

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KORONER ARTER HASTALIĞI OLAN BİREYLERDE
ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ GEN
POLİMORFİZMİ (GLU298ASP) VE NİTRİK OKSİT
DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. RAMAZAN AKBAY**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. SÜLEYMAN DEMİR**

DENİZLİ-2008

İş bu çalışma, Jürimiz tarafından BİYOKİMYA ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU



Üye : Prof. Dr. Diler ASLAN



Üye : Prof.Dr.S.Simin ROTA



Üye : Prof. Dr. Süleyman DEMİR



Üye : Doç. Dr. Hülya AYBEK



Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

16/05/2008


Prof. Dr. Zafer AYBEK
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Doç. Dr. Süleyman DEMİR'e, uzmanlık eğitimime değerli katkılarından dolayı anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU'na, hocalarım Prof. Dr. Diler ASLAN'a, Prof. Dr. Simin ROTA'ya, Doç. Dr. Hülya AYBEK'e, Yrd. Doç. Dr. Yaşar ENLİ'ye, desteklerinden dolayı arkadaşlarım Dr. Mehmet TÜRK'e, Dr. Murat ÇELİKER'e, Dr. Feride SERT'e, Dr. Funda ERCAN'a, Dr. Şahika ÖZEN'e, Dr. R. Didem PINARBAŞILI'ya, Dr. Koray KORKMAZCAN'a, Dr. Emine KAVALCI'ya, Dr. Fatih YAMAN'a, Dr. Cafer GÖNEN'e, Dr. Mahmut ŞENYURT'a tezime katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ'e, verilerimi toplamamda yardımcı olan Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ender SEMİZ'e, Doç. Dr. Dursun DURSUNOĞLU'na ve bölüm asistanlarına, verilerimi değerlendirmemde yardımcı olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mehmet ZENCİR'e ve bölüm asistanlarından Dr. Özgür ÖNAL'a, Dr. Ertan DARIVERENLİ'ye, her zaman yanımda olan ve özveride bulunan sevgili eşim Aysun AKBAY'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
KORONER ARTER HASTALIĞI	2
KORONER ARTER HASTALIĞI RİSK FAKTÖRLERİ	2
ATEROSKLEROZ	4
ATEROSKLEROTİK LEZYONUN MAKROSKOBİK YAPISI.....	4
ATEROSKLEROTİK LEZYONUN HİSTOLOJİK SINIFLANDIRMASI	5
ATEROSKLEROZUN OLUŞUM HİPOTEZLERİ VE PATOGENEZİ	5
NİTRİK OKSİT	7
NİTRİK OKSİT SENTAZLAR	7
NOS ENZİMLERİNİN YAPISI	8
NOS ENZİMLERİNİN NİTRİK OKSİT SENTEZİ.....	9
ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ.....	10
eNOS ENZİMİNİN İŞLEVİ	11
eNOS ENZİMİNİN KONTROLÜ	11
eNOS GEN POLİMORFİZMLERİ	12
eNOS GEN POLİMORFİZMLERİNİN HASTALIKLAR İLE İLİŞKİSİ.....	13
eNOS Glu298Asp POLİMORFİZMİ.....	13
ATEROSKLEROZ VE eNOS İLİŞKİSİ	14
GEREÇ VE YÖNTEM	17
BULGULAR.....	30
TARTIŞMA	33
SONUÇLAR	41
ÖZET.....	42
İNGİLİZCE ÖZET	44
KAYNAKLAR	46

TABLolar ÇİZELGESİ

Tablo – 1: Nitrik oksit sentaz izoenzimlerinin başlıca özellikleri.....	8
Tablo – 2: PCR karışımının hazırlanması	23
Tablo – 3: eNOS gen bölgesi PCR programı	24
Tablo – 4: Kesim karışımının hazırlanması	24
Tablo – 5: KAH grubunun özelliklerinin karşılaştırılması (Ortalama ± SD)	30
Tablo – 6: Glu298Asp polimorfizminin genotipik dağılımı ve allelik sıklığı	31
Tablo – 7: Polimorfizmin ve T allelinin KAH için odds oranları	31
Tablo – 8: Tüm gruba ve eNOS genotiplerine göre plazma NO _x düzeyleri	32
Tablo – 9: Çeşitli çalışmalardaki Glu298Asp polimorfizminin genotipik dağılımı ...	35

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil – 1: Ateroskleroz gelişimindeki enflamatuvar mekanizma	6
Şekil – 2: Nitrik oksit sentaz izoenzimlerinin yapısı	9
Şekil – 3: eNOS geninin kromozomal yerleşimi	10
Şekil – 4: eNOS enzimi aktivasyonunun kontrolü	12
Şekil – 5: Eco241 kesim enziminin hedefi.....	25
Şekil – 6: PCR sonrası hedef eNOS gen bölgesine ait elektroforez görüntüsü	26
Şekil – 7: RFLP sonrası elektroforez görüntüsü	26
Şekil – 8: Griess yönteminin şeması	27
Şekil – 9: Nitrat kalibrasyon eğrisi.....	28
Şekil – 10: KAH ve kontrol grubu plazma NO _x düzeyi grafiği	32

KISALTMALAR ÇİZELGESİ

Ala	: Alanin
Asp	: Aspartik Asit
BH ₄	: Tetrahidrobiyopterin
CaM	: Kalmodulin
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
Cys	: Sistein
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDRF	: Endotel Kaynaklı Gevşeme Faktörü “ <i>Endothelium Derived Relaxing Factor</i> ”
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	: Flavin Mononükleotid
g	: Gravite
GC	: Guanilat Siklaz
Glu	: Glutamik Asit
Gly	: Glisin
GMP	: Guanozin Monofosfat
GTP	: Guanozin Trifosfat
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein “ <i>High Density Lipoprotein</i> ”
HSDA	: Sodyum N-(2-Hidroksi-3-Sülfopropil)-3,5-Dimethoksianilin
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein “ <i>Low Density Lipoprotein</i> ”
mRNA	: Haberci Ribonükleik Asit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NED	: Naftiletilediamin
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	: Nitrik Oksit
NO ₂	: Nitrit
NO ₃	: Nitrat

NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NO _x	: Nitrit/Nitrat
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
PEG	: Polietilen Glikol
RFLP	: Kesim Parça Uzunluk Polimorfizmi “ <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ”
rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı “ <i>Revolutions Per Minute</i> ”
VKİ	: Vücut Kütle İndeksi
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein “ <i>Very Low Density Lipoprotein</i> ”

GİRİŞ

Koroner arter hastalığı (KAH) tüm dünyada önde gelen başlıca ölüm nedenlerinden biridir (1). Temel nedeni ateroskleroza bağlı olarak gelişen koroner arter kan akımının azalmasıdır. Ateroskleroza yatkınlık yaratan mekanizmalar ise oldukça karmaşıktır. Lipit metabolizması bozukluğu, pıhtılaşma fazlalığı, oksidatif stres, enflamasyon ve endotel işlevlerinin bozukluğunu da içeren çok sayıda faktörün aterosklerozun oluşumuna katkısı olduğu gösterilmiştir (2).

Günümüzde endotel işlevlerindeki bozuklukların aterosklerozdaki başlangıç lezyonlarının oluşumunda ve gelişiminde önemli rolü olduğu bilinmektedir. Sağlıklı bir endotel saldığı çeşitli moleküller ile damar tonusunu ve yapısını düzenler, pıhtılaşmayı önleyici ve oluşmuş pıhtıyı çözücü etkiler gösterir (3, 4).

Endotelden salınan önemli moleküllerden birisi de ateroskleroza karşı birçok farklı mekanizma ile koruyucu rolü olduğu gösterilen nitrik oksit (NO)'dur. NO, nitrik oksit sentaz (NOS) adı verilen bir enzim ailesi tarafından L-arginin amino asitinden sentezlenir. NOS enzim ailesinin üç izoenzimi bulunur; nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) (5, 6).

Dolaşımdaki nitrik oksitin başlıca kaynağı ise damar endotel hücrelerinde bulunan eNOS izoenzimidir (7). Bundan dolayı eNOS enziminin fonksiyonundaki bir bozukluğun NO düzeyini etkileyerek aterosklerozun gelişimine katkıda bulunabileceği ve KAH'a neden olabileceği düşünülmektedir. Şimdiye kadar eNOS gen polimorfizmi ve KAH ilişkisini inceleyen çok sayıda çalışma yapılmış ancak kesin bir sonuca varılamamıştır (8).

Bu çalışmada, eNOS enzimini kodlayan genin 7. ekzonundaki 894. pozisyonunda bulunan guanin bazının timin bazı ile yer değiştirmesinden kaynaklanan Glu298Asp polimorfizmi ile KAH arasındaki ilişkinin araştırılması ve NO düzeylerinin incelenmesi amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

KORONER ARTER HASTALIĞI

Diğer yaygın bilinen isimleri koroner kalp hastalığı, iskemik kalp hastalığı ve koroner arterlerin aterosklerozudur. KAH, özellikle gelişmiş ülkelerde olmak üzere tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu ve ekonomik yüküdür (1). Bu yüzden nedenleri ve bunların nasıl önlenebileceği üzerine en fazla çalışma yapılan hastalıklardan birisidir.

Ülkemizde Türk Kardiyoloji Derneğinin 1990 yılında başlattığı Türk Erişkinlerde Kalp Hastalığı Risk Faktörleri (TEKHARF) çalışmasının verileri ile Türkiye'deki önemi değerlendirilmiştir. On yıllık takip sonucu ülke geneli için yıllık tüm nedeni ölüm oranı erkeklerde %12,3, kadınlarda %8 olarak hesaplanmıştır. Yıllık koroner mortalite ise erkeklerde %5,2, kadınlarda %3,2 bulunmuştur. Bu verilere göre nedeni ölümler arasında kalp hastalığı ilk sırayı almaktadır. İki milyona yaklaşan kalp hastası havuzuna, her yıl yaklaşık 90-100 bin yeni olgu katıldığı düşünülürse, koroner hastalıkların bir salgın gibi yayıldığı ve bu salgında koruyucu önlemlerin çok daha etkin biçimde alınması gerekliliği açıktır (9).

KORONER ARTER HASTALIĞI RİSK FAKTÖRLERİ

Daha önce yapılan çalışmalarla KAH için yaş, cinsiyet, hiperlipidemi, hipertansiyon, sigara, diyabet, obezite ve ailesel öykü gibi risk faktörleri tanımlanmıştır (10-12).

KAH oluşumuna neden olduğu gösterilen risk faktörlerinin bazıları tedavi edilerek veya yaşam şekli düzenlenerek değiştirilebilirken; bazıları değiştirilemez faktörlerdir (13).

Değiştirilemez ana risk faktörleri:

- Yaş: Koroner arter hastalığından ölen kişilerin %83'ten fazlası 65 yaş ve üzerindedir.
- Cinsiyet: Erkekler kadınlara göre daha fazla risk altındadır. Menapoz sonrası kadınlardaki risk oranı artar ama erkeklerdeki kadar değildir.

- Kalıtım: Aile öyküsünde kalp hastalığı olan bireylerde risk daha fazladır.

Değiştirilebilir ana risk faktörleri:

- Sigara: Sigara içenler, içmeyenlere göre 2-4 kat daha fazla risk altındadır. Sigara içmek, koroner arter hastalığı olan hastalarda ani kardiyak ölüm için güçlü, bağımsız bir risk faktörüdür.
- Kan kolesterolü: Serum kolesterol düzeyi yüksekliği risk oranını artırır. Sigara içmek ve yüksek kan basıncı gibi diğer risk faktörlerinin varlığında ise bu oran daha da artar.
- Kan basıncı: Yüksek kan basıncında kalbin iş yükü artar ve bu da KAH riskini artırır.
- Fiziksel aktivite: Hareketten uzak bir yaşam şekli hastalık riskini artırır. Düzenli, orta seviyede bir aktivite ise kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucudur.
- Obezite veya fazla kiloluluk: Diğer risk faktörleri olmasa bile fazla kilolu olmak kalp hastalığı gelişimini artırır.
- Diabetes mellitus: Diyabet kalp hastalığı riskini ciddi biçimde artırır. Kan glukozunun yüksek düzeyi kontrol altına alınsa bile bu risk vardır ancak kötü kontrollü diyabetteki kadar yüksek değildir.

Katkıda bulunan diğer risk faktörleri:

- Stres
- Alkol

Bunların dışında çeşitli enflamasyon belirteçleri ile koroner arter hastalığı riski arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir. Bu belirteçler hücre adezyon molekülleri, sitokinler, aterosjenik enzimler ve C-reaktif proteindir (14).

Düşük yoğunluklu lipoproteine (LDL) apolipoprotein (a)'nın eklenmesi ile oluşan Lipoprotein (a)'nın yüksek düzeylerinin de bağımsız bir risk faktörü olduğu bazı çalışmalarla gösterilmiştir (15, 16).

ATEROSKLEROZ

Ateroskleroz orta ve büyük çaplı arterleri etkileyen, intimada yama tarzında duvar kalınlaşmalarına neden olan ve arter lümenini daraltabilen kronik bir hastalıktır (17).

Ateroskleroz Yunanca kökenli bir terimdir ve lezyonun başlıca iki bileşenini yansıtır. *Athero* Yunanca'da lapa anlamında kullanılır. Aterosklerotik plağın tabanındaki nekrotik çekirdeğe karşılık gelir. *Sclerosis* ise sertleşme anlamında kullanılır. Plağın luminal kenarındaki fibrotik başlığa karşılık gelir (18).

Ateroskleroz ve onun sonuçları gelişmiş toplumlarda ölüm ve sakatlığın en önemli nedenidir. Bugüne kadarki artış oranı incelendiğinde ise tahminlere göre 2020 yılına kadar hastalıklardan ölümün başlıca nedeni olacaktır (19).

ATEROSKLEROTİK LEZYONUN MAKROSKOBİK YAPISI

Aterosklerotik lezyonlar makroskopik olarak üç tiptir: Yağ çizgisi, fibroz plak ve komplike olmuş lezyon (20).

Ateroskleroz çok erken yaşlarda başlamaktadır. İlk başlangıç lezyonu, okside olmuş LDL'yi fagosite ederek köpük hücrelerine dönüşen makrofajların birikmesiyle oluşan yağ çizgileridir (21, 22).

Daha sonra makrofajların dışında da lipit birikimi olur. Bu yapıya düz kas hücreleri ve fibroblastların eklenmesi ile beyaz renkte ve yüzeyden kabarık olan damar lümenini daraltabilen fibröz plak gelişir. Ardından hücre dışı kolesterol içeriğinin artması, kollajenden zengin matriks yapısının ve fibröz kapsülün de eklenmesi ile olgun aterom plağı oluşur (23).

İlerlemiş lezyonda aterosklerotik plak içinde kolesterol birikimi devam eder ve kalsifikasyon ile kanama komplike plağı oluşturur. Plak yüzeyindeki bozulma trombüs gelişimine neden olabilir ve sonuçta damar tıkanıklığına yol açabilir (24).

ATEROSKLEROTİK LEZYONUN HİSTOLOJİK SINIFLANDIRMASI

Geleneksel plak sınıflaması aşağıda görüldüğü gibidir (17, 25).

- Tip I: Köpük hücreli başlangıç lezyonu
- Tip II: Köpük hücre tabakalı yağ çizgisi
- Tip III: Hücre dışı lipit birikimli preaterom
- Tip IV: Hücre dışı lipitlerin birleşmesi ile oluşan lipit çekirdekli aterom plağı
- Tip V: Fibroaterom
- Tip VI: Yüzeysel bozukluğu, kanama veya trombüsü olan komplike plak
- Tip VII: Kalsifiye olmuş plak
- Tip VIII: Lipit çekirdeğı olmayan fibrotik plak

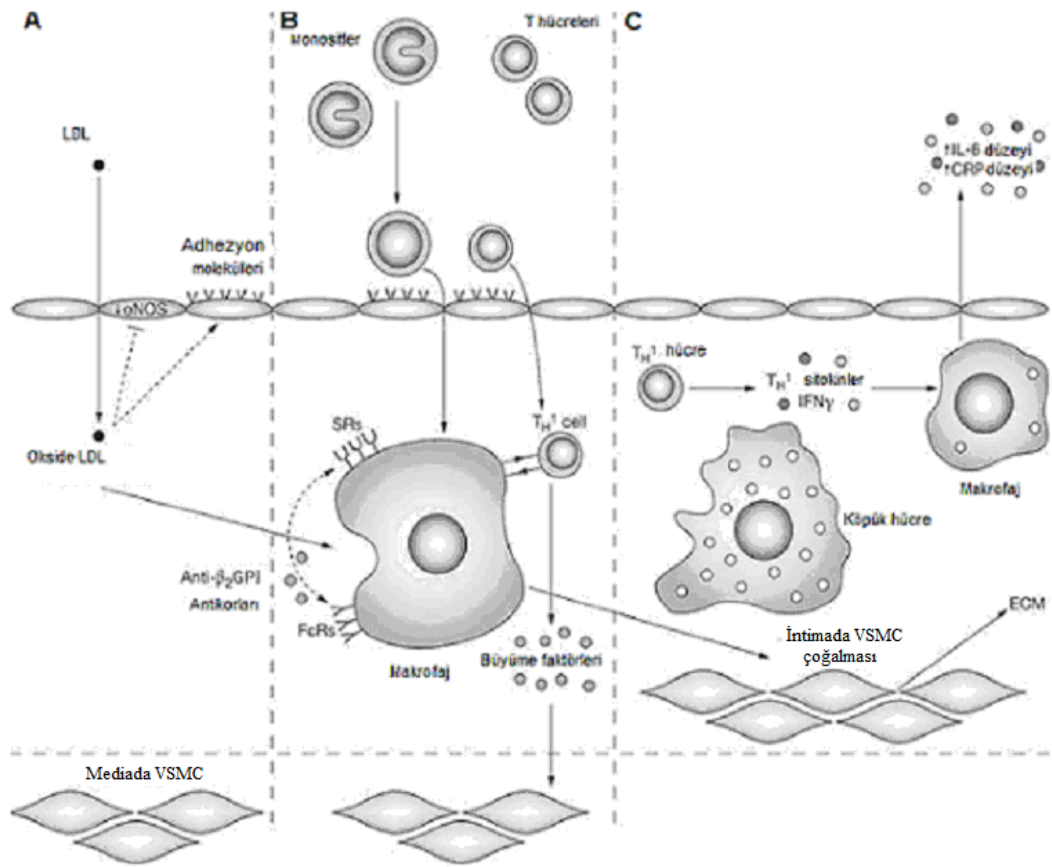
ATEROSKLEROZUN OLUŞUM HİPOTEZLERİ VE PATOGENEZİ

Aterosklerozun gelişimi oldukça karmaşıktır ve çeşitli çevresel, genetik etkileşimleri de içeren çok faktörlü bir süreçtir (16). Aterosklerozun patogenezi için birçok hipotez öne sürülmüştür: Lipit hipotezi, homodinamik hipotez, fibrin hipotezi, mezenkimal hipotez, hasara yanıt hipotezi (18).

Bunlardan en çok üzerinde durulanı hasara yanıt hipotezidir. Bu hipotezde aterosklerotik lezyonlar, damar endotel hücrelerinin yapısının bozulması ile sonuçlanan hasara yanıt olarak gelişen bir cevaptır. Hasar hafiftir ve yol açan nedenler kronik hiperlipidemi, enfeksiyon, enflamasyon, mekanik ve kimyasal faktörler olabilir. Ancak asıl etkili olanın düzensiz kan akımının endotel hücrelerinde oluşturduğu gerilim stresi olduğu düşünülmektedir. Hasar görmüş olan alanlarda endotel altı doku ortaya çıkmakta, trombositler bu alanlara yapışmakta ve makrofajlar toplanmakta lipoproteinler damar içine sızmakta, orta tabakada (*tunica media*) bulunan düz kas hücreleri intimaya göç etmekte ve orada çoğalmaktadır (26).

Aterosklerozun gelişiminde enflamatuvar bir mekanizma olduğu da düşünülmektedir (Şekil – 1). Bu mekanizmada kompleman sisteminin önemli rolü vardır. Kompleman sistemi, plazmada inaktif olarak bulunan enzimlerin kademeli aktivasyonu ile enflamatuvar moleküllerin olduğu bir yoldur. LDL'nin okside olması ile oluşan okside LDL'nin de kompleman faktörlerinin üretilmelerine ve aktivasyonlarına yol açtığı ve bu yönüyle endotel işlevlerini bozan önemli bir faktör

olduğu gösterilmiştir (27). Modifiye LDL adı da verilen okside LDL, lipoproteindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu apolipoprotein B-100'deki lizin kalıntılarının değişimi ile ortaya çıkar (28). Bu şekilde modifiye olan LDL, makrofajlar tarafından normal reseptörlerinden farklı olarak “çöpçü reseptörler” aracılığı ile çok daha hızlı bir şekilde tutulur. Okside LDL monositler için kemotaktiktir, monosit adezyonunu artırır, makrofaj motilitesini engelleyerek hasar alanında toplanmalarına ve dokuya tutunmalarına yol açar, büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınmasını uyarır, immunojenik ve sitotoksiktir (29-31).



Şekil – 1: Ateroskleroz gelişimindeki enflamatuvar mekanizma (32).

(A) Erken süreçte oksidasyon ile LDL'nin yapısı değişir. Okside LDL endotel işlevlerinin bozulmasına katkıda bulunur (eNOS aktivitesi azalır) ve adezyon moleküllerinin sentezini artırır. (B) Dolaşımdaki monosit ve lenfositler endotel altı boşluğa göç eder. Okside olmuş LDL'yi alan makrofajlar köpük hücrelerine dönüşür. (C) Büyüme faktörlerinin salınması ile mediadaki düz kas hücreleri intimaya göç eder ve çoğalır. Yardımcı T hücrelerinden sitokinler salınır ve bunlar IL-6 ve CRP salınmasını uyarır. LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein, CRP: C-reaktif protein, ECM: Hücre dışı matriks, eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz, FcRs: Fc Reseptör, IL-6: İnterlökin 6, IFN γ : İnterferon gama, SRs: Çöpçü reseptör, T_H1: Timus yardımcı hücre-1, VSMC: Damar düz kas hücresi.

Aterosklerozun erken sürecinde okside olmuş LDL, eNOS aktivitesini de azaltmaktadır. eNOS enziminin ürünü olan NO'nun ise LDL'nin oksidasyonunu sınırladığı düşünülmektedir (31, 32). Ayrıca çok sayıda başka mekanizmalar ile de NO'nun ateroskleroza karşı koruyucu rolleri vardır.

NİTRİK OKSİT

NO, son yıllarda üzerinde birçok çalışma yapılan, çeşitli biyolojik olaylarda önemli rolleri olduğu gösterilmiş kısa ömürlü bir moleküldür.

NO'nun keşfinden önce tavşan aortasının asetilkoline karşı vermiş olduğu cevabın değerlendirildiği çalışmada, sadece endotel hücreleri sağlam olduğunda gevşeme gerçekleşirken, endotel devamlılığı bozulduğunda gevşemede yetersizlik olduğu bulunmuştur. Damar genişlemesinde etkili olan bu molekül ilk başlarda "Endotel Kaynaklı Gevşeme Faktörü" (EDRF) olarak isimlendirilmiştir (33).

Daha sonraki yıllarda ise EDRF damar endotelinden izole edilmiş ve nitrik oksitin benzer farmakolojik yapıda olduğu ileri sürülerek EDRF, NO olarak tanımlanmıştır (34).

Biyolojik sistemlerde NO, NOS adı verilen bir grup enzim tarafından sentezlenmektedir (6).

NİTRİK OKSİT SENTAZLAR

Nitrik oksit sentaz enzim ailesi başlangıçta nNOS ve eNOS'un oluşturduğu yapısal ve iNOS'un oluşturduğu indüklenebilir olmak üzere iki sınıfa ayrılmıştır (34). Günümüzde ise her bir izoenzimin ayrı ayrı ele alınmaktadır.

iNOS, uyarılmış birçok hücre tipinden salınabilen izoenzimdir. nNOS başlıca nöronal dokuda, eNOS ise başlıca damar endotel hücrelerinde bulunur (36). Bu izoenzimlerin amino asit dizilimi ve biyokimyasal özellikleri benzerlik gösterir ancak farklı kromozomlar üzerindeki ayrı genler tarafından kodlanır ve başlıca buldukları yerler ile aktivatörleri de birbirlerinden farklıdır (7, 37, 38) (Tablo – 1).

Tablo – 1: Nitrik oksit sentaz izoenzimlerinin başlıca özellikleri (35, 39).

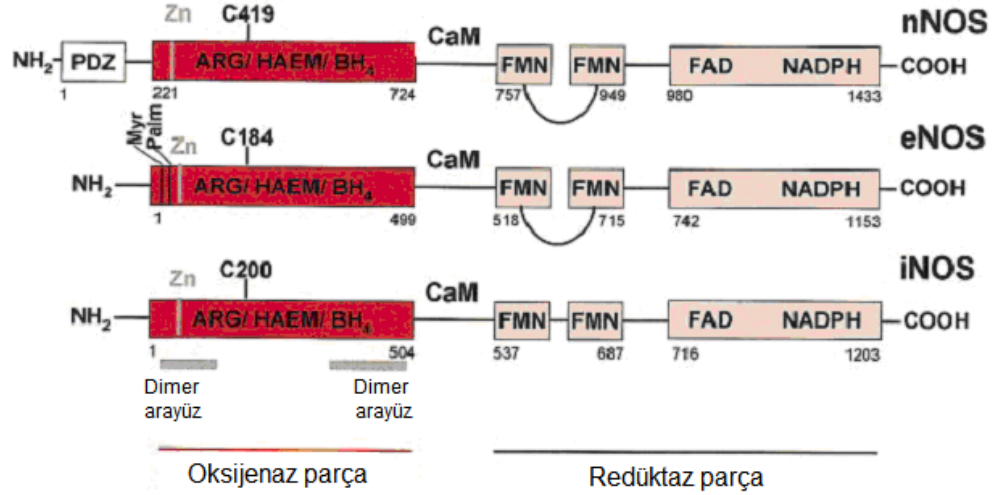
NOS izomerleri	Kromozal lokalizasyonu	Gen yapısı	Enzimin bulunduğu yerler	Enzimin aktivatörleri
nNOS (NOSI)	12q24.2-12q24.3	29 ekzon 28 intron	Merkezi sinir sistemi (serebral korteks, hipokampus) Periferel sinir sistemi Nonadrenarjik, nonkolinerjik nöronlar	Asetilkolin Bradikinin Ca iyonoforları Histamin Lökotrienler Trombosit aktive edici faktör
iNOS (NOSII)	17q11.2-17q12	26 ekzon 25 intron	Makrofajlar Nötrofiller Solunum yolu epitel hücreleri Fibroblastlar Mast hücreleri	Bakteriyel ürünler (lipopolisakkaritler) Enflamatuvar sitokinler
eNOS (NOSIII)	7q35-7q36	26 ekzon 25 intron	Endotel hücreleri Mast hücreleri Trombositler Düz kas hücreleri Nötrofiller	Serotonin Trombin Asetilkolin Bradikinin

nNOS (NOSI): Nöronal nitrik oksit sentaz, iNOS (NOSII): İndüklenebilir nitrik oksit sentaz, eNOS (NOSIII): Endotelial nitrik oksit sentaz.

NOS ENZİMLERİNİN YAPISI

NOS'lar oksijenaz ve redüktaz bölge olmak üzere iki parçalı yapıya sahiptirler. Oksijenaz bölgesi, protoporfirin IX (hem), tetrahidrobiopterin (BH₄) ve arjinin için bağlanma kısımları içerir. Redüktaz bölgesi ise flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) için bağlanma kısımları içerir (40) (Şekil – 2). Bu iki bölgenin birbirine kenetlenmesi kalmodulinin (CaM) sayesinde gerçekleşir. eNOS ve nNOS enzimlerinde CaM bağlanması Ca⁺⁺ gerektirir. iNOS enzimi ise başka bir liganda gereksinim duymadan dimerik formu başına bir CaM molekülünü büyük bir afinite ile geri dönüşümsüz olarak bağlayabilir (41).

NOS enzimlerinin tam işlev gösterebilmeleri için oksijenaz ve redüktaz bölgelerden oluşan monomerlerin birleşerek dimerleşmesi gerekmektedir. Bu hem bağlanması ile başlar ve BH₄ yapının sağlamlığına katkıda bulunur (42, 43).



Şekil – 2: Nitrik oksit sentaz izoenzimlerinin yapısı (35).

Oksijenaz ve redüktaz bölgesi kutucuklarla gösterilmiştir. Amino asit sayıları her bir bölgenin başında ve sonunda verilmiştir. Her bir izoenzimde sistin ve CaM bağlanma alanı gösterilmiştir. Çinko bağlanmış sistinlerin yeri ise gri renk ile gösterilmiştir. Dimer arayüzler gri bar ile gösterilmiştir. nNOS fazladan bir hücre bağlantı noktalarında kompleks oluşumuna katkıda bulunan globüler protein parçaya (PDZ) sahipken, eNOS miristik asit ve palmitik asit bağlanma kısımları içerir. Arg: Arjinin, Hem: Protoporfirin IX, BH₄: Tetrahidrobiyopterin, CaM: Kalmodülin, FMN: Flavin mononükleotid, FAD: Flavin adenin dinükleotid, NADPH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, Myr: Miristik asit, Palm: Palmitik asit, nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz, iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz, eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz

NOS ENZİMLERİNİN NİTRİK OKSİT SENTEZİ

NO, L-arjinin amino asidinden sentezlenir (6). L-Arjinin/Nitrik oksit yolu 1987’de bulunmuştur (44).

Nitrik oksit sentezi için ana elektron taşıyıcısı NADPH’dır. FAD ve FMN’nin her biri NADPH’dan ikişer elektron alır ve CaM aracılığı ile bunları oksijenaz bölgesindeki hem grubuna tek tek aktarır (35).

Oksijenaz bölge aynı zamanda arjinin ve oksijenin bağlandığı kısımları içerir. Bundan sonra NOS enzimi, NO sentezindeki iki basamağı katalizler. Tepkimenin ilk basamağında arjininin guanido nitrojeni hidroksillenerek Guanido-Hidroksi Arjinin (N-OH-Arjinin) oluşur. Bu ara ürün oldukça stabildir. Enzime sıkı bağlı olan ara ürün ikinci basamakta ise okside edilir ve sitrülün ile nitrik oksite çevrilir. Reaksiyonda bir mol NO sentezi için 2 mol oksijen ile 1,5 mol NADPH kullanılır.

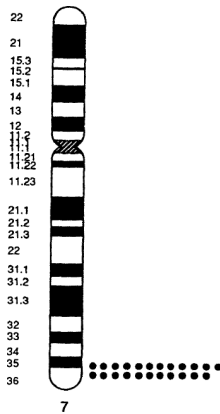
Kullanılan oksijenlerin iki atomu suya indirgenirken, diğeri iki oksijen atomu NO ve sitrülünin oluşumunda kullanılır. Nitrik oksit yapısındaki oksijenin kaynağı, ilk basamakta arjinine katılan atomdur. Enzimin kofaktörleri BH₄, FAD, FMN ve hem molekülüdür (36, 45-47). Reaksiyonlar sonucu oluşan NO çok kısa yarı ömürlüdür. Biyolojik sıvılarda hızla metabolitleri olan nitrit (NO₂) ve nitrata (NO₃) okside olur (48).

Oksijenaz ve redüktaz bölgeleri CaM tarafından kenetlenmemiş ise elektronlar hem grubuna değil ortamda bulunan başka bir elektron alıcısına (ferrisiyanid, sitokrom c gibi) aktarılır (49). Bu şekilde hücrede NO sentezlenirken bir taraftan da süperoksitin üretimi oldukça reaktif bir tür olan peroksinitrit radikalinin oluşumuna neden olur (50).

NOS izoenzimlerinin hepsinin ortak ürünü NO'dur fakat buldukları yerler ve üstlendikleri roller farklıdır. eNOS, düşük miktarlarda üretilir ve damar tonusunu ayarlar. nNOS, düşük miktarlarda üretilip sinaptik şekillenme ve sinirsel iletimi düzenler. iNOS, yüksek miktarlarda üretilerek enflamatuvar olaylarda rol alır ve hücre aracılı immun cevapta etkilidir (51). Dolaşımdaki NO'nun asıl kaynağı ise eNOS izoenzimidir (7).

ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ

eNOS geni, 7. kromozomun uzun kolunun 35. ve 36. loküsünde yerleşmiştir (Şekil – 3). 26 ekzon içerir ve 4052 nükleotidlik bir haberci ribonükleik asit (mRNA) tarafından kodlanır (7).



Şekil – 3: eNOS geninin kromozomal yerleşimi (7).

eNOS ENZİMİNİN İŞLEVİ

Başlıca gerilim stresi olmak üzere asetil kolin, serotonin, trombin, Bradikinin gibi çeşitli biyolojik moleküller eNOS enzimini uyarır. Ardından eNOS tarafından endotelde üretilen NO düz kas hücrelerine geçer. Burada guanilat siklaz (GC) enzimini aktifler ve guanozin trifosfat (GTP) guanozin monofosfata (GMP) dönüşür. Artan hücre içi siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyi düz kas hücrelerinde gevşemeye yol açar (52).

eNOS ENZİMİNİN KONTROLÜ

eNOS enziminin aktivitesi çeşitli faktörlerin etkisi ile düzenlenmektedir (Şekil – 4). CaM NOS enzimleri ile ilişkili olduğu gösterilen ilk proteindir ve her üç izoenzimin en güçlü uyarandır (53). eNOS enziminin redüktaz bölgesi NO üretimi için gerekli olan elektronları indirgenmiş NADP'yi bağlayıp dehidrojene ederek sağlar. Ardından bu elektronlar oksijenaz bölgeye transfer edilirler. Elektronların transferi için öncelikle Ca^{++} ile CaM'in kompleks yapmış olması gerekmektedir. Kompleksin eNOS'a bağlanması ile iki parça birbirine kenetlenir ve elektron akışı gerçekleşir (54).

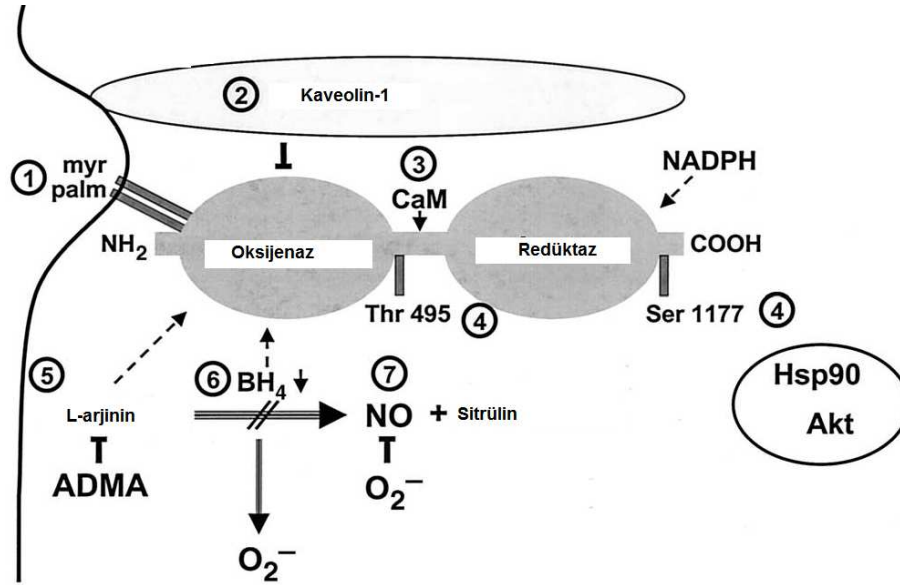
eNOS'un hücre zarının kendi içine kıvrılmasıyla meydana gelen zarsal çukurlara (kaveol) yerleşmesi uygun düzeyde NO sentezi için zorunludur. Enzimin kaveole yönlendirilmesi ve yerleşmesinde oksijenaz bölgesine takılmış olan miristik asit ve palmitik asit önemlidir. Bunun eksikliğinde eNOS sitoplazmaya geçer ve aktivitesi azalır (39).

eNOS enziminin aktivitesinde protein-protein etkileşimi de gösterilmiştir. Kaveolün yapısal proteini olan kaveolin-1, eNOS ile kompleks oluşturarak enzimi inaktif tutar (55).

eNOS'un aktivitesi enzimin fosforillenmesi ile de kontrol edilir. Serin 1177'nin fosforillenmesi enzimi aktive eder. Bu aktivasyon işlemi protoonkogen olan protein kinaz B ve bir şaperon olan ısı şok protein 90'a ihtiyaç duyar. Treonin 495'in fosforilasyonu ise eNOS'u inaktive eder (56 -58).

L-arjininin eNOS'a bağlanması da endojen yarışmalı antagonisti olan asimetrik dimetil arjinin tarafından inhibe edilebilir (54).

BH₄ de NO sentezi için kofaktör olarak gereklidir ve eksikliğinde eNOS'da ayrışma meydana gelir. Sonuç olarak da eNOS tarafından NO'nun yerine süperoksit (O₂⁻) üretilir (59).



Şekil – 4: eNOS enzimi aktivasyonunun kontrolü (54).

1-eNOS'un kaveole yerleşmesi. 2- Kaveolin-1'in eNOS aktivitesini baskılaması. 3- CaM'in eNOS aktivitesini uyarması 4- Serin 1177 (Ser 1177)'nin fosforillenmesi ile eNOS aktivitesinin uyarılması ve treonin 495 (Thr 495)'in fosforilasyonu ile baskılanması. 5- ADMA ile L-arjininin bağlanmasının yarışmalı inhibisyonu. 6- BH₄ eksikliği ile O₂⁻ oluşumu. 7- O₂⁻ ile NO'nun inaktivasyonu. myr: Miristik asit, palm: Palmitik asit, CaM: Kalmodülin, Hsp90: Isı şok proteini 90, Akt: Protein kinaz B, ADMA: Asimetrik dimetil arjinin, BH₄: Tetrahydrobiopterin, NO: Nitrik oksit, Thr: Treonin, Ser: Serin, NADPH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

eNOS GEN POLİMORFİZMLERİ

eNOS enzimini kodlayan gende şimdiye kadar yapılan araştırmalarda dizideki tek bir bazın değişmesinden kaynaklanan tek nükleotid polimorfizmleri başta olmak üzere, bazı dizilerin tekrarlanmasından kaynaklanan tekrar polimorfizmleri bulunmuştur. eNOS geninde tanımlanabilmiş ve en fazla çalışılan değişikliklerden bazıları şunlardır:

İntronlarda, bir tanesi intron 18'deki Ala27Cys, diğeri ise intron 23'teki Gly10Thr olmak üzere iki tek nükleotid polimorfizmi bulunmuştur. İntron 4, 13, 23'te de bazı tekrar değişiklikleri tanımlanmıştır. Promoter bölgede Thr786Cys, Ala922Gly, Thr1468Ala olarak adlandırılan üç tek nükleotid değişimi tanımlanmıştır. Ekzon bölgesi polimorfizmi ise Glu298Asp'dir (47).

eNOS GEN POLİMORFİZMLERİNİN HASTALIKLARLA İLİŞKİSİ

eNOS'un hastalıklardaki rolünü belirleyebilmek için hem insanlarda hem de laboratuvar hayvanlarında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sonuçta, değişmiş gen ekspresyonunun ve aktivitesinin endotelin bütünlüğünü ve işlevini etkileyerek bazı patolojilere neden olduğu açıklanmıştır. Bu değişimlere neden olan faktörlerin ne olduğu her zaman bilinmemekle birlikte hipoksi, stres, hormonlar veya gen polimorfizmi gibi etkenler olabilir. Ancak başlıca endotel işlevlerinin bozukluğu ile de ilişkili olabilmektedir. Değişmiş olan eNOS aktivitesinde endotel işlevlerindeki bozukluğunun neden mi yoksa sonuç mu olduğu henüz tam olarak açıklanabilmiş değildir (46).

eNOS polimorfizmleri esansiyel hipertansiyon (60), KAH (61-64), koroner spazm (65-68), gebelik hipertansiyonu (69), preeklampsi (70), tekrarlayan düşükler (71), polikistik böbrek hastalığı (72), Alzheimer (73-75), serebrovasküler hastalıklar (76), ateroskleroz (77, 78) gibi çeşitli patolojik durumlarda çalışılmıştır.

eNOS Glu298Asp POLİMORFİZMİ

Polimorfizmlerin biyolojik sistemlerdeki etkileri açısından değişikliğin oluş şekli kadar genin hangi bölgesinde meydana geldiği de önemlidir.

Promoter bölge, genin dışında bulunan ve kopyalanmanın başladığı kısa DNA dizisidir. Genelde promoter bölgedeki polimorfizmler mRNA kopyalanmasını etkileme, dolayısıyla enzimin düzeyini değiştirme potansiyeline sahiptir. Ekzon bölgeleri kodlanan kısımlardır. Buradaki polimorfizmler protein yapıyı etkileyerek enzim aktivitesini değiştirebilir. İntronlar genlerdeki kodlamayan bölgelerdir. Bu yüzden intronlardaki polimorfizmlerin promoter veya ekzon bölgesi varyantlarına göre daha az işlevsel role sahip olduğu düşünülür (62, 79).

Şimdiye kadar yapılmış çalışmalar ile eNOS genin diğer bölgelerinde çeşitli polimorfizmler bulunabilmişse de sadece tek bir ekzon bölgesi polimorfizmi tanımlanabilmiştir (G894T/Glu298Asp) (80, 81).

Bir ekzon polimorfizmi olması nedeniyle Glu298Asp polimorfizminin enzimin ürünü olan NO ile ilişkisinin nasıl olduğu ve ne gibi durumlara yol açtığı araştırmacılar açısından daha dikkate değer olarak görülmektedir.

Glu298Asp ekzon polimorfizmi ilk olarak 1998'de Yoshimura ve arkadaşları tarafından eNOS geninin ekzon 7'sinde gösterilmiştir. 894. pozisyondaki guanin (G) bazının timin (T) bazı ile yer değiştirmesi ile meydana gelir. Bu durumda eNOS geninde 298. pozisyonda ifade edilen amino asit Glutamat (Glu) yerine Aspartat (Asp) olur (66).

Glu298Asp polimorfizminin birçok hastalık ve durumla ilişkisini inceleyen çok sayıda çalışma vardır. Bunlardan bazıları; koroner arter spazmı (66), koroner arter hastalığı (61, 62, 82), miyokart enfarktüsü (83, 84), ateroskleroz (79, 80), hipertansiyon (85) ve Alzheimerdir (86).

ATEROSKLEROZ VE eNOS İLİŞKİSİ

Aterosklerozun güçlü bir genetik bileşeni olduğu uzun süredir bilinmektedir. Çeşitli genlerin tek başına veya birleşerek aterosklerozun gelişimine katkıda bulunduğu açıklık kazanmıştır (87, 88).

eNOS genindeki varyasyonların da ateroskleroza neden olabileceği düşünülmektedir. Çünkü eNOS'un katalizlediği reaksiyonla endotel hücrelerinde meydana gelen NO'nun aterosklerozun oluşumunu önleyen birçok fizyolojik etkisi vardır. Bunlar:

NO, endotelden salındıktan sonra düz kas hücresi zarından diffüze olarak GC'yi aktive eder ve hücre içi cGMP düzeyini artırır. cGMP düz kas hücrelerinde gevşemeye yol açar ve bu vazodilatasyona katkıda bulunur (52). NO ayrıca Ca^{++} bağımlı K^+ kanallarını aktive ederek hücre içi K^+ düzeyini artırır. Bu hücre zarında hiperpolarizasyona yol açar ve damarlardaki dilatasyona katkıda bulunur (89).

NO vazodilatatör etkilerine ek olarak trombosit ve lökositlerin toplanmasını ve endotele yapışmasını önler (90, 91).

Tüm bu etkileri ile NO, ateroskleroza karşı koruyucu olmasının yanında damar tonusunu ve kan basıncını düzenler. Endoteldeki NO düzeyinin değişmesi aterosklozün oluşumuna katkıda bulunur (62).

NO'nun aterosklerozdaki farklı rolleri bazı hayvan modellerinde yapılan deneylerle de gösterilmiştir. Moroi ve arkadaşları NO eksikliğinin aterosklerozdaki rolünü belirleyebilmek amacıyla femoral arterleri hasarlanmış fare modellerinde yapmış olduğu çalışmada, eNOS mutant fareleri kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Mutant farelerde yeni intimal çoğalmanın arttığı ve yeniden yapılanmanın azalmış olduğu saptanarak NO eksikliğinde ateroskleroza eğilim olabileceği bildirilmiştir (92). Rudic ve arkadaşlarının çalışmasında da eNOS mutant farelerin vasküler hasara aşırı çoğalma ile cevap verdiği bulunmuştur. Damarların yeniden yapılanmasının kontrolünde, başlıca rolün endotelden kaynaklanan mediatörler arasında NO'ya ait olduğu, NO üretimindeki bozuklukların ateroskleroz ve hipertansiyona neden olabileceği sonucuna varılmıştır (93). Hogg ve arkadaşları NO'nun LDL'nin oksidasyonunu baskıladığını ve arter duvarında köpük hücrelerin toplanmasını bu şekilde engellediğini göstermiştir (31). Haperan ve arkadaşları da eNOS aktivitesindeki yükselmenin kan basıncında yaklaşık 20 mmHg'lık bir düşmeye ve plazma kolesterol düzeyinde ise yaklaşık %17'lik bir azalmaya yol açtığını, bunların sonucunda aterosklerotik lezyonda %40'lık bir azalma olduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak eNOS aktivitesindeki artışın ateroskleroza karşı koruma sağladığını belirtmişlerdir (94).

İnsanlarda yapılmış olan ateroskleroz çalışmaları da hayvan deneyleriyle aynı sonuçları vermiştir. Pritchard ve arkadaşlarının insan umbilikal veni endotelial hücrelerinde yapmış olduğu çalışmada NO'nun süperoksit anyonu miktarının sınırlandırılmasında önemli bir rolü olduğu ve bu sayede LDL'nin oksidasyonunda koruyucu olduğu bildirilmiştir (95). Buttery ve arkadaşları normal safen ven ve suni ortamda yaşatılan safen vende eNOS'un immunokimyasal olarak yerleşim yerini araştırmışlardır. Suni ortamdaki venin aterosklerotik bölgelerinde eNOS düzeyinin

anlamli miktarda düşük olduğunu göstermişlerdir (96). Benzer şekilde Wilcox ve arkadaşları da normal ve aterosklerotik insan damarlarında eNOS düzeyini zgn işaretleyiciler kullanarak insutu hibridizasyon ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırmışlar ve aterosklerotik damarlarda eNOS mRNA ve proteinlerinin azaldığını göstermişlerdir (97). Oemar ve arkadaşları aterosklerotik insan karotid arterinde mikrosensör vasıtasıyla NO düzeyini ölçmüş ve plaklardaki endotel hücrelerinde eNOS'un immunoreaktivitesinin ve NO düzeyinin azaldığını bulmuşlardır (78). Quyyumi ve arkadaşlarının ateroskleroz risk faktörleri ve NO düzeyi ile ilgili çalışmasında ise yaş, cinsiyet, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, sigara içimi, diabetes mellitus gibi risk faktörlerine sahip kişilerde bazal NO düzeyinin düşük olduğu ve asetilkolinle uyarılmaya cevabın azaldığı bulunmuştur (98).

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇ

ÇALIŞMA GRUBU

Çalışmaya, Eylül 2006 ile Kasım 2007 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kardiyoloji Kliniğine başvuran ve incelemeler sonucunda koroner anjiyografi çekilmesi gerekli görülen, yaşları 36 ile 81 arasında değişen, 145'i erkek, 61'i kadın olmak üzere toplam 206 kişi dahil edildi. Anjiyografi sonucuna göre herhangi bir ana damarında veya dallarında %50'den daha fazla darlık görülen 131 kişi KAH grubunu, darlığı olmayan veya %50'den daha az darlık görülen 75 kişi kontrol grubunu oluşturdu.

Çalışma öncesi Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu'nun onayı alındı. Ayrıca çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılara "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" ile yapılacaklar hakkında bilgi verildi ve gönüllü olduklarına ilişkin imzaları ile izinleri alındı.

Hastaların fizik muayenesi ve diğer tetkikleri çalışmadan habersiz olan klinik doktorları tarafından yapıldı. Anjiyografileri ise anjiyografi laboratuvarı doktorları tarafından uygulandı.

Çalışmaya katılan tüm bireylerden 12 saatlik açlık sonrası anjiyografi için girilmiş olan damardan eNOS genotiplendirmesi ve plazma nitrit/nitrat (NO_x) düzeyi ölçümü için iki EDTA'lı tüpe yaklaşık 2'şer mL kan alındı. Kan örneklerinden biri tam kan olarak +4 °C de saklandı ve en fazla iki ay içinde DNA izolasyonu için kullanıldı, diğeri plazma NO_x düzeyi ölçümü için santrifüj cihazında 1000 gravite (g)'de 10 dakika (dk) çevrildi. Ardından plazması ayrılarak mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve çalışma başlangıcına kadar -20 °C'de saklandı.

KULLANILAN CİHAZLAR

- Masa üstü santrifüj (NF 1215, Nüve, Türkiye)
- Soğutmalı masa üstü santrifüj (Hettich, MİKRO 22 R, Almanya)
- Spektrofotometre (U.V 1601, Shimadzu, Japonya)
- Etüv (EN 500, Nüve, Türkiye)
- pH metre (pH 526, WTW, Almanya)
- Vorteks/Spin santrifüj (FVL-2400N, Biosan, Letonya)
- Kuru ısıtıcılı blok (TDB120, Biosan, Letonya)
- Yatay elektroforez seti (Model 75.1214, Model 75.710, CLP, ABD)
- Elektroforez güç kaynağı (Power station 300, Labnet, ABD)
- *Thermal cycler* (ATC 201, CLP, ABD)
- Mikrodalga fırın (Beko, Türkiye)
- -20 °C derin dondurucu (Beko, Türkiye)
- +4 °C buzdolabı (Vestel, Türkiye)
- Hassas terazi (Sartorius, Almanya)
- Jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 200, Kodak, ABD)
- Otomatik pipet seti (1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL) (Eppendorf, ABD)
- Modular P (Roche/Hitachi, Japonya) otoanalizörü

KULLANILAN MALZEMELER

- DNA izolasyon kiti (Fermentas, Litvanya)
- Kloroform (Scharlau, İspanya)
- Etanol (Scharlau, İspanya)
- Primerler (Metabion, Almanya)
 - Oligonükleotid 1; 5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3'
 - Oligonükleotid 2; 5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3'
- dNTP karışımı (Fermentas, Litvanya)
- Tag polimeraz (10x tamponu ile birlikte) (Bioron, Almanya)
- Magnezyum klorür (Bioron, Almanya)
- Eco241 kesim enzimi (10x tamponu ile birlikte) (Fermentas, Litvanya)
- 50 bp DNA marker (Fermentas, Litvanya)
- Agaroz (Scharlau, İspanya)
- Borik asit (Scharlau, İspanya)

- Etilen diamin tetra asetik asit (Scharlau, İspanya)
- Etidyum bromür (Scharlau, İspanya)
- Jel yükleme boyası
- Sodyum hidroksit (Carlo Erba, İtalya)
- Tris-(hidroksimetil)-aminometan (Scharlau, İspanya)
- N-(1-naftil) etilendiamin (NED) (Merck, Almanya)
- Sülfanilamid (Sigma, Almanya)
- Ortofosforik asit (Merck, Almanya)
- β -NADPH (Fluka, Almanya)
- Nitrat redüktaz (Roche, Almanya)
- Sodyum nitrat (Merck, Almanya)
- 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L filtreli otomatik pipet ucu (CLP, ABD)
- 0,2 μ L'lik kapaklı tüp (CLP, ABD)
- 1,5 mL nükleaz içermeyen kapaklı mikrosantrifüj tüpü (CLP, ABD)
- EDTA'lı tüp (Greiner bio-one, Almanya)
- Cam malzemeler
- Mikroplak 96'lık

KULLANILAN ÇÖZELTİLER

AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

○ 0,5 M EDTA (pH; 8,0): 0,5 M olacak şekilde EDTA tartılıp son hacim distile su ile tamamlandı. Sodyum hidroksit ile pH 8,0'e ayarlandı. +4⁰C'de saklandı.

○ 5xTBE: 27,5 gr borik asit, 54 gr tris-baz tartıldı. Üzerine 20 mL 0,5 M pH'ı 8,0 olan EDTA eklendi. Karışımın son hacmi distile su ile 1000 mL tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

NO_x DÜZEYİNİN ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

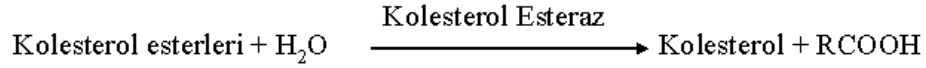
○ Griess A: 0,1 gr NED, 100 mL distile suda çözüldü. +4⁰C'de ışıktan korunarak saklandı.

○ Griess B: 1 gr Sülfanilamid, %5 (v/v) 100 mL Ortofosforik asit'te çözüldü. +4⁰C'de ışıktan korunarak saklandı.

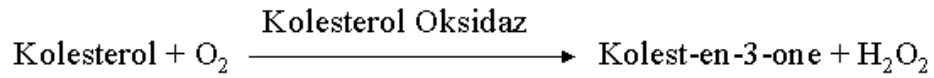
YÖNTEMLER

TOTAL KOLESTEROL ÖLÇÜMÜ

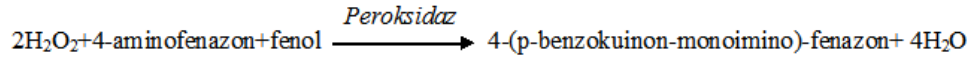
Enzimatik kolorimetrik yöntem ile Modular P analizöründe (Roche/Hitachi, Japonya) yapılmıştır. Bu yöntemin ilk reaksiyonunda kolesterol esterleri, kolesterol esteraz ile serbest kolesterol ve yağ asidi oluşturacak şekilde parçalanır.



Ardından kolesterol, kolesterol oksidaz ile kolest-4-en-3-one ve hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüştürülür.



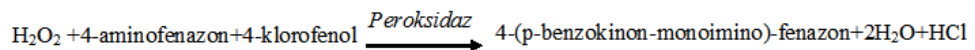
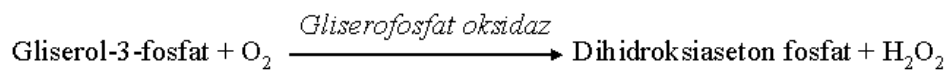
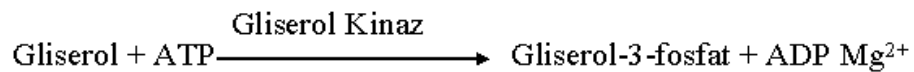
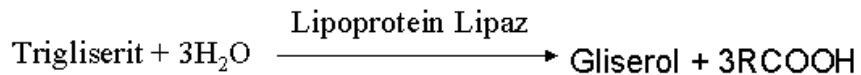
Açığa çıkan H_2O_2 , peroksidaz enziminin katalizi altında 4-aminofenazon ve fenol ile reaksiyona girerek kırmızı bir boya oluşturur. Renk yoğunluğu kolesterol düzeyi ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak tespit edilebilir.



Kit prospektüsünde kolesterolün referans değeri erkeklerde ve kadınlarda < 200 mg/dL (5,2 mmol/L) olarak verilmiştir.

TRİGLİSERİT ÖLÇÜMÜ

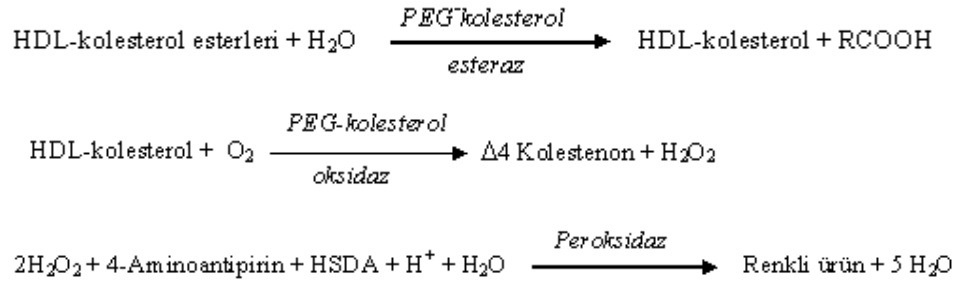
Enzimatik kolorimetrik yöntem ile Modular P analizöründe (Roche/Hitachi, Japonya) yapılmıştır. Bu yöntemde trigliseritlerin gliserole, hızlı ve tam olarak hidroliz olabilmesi için lipoprotein lipaz kullanılır. Üretilen H_2O_2 daha sonra 4-aminofenazon ve 4-klorofenol ile kırmızı bir boya maddesi oluşturmak için peroksidazın katalitik etkisi altında reaksiyona girer. Ortaya çıkan rengin absorbansı fotometrik olarak ölçülür.



Kit prospektüsünde trigliseritin referans değeri erkeklerde ve kadınlarda < 200 mg/dL (5,2 mmol/L) olarak verilmiştir.

HDL-KOLESTEROL ÖLÇÜMÜ

Homojen enzimatik kolorimetrik yöntem ile Modular P analizöründe (Roche/Hitachi, Japonya) yapılmıştır. Bu yöntemde, HDL-kolesterol esterleri polietilen glikol (PEG) kolesterol esteraz enzimi yardımıyla serbest HDL-kolesterol oluşturacak şekilde parçalanır. Ardından PEG koesterol oksidaz enziminin katalizi altındaki bir reaksiyon ile H₂O₂ meydana gelir. Oluşan H₂O₂, sodyum N-(2-hidroksi-3-sülfopropil)-3,5-dimethoksianilin (HSDA) ve 4-Aminoantipirin ile reaksiyona girerek renkli bir ürün ortaya çıkartır. Bu renkli bileşiğin verdiği absorbans fotometrik olarak ölçülür.



Kit prospektüsünde HDL-kolesterolün referans aralığı erkeklerde 35-55 mg/dL (0,90-1,45 mmol/L), kadınlarda 45-65 mg/dL (1,15-1,68 mmol/L) olarak verilmiştir.

VLDL-KOLESTEROL VE LDL-KOLESTEROL MİKTAR TAYİNİ

VLDL-kolesterol ve LDL-kolesterol Friedewald formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Bu formül de LDL-kolesterol=Total kolesterol-(VLDL+HDL) ve VLDL-kolesterol= Trigliserit/5'tir. Formül trigliserit < 400 mg/dL olduğunda geçerlidir.

KAN ÖRNEKLERİNDEN DNA'NIN İZOLE EDİLMESİ

DNA elde edilecek olan EDTA'lı tam kan örnekleri çalışmaya kadar +4 °C'de saklandı. DNA izolasyonu için "Genomik DNA Saflaştırma Kiti" (Fermentas, Litvanya) kullanıldı. Kit içeriğinde 1 adet parçalayıcı çözelti, 1 adet çöktürücü çözelti, 1 adet sodyum klorür (NaCl) bulunmaktadır. Kit prospektüsünde verilen

izolasyon basamakları aşağıdaki gibidir.

- 1- 200 µL örnek, 400 µL parçalayıcı çözelti ile 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpünde vorteks yapılarak karıştırıldı.
- 2- 65 °C'de 5 dk inkübe edilip hücreler parçalandı.
- 3- Hemen sonra tüpe 600 µL kloroform eklenerek birkaç kez nazikçe alt üst edildi.
- 4- 11000 g'de 2 dk santrifüj yapılarak DNA harici hücre içeriği DNA'dan ayrıldı.
- 5- Yeni bir tüpte, her bir örnek için 720 µL nükleaz içermeyen su ile 80 µL 10x çöktürücü çözelti karıştırıldı.
- 6- Santrifüj sonrası DNA içeren süpernatant hazırlanmış olan yeni tüpe konuldu ve oda ısısında 1-2 dk nazikçe alt üst edildi.
- 7- 11000 g'de 2 dk santrifüj yapılarak DNA çöktürüldü.
- 8- Süpernatant tamamen uzaklaştırıldıktan sonra pellet 100 µL 1,2 M NaCl solüsyonu ile tam olarak çözüldü.
- 9- 300 µL soğuk absolut (%100) etanol eklenerek -20 °C'de 10 dk DNA'nın çökmesi beklendi.
- 10- 11000 g'de 3-4 dk santrifüj yapıldıktan sonra etanol tamamen uzaklaştırıldı ve böylece DNA tuzlardan arındırılmış oldu.
- 11- Son olarak pellet 100 µL steril deiyonize su ile hafifçe vorteks edilerek çözüldü ve -20 °C'de saklandı.

DNA SAFLIK DEĞERLENDİRMESİ

DNA örnekleri distile su ile 1/200 oranında seyreltildi. Spektrofotometrenin distile su ile kör ayarı yapıldıktan sonra nükleotidlerin heterosiklik halkalarının maksimum absorptans verdikleri 260 nm'de DNA'nın ve 280 nm'de de RNA ile proteinlerin vermiş olduğu absorptanslar ölçüldü.

260 nm'de okunan absorptansın, 280 nm'de okunan absorptansa bölünmesi ile elde edilen orana bakılarak DNA izolasyonunun saflığı değerlendirildi. Saf bir DNA izolasyonu için bu oran 1,7-1,8 olmalıdır (99).

DNA MİKTARININ HESAPLANMASI

DNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 birimlik absorbands 50 µg/mL DNA'ya karşılık gelir (99). Buna göre elde edilmiş olan DNA'nın miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{DNA miktarı (}\mu\text{g/mL)}: \text{Seyreltme katsayısı (200)} \times A_{260} \times 50$$

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)YÖNTEMİ

Elde edilen DNA örneklerinden, hedef eNOS gen bölgesini içeren 248 baz çiftlik (bp) kısmının çoğaltılmasında 5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3' ve 5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3' baz dizili oligonükleotidler kullanıldı (81, 100).

1 örneklik PCR için kullanılan karışım Tablo – 2'de görüldüğü gibidir.

Tablo – 2: PCR karışımının hazırlanması.

1 örnek için PCR karışımının içeriği	Miktar (µL)
10x PCR tamponu	2
dNTP karışım	2
MgCl ₂	4
Oligonükleotid 1	1
Oligonükleotid 2	1
Tag polimeraz	0,25
Distile su	7,75

PCR; polimeraz zincir reaksiyonu, dNTP; deoksintükleotid trifosfat

Kontrol PCR tüpüne negatif kontrol için 2 µL distile su ve örnek tüplerinin her birine 2 µL DNA örneği konulduktan sonra üzerine hazırlanmış olan PCR karışımı eklendi. Ardından uygun ısı ve sayıda döngü için *Thermal Cycler* cihazına yerleştirildi. Hedef DNA'nın çoğaltılmasında Naber ve arkadaşlarının programı modifiye edilerek kullanıldı (100). İlk aşamada tüpler, çoğaltılacak olan DNA çift sarmalının birbirinden ayrılması için 95 °C'de 5 dk ısıtıldı. İkinci aşamada 3

kademeli 30 döngü uygulandı. Birinci kademede 94 °C’de 0,30 dk ısıtılarak çoğaltılan eNOS gen bölgesi çift zincirleri ayrıldı. İkinci kademede 60 °C’de 0,30 dk oligonükleotid 1 ve 2 bağlandı. Üçüncü kademede 72 °C’de 0,30 dk uzama için bekletildi. Üçüncü aşamada ise 72 °C’de 5 dk ek bir uzama inkübasyonu uygulandı (Tablo – 3).

Tablo – 3: eNOS gen bölgesi PCR programı.

Aşama	Döngü	Kademe	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)
1	1	1	95	5,00
2	30	1	94	0,30
		2	60	0,30
		3	72	0,30
3	1	1	72	5,00

eNOS; endotelial nitrik oksit sentaz, PCR; polimeraz zincir reaksiyonu, dk; dakika

KESİM PARÇA UZUNLUĞU POLİMORFİZMİ YÖNTEMİ (RFLP)

eNOS gen bölgesinin çoğaltılması ile elde edilmiş olan 248 bp’lik hedef DNA’nın kesilmesi için standart RFLP yöntemi kullanıldı (81, 100).

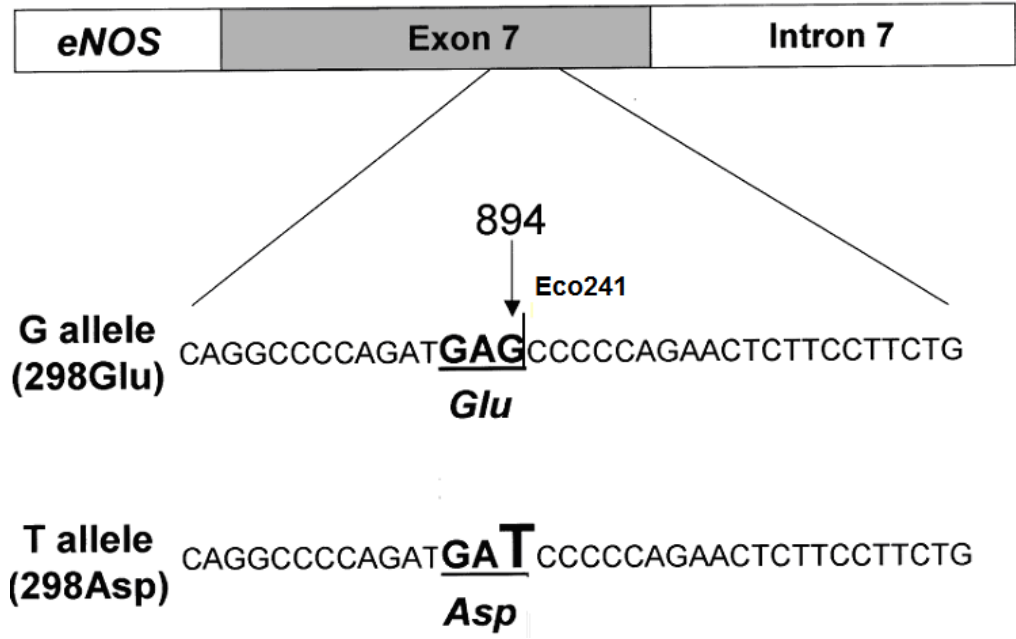
1 PCR ürününün kesimi için hazırlanan karışım (Tablo – 4)’de verilmiştir.

Tablo – 4: Kesim karışımının hazırlanması.

1 örnek için kesim karışımının içeriği	Miktar (µL)
10x Kesim tamponu	2
Kesim enzimi (1 Ü/µL)	2
Distile su	2

PCR tüpüne 2 µL çoğaltılmış olan hedef DNA parçası konup üzerine kesim için hazırlanmış olan karışım eklendi. Hemen ardından 37 °C’de 16 saat inkübe edildi.

Kesim için kullanılan Eco241 (HgiII) kesim enzimi *Escherichia Coli* bakterisinden izole edilmiştir (101). Enzimin eNOS gen bölgesindeki kesim hedefi Şekil – 5’te görüldüğü gibi 894 pozisyonadaki glutamik asittir. Bu pozisyonadaki amino asit aspartik asit olduğunda ise kesim yapmaz.



Şekil – 5: Eco241 kesim enziminin hedefi.

eNOS; endotelial nitrik oksit sentaz, G; guanin, Glu; glutamik asit, T; timin, Asp: aspartik asit

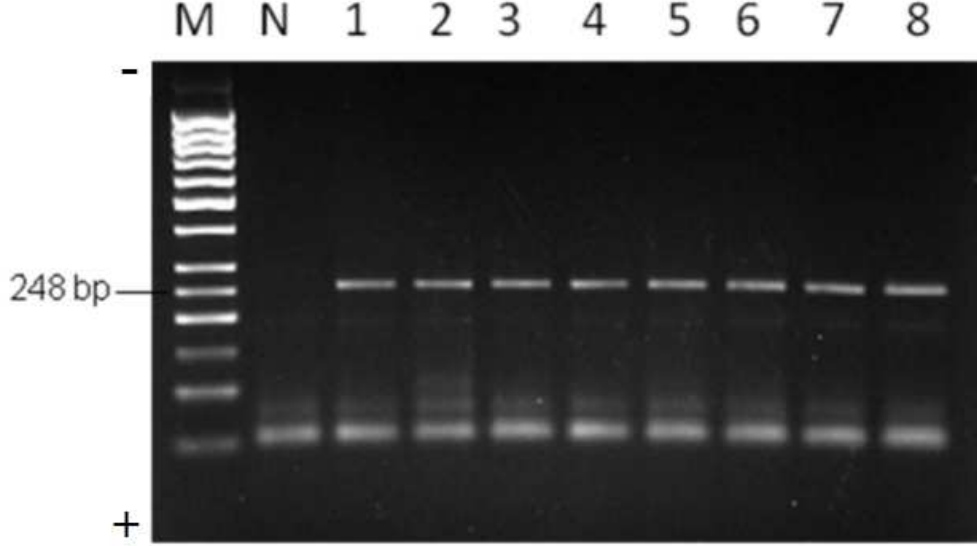
eNOS geninde 894. pozisyonda guanin bazı yer aldığındaki 298. pozisyondaki amino asit glutamik asit olur ve bu polimorfik olmayan tiptir (Glu/Glu). 894. pozisyondaki guanin, timin bazı ile yer değiştirdiğinde 298. pozisyondaki amino asit aspartik asit olur (Asp/Asp). Bu ise homozigot polimorfik olgudur. Eğer allellerden birinin 298. pozisyonundaki amino asit glutamat, diğer alleldeki aspartat ise (Glu/Asp) heterozigot polimorfik olgu meydana gelir (81, 100).

Bu şekilde homozigot polimorfizm gösteren olgularda Eco241 enzimi hiç kesim yapamazken, polimorfik heterozigot olgularda normal olan tek bir alleli, iki alleli de normal olan olgularda her iki alleli 163 bp ve 85 bp'lik iki parça olarak keser (81, 100).

AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

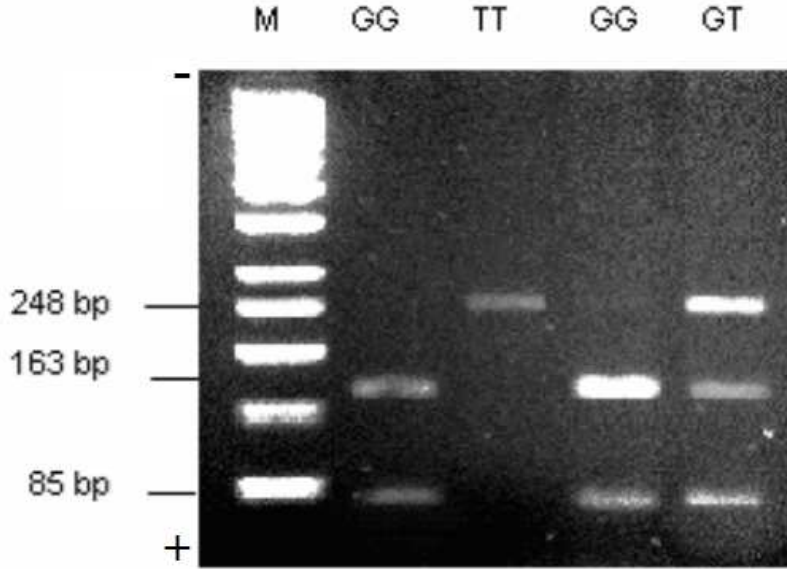
PCR sonrası elde edilen 248 bp'lik eNOS gen bölgesinin ve RFLP sonrasındaki DNA parçalarının görüntülenmesi için etidyum bromürlü % 2'lik agaroz jel hazırlandı (81).

İlk kuyucuğa 50 bp'lik DNA marker konuldu. Örnekler yükleme boyası ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi ve 140 Volt'ta 40 dk yürütüldü. Ardından jel görüntüleme sistemi ile incelendi (Şekil – 6, Şekil – 7)



Şekil – 6: PCR sonrası hedef eNOS gen bölgesine ait elektroforez görüntüsü.

M: Moleküler marker, N: Negatif kontrol, bp: Baz çifti



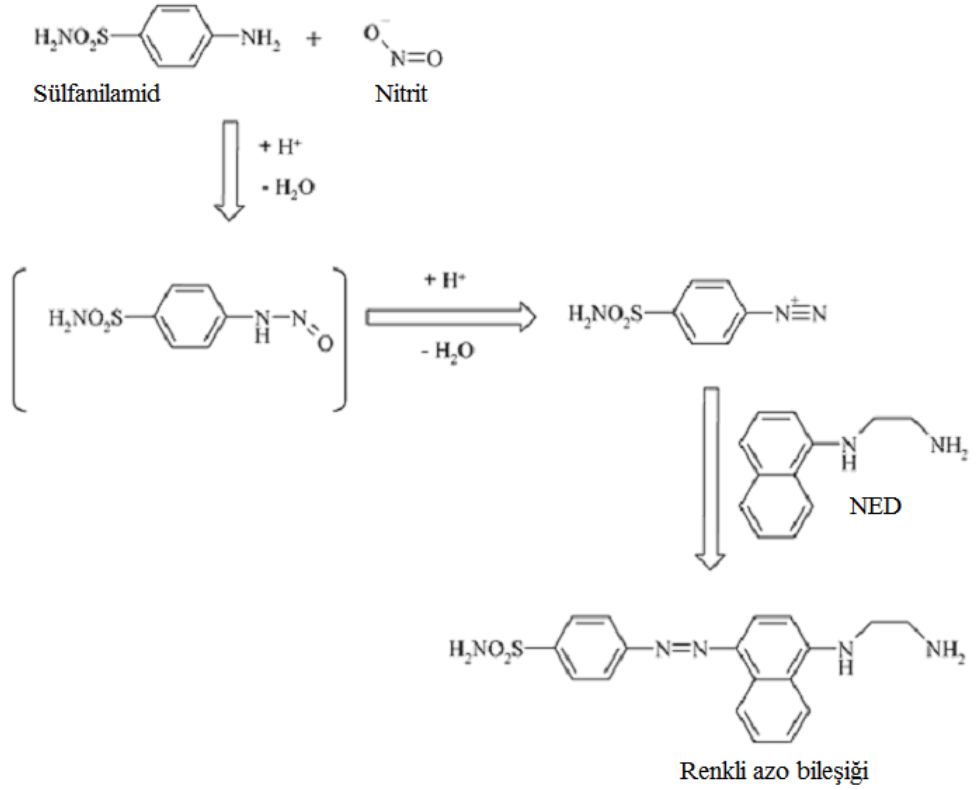
Şekil – 7: RFLP sonrası elektroforez görüntüsü.

894. pozisyonda G→T değişimi olan homozigot olgularda (T/T) 248 bp'de tek bant görülür. Heterozigot olgularda (G/T) 248 bp, 163 bp ve 85 bp'de üç bant görülür. Genetik polimorfizm göstermeyen olgularda (G/G), 163 bp ve 85 bp'de iki bant görülür. M: Moleküler marker, GG: Homozigot normal olgu, GT: Heterozigot olgu, TT: Homozigot polimorfik olgu, bp: Baz çifti

NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ

Nitrik oksit düzeylerinin ölçümü için EDTA'lı kan örnekleri 1000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Plazması 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine ayrılarak analize kadar -20 °C'de dondurularak saklandı.

Nitrik oksit çok kısa yarı ömürlü olduğu için hızla metabolitleri olan nitrit ve nitrate dönüşür. Griess yöntemi ile bu metabolitlerin düzeyi ölçülerek NO düzeyi saptanabilir. Yöntem sülfanilamidin amino grubunun asit ortamda nitrit ile reaksiyona girmesi ile diazotizasyonu ve NED ile mor renkli bir azo ürünü oluşturması temeline dayanır (102) (Şekil – 8).

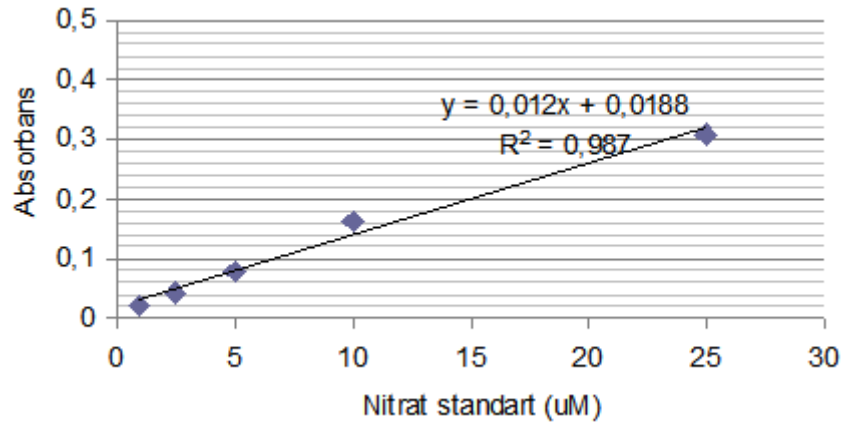


Şekil – 8: Griess yönteminin şeması (102).

NED: Naftiletilendiamin

Ölçüm için ilk basamakta 1µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM ve 25 µM düzeylerinde seyreltilerek hazırlanan nitrat standartları ile örnekler 50'şer µL olmak üzere mikroplağa konuldu. Ardından nitratın nitrite dönüşümü için 12 mM'lık β-NADPH'dan ve 100 Ü/L'lik nitrat redüktaz enziminden 25'er µL eklenerek 37 °C'de

30 dk inkübe edildi. Sürenin bitiminde 50'şer μL Griess A ve Griess B reaktifi eklendi ve 10 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tüm örneklerin ve standartların optik dansiteleri, enzim bağlı immunosorbent yöntem (ELISA – *Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay*) ile Diagnostics Pasteur (Anthos Labtec, Avusturya) cihazında 540 nm dalga boyunda okundu. Nitrat standartları kullanılarak hazırlanmış kalibrasyon eğrisine göre plazma NO_x düzeyleri hesaplandı (103) (Şekil – 9).



Şekil – 9: Nitrat kalibrasyon eğrisi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz SPSS 11.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Çalışma grubunun ölçümle belirtilen sürekli verileri ortalama \pm standart sapma ($\bar{x} \pm SD$) olarak verildi ve *Student t* test ile analiz edildi. Sayımla belirtilen verileri ise Ki-kare testi ile karşılaştırıldı. Çalışma grubu genotip sıklığının *Hardy-Weinberg* eşitliği ile uyumu Ki-kare analizi ile değerlendirildi. Gruplar arasında genotip dağılımının ve allel sıklığının anlamlı farklı olup olmadığının kontrolü için Ki-kare testi kullanıldı. Grup içi genotiplere göre NO_x düzeylerini değerlendirmek için *Oneway Anova* analizi yapıldı. Tüm analizlerde P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya 42'si erkek, 33'ü kadın toplam 75 kontrol ve 103'ü erkek, 28'i kadın toplam 131 KAH dahil edildi. Çalışma grubunun özellikleri ve laboratuvar verileri Tablo – 5'da görüldüğü gibidir. KAH grubunda erkek cinsiyet kontrol grubundan anlamlı yüksektir ($p=0,001$). Diabetes mellitus, hipertansiyon, sigara içmek, ailesel kalp hastalığı öyküsü gibi risk faktörlerine sahip olma oranı açısından ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo – 5). Yaş, vücut kütle indeksi (VKİ), total kolesterol, trigliserit, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol ortalamaları açısından da iki grup benzerdi (Tablo – 5).

Tablo – 5: KAH grubunun özelliklerinin karşılaştırılması (Ortalama \pm SD)

	KAH (n = 131)	Kontrol (n = 75)	P
Yaş (yıl)	58,6 \pm 10,0	55,8 \pm 9,67	0,054
Cinsiyet (erkek/kadın)	103/28	42/33	0,001*
VKİ (kg/m ²)	27,2 \pm 3,8	27,6 \pm 4,3	0,571
Sigara içme oranı [n (%)]	42 (32,1)	21 (28,0)	0,638
Ailesel kalp hastalığı öyküsü [n (%)]	32 (24,4)	10 (13,3)	0,072
Diabetes mellitus [n (%)]	46 (35,1)	18 (24,0)	0,097
Hipertansiyon [n (%)]	68 (51,9)	29 (38,7)	0,082
Total kolesterol (mg/dL)	186,4 \pm 45,9	186,8 \pm 42,3	0,959
Trigliserit (mg/dL)	172,3 \pm 81,2	152,8 \pm 81,7	0,131
HDL-kolesterol (mg/dL)	42,4 \pm 9,7	43,8 \pm 10,5	0,395
LDL-kolesterol (mg/dL)	105,7 \pm 43,7	100,1 \pm 51,8	0,437

* ; İstatistiksel olarak anlamlı, KAH: Koroner arter hastalığı, n: Olgu sayısı, VKİ: Vücut kütle indeksi, HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

Çalışma grubundaki bir örneğin Hardy-Weinberg eşitliğindeki toplumdan rastgele alınan örneklerden biri olup olmadığını test etmek için Ki-kare uygunluk testi uygulandı. Beklenen değerler ile gözlenen değerler arasında KAH grubunda ve kontrol grubunda Hardy-Weinberg eşitliğinden anlamlı sapma görülmedi ($p>0,05$).

KAH grubunda Glu298Asp homozigot olgu sayısı (%12,2), kontrol grubundan (%4) daha yüksek saptanmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). T alleli sıklığı KAH grubunda (%29,8) kontrol grubundan (%21,3) daha yüksek olmakla birlikte, yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo – 6).

Tablo – 6: Glu298Asp polimorfizminin genotipik dağılımı ve allelik sıklığı.

	KAH (n=131)	Kontrol (n=75)	χ^2 , p
eNOS genotip			4,132, 0,127
Asp/Asp [n (%)]	16 (12,2)	3 (4)	
Glu/Asp [n (%)]	46 (35,1)	26 (34,7)	
Glu/Glu [n (%)]	69 (52,7)	46 (61,3)	
Alleller			3,470, 0,062
T [n (%)]	78 (29,8)	32 (21,3)	
G [n (%)]	184 (70,2)	118 (78,7)	

KAH: Koroner arter hastalığı, n: Olgu sayısı, eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz, Asp: Aspartik asit, Glu: Glutamik asit, T: Timin, G: Guanin, χ^2 : Ki kare

Polimorfizm görülen olguların ve T alleli sıklığının KAH riski için hesaplanmış odds oranları Tablo – 7’de görüldüğü gibidir.

Tablo – 7: Polimorfizmin ve T allelinin KAH için odds oranları.

	χ^2	Odds oranı (%95 Güven aralığı)	p
GG’ye karşı GT ve TT	1,451	1,425 (0,800-2,539)	0,228
G allele karşı T allel	3,470	1,563 (0,975-2,506)	0,062

KAH: Koroner arter hastalığı, T: Timin, G: Guanin, χ^2 : Ki kare

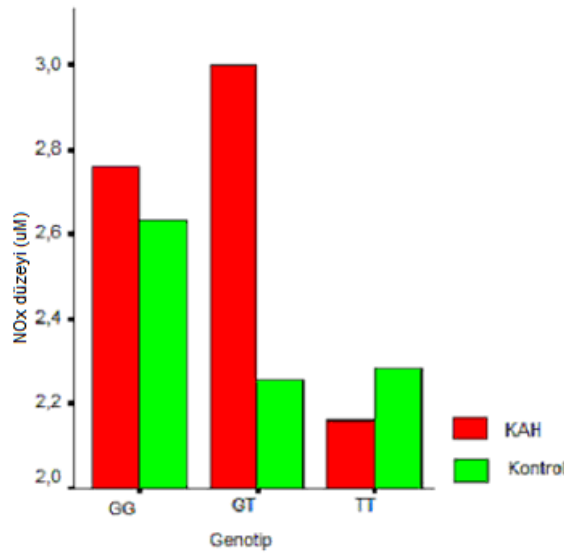
KAH grubunun ve kontrol grubunun plazma NO_x düzeyleri karşılaştırıldığında KAH grubunun ortalaması kontrol grubunun ortalamasından daha yüksek saptandı; ancak iki grubun ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,135$) (Tablo – 8).

Glu298Asp polimorfizmine sahip olgularda plazma NO_x ortalaması her iki grupta da normal bireylere göre daha düşük bulundu (Şekil – 10). Ancak ne KAH grubunda ne de kontrol grubunda genotipler arası plazma NO_x düzeyi birbirlerinden farklı bulunmadı (KAH grubu p=0,092, kontrol grubu p=0,451).

Tablo – 8: Tüm gruba ve eNOS genotiplerine göre plazma NO_x düzeyleri (µM±SD).

Gruplar (n = 206)	Tüm grup NO _x Düzeyi	Genotip			p
		Asp/Asp	Glu/Asp	Glu/Glu	
KAH (n = 131)	2,77 ± 1,33	2,16 ± 0,50	3,00 ± 1,33	2,76 ± 1,43	0,092*
Kontrol (n = 75)	2,49 ± 1,25	2,28 ± 0,68	2,26 ± 1,33	2,63 ± 1,33	0,451*

eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz, NO_x: Nitrit/Nitrat, KAH: Koroner arter hastalığı, Glu: Glutamik asit, Asp: Aspartik asit, n: Olgu sayısı, *: Genotiplere göre NO_x düzeyi istatistiğine ait değer.



Şekil – 10: KAH ve kontrol gruplarının plazma NO_x düzeyi grafiği.

KAH: Koroner arter hastalığı, NO_x: Nitrit/Nitrat, G: Guanin, T: Timin

TARTIŞMA

KAH oluşumunda birçok faktörün etkili olduğu bilinmektedir (10-12). İyi bilinen risk faktörlerinin yanı sıra bazı genlerle de bağıntılı olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (87). eNOS enzimini kodlayan genin de bunlardan biri olduğu düşünülmektedir (80).

eNOS geninin üç bölgesinde (intron, ekzon, promoter) çeşitli varyasyonlar olduğu bulunmuş ve bunların birçok farklı durumla olası ilişkisi incelenmiştir. Bu varyasyonlar içinden Casas ve arkadaşlarının yaptıkları “eNOS gen polimorfizmleri ve KAH” başlıklı metaanalizinde işlevsel değişiklikler olarak kabul edilen ve sık çalışılan üç tanesi; intron bölgesindeki 27 baz çiftlik tekrar polimorfizmi, promoter bölgedeki 786T/C polimorfizmi, ekzon bölgesindeki Glu298Asp polimorfizmi ile ilgili yapılmış çalışmaların sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (8). Sonuç olarak her üç polimorfizmin de KAH ile ilişkili olduğu bulunmuş; ancak verilerin heterojenliğine ve birbirleriyle çelişen çok sayıda çalışma sonuçlarının bulunduğu da dikkat çekilmiştir. Bu çelişkinin nedenleri arasında etnik farklılıkların, seçim kriterlerinin ve diğer KAH risk faktörlerinin olabileceği belirtilmiştir (8).

İntron bölgesi varyasyonlarının işlevsel olan diğer bölge varyasyonlarına göre eNOS enzimi üzerine olan etkisinin daha az olacağı düşünülmektedir (8). Bir promoter bölge varyasyonu olan -786T/C polimorfizminin enzim ekspresyonunu etkileyip etkilemediği de açık değildir (104). Bulunabilmiş tek ekzon polimorfizmi olan Glu298Asp polimorfizminin de eNOS enziminin aktivitesini azalttığı veya artırdığı yönündeki ilişkisi belirsizdir (104). Bununla birlikte ekzonlar genin kodlayan kısmı olması nedeni ile bu bölgedeki bir polimorfizminin enzim aktivitesini etkileyerek NO sentezini değiştirebileceği, bunun ise birçok patolojik durumun oluşumunda önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (72, 78, 105). Glu298Asp polimorfizmi en sık çalışılan varyanttır (104). İki bağımsız kohort çalışma ile de aterosklerotik KAH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (62).

Biz de çalışmamızda eNOS geninin 7. ekzonunda, 894. pozisyonda yer alan guanin bazının timin bazı ile yer değiştirmesi sonucu ortaya çıktığı tespit edilen

Glu298Asp polimorfizminin KAH ile ilişkisini ve NO_x düzeylerine olan etkisini Denizli/Türkiye toplumunda inceledik.

Çalışmamızda KAH grubunda erkek cinsiyet yüzdesi (%78,6) kontrol grubundan (%56) belirgin olarak yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,001). Total kolesterol, trigliserit, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri KAH ve kontrol grubunda benzer bulundu. KAH grubunda sigara içimi, ailesel kalp hastalığı öyküsü, diabetes mellitus, hipertansiyon gibi diğer risk faktörlerine sahip olguların yüzdesi kontrol grubundan daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo – 5).

Elde ettiğimiz verilere göre Glu298Asp polimorfizmi ile KAH arasında ilişki saptanmaması çalışmamızın ilk önemli sonucudur. Benzer şekilde T allel sıklığı bakımından da gruplar arasında fark bulunmamaktadır (Tablo – 6, 7).

Glu298Asp polimorfizminin KAH için bir risk faktörü olup olmadığını inceleyen çok sayıda çalışma yapılmıştır. Değişik toplumlarda yapılmış olan bu çalışmalarda elde edilen genotipik dağılım yüzdeleri ve sonuçlar birbirinden farklı bulunmuştur (Tablo – 9).

Tablo – 9: Çeşitli çalışmalardaki Glu298Asp polimorfizminin genotipik dağılımı.

	KAH			Kontrol			Sonuç
	T/T	G/T	G/G	T/T	G/T	G/G	
Park ve ark. ¹⁰⁶ (%)	0,6	21,3	78	1,4	15,5	83,1	AD
Cai ve ark. ⁶⁴ (%)	12,3	41,1	46,5	13,8	44,2	41,7	AD
Colombo ve ark. ⁸² (%)	16	43,3	40,7	6,8	49	44,2	A
Colombo ve ark. ¹⁰⁷ (%)	15,9	38,8	45,3	6,1	51,8	42,1	A
Kerkeni ve ark. ¹⁰⁸ (%)	11	44	45	4,2	35,8	60	A
Rios ve ark. ¹⁰⁹ (%)	11,9	50,2	37,9	7,4	45,6	47	AD
Rios ark. ⁶¹ Kafkas (%)	10,6	40,2	49,2	9,4	32,9	57,6	AD
(Sigara -) Afrikalı (%)	11,5	31,1	57,4	3,3	49,2	47,5	AD
Rios ark. ⁶¹ Kafkas (%)	7,7	39,1	53,3	8,2	36,1	55,7	AD
(Sigara +) Afrikalı (%)	7	41,9	51,2	3,3	26,7	70	A
Granath ve ark. ¹¹⁰ (%)	11	43,4	45,5	10,6	46,1	43,3	AD
Jaramillo ve ark. ¹¹¹ (%)	7	28	65	1	28	71	AD
Fatini ve ark. ¹¹² (%)	16,5	44,6	38,8	10,8	42,5	43,9	AD
Yoon ve ark. ¹⁰³ (%)	0,0	14,1	85,9	0,9	13,6	85,5	AD
Kim ve ark. ¹¹³ (%)	0,0	19,4	80,9	0,0	17,1	81,5	AD
Hingorani ve ark. ⁶² (%)	35,9	23,8	40,3	10,2	42	47,8	A
Afrasyap ve ark. ¹¹⁴ (%)	13,2	41,2	45,6	9,3	41,3	49,3	AD
Cam ve ark. ¹¹⁵ (%)	29,5	32,2	38,3	2,4	28,9	68,7	A
Bizim çalışmamız (%)	12,2	35,1	52,7	4	34,7	61,3	AD

KAH: Koroner arter hastalığı, ark: Arkadaşları, G: Guanin, T: Timin, A: Anlamlı, AD: Anlamlı değil

Bizim sonuçlarımız Park ve arkadaşlarının Kore toplumunda yaptığı çalışma ile benzer bulundu (106). Ancak Park ve arkadaşlarının çalışmasında hem KAH grubunda hem de kontrol grubunda Glu298Asp polimorfizminin yüzdesi bizim çalışmamızın sonuçlarından daha düşüktü (Tablo – 9). Cai ve arkadaşlarının beyaz

Avustralya toplumundaki çalışmasında da bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Glu298Asp polimorfizmi ile KAH arasında ilişki saptanmamıştır (64). Diğer taraftan bu çalışmanın gruplara göre genotip dağılımı incelendiğinde; KAH grubunda sonuçlarımıza yakın sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte kontrol grubunda Glu298Asp homozigot olguların yüzdesi bizim çalışmamızdakinden daha yüksek olarak bulunmuştur (Tablo – 9). Colombo ve arkadaşlarının çalışmasında ise İtalyan toplumunda Glu298Asp polimorfizmine sahip olgu sayısının KAH grubunda anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır (82). Colombo ve arkadaşlarının İtalyan toplumunda yaptığı başka bir çalışmada Glu298Asp polimorfizmi KAH şiddeti (\geq %50 darlık görülen damar sayısı) ile de ilişkili bulunmuştur (107). Kerkeni ve arkadaşlarının, Colombo ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde dizayn ettikleri çalışmada ise polimorfizm ile KAH ilişkili bulunurken, hastalığın şiddeti ile anlamlı ilişki saptanmamıştır (108). Rios ve arkadaşlarının Alman, İtalyan ve İspanyol genlerini de içerdiği belirtilen Portekiz toplumunda yaptıkları çalışmada Glu298Asp polimorfizmi KAH riski ile ilişkili bulunmamıştır (109). Rios ve arkadaşlarının Brezilyalı Kafkas toplumunda yaptıkları başka bir çalışmada, sigara içen ve içmeyen olgulardan oluşturulmuş gruplarda KAH ile Glu298Asp polimorfizmi ilişkili bulunmazken; Brezilyalı Afrika toplumunda sigara içmeyenlerde değil ancak sigara içenlerde anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Gruplar arasında farklı sonuçlar elde edilmesi, grupların etnik kökeninin farklı olması ve ateroskleroz gelişiminde eNOS geninin sigara ile ilişkili bir etkisi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (61). Granath ve arkadaşları da Avustralyalı Kafkas toplumunda görünüşte sağlıklı kontrol grubu ile <50 yaş KAH arasında Glu298Asp polimorfizmi bakımından anlamlı bir fark saptayamamışlardır (110). Jaramillo ve arkadaşlarının çalışmasında Şili toplumunda koroner arterlerinde >%70 darlığı olan KAH grubu ile görünüşte sağlıklı kontrol grubu Glu298Asp polimorfizmi bakımından karşılaştırılmış fark bulunmamıştır (111). Grupları bu çalışmaya benzer şekilde oluşturulmuş Fatini ve arkadaşlarının İtalyan toplumunda yaptığı çalışmada da yine farklı bulunmamıştır (112). Sonuçları benzer olmakla birlikte iki ayrı toplumda yapılan bu çalışmaların Glu298Asp polimorfizmi dağılımları ise birbirinden oldukça farklıdır (Tablo – 9). Yoon ve arkadaşlarının çalışmasında Kore toplumunda görünüşte sağlıklı kişilerden oluşturulmuş kontrol grubu ile anjiyografik olarak tespit edilmiş KAH grubunda Glu298Asp polimorfizmi araştırılmış gruplar arasında fark olmadığı saptanmıştır

(103). Bu toplumda Glu298Asp polimorfizmi sıklığı da oldukça düşük bulunmuştur (Tablo – 9). Kim ve arkadaşlarının Kore toplumunda yapmış olduğu çalışmada da benzer şekilde Glu298Asp polimorfizmi ile KAH riski arasında ilişki bulunmamıştır (113). Bu çalışmada saptanan genotip dağılım yüzdeleri de Yoon ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyumludur (Tablo – 9). Kontrol ve olgu grubu benzer şekilde oluşturulmuş Hingorani ve arkadaşlarının İngiltere toplumunda yaptığı çalışmada ise söz konusu polimorfizm ile KAH'ın anlamlı ilişkili olduğu ve bu toplumda Glu298Asp polimorfizmi dağılım sıklığının da yüksek olduğu bulunmuştur (62). Kore ve İngiltere toplumundaki bu çalışmaların genotip dağılım yüzdeleri incelendiğinde ise birbirinden oldukça farklı sonuçlar elde edilmiş olduğu görülmektedir (Tablo – 9).

Afrasyap ve arkadaşlarının Türkiye toplumunda yapmış olduğu ve benzer şekilde tasarlanmış olan çalışmalarında da ilişki saptanmamıştır (114). Bu çalışmanın genotip dağılım yüzdelerini bizim çalışmamızın kontrol grubu ile karşılaştırmak doğru olmayabilir. Çünkü Afrasyap ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada kontrol grubu genel sağlık incelemesine göre sağlıklı olduğu düşünülen kişilerden oluşturulurken, bizim çalışmamızda anjiyografi temel alınmıştır. KAH grubu ise bizim çalışmamıza benzer şekilde oluşturulmuştur. Bu yüzden KAH gruplarındaki Glu298Asp homozigot olguların genotipik dağılımlarına bakıldığında birbirine yakın olduğu görülmektedir (Tablo – 9).

Glu298Asp polimorfizminin KAH ile ilişkisini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda farklı sonuçlara ulaşılmış ve henüz tam olarak ortak bir noktaya varılamamıştır. Yukarıdaki çalışmalardan da anlaşıldığı üzere farklı toplumlarda yapılmış çalışmalarda genotip dağılım yüzdeleri ve Glu298Asp polimorfizminin KAH ile olan ilişkisi farklı bulunmuştur. Yine bu çalışmalarda dikkat çekici bir diğer nokta Glu298Asp polimorfizminin genotipik yüzdesinin Asya toplumunda düşük, İngiltere toplumunda ise yüksek olarak saptanmış olmasıdır.

Bunu destekler şekilde Srivastava ve arkadaşlarının Asyalı Hintli toplumda sistolik kan basıncı <140 mmHg, diyastolik kan basıncı <90 mm Hg, belirgin metabolik ve endokrin hastalığı, diğer kronik veya akut hastalığı ve enfeksiyonu

olmayan 20-50 yaş arası sağlıklı bireylerde Glu298Asp polimorfizmi sıklığını araştırdıkları çalışmada GG genotip %71,22, GT genotip %28,06, TT genotip %0,72 bulunmuştur (116).

Bu veriler incelendiğinde olguların seçildiği toplumun etnik kökeninin sonuçlar üzerinde belirgin etkili olduğu söylenebilir. Glu298Asp polimorfizmi ile ilgili çalışmaların sonuçlarındaki çelişkinin bir nedeni bu olabilir.

Gardemann ve arkadaşlarının Almanya toplumunda yapmış olduğu çalışmada, tüm katılımcılar ele alınarak değerlendirildiğinde Glu298Asp polimorfizmi KAH ile ilişkili bulunmazken, genç bireylerde (ortalama yaş <61 yıl) eNOS T alleli sıklığının hem KAH riski ile hem de hastalığın şiddeti ile anlamlı ilişkili olduğu saptanmıştır (117). Nassar ve arkadaşlarının Kanada toplumunda yapmış olduğu çalışmada ise 50 yaşından küçük ve 65 yaşından büyük KAH grupları karşılaştırılmış ve Glu298Asp polimorfizminin dağılımı farklı bulunmamıştır (118).

Cam ve arkadaşlarının Ege bölgesinde yaptığı çalışmada 55 yaşından küçük erkek ve 65 yaşından küçük kadın olgular seçilerek KAH grubu ile sağlıklı kontrol grubu oluşturulmuş ve TT genotipi KAH'da anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. (115). Bu çalışmada dikkat çekici bir başka nokta ise KAH grubunda Glu298Asp homozigot olguların genotip yüzdesinin (%29,5) bizim çalışmamıza (%12,2) göre de oldukça yüksek olmasıdır. Genotip dağılımındaki bu fark seçim kriterleri nedeni ile çalışma grubundaki KAH prevalansının farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Daha genç bireylerde yapılmış bazı çalışmalarda Glu298Asp polimorfizmi KAH ile ilişkili bulunurken; yaşlı bireylerin de dahil edildiği çalışmalarda ilişki saptanmamış olması, çalışma sonuçlarındaki farklılığın diğer bir nedeninin de seçim kriterleri olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın ikinci önemli sonucu, kontrol ve KAH gruplarında genotipe göre plazma NO_x düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamış olmasıdır.

Benzer şekilde Jeerooburkhan ve arkadaşlarının çalışmasında da genotipe göre plazma NO_x düzeyleri farklı bulunmamıştır. Ayrıca bu çalışmada ne NO_x düzeylerinin ne de eNOS polimorfizminin gelecekteki iskemik kalp hastalığı olguları için bir öngörü değerinin olmadığı saptanmıştır (119).

Endojen NO sentezini plazma NO_x düzeyi gösterse de diyetle alınan nitratın da bu plazma havuzuna anlamlı düzeyde katkısı olmaktadır (120). Sepsis ve travma durumunda da NO_x düzeyleri anlamlı derecede yükselmektedir (121). Ayrıca nitrit/nitratın bir kısmı dışkıyla büyük bir bölümü ise idrarla vücuttan atılmaktadır (122). Dolayısıyla atılımdaki bir bozukluk da ölçülen plazma NO_x düzeylerini etkileyebilecektir. Tüm bu faktörler NO_x düzeylerinin Glu298Asp polimorfizmi ile ilişkisinin incelendiği çalışmalarda karıştırıcı role sahip olabilir.

Çalışmamızın üçüncü önemli sonucu da plazma NO_x düzeyleri açısından kontrol ve KAH gruplarının ortalamaları arasında anlamlı fark bulunmamış olmasıdır.

Afrasyap ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da sağlıklı kontrol grubu ve KAH grubu arasında ortalama plazma NO_x düzeyi farklı bulunmamıştır (114). Yoon ve arkadaşlarının çalışmasında ise ortalama plazma NO_x düzeyi hipertansiyonlu KAH grubunda hipertansiyonsuz KAH ve kontrol grubundan anlamlı yüksek bulunmuş ve hipertansiyonlu olgulardaki artmış damar geriliminin NO_x düzeyini arttırdığı düşünülmüştür (103). Higashino ve arkadaşlarının çalışmasında tüm katılımcılar ele alındığında NO_x düzeyi hipertansiyon ile ilişkili bulunmamıştır. Menapoz sonrası hipertansif kadınlarda ise NO_x düzeyi anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu durumun kardiyak komplikasyonlar ile ilişkili östrojen eksikliği veya birlikte bulunabilen diyabet, hiperlipidemi, böbrek hastalıkları ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (123).

Çok sayıda patolojik olayda rol oynadığı düşünülen NO'nun KAH ile olan ilişkisini inceleyen çalışmalarda birlikte bulunabilen diğer hastalıkların nitrit/nitrat düzeylerini etkilemesi muhtemeldir.

KAH, etyolojisinde birbiri ile ilişkili birçok etkenin rol oynadığı, yaygınlığı toplumlar arasında farklılık gösteren bir hastalıktır. Benzer şekilde Glu298Asp polimorfizmi de farklı etnik gruplarda değişen sıklıkta bulunmaktadır. Bu nedenle her ülkenin çok merkezli çalışmalar düzenleyerek kendi bireylerinden oluşturduğu gen havuzunda bu polimorfizmin KAH ile ilişkisini incelemesi ve sonuçlarını yine kendi toplumuna genellemesi gerektiği görüşünderiz. Bunu yaparken ülke içindeki etnik farklılıklar da göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca NO düzeylerinin birçok farklı patoloji ile ilişkili olmasından dolayı genotip ile NO düzeyi ilişkisini inceleyen çalışmalarda, birlikte bulunabilen diğer durumların etkisiyle NO üretiminde değişiklik olabileceği ve polimorfizmin gerçek etkisinin maskelenebileceği görüşünderiz. Bundan dolayı Glu298Asp polimorfizminin NO düzeyleri ile olan ilişkisinin genotipleri hariç her yönüyle eşitlenmiş deneysel yaklaşımlar ile incelenmesinin daha uygun olacağı görüşünderiz. Aynı şekilde hastalıklar ile NO düzeylerinin ilişkisini sorgulamak için karışıklığa neden olabilecek diğer faktörlerin iyi değerlendirilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada Glu298Asp polimorfizmi, T allel sıklığı ve plazma NO_x düzeyleri KAH'da kontrol grubundan farklı bulunmadı.

SONUÇLAR

1. Glu298Asp polimorfizmi homozigot olguların genotip dağılım yüzdesi KAH grubunda (%12,2) kontrol grubuna (%4) göre daha yüksek bulunmakla birlikte bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.
2. T alleli sıklığının yüzdesi KAH grubunda (%29,8) kontrol grubuna (%21,3) göre daha yüksek olduğu görüldü; ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.
3. Kontrol grubunda plazma NO_x düzeyleri ortalamaları (homozigot olgularda $2,28 \pm 0,68 \mu\text{M}$, heterozigot olgularda $2,26 \pm 1,33 \mu\text{M}$, polimorfizm görülmeyen olgularda $2,63 \pm 1,33 \mu\text{M}$) genotipe göre karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı.
4. KAH grubunda plazma NO_x düzeyleri ortalamaları (homozigot olgularda $2,16 \pm 0,50 \mu\text{M}$, heterozigot olgularda $3 \mu\text{M} \pm 1,33$, polimorfizm görülmeyen olgularda $2,76 \pm 1,43 \mu\text{M}$) genotipe göre karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı.
5. KAH grubunun ortalama plazma NO_x düzeyi ($2,77 \pm 1,33 \mu\text{M}$), kontrol grubu ortalaması ($2,49 \pm 1,25 \mu\text{M}$) ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı.
6. KAH grubunun yaş ortalaması ($58,6 \pm 10,0$) ile kontrol grubu ($55,8 \pm 9,67$) arasında fark yoktu.
7. KAH grubunda erkek cinsiyet oranı (103'ü erkek, 28'i kadın), kontrol grubundan (42'si erkek, 33'ü kadın) yüksek bulundu ($P=0,001$)
8. Diabetes mellitus, hipertansiyon, sigara içmek, ailesel kalp hastalığı öyküsü gibi risk faktörlerine sahip olma oranı açısından KAH grubu kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklı değildi.
9. VKİ, total kolesterol, trigliserit, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol gibi ölçümsel değerlerin ortalamaları iki grupta istatistiksel olarak farklı değildi.

ÖZET

Koroner arter hastalığı olan bireylerde endotelial nitrik oksit sentaz gen polimorfizmi (Glu298Asp) ve nitrik oksit düzeyinin araştırılması.

Dr. Ramazan AKBAY

KAH, özellikle gelişmiş ülkelerde olmak üzere tüm dünyada önde gelen ölüm nedenlerindedir. Hangi durumlarla ilişkili olabileceği ve bunların nasıl önlenebileceği hakkında en fazla çalışma yapılan hastalıklardan birisidir.

KAH oluşumuna yol açan en sık neden koroner arterlerin aterosklerozudur. Yapılmış çalışmalar ile endotel işlevlerinin aterosklerozda önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Endotelden salınan önemli moleküllerden birisi de NO'dur. NO, birçok farklı mekanizma ile aterosklerozun gelişimini önler. NO, NOS enzim ailesi tarafından sentezlenir. NOS enziminin eNOS, nNOS ve iNOS olmak üzere üç farklı izoenzimi vardır. Damar endotelindeki NO'nun başlıca kaynağı ise eNOS enzimidir. Bundan dolayı eNOS genindeki değişikliklerin NO düzeyini ve endotel işlevlerini etkileyerek ateroskleroza yol açabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde eNOS geninin farklı bölgelerinde çok sayıda polimorfizm tanımlanmıştır. Bulunabilmiş tek ekzon polimorfizmi ise Glu298Asp'dir. Ekzon bölgesi genin kodlayıcı kısmı olduğu için buradaki değişikliklerin enzim aktivitesini daha fazla etkilediği düşünülmektedir.

Bu çalışmada Denizli toplumunda eNOS geninin 7. ekzonundaki, 894. pozisyonda bulunan guanin bazının timin bazı ile yer değiştirmesinden kaynaklanan Glu298Asp polimorfizminin (G894T) KAH ile ilişkisi ve NO_x düzeyi araştırıldı.

Anjiyografisinde herhangi bir ana damarı veya onun dallarında %50'den daha fazla darlığı olan 131 kişi KAH grubunu ve darlığı olmayan veya %50'den daha az darlığı olan 75 kişi kontrol grubunu oluşturdu. Tüm katılımcıların PCR ve RFLP yöntemi ile genotipleri saptandı ve Griess yöntemi kullanılarak plazma NO_x düzeyleri ölçüldü.

Glu298Asp polimorfizmi genotipi ve T allel sıklığı KAH ile ve plazma NO_x düzeyleriyle ilişkili bulunmadı. Ayrıca plazma NO_x düzeyleri KAH grubunda farklı değildi.

Sonuç olarak Denizli toplumunda yapılan bu çalışmada Glu298Asp polimorfizmi, plazma NO_x düzeyi ve KAH arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

İNGİLİZCE ÖZET

Researching on endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) and nitric oxide levels in individuals who have coronary artery disease.
Dr. Ramazan AKBAY

CAD is the leading cause of death in the world especially in developed countries. It is one of the diseases that is mostly studied on its causes and how it can be prevented. The most common cause of CAD is atherosclerosis of coronary arteries.

Some performed studies have demonstrated that endothelial function has important roles on developing atherosclerosis. One of the important molecules secreted from endothelium is NO. NO prevents the development of atherosclerosis by many different mechanisms. It is synthesized by the NOS enzyme family. NOS enzyme family has 3 different isoenzymes which are called eNOS, nNOS and iNOS. The main source of NO in vascular endothelium is eNOS. Therefore, it is considered that variations in NOS gene may cause atherosclerosis by affecting NO level and endothelial function.

Up until this time, many polymorphisms have been described in different regions of NOS gene. The only exon polymorphism which has been found is Glu298Asp. It is considered that the changes in exon region affects enzyme activity more, since this region is the encoding part of the gene.

In this study we examined association of Glu298Asp polymorphism (G894T) that is originated from exchange of guanin base with timin base located in 894th position of exon 7 on eNOS gene with CAD and NO_x level in the population of Denizli.

On the basis of angiography, 131 individuals who have \geq 50% obstruction in any main vessel or it's branches formed CAD group and 75 individuals who have no obstruction or $<$ 50% obstruction formed control group. We determined genotypes by

PCR and RFLP method and measured the plasma NO_x levels from blood plasma using Griess method in all participants.

Neither Glu298Asp polymorphism genotype nor T allele frequency was found associated with CAD and plasma NO_x levels. Also there was no different plasma NO_x levels in the CAD grup.

As a conclusion, in the study that we performed in the population of Denizli, we did not detect a significant association between Glu298Asp polymorphism, plasma NO_x level and CAD.

KAYNAKLAR

1. Beaglehole R, Ebrahim S, Reddy S, Voüite J, Leeder S. Prevention of chronic diseases: a call to action. *Lancet* 2007; 370: 2152-57
2. Mallika V, Goswami B, Rajappa M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. *Angiology* 2007; 58: 513-522.
3. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Rand WM, Udelson JE, Karas RH. Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1843-1849.
4. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 2673-2678.
5. Raman CS, Li H, Martasek P, Kral V, Masters BSS, Poulos TL. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: A paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 1998; 95: 939-950.
6. Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
7. Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 17478-17488.
8. Casas JP, Cavalleri G, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 921-935.

9. Onat A, Keleş İ, Çetinkaya A, Başar Ö, Yıldırım B, Erer B, Ceyhan K, Eryonucu B, Sansoy V. On yıllık TEKHARF çalışması verilerine göre Türk erişkinlerinde koroner kökenli ölüm ve olayların prevalansı yüksek. Türk Kardiyol Dern Arş 2001; 29: 8-19.

10. Dawber TR, Moore FE, Mann GV. Coronary heart disease in the Framingham study. Am J Public Health 1957; 47: 4-24.

11. Gotto AM. Interactions of the major risk factors for coronary heart disease. Am J Med 1986; 80: 48-55.

12. Kannel WB. Clinical misconceptions dispelled by epidemiological research. Circulation 1995; 92: 3350-3360.

13. American Heart Association. <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4726> adresinden 25/11/2007 tarihinde ulaşılmıştır.

14. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. J Intern Med 2002; 252: 283-294.

15. Pati U, Nirumpa P. Lipoprotein(a), atherosclerosis and apolipoprotein(a) gene polymorphism. Mol Genet Metab 2000; 71: 87-92.

16. Liu AC, Lawn RM, Verstuyft JG, Rubin EM. Human apolipoprotein A-I prevents atherosclerosis associated with apolipoprotein[a] in transgenic mice. J Lipid Res 1994; 35: 2263-2266.

17. Cai JM, Hatsukami TS, Ferguson MS, Small R, Polissar NL, Yuan C. Classification of human carotid atherosclerotic lesions with in vivo multicontrast magnetic resonance imaging. Circulation 2002; 106: 1368-1373.

18. Tegos TJ, Kalodiki E, Sabetai MM, Nicolaides AN. The genesis of atherosclerosis and risk factors: A review. Angiology 2001; 52: 89-98.

19. Witztum JL. Thematic reviews on the pathogenesis of atherosclerosis J Lipid Res 2004; 45: 991-992.
20. Gerrity RG, Antonov AS. The pathogenesis of atherosclerosis. Diabetologia 1997; 40: 108-110.
21. Witztum JL, Berliner JA. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 1998; 9: 441-448.
22. Rong JX, Rangaswamy S, Shen L, Dave R, Chang YH, Peterson H, Hodis HN, Chisolm GM, Sevanian A. Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction and arterial wall cholesterol accumulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1885-1894.
23. Yalçın R, Emri M, Boyacı B, Timurkaynak T, Akata D, Ünlü M. Koroner arter hastalığı. Gazi Tıp Dergisi 2006; 17: 1-33.
24. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld M, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A Definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15: 1512-1531.
25. American Heart Association. <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=1402> adresinden 29/11/2007 tarihinde ulaşılmıştır.
26. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to Injury and Atherogenesis. Am J Pathol 1977; 86: 675-684.
27. Hergenç G. Role of Complement system in atherosclerosis. Türk Kardiyol Dern 2004; 32: 8-37.
28. Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and

remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta* 2006; 367: 36-47.

29. Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, Sigal E. Overexpression of 15-Lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice arteriosclerosis. *Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2100-2105.

30. Luc G, Fruchart JC. Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 206-209.

31. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. Inhibition of low density lipoprotein oxidation by nitric oxide. *FEBS Lett* 1993; 334: 170-174.

32. Haque S, Bruce IN. Therapy Insight: Systemic lupus erythematosus as a risk factor for cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005; 2: 423-430.

33. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.

34. Palmer M J, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.

35. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.

36. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 477-481.

37. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Synder SS. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-718.

38. Lowenstein CJ, Glatt CS, Brecht DS, Snyder SH. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 6711-6715.

39. Kılınc K, Kılınc A. Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Nitrik oksit sentaz enzimleri ve nitrik oksitin sentezi. Ankara: Palme Yayıncılık, 2003.

40. Ghosh DK, Stuehr DJ. Macrophage NO synthase: Characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry* 1995; 34: 801-807.

41. Knudsen GM, Nishida CR, Mooney SD, Montellano PRO. Nitric-oxide synthase (NOS) reductase domain models suggest a new control element in endothelial NOS that attenuates calmodulin-dependent activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 31814-31824.

42. Panda K, Rosenfeld RJ, Ghosh S, Meade AL, Getzoff ED, Stuehr DJ. Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J Biol Chem* 2002; 277: 31020-31030.

43. Klatt P, Pfeiffer S, List BM, Lehner D, Glatter O, Bachinger HP, Werner ER, Schmidt K, Mayer B. Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 1996; 271: 7336-7342.

44. Iyengar R, Stuehr DJ, Marletta MA. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: Precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 6369-6373.

45. Marletta MA, Hurshman AR, Rusche KM. Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol* 1998; 2: 656-663.

46. Tsikas D. Analysis of the L-arginine/nitric oxide pathway: The unique role of mass spectrometry. *Curr Pharm Anal* 2005; 1: 15-30.
47. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003; 199: 8-17.
48. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 8103-8107.
49. Gachhui R, Abu-Soud HM, Ghosha DK, Presta A, Blazing MA, Mayer B, George SE, Stuehr DJ. Neuronal nitric-oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem* 1998; 273: 5451-5454.
50. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 6954-6958.
51. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, Gözükara EM. Nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS)'ın fizyolojik ve patolojik özellikleri. *T Klin Pediatri* 2001; 10: 226-235.
52. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: 27-32.
53. Bredt DS, Syder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 682-685.
54. Behrendt D, Ganz. Endothelial function: From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002; 90: 40-48.
55. Cardena GG, Martasek P, Masters BSS, Skidd PM, Coneti J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. *J Biol Chem* 1997; 272: 25437-25440.

56. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399: 597-601.
57. Xu H, Shi Y, Wang J, Jones D, Weilrauch D, Ying R, Wakim B, Pritchard KA. Heat shock protein 90 binding domain in endothelial nitric-oxide synthase influences enzyme function. *J Biol Chem* 2007; 282: 37567-37574.
58. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Buse R. Phosphorylation of Thr495 regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2001; 88: 68-75.
59. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey Ma, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in ApoE-deficient mice: Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103: 1282-1288.
60. Bonnardeaux A, Nadaud S, Charru A, MD; Jeunemaitre X, Corvol P, Soubrier F. Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. *Circulation* 1995; 91: 96-102.
61. Rios DL, D'Onofrio LO, Souza JK, Queiroz AM, Raduy-Maron L, Silva-Neto N, Carvalho HG, Santos-Filho A, Galvao-Castro B. Smoking-dependent and haplotype-specific effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on angiographically assessed coronary artery disease in Caucasian- and African-Brazilians. *Atherosclerosis* 2007; 193: 135-141.
62. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu2983Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 1999; 100: 1515-1520.

63. Salimi S, Firoozrai M, Nourmohammadi I, Shabani M, Zavarehee A, Mohebbi A. Association of variable number of tandem repeats in endothelial nitric oxide synthase gene with coronary artery disease. *Iranian J Publ Health* 2006; 35: 15-21.
64. Cai H, Wilcken DEL, Li Wang X. The Glu-298Asp (894GT) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J Mol Med* 1999; 77: 511-514.
65. Bertrand ME, LaBlanche JM, Tilmant PY, Thieuleux FA, Delforge MR, Carre AG, Asseman P, Berzin B, Libersa C, Laurent JM. Frequency of provoked coronary arterial spasm in 1089 consecutive patients undergoing coronary arteriography. *Circulation* 1982; 65: 1299-1306.
66. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 1998; 103: 65-69.
67. Kugiyama K, Ohgushi M, Motoyama T, Sugiyama S, Ogawa H, Yoshimura M, Inobe Y, Hirashima O, Kawano H, Soejima H, Yasue H. Nitric oxide-mediated flow-dependent dilation is impaired in coronary arteries in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 920-926.
68. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T786C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999; 99: 2864-2870.
69. Arngrimsson R, Hayward C, Nadaud S, Baldursdottir Asdis, Walker JJ, Liston WA, Bjarnadottir RI, Brock DJH, Geirsson RT, Connor JM, Soubrier F. Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 354-362.

70. Serrano NC, Casas JP, Diaz LA, Paez C, Mesa CM, Cifuentes R, Monterrosa A, Bautista A, Hawe E, Hingorani AD, Vallance P, Jaramillo PL. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: A multicenter case-control study. *Hypertension* 2004; 44: 702-707.

71. Tempfer C, Unfried G, Zeillinger R, Hefler L, Nagele F, Huber JC. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2001; 16: 1644-1647.

72. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El-Khattabi O, Mourad M, Horie S, Feron O, Balligand JL, Wattiez R, Pirson Y, Chauveau D, Lens XM, Devuyst O. Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 229-241.

73. Akomolafe A, Lunetta KL, Erlich PM, Cupples LA, Baldwin CT, Huyck M, Green RC, Farrer LA. Genetic association between endothelial nitric oxide synthase and Alzheimer disease. *Clin Genet* 2006; 70: 49-56.

74. Monastero R, Cefalu AB, Camarda C, Buglino CM, Manin M, Barbagallo CM, Lopez G, Camarda LKC, Travali S, Camarda R, Averna MR. No association between Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase polymorphism and Italian sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2003; 341: 229-232.

75. Kunugi H, Akahane A, Ueki A, Otsuka M, Isse K, Hirasawa H, Kato N, Nabika T, Kobayashi S, Nanko S. No evidence for an association between the Glu298Asp polymorphism of the NOS3 gene and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2000; 107: 1081-1084.

76. Markus HS, Ruigrok Y, Ali N, Powell JF. Endothelial nitric oxide synthase exon 7 polymorphism, ischemic cerebrovascular disease and carotid atheroma. *Stroke* 1998; 29: 1908-1911.

77. Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, Shesely EG, Smithies O, Maeda N. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS^{-/-} ApoE^{-/-} mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* 2000; 105: 451–458.

78. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 1998; 97: 2494-2498.

79. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi. http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal_medical/pediatrics/mol-gen/index.php?PgId=39 adresinden 02 Aralık 2007 tarihinde ulaşılmıştır.

80. Lembo G, De Luca N, Battagli C, Lovino G, Aretini A, Musicco M, Frati G, Pompeo F, Vecchione C, Trimarco B. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke* 2001; 32: 735-740.

81. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 3-8.

82. Colombo MG, Paradossi U, Andreassi GM, Botto Ni, Manfredi S, Masetti S, Biagini A, Clerico A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clinical Chemistry* 2003; 49: 389-395.

83. Shimasaki Y, Yasue H, , MD, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1506-1510.

84. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, 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.
85. Kishimoto T, Misawa Y, Kaetu A, Nagai M, Osaki Y, Okamoto, Soiti Yoshida, Kurosawa Y, Fukumoto S. eNOS Glu298Asp polymorphism and hypertension in a cohort study in Japanese. *Prev Med* 2004; 39: 927-931
86. Ntais C, Polycarpou A. Association of the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) Glu298Asp gene polymorphism with the risk of Alzheimer's disease. A meta-analysis. *J Neurol* 2005; 252: 1276-1278.
87. Hirashiki A, Yamada Y, Murase Y, Suzuki Y, Kataoka H, Morimoto Y, MD, Tajika T, Murohara T, Yokota M. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low or high risk subjects defined by conventional risk factors. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1429-1437.
88. Rader DJ, Pure E. Genetic susceptibility to atherosclerosis insights from mice. *Circ Res* 2000; 86: 1013-1015.
89. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368: 850-853.
90. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 330: 1057-1058.
91. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric Oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 4651-4655.
92. Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, Huang PL. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender and

pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest* 1998; 101: 1225-1232

93. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 1998; 101: 731-736.

94. Haperan R, Waard M, Deel E, Mees B, Kutryk M, Aken T, Hamming J, Grosveld F, Duncker DJ, Crom R. Reduction of blood pressure, plasma cholesterol and atherosclerosis by elevated endothelial nitric oxide. *J Biol Chem* 2002; 277: 48803-48807.

95. Pritchard KA, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, Wolin MS, Stemerman MB. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circulation Research* 1995; 77: 510-518.

96. Buttery LDK, Chester AH, Springall DR, Borland JAA, Michel T, Yacour MH, Polak JM. Explanted vein grafts with an intact endothelium demonstrate reduced focal expression of endothelial nitric oxide synthase specific to atherosclerotic sites. *J Pathol* 1996; 179: 197-203.

97. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2479-2488.

98. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1995; 95: 1747-1755.

99. Sambrook J, Russel D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

100. Naber CK, Baumgart D, Altmann C, Siffert W, Erbel R, Heusch G. eNOS 894T allele and coronary blood flow at rest and during adenosine-induced hyperemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: 1908-1912.

101. Fermentas Life Sciences. <http://www.fermentas.com/catalog/re/eco24i.htm> adresinden 23 Aralık 2007 tarihinde ulaşılmıştır.

102. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 851: 51-70.

103. Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem* 2000; 46: 1626-1630.

104. Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res* 2006; 4: 53-65.

105. Tesouro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2832-2835.

106. Park KW, You KH, Oh S, Chae IH, Kim HS, Oh BH, Lee MM, Park YB. Association of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism with acute coronary syndrome in Koreans. *Heart* 2004; 90: 282-285.

107. Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Rossi G, Clerico A, Biagini A. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart* 2002; 87: 525-528.

108. Kerkeni M, Addad F, Chauffert M, Myara A, Farhat MB, Miled A, Maaroufi K, Trivin F. Hyperhomocysteinemia, endothelial nitric oxide synthase polymorphism, and risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 2006; 52: 53-58.

109. Rios DLS, Sidia Jacques MC, Hutz MH. Endothelial nitric oxide synthase and fractalkine chemokine receptor polymorphisms on angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2005; 362: 138-146.

110. Granath B, Taylor RR, van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J Cardiovasc Risk* 2001; 8: 235-241.

111. Jaramillo PC, Munoz MA, Lanan MC, Lanan ZF, Salazar AL. Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism in Chilean subjects with coronary artery disease and controls. *Clin Chim Acta* 2006; 371: 102-106.

112. Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S, Lapini I, Rostagno C, Comeglio M, Brogi D, Gensini G, Abbate R. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2004; 147: 516-521.

113. Kim IJ, Bae J, Lim SW, Cha DH, Cho HJ, Kim S, Yang DH, Hwang SG, Oh D, Kim NK. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) in Korean patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 2007; 119: 579-585.

114. Afrasyap L, Öztürk G. NO level and endothelial NO synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in the patients with coronary artery disease from the Turkish population. *Acta Biochim Biophys Sin* 2004; 36: 661-666.

115. Cam SF, Sekuri C, Tengiz I, Ercan E, Sagcan A, Akin M, Berdeli A. The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population. *Thromb Res* 2005; 116: 287-292.
116. Srivastava K, Biswas UK, Narang R, Varghese JJ, Das N. Prevalence of eNOS Glu298Asp polymorphism in healthy volunteers from a region of northern india. *Community Genet* 2005; 8: 180-183.
117. Gardemann A, Lohre J, Cayci S, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The T allele of the missense Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with coronary heart disease in younger individuals with high atherosclerotic risk profile. *Atherosclerosis* 2002; 160: 167-175.
118. Nassar BA, Bevin LD, Johnstone DE, O'Neill BJ, Bata IR, Kirkland SA, Title LM. Relationship of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and early-onset coronary artery disease. *Am Heart J* 2001; 142: 586-589.
119. Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Vallance P, Humphrie SE, Hingorani AD. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension* 2001; 38: 1054-1061.
120. Wang J, Brown MA, Tam SH, Chan MC, Whitworth JA. Effects of diet on measurement of nitric oxide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24: 418-420.
121. Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991; 214:621-626.

122. Wang CF, Cassens RG, Hoekstra WG. Fate of ingested ¹⁵N-labelled nitrate and nitrite in the rat. *J Food Sci* 1981; 46: 745-748.

123. Higashino H, Miya H, Mukai H, Miya Y. Serum nitric oxide metabolite (NO(x)) levels in hypertensive patients at rest: a comparison of age, gender, blood pressure and complications using normotensive controls. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 725-731.