B.** Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, **1989**;165:802-9.
118. **Radomski MW.** Endogenous nitric oxide inhibits platellet adhesion to vasculer endothelium. *Lancet*, **1988**;11:1057-8.
119. **Radomsky MV, Moncada S.** Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost*, **1993**; 70:36-41.
120. **Nakaike R, Shimokawa H, Yasutake H, Sumimoto H, Ito A, Numaguchi K.** Effects of L-arginine analogues on vasomotion of isolated porcine coronary arteries. *Am J Physiol*, **1995**; 268:1966-1972.
121. **Marletta MA, Hurshman AR, Rusche KM.** Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol*, **1998**;2:656-63.
122. **Richard K.** Nitric oxide synthases. *The Biochemist Nov*, **1994**;16:3-6.
123. **Marletta MA.** Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The J. Biol. Chem*, **1993**;268:12231-4.
124. **Croen KD.** Evidence for an antiviral effect of NO. *J Clin Invest*, **1993**;91:2446-52.
125. **Dunlop NE, Benjamin HW and Briles ED.** The intracelluler nature of salmonella infection. *Macrophage*, **1994**;18: 303-12.
126. **Liew FY, Li Y, Millott S.** TNF-alpha induced macrophage leishmanicidal activity is, mediated by nitric oxide from Larginine. *Immunology*, **1990**;71: 556-9.
127. **Drexler H, Zeiher AM, Meinzerk H.** Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic human. *J Clin Invest*, **1992**; 90: 1248-53.
128. **Katayama Y.** Nitric oxide: Mysterious messenger. *Dojindo News Letter*, **1995**; 1:1-20.
129. **Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K.** Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, **1993**;328: 399-402.

130. **Synder SH**. Nitric oxide and neurons. *Curr. Opin. Neurobiol*, **1992**;2:323-38.
131. **Chan Y, Fish EJ, D'Abreo C, Lin S**. The Cell-specific Expression of Endothelial Nitric-oxide Synthase a role for DNA methylation. *The Journal of Biological Chemistry*, **2004**; 279: 35087–35100.
132. **Tai SC, Robb GB and Marsden PA**. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2004**; 24:405-412.
133. [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)
134. **Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae**. From cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rew*, **2002**; 54: 431-467.
135. **Vini G, Khurana MD, PhD; Youvraj R, Sohni PhD; Wells I. Mangrum**. Endotel nitric oxide synthase T-786C Single nucleotide polymorphism. A Putative genetic marker differentiating small versus large ruptured intracranial aneurysms. *Stroke November*, **2003**; 2555-2559.
136. **Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, and Hingorani AD**. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation*, **2004**; 23,109:1359-1365.
137. **Gerritsen ME**. Genetic variations in vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase and their contributions to human disease. *Microcirculation*, **2005**; 12:129-140.
138. **Wattapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA**. Therapeutic implicatons of human endothelial nitric oxide synthase gene polimorphism. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2001**; 22:361-367.
139. **Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshmura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M**. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*, **1998**; 32:3–8.
140. **Stangl K, Cascorbi I, Laule M, Klein T, Stangl V, Rost S, Wernecke KD, Felix SB**. High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease. *Pharmacogenetics*, 10, **2000**; 133–140.
141. **Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A**. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun*, **1998**; 245:190-193.
142. **Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T**. T-786-C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*, **1999**; 2864–2870.

143. **Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L.** Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin Chem*, **1990**; 36:15-19.
144. **Leitinger N.** Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res*, **2005**; 49:1063-71.
145. **Naseem KM.** The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*, **2005**; 26:33-65.
146. İç Hastalıkları. **İlçin G, Biberöglu K, Süleymanlar G, Ünal S.** Güneş Kitabevi, 2. baskı, **2003**;449-474.
147. **Franklin SS, Khan SA, Wong ND.** Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart disease ? The Framingham Heart Study. *Circulation*, **1999**; 100: 354.
148. **Fuster V, Alexander RW, O'Rourke R.** Hurt's The Heart. 10. Baskısının Türkçe çevirisi. And Danışmanlık Eğitim Yayıncılık ve Organizasyon Ltd. Şti. 1. Basım. **2002**; 1065-1109
149. **Babiak J, Rudel LL.** Lipoproteins and atherosclerosis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, **1987**; 1:515.
150. **Flavahan NA.** Atherosclerosis or lipoprotein induced endothelial dysfunction: Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/ nitric oxide activity. *Circulation*, **1992**; 85:19-27.
151. **Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS.** Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, **1995**; 332: 481.
152. **Pocock SJ, Shaper AG, Phillips AN.** HDL-Cholesterol, triglycerides and total cholesterol in ischaemic heart disease. *Br Med J*, **1989**; 298: 998-1002.
153. **Assman G, Schulte H.** Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerosis and coronary artery disease. *Am J Cardiol*, **1992**; 70:733-737.
154. **Reaven GM.** Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: role in hypertension, dyslipidemia, and coronary heart disease. *Am Heart J*, **1991**; 121:1283-1288.
155. **Framingham Score.** Implications for future risk assessment: results from a large cohort study in southern Germany. *Circulation*, **2004**; 109:1349-1353.
156. **Vaina S, Stefanadis C.** Detection of the vulnerable coronary atheromatous plaque. Where are we now? *Int J Cardiovasc Intervent*, **2005**; 7:75-87.



157. **Biomarkers Definitions Working Group.** Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* **2001**; 69:89-95.
158. **Ferri N, Paoletti R, Corsini A.** Lipid-modified proteins as biomarkers for cardiovascular disease: a review. *Biomarkers*, **2005**; 10:219-237.
159. **Akarasereenont P, Nuamchit T, Thaworn A, Leowattana W, Chotewuttakorn S, Khunawat P.** Serum nitric oxide level in patients with coronary artery disease. *J Med Assoc Thai*, **2001**; 84 Suppl 3:S730-9.
160. **Yoon Y, Song J, Hong SH and Kim JQ.** Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem*, **2000**; 46:1626-1630.
161. **Srivastava K, Biswas UK, Narang R, Varghese JJ, Das N.** Prevalence of eNOS Glu298Asp polymorphism in healthy volunteers from a region of Northern India. *Community Genet*, **2005**; 8(3):180-183.
162. **Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagasaki S.** Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenetics and Genomics*, **2005**; 15:565-570.
163. **Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, and Masetti S.** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem*, **2003**; 49:389-395.
164. **Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JR, Iglesias-Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzalez I, Alvarez V, Coto E.** Association between the NOS3 (786 T/C) and the ACE (I/D) DNA Genotypes and Early Coronary Artery Disease. *J Biol Chem*, **2001**; 5:343-348.
165. **Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G, Pedon L, Cavallin M, Maiolino P, Pessina AC.** The T -786C Endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. *J Am Coll Cardiol*, **2003**; 41:930-937.
166. **Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Rossi G, Clerico A, Biagini A.** Evidence for association of common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart*, **2002**; 87: 525-528.
167. **Jeerooburkan N, Jones LJ, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Wallace P, Humphries SE.** Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension*. **2001**; 38: 1054-1061.
168. **Bae J, Kim IJ, Ho Hong S, Sung JH, Lim SW, Cha DH, Wook Cho Y, Doyeun Oh D.** Association of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms with coronary artery disease in Korean individuals with or without diabetes mellitus. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **2010**; 719-724.

169. **Zhang C, Lopez-Ridaura R, Hunter DJ, Rifai N and Hu FB.** Common variants of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary heart disease among US diabetic men. *Diabetes* 55, **2006**; 2140-2147.
170. **Rittig K, Holder K, Stock J, Tschritter O, Peter A, Stefan N, Fritsche A, Machicao F, Häring HU and Balletshofer B.** Endothelial NO-synthase intron 4 polymorphism is associated with disturbed in vivo nitric oxide production in individuals prone to type 2 diabetes. *Horm Metab Res*, **2008**; 40: 13-17.
171. **Tangurek B, Ozer N, Sayar N, Terzi S, Yilmaz H, Dayi SU, Ciloglu F, Aksu H, Asilturk R, Cagil A.** The relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T786C) and coronary artery disease in the Turkish population. *J Am Coll Cardiol.*, **2003**; 19;41:930-7.

## ÖZGEÇMİŞ

Şenay Balcı Fidancı, 1980 yılında Mersin’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Mersin’de tamamladıktan sonra 2003 yılında Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesinden mezun oldu. 2005 yılında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilimdalı, Mikrobiyoloji bilim dalında "Ankara'da Tüketime Sunulan Bazı Balıklarda Listeria Türlerinin İzolasyonu ve Bulunma Sıklığı" adlı yüksek lisans tezini tamamlayarak bilim uzmanı ünvanını aldı. 2010 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2011 yılında araştırma görevlisi kadrosuna atandı ve halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.