

T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KORONER ARTER HASTALIKLARINDA GENETİK RİSK FAKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ

Biolog Bahadır ERCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

111921

DANIŞMANI

Doç. Dr. Lülüfer TAMER

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

MERSİN-2002

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

KORONER ARTER HASTALIKLARINDA GENETİK RİSK FAKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ

Biolog Bahadır ERCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç.Dr. Lülüfer TAMER

Bu tez, Mersin Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından, SBE TTB (BE) 2001-3 nolu proje olarak desteklenmiştir.


Tez No: ...10.....

MERSİN-2002


Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Bahadır ERCAN'ın yüksek lisans programı çerçevesinde yürütülmüş olan "Koroner Arter Hastalıklarında Genetik Risk Faktörlerinin Belirlenmesi" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: .../.../2002


Prof. Uğur ATIK
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı Bşk.
Jüri başkanı


Doç.Dr. Lülüfer TAMER
Mersin Üniversitesi
Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi
Jüri Üyesi


Yrd.Doç.Dr. Gürbüz POLAT
Mersin Üniversitesi
Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Enstitü yönetim kurulunun 29.8.2002 tarih ve 10-3 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Canan Erdoğan


TEŞEKKÜR

“Koronar Arter Hastalıklarında Genetik Risk Faktörlerinin Belirlenmesi” başlıklı tezimin hazırlanması sırasında benden değerli yardımlarını esirgemeyen başta Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı Başkanı Prof Uğur ATİK’e, tez danışmanım Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Lülüfer Tamer’e, Mersin Üniversitesi Biyokimya Anabilimdalı Öğretim Üyeleri, Yard. Doç.Dr. Gürbüz Polat, Yard.Doç.Dr. Gülçin Eskandari, Yard.Doç.Dr. Ali Ünlü, Yard.Doç.Dr. Burak Çimen’e, Biyokimya Anabilimdalı Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma ve tüm Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca çalışmamın istatistiksel analizleri sırasında katkı ve yardımlarından dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilimdalı Öğretim Üyesi Yard.Doç.Dr. Arzu Kanık’a ve tez çalışmamı destekleyen Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu’na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
EŞİTLİKLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİ	3
2.1.Koroner Kalp Hastalığı	3
2.1.1.Ateroskleroz İçin Öne Sürülen Teoriler	3
2.1.1.1.Aterosklerotik Lezyon Oluşumu ve Gelişimi	4
2.1.1.2.Okside LDL Oluşumu	6
2.2.Koroner Arter Hastalığı İle İlişkili Risk Faktörleri	8
2.2.1. Koroner Arter Hastalığı İle İlişkili Mutasyonlar	9
2.2.1.1.Koagülasyon İle İlişkili Mutasyonlar	9
2.2.1.2.Lipoproteinler İle İlişkili Mutasyonlar	9
2.2.1.3.Kan Basıncının Regülasyonu İle İlişkili Mutasyonlar	9
2.3. Lipoproteinler ve Apolipoproteinler	10
2.3.1.Lipoproteinler	10
2.3.2.Apolipoproteinler	10
2.3.2.1.Apolipoprotein Genleri	11
2.3.2.2.Apolipoproteinlerin Yapısal Özellikleri	12
2.3.3.Lipoprotein Metabolizmasında Yer Alan Diğer Proteinler	17
2.3.3.1.Enzimler	17
2.3.3.2.Reseptörler	19
2.3.3.3.Lipoproteinler ile İlişkili Transfer Proteinleri	21
2.3.4. Lipoproteinler ile İlişkili Mutasyonlar	22
2.3.4.1. HDL ile İlişkili Mutasyonlar	22
2.3.4.2. LDL ile İlişkili Mutasyonlar	24
2.4.Hemostaz ve Koagülasyon Sistemi Elemanları	26
2.4.1.Hemostaz	26
2.4.1.1.Primer Hemostaz	26
2.4.1.2.Sekonder Hemostaz	28
2.4.2.Koagülasyon ile İlişkili Mutasyonlar	29
3.MATERYAL VE METOD	31
3.1.Araç ve Gereçler	31
3.1.1.Kimyasal Maddeler	31
3.1.2. Aletler	31
3.1.3. Kullanılan Kitler	31
3.1.4.Ayırıcıların Hazırlanması	32

3.1.5.Çalışma Grubu ve Örnek Alımı	33
3.2. Yöntemler	33
3.2.1. Serum Lipid ve Lipoprotein Ölçümleri	33
3.2.1.1.Total Kolesterol Ölçümü	33
3.2.1.2.HDL-Kolesterol Ölçümü	34
3.2.1.3.Trigliserit Ölçümü	34
3.2.1.4.LDL ve VLDL Ölçümü	35
3.2.1.5.Apolipoprotein A-I Ölçümü	35
3.2.1.6. Apolipoprotein B Ölçümü	35
3.2.2. Apo E, Apo B100, Faktör V ve Protrombin Mutasyonlarının Saptanması	35
3.2.2.1.DNA İzolasyonu	35
3.2.2.1.1.Prensip	35
3.2.2.1.2.Protokol	36
3.2.2.2.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mutasyon Görüntüleme	36
3.2.2.2.2.Apolipoprotein E, B, Faktör V ^{Leiden} ve Protrombin G20210A için PCR Protokolleri	37
3.3 İstatistiksel Yöntemler	42
4.BULGULAR	44
4.1. Hasta Ve Kontrol Grubuna Ait Apo E Gen Polimorfizmi ve Lipid Düzeyleri İle Olan İlişkisi	43
4.2. Hasta Ve Kontrol Grubuna Ait Apo B100(3500) Mutasyonları	45
4.4. Hasta Ve Kontrol Grubuna Ait Fv ^{Leiden} Mutasyonu Sonuçları	45
4.5. Hasta Ve Kontrol Grubuna Ait Protrombin G20210A Mutasyonu Sonuçları	45
5.TARTIŞMA	47
6.SONUÇ	53
7.KAYNAKLAR	54
8.ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1: Komplike lezyon gelişmiş koroner arter kesiti	4
Şekil 2.2: Aterosklerozda trombozun yeri	6
Şekil 2.3: Okside LDL'nin aterogenezdeki rolü	8
Şekil 2.4: Apolipoprotein gen ailesine ait apolipoproteinlerin ekzon ve intron yerleşimleri	11
Şekil 2.5: Apolipoproteinlerde rastlanılan polar ve apolar heliks yapılar ve lipoproteinlerde yerleşimleri	13
Şekil 2.6: Apo B-100 gen yapısı ve fonksiyonel bölgeleri	14
Şekil 2.7: LDL reseptör ailesi	20
Şekil 3.1: Apo E kodon 158 için melting curve analiz grafiği	40
Şekil 3.2: Apo B100 kodon 3500 (G9775A) için melting curve analiz grafiği	40
Şekil 3.3: Protrombin (G20210A) için melting curve analiz grafiği	41
Şekil 3.4: Faktör V ^{Leiden} için melting curve analiz grafiği	41
Şekil 4.1: Apolipoprotein E allel dağılımı	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1: Apolipoprotein E polimorfları, mutasyon sonucu oluşan aminoasit yerdeğişimi ve relatif LDLR bağlama aktiviteleri	25
Çizelge 2.2: Kan koagülasyonunda görev alan faktörler ve fonksiyonları	29
Çizelge 2.3: Diğer koagülasyon sistemi elemanları	29
Çizelge 3.1: DNA İzolasyonunda kullanılan high pure PCR templat kit içeriği	32
Çizelge 3.2: Light Cyler-Apo E mutation detection kit (codon 112 and 158) içeriği ve örnek başına kullanılan miktarları	37
Çizelge 3.3: Light Cyler-Apo B Mutation detection kit (codon 3500) içeriği ve örnek başına kullanılan miktarları	38
Çizelge 3.4: Light Cyler-Prothrombin (G20210A) mutation detection kit içeriği ve örnek başına kullanılan miktarları	39
Çizelge 3.5: Light Cyler-factor V ^{Leiden} mutation detection kit içeriği ve örnek başına kullanılan miktarları	39
Çizelge 4.1: Apo E geni allelerine göre lipoproteinlerin ve apolipoprotein A-I ve B düzeylerinin dağılımı	44
Çizelge 4.2: Apo E genotiplerinin görülme sıklığı	44
Çizelge 4.3: Apo B-100 (C9774T ve G9775A) mutasyonunun hasta ve kontrol grubundaki dağılımı	45
Çizelge 4.4: Faktör V ^{Leiden} mutasyonunun hasta ve kontrol grubundaki dağılımı	45
Çizelge 4.5: Protrombin G20210A mutasyonunun hasta ve kontrol grubundaki dağılımı	46

EŞİTLİKLER DİZİNİ

Sayfa No

EŞitlik 3.1: Total kolesterolün ölçümünde yer alan reaksiyonların denklemleri	34
EŞitlik 3.2: HDL-Kolesterolün ölçümünde yer alan reaksiyonların denklemleri	34
EŞitlik 3.3: Trigliserit ölçümünde yer alan reaksiyonların denklemleri	35
EŞitlik 3.4: LDL ve VLDL'nin hesaplanması için Friedewald eşitliği	35



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

4-AP	4-aminofenazon
4-APP	4-aminoantripin
A	Adenin
ABC1-transporter	ATP-Binding Cassette Transporter
ACAT	Asil-CoA:Kolesterol Asiltransferaz
ACE	Anjiotensin Konverting Enzim
ADP	Adenozin Difosfat
Arg	Arjinin
AT1R	Anjiotensin II Tip I Reseptör
ATP	Adenozin 5'-Trifosfat
bç	Baz Çifti
C	Sitozin
Ca	Kalsiyum
CE	Kolesterol Esteraz
CETP	Kolesterol Ester Transfer Protein
CHOD	Kolesterol Oksidaz
Cys	Sistein
Da	Dalton
DAG	Diasilgliserol
DHAP	Dihidroksiaseton Fosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
dTTP	Deoksitimidintrifosfat
dUTP	Deoksiüridintrifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ELAM	Endotelial Lökosit Adezyon Molekülü
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
FRET	Floresan Rezonans Enerji Transferi
G	Guanin
Gln	Glutamin
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
gp	Glikoprotein
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HL	Hepatik Lipaz
HMWK	Yüksek Moleküler Ağırlıklı Kininojen
IDL	Ara Yoğunluklu Lipoprotein
KAH	Koroner Arter Hastalığı
kb	Kilo Baz
KE	Kolesterol Esterleri
KKH	Koroner Kalp Hastalığı
LCAT	Lesitin Kolesterol Asil Transferaz

LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LDLR	LDL Reseptörü
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPL	Lipoprotein Lipaz
LRP	LDL Reseptör Benzeri Protein
MCP-1	Monosit Kemotaktik Protein
M-CSF	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
MI	Miyokard Enfarktüsü
MM-LDL	Minimal Okside LDL
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTHFR	Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
MTP	Mikrozomal Trigliserit Transfer Protein
NPXY	N:Arjinin, P:Prolin, X:Herhangi Bir Amino Asit, Y:Tirozin
Ox-LDL	Okside LDL
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PK	Prekallikrein
PLTP	Fosfolipid Transfer Protein
POD	Peroksidaz
RFLP	Restriksiyon Lenght Fragment Polimorfizm
SK	Serbest Kolesterol
T	Timin
T-KOL	Total Kolesterol
tPA	Doku Tipi Plazminojen Aktivatörü
Trig	Trigliserit
uPA	Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü
VCAM	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

ÖZET

KORONER ARTER HASTALIKLARINDA GENETİK RİSK FAKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ

Koroner arter hastalığı, gelişmiş ülkelerde en yaygın ölüm sebeplerinden birini oluşturmaktadır. Koroner kalp hastalığı, kalp kaslarına giden kan akışının azalması nedeni ile oluşan miyokard iskemisi, doku nekrozu ve miyokard enfarktüsü ile sonuçlanan bir hastalıktır.

Koroner arter hastalıklarında sigara kullanımı, hipertansiyon, diyabet, kötü beslenme, obezite ve fiziksel olarak inaktif bir yaşam gibi değiştirilebilen ve yaş, cinsiyet ve genetik yatkınlık gibi değiştirilemeyen risk faktörleri vardır. Kişilerin yaşam kalitesinin artırılması açısından, koroner arter hastalıklarına yatkınlığının olup olmadığını erkenden öğrenebilmek ve ona göre önlem alabilmek için koroner arter hastalığı gibi mortalite ve morbidite oranı yüksek olan koroner arter hastalıklarının genetik alt yapısının belirlenebilmesi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Mevcut bilgilerin ışığı altında çalışmamızda, bölgemizde koroner arter hastalıklarında genetik risk faktörleri olduğu düşünülen Apo E, Apo B, Protrombin ve Faktör V mutasyonları çalışılmıştır. Ayrıca lipoproteinler ile ilişkili olan mutasyonlardan Apo E gen polimorfizmleriyle serum lipid lipoproteinler ve apolipoproteinler arasındaki korelasyon incelenmiştir.

Apo E, Apo B, Faktör V ve Protrombin mutasyonları real time PCR (Light Cycler) cihazı kullanılarak, serum lipoprotein, trigliserit düzeyleri enzimatik kolorimetrik yöntem, Apo A-I ve Apo B düzeyleri ise immünotürbidimetrik yöntem kullanılarak Cobas integra cihazında çalışılmıştır.

Çalışma sonucunda Apo B100'ün kodon 3500 C9774T, G9775A olmak üzere iki mutasyonu taranmış olup ne hasta ne de kontrol grubunda bu mutasyonlara rastlanmamıştır. Apo E'nin bilinen E2,E3 ve E4 allellerinin sıklığı hasta ve kontrol grubunda sırasıyla %12,2;5,0, %73,9;80,7, %14,0;14,3 olarak bulunmuştur.

Faktör V^{Leiden} mutasyonuna hasta grubunda %6,2, kontrol grubunda ise %9,8 oranında rastlanmıştır. Protrombin G20210A mutasyonuna kontrol grubunda hiç rastlanmamıştır, hasta grubunda ise %4,6 sıklıkta rastlanmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre Apo B (3500) C9774T, G9775A mutasyonuna hasta ve kontrol grubunda rastlanılmamıştır, E2 allel sıklığı kontrol grubuna oranla hasta grubunda daha yüksek bulunmuştur (odds oranı= 0.386 CI: 0.149-0.998). Hasta grubunda Protrombin G20210A mutasyonu olmayanların mutasyonu olanların yarısı kadar risk altında olduğu saptanmıştır (p=0,021). Faktör V^{Leiden} mutasyonu hasta ve kontrol grubunda anlamlı bir dağılım göstermemiştir (p=0,064).

Anahtar Sözcükler: Apo B100(3500), Faktör V^{Leiden}, Protrombin G20210A, Apo E gen Polimorfizmi ve Koroner Arter Hastalığı.

ABSTRACT

THE DETERMINATION OF GENETIC RISK FACTORS IN CORONARY ARTER DISEASE

Coronary artery disease is the major cause of death in developed countries. Coronary arter disease is a disease results with myocardial infarction, tissue necrose and myocardial ischemia caused by decreased blood flow to coronary myocytes.

There are preventible risk factors as cigarette consumption, hypertension, diabetes, obesity, diet, physical inactivity and unpreventible risk factors such as age, sex and genetic susceptibility. In order to increase the life span of people, the genetic background of the coronary artery disease which have a high rate of mortality and morbidity must be determined therefore necessary protections could be taken. There are so many studies, which are going on, the genetics of coronary artery disease in worldwide.

In this study we aimed to determine the mutations of the molecules Apo E, Apo B, Prothrombin and Factor V which are considered as genetic risk factors of coronary arter disease also we investigated the corrolation between Apo E gene polymorphism and blood lipids, lipoproteins, and apolipoproteins.

In our results, there are no mutations of Apo B100 (C9774T and G9775A) neither in patients nor in the control group. The distribution of E2,E3 and E4 the common alleles of apo E in patients and control group are %12,2;5,0, %73,9;80,7, %14,0;14,3, respectively. The factor V ^{leiden} mutation is present in both group (%6,2 in patients, %9,8 in control group) but the prothrombin G20210A mutation is presents only in the patients group with the frequency of %4,6.

To our study there are no mutations of Apo B100 (3500) neither in patients nor in the control group. Apo E2 allel frequency is more frequent in patient group but it isn't stasittically maeningful (odd's ratio=0,386 CI: 0,149-0,9978). Healty

individuals are at half of risk of those carrying prothrombin G20210A mutation (p=0,021). The distribution of factor V^{Leiden} mutation is not statistically meaningful (p=0,064).

Key Words: Apo B100(3500), Factor V^{Leiden}, Prothrombin G20210A, Apo E gene Polymorphism and Coronary Artery Disease



1.GİRİŞ ve AMAÇ

Koroner Kalp Hastalığı (KKH), günümüzde mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerinden biridir. Bu hastalığın tedavisindeki gelişmelere karşın görülme sıklığı artmaktadır. Koroner kalp hastalığı, kalp kaslarına giden kan akışının azalması nedeniyle oluşan miyokard iskemisi, doku nekrozu ve miyokard enfarktüsü (MI) ile sonuçlanan bir hastalıktır. İskemi genellikle ateroskleroz, tromboz, spazm ya da emboli gibi nedenlerle kanın 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 (1).

Koroner arter hastalığının en önemli sebeplerinden biri olan ateroskleroz, damar duvarlarında kolesterol birikimi ile karakterize komplike bir hastalıktır. Erken yaşlarda gelişmeye başlar. Çeşitli çevresel ve genetik faktörler gelişimini hızlandırmaktadır. Ateroskleroz için önemli bir risk faktörü olan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) partikülleri dolaşımdan reseptör aracılığıyla temizlenmektedir (2). Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüne bağlanmada görev alan apolipoproteinlerde (Apo B-100, Apo E) var olan herhangi bir mutasyon, serum LDL kolesterol düzeylerini arttırmakta ve bu durum da ateroskleroz gelişimi için uygun ortamın oluşmasına yol açmaktadır (2).

Ateroskleroz fizyopatolojisi incelendiğinde trombüs oluşumunun süreçte önemli bir yeri bulunmaktadır. Faktör V^{Leiden} ve Protrombin G20210A mutasyonlarının trombüs oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir (3,4). Plazma homosistein düzeylerindeki artışın KKH ve venöz trombüs oluşumunu hızlandırdığı bilinmektedir. Bu artıştan da metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimini kodlayan gendeki mutasyon sorumlu tutulmaktadır (5). Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) gen polimorfizmi KKH'larında oldukça yüksek oranda rastlanan bir mutasyon olup; vasküler tonusun düzenlenmesinde bozukluğa ve düz kas hücre proliferasyonuna neden olarak ateroskleroz gelişimini hızlandırmaktadır (6).

Kişilerin yaşam kalitesinin artırılması açısından, koroner arter hastalıklarına yatkınlığının olup olmadığını erkenden öğrenebilmek ve ona göre önlem alabilmek için mortalite ve morbidite oranı yüksek olan koroner arter hastalıklarının genetik alt yapısının belirlenebilmesi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda, bölgemizde stabil anjina pektorisi olan ve koroner anjiyografi ile koroner arterlerinde %70 ve fazlası darlığı saptanan 35'i kadın ve 66'sı erkek olmak üzere toplam 101 hasta (yaş ortalaması;60±10) ve özgeçmişinde diabet, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı öyküsü olmayan 30'u kadın ve 52'si erkek olmak üzere toplam 82 sağlıklı kontrol grubunda (yaş ortalaması;58±8) Apo E polimorfizmleri, Apo B100 (3500), Protrombin G20210A ve Faktör V^{leiden} mutasyonlarının saptanması amaçlanmıştır.

Ayrıca lipoproteinler ile ilişkili mutasyonlardan Apo E gen polimorfileri ile lipid düzeyleri arasındaki korelasyonu incelemek amacıyla total kolesterol (T-KOL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), trigliserit, apolipoprotein A ve B düzeylerinin çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Koroner Kalp Hastalığı

Koroner kalp hastalığı, kalp kaslarına kan akışının azalması nedeniyle oluşan miyokard iskemisi ile sonuçlanan bir hastalıktır. İskemi genellikle ateroskleroz, tromboz, spazm ya da emboli gibi nedenlerle kanın 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. En sık görülen neden ise bir ya da daha fazla koroner arterin daralmasına neden olan aterosklerozdur (1).

Kardiak iskemi sonucu ortaya üç genel durum çıkar. Bunlar; kanın etkili bir şekilde pompalanamaması ile görülen konjestif kalp yetmezliği, yetersiz perfüzyon nedeni ile gelişen ve göğüs ağrısıyla karakterize angina pectoris ve miyokarda kan akımının birden kesilmesi ile iskemi ve miyokardial doku nekrozu ile karakterize miyokardial enfarktüstür (1).

2.1.1.Ateroskleroz İçin Öne Sürülen Teoriler

Ateroskleroz (Athero: yağlı, sclerosis: sertleşme) çeşitli organlara kan akışının bozulmasına yol açan bir hastalık sürecidir. Erken lezyonlar yağlı çizgilerdir. Bunu tamamen şişkin ateroskleroz lezyonu olan plak oluşumu izler. Plak iki ana bileşenden oluşur. Yüzeyi fibröz başlığa sahiptir ve başlıca düz kas hücrelerinden oluşur. Bunun altında hücre kalıntıları, kolesterol ve köpük hücrelerden oluşmuş nekrotik merkez vardır. Komplike bir plak kalsifikasyon, ülserasyon, tromboz veya hemoraji oluşumuna neden olur (7,8). Şekil 2.1'de komplike lezyon gelişmiş koroner arter kesiti görülmektedir (9).



Şekil 2.1: Komplike lezyon gelişmiş koroner arter kesiti (9).

Son birkaç yıla kadar iki aterogenez teorisi mevcut olup bunlardan biri olan “lipid infiltrasyon hipotezi”nde aşırı kan lipidlerinin lipoprotein şeklinde arter duvarına infiltre olduğu ileri sürülmektedir. Bu teori epidemiyolojik deliller ve aterojenik lipoproteinlerin saptanmasıyla destek bulmuştur (8).

İkinci teori ise bazı yönlerden lipid infiltrasyonu hipotezine karşıt görüşler ortaya koyan “endotel hasar hipotezi”dir. Bu teori, endotel yüzeyinde bir hasarın gerekli olduğunu ve buradan hücrelerin ayrılmasıyla oluşan trombojenik yüzeye trombositlerin yapıştığını ileri sürmektedir. Trombositlerin yapışması, trombosit türevi büyüme faktörünün (PDGF) salınmasıyla sonuçlanarak, bunun erken lezyonun karakteristiği olan düz kas hücre proliferasyonunu ve intimaya göçünü uyardığı öne sürülmüştür. Endotelial rüptür lipoproteinlerin damar duvarına girmesini önleyecek endotelial engeli kaldırır (7,8).

Günümüzdeki teori ise ateroskleroz gelişimi için her iki teorinin özelliklerini birleştirerek patogeneizde tek bir hipotezle sonuçlanmıştır ve endotelial hücre kaybının aterosklerotik bir lezyonun gelişimi için gerekli olmadığı ve aterojenik lipoproteinlerin sağlam endotele girebildikleri şeklindedir (8).

2.1.1.1.Aterosklerotik Lezyon Oluşumu ve Gelişimi

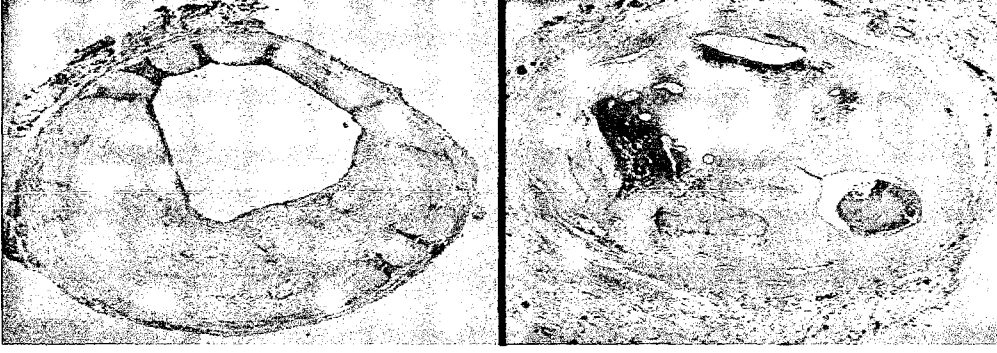
Ateroskleroz ile ilişkili hücre tipleri endotel hücreler, düz kas hücreleri, makrofajlar ve lenfositlerdir. Lezyon oluşumunda ilk olaylardan birisi dolaşımdaki monositlerin endotel yüzeyine fokal tutulumudur. Okside LDL (Ox-LDL) veya diğer aterojenik lipoproteinlerin başlatıcı faktör olmaları ileri sürülmesine rağmen, monositlerin yapışmasından hangi faktörlerin sorumlu olduğu açık değildir. Bununla beraber mikro hasar alanları da katkıda bulunabilir. Monositler endotel yüzeyi değiştirirler ve vasküler

hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi lökosit adezyon moleküllerinin sentezini uyarırlar. Monositler bir kez yapışınca endotel hücreler arasında göç ederler, subendotelial boşluğa girerler ve makrofajlara dönüşürler. Ek olarak, LDL ve diğer aterojenik lipoproteinler bu boşluğa girebilir. Bir kez duvara girince, LDL matriks içinde tutunabilir ve oksidasyona veya daha ileri kimyasal değişimlere uğrayabilir. Makrofajlar oksitlenmiş veya değişime uğramış LDL'yi alırlar ve lipid biriktikçe köpük hücreleri görünümüne bürünürler. Bu ilk olaylar bir takım büyüme faktörleri (hücre proliferasyon ve kemotaksis mediatörleri) ve sitokinlerin salınımını sağlayan olaylar zincirini başlatırlar (8).

Endotel ve düz kas hücreleri tarafından oluşturulan monosit kemoattraktan protein 1'in lezyonlara monosit girişinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Okside LDL'nin varlığı da bu uyarımda etkili olabilir. Diğer büyüme faktörleri, trombosit büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, insüline benzer büyüme faktörü, interlökin-1, tümör nekroz faktörü ve transforman büyüme faktörü β 'dir. Tüm bu faktörler düz kas hücre proliferasyonunu uyarabilir ve normal arter duvarında ortaya çıkmazken lezyon gelişen bölgelerde görülürler. Ek olarak bu mitojenlerin bazıları endotel hücreler, düz kas hücreleri ve monosit/makrofajlar için özgül olan kemoattraktanlardır (8).

İlk makroskopik görülebilir lezyon yağlı çizgilerdir. Makrofajlar, subintimal boşlukta fazla miktarda birikirler ve köpük hücrelerine dönüşürler ki bu olay Ox-LDL veya kalıntı lipoproteinlerin alımı ile gerçekleşir. Monositlerin toplanması devam eder ve düz kas hücreleri intimaya göç ederler. Arter duvarındaki lokal uyarıya göre yağlı çizgiler oluşur ve yok olur (8).

Etkileşim döngüsü devam ederken plak, yağlı çizgi lezyonundan proliferatif veya fibröz bir lezyona değişir, bu lezyon kabarık olup damar duvarında lümen boyunca uzanır. Lezyon komplike devreye ilerledikçe biriken lipidin sitotoksitesinin etkisi ile köpük hücrelerinin nekrozu gelişmeye başlar; sıklıkla kolesterol kristalleri oluşur (köpük hücre ölümü, kollajen sentezi ile düz kas hücre göçü ve proliferasyonunun eşlik ettiği ekstraselüler lipid birikimi ile sonuçlanır). Aterogenezi oluşturan faktörlerin devamı halinde plak komplikasyonlu evreye doğru gelişmeye devam eder. Endotel hücreleri kaybolup subendotelial boşluk açığa çıkınca komplike lezyonların yüzeyi trombojenik olabilmektedir. Trombositler bu açığa çıkan yüzeye yapışarak trombüs oluşumunu kolaylaştırır (Şekil 2.2) (8).



Şekil 2.2: Aterosklerozda trombozun yeri (10). Solda %60, 70 daralmış koroner arter kesiti ve sağda tromboz nedeni ile tıkanmış ve sadece üç küçük lümeni kalmış koroner arter kesiti yer almaktadır

Komplike lezyonların geç döneminde T lenfositler lezyona infiltre olur ve adventisyaya lenfosit infiltrasyonu ile karakterize otoimmün bir cevap ortaya çıkar. Kalsifikasyon da geç lezyonların bir özelliğidir. İlerlemiş lezyonlar arter duvarının esneklik ve bütünlüğünü bozarak damarda bir anevrizma potansiyeli oluştururlar (8).

2.1.1.2.Okside LDL Oluşumu

Düşük yoğunluklu lipoproteinlerin endotel veya düz kas hücre kültürüyle inkübe edildiğinde okside olarak modifiye olduğu ve bu halde çok daha hızlı şekilde makrofajlar tarafından alındığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (11,12). Hücre kültürü ortamında LDL'de lipid peroksidasyonunun nasıl başladığı tam olarak bilinmemekte, ancak bazı mekanizmalar ileri sürülmektedir (11,12). Bunlar arasında;

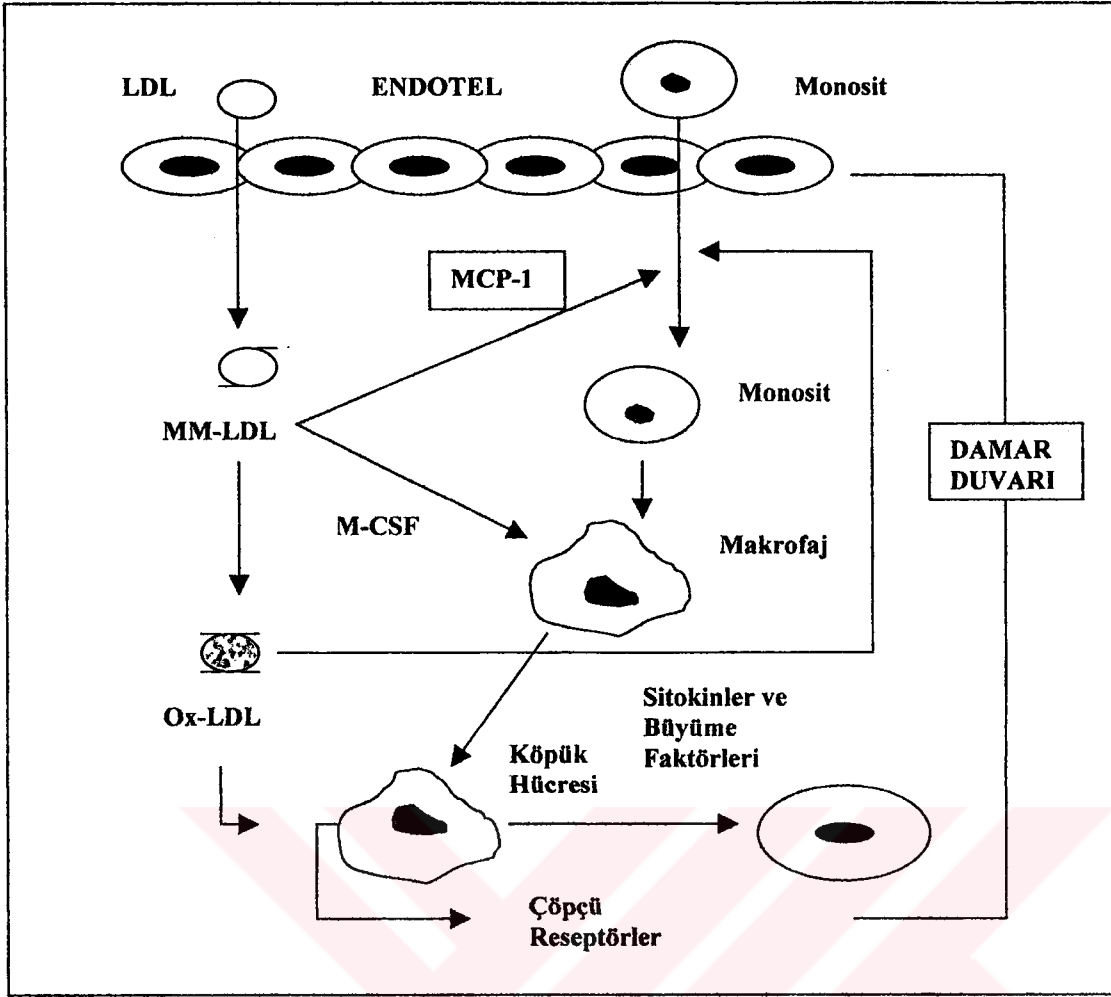
- Hücrelerden süperoksit anyonunun salınımı
- Hücre membranında oluşan lipid peroksidlerinin LDL'ye transferi
- Metal iyonların katalizlediği lipid peroksidasyonu
- Membrana bağlı enzimlerin LDL'ye direkt etkisi sayılabilir.

İntimaya giren LDL oksidan etkiye maruz kalınca oksidatif modifikasyonunun ilk basamaklarını geçirir ve çeşitli ürünler oluşur. Ancak oluşan bu form tam olarak modifiye olmamıştır; normal reseptörler tarafından alınır, fakat çöpçü reseptörler tarafından henüz tanınmaz. Buna minimal modifiye LDL (MM-LDL) denir. MM-LDL in vitro olarak plazmanın uzun süre depolanmasıyla veya demirle inkübasyonla da oluşabilir (13).

Minimal modifiye-LDL aterosklerozda önemli role sahiptir, çünkü arter hücrelerinde gen ekspresyonunu etkileyen ürünlerin (makrofaj koloni uyarıcı faktör: M-CSF, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör: GM-CSF, granülosit koloni uyarıcı faktör: G-CSF) salınımına yol açar. Farelere *in vivo* olarak MM-LDL enjekte edildiğinde serum M-CSF düzeyinin 7-26 kat arttığı bulunmuştur. Ayrıca MM-LDL'nin aort, endotel ve düz kas hücre kültürlerinde monosit-kemotaktik protein (MCP-1) sekresyonuna yol açtığı gösterilmiştir (14). Farelere enjekte edilen MM-LDL'nin mRNA ekspresyonunu artırdığı bulunmuştur. MM-LDL, endotel hücrelerinin yüzeyindeki monosit spesifik adezyon moleküllerini de uyarır ve böylece monosit kemotaksisi için ek bir mekanizma daha işe karışır. Bu moleküller vasküler hücre adezyon molekülleri (VCAMs) ve endotelial lökosit adezyon molekülleridir (ELAMs) (13).

Makrofaj koloni uyarıcı faktör etkisiyle monositlerin makrofajlara dönüşümü uyarılır ve oluşan makrofajlar MM-LDL'nin Ox-LDL'ye dönüşümünü hızlandırır. Ox-LDL çöpçü reseptörler aracılığıyla down regülasyona uğramaksızın makrofajlarca alınabilir ve böylece köpük hücreleri oluşur. Ox-LDL, MM-LDL gibi MCP-1 salınımına yol açarak monositler için kemotaktik etki gösterir. Yağlı çizgilerde bulunan hücrelerin yaklaşık %20'si T lenfositlerdir. Ox-LDL T-lenfositler için de kemotaktiktir. Makrofajların migrasyonu Ox-LDL tarafından inhibe edilir ve böylece bu hücrelerin arter duvarından çıkışı önlenir. Sonuçta arter duvarında patolojik boyutta kolesterol birikimi olur. Ox-LDL çeşitli hücrelere karşı sitotoksik etkiye sahiptir. Etkilenen hücrelerin kan elemanları ile teması büyüme faktörlerinin olaya karışmasına yol açar ve bu da düz kas hücrelerinin migrasyonuna ve proliferasyonuna neden olur ve böylece yağlı çizgiler daha kompleks lezyonlara döner.

Okside-LDL makrofajlardan interlökin-1 salınımını uyarır. İnterlökin-1 düz kas hücre proliferasyonuna ve lökositlerin endotele adezyonuna yol açar. Okside-LDL doku faktörü ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 sentezini uyararak pıhtılaşma sistemini etkiler. Ayrıca Ox-LDL ürünleri tümör nekroz faktör ve trombositten türeyen büyüme faktörü gibi indüklenebilir genlerin ekspresyonunu bozabilir. Minimal modifiye-LDL yağlı çizgilerin oluşumuyla ilgili iken Ox-LDL ise aterogenezin ilerlemesinde etkin gibi görünmektedir (Şekil 2.3) (13).



Şekil 2.3: Okside LDL'nin aterogenezdeki rolü. MCP-I:monosit kemotaktik protein, M-CSF: monosit koloni uyarıcı faktör, Ox-LDL: okside düşük yoğunluklu lipoprotein

2.2. Koroner Arter Hastalıkları İle İlişkili Risk Faktörleri

A) Değiştirilebilir Risk Faktörleri

- 1- Sigara
- 2- Hipertansiyon
- 3- Diyabet
- 4- Diyet
- 5- Obesite
- 6- Fiziksel olarak inaktif yaşam

B) Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

- 1- Yaş
- 2- Cinsiyet
- 3- Genetik yatkınlık

olmak üzere iki ana başlık altında toplayabiliriz (15).

2.2.1.Koroner Arter Hastalığı İle İlişkili Mutasyonlar

Koroner arter hastalığı ile ilişkili mutasyonları üç ana başlık altında toplamak mümkündür (16);

1. Koagülasyon ile ilişkili mutasyonlar
2. Lipoproteinler ile ilişkili mutasyonlar
3. Kan basıncının regülasyonu ile ilişkili mutasyonlar

2.2.1.1.Koagülasyon İle İlişkili Mutasyonlar

- Glikoprotein IIb/IIIa
- PI^{A2} mutasyonu
- Faktör V^{leiden}
- Protrombin G20210A
- Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) yer almaktadır (16).

2.2.1.2.Lipoproteinler İle İlişkili Mutasyonlar

- Apo AI
- Apo AIV
- CETP (kolesterol ester transfer protein)
- LPL (lipoprotein lipaz)
- Apo B-100
- Apo CII
- Apo E
- LDLR (low density lipoprotein reseptor) gen polimorfizmleridir (16).

2.2.1.3.Kan Basıncının Regülasyonu İle İlişkili Mutasyonlar

- Angiotensin converting enzim (ACE)
- Angiotensin II tip I reseptör (AT1R)
- Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) da rastlanan gen polimorfizmleridir (16).

2.3.Lipoproteinler ve Apolipoproteinler

2.3.1.Lipoproteinler

Hidrofobik yapılarından dolayı lipitler, plazmada lipoproteinler adı verilen makromoleküler kompleksler oluşturarak dolaşırlar. Lipoproteinler merkezlerinde nonpolar lipitler (trigliseritler ve kolesterol esterleri) ve yüzeyinde ise polar lipitleri taşıyan küresel (lenfatik ve beyin omurilik sıvısında olanlar gibi diskoid yapıdaki damar dışı lipoproteinler ve yeni sentez edilen HDL hariç) moleküllerdir. Yapılarında apolipoprotein adı verilen ve yüzeysel yerleşimli özel proteinler bulundurlar. Merkezde yer alan lipitlerle, fosfolipit ve proteinler birbirlerine van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları ile nonkovalent olarak bağlanırlar. Bu lipitlerle proteinler arasındaki bağlar lipitlerin lipoproteinler ile hücre membranı ve lipoproteinler arasında değişiminin kolay olması açısından bir avantajdır (17,18,19).

2.3.2.Apolipoproteinler

Apolipoproteinler, lipoproteinlerin protein bileşenleridir. Plazmada mikromolar aralıklarda bulunurlar ve buldukları lipoproteinin akibetine uğrarlar. Her bir lipoprotein sınıfının karakteristik içerikleri ve apolipoprotein dağılımları vardır. Sabit yapısal komponentler gibi davranan apo B-100 ve B-48 hariç diğer apolipoproteinler, lipoproteinler arasında değiş tokuş edilirler. Bununla birlikte birbirlerine eşit olarak çevrilmezler (19). Bunun yerine apolipoproteinler belirli partiküllere artmış ilgi ile bağlanırlar, bu da, kavis ve yüzey fosfolipit paketlerini etkileyen partikül yarıçapı, veya belki de diğer apolipoproteinlerin varlığı gibi yüzey lipitlerindeki değişiklikleri kapsayan tam anlaşılammış verilerin bir sonucudur (18-20).

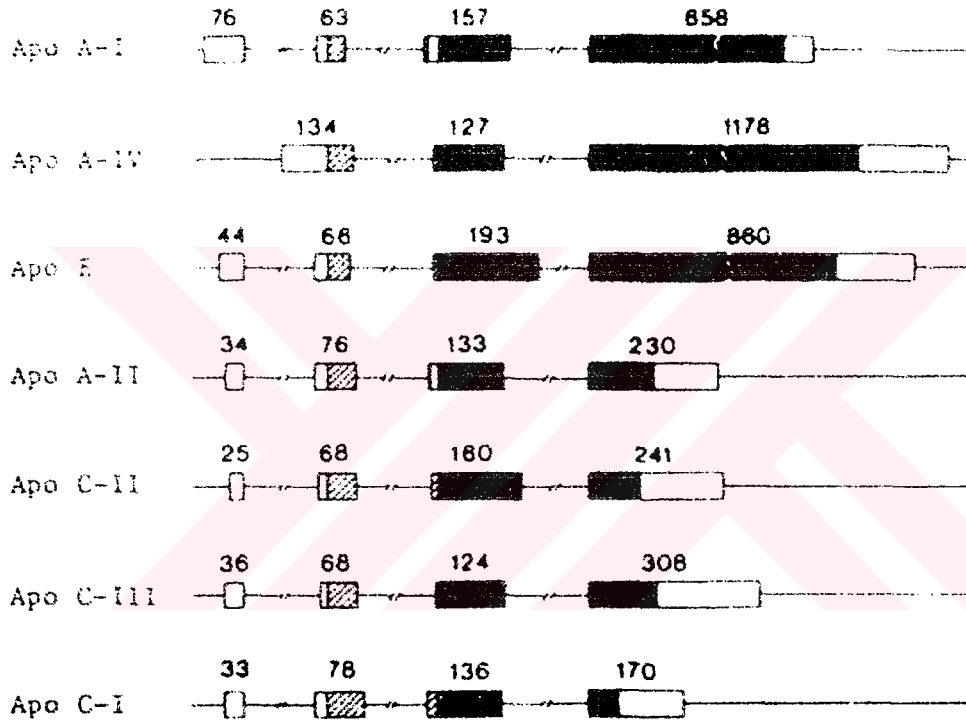
Apolipoproteinler;

- Yapısal lipid bağlama bileşenleri (apoA-I, apo A-II, apo B-100, apo B-48)
- Lipoprotein reseptörleri için ligand (apo A-I, apo B-100 ve apo E)
- Lipoprotein-reseptör etkileşiminin inhibitörleri (apo C-I ve apo C-III)
- Lipoprotein metabolizmasında yer alan enzimlerin modülatörleri (apo A ailesi, apo C ailesi)
- Lipoproteinler arası lipid transferinde kofaktörler olarak görev alırlar (17).

Bunlara ek olarak minör apolipoproteinler de tanımlanmıştır; apo D, apo F, apo G, apo H (α_2 -glikoprotein), apo I (serum amiloid A) ve apo J (clusterin)'dir (17).

2.3.2.1. Apolipoprotein Genleri

Yedi majör çözümler apolipoproteininin genomik yapısı birbirine benzerken apo B bunlardan ekzon sayısı bakımından farklıdır. Şekil 2.4'de apolipoproteinlerin ekzon ve intronları, nükleotid sayıları, çevrimi yapılmayan ve olgun proteini kodlayan bölgeleri ve sinyal peptidleri görülmektedir (21).



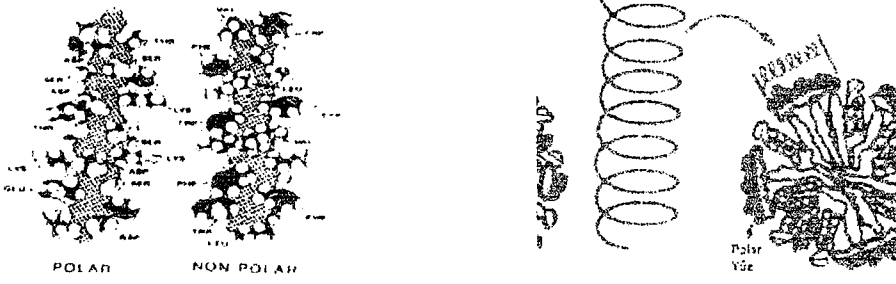
Şekil 2.4: Apolipoprotein gen ailesine ait apolipoproteinlerin ekzon ve intron yerleşimleri. İnce çizgiler intronları, dikdörtgenler ise ekzonları göstermektedir. Transkripsiyon soldan sağa doğru gerçekleşir. İçi boş dikdörtgenler 3' ve 5' uçlardaki çevrimi yapılmayan ekzon bölgelerini, çizgili dikdörtgenler sinyal peptidlerini kodlayan ekzon bölgelerini, içi dolu dikdörtgenler ise olgun proteini kodlayan ekzon bölgelerini göstermektedir. Rakamlar ise ekzonlardaki nükleotid sayısını göstermektedir (21).

Apolipoprotein A IV geni hariç hepsi 4 ekzon ve 3 introndan oluşur. Hepsinde de intronlar çok benzer yerlerde yerleşmişlerdir. İtron I genlerin 5' çevirimi yapılmayan bölgesini ayırır, intron II sinyal peptidaz bağlanma bölgesine yakın olan kodlayan bölgesini ayırır ve intron 3 de olgun proteini kodlayan bölgeyi ayırır. Apo A IV'ün diğerlerinden farkı ilk intronun olmamasıdır. Diğer iki intronun lokalizasyonu diğerleri ile aynıdır. İlk üç ekzonun uzunlukları birbirlerine yakındır. En büyük fark ekzon 4'te ortaya çıkmaktadır. Bu bilgilerin ışığında birbirlerine benzeyen bu apolipoproteinlerin tek bir ortak genden kök aldığı düşünülmektedir (21).

Apolipoprotein D geninin organizasyonu diğer çözümler apolipoproteinlerden çok farklıdır. 5' çevirimi yapılmayan ucunda en az bir intron bulunur. Burada yer alan intron sayısı transkripsiyon başlangıç bölgesinin henüz tanımlanamamış olmasından dolayı belli değildir. Sinyal peptidi kodlayan bölge intron içermez. Olgun proteini kodlayan bölgede ise üç intron daha yerleşmiştir. Bu farklı organizasyondan dolayı apo D'nin diğer çözümler apolipoproteinlerden farklı bir ata genden kök aldığı düşünülmektedir (21).

2.3.2.2. Apolipoproteinlerin Yapısal Özellikleri

Apolipoproteinler, 57 aminoasitten (Apo C-I) 4356 aminoasite (Apo B-100) kadar değişik büyüklüktedir ve Apo B-100 dolaşımdaki bilinen en büyük polipeptidlerden biridir. Apo B-48, B-100, D, E ve C-III sialik asit ile biten karbonhidrat zincirleri ile değişik şekillerde glikolize olurlar. Bir çok apolipoprotein amino asit dizilişlerinin bir veya iki pozisyonundaki farklılıklara bağlı olarak iki veya daha fazla izoform içerir. Bütün apolipoproteinlerin temel yapısal görevi lipid transportudur. Apolipoproteinlerin lipitlerle temasa geçen amfipatik helikal bölgeler içerdikleri gösterilmiştir (21). Amfipatik helikal yapıların en önemli özelliği iki farklı yüzünün bulunmasıdır. Bunlardan biri fosfolipit moleküllerinin yağ asidi zincirleri arasına giren hidrofobik yüzü diğeri ise fosfolipitlerin hidrofilik baş grupları ve sulu fazla temasta bulunan hidrofilik yüzüdür. Diğer bir özelliği ise polar yüzdeki yüklü amino asitlerin dağılımları ile ilgilidir. Negatif yüklü amino asitler glutamik asit ve aspartik asit polar yüzeyin ortalarında yer alırken pozitif yüklü amino asitler lizin ve arjinin polar yüzün kenarlarında yerleşmişlerdir (şekil 2.5) (19-21).



Şekil 2.5: Apolipoproteinlerde rastlanılan polar ve apolar heliks yapılar ve lipoproteinlerde yerleşimleri (21)

a) Apolipoprotein A

Apolipoprotein A-I (Apo A-I) ve apolipoprotein A-II (Apo A-II), HDL proteininin yaklaşık %90'ını oluşturur. Apo A-I'in A-II'ye oranı ise yaklaşık olarak 3:1'dir. HDL'in önemli yapısal bileşeni olmasının yanı sıra apo A-I Lesitin: Kolesterol asil transferaz'ın (LCAT) da kofaktörü olarak görev yapmaktadır. Bazı bulgular apo A-II'nin LCAT'i inhibe ettiği ve hepatik trigliserit lipazı aktive ettiğini desteklemektedir. Apo A-IV yeni salınmış şilomikronların bir bileşenidir, şilomikron kalıntılarının, VLDL, LDL ve HDL'nin önemli bir bileşeni değildir. Apo A-IV'ün birincil işlevi henüz bilinmemektedir, fakat *in vitro* olarak LCAT'i aktive ettiği gösterilmiş, ayrıca bazı bilgiler periferik dokulardan karaciğere kolesterol transportunda rol oynadığını desteklemektedir (7,19).

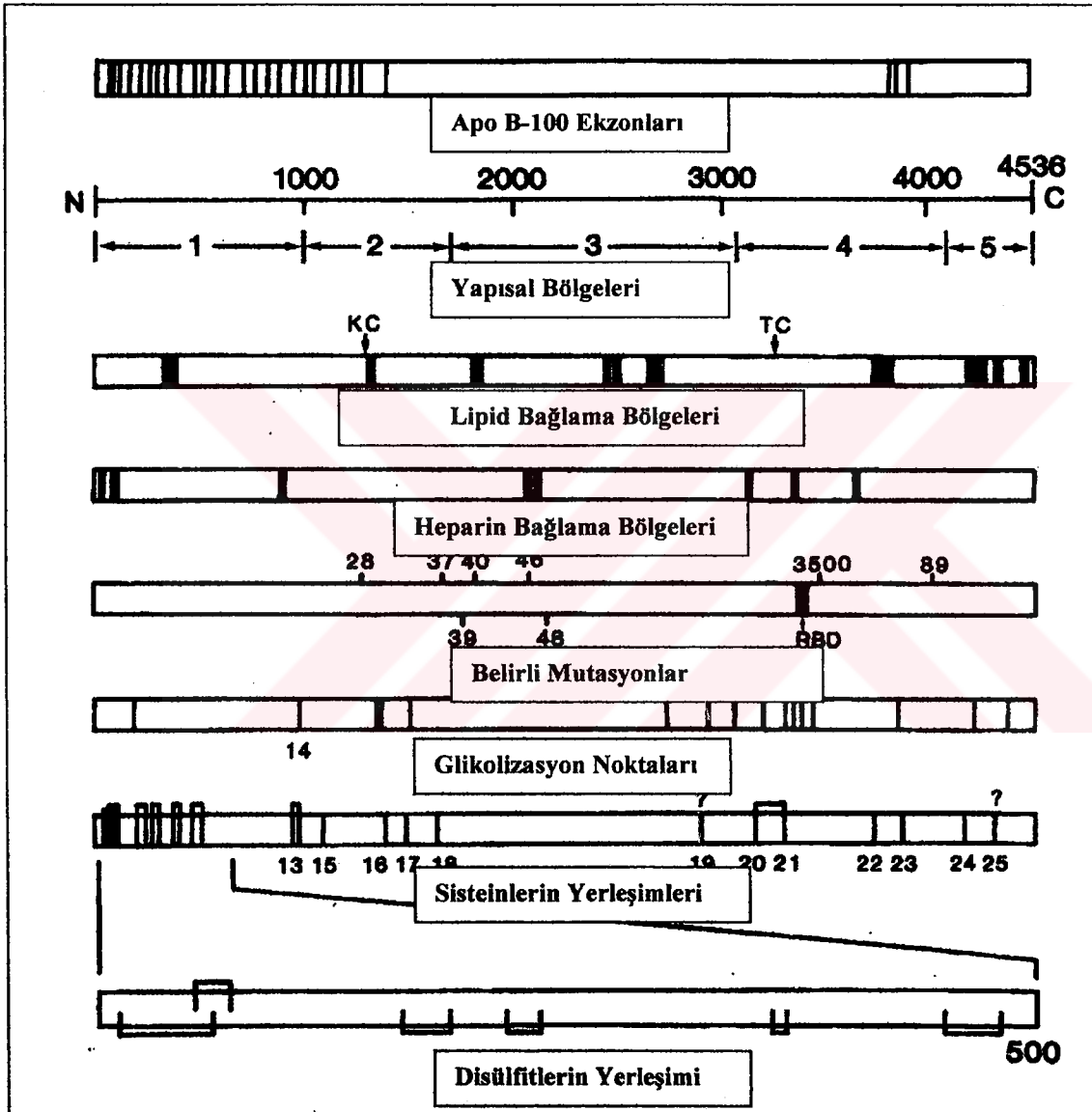
b) Apolipoprotein B

Apolipoprotein B (Apo B) iki formda bulunur: Apo B-100 ve Apo B-48. Her iki protein de bir yapısal genin translasyon ürünüdür. Apo B-100 tek bir polipeptid olarak apo B geninin tam olarak translasyonundan oluşmaktadır. Apo B-48 ise bu gende 2153. rezidüye denk gelen kodonda tek baz değişimi ile oluşan stop kodonu nedeni ile tam olarak translasyonu yapılamamış bir polipeptid ürünüdür (7).

i) Apolipoprotein B-100

Apolipoprotein B-100 (apo B-100), düşük yoğunluklu lipoprotein, LDL reseptörüne bağlanmasına aracılık eden apolipoproteindir. 43 kb uzunluğundaki genin

translasyonu sonucu oluşan 4536 amino asitlik bir proteindir. Ekzonların tümünün gendeki oranı 1/3'tür ve ekzon uzunlukları birbirinden oldukça farklıdır. 26. ve 29. ekzonlar çok uzun iki ekzondur (Şekil 2.6) (21).



Şekil 2.6: Apo B-100 gen yapısı ve fonksiyonel bölgeleri (Apo B-100 ekzonları, yapısal bölgeleri, lipid ve heparin bağlayan bölgeleri, mutasyonlarının konumları, glikolizasyon bölgeleri, sisteinlerin yerleşimi ve ilk 500 amino asitlik bölgedeki disülfidlerin yerleşimi) (21).

Apolipoprotein B 100, 4536 amino asitlik dizisi içerisinde 12'si N-terminalde olmak üzere toplam 25 sistein kalıtı vardır. Apo E reseptör bağlama bölgesi ile homoloji gösteren iki LDL reseptörü bağlayan bölgesi tespit edilmiştir. Proteinde çok sayıda tekrar eden birimlerin bulunduğu bildirilmiştir. Tekrar eden bu birimler iki ana grup altında toplanabilir. Bunlar amfipatik helikal bölgeler ve hidrofobik prolinden zengin bölgelerdir. Diğer apolipoproteinlerde de bulunan amfipatik helikal bölgelerin bir yanında polar amino asitler yer alırken diğer yanında hidrofobik amino asitler yer alır. Bu yapıların özellikle fosfolipitler olmak üzere lipid bağlama ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (7,17,19,21).

Prolinden zengin tekrarlar sadece apo B100'e özgüdür ve hidrofobik amino asitlerin çoğunlukta olması ile karakterizedir. Baskın olarak β -tabakalı yapı ve β -kırılmalara sahiptir. Amfipatik helikal yapılara göre lipitlere daha kuvvetli bağlanmayı sağladığı düşünülmektedir (21).

ii) Apolipoprotein B-48

Apolipoprotein B-48 (Apo B-48), apo B-100 mRNA'sının dokuya spesifik posttranskripsiyonel modifikasyonu ile oluşmuş bir polipeptid üründür. İnsan ince barsaklarında 6666. pozisyondaki sitozinin deaminasyona uğramasıyla oluşur (7). Bu spesifik deaminasyonu katalizleyen enzim bir multikomponent sitidin deaminazdır. Deaminasyon sonucu oluşan urasil, kodonun stop kodonuna dönmesine neden olur. 2153. amino asiti kodlayan kodonda meydana gelen tek baz yer değişimi ile stop kodonu oluşmuş ve Apo B-100'ün yaklaşık %48'inin çevirimi yapılabilmektedir (17,18). Bu posttranskripsiyonel modifikasyonla apo B-100'ün reseptör bağlanma bölgesinin kesilmesine ve oluşan apo B-48'in daha farklı bir metabolik görev üstlenmesine neden olur. Apo B-48 barsaklarda sentezi yapılan şilomikronların majör protein bileşeni olarak yer alır. Apo B-48 şilomikronların stabilitesinden sorumludur ve şilomikronların oluşumu için mutlaka bulunması gereken apolipoproteindir (7,18-21).

c) Apolipoprotein C

Apolipoprotein C-I, C-II ve C-III (Apo C-I, C-II ve C-III) LDL dışında bütün lipoproteinlerle ilişkilidir. En küçük apolipoprotein olan Apo C-I'in *in vitro* olarak

LCAT'i aktive ettiği gösterilmiştir. Apolipoprotein C-II trigliseritten zengin lipoproteinlerin (VLDL ve şilomikronlar) metabolizmasında trigliseritleri hidrolize eden bir enzim olan lipoprotein lipazı (LPL) aktive eder. Sialik asit içeriğindeki farklılıklardan dolayı apo C-III en az üç polimorfik forma sahiptir. Hipertrigliseridemik kişilerde plazma apo C-III düzeyleri artmış bulunmuştur. Ayrıca transgenik farelerde artan apo C-III düzeylerinin apo E'lerin VLDL'den ayrılmasına neden olduğu gösterilmiştir. Apo C-III'ün gerçek metabolik görevi bilinmemekte fakat *in vitro* çalışmalar LPL'nin inhibisyonunda yer aldığını göstermiştir. Lesitin:kolesterol asil transferazı aktive ettiği de düşünülmektedir (19,21,22).

d) Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (apo E), 299 amino asitlik polimorfik bir proteindir. Apolipoprotein E geni 19 no'lu kromozomda yerleşmiştir ve apo CI ve apo CII'nin içinde yer aldığı gen kümesinin bir bölümünü oluşturur. 3,6 kb uzunluğundadır ve 1163 nükleotidden oluşan mesajcı RNA'yı (mRNA) oluşturur (21). Birincil olarak VLDL'de olmak üzere şilomikronlarda ve bazı HDL alt gruplarında da bulunmaktadır. Özellikle lipoprotein kalıntılarının plazmadan temizlenmesinde görev alır (23). LDL reseptörü bağlanma bölgesi içerir. LDL reseptörü bağlanma bölgesi 130-150. amino asitler arasında yer alır ve başlıca bazik amino asitlerden oluşur. Bağlanma bölgesinin dışında 170-183. rezidüler arasında yer alan aminoasitlerin de reseptöre bağlanma aktivitesini etkilediğini gösteren literatür bilgileri de vardır. Bu bölgede de özellikle arg¹⁷²'nin bağlanma için önemli olduğu gösterilmiştir (24). Bunun yanısıra LDL reseptörü benzeri protein (LRP) bağlanma bölgesi henüz bilinmemektedir (21).

C-terminal bölge, amfipatik ve polar ile nonpolar rezidülerden oluşan helikal yapılar içerir. Bu bölge molekülün majör lipid bağlama bölgesidir. Ek olarak heparin bağlayan bölgeler içeren apo E molekülünün bu bölgeleri 142-147 rezidüleri arasında yerleşiktir (21,24). 22 kDa moleküler ağırlıklı N-terminal uç 4 antiparalel helikal yapı gösterir ve bunlar 24-42, 54-81, 87-122 ve 130-164'üncü rezidüler arasında yer alır. 1 ve 4 ile 2 ve 3'üncü yapılar arasında stabilizasyonu sağlayan tuz köprüleri ve hidrofobik etkileşimler vardır (21,25). Apolipoprotein E'nin genetik olarak saptanan başlıca üç şekli vardır. Bunlar apo E2, apo E3 ve apo E4'tür ve ε2, ε3 ve ε4 adı verilen ve çeşitli toplumlarda sırasıyla %8, %77 ve %15 sıklıkla görülen üç gen çiftinden kaynaklanır. Bu gen

çiftlerinden herhangi ikisinin olması sonucu üç homozigot (E2/2, E3/3 ve E4/4) ve üç heterozigot (E3/2, E4/2 ve E4/3) genotip meydana gelir. Apolipoprotein E2 ile E3 arasındaki fark normalde var olan arginin yerine sisteinin geçtiği kodon 158'dir. Apolipoprotein E4 ile E3 arasındaki fark normalde var olan sistein yerine argininin geçtiği kodon 112'dir (14,21,26).

2.3.3.Lipoprotein Metabolizmasında Yer Alan Apolipoprotein Dışı Proteinler

Lipoprotein metabolizmasında yer alan apolipoproteinler dışında enzim, reseptör ve transfer protein olarak yer alan çeşitli protein yapıda makromolekül vardır.

2.3.3.1. Enzimler

Plazma lipoproteinleri sürekli bir değişim, yıkım ve yapım halindedirler. Lipoproteinlerin majör yapım yerleri karaciğer ve ince barsaktır. Sentezleri granüllü ve düz endoplazmik retikulum içerisinde gerçekleşmektedir. Metabolizmalarının bir çok noktasında dört önemli enzim görev almaktadır. Bunlar; lipoprotein lipaz (LPL), hepatik lipaz (HL), lesitin:kolesterol asil transferaz (LCAT) ve asil-CoA:asiltransferaz (ACAT)'tır (7).

a) Lipoprotein Lipaz

Lipoprotein lipaz (LPL), hepatik lipaz ve pankreatik lipazı da içine alan serin esteraz ailesine ait glikoprotein yapıda bir enzimdir. Lipoprotein lipaz başlıca parankimal hücrelerde sentezlenir, fakat sentezi kas ve adipoz dokuda oldukça yoğun olarak bulunmaktadır. Lipoprotein lipaz plazma trigliseritlerinin serbest yağ asitlerine ve monogliseritlere hidrolizinden sorumludur. Tercih ettiği substratlar VLDL ve şilomikronlardır. Kofaktör olarak APO C-II'ye ihtiyaç duyar. Lipoprotein lipaz proteoglikanlar aracılığıyla karaciğer harici endotel yüzeylere bağlanır. Enzim 449 amino asitten oluşmaktadır. Lipoprotein lipazın sadece bir dimer olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir. Enzimin amino terminal bölümü (1-335) katalitik bölge ile heparin bağlayıcı bölge içerir. Karboksiterminal bölümü ise (336-445) lipoproteinler, heparin, LRP ve LDL reseptörlerini bağlamak için farklı bölgeler içerir. Böylece LPL alışılmadık bir şekilde bir enzim ve reseptör ligandı özelliklerine birarada sahiptir (7,8,17,21).

b) Hepatik Lipaz

Hepatik lipaz (HL), karaciğer parankima hücrelerinde sentezlenir ve heparan sülfata bağlı olarak hepatik kan damarı endotellerinin membran yüzeyinde yerleşiktir. Ayrıca gonad ve adrenallerin kan damarı endotellerinde de bulunmaktadır. Lipoprotein lipaz gibi LRP'ye bağlanır. Bununla birlikte LPL'den farklı olarak HL bir aktivatöre ihtiyaç göstermez. Hepatik lipaz, fosfolipitleri ve trigliseritleri hidrolize eder ve HDL₂'nin daha küçük olan HDL₃'e dönüşümüne katılmış olur. Hepatik lipaz ayrıca kalıntıların normal metabolizması ve temizlenmesine de yardımcı olur, insanlarda enzim eksikliğinin plazmada lipoprotein kalıntılarının birikimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (7,8,18).

c) Lesitin:Kolesterol Asil Tansferaz

Lesitin:kolesterol asil tansferaz (LCAT), karaciğerde sentezlenen glikoprotein yapıda bir enzimdir ve dolaşımında HDL, LDL, apo D ve kolesterol ester transfer protein (CETP) ile birlikte dolaşır. Apolipoprotein A-I tarafından aktive edilir. Lesitin:kolesterol asil tansferaz fosfolipitlerden uzun zincirli yağ asitlerini alarak kolesterole aktarır. Serbest kolesterolün kolesterol esterlerine dönüşümünü sağlayarak kolesterolün hücre zarlarından HDL'ye yayılım için gerekli kimyasal gradientin sürdürülmesinde rol oynar. Olgun protein hidrofobik amino asitlerin çeşitli dizilimini kapsayan 416 amino aside sahiptir. Pankreatik lipazın yüzeyler arası bağlayıcı kısmına eş olan altı amino asitlik diziye sahiptir. Bu bölümün enzimin aktif bölgesine yakın olan lipid substratlarının bağlanmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Lesitin:kolesterol asil tansferaz aynı zamanda apo E'nin karboksiterminal ucunda bulunan lipid bağlayıcı bölgeye benzeyen bir amfipatik heliks içermektedir. Normal plazmada, LCAT'in çoğu HDL ile ilişkilidir (7,8,19-21).

d) Asil-CoA:Kolesterol Asiltransferaz

Asil-CoA:kolesterol asiltransferaz (ACAT), endoplazmik retikuluma bağlı hücre içi bir enzimdir. Bu enzim 65 kDa ağırlığında ve 550 amino asitten oluşan bir polipeptittir. Serbest kolesterole yağ asitlerini ester bağı ile bağlar. Asil-CoA:kolesterol asiltransferaz kolesterolün karaciğer parankima hücrelerinde olduğu gibi depo edilebilir forma

dönüştürülmesini sağlayan intraselüler bir enzimdir. Bu enzimin aktivitesi hücre içi kolesterolün artması halinde artar. Hücre içine fazla kolesterolün girmesini sınırlamak amacı ile LDL reseptör geninin transkripsiyonunu azaltarak yeni LDL reseptör proteininin sentezini azaltır (7,8,18).

2.3.3.2. Reseptörler

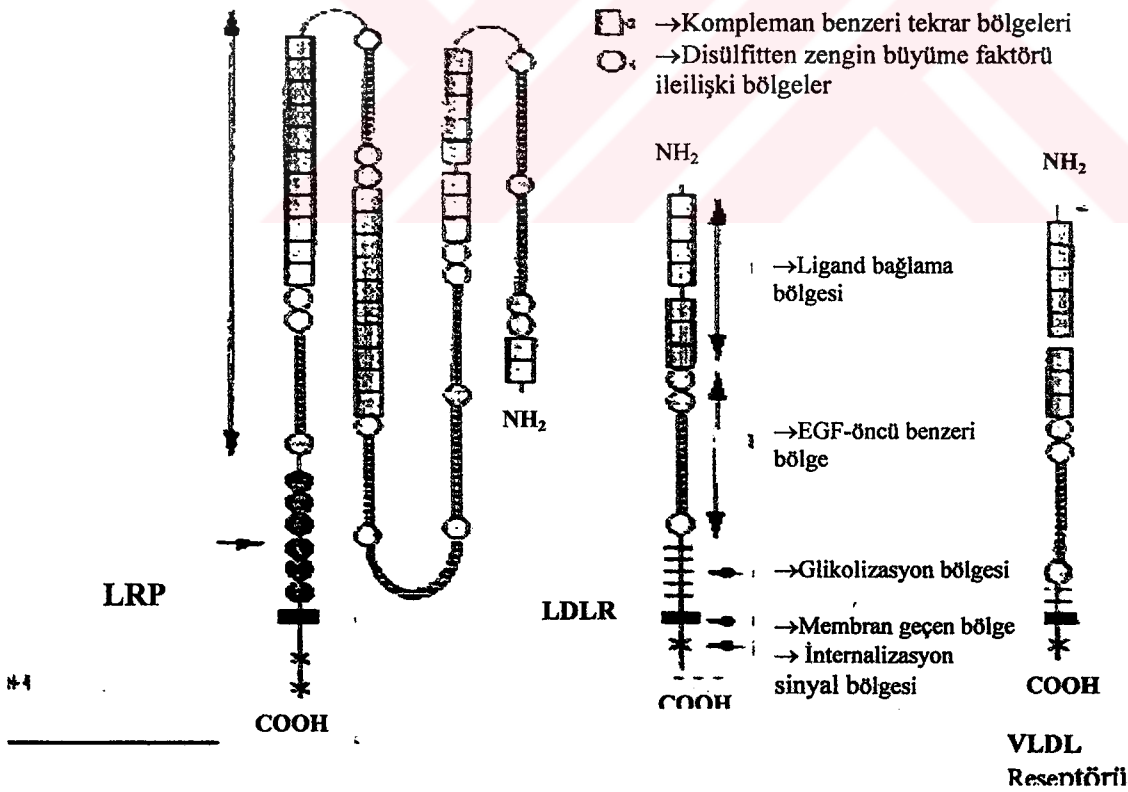
a) LDL Reseptör Ailesi

LDL reseptör geni 19. kromozomda 45 kb'lık bir yer kaplar, 18 ekzonu vardır ve 5,3 kb'lık bir mRNA oluşturur. Ekzon 1 kısa bir çevrimi yapılmayan (untranslated) bölge ve 21 amino asitlik sinyal peptidi kodlayan bölgeyi içerir. Bu kısım proteinin endoplazmik retikulum translokasyonu sırasında kesilir. Geri kalan ekzonlar beş farklı domain içeren 839 amino asitlik proteini kodlar. LDL reseptör proteininin diğer proteinlerle karşılaştırılması ve bazı bölgelerinin belirgin homolojiler göstermesi büyük bir gen ailesinin üyesi olduğunu göstermektedir (2,18,21).

LDL reseptör ailesinin LDLR, LRP-1, glikoprotein330 (gp330) ve VLDL reseptörü olmak üzere bilinen dört üyesi vardır (7). Ayrıca sadece LDL reseptörleri LDL ve apo E içeren lipoproteinlerin endositozunda önemli bir role sahiptir. İlginç olarak LRP, doku tipi plazminojen aktivatörü (tPA), ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) ve bunların inhibitörü olan plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) gibi fibrinolitik enzimleri kapsayan ve lipoprotein metabolizması ile ilişkisi olmayan bir çok proteini de bağlamaktadır (18).

LDL reseptör ailesinin diğer üyeleri gp330 ve VLDL reseptörleridir. VLDL reseptörleri bugüne kadar keşfedilmiş LDL reseptörleri ile en yakından ilişkili proteindir. LDL reseptörleri ve LRP'den farklı olarak, bu reseptörler karaciğerde çok fazla değildir ve böylece plazma LDL veya kalıntı temizlenmesinde önemli bir rol oynamazlar. VLDL reseptörleri ise en fazla iskelet ve kalp kası, adipositler ve beyinde bulunur. Glikoprotein 330 proksimal tübüler epitel hücreleri, tip II pnömositler ve gelişmekte olan embriyonun beyin bölgesinde bulunur ve 600 kDa'luk bir proteindir. Apolipoprotein E içeren lipoproteinleri ve LDL'yi bağlamasına rağmen lipid metabolizmasındaki rolü henüz bilinmemektedir (8,18,21).

LDL reseptör ailesinin üyeleri, sisteinden zengin yapısal motiflerin iki tipini veya yaklaşık 40 aminoasitin tekrarlanması şeklinde bir yapı sergiler. Tekrarların birimlerinden biri, ligantların bağlanmasından sorumludur ve C9 kompleman faktörlerindeki tekrarlara benzerdir. Epidermal büyüme faktörünün (EGF) öncüsündeki tekrarlar ile homoloji gösteren diğerinin ise bir fonksiyonu yoktur ancak, bu silindiği zaman, reseptörlerin lizozomlardan hücre yüzeyine dönüşümünün ortadan kalkmasına neden olmaktadır. LDL, LDL reseptörünün 7 ligand bağlayıcı tekrarını içeren amino terminal bölgesine bağlanır. Bu öncelikle EGF öncü proteine homoloji gösteren bölgeye, sonra da O-bağlı glikozilasyonun meydana geldiği membrana yakın hücre dışı bölgeye bağlanır. Transmembran bölgesi 27 amino asit uzunluğundadır. Reseptörün sitoplazmik ucu, 50 amino asittir ve bir çok ilişkisiz reseptörün kltrin kaplı çukurlar ile birleştirilmesi için NPXY (N; arjinin, P; prolin, X: herhangi bir amino asit ve Y; tirozin) motifi içerir. Bu yapısal motifler çeşitli sayılarda tüm reseptör ailesi üyelerinde bulunmaktadır. Örneğin LRP 31 ligand bağlayıcı tekrar ve 2 NPXY motifi içerir. LRP sentezden sonra 515 ve 85 kDa'luk parçalara ayrılır. Bu ayrılmanın nedeni bilinmemektedir (şekil 2.7)(18).



Şekil 2.7: LDL reseptör ailesin (LDL:düşük yoğunluklu lipoprotein, LRP:LDL reseptör benzeri protein, LDLR:LDL reseptörü) (21).

b)HDL Reseptörleri

HDL reseptörlerinin tanımlanması, lipoprotein metabolizmasındaki tartışmalı pek çok problemin çözümünü sağlamıştır. HDL reseptörlerinin iki farklı fonksiyonu bulunmaktadır. Birincisi, HDL'den hücrelere kolesterol esterlerinin dağıtımını kapsar. Son zamanlarda, bu fonksiyona aracılık eden Klas B yakalayıcı reseptörlerden biri (B1) gösterilmiştir. Apolipoprotein B-100 veya Apo E içeren lipoproteinlerin LDL-reseptör aracılı alımından farklı olarak, HDL kolesterol esterlerinin B1 reseptörü aracılığıyla hücrelere dağıtımına, HDL'nin apolipoprotein bileşeninin yıkılımı eşlik etmektedir. Bu göstermektedir ki; kolesterol ester alımı için, LDL reseptör ailesinin üyeleri aracılığıyla lipoproteinlerin alımını takiben meydana gelmesi gibi, tüm partikülün lizozomal yıkılımdan başka bazı mekanizmalar da mevcuttur. Yakalayıcı reseptör B1'in ekspresyonu adrenal bez gibi kolesterolünün çoğu HDL'den türeyen bir dokuda özellikle yüksektir. HDL reseptörlerinin ikinci fonksiyonu, hücrelerden kolesterolün uzaklaştırılmasına aracılık etmesidir (2,7).

c) Çöpçü Reseptörler

Çöpçü reseptörler lipoproteinlerin veya diğer proteinlerin *in vivo* olarak metabolizmaları sırasında kimyasal değişmelerle oluşan çok çeşitli polianyonik molekülleri bağlar. LDL arter duvarında uzun bir süre boyunca kaldığında, LDL oksidasyon ve diğer kimyasal değişmelere uğramaktadır. Tamamen ilişkili iki klas A yakalayıcı reseptörünü de kapsayan, bir çok yapısal olarak ilişkisiz protein yakalayıcı reseptör aktivitesine sahiptir (CD36). Klas A yakalayıcı reseptörler çok kapsamlı olarak çalışılmıştır ve kan monositlerinin makrofajlara değişimini izleyen düzenlemede artışa uğradığı bilinmektedir (7,8).

2.3.3.3.Lipoproteinler İle İlişkili Transfer Proteinleri

a) Kolesterol Ester Transfer Protein

Kolesterol Ester Transfer Protein (CETP), oldukça hidrofobik, ısıya dayanıklı 70 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. Karaciğer, incebarsak, dalak ve adrenal bezlerde olmak üzere bir çok dokuda sentezlenmektedir. Kolesterol Ester Transfer Protein, HDL'deki kolesterol esterlerinin VLDL, IDL ve LDL'deki trigliseritlerle değiş

tokuşunu katalizler. Ayrıca CETP, HDL alt sınıflarının partikül büyüklüğünü de değiştirir. LDL'deki kolesterol esterlerinin çoğu CETP aktivitesinin sonucudur ve Kolesterol ester transfer protein, 476 amino asit ile kolesterol esterleri, trigliseritler ve fosfolipitler için bağlayıcı bölgeler içeren bir glikoproteindir. İnsan CETP eksikliği aşırı derecede yüksek kolesterol ve düşük LDL düzeyleri ile ilişkilidir (7,27-29).

b) ATP-Binding Cassette Transporter

ATP-Binding cassette transporter (ABC1-transporter), kolesterolün aktif transport ile hücrelerden uzaklaştırılmasında görev alan bir proteindir. Hücrelerden HDL'ye kolesterol akışında önemli bir rolü vardır ve çeşitli substratların hücre membranlarından enerji bağımlı transpotunu sağlayan bir süperaileye aittir. Protein kinazlar tarafından fosforilasyonla aktive edilir. Otozomal resesif bir hastalık olan ABC1-transporter proteinini kodlayan gende mutasyonla oluşan tangier hastalığında kolesterol esterleri dokularda birikir ve plazma HDL'inin tam olarak yokluğu söz konusudur. ABC1-transporter heterozigot hasarı koroner arter hastalığı ile ilişkilidir (7,30).

c) Diğer Transfer Proteinler

Lipoprotein metabolizmasında yer alan diğer transfer proteinlerden birisi fosfolipit transfer protein (PLTP)'dir. Trigliseritten zengin lipoproteinlerin merkezindeki nötral lipit kaynağının tükenmesi ile yüzeydeki fosfolipit tabaka HDL oluşumunda kullanılabilir hale gelir. Bu noktada PLTP devreye girerek bu fosfolipitlerin HDL oluşumunda kullanılabilmesini sağlar. Fosfolipid transfer protein hasarlı farelerin %60-70 oranında HDL'den yoksun oldukları gösterilmiştir. Diğerleri ise mikrozomal trigliserit transfer protein (MTP)'dir, şilomikron ve VLDL'nin oluşumunda görev alır. Endoplazmik retikulumda etkindir ve trigliseritlerin transferinden sorumludur (7,18,31).

2.3.4.Lipoproteinler İle İlişkili Mutasyonlar

2.3.4.1.HDL İle İlişkili Mutasyonlar

a) Apolipoprotein AI

Transkripsiyonun başladığı yerden 75 baz çifti uzaklıkta adenin yerine guanin transisyonu (bazı çalışmalara göre bu polimorfik uç değişken olarak -75.bp, -76bp ve -

78.bp de olabilir) Mspl (restriksiyon enzimi) için bir yer oluşturur. Başka bir Mspl Apo AI polimorfizmi ilk intron içinde timin yerine sitozin transisyonu (+83bp) ve/veya bir adenin yerine guanin transisyonu (+84bp) ile oluşur. Bunlardan birisi (+83.bp ya da +84) beyaz ırkın %4'ünde görülür ve HDL seviyesinin düşmesine ve koroner arter hastalığı riskinin artmasına yol açar, diğeri (-75.bp) beyaz ırkın %20 ve sarı ırkın %45'inde görülür (32).

b) Apolipoprotein AIV

Apolipoprotein A-IV (Apo A-IV) 360. amino asit pozisyonunda glutamin yerine histidin geçmesi (apo A IV-2 olarak da bilinir) ve 347. amino asit pozisyonunda treonin yerine serin geçmesi ile oluşan iki polimorfizmi vardır. Her iki mutasyon koroner arter hastalığı riskini azaltan etkiye sahiptir. Apolipoprotein A IV-2 polimorfizmi HDL düzeyinin artmasına ve trigliserit düzeyinin azalmasına neden olur. Dünyanın her yerinde gözlenen bu polimorfizmin batı ülkelerinde görülme sıklığı %7-9 arasında yer alır. Asyalı hintlilerde %12, beyazlarda ise %21 sıklıkta gözlenen diğeri polimorfizmde LDL ve trigliserit seviyelerini azaltmak yolu ile koroner arter hastalığı riskini azaltır (33,34).

c) Kolesterol Ester Transfer Protein TaqI B

Kolesterol ester transfer protein (CETP) geni HDL'deki kolesterol esterlerinin LDL'ye aktarmak yolu ile ters kolesterol transportunun önemli noktasında görev alır ve 16.kromozomda bulunur ve CETP geninin 1. İntronunda TaqI B diye adlandırılan bir restriksiyon polimorfizmidir (CETP TaqI B). Polimorfizmin varlığı B1 yokluğu ise B2 olarak ifade edilir. Bu genin varyantları HDL yıkımında azalma ve dolayısıyla HDL seviyesinin artmasına neden olur. Koroner arter hastalığı riskini azalttığı gösterilememiştir. Bu varyantlar üzerinde yapılan çalışmalar devam etmektedir (27,29).

d) Lipoprotein Lipaz

Trigliseritlerin hidrolizinde görev alan LPL geninde 40 farklı yapısal mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonların varlığında enzim ya hiç üretilmemiş ya da katalitik olarak hasarlı üretilmiştir. Bunlardan Gly¹⁸⁸→Glu mutasyonu iskemik kalp hastalığı ile 4,9 kat ilişkili bulunmuştur. Genel populasyonda %0,06 sıklıkla görülen bu mutasyon artmış

trigliserit ve azalmış HDL-kolesterol ile ilişkilidir (34). Asp⁹→Asn mutasyonu ise koroner arterin hastalığının ilerlemesi ile ilişkili bulunmuştur (35,36).

2.3.4.2.LDL İle İlişkili Mutasyonlar

a) Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (Apo E) geni 19 no'lu kromozomda yerleşiktir ve apo CI ve apo CII'nin içinde yer aldığı gen kümesinin bir bölümünü oluşturur. Gen 3,6 kb uzunluğundadır, 1163 nükleotidden oluşan mRNA'yı oluşturur ve 18 aminoasitlik sinyal peptidi içeren 317 amino asitten oluşan bir proteindir. Genetik olarak saptanan polimorflara (Çizelge 2.1) ek olarak var olan ikinci bir polimorf tipi posttranslasyonel glikolizasyondur. Treonin 194'e karbohidrat bağlanması ve multiple sialik asit kalıntıları, minor asidik izoformlar meydana getirirler (21).

Apolipoprotein E'nin genetik olarak saptanan başlıca üç şekli vardır. Bunlar apo E2, apo E3 ve apo E4 olup ε2, ε3 ve ε4 adı verilen ve çeşitli toplumlarda sırasıyla %8, %77 ve %15 sıklıkla görülen üç gen çiftinden kaynaklanır. Bu çiftlerden herhangi ikisinin olması sonucu üç homozigot (E2/2,E3/3 ve E4/4) ve üç heterozigot (E3/2, E4/2 ve E4/3) genotipleri meydana gelir. Apolipoprotein E2 ile E3 arasındaki fark normalde var olan arginin yerine sisteinin geçtiği kodon 158'dir. Apolipoprotein E4 ile E3 arasındaki fark normalde var olan sistein yerine argininin geçtiği kodon 112'dir. Apolipoprotein E3 ve E4 LDL reseptörü ile reaksiyona girme açısından eşit yetenektedir. Apolipoprotein E4'ün hücre yüzeyi heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanmada kusurlu olduğu ve bu nedenle plazma lipoprotein kalıntılarının seviyesinin yüksekliği ile ilişkilidir (23). Apolipoprotein E4 alleli koroner arter hastalığı riski ile ilişkilidir (8,20,23,37). Apolipoprotein E2 ise LDL reseptörüne bağlanmada bir bozukluk içerir. Bu nedenle apo E2/E2 homozigot gen çiftine sahip kişilerin teorik olarak plazma LDL seviyelerinin yüksek olması beklenir fakat E2 alleli plazma kolesterol düzeylerinde %10-15 arasında bir düşüşle ilişkilidir (24). Bununla beraber E2 alleleline homozigot olan bireylerin %1'inde hipertrigliseridemi gelişebilir (8,14,23,24).

Çizelge 2.1: Apolipoprotein E gen polimorfları, mutasyon sonucu oluşan aminoasit yerdeğişimi ve relatif LDLR bağlama aktiviteleri (E3'e göre % olarak belirtilmiştir, boş olan yerlerde aktivite bildirilmemiştir) (21).

Fenotip	Aminoasit yerdeğişimi	Relatif LDLR bağlama aktivitesi (% , normal E ₃)
E ₇ Csuta(tajima ve ark.,1988)	Glu ₂₄₄ →Lys, Glu→Lys	
E ₅ Japan(Tajima ve ark.,1989)	Glu ₃ →Lys	
E ₅ Kanada(Mailly ve ark.,1991)	Glu ₁₃ →Lys	
E ₄ (Genel)	Cys ₁₁₂ →Arg	100
E ₃ (Genel)		
E ₃ (McLean ve ark.,1984)	Ala ₉₉ →Thr	
E ₃ (Rall ve ark.,1989)	Arg ₁₄₂ →Cys	
E ₃ Leiden(Wardell ve ark.,1989)	121-127 aminoasitlerinin dublikasyonu	25
E ₂ (Genel)	Arg ₁₅₈ →Cys	<2
E ₂ (Rall ve ark.,1982)	Arg ₁₄₅ →Cys	45
E ₂ (Rall ve ark.,1983)	Lys ₁₄₆ →Gln	40
E ₁ (Weisgraber ve ark.,1984)	Gly ₁₂₇ →Asp	
E ₁ Bethseda(Gregg ve ark.,1983)	?	
E ₁ Harrisburg(Mann ve ark.,1989)	Lys ₁₄₆ →Glu	
E ₁ Dunedin(Wardell ve ark.,1989)	Arg ₂₂₈ →Ser	
E ₁ Christchurch(Wardell ve ark.,1989)	Arg ₁₃₆ →Ser	40
E hasarlı (Claradas ve ark.,1987)	İntron 3'te kesim hatası	
E ₅ (Wardell ve ark.,1991)	Glu ₃ →Lys	180
E ₅ (Wardell ve ark.,1991)	Pro ₈₄ →Arg	
E ₄ Philadelphia(Lohse ve ark.,1991)	Gly ₁₃ →Lys, Arg ₁₄₅ →Cys	0

b) Apolipoprotein B

Apolipoprotein B LDL'nin LDL reseptörüne bağlanmasına aracılık eden apolipoproteindir. Birçok polimorfizmi rapor edilmiştir. Apo B100 (Arg₃₅₀₀-Gln) mutasyonu familial defektif apo B100' e neden olan primer mutasyondur (21,38,39). Bu mutasyon 3500. amino asitte arginin yerine glutaminin kodlanması ile oluşmuştur. Bu durum LDL'nin reseptörüne bağlanmasında soruna yol açar ve LDL-kolesterol düzeyinin yükselmesine neden olur. Normal popülasyonda görülme sıklığı %0,1'dir. Bu

mutasyon Japonya, İsrail ve Finlandiya'da görülmemiştir (21). Arg₃₅₀₀-Gln mutasyonunun dışında ligand defektif bir mutasyon daha belirlenmiştir, bu mutasyon Arg₃₅₃₁-Cys mutasyonudur (21).

c) Apolipoprotein CIII(Sst I allel)

Apolipoprotein CIII geninin 3' çevrimi yapılmayan bölgesinde guanin yerine sitozin geçmesinin neden olduğu restriksiyon lengt fragment polimorfizm (RLFP) Sst I polimorfizmidir. Apolipoprotein E aracılı reseptör bağlanmasını antagonize eden apolipoproteindir. Apo CIII S2 alleli taşıyan kişiler, lipoprotein reseptöre bağlanmada kusurlar içerir ve apo CIII yüklü lipoproteinler kanda birikir. Bu polimorfizm genel popülasyonun %5-10'unda gözlenir ve hipertrigliseridemi riskini 5 kat artırır (22).

d) Düşük yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü (LDL-R)

LDL'nin dokular tarafından alınabilmesi için gerekli bir proteindir. Bu proteini kodlayan gen 19. kromozomda yer alır ve 350'ye yakın varyantı tanımlanmıştır. Her beş yüz kişiden biri zayıf olarak fonksiyon gören bir LDL-R varyantına sahiptir. Bu kişilerde LDL seviyeleri yüksektir ve erken yaşta koroner arter hastalığı geliştirme riski fazladır (40,41,42).

2.4. Hemostaz ve Koagülasyon Sistemi Elemanları

2.4.1. Hemostaz

Hemostazis vasküler bütünlüğün bozulmasının ardından kanamanın durmasıdır. Kanın pıhtılaşmasını kapsar, hem pıhtılaşma hem de pıhtının çözülmesine neden olan kan damarları, trombositler ve plazma proteinleri ile ilişkilidir (43).

2.4.1.1. Primer Hemostaz

Kanın kapiller, küçük arteriel ve venüllerden damar dışına çıkmasının önler. Damar zedelendiğinde kan subendotelial dokulara temas edince trombositler subendotelial kollajene yapışarak, trombosit tıkaçını oluşturur. Meydana gelen trombosit tıkaçı, kanamanın durmasını sağlar. Primer hemostaz saniyeler içerisinde gelişir ve sonuçlanır (43).

Primer hemostazda üç safha vardır;

Adezyon

Granül salınımı

Trombosit agregasyonu (43).

a) Adezyon

Trombositler damar zedelenmesini takip eden birkaç saniye içinde subendotelial kollajen liflerine glikoprotein Ia ve IIa ile yapışırlar. Von willebrand faktörü bu birleşmeyi trombositlerdeki glikoprotein Ib (gp Ib) ile kollajen lifleri arasında köprü oluşturarak stabilize eder (43).

b) Trombosit Aktivasyonu ve Granül Salınımı

Kollajen, epinefrin veya trombinle uyarılan trombositler aktive olurlar. Aktive trombositlerin membranlarında bulunan fosfolipaz Cve fosfolipaz A₂ enzimleri aktifleşir ve araşidonik asit salınımına neden olur. Başlangıçta oluşan az miktarda tromboksan A₂'de fosfolipaz C' yi aktive eder. Sonuç olarak fosfatidil inositol 4-5 bifosfat diasilgliserol (DAG) ve inositol trifosfata dönüşür. İnositol trifosfat kalsiyumun hücreye girişini kolaylaştırır ve miyozin hafif zincirinin fosforilasyonunu sağlar. Miyozin de aktinle birleşerek trombositlerin şekil değişikliğine neden olur (43).

Bu reaksiyon esnasında oluşan DAG protein kinaz C'yi aktive ederek 47000 Da ağırlığında olan plekstrin denilen proteini fosforile ederek granül sekresyonunu sağlar. Bu granüllerden aşağıdaki maddeler salgılanır (43).

1. Lizozomlardan, endoglikozidaz ve heparin parçalayıcı enzim
2. Yoğun granüllerden, kalsiyum, serotonin ve ADP
3. Alfa granüllerden, von willebrand faktörü, fibronektin, trombospondin, heparin nötralize edici faktör, trombosit büyüme faktörü salgılanır (43).

Trombositlerden salgılanan adenzin difosfat (ADP) molekülü trombosit yüzeyinde modifikasyon yapmaktadır. Böylece modifikasyona uğrayan gp IIa/IIIb fibrinojen ile birleşmektedir. Trombositlerin arasına giren fibrinojen trombositlerin agregasyonuna neden olmaktadır. Böylece trombosit tıkaçı meydana gelerek primer hemostaz tamamlanmaktadır (43).

2.4.1.2.Sekonder Hemostaz

Sekonder hemostaz esnasında fibrinojen fibrine dönüşerek pıhtı meydana gelmektedir. Pıhtılaşma mekanizması sırasında adı geçen faktörler ve fonksiyonları aşağıdaki tablo 1 ve 2’de verilmiştir. Pıhtılaşma olayını üç kısımda inceleyebiliriz (43).

1. Faktör X’un aktivasyonu
2. Protrombinden trombinin yapımı
3. Trombinin fibrinojene etkisi sonucu fibrin oluşumu

Pıhtılaşma olayı iki yoldan olabilmektedir (43).

1. İntrensik pıhtılaşma mekanizması, intrensik pıhtılaşma mekanizmasından önce kontak faz vardır. Faktör XII, yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HMWK) ve prekallikrein (PK) subendotelial dokuya yapışarak bir kompleks meydana getirir.

Bu fazda aşağıdaki reaksiyonlar olur.

HMWK faktör XII ile birleşerek faktör XII’yi aktif proteaz haline sokar (faktör XII_a). Diğer taraftan meydana gelen faktör XII_a, PK’ ya etki ederek kallikrein meydana getirir. Meydana gelen kallikrein de inaktif faktör XII’ yi aktifleştirebilir. Diğer taratan faktör XII_a, faktör XI’e etki ederek onu aktifleştirir. Meydana gelen faktör XI_a da faktör IX’a etki ederek onu aktifleştirir. Faktör IX_a da faktör X’ u aktifleştirir (43).

2. Ekstrinsik yolda ise doku faktörü ve faktör VII rol oynar. Doku faktörü (TF), faktör VII ile Ca⁺⁺ varlığında birleşir ve faktör VII’ yi aktif hale getirir (faktör VII_a).

Faktör X’ un aktifleşmesi aşağıdaki şekilde olur:

- a) İntrensik yoldan faktör X’ un aktifleşmesi: İntrensik yolda rol oynayan ve aktif hale geçmiş bulunan faktör IX_a faktör VIII_a ve Ca⁺⁺ ile beraber faktör X’ u aktif hale getirir.
- b) Ekstrinsik yoldan faktör X’ un aktifleşmesi: Faktör X faktör VII_a ve doku faktörünün varlığında faktör X aktive olur.

Böylece meydana gelen faktör X_a, faktör V_a ve Ca⁺⁺ ile beraber protrombine etki ederek trombin meydana getirir. Oluşan trombin, fibrinojeni fibrine çevirir. Trombinin diğer faktörlere de etkisi vardır (faktör V, faktör VIII’ i aktive eder). Aynı zamanda trombosit agregasyon ve sekresyonunu stimüle etmektedir.

Trombinin fibrinojene etkisi sonucunda fibrino peptid A ve B parçaları ayrılır, böylece fibrin monomerlerini meydana getirir. Bunlar birleşerek fibrin polimerleri oluşur. Fibrin polimerleri faktör XIII_a'nın etkisi ile stabilize olur (18,43).

Çizelge 2.2'de koagülasyon sisteminde görev alan faktörlerin adları ve görevleri verilmiştir. Çizelge 2.3'de ise koagülasyon yolunda yer alan diğer pıhtılaşma faktörleri verilmiştir.

Çizelge 2.2: Kan koagülasyonunda görev alan faktörler ve fonksiyonları (18)

Faktör	Adı	Fonksiyonu
I	Fibrinojen	Fibrine dönüşüm
II	Protrombin	Trombine dönüşüm
III(TF)	Doku faktörü	Faktör X'un aktivasyonu, kofaktör
IV	Kalsiyum iyonu	Bir çok reaksiyon için kofaktör
V	Proakkelerin	Trombin oluşumu (enzim değil)
VII	Prokonvertin	Faktör X aktivasyonu
VIII	Antihemofilik globülin	Faktör X aktivasyonu, kofaktör
IX	Plazma tromboplastin öncüsü veya christmas faktörü	Faktör VIII'in oluşumu
X	Stuart-Power faktörü	Trombin oluşumu
XI	Plazma tromboplastin öncüsü	Faktör IX aktivasyonu
XII	Hageman faktör	Kontak aktivasyonu
XIII	Fibrin stabilize edici faktör (fibrinolitikaz)	Fibrinin çapraz bağlanmaları

Çizelge 2.3: Diğer koagülasyon sistemi elemanları (18)

Perkallikrein
Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HMWK)
Protein C
Protein S
Antitrombin III
Heparin faktör II
Von Willebrand Faktör (vWF)
Trombositler

2.4.2.Koagülasyon İle İlişkili Mutasyonlar

a) Faktör V^{leiden} Mutasyonu

Faktör V^{leiden} mutasyonu faktör V'i kodlayan genin 1691. nükleotidinde guanin yerine adenin geçmesinin neden olduğu 506. pozisyonadaki arginin amino asidi yerine glutaminin kodlanması ile oluşur. Aktive plateletler üzerinde faktör Xa, Va'ya

bağlanarak protrombinin trombine dönüşümünde rol alır. Oluşan trombin fibrinojenin fibrin'e dönüşümünü sağlar. Aktive protein C ise faktör VIIIa ve Va'yı inaktive etmek yolu ile bir antikoagülan gibi davranır. Faktör V^{leiden} mutasyonu aktive protein C'nin bu inaktivasyon etkisine daha dayanıklı bir faktör V mutasyonudur. Faktör V^{leiden} mutasyonu daha çok venöz trombozda çalışılmış, arteriel trombozdaki etkisi henüz netleşmemiştir (3,4).

b) Protrombin G20210A Mutasyonu

Protrombin geninin 3' çevrimi yapılmayan bölgesinde 20210.'uncu pozisyonunda guanin yerine adenin yerleşimi ile oluşan bir polimorfizmdir. Bu polimorfizm genel popülasyonun %2-5'inde bulunur. Genellikle venöz tromboz için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Komplike faktörler ile birlikte MI ile ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (3,4,5).

c) Metilentetrahidrofolat Redüktaz Mutasyonu

Pozisyon 223'te valin yerine alanin geçmesi ile oluşan bir polimorfizmdir. Metilentetrahidrofolat redüktaz'ı (MTHFR) kodlayan gendeki bu polimorfizm genel popülasyonun %5'inde bulunur ve homosistein artışı ile ilişkilidir. Koroner arter hastalık riskini üç kat artırdığı belirtilmiştir (5,44).

3.MATERYAL ve METOD

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Fosfotungstik asit (Sigma)

Mutlak etil alkol (Reidel-Haen)

2-propandiol (Merck)

3.1.2. Aletler

Santrifüj (Nüve NF 800, Sigma Ultra santrifüj)

Etüv (Nüve EN 500)

Hassas terazi (Shimadzu AX 120)

Derin dondurucu (Uğur Derin Dondurucu)

Soğutucu (Bosch)

Eppendorf tüpü (İsolab 1,5 ml'lik)

5 ml'lik EDTA'lı cam tüp (%7,5'lik)

Otomatik pipet (Gilson)

Cobas integra 700 (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany),

Light Cycler Real Time PCR (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

3.1.3. Kullanılan Kitler

Total Kolesterol: CHOLL (Cat. No. 2055643, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

HDL kolesterol: HDL (Cat.No. 2055937, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

Trigliserit: TRIG (Cat.No. 2144620, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

Apo A-I: APOA (Cat.No. 3032566, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

Apo B: APOB (Cat.No. 2053098 Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

High Pure PCR Template Kit (Catalog no. 1 796 828, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

Light Cycler-Apo E mutation Detection Kit (codon 112 and 158) (Cat. No. 3 004 716 Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

Light Cycler-Apo B Mutation Detection Kit (codon 3500) (Cat. No. 3 004 708 Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

Light Cycler-Prothrombin (G20210A) Mutation Detection Kit (Cat. No. 2 236 842, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

Light Cycler-factor V Leiden Mutation Detection Kit (Cat. No. 2 212 161, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

3.1.4. Ayıraçların Hazırlanması

a) HDL Çöktürmesinde Kullanılan Ayıraçlar

0,14 M Fosfotungstik asit hazırlanması:

41,3 gram fosfotungstik asit tartılır ve bir litreye distile su ile tamamlanır.

b) DNA İzolasyonunda Kullanılan Ayıraçların Hazırlanması

DNA izolasyonu için high pure PCR template kiti kullanılmıştır (Catalog no. 1 796 828 Roche Diagnostics Mannheim, Germany). Kit içeriği çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1: DNA İzolasyonunda kullanılan high pure PCR templat kit içeriği

Kimyasal	Miktarı	İçeriği
Binding (Bağlayıcı) tampon	20 ml	6M guanidin HCl, 10mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH:4,4
Proteinaz K	90 mg	Liyofilize proteinaz K
İnhibitör uzaklaştırıcı tampon	53 ml	5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl pH:6,6
Yıkama tamponu	20 ml	20 mMNaCl, 2 mM Tris-HCl, pH:7,5
Elüsyon tamponu	40	10 mMTris,pH:8,5

Yukarıda kit içeriği verilen DNA izolasyon setinde bulunan Proteinaz K, İnhibitör uzaklaştırıcı tampon, yıkama tamponu DNA izolasyon kitinin prospektüsünde verilen bilgiler doğrultusunda aşağıda verilen şekilde işlemlere tabi tutulmuştur.

Proteinaz K: Liyofilize proteinaz K'ya 4,5 ml steril bidistile su eklenir ve çalışma gününe kadar 500'er µl'lik porsiyonlara ayrılarak -20°C'de saklanmıştır.

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

Yıkama Tamponu: 20 ml yıkama tamponuna 80 ml mutlak etil alkol eklenmiştir.

LABORATUVAR
MAMMEZ

3.1.3.Çalışma Grubu ve Örnek Alımı

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji ve Göğüs-Kalp Damar Carrahisi polikliniklerine stabil anjina pektorisi olan ve koroner anjiyografi ile koroner arterlerinde %70 ve fazlası darlığı olan 35'i kadın, 66'sı erkek olmak üzere topla 101 hasta (yaş ortalaması;60±10) çalışma grubumuza dahil edilmiştir. Hastalara verilen bilgi formundan, hastaların %90'ı statin grubu kolesterol düşürücü ilaç kullandığı ve kolesterolden fakir diyet ile beslendiği ve %20'unun sigara kullandığı saptanmıştır. Özgeçmişinde sigara hikayesi olanların ise sigara içmeyi son kaç yıldır bıraktıkları farklılık göstermekte olup 1-20 yıl arasında değişmektedir.

Kontrol grubu olarak da özgeçmişinde diyabet, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı öyküsü olmayan 30'u kadın ve 52'si erkek olmak üzere toplam 82 sağlıklı kişi (yaş ortalaması;58±8) seçilmiştir.

Hasta ve kontrol grubuna ait total kolesterol, HDL, LDL, VLDL, trigliserit, apolipoprotein A-I ve B analizleri için biyokimya tüplerine, apolipoprotein E gen polimorfizmi, apolipoprotein B, Faktör V ve Protrombin mutasyonları için etilendiaminotetraasetikasit (EDTA) içeren tüplere kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri 12 saatlik açlıktan sonra alınmıştır. Lipid parametreleri için alınan kan örnekleri 15 dakika sonra 4000 rpm'de santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır ve takip eden 1 saat içerisinde de lipid parametreleri çalışılmıştır. EDTA'lı kanlar +4°C'de saklanmıştır ve takip eden 1 ay içerisinde DNA izolasyonları yapılmıştır.

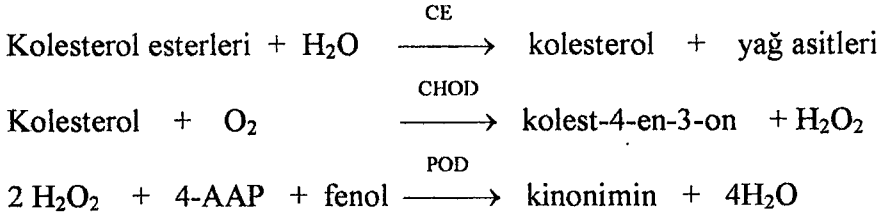
3.2.Yöntemler

3.2.1. Serum Lipid ve Lipoprotein Ölçümleri

3.2.1.1.Total Kolesterol Ölçümü

Total kolesterol düzeyleri enzimatik kolorimetrik metod (CHOD/PAP) ile çalışılmıştır. Yöntemde prensib, kolesterol esterlerinin kolesterol esteraz (CE) enzimi ile açığa çıkan serbest kolesterolün, kolesterol oksidaz (CHOD) varlığında H₂O₂'ye oksidasyonu ve oluşan H₂O₂'in ise peroksidaz (POD) ile fenol ve 4-aminoantiprin (4-APP) varlığında, kinonimine dönüşümü ve oluşan kinonimin 520 nm de ölçülmesine dayanmaktadır (Eşitlik 3.1).

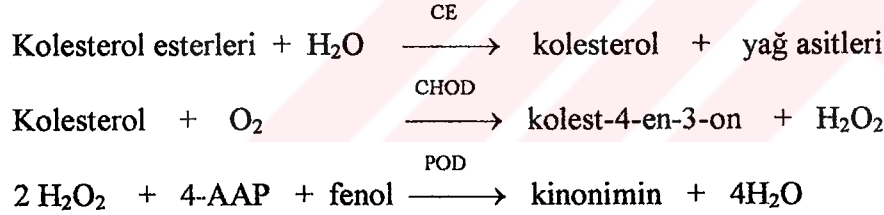
Eşitlik 3.1: Total kolesterolün ölçümünde yeralan reaksiyonların denklemi



3.2.1.2.HDL-Kolesterol Ölçümü

HDL kolesterol düzeyleri enzimatik kolorimetrik (CHOD/PAP) metod kullanılarak fosfotungustik asit ile çöktürme yöntemi ile çalışılmıştır. Yöntem, kolesterol esterlerinin CE enzimi ile açığa çıkan serbest kolesterolün, CHOD varlığında H_2O_2 'e oksidasyonunu ve oluşan H_2O_2 'in ise POD varlığında fenol ve 4-aminoantiprinin (4-APP) ile oksidatif olarak birleşerek kinonimin oluşturması prensibine dayanır. Oluşan kinonimin 520 nm'de verdiği absorbans HDL-kolesterol ile doğru orantılı olarak ilişkilidir.(Eşitlik 3.2)

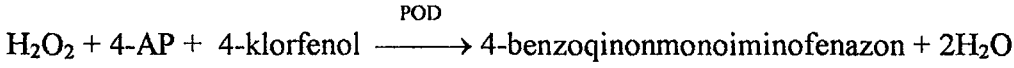
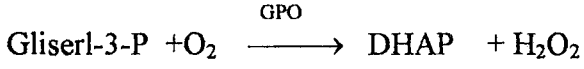
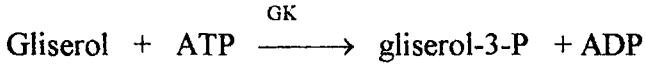
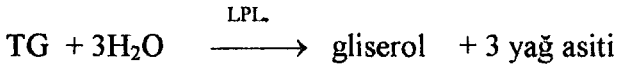
Eşitlik 3.2: HDL-kolesterolün ölçümünde yer alan reaksiyonların denklemleri



3.2.1.3.Trigliserit Ölçümü

Trigliserit düzeyleri enzimatik-kolorimetrik (gliserolfosfat oksidaz-peroksidaz) yöntem ile ölçülmüştür. Yöntem, trigliseritlerin lipoprotein lipaz tarafından serbest yağ asitleri ve gliserole hidrolizini, gliserolün gliserokinaz (GPA) ile gliserol-3-fosfata katalizini, gliserol-3-fosfatın da gliserol fosfat oksidaz (GPO) tarafından dihidroksi aseton fosfata (DHAP) ve H_2O_2 'e oksidasyonunu ve oluşan H_2O_2 'in POD ile fenol ve 4-aminofenazon (4-AP) oksidatif olarak birleşerek kinonimin oluşturması prensibine dayanmaktadır. Oluşan kinonimin 520 nm de verdiği absorbans HDL-kolesterol ile doğru orantılı olarak ilişkilidir (Eşitlik 3.3).

Eşitlik 3.3: Trigliserit ölçümünde yer alan reaksiyon denklemleri



3.2.1.4.LDL ve VLDL Ölçümü

LDL ve VLDL düzeyleri oransal olarak Friedewald eşitliğine göre hesaplanmıştır (eşitlik 3.4) (19).

Eşitlik 3.4: LDL ve VLDL'nin hesaplanması için Friedewald eşitliği.

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

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

3.2.1.5.Apolipoprotein A-I Ölçümü

Apolipoprotein A-I düzeyleri immünotürbidimetrik yöntem ile ölçülmüştür. Yöntem insan apolipoprotein A-I'ine karşı spesifik antiserum (koyun) kullanılarak çökmesi ve çökeltinin 340nm'deki türbidimetrik ölçümüne dayanmaktadır.

3.2.1.6. Apolipoprotein B Ölçümü

Apolipoprotein B düzeyleri immünotürbidimetrik yöntem ile ölçülmüştür. Yöntem insan apolipoprotein B'sine karşı spesifik antiserum (tavşan) kullanılarak çökmesi ve çökeltinin 340nm'deki türbidimetrik ölçümüne dayanmaktadır.

3.2.2. Apo E, Apo B100, Faktör V ve Protrombin Mutasyonlarının Saptanması

3.2.2.1.DNA İzolasyonu

3.2.2.1.1.Prensip

Hücreler, tüm nükleazları hemen inhibe eden bir koatropik tuz (guanidin-HCl) varlığında proteinaz K ile kısa bir inkübasyon sonunda parçalanır. Hücresel nükleik asitler çok saf pürifikasyon filtre tüplerinde bulunan özel fiber glas yapıya seçici olarak

bağlanır. Bağlı nükleik asitler kontamine edici hücre sel elemanlardan hızlı yıkama ve çevirme işlemleri ile arındırılır. Özel bir inhibitör temizleyici tampon ile bu işlem gerçekleştirilir. Son olarak düşük yoğunluklu tuz elüsyonu ile nükleik asitlerin fiber glastan ayrılmasını sağlanır.

3.2.2.1.2. Protokol

Steril bir ependorf tüpüne 200 µl tam kan alınır ve üzerine sırası ile 200 µl binding tamponu ve 40 µl proteinaz K eklenir (proteinaz K pipetlenir pipetlenmez ependorf tüpünün ağzı kapatılır ve karıştırılır). 10 dakika 72 °C'de inkübe edilir. İnkübasyonun ardından tüpe 100 µl izopropanol eklenir iyice karıştırılır ve karışım filtre tüpüne aktarılır. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir. Toplama tüpü değiştirilir. 500 µl inhibitor uzaklaştırıcı tampon alınır ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir. Toplama tüpü değiştirilir ve 500 µl yıkama tamponu alınır, 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir. Toplama tüpü değiştirilir. Bu işlem tekrar edilir. Toplama tüpünün içeriği boşaltılır ve 10 saniye 8000 rpm'de santrifüj edilir. Filtre tüpü yeni bir ependorf tüpüne alınır, üzerine 200 µl 70 °C'de inkübe edilmiş elüsyon tamponu ilave edilir. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir. Filtre tüpü atılır ve pürifiye templat DNA elde edilir.

3.2.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mutasyon Görüntüleme

İnsan genomik DNA'sından elde edilen spesifik primerlerle hedef gen (Apo B100, Apo E, Faktör V^{leiden} ve Protrombin) bölgesinden uygun baz çifti uzunluğunda gen fragmanı amplifiye edilir. Amplikon özel bir çift hibridizasyon probu aracılığı ile işaretlenir. Hibridizasyon problemleri iki farklı oligonükleotidden oluşan ve polimeraz zincir reaksiyonu PCR'in annealing fazı esnasında amplifiye fragmanın iç sekanslarına bağlanan iki probdan oluşur. Problemlerden biri 5' ucundan Light Cyclers-Red 640 tarafından işaretlenmiş ve 3' ucundan fosforile edilmiştir. Diğerisi ise 3' ucundan fluorescein tarafından işaretlenmiştir. Templat DNA'ya hibridize olduktan sonra iki prob birbirine iyice yaklaşır ve iki fluorophore arasında fluorescence resonance energy transferi (FRET) gerçekleşir ve FRET esnasında donör fluorophore fluorescein Light Cyclers cihazının ışık kaynağı tarafından eksite edilir. Eksitasyon enerjisinin bir kısmı akseptör fluorophore olan Light Cyclers-Red 640'a transfer olur. Light Cyclers-Red 640 tarafından emilen floresans Light Cyclers cihazı tarafından ölçülür.

Melting Curve Analizi ile Genotip Belirlenmesi:

Hibridizasyon problemleri kullanılarak yapılan bir işlemdir. Light Cycler-Red 640 işaretli hibridizasyon probu (çapa probu) mutasyona uğramamış hedef sekansa bağlanır. Diğer hibridizasyon probu (fluorescein işaretli prob) ise mutasyonlu kısma bağlanır. Fluorescein işaretli prob çapa probundan daha düşük bir erime ısısına sahiptir. Böylece melting curve analizi esnasında erken oluşan floresan mutasyon probuna aittir. Erime ısı (T_M) sadece ampikonun uzunluğuna ve G+C içeriğine bağlı değildir, özellikle mutasyon probu ile templat DNA arasındaki homoloji derecesine bağlıdır.

Bir mutasyon varlığında mutasyon probunun hedefle olan uyumsuzluğu hibridin destabilizasyonuna neden olur. Bir normal genotipte uyumsuzluk olmaz ve hibridin daha yüksek T_M 'i olur. Isı yavaşça artar ($0,1 \text{ s}^\circ\text{C}$) ve mutasyon probu eriyince ve her iki fluorescent boya birbirinden uzaklaşacak ve fluorescent azalacaktır. Mutasyonlu genotipte bu olay daha düşük ısılarda olacaktır. Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4'de sırası ile, Apo E, Apo B100 (kodon 3500), Protrombin ve Faktör V^{Leiden} için melting curve analizlerine ait grafikler verilmiştir.

3.2.2.2.2. Apolipoprotein E, B, Faktör V^{Leiden} ve Protrombin G20210A için PCR Protokolleri

a) Apolipoprotein E Polimorfizmi İçin PCR Protokolü

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve mutasyon görüntülemeleri için Light Cycler-Apo E Mutation Detection Kit'i (codon 112 and 158) (Cat. No. 3 004 716) kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Amplifiye edilen bölge 265 bp uzunluğundadır.

Çizelge 3.2: Light Cycler-Apo E mutation detection kit (codon 112 and 158) içeriği ve örnek başına kullanılan miktarları

Karışımlar	İçerikleri	Bir örnek için harcanan miktar (μl)
LC-Apo E mutasyon belirleme karışımı	İşaretsiz primer, mutasyon probu 1(kodon 112), mutasyon probu 2 (kodon 158), çapa probu 1 (kodon 112), çapa probu 2 (kodon 158)	4
LC-Apo E reaksiyon karışımı	Taq polimeraz, reaksiyon tamponu, dNTP karışımı (dTTP yerine dUTP)	2
Kontrol templat	Heterozigot plazmit DNA'sı	2
Steril su	PCR grade sterile dH ₂ O	12

PCR Protokolü

Denaturasyon	95°C'de	0 saniye
Anealing	60°C'de	10 saniye
Extension	72°C'de	10 saniye

b) Apolipoprotein B Mutasyonu İçin PCR Protokolü

PCR ve mutasyon görüntülemeleri için Light Cycler-Apo B Mutation Detection Kit'i (codon 3500) (Cat. No. 3 004 708) kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Amplifiye edilen bölge 207 bç uzunluğundadır.

Çizelge 3.3: Light Cycler-Apo B mutation detection kit (codon 3500) içeriği ve örnek başına kullanılan miktarları

Karışımlar	İçerikleri	Bir örnek için harcanan miktar (µl)
LC-Apo B mutasyon belirleme karışımı	İşaretsiz primer, mutasyon probu, Çapa probu	2
LC-Apo B reaksiyon karışımı	Taq polimeraz, reaksiyon tamponu, dNTP karışımı (dTTP yerine dUTP)	2
Kontrol templat A	Heterozigot plazmit DNA'sı (wt/mut C9774T)	2
Kontrol templat B	Heterozigot plazmit DNA'sı (wt/mut G9775A)	2
Steril su	PCR grade sterile dH ₂ O	14

PCR Protokolü

Denaturasyon	95°C'de	0 saniye
Anealing	58°C'de	5 saniye
Extension	72°C'de	5 saniye

c) Protrombin G20210A için PCR Protokolü

PCR ve mutasyon görüntülemeleri için Light Cycler-Prothrombin (G20210A) mutation Detection Kit'i (Cat. No. 2 236 842) kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Amplifiye edilen bölge 165 bç uzunluğundadır.

Çizelge 3.4:Light Cycler-Prothrombin (G20210A) mutation detection kit içeriği ve örnek başına kullanılan miktarları

Karışımlar	İçerikleri	Bir örnek için harcanan miktar (µl)
LC- Prothrombin (G20210A) mutasyon belirleme karışımı	İşaretsiz primer, mutasyon probu, çapa probu	4
LC- Prothrombin (G20210A) reaksiyon karışımı	Taq polimeraz, reaksiyon tamponu, dNTP karışımı (dTTP yerine dUTP)	2
Kontrol templat	Heterozigot plazmit DNA'sı	2
Steril su	PCR grade sterile dH ₂ O	12

PCR Protokolü

Denaturasyon	95°C'de	0 saniye
Anealing	55°C'de	10 saniye
Extension	72°C'de	5 saniye

d) Faktör V^{Leiden} mutasyonu için PCR Protokolü

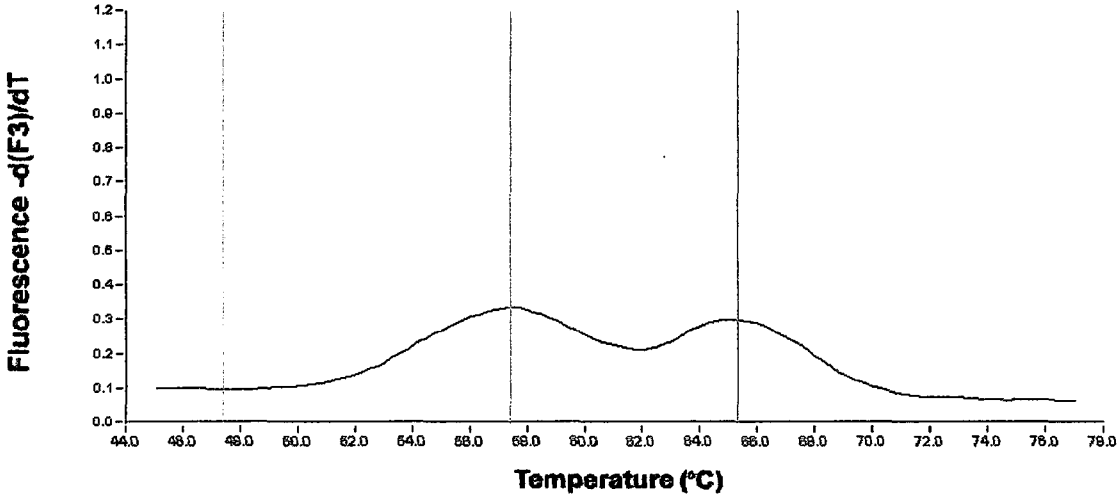
PCR ve mutasyon görüntülemeleri için Light Cycler-factor V Leiden Mutation Detection Kit (Cat. No. 2 212 161) kullanıldı (Çizelge 3.5). Amplifiye edilen bölge 222 bç uzunluğundadır.

Çizelge 3.5: Light Cycler-factor V^{Leiden} mutation detection kit içeriği ve örnek başına kullanılan miktarları

Karışımlar	İçerikleri	Bir örnek için harcanan miktar (µl)
LC- Prothrombin (G20210A) mutasyon belirleme karışımı	İşaretsiz primer, mutasyon probu, çapa probu	4
LC- Prothrombin (G20210A) reaksiyon karışımı	Taq polimeraz, reaksiyon tamponu, dNTP karışımı (dTTP yerine dUTP)	2
Kontrol templat	Heterozigot plazmit DNA'sı	2
Steril su	PCR grade sterile dH ₂ O	12

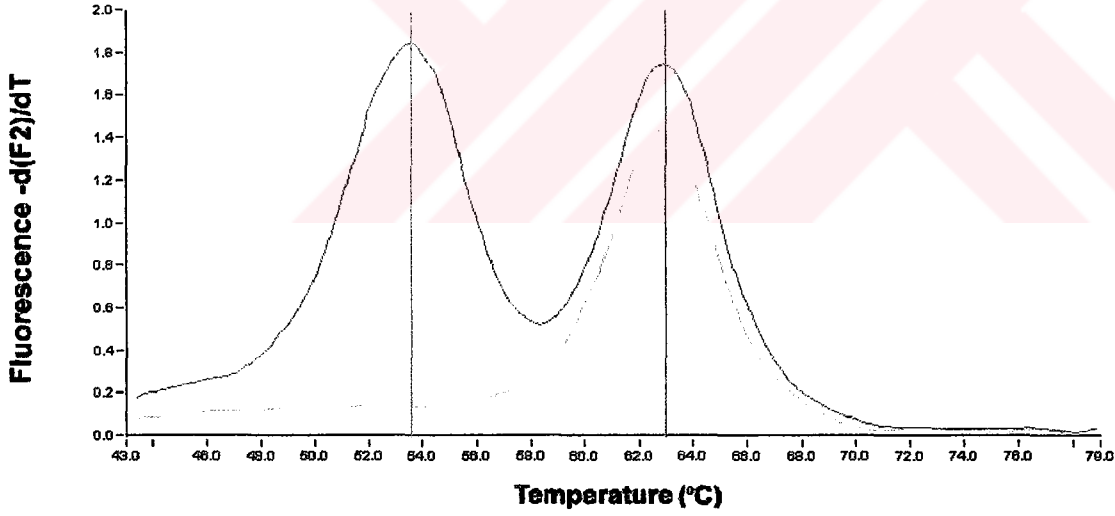
PCR Protokolü

Denaturasyon	95°C'de	0 saniye
Anealing	55°C'de	10 saniye
Extension	72°C'de	10 saniye



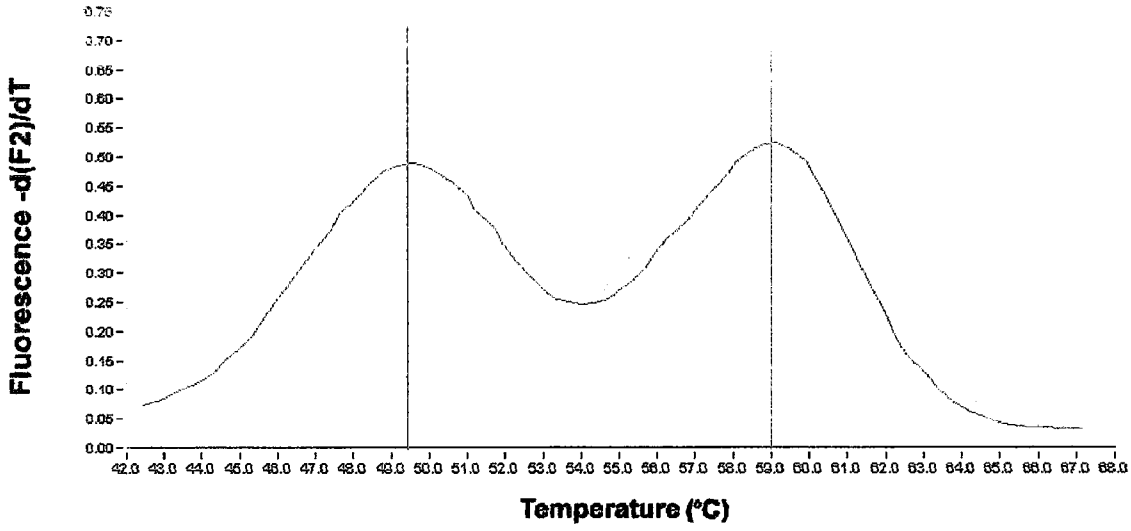
Homozigot genotip 66,0 ($\pm 2,5$)°C
 Homozigot genotip 57,5 ($\pm 2,5$)°C
 Heterozigot genotip 57,5 ve 66,0 ($\pm 2,5$)°C

Şekil 3.1: Apo E kodon 158 için melting curve analiz grafiği



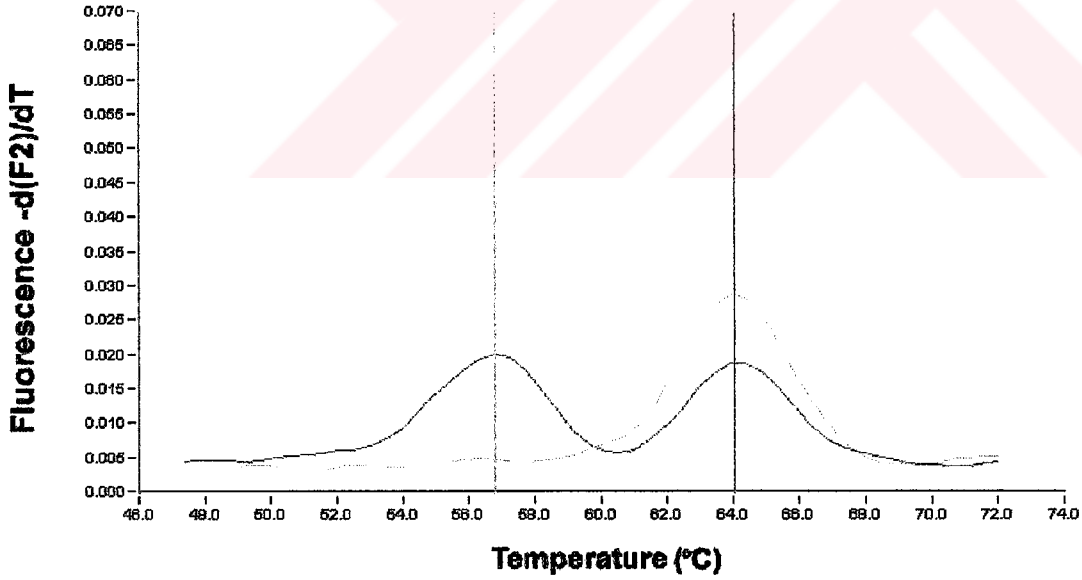
Homozigot genotip 53,0 ($\pm 1,5$)°C
 Homozigot genotip 62,5 ($\pm 1,5$)°C
 Heterozigot genotip 62,5 ve 53,0 ($\pm 1,5$)°C

Şekil 3.2: Apo B100 kodon 3500 (G9775A) için melting curve analiz grafiği



Homozigot genotip 49,0(\pm 2,5) $^{\circ}$ C
 Homozigot genotip 59,0(\pm 2,5) $^{\circ}$ C
 Heterozigot genotip 49,0 ve 59,0(\pm 2,5) $^{\circ}$ C

Şekil 3.3: Protrombin (G20210A) için melting curve analiz grafiği



Homozigot genotip 57,0(\pm 2,5) $^{\circ}$ C
 Homozigot genotip 65,0(\pm 2,5) $^{\circ}$ C
 Heterozigot genotip 57,0 ve 65,0(\pm 2,5) $^{\circ}$ C

Şekil 3.4: Faktör V^{Leiden} için melting curve analiz grafiği

3.3.İstatistiksel Yöntemler:

İstatistiksel analizler SPSS 9,05 paket istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Mutasyonların gruplar arasındaki dağılımının değerlendirilmesi χ^2 testi kullanılarak yapılmıştır. Lipid parametreleri değerlendirilirken ortalama, standart sapma, maksimum ve minimum değerleri gibi tanımlayıcı istatistik analizleri kullanılmıştır. Lipid parametreleri ile mutasyonlar arasındaki ilişki ise Bağımsız T-Testi ve Odd's oranı kullanılarak araştırılmıştır. Protrombin mutasyonu ile hastalık arasındaki ilişki relatif risk olarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık değeri (p:significance) için cut-off 0,05 olarak kabul edilmiştir.



4.BULGULAR:

4.1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Apo E Gen Polimorfizmi ve Lipid Düzeyleri İle Olan İlişkisi

Hasta ve kontrol grubuna ait apo E'nin bilinen E2, E3 ve E4 allellerinin sıklığı şekil 4.1'de; apo E allellerine göre lipoproteinlerin ve apolipoprotein A-I ve B düzeylerinin dağılımı çizelge 4.1'de; apo E genotiplerinin görülme sıklığı ise çizelge 4.2'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre E2 Allel sıklığı hasta grubunda (%12,0) kontrol grubuna (%5,0) oranla daha yüksek bulunmuştur, fakat istatistiksel olarak anlamlı olarak saptanmamıştır (odds oranı=0,386 CI: 0,149-0,998).

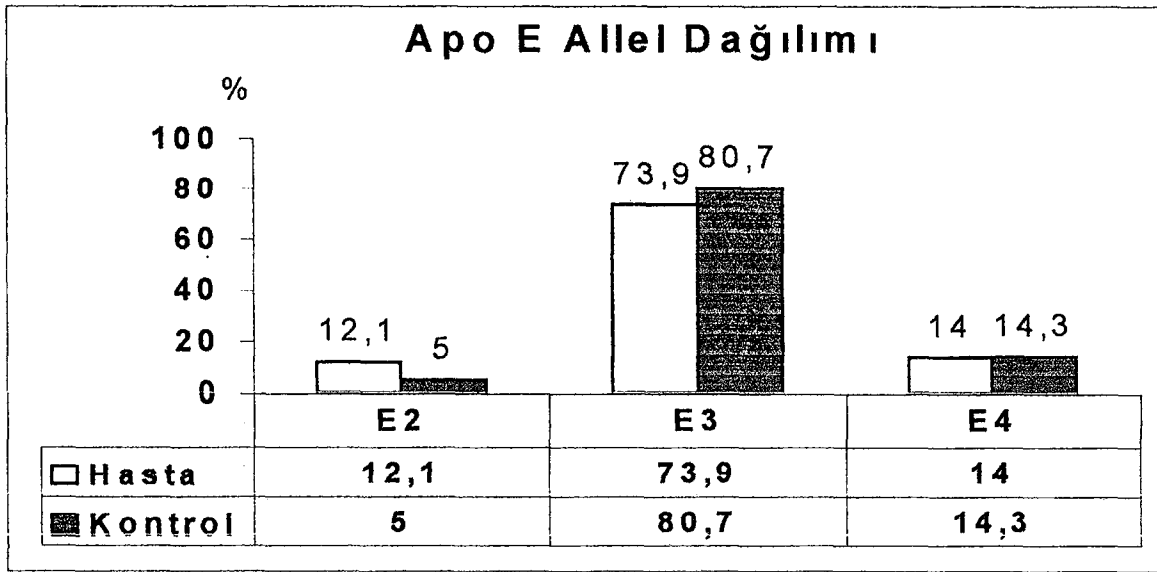
Apolipoprotein E2 allelinin E3 alleleline göre;

- Total kolesterol seviyelerinde yaklaşık %13,8'lik
- HDL-K düzeylerinde %15,0'lik
- LDL-K düzeylerinde %16,6'lık
- Apo A-I düzeylerinde %15,0'lik ve
- Apo B düzeylerinde %6,0'lık bir azalma olduğu saptanmıştır

Apolipoprotein E4 allelinin ise, E3 alleleline göre;

- Total kolesterol düzeylerinde %9,8'lik,
- HDL-K düzeylerinde %3,8'lik,
- LDL-K düzeylerinde %17,6'lık ve
- Apo B düzeylerinde %12,0'lık bir artış olduğu gözlenirken, trigliserit, apo A-I ve VLDL-K düzeylerine etkisi gözlemlenmemiştir. Çalışma grubumuzdaki hastalar statin grubu ilaçlar kullandıklarından değerlendirilmeye alınmamıştır ve yukarıda verilen değerler kontrol ait değerlerdir.

Her iki E2/E2 ve E4/E4 genotipine sahip hasta ve kontrollerin sayıların az olması nedeni ile istatistiksel olarak değerlendirmeye alınmamıştır ancak apolipoprotein E genotiplerinin görülme sıklığı sırasıyla sayı ve yüzde olarak incelendiğinde E2/E2 genotipi kontrol grubunda (1;%1,6) hasta grubuna (1;%1,0) oranla daha yüksek olduğu saptanırken E4/E4 genotipi ise kontrol grubunda (2;%3,0) hasta grubuna (5;%5,0) oranla daha düşük olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1: Apolipoprotein E allel Dağılımı

Çizelge 4.1: Apolipoprotein E geni allelerine göre lipoproteinlerin ve apolipoprotein A-I ve B düzeylerinin dağılımı (hasta grubu için n:101, kontrol grubu için n:82)

Lipid Parametreleri	E2		E3		E4	
	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol
T.Kolesterol	169,4±55,6	174,2±30,5	189,0±47,7	206,3±44,5	201,5±38,3	230,5±43,3
HDL-K	34,9±11,9	43,7±14,8	39,8±9,5	51,6±12,8	42,1±9,3	53,6±16,7
LDL-K	98,1±40,3	106,5±12,6	122,3±37,8	127,6±37,8	125,0±37,0	150,1±43,7
VLDL-K	37,8±27,4	24,2±15,5	29,8±21,9	28,7±23,2	34,4±19,3	26,8±12,5
Trigliserit	188,6±137,0	119,8±77,0	135,7±68,6	135,0±105,4	171,9±96,6	133,7±63,4
Apo A-I	108,2±137	129,8±39,2	115,8±19,2	152,1±25,6	118,5±19,4	149,3±31,6
Apo B	85,5±26,2	108,8±14,2	104,6±27,5	113,2±29,5	112,6±29,0	127±30,1

Çizelgedeki değerler X (ortalama) ± SD (standart sapma) olarak verilmiştir. n:örnek sayısı

Çizelge 4.2: Apo E genotiplerinin görülme sıklığı.

	E2/E2	E2/E3	E2/E4	E3/E3	E3/E4	E4/E4
Hasta grubu n: 101	%1,0	%14,0	%3,0	%63,0	%13,0	%5,0
Kontrol Grubu n: 82	%1,6	%6,0	%1,6	%66,0	%20,0	%3,0

4.2. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Apo B100(3500) Mutasyon sonuçları

Apolipoprotein B-100 (kodon 3500) C9774T, Apo B-100 (kodon 3500) G9775A mutasyonlarına ne hasta grubunda ne de kontrol grubunda rastlanmadığından çalışma grubu sayısı 185 hiperlipidemik, 272 kontrol ve 179 aterosklerotik hastaya çıkarılmıştır ve toplam 636 kişi taranmış fakat mutasyona rastlanılmamıştır (çizelge 4.3).

Çizelge 4.3: Apo B-100 (C9774T ve G9775A) mutasyonlarının hasta ve kontrol grubundaki dağılımı.

	Apo B-100 (C9774T)	
	Homozigot	Heterozigot
Hiperlipidemi grubu n: 185	%0	%0
Atroskleroz grubu n:179	%0	%0
Kontrol grubu n: 272	%0	%0

4.3. Hasta ve Kontrol Grubunda FV^{Leiden}: Faktör V leiden mutasyonuna hasta grubunda %6,2 kontrol grubunda %9,8 oranında rastlanmıştır fakat istatistiksel olarak anlamlı bir dağılıma sahip değildir (p=0,064) (çizelge 4.4).

Çizelge 4.4: Faktör V^{Leiden} mutasyonunun hasta ve kontrol grubundaki dağılımı

	Faktör V ^{Leiden}	
	Homozigot	Heterozigot
Hasta grubu n: 101	% 0	%6,2
Kontrol grubu n: 82	%0	%9,8

4.5. Hasta ve Kontrol Grubunda Protrombin G20210A: Protrombin de 20210. pozisyonda görülen G→A yer değişimi ile oluşan bu mutasyon kontrol grubunda rastlanılmamıştır, hasta grubunda sıklığı yaklaşık olarak %4,6 olarak saptanmıştır (p=0,022) (çizelge 4.5).

TOBB İZMİR İL BAKANLIĞI
KURUMSAL İZMİR İL BAKANLIĞI
MUTASYON MERKEZİ

Cizelge 4.5: Protrombin G20210A mutasyonunun hasta ve kontrol grundaki dağılımı

	Protrombin G20210A	
	Homozigot	Heterozigot
Hasta grubu	%0	%4,6
n: 101		
Kontrol grubu	%0	%0
n: 82		



5.TARTIŞMA

Yirminci yüzyılın başlarında ölüm olaylarının birincil nedenini enfeksiyon kökenli hastalıklar oluşturmaktaydı. Bilim ve teknolojideki gelişmeler bu gidişin seyrini değiştirmiş yirmibirinci yüzyılın başlarında bulunduğumuz şu yıllarda meydana gelen ölüm olaylarının birincil nedenini, geri kalmış ülkelerde savaş ve açlık iken gelişmiş ülkelerde koroner kalp hastalığı ve kanser gibi kompleks hastalıklar oluşturmaktadır.

Koroner kalp hastalığı, kalp kaslarına kan akışının azalması nedeniyle oluşan miyokard iskemisi ile sonuçlanan bir hastalıktır. İskemi genellikle ateroskleroz, tromboz, spazm ya da emboli gibi nedenlerle kanın kalbin bir bölümüne az ulaşması ya da anemi, karboksihemoglobinemi veya hipotansiyon gibi nedenlerle kan akımının azalmasıyla gelişen ve doku hasarıyla sonuçlanan patolojik bir durumdur. En sık görülen neden ise bir ya da daha fazla koroner arterin daralmasına neden olan aterosklerozdur. Subklinik formu çok defa erken yaşlarda başlayıp, orta ve ileri yaşlarda klinik forma dönüşen koroner arter hastalığından korunmada erken teşhisin önemli bir yeri vardır (1).

Koroner arter hastalığı ile ilişkili birçok risk faktörü belirlenmiştir. Sigara kullanımı, hipertansiyon, obezite gibi değiştirilebilir risk faktörlerinin yanı sıra yaş, cinsiyet ve genetik alt yapı gibi değiştirilemeyen risk faktörleri vardır (15).

Koroner arter hastalığı ile ilişkili genetik risk faktörleri deyince hastalığın biyokimyasal temelleri üzerinde yer alan proteinlerde fonksiyonel ve yapısal bir takım değişikliklere yol açan mutasyonlar akla gelir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda birçok genin koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür, fakat bunlarda kesin bir netlik bulunmamaktadır. Faktör V^{Leiden} mutasyonu daha çok venöz trombozda çalışılmış ve arteriel trombozla ilişkisi konusunda çok az çalışma mevcut olup, arteriel trombozdaki yeri henüz netlik kazanmamıştır. Aynı şekilde Protrombin G20210A mutasyonu da çoğunlukla venöz trombozda çalışılmış olup, venöz tromboz için bir risk faktörü olarak değerlendirilmekte fakat MI ve ateroskleroz için risk faktörü olarak değerlendirilebileceği konusunda bir netlik mevcut değildir. Bu konuda çalışmalar bütün hızı ile sürmektedir (3,4,21,45- 48).

Koroner arter hastalığı ile ilişkili mutasyonları lipoproteinlerle ilişkili mutasyonlar, koagülasyon ile ilişkili mutasyonlar, kan basıncının regülasyonu ile ilişkili mutasyonlar olmak üzere üç ana başlık altında toplayabiliriz (16).

Bölgemizde, çalışma grubumuzu oluşturan stabil anjina pektoris olan ve koroner anjiyografi ile koroner arterlerinde %70 ve fazlası darlığı saptanan 35'i kadın ve 66'sı erkek olmak üzere 101 hasta (yaş ortalaması;60±10) ve özgeçmişinde diabet, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı öyküsü olmayan 30'u kadın ve 52'si erkek olmak üzere toplam 82 sağlıklı kontrol grubunda (yaş ortalaması;58±8) lipoproteinlerle ilişkili mutasyonlardan apo B100 (3500) mutasyonu ve apo E gen polimorfları, koagülasyonla ilişkili olarak Protrombin G20210A mutasyonu ve Faktör V^{leiden} mutasyonu çalışılmıştır. Ayrıca lipoproteinlerle ilişkili mutasyonlardan apo E gen polimorfları ile lipid düzeyleri arasındaki korelasyonu belirlemek amacıyla total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, VLDL-kolesterol, trigliserit, apolipoprotein A-I ve B düzeyleri çalışılmıştır.

Karaciğer kaynaklı apo B100 proteini VLDL, IDL ve LDL'nin yapısında yer alan birincil apolipoproteindir. Özellikle apo B100, LDL'nin LDL reseptörüne bağlanmasında aracılık etmesi nedeni ile aterogeneizde LDL'nin plazmadan uzaklaştırılmasında çok önemli bir yere sahiptir (7,19).

Apo B100'e ait birçok mutasyon belirtilmiştir. Bunlardan özellikle ailesel defektif Apo B100 hastalığının nedeni olan Apo B100 Arg3500Gln (G9775A) mutasyonu, LDL'nin reseptörüne bağlanmasında problemlere sebep olmaktadır. Apo B100 3500 mutasyonu, 3500'üncü amino asitte bir nokta mutasyonu sonucu yer değiştirme ile sonuçlanan bir mutasyondur. Bunun dışında ailesel defektif Apo B100'e neden olan 3500'üncü pozisyonda Arg3500Trp (C9774T) ve 3531'inci pozisyonda Arg3531Cys (C9867T) nokta mutasyonları da bildirilmiştir. Bunlardan ilk bulunanı ve en sık rastlanılanı Apo B100 Arg3500Gln mutasyonudur.

Bednarska ve ark. Polonya'da 525 hiperkolesterolemik kişide yapmış oldukları çalışmada Arg3500Gln mutasyonu sıklığını %3,7 olarak bulmuşlar ve bu sıklığı diğer beyaz ırk popülasyonları sıklığı ile benzerlik içinde olduğunu belirtmişler. Bu mutasyona ayrıca genel Polonya popülasyonunda 1/250 sıklıkla rastlamışlardır (49).

Apolipoprotein B100 kodon 3500'de en sık rastlanılan Arg3500Gln mutasyonuna İsrail ve Japonyada rastlanılmamıştır (45).

Defesche ve ark. aynı mutasyonu Batı Avrupada sık görülmesi nedeniyle Batı Avrupa kökenli olabileceğini belirtmiştir (50).

Myant ve ark. Apo B100 (Arg3500Gln) mutasyonunun 6750 yıl önce avrupada yaşayan bir atadan kökenlenebileceğini ileri sürmüştür (51).

Tybjærg-Hansen ve ark. Danimarkada 9250 kadın ve erkekte Apo B100 (Arg3500Gln) mutasyonunu taramışlar ve yaklaşık olarak 1/1000 sıklıkta görüldüğünü, ciddi hiperkolesterolemi ve iskemik kalp hastalığı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (38). Yine Tybjærg-Hansen ve Humpries'in 1992'de yaptığı bir çalışmaya göre Kuzey Amerika ve Avrupada beyaz ırkta bu mutasyonun görülme sıklığının 1/500-1/700 arasında olduğunu belirtmişlerdir (52).

Hämäläinen ve ark. Apo B100 (Arg3500Gln) mutasyonun Finlandiya'da rastlanmadığını bildirmişlerdir (53).

1995 yılında Mahley ve ark. İstanbul, Adana, Trabzon, Kayseri, Aydın ve Ayvalık olmak üzere yedi ayrı bölgede Apo B100 (Arg3500Gln) mutasyonunu 2450 kişide taramışlar, fakat mutasyona rastlamamışlardır (54).

Bizim çalışmamızda ise, Mersin bölgesinde Apo B100 Arg3500Trp (C9774T), Apo B100 Arg3500Gln (G9775A) mutasyonlarının her ikisi de 101 hasta ve 82 kontrol grubunda çalışmıştır. Hasta ve kontrol grubunda her iki mutasyona da rastlanmaması nedeni ile örnek sayısı artırılmış ve 185 hiperlipidemik, 179 aterosklerotik ve 272 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 636 kişide çalışılmıştır, fakat ne hasta grubunda ne de kontrol grubunda Apo B100 Arg3500Gln (G9775A) ve Apo B100 Arg3500Trp (C9774T) mutasyonlarının her ikisine de rastlanılmamıştır.

Koroner arter hastalığı ile ilişkili mutasyonlardan lipoproteinlerle ilgili olan çalıştığımız diğer bir genetik faktör ise, özellikle kalıntı lipoproteinlerinin karaciğer aracılı plazmadan uzaklaştırılmasında görev alan Apo E de rastlanılan polimorfizmlerdir.

Apolipoprotein E'nin üç genel polimorfu vardır. Bunlar E2, E3 ve E4 polimorflarıdır. Bunlar ϵ_2 , ϵ_3 ve ϵ_4 adı verilen ve çeşitli toplumlarda farklı sıklıklarda görülen üç gen çiftinden kaynaklanır. Apolipoprotein E2 ile E3 arasındaki fark 158. kodonda arjinin yerine sisteinin geçmesiyle oluşmuştur (21). Apolipoprotein E4 ile E3 arasındaki fark ise 112. pozisyonda yer alan sistein amino asiti yerine arjinin amino asitinin geçmesiyle oluşmuştur. Apolipoprotein E2, LDL reseptör proteinine

bağlanmada kusurlu bir yapıya sahiptir. Apolipoprotein E4 ise, kalıntı lipoproteinlerin karaciğerden uzaklaştırılmasında görev alan dört reseptör aracılı yoldan üçünde görev alan heparan sülfat bağlama bölgesi hasarlıdır (23). Her iki LDLR ve heparan sülfat bağlama bölgeleri de 130-150. amino asitler arasında yer almaktadır. Bunların dışında bilinen birçok polimorfu vardır (26).

Kamboh ve ark. Nijeryada 176 kişide yapmış oldukları çalışmada E2, E3 ve E4 allel sıklığını sırasıyla %2,8, %66,6 ve %31,0 olarak bulmuşlardır (55).

Schaffer ve ark. Massachusetst'te beyaz ırktan 1123 erkek ve 1135 kadında E2, E3, E4 allel sıklığını sırasıyla %7,7, %78,9 ve %13,3 olarak saptamışlardır (56).

Evans ve Ark. Çinde 141 erkekte yaptıkları çalışmada E2, E3, E4 allel sıklığını sırasıyla %7,4, %84,4 ve %8,2 olarak saptamışlardır (57).

Assman ve ark. Batı Almanya da yürüttükleri çalışmada 1557 erkek ve kadın taranmış, E2, E3, E4 allel sıklığını %8,2, %78,2 ve %13,6 bulmuşlardır (58).

Malle ve ark. Almanya'da yaşayan 240 İç anadolu ve batı anadolu kökenli Türkte E3, E2 ve E4 allel sıklığını sırasıyla %88, %4,8 ve % 6,67 olarak bulmuşlardır (59).

ABD, Almanya, Finlandiya ve Japonya'da E3 alleli sırasıyla %76, %77,3, %69,5 ve %84,6 olduğu yapılan çalışmalarda mevcuttur (54).

Mahley ve ark. 1995 yılında İstanbul, Adana, Trabzon, Kayseri, Aydın ve Ayvalık olmak üzere yedi ayrı bölgedetoplam 8366 katılımcıda Apo E genotiplerini belirlemişler ve en yaygın olarak %86 sıklıkla E3 allelini saptamışlardır. Apolipoprotein E4 ve E2 allel sıklığını ise sırasıyla %7,9 ve %6,1 olarak bulmuşlardır (54).

Yaptığımız çalışmada hasta ve kontrol grubuna ait E2, E3 ve E4 allel sıklığı sırasıyla %9,1, 76,8 ve 14,1 olarak bulunmuştur (çizelge 2.3). Sonuçlarımızın Mahley ve ark.'nın (54) Türkiye'de yaptığı çalışma ile farklılık gösterirken, Assman ve ark. (58) Batı Almanya'da yürüttükleri çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda ayrıca apolipoprotein E alleleri ile total kolesterol, HDL, LDL, VLDL, trigliserit, apolipoprotein A-I ve B düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

Larson ve ark. çalışmalarında E2 allelinin %5 kolesterol azalması ve E4 allelinin % 10 kolesterol artması ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (60).

Hanon ve ark. total kolesterol ve LDL kolesterol seviyelerinin E4 alleleline sahip kişilerde yüksek ve E2 alleleline sahip kişilerde ise düşük olduğunu belirtmişlerdir (61).

Atilla ve ark. ise Apo E allelleri ile lipid düzeyleri arasında herhangi bir ilişki saptamamışlardır (62).

Çalışmamızda ise apo E3 alleleline göre E2 alleleline total kolesterol seviyelerinde yaklaşık %13,8'lik, HDL-K seviyelerinde %15,0'luk, LDL-K seviyelerine %16,6'lık, Apo A-I seviyelerinde %15,0'luk ve Apo B seviyelerinde %6'lık bir düşüşün eşlik ettiği gözlenilmiştir. Apo E3'e göre E4 alleleline kolesterol düzeylerinde %9,8'lik, HDL-K düzeylerine %3,8'lik, LDL-K düzeylerine %17,6'lık ve Apo B düzeylerine %12,0'lık bir artış eşlik ederken trigliserit, apo A-I ve VLDL-K düzeylerine etkisi gözlenilmemiştir. Çalışma grubumuzdaki hastalar hidroksimetil koenzim A redüktaz (HMGC_oA redüktaz) inhibitörleri (statin grubu ilaçlar) kullandıklarından apo E allelleri ile lipid, lipoprotein ve apolipoproteinler arasındaki ilişki kontrol grubuna ait verilerdir.

Humpries ve ark. (63), Yamamura ve ark (37) ve Eichner ve ark.'nın (64) yapmış olduğu çalışmalara göre Apo E4 alleli koroner arter hastalığı ile ilişkili iken bizim çalışmamızda herhangi bir ilişki saptanamamıştır (p=0,121).

Eichner ve ark. E2 allelinin artmış koroner kalp hastalığı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (64). Çalışmamızda Apo E4 alleli her iki grupta da benzer oranlarda dağılım göstermiştir. Apolipoprotein E2 allelinin hasta grubunda daha sık rastlanmasına karşın bu sıklık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (odds oranı=0,386 CI: 0,149-0,998).

Her iki E2/E2 ve E4/E4 genotipine sahip hasta ve kontrollerin sayıların az olması nedeni ile istatistiksel olarak değerlendirmeye alınmamıştır ancak apolipoprotein E genotiplerinin görülme sıklığı sırasıyla, sayı ve yüzde olarak incelendiğinde E2/E2 genotipi kontrol grubunda (1;%1,6) hasta grubuna (1;%1,0) oranla daha yüksek olduğu saptanırken, E4/E4 genotipi ise kontrol grubunda (2;%3,0) hasta grubuna (5;%5,0) oranla daha düşük olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda koagülasyon ile ilgili çalıştığımız mutasyonlardan biri olan faktör V^{leiden} mutasyonu, aktive protein C'nin inaktivasyon etkisine daha dayanıklı faktör V sentezlenmesine yol açmaktadır. Antikoagülan yolda yetersizliğe neden olan bu mutasyon daha çok venöz trombozda çalışılmıştır ve venöz tromboz riskini 8 kez arttırdığı saptanmıştır. Bazı çalışmalarda Faktör V^{leiden} mutasyonu taşıyan kadınların oral kontraseptif kullanmaktan kaçınmaları gerektiğini önermektedir. Ancak koroner arter hastalığı ile ilişkisi kesinlik kazanmamıştır (45-48).

Faktör V^{leiden} mutasyonu genel popülasyonda %2-5 sıklıkta saptanmıştır. Bu mutasyonun sigara kullanımı, hipertansiyon, diabetes ve obesite gibi risk faktörleri ile birlikte varlığı MI ile 3-6 kat ilişkili bulunmuştur (45).

Lucotte ve Mercier, Faktör V^{Leiden} sıklığını %12 sıklıkla enfazla Kıbrısta olduğunu ve genel Avrupa'da popülasyonunda ise % 2.7 olduğunu belirtmişlerdir (48).

Gürgey ve Mesci'nin, Türkiye'de yaptıkları çalışmada genel popülasyonda heterozigot Faktör V^{leiden} mutasyonu sıklığını %7,1 olarak saptamışlardır(65).

Doggen ve ark. Faktör V^{leiden} mutasyonu ile MI arasında ilişki bir ilişki olduğunu ve bu mutasyonun Protrombin G20210A mutasyonu varlığında MI riskinin 2.3 kat arttığını göstermiştir (3).

Ridker ve ark. 374 MI'lı ve 14916 sağlıklı erkekte yaptıkları çalışmaya göre MI ve faktör V^{leiden} mutasyonu arasında bir ilişki saptamamıştır (66).

Ayrıca Price ve ark.'nın 1997'de yaptığı çalışmada, Faktör V^{leiden} ve MI arasında bir ilişki söz konusu olmadığı bildirilmiştir (4).

Çalışmamızda ise Faktör V^{leiden} mutasyonu taraması sonucu mutasyona hasta grubunda %6,2 ve kontrol grubunda %9,8 sıklıkta heterozigot formda rastlanmıştır, fakat bu mutasyon hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir dağılım göstermemiştir (p=0,064).

Koagülasyon ilişkili diğer bir mutasyon olan Protrombin G20210A mutasyonu olup, bu mutasyonun varlığı artmış protrombin seviyeleri ile ilişkilidir. Özellikle venöz trombozda çalışılmış olan bu mutasyon MI ile ilişkili bulunmuştur (3).

Doggen ve ark. yaptığı çalışma Protrombin G20210A mutasyonunun varlığında MI riskinin 2,8 kat arttığını ileri sürmektedir (3).

Yine Arruda ve ark.'na göre MI'lı hastalarda mutasyonun sıklığı %3'tür ve Protrombin G20210A'nın mutasyonunun MI için bir risk faktörü olabileceğini ileri sürmüşlerdir (67).

Poort ve ark.. Protrombin G20210A mutasyonunu venöz trombozda çalışmışlar ve mutasyonun varlığını sağlıklı kontrol grubunda %1, hasta grubunda ise %18 olarak saptamışlardır. Venöz tromboz için 3 kat riskle ilişkili bulmuşlardır (68).

Hillarp ve ark. Protrombin G20210A mutasyonunun venöz tromboz için önemli bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir. Mutasyonun hasta grubunda görülme sıklığını %7,1, kontrol grubunda ise %1,2 olarak bulmuşlardır (69).

Gerdes ve ark. Protrombin G20210A mutasyonunu arter duvarı kalınlaşması, iskemik olaylar ve ateroskleroz ile ilişkili bulmuşlardır (70).

Çalışmamızda kontrol grubunda mutasyona rastlanmazken hasta grubunda %4,6 sıklıkta rastlanmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre protrombin mutasyonu olmayanlar mutasyonu olanların yarısı kadar risk altındadır ($p=0,022$). Bu nedenle toplumumuzda koroner arter hastalığı için Protrombin G20210A mutasyonunun bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.



6. SONUÇLAR

Çalışmamız sonucunda;

- Ne hasta ne de kontrol grubunda Apo B100 Arg3500Gln (G9775A) ve Arg3500Trp (C9774T) mutasyonlarının her ikisine de rastlanılmamıştır.
- Apolipoprotein E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4 genotipleri hasta ve kontrol grubunda sırası ile %1,0;1,6, %14,0;6,0, %3,0;1,6, %63,0;66,0, %13,0;20,0, %5,0;3,0 sıklıkta belirlenmiştir.
- Apolipoprotein E2, E3 ve E4 allelerinin dağılımı hasta ve kontrol grubunda sırasıyla %12,1;5,0, %73,9;80,7, %14,0;14,3 olarak bulunmuştur.
- Faktör V^{Leiden} mutasyonu hasta grubunda %6,2 ve kontrol grubunda ise %9,8 oranında bulunmuştur.
- Protrombin G20210A mutasyonunakontrol grubunda rastlanılmamış, hasta grubunda ise %4,6 sıklıkta bulunmuştur.

Yukarıda sıraladığımız sonuçlar doğrultusunda Apo B100 Arg3500Gln ve Arg3500Trp mutasyonu bölgemizde rastlanılmayan mutasyonlardır. Bu nedenle toplumumuzda koroner arter hastalığı için genetik risk faktörü olarak değerlendirilmemesi gerektiği, Protrombin G20210A mutasyonunun ise bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

7.KAYNAKLAR

1. **Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP.** Clinical Chemistry, Principles, procedures, correlations. Chapter 20. Fourth edition, New York, 2000;429-430.
2. **Gökdemir O, Palaoğlu KE.** Aterogenezin hücresel ve moleküler biyolojisi, Kolesterol taşınması ve lipoprotein metabolizması. İstanbul , 1993;4-5.
3. **Doggen JC, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR.** Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors:increased risk for myocardial infarction associated with factor V leiden or prothrombin 20210A. Circulation, 1998;24;97(11) :1037-41.
4. **Price D, Ridker PM.** Factor V leiden mutation and the risk for Thromboembolic diseases: A clinical perspective. Ann Int Med, 1997;127:895-903.
5. **Hessner MJ, Dinauer DM, Luhm RA, Endres JL, Freidman M, Freidman KD.** Contribution of the glycoprotein Ia 807TT, methylene tetrahydrofolate reductase 677TT and prothrombin 20210GA genotypes to prothrombotic risk among factor V (Lieden) carriers. Brit J Haem, 1999;106:237-239.
6. **Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, WatanabeY, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S.** Endothelial Nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. Hypertension, 1998;32:521-526.
7. **Bhagavan NV.** Medical Biochemistry 4th edition, San Diego 2001:429-450
8. **Mahley RW, Weisgraber KH, Farese RV.** Lipid metabolizması bozuklukları. Birinci baskı, Lipid metabolizması bozuklukları. 2000.
9. <http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/ATHHTML/ATH003.html>
10. <http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/ATHHTML/ATH005.html>
11. **Steinber D.** Low density Lipoprotein Oxidation and its Pathobiological Significance. J Biol Chem 1997;272(34):20963-66.
12. **Tsimikas S, Witztum JL.** Measuring Circulation Oxidized Low-Density Lipoprotein to Evaluate Coronary Risk. Circulation, 2001;103:1930-32.
13. **Dirican M.** LDL oksidasyonu ve atherosklerozla ilişkisi. Biyokimya dergisi, 1999;24(1);41-48.

14. **Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ.** Atherosclerosis; basic mechanisms, oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*, 1995;91(9):2488-2496.
15. **Karaaslan Y, Kadayıfçı A, Köroğlu E.** *Klinisyen.Hekimler Yayın Birliği*, 1999:229-230.
16. **Ercan B, Tamer L, Atik U.** Koroner arter hastalığı ile ilişkili genetik risk faktörleri. *MEÜ. Tıp Fak. Dergisi*. 2002;2:213-219
17. **Meng Q.** Low density lipoprotein Particles as carriers for Bioactive hormonal substnaces, Meilahti hospital, Helsinki 1999;ISBN 951-45-8669-1.
18. **Montgomery R, Conway TW, Spektor AA.** *Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım*. 6. Baskıdan çeviri, çeviri editörü; Altan N, palme yayıncılık, 2000;356-83.
19. **Burtis CA, Ashwood ER.** *Tietz Text Book of Clinical Chemistry*. Third edition, Chapter 25, 1998:820-835
20. **Champe PC, Harvey RA.** *Lippincott's Illustrated serisinden: Biyokimya*. 2. Baskı, Nobel Tıp kitabevleri ltd.şti., 1997;213-22.
21. **Betteridge DJ, Illingworth DR, Shepherd J.** Lipoproteins in health and disease. Oxford university press, section 1,2A,2C,1999;3-17,163-181,303-323.
22. **Surguchov AP, Page GP, Smith L, Patsch W, Boerwinkle E.** Polymorphic Markers in Apolipoprotein C-III Gene Flanking Regions and Hypertriglyceridemia. *Arter, Throm and Vasc Biol*, 1996;16(8):941-947.
23. **Mahley RW, Ji ZS.** Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving Cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lip Res*, 1999;40:1-13.
24. **Morrow JA, Arnold KS, Dong J, Balestra ME, Innerarity TL, Waisgraber KH.** Effect of arginine 172 on the binding of apolipoprotein E to the low density lipoprotein reseptör. *J Biol Chem*, 2000;275(4):2576-2580.
25. **Saito H, Dhanasekaran P, Baldwin F, Weisgraber KH, Lund-Katz S, Philips MC.** Lipid binding-induced conformational change in human apolipoprotein E. *J Biol Chem*, 2001;276(44):40949-54.
26. **Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Steward KE, Stroehla BC.** Apolipoprotein E Polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epid*, 2002;155(6):487-95.
27. **Kuivenhoven JA, Lukema JW, Zwindreman AH, De knijff P, McPherson R, Bruschke AV, Lie KI, Kastelein JJ.** The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene

- in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. *N Eng J Med*, 1998;338(2):86-93.
28. **Hong SH, Kim YR, Song J, Kim JQ.** Genetic variations of cholesterol ester transfer protein gene in Koreans. *Hum Biol*, 2001;73(6):815-21.
 29. **Ordovas JM, Cupples LA, Corella D et al.** Association of cholesterol ester transfer protein-*TaqI*B polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk in the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000;20:1323-29.
 30. **Attie AD; Kastelein JP, Hayden MR.** Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res*, 2001;42:1717-1726.
 31. **Juo SHH, Han Z.** Common polymorphism in promoter of microsomal triglyceride transfer protein gene influences cholesterol, apo B, and triglyceride levels in young African men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000;20:1316-1322.
 32. **Kamboh MI, Aston CE, Nestlerode CM, McAllister AE, Hamman RF.** Haplotype analysis of two APOA1/MspI polymorphisms in relation to plasma levels of Apo A-I and HDL-cholesterol. *Atherosclerosis*, 1996;127:255-262.
 33. **Carmena-Ramon R, Ascaso JF, Real JT, Ordovas JM, Carmena R.** Genetic variation at the apo AIV gene locus and response to diet in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998;18(8):1266-74.
 34. **McCombs RJ, Marcadis DE, Ellis J, Weinberg RB.** Attenuated hypercholesterolemic response to a high cholesterol diet in subjects heterozygous for the apolipoprotein AIV-2 allele. *N Eng J Med*, 1994;331(11):706-10.
 35. **Nordesgaard BG, Abildgaard S, Wittrup HH, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A.** Heterozygous Lipoprotein Lipase Deficiency. *Circulation*, 1997;96:1737-1744.
 36. **Jukema JW, Boven JV, Groenemeijer B, Zwinderman AH, Reiber JHC, Bruschke AVG, Henneman JA, Molhoek GP, Bruin T, Jansen H, Gagne E, Hayden MR, Kastelein JJP.** The Asp₉ Asn mutation in the lipoprotein lipase gene is associated with increased progression of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 1996;94:1913-1918.
 37. **Yamamura T, Dong LM, Yamamoto A.** Characterization of apo E7 (Glu244Lys, Glu245Ls), a mutant apolipoprotein E associated with hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Lipid Res*, 1999;40:253-259.
 38. **Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, Schnohr P, Nordesgaard BG.** Association of mutations in the apolipoprotein B with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Eng J Med*, 1998;338:1577-84.

پ.ا. قلمدانچي کورډي
پښتانه کورډي

39. **Ludwig EH, Hopkins PN, Allen A et al.** Association of genetic variations in apolipoprotein B with hypercholesterolemia, coronary artery disease, and receptor binding of low density lipoproteins. *J Lipid Res*, 1997;38(7):1361-73.
40. **Mak YT, Pang CP, Tomlinson Brian, Zhang J, Chan YS, Mak TWL, Masarei JRL.** Mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in Chinese familial hypercholesterolemia patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998;18:1600-1605.
41. **Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghiselline M, Rabbone I, Calandra S.** Clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000;20:e41-e52.
42. **Couture P, Brun L, Szots F, Lelievre M, Gaudet D, Despres JP, Simard J, Lupien PJ, Gagne C.** Association of specific LDL receptor gene mutations with differential plasma lipoprotein response to simvastatin in young French Canadians with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998;18:1007-1012.
43. **Müftüoğlu E.** Klinik hematoloji. 4. Baskı, Diyarbakır, 1995;501-503.
44. **Gardemann A, Wiedemann H, Philipp M, Katz N, Tillmanns H, Herhlein FW, Haberbosch W.** The TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at high risk for coronary artery disease. *Eur Heart J*, 1999;20(8):584-92.
45. www.bioheartinc.com
46. **Dunn ST, Roberts CR, Schechter E, Moore WE, Lee ET, Eichner JE.** Role of factor V Leiden mutation in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Thromb Res*, 1998;15;91(2):91-9.
47. **Foley PW, Irvine CD, Standen GR, Morse C, Smith FT, McGrath C, Baird RN.** Activated protein C resistance, factor V Leiden and peripheral vascular disease. *Cardiovasc Surg*, 1997;5(2):157-60.
48. **Lucotte G, Mercier G.** Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis*, 2001;27(2):362-7.
49. **Bednarska-Makaruk M, Bisco M, Pulawska MF, Hoffman-Zacharska D, Rodo M, Roszczyńko M, Solik-Tomassi A, Broda G, Polakoowska M, Pytlak A, Wehr H.** Familial defective apolipoprotein B-100 in a group of hypercholesterolaemic patients in Poland. Identification of a new mutation Thr3492Ile in the apolipoprotein B gene. *Eur J Hum Genet*, 2001;9(11):836-42.

50. **Defesche JC, Pricker KL, Hayden MR, van der Ende BE, Kastelein JJ.** Familial defective apolipoprotein B-100 is clinically indistinguishable from familial hypercholesterolemia. *Arch Intern Med*, 1993;153(20):2349-56.
51. **Myant NB, Forbes SA, Day INM, Gallagher J.** Estimation of the age of the ancestral arginine₃₅₀₀glutamine mutation in human apoB-100. *Genomics*, 1997;45:78-87.
52. **Tybjærg-Hansen A, Humphries SE.** Familial defective apolipoprotein B-100: a single mutation that causes hypercholesterolemia and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 1992;96(2-3):91-107.
53. **Hämäläinen T, Palotie A, Aalto-Setälä K, Kontula K, Tikkanen MJ.** Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Finnish patients with elevated serum cholesterol. *Atherosclerosis*, 1990;82:177-183.
54. **Mahley RW, Palaoğlu KE, Atak Zerrin, Dawson-Pepin J, Langois AM, Cheung Vivian, Onat Hülya, Fulks P, Mahley LL, Vakar F, Özbayrakçı S, Gökdemir O, Winkler W.** Turkish heart study: lipids, lipoproteins and apolipoproteins. *J Lipid research*, 1995;36:839-861.
55. **Kamboh MI, Sepehrnia B, Ferrell RE.** Genetic Studies of Human Apolipoproteins VI. Common polymorphism of apolipoprotein E in blacks. *Dis Markers*, 1989;7:49-55.
56. **Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Johnson S.** Effects of gender and menopausal status on the association of apoipoprotein E phenotype with plazam lipoprotein level: results from the Offspring Studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1994;14:1005-13.
57. **Evans AE, Zhang W, Moreel JFR.** Polimorphisms of the apolipoprotein B and E genes and their relationship to plasma lipid variables in healthy Chinese men. *Hum Genec*, 1993;92:191-7.
58. **Assman G, Schmitz G, Menzel HJ.** Apolipoprotein E polimorfisms and hyperlipidemia. *Clin Chem*, 1984;30:641-3.
59. **Malle E, Pfeiffer KP, Dugi K, Pfeiffer C, Glaum M, Oezcueruemez M, Kloer HU, Steinmetz A.** Polymorphisms of apolipoproteins A-IV and E in a Turkish population living in Germany. *Hum Genet*, 1996;98(3):285-90
60. **Larson I.** Effect of apolipoprotein E, A-I, A-IV, and lipoprotein lipase genotypes on fasting glukose, lipid, lipoprotein and apolipoprotein levels, and their response to lifestyle intervention. *Oregon Portlanda*, 1999;54-55.
61. **Hanon O, Girerd X, Luong V, Jeunemaitre X, Laurent S, Safar ME.** Association between the apolipoprotein E polymorphism and arterial wall thickness in asymptomatic adults. *J Hypertens*, 2000;18(4):431-6

62. **Atilla G, Acartürk E, Eskandari G, Akpınar O, Tuli A, Kanadışı M, Kayrın L.** Effects of apolipoprotein E genotypes and other risk factors on the development of coronary artery disease in Southern Turkey. *Clin Chem Acat*, 2001;312(1-2):191-6
63. **Humpries SE, Talmud PJ, Hawe E, Bolla M, et al.** Apolipoprotein E4 and coronary heart disease in middle-aged men who smoke: A prospective study. *J Biol Chem*, 2000;275 (4):2576-80.
64. **Eichner JE, Kuller LH, Orchard TJ.** Relation of apolipoprotein E genotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 1993;71:160-5.
65. **Gürgey A, Mesci L.** The prevalence of factor V Leiden (1691 G→A) mutation in Turkey. *Turk J Pediatr*, 1997;39(3):313-5.
66. **Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP,** mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, Stroke, and Venous Thrombosis in apparently healthy men. *N Eng J Med*, 1995;912-917.
67. **Arruda VR, Siquiera LH, Chiaparini LC, Coelho OR, Mansur Ap, Ramires A, Annichino-Biizacci JM.** Prevalance of the prothrombin gene variant 20210GA among patients with Myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 1998;37(1):42-5.
68. **Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM.** A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;15;88(10):3698-703
69. **Hillarp A, Zoller B, Svensson PJ, Dahlback B.** The 20210A allele of the prothrombin gene is a common risk factor among Swedish outpatients with verified deep venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1997;78(3):990-2.
70. **Gerdes VE, ten Cate H, de Groot E, Kwa VI, Prins MH, Reitsma PH, Buller HR, Brandjes DP.** Arterial wall thickness and the risk of recurrent ischemic events in carriers of the prothrombin G20210A mutation with clinical manifestation of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2002; 163(1):135-40.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
GENEL BAŞKANLIĞI
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI

8.ÖZGEÇMİŞ

Bahadır ERCAN 16/04/1974 tarihinde Malatya'nın Hekimhan ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Kulu ve Dört Yol, orta öğrenimini Adana ve Lise öğrenimini Mersin'de tamamladı. 1999 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2000 yılı bahar yarı yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalında başladığı Yüksek Lisans Öğrenimine halen devam etmektedir.

