

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**YAVAŞ KORONER AKIMI OLAN HASTALARDA  
ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ (T-786C) GEN  
POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Habil YÜCEL**

**UZMANLIK TEZİ  
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Abdullah DOĞAN**

**ISPARTA-2011**

## TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aşamalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve ihtisas sürem boyunca bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Abdullah Doğan'a, uzmanlık eğitimim süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Altınbaş, Prof. Dr. Mehmet Özaydın, Doç. Dr. Doğan Erdoğan, Doç. Dr. Ercan Varol ve Yrd. Doç. Dr. Süleyman Murat Aslan'a,

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma,

Bir ekip olarak çalıştığımız tüm kardioloji hemşire ve personeline,

Bu günlere gelmemde sonsuz destek ve sevgileriyle her zaman yanımda olan, beni sevgiyle yetiştiren değerli aileme,

En büyük desteğim eşim Dr. Halime Yücel'e,

Tüm içtenliğim ve sevgilerimle teşekkürlerimi sunuyorum.

**Dr. Habil YÜCEL**

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>iii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR .....</b>	<b>v</b>
<b>TABLolar DİZİNİ .....</b>	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Koroner Dolaşımın Fizyolojisi .....	3
2.1.1. Koroner Kan Akımını Etkileyen Fiziksel Faktörler .....	3
2.1.2. Koroner Kan Akımını Etkileyen Nöronal Faktörler .....	4
2.1.3. Koroner Kan Akımını Etkileyen Humoral Faktörler .....	4
2.2. Yavaş Koroner Akım.....	5
2.2.1. Tanım .....	5
2.2.2. Etyopatogenez.....	5
2.2.2.1. Koroner Arterlerin Tıkayıcı Hastalığı.....	6
2.2.2.2. Küçük Damar Disfonksiyonu.....	6
2.2.2.3. Dilate Koronaropati.....	7
2.2.2.4. Vazodilatör ve Vazokonstriktör Faktörler Arasındaki Dengesizlik.....	7
2.2.2.5. Trombosit Fonksiyon Bozukluğu.....	8
2.2.2.6. İnflamasyon.....	9
2.2.3. Klinik .....	9
2.2.4. Tanı .....	10
2.2.5. Tedavi .....	12
2.3. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz .....	13
2.3.1. Nitrik Oksit Molekülü.....	13
2.3.1.1. Nitrik Oksit Biyosentezi.....	13
2.3.1.2. Nitrik Oksit Metabolizması.....	14
2.3.1.3. Nitrik Oksitin Genel Fonksiyonları.....	15
2.3.1.4. Nitrik Oksitin Kardiyovasküler Sistemdeki Fonksiyonları.....	16
2.3.2. Nitrik Oksit Sentaz Enzimi .....	17

2.3.2.1. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) .....	19
2.4. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizmi .....	21
2.4.1. Genetik Polimorfizm .....	21
2.4.2. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Geni .....	22
2.4.2.1. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Genindeki Polimorfizm.....	22
2.4.2.1.1. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen T-786C Polimorfizmi .....	23
<b>3. MATERYAL ve METOD .....</b>	<b>25</b>
3.1. Çalışmanın Yapıldığı Yer.....	25
3.2. Hastalar.....	25
3.3. Koroner Anjiyografi .....	27
3.4. Biyokimyasal Analizler .....	28
3.5. Moleküler Analiz.....	28
3.5.1. DNA İzolasyonu .....	28
3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Yapılışı.....	28
3.5.3. Agaroz Jel Elektroforeziyle PCR Kontrolü, Elektroforez İşlemi .....	29
3.5.4. Revers İn situ Hibridizasyon Yöntemi .....	29
3.5.5. Promotor Bölge eNOS Gen T-786C Polimorfizminin Analizi.....	29
3.6. Dominant ve Resesif Modelin Anlamı .....	30
3.7. İstatistiksel Analiz .....	30
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>31</b>
4.1. Hastaların Klinik Özellikleri .....	31
4.2. eNOS Gen T-876C Polimorfizmi Genotipleri.....	32
4.3. eNOS Geni T-876C Polimorfizmi Allel Frekansları.....	33
4.4. Hastalarının Anjiyografik Özellikleri.....	34
4.5. Tek Damar ve Çok Damar Tutulumunda eNOS gen T-786C Gen Mutasyon Genotipleri.....	36
4.6. eNOS Gen T-786C Gen Polimorfizmi ve Kardiyovasküler Risk Faktörleri... 36	
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>39</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>45</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>46</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>47</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>48</b>

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

<b>ACEi</b>	: Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri
<b>Ach</b>	: Asetilkolin
<b>ADMA</b>	: Asimetrik dimetil arginin
<b>AKS</b>	: Akut koroner sendrom
<b>BH4</b>	: Tetrahidrobiyopterin
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>CaM</b>	: Kalmodulin
<b>cGMP</b>	: Siklik 3'5'-guanozin monofosfat
<b>CGRP</b>	: Kalsitonin gen ilişkili peptid
<b>CRP</b>	: C-reaktif protein
<b>Cx</b>	: Sirkumfleks arter
<b>DM</b>	: Diyabetes mellitus
<b>E</b>	: Epinefrin
<b>EDRF</b>	: Endotel kaynaklı gevşeme faktörü
<b>ET-1</b>	: Endotelin-1
<b>eNOS</b>	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
<b>FAD</b>	: Flavin adenin dinükleotid
<b>FFR</b>	: Fraksiyonel akım rezervi
<b>FMN</b>	: Flavin mononükleotid
<b>HbO<sub>2</sub></b>	: Oksi-hemoglobin
<b>HL</b>	: Hiperlipidemi
<b>HT</b>	: Hipertansiyon
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IVUS</b>	: İntravasküler ultrason
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>KAH</b>	: Koroner arter hastalığı
<b>LAD</b>	: Sol ön inen arter
<b>MI</b>	: Miyokard infarktüsü
<b>MPV</b>	: Ortalama trombosit hacmi
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid

<b>NE</b>	: Norepinefrin
<b>nNOS</b>	: Nöronal nitrik oksit sentaz
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NO<sub>2</sub></b>	: Nitrit
<b>NO<sub>3</sub></b>	: Nitrat
<b>Non-Q MI</b>	: ST yükselmesiz miyokard infarktüsü
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PG</b>	: Prostaglandin
<b>PL</b>	: Posterolateral arterin
<b>RCA</b>	: Sağ koroner arter
<b>RLFP</b>	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türevleri
<b>RV</b>	: Sağ Ventrikül
<b>SPECT</b>	: Tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi
<b>SSCP</b>	: Tek iplikçik yapısal çeşitlilik
<b>STEMI</b>	: ST yükselmeli miyokard infarktüsü
<b>SV</b>	: Sol Ventrikül
<b>TFC</b>	: TIMI kare sayısı
<b>TIMI</b>	: Thrombolysis in myocardial infaction
<b>TXA2</b>	: Tromboksan A2
<b>USAP</b>	: Kararsız anjina pektoris
<b>VIP</b>	: Vazointestinal peptid
<b>VNTR</b>	: Değişken ardışık tekrarlar
<b>YKA</b>	: Yavaş koroner akım

## TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. TIMI akım derecelendirmesi .....	11
Tablo 2. Nitrik oksit fonksiyonları.....	16
Tablo 3. NOS izoenzimlerinin genel özellikleri .....	18
Tablo 4. İnsan eNOS Gen Polimorfizmi ve hastalıklarla İlişkisi.....	24
Tablo 5. Hastaların bazal demografik ve klinik özellikleri.....	31
Tablo 6. Hastaların laboratuvar testleri.....	32
Tablo 7. eNOS geni T-876C polimorfizminin genotip frekansları .....	33
Tablo 8. Grupların dominant ve resesif modele göre eNOS geni T-876C polimorfizminin genotip dağılımları .....	33
Tablo 9. Grupların eNOS geni T-876C polimorfizminin allel frekansları.....	34
Tablo 10. YKA ve kontrol grubunun TIMI kare sayıları.....	34
Tablo 11. YKA grubundaki hastalarının anjiyografik karakteristikleri.....	35
Tablo 12. KAH grubundaki hastalarının anjiyografik karakteristikleri.....	35
Tablo 13. YKA hastalarında göre tek damar ve çok damar tutulumunda dominant modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi genotipleri .....	36
Tablo 14. YKA hastalarında göre tek damar ve çok damar tutulumunda resesif modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi genotipleri .....	36
Tablo 15. Çalışmaya alınan tüm hastalarda dominant modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi genotip dağılımı ve kardiyovasküler risk faktörleri .....	37
Tablo 16. YKA'lı hastalarda dominant modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi genotip dağılımı ve kardiyovasküler risk faktörleri.....	38

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

Şekil 1. Her bir koroner arterin distal son noktaları.....	12
Şekil 2. Nitrik oksitin biyosentezi.....	14
Şekil 3. eNOS enzimi aktivasyonun kontrolü.....	20
Şekil 4. eNOS genine ait kromozomal yerleşimi.....	22



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Anjiyografik olarak normal görünümlü koroner anatomiye rağmen, opak maddenin koroner arterler içinde yavaş ilerlemesine yavaş koroner akım (YKA) denir. İlk olarak 1972 yılında Tambe ve ark tarafından tanımlanmıştır (1). Başlangıçta bu durumun koroner mikrosirkülasyondaki anormalliklerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Küçük damarları tutan sklerodermalı bir hastada YKA'nın görülmesi bu hipotezi desteklemiştir (2). Tanısal anjiyografi yapılan hastalarda sıklığı %7 olarak bildirilmiştir. Sigara kullanan genç erkeklerde daha sık gözlenmiştir (3, 4).

Bugüne kadar YKA'ya neden olabilecek etyolojik faktörlerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (5-9). Histopatolojik çalışmalar YKA'lı hastalarda luminal çap kaybı, kapiller ve endotelial hasar olduğunu göstermiştir. YKA'nın patofizyolojik mekanizmaları hakkında öne sürülen çeşitli hipotezler mevcuttur (10).

Yavaş koroner akıma yol açan faktörlerden birisi tıkalı koroner arter hastalığıdır (KAH). Bu hipoteze göre YKA, aterosklerozun erken evresinin bir formu olabilir (7). Yapılan bir çalışmada YKA'nın mikrovasküler dirençte artışa sebep olan gerçek lümen daralması veya düzensizliğine yol açmayan aterosklerotik bir süreç olduğu ileri sürülmüştür (8).

Yavaş koroner akımın etyopatogenezinde vazodilatör ve vazokonstriktör faktörler arasındaki dengesizliğin olabileceği düşünülmüştür. Bazı çalışmalarda plazma nitrik oksit (NO) seviyesi YKA'lı hastalarda kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur (6, 11).

Yavaş koroner akımın patogenezinde yer alan diğer hipotezler ise küçük damar disfonksiyonu, trombosit fonksiyon bozukluğu ve inflamasyondur (9, 12).

Yavaş koroner akımlı hastalar KAH'ın tüm klinik formlarıyla başvurabilirler. Efor anginası, kararsız anjina pektoris (USAP), ST yükselmesiz (Non-Q MI) veya ST yükselmeli miyokard infarktüsü (STEMI) şeklinde ortaya çıkabilir (5). YKA'lı hastalar için kesinleşmiş bir medikal tedavi protokolü yoktur.

Nitrik oksit membranlardan kolayca geçebilen, yarılanma ömrü 6-30 saniye olan, pek çok reaksiyonu etkileyen zayıf bir oksidan veya indirgeyici bir bileşen

olarak görev yapan, serbest radikal bir gazdır. NO organizmanın hemen her yerinde bulunan, çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik süreçte rol oynayan biyolojik bir mediyatördür (13, 14).

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) ailesinden bir enziminin katalizlediği reaksiyon ile sentezlenir. NOS enzim ailesi üç izoenzimden oluşur. Bunlar endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve indüklenbilir nitrik oksit sentazdır (iNOS). NOS izoenzimlerinin hepsinin ortak ürünü NO'dur fakat buldukları yerler ve üstlendikleri roller farklıdır (15). Endotelial nitrik oksit sentaz geni 7.kromozomun uzun kolu üzerinde bulunmaktadır (16). İnsan eNOS geninde, intron, ekson ve promotor bölgesinde olmak üzere 3 çeşit polimorfizm tanımlanmıştır (17). Yapılan gen çalışmalarında eNOS geninin promotor bölgesindeki T-786C baz değişiminin eNOS transkripsiyonunda %50 azalmaya neden olduğu ve bunun serum NO seviyelerinde azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (18). Çeşitli toplumlarda eNOS gen polimorfizmi ile KAH arasındaki ilişki araştırılmış ve eNOS gen polimorfizminin KAH için risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür (18-21).

Önceki çalışmalar sonucunda (8, 11) YKA'nın ateroskleroz ve NO biyosentezini etkileyen faktörlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. eNOS gen polimorfizminin ise NO biyosentezini etkilediği ve ateroskleroz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (22). Bu veriler eNOS gen polimorfizmi ile YKA arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Literatürde YKA'lı hastalarda eNOS gen polimorfizmini araştıran iki çalışma vardır (23, 24) ve bu çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Biz de bundan dolayı, YKA ve eNOS gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi bölgemizdeki YKA'lı hastalarda araştırmak istedik.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Koroner Dolaşımın Fizyolojisi

Miyokardın kanlanması aort kapağın hemen üstünden ayrılan sağ ve sol koroner arterler ile sağlanır. Koroner dolaşımla miyokarda O<sub>2</sub> sağlanır ve ihtiyaç halinde koroner akım 5-6 kat artabilir (25). Koroner dolaşımın miyokarda fazladan kan sağlama kapasitesine koroner akım rezervi denir. İstirahat halinde, normal koroner kan akımı 60-90 ml/100gr/dk, O<sub>2</sub> tüketimi 8-10 ml/100g/dk'dır (25). İnsanlarda, koroner kan akımının düzenlenmesi karmaşıktır. Bu süreçte fiziksel, hümorale ve nöronal faktörler rol oynar.

#### 2.1.1. Koroner Kan Akımını Etkileyen Fiziksel Faktörler

Koronerlere gelen kan miktarının en önemli belirleyicileri diyastol süresi ve aort ile sol ventrikül (SV) arası diyastolik basınç farkıdır. Diyastol süresi ne kadar uzunsa koronerlere gelen kan miktarı o oranda yüksektir. Koroner kan akımı diyastolik basınç farkı ile doğrusal olarak ilişkilidir. Ancak; aşırı yüksek diyastolik basınç farkı otoregülasyondan dolayı gereksiz koroner kan akımına neden olmaz. Perfüzyon basıncı çok düşük olduğu zaman ise koroner damarlar maksimal dilate olur (26). Koroner kan akımı, miyojenik değişikliklerle sağlanan otoregülasyon ile oldukça geniş bir perfüzyon basıncı aralığında devam eder. Koroner kan akımı ateroskleroz, konjenital anomaliler, tromboz ve vazokonstriksiyon gibi efektif perfüzyon basıncını azaltan bazı faktörlerle azalabilir (27).

Miyokard içine penetre olan damarlar ventrikül sistoli sırasında belirgin şekilde kompresyona uğrarlar. İleri akım engellenir; hatta bazen geri akım oluşur (28). Bununla birlikte sistol sırasında koroner damarların kıvrılma hareketi yapması (twisting) ile oluşan sıyrılmaya (shear) stresin artışı ile de koroner kan akımı engellenir (29). Miyokardın kasılması özellikle SV duvarında güçlü baskıya neden olur ve bu baskı özellikle subendokardiyal koroner damarlarda belirgin bir daralma sonucu kan akımını azaltır. Sistolde koroner kan akımını azaltan diğer bir faktör ise aort kapağın açılmasıyla aort yapraklarının koroner arterleri kısmen kapatmasıdır. Sonuç olarak

SV'ye olan koroner kan akımının çoğu diyastolde olur. Sağ ventriküle olan koroner kan akımı ise sistol ve diyastolde hemen hemen eşit derecededir.

### **2.1.2. Koroner Kan Akımını Etkileyen Nöronal Faktörler**

Koroner kan akımının kontrolü başlıca otonom sinir sistemi üzerinden olmaktadır. Epikardiyal arterler ve koroner arteriyoller, sempatik ve parasempatik lifler tarafından innerve edilir ve yaygın adrenerjik ve muskarinik reseptör dağılımına sahiptir. Büyük damarlarda  $\alpha$  ve  $\beta_2$ , küçük damarlarda dominant olarak  $\beta_2$  adrenerjik reseptörler vardır. Bu damarlar  $\beta_1$  reseptör içermez (30).

Otonom sinir sistemi damar çapı ve damar içi basıncına etki ederek koroner akımın nöronal kontrolünü sağlar. Sempatik sinirlerin uyarılması direkt vazokonstriktör etki gösterir; ancak bu etki pozitif inotropik ve kronotropik etkiyle oluşan miyokard metabolizma artışına sekonder vazodilatasyonla yok edilir (31).

Deneyssel olarak parasempatik uyarı asetilkolin (Ach) aracılı vazodilatasyon oluşturmasına rağmen negatif inotropik ve kronotropik etkiyle sekonder vazokonstriksiyona neden olur. Ancak vasküler parasempatik innervasyon çok az olduğu için bu etkisi de çok küçüktür (31).

### **2.1.3. Koroner Kan Akımını Etkileyen Humoral Faktörler**

Otonom sinir sistemi koroner kan akımının kontrolünü norepinefrin (NE) ve epinefrin (E) üzerinden gösterir. NE ve E direkt etkiyle koroner damarlarda vazokonstriksiyon yapar ancak inotropi ve kronotropiyi arttırarak, indirekt etkiyle vazodilatasyon yapar. Dopaminin etkisi doza bağlı olarak değişir. Genelde hafif vazodilatasyon yapar. Anjiyotensin II direkt vazokonstriktör etki gösterirken prostaglandin (PG) E2 ve F salınımını arttırarak bu etkisini bir miktar azaltır. Vazopresinin yüksek konsantrasyonları direkt koroner vazokonstriksiyon yaparken, tiroid hormonları ve glukagon indirekt etkiyle vazodilatasyon yaparlar. Adenozin ve Ach belirgin koroner vazodilatasyon yaparlar (32).

Prostaglandinlerin çoğu koroner vazodilatasyon yapmalarına rağmen koroner dolaşımın normal kontrolünde bir rolleri olup olmadığı bilinmemektedir. Tromboksan A2 (TXA2), serotonin ve vazopresin vazokonstriktör etki yaparlar (33).

Lokal ateroskleroz, bu vazokonstriktör etkileri arttırabilir (34). Lokal olarak endotel veya endotel fonksiyon kaybı endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) mekanizmasını bozar; bu durumda Ach paradoks etkiyle vazokonstriksiyon yapar (35).

Polipeptidler de koroner akım regülasyonunda önemlidirler. Bradikinin, substans P ve vazointestinal peptit (VIP) vazodilatör etkiyle akımı arttırmırlar. Nöropeptit tirozin Y sinir uçlarından NE ile birlikte salınır; bazı durumlarda koroner spazmda önemli rol oynar. Kalsitonin gen ilişkili peptit (CGRP) endotel bağımlı vazodilatasyon yapar; ancak bu peptidin rolü tam olarak bilinmemektedir (32).

## **2.2. Yavaş Koroner Akım**

### **2.2.1. Tanım**

İlk olarak Tambe ve ark tarafından tanımlanan YKA, normal koroner anatomiye rağmen opak maddenin koroner arterler içinde yavaş ilerlemesidir (1). Miyokard iskemisini düşündüren anjinal yakınmalar nedeniyle koroner anjiyografi yapılan, epikardiyal koroner arterleri normal bulunan hastalarda YKA saptanmıştır. Bu durumun koroner mikrosirkülasyondaki anormalliklere bağlı olabileceği öne sürülmüştür. Küçük damarları tutan sklerodermalı bir hastada YKA'nın görülmesi bu durumu destekler bir bulgu olmuştur (2).

Sendrom X tanısı konulmuş hastalarda yapılan çalışmalarda YKA tespit edilmiş ve YKA'nın Sendrom X'in bir alt grubu olup olmadığı tartışılmıştır.

Yeni bir derlemede tanısız anjiyografi yapılan hastalarda YKA sıklığı %7 olarak bildirilmiştir. YKA sigara kullanan genç erkeklerde daha sık gözlenmiştir (3).

### **2.2.2. Etyopatogenez**

Bugüne kadar YKA'ya neden olabilecek etyolojik faktörlerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Histopatolojik çalışmalar YKA'lı hastalarda luminal çap kaybı, kapiller ve endotelyal hasar olduğunu göstermiştir. YKA'nın patofizyolojik mekanizmaları hakkında öne sürülen çeşitli hipotezler mevcuttur (10).

### 2.2.2.1. Koroner Arterlerin Tıkayıcı Hastalığı

Yavaş koroner akım için öne sürülen etyolojik faktörlerden birisi koroner arterlerin tıkayıcı hastalığıdır. Bu hipoteze göre YKA fenomeni aterosklerozun erken evresinin bir formu olabilir (7).

Daha önce yapılan birçok çalışmada anjiyografik olarak normal saptanan damarlarda yaygın ateroskleroz varlığı görülmüştür (36, 37). İnvasküler ultrason (IVUS) çalışmalarında normal koroner arter olarak yorumlanan vakaların bir kısmında gerçekte lümen daralması veya düzensizliği yapmayan ateroskleroz saptanmıştır (36, 37). IVUS kullanılarak yapılan başka bir çalışmada; YKA saptanan hastaların koroner arterlerinde boylu boyunca lümeni daraltmayan yaygın kalsifikasyon, diffüz intimal kalınlaşma ve aterom plakları saptanmıştır. Yine bu çalışmada fraksiyone akım rezerviyle (FFR) epikardiyal direnç ölçülmüş ve distal koroner basınçta azalma olduğu gözlenmiştir (8). Mikrosirkülasyondaki direnç artışını gösteren proksimal - distal koroner arter basıncı oranında kontrol grubuna göre azalma saptanmıştır. FFR değerlerinin azalmasının IVUS ile gösterilen yaygın ateroskleroz sonucunda koroner arterlerdeki direnç artışına bağlı olduğu kabul edilmiştir (8).

Sonuç olarak, bu çalışmalarda YKA'nın mikrovasküler dirençte artışa sebep olan gerçek lümen daralması veya düzensizliğine yol açmayan aterosklerotik bir patoloji olduğu ileri sürülmüştür.

### 2.2.2.2. Küçük Damar Disfonksiyonu

Küçük damar disfonksiyonu YKA'nın ilk tanımının yapıldığı günden bu yana patogeneizde yer almaktadır (1). YKA'lı hastaların endomiyokardiyal biyopsilerinde küçük koroner damarlarda fibromusküler hiperplazi, medial hipertrofi, miyointimal proliferasyon ve endotelial ödem rapor edilmiştir (7). Epikardiyal koroner arterlerde darlık olmadığı sürece miyokardiyal kan akımı küçük koroner damarlar (<400 µm) tarafından regüle edilmektedir. YKA olan hastaların koroner sinüs oksijen saturasyonunun düşük ve küçük koroner arter tonusunun yüksek olduğu bildirilmiştir (3).

Yavaş koroner akımlı hastalarda saptanan yapısal değişiklikler hastaların çoğunda semptomlarının tekrarlamasının nedenini açıklayamamaktadır. Mikrovasküler spazma bağlı dinamik tonüsün arttığı bunun da semptomlara yol açtığı kabul edilmektedir. Mikrovasküler spazmın mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak aralıklı salınan çeşitli otakoidlerin koroner vazokonstruksiyona neden olduğu düşünülmektedir (38).

Yavaş koroner akımlı hastalarda stresle uyarılan miyokardiyal iskemi varlığı araştırılmıştır. Hastaların çoğunda atriyal pacing ile anjinal semptomlar ortaya çıkmasına rağmen, az bir kısmında metabolik iskemi bulguları saptanmıştır. Bundan dolayı YKA'lı hastaların çoğunda anjinal semptomların miyokardiyal iskemiden kaynaklanmadığı düşünülmüştür. Öte yandan metabolik iskemi bulguları gösteren hastaların çoğunda SPECT (Tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi) ile YKA saptanan damar ile uyumlu perfüzyon defekti saptanmıştır (39). YKA'lı hastalar arasındaki bu farklılıklar, koroner akım rezervindeki değişikliklerle açıklanabilmektedir. Koroner akım rezervi mikrovasküler fonksiyonların bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Erdoğan ve ark YKA'lı hastalarda koroner akım rezervinin azaldığını göstermişlerdir (40)

### **2.2.2.3. Dilate Koronaropati**

Ektazi veya anevrizma şeklinde dilate olmuş koroner arterlerde, YKA saptandığı öne sürülmüştür. Bu görüşe göre koroner arter çapı arttıkça, çapla ters orantılı bir şekilde kan akımı bozulmaktadır (10). Ancak, YKA ile damar çapı arasındaki ilişkiyi açıklayan yeterli çalışma yoktur.

Koroner ektazi saptanan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada koroner akım hızları, tıkaçıcı koroner arter hastalığı olanlara ve kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur (41).

### **2.2.2.4. Vazodilatör ve Vazokonstriktör Faktörler Arasındaki Dengesizlik**

Koroner dolaşımın düzenlenmesinde endotel aracılı metabolik otonöregülasyon çok önemlidir. Bu regülasyonun en önemli araçları NO ve endotelindir (ET) (25).

Yavaş koroner akımın etyopatogenezinde ET-1 ve NO salınımları arasındaki dengesizliğin olabileceği düşünülerek bazı çalışmalar yapılmıştır. Ülkemizde YKA'lı hastalarla yapılan iki çalışmada plazma NO seviyesi YKA'lı hastalarda kontrol grubuna kıyasla düşük bulunmuştur (11). YKA'lı hastaların egzersiz sonrasında plazma NO seviyelerine bakılmış ve egzersiz sonrasında da YKA'lı hastalarda kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur (11).

Yine bu çalışmada plazma ET-1 seviyeleri YKA'lı hastalarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Yapılan diğer bir çalışmada, normal ve YKA'ya sahip gruplarda, çalışma başlangıcında ve hızlı atriyal pacing sonrasında ölçülen arteriyel ve koroner sinüs ET-1 düzeyleri karşılaştırılmıştır. YKA'lı hastalarda bazal plazma ET-1 düzeyleri daha yüksek tespit edilmiştir (11). Ayrıca, YKA'lı hastalarda hızlı atrial pacing, koroner sinüs ET-1 düzeylerinde anlamlı olarak daha fazla yükselmeye yol açmıştır. Koroner sinüs ET-1 düzeyleri femoral arter ET-1 düzeyleri ile karşılaştırıldığında, YKA'lı hastalarda koroner sinüs ET-1 düzeyleri anlamlı olarak daha fazla artmıştır (42).

Yavaş koroner akımlı hastalarda plazma homosistein ve asimetric dimetil arginin (ADMA) düzeylerinin yükseldiğinde gösterilmiştir. Bu moleküller NO sentezini inhibe ederek endotel fonksiyonlarını etkilemektedir ve plazma seviyelerinin yükselmesi kardiyovasküler sistem risk artışına neden olmaktadır (43, 44).

Bu bulgular ışığında YKA'nın vasküler tonusun ayarlanmasında bozulmaya neden olan vazodilatör ve vazokonstriktör moleküllerin salınımındaki dengesizlikten kaynaklanabileceği öne sürülmüştür.

#### **2.2.2.5. Trombosit Fonksiyon Bozukluğu**

Yavaş koroner akımın patogenezinde trombosit fonksiyon bozukluğu olabileceği öne sürülmüştür. Ülkemizde yapılan çalışmalarda YKA'lı hastalarda ortalama trombosit hacmi (MPV) ve plazma sP-selektin seviyesinin yüksek olduğu saptanmış ve trombosit aktivasyonun arttığı gösterilmiştir (12, 45).



Trombosit aktivasyon artışının patofizyolojik mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Koroner arterdeki anormal yavaş akım trombüs gelişmesine yol açabilir. Bunun sonucunda, distal embolizasyon veya miyokard infarktüsü gelişebilir.

#### **2.2.2.6. İnflamasyon**

İnflamasyon ile ateroskleroz arasındaki ilişkiden yola çıkılarak inflamasyonun YKA'nın patogenezinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür. İnflamasyonun aterosklerozun başlangıç, gelişim ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Aterosklerozun multifaktöriyel bir hastalık olduğunun bilinmesiyle birlikte aterosklerozun inflamatuvar bir hastalık olduğu kabul edilmektedir (10).

YKA'lı hastalarda inflamasyon bulguları araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada, YKA'lı hastalarda plazma C-reaktif protein (CRP) ve interlekin-6 (IL-6) konsantrasyonları yüksek bulunmuştur. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise YKA'lı hastalarda ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi adezyon molekülleri araştırılmıştır ve YKA'lı hastalarda kontrol grubuna göre serum düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Yine aynı çalışmada, TIMI (Thrombolysis in Myocardial Infaction) kare sayısının ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin düzeyleriyle anlamlı bir şekilde korele olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmayla YKA'lı hastalarda artmış inflamatuvar sitokin düzeylerinin, endotelial aktivasyon ve inflamasyonun belirteci olabileceği öne sürülmüştür (9).

Bu çalışmalar sonucunda inflamasyon YKA'ya neden olabilecek mekanizmalar arasında sayılmaktadır.

#### **2.2.3. Klinik**

Yavaş koroner akım ile ilgili yapılan çalışmalar hasta sayısı az olan küçük çaplı çalışmalar olduğundan hastaların genel demografik özellikleri hakkında yeterli bilgi yoktur. Ülkemizde yapılan bir çalışmada YKA'lı hastalarda hipertansiyon (HT) %58, sigara içme oranı %80, ailede KAH öyküsü %45, hiperlipidemi (HL) %45, diyabetes mellitus (DM) %22 oranında saptanmıştır (46). YKA'lı hastaların demografik özellikleri hakkında daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yavaş koroner akımlı hastalar KAH'ın tüm klinik formlarıyla başvurabilirler. Efor anginası, USAP, Non-Q MI veya STEMI şeklinde ortaya çıkabilirler (4, 5). YKA'lı hastalarda, Sendrom X'in aksine göğüs ağrısı daha çok kararsız angina özelliğindedir. YKA'lı hastalar sıklıkla istirahat sırasındaki göğüs ağrısı ile kliniğe başvururlar. Sendrom X'te ise göğüs ağrısı daha çok stres sonrası oluşur. YKA'lı hastalarda Sendrom X'ten farklı olarak efor testinde iskemik ST depresyonu ve efor anginası kliniğe her zaman eşlik etmeyebilir. Normal koroner kan akımına sahip hastalarla karşılaştırıldığında ise YKA'lı hastalarda anormal EKG bulguları ve pozitif eforlu EKG görülmektedir. (4).

Yavaş koroner akım daha çok sigara içen genç erkeklerde görülürken, Sendrom X daha çok post menapozal kadınlarda görülmektedir. YKA'lı hastalarda hayatı tehdit edici aritmiler ve ani kardiyak ölüm bildirilmiştir (4).

Yeni yapılan bir çalışmada akut koroner sendrom (AKS) ile başvuran olan YKA'lı hastaların EKG değişiklikleri incelenmiştir ve çalışmaya alınan hastaların %92'sinde miyokardiyal iskemiye destekleyen EKG değişikliği olmuştur. EKG değişikliği olan hastaların %24'ünde ST segment değişikliği ve %86'sında T dalga değişikliği olmuştur. T dalga değişikliklerinin sık gözükmesi YKA'lı hastalardaki mikrovasküler iskemiye destekleyen bir bulgu olmuştur (47).

Yapılan çalışmalarda YKA'lı hastaların semptomlarının tekrarladığı fakat prognozun iyi olduğu yönündedir. Yinede miyokard infarktüsü gelişme olasılığının sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (3, 4, 10, 47).

#### **2.2.4. Tanı**

Yavaş koroner akım anjiyografik olarak tanınır. Anjiyografik olarak koroner akımının değerlendirilmesi, önceleri koroner arterlerin tamamen dolması için geçen sürenin kaç kalp atımı olduğuna bakılarak yapılırdı (5). 1985 yılında TIMI çalışma grubu TIMI akım derecelendirme yöntemini yayınladı (Tablo-1) (48). Ancak, yayınlanan bu TIMI akım derecelendirme yöntemi birçok yönden yetersiz kalmıştır çünkü visüel değerlendirme yapılması nedeniyle bu yöntem kişiler arası değişkenlikten etkilenmektedir.

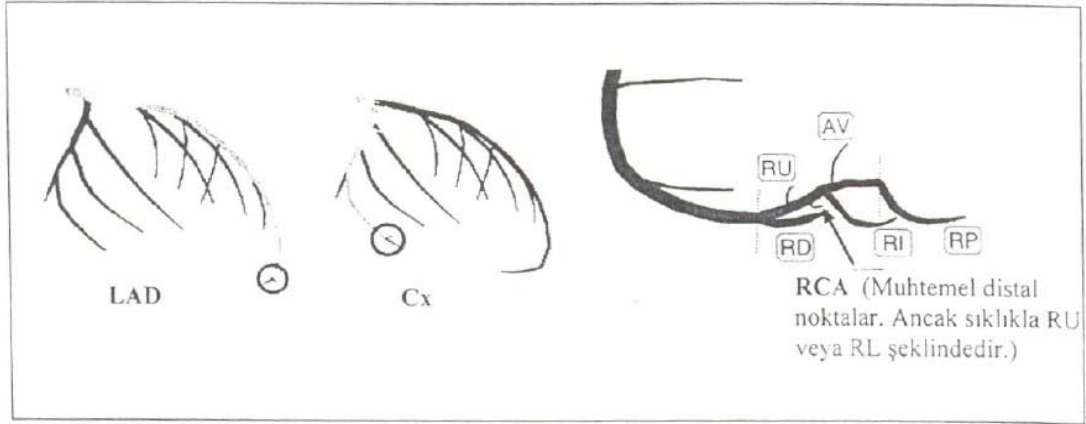
Koroner akımı standardize etmek için TIMI-4 çalışmasında TIMI kare sayısı (TFC) kavramı geliştirilmiştir (49). Sonrasında kişiler arasındaki değişkenlikleri önlemek için Gibson ve ark. tarafından objektif ya da kantitatif olarak değerlendirilecek şekilde düzenlenmiştir. Bu yöntemle kişiler arası değerlendirme değişkenliğinin üstesinden gelinmiş ve koroner akım derecelendirilmesinde kantitatif ve standardize bir aşamaya ulaşılmıştır. Özellikle uygulanabilirliği çok kolay olan bu yöntem daha invaziv bir yöntem olan intrakoroner doppler ölçümleri kadar güvenilir bulunmuştur (50).

**Tablo 1.** TIMI akım derecelendirmesi

<b>TIMI 0</b>	Perfüzyon yok; tıkanma noktasının ötesinde antegrad akım yok
<b>TIMI 1</b>	Perfüzyon olmadan penetrasyon; kontrast madde obstruksiyonun ötesine geçer, fakat sine çekimi esnasında obstruksiyona distal tüm koroner yatağa ulaşamaz.
<b>TIMI 2</b>	Parsiyel perfüzyon; kontrast madde obstruksiyonu geçer, koroner yatak distaline ulaşır. Bununla birlikte, obstruksiyona distal damara kontrast maddenin girişi, ilerlemesi ve/veya distal yataktan temizlenme hızı diğer koronerlere kıyasla daha yavaştır.
<b>TIMI 3</b>	Komplet perfüzyon; obstruksiyona distal antegrad akım ve temizlenme hızı, proksimal akım ve diğer koronerler kadar çabuk olur.

Bir koroner arterin kontrastla dolmaya başlamasından distalde belirlenmiş hedef noktaya ulaşması için gereken zaman sine-kare sayısı (cine-frame) olarak hesaplanmıştır. İlk kare, arter orjinini tamamıyla doldurup her iki kenarına dokunması ve ilerlemeye başlaması olarak; son kare ise her bir koroner için belirleyici bir distal damara ulaşması olarak belirlenmiştir. Sol ön inen arter (LAD) için bıyık “moustache” olarak adlandırılan distal bifurkasyon, sirkumfleks arter (Cx) için sorumlu lezyonu kapsayan en uzun dalın distal bifurkasyonu, sağ koroner arter (RCA) için posterolateral arterin ilk yan dalının çıktığı an son nokta olarak belirlenmiştir (Şekil 1). LAD’de proksimalden distal çatala kadar olan mesafe diğer koroner arterlerden daha uzun olduğundan LAD TIMI kare sayısı RCA ve Cx’in TIMI kare sayısından anlamlı şekilde yüksektir. Bu nedenle diğer koroner arterlerle birlikte standardize edilebilmesi amacıyla bir sabit katsayı ile düzeltilmektedir. Tüm

koroner arterlerin standardize edilmesi için Gibson ve ark, LAD kare sayısını 1.7 sabit sayısına bölerek düzeltilmiş TIMI kare sayısını elde etmişlerdir (50).



**Şekil 1.** Her bir koroner arterin distal son noktaları.

LAD ve Cx'de TIMI kare sayısını belirlemek için kaudal açılı sağ ve sol anterior oblik görüntüler, RCA'da ise hafif kraniyal açılı sol anterior oblik görüntü en uygun olanıdır.

Koroner arterleri normal olan 78 hastadan elde edilen verilere göre; koroner arterlerin kare sayıları, LAD  $36.2 \pm 2.6$ , Cx  $22.2 \pm 4.1$ , RCA  $20.4 \pm 3.0$  kare olarak bildirilmiştir. Bu verilere göre, yapılan araştırmalarda bu değerlerin belirlenmiş standart sapmaları üzerinden kare sayısına sahip olan ve akımda yavaşlamaya neden olabilecek görülebilen darlığa sahip olmayanlar YKA hastaları olarak tanımlanmıştır (50).

### 2.2.5. Tedavi

YKA'lı hastalar için kesinleşmiş bir medikal tedavi stratejileri yoktur. Farklı çalışmalarda farklı ilaçlar YKA'lı hastalarda denenmiştir. Önceki bir çalışmada oral dipiridamol tedavisinin hastaların yakınmalarını etkili bir şekilde azalttığı ve anjiyografik düzelme sağladığı gösterilmiştir (51). Başka bir çalışmada ise vazodilatör özelliği olan bir T-tipi kalsiyum kanal blokeri mibefradil anjiyografi sırasında verilmiş ve çığnemededen 30 dakika sonra koroner akımı düzeltmiştir. Oral kullanımında ise angina sıklığını azaltarak hayat kalitesini arttırmıştır (52).

Yeni yapılan bir çalışmada YKA'lı hastalara anjiyografi esnasında intrakoroner verapamil ve nitrogliserin verilmiştir. Verapamil nitrogliserine göre

daha fazla angiyoğrafik düzelme sağlamıştır (53). Diğer yeni bir çalışma da ise YKA'lı hastalarda statin kullanılması koroner akım rezervini iyileştirdiği gösterilmiştir (54).

Sonuç olarak kesin önerilen bir tedavi yöntemi olmamakla birlikte YKA'lı hastalara klasik anti-iskemik tedavide verilebilir. Antiiskemik tedavi yanında endotel fonksiyonlarını düzenlemek amacıyla anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEi), statinler vs. verilebilir (55).

### **2.3. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz**

#### **2.3.1. Nitrik Oksit Molekülü**

Nitrik oksit membranlardan kolayca geçebilen, hidrofobik, yarılanma ömrü 6-30 saniye olan, bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşan, paylaşılmamış elektron içeren, pek çok reaksiyonu etkileyen zayıf bir oksidan veya indirgeyici bir bileşen olarak görev yapan, serbest radikal bir gazdır.

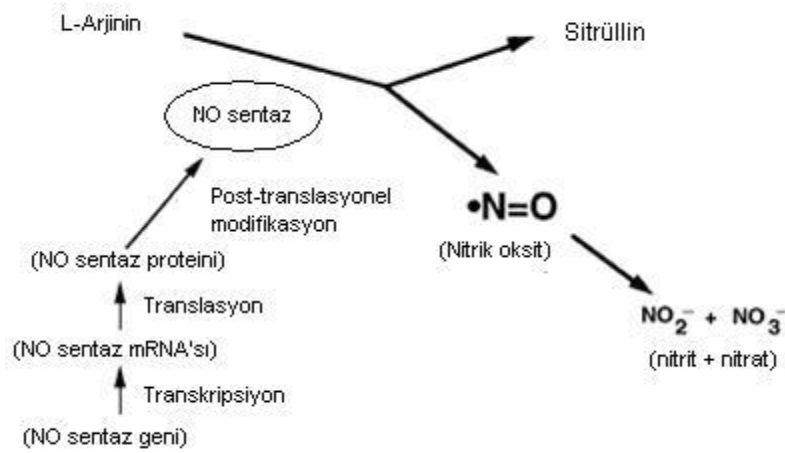
Kardiyovasküler sistemde NO bir sinyal molekülü olarak 1998 yılında keşfedilmiştir. NO'nun bu özelliğinin tanımlanmasından sonra, NO'nun vasküler etkileri ve kardiyovasküler hastalıklardaki rolü ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır (56).

Nitrik oksit organizmanın hemen her yerinde bulunan, çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik işlemde rol oynayan biyolojik bir mediyatördür. Kimyasal yapısındaki paylaşılmayan elektronu ile yüksek derecede reaktif bir moleküldür ve sinyal iletimi sonrasında kendiliğinden nitrite dönüşmektedir. Hücreler arasında sinyal iletiminde yer alan hormon, nörotransmitter ve büyüme faktörleri gibi moleküllerin çoğu sıklıkla plazma membranı ile bağlantılı olan spesifik protein reseptörleri olarak görev yaparken NO üretildiği hücreden dışarı diffüzyonla çıkmakta ve spesifik moleküler hedeflerinin bulunduğu, hedef hücrenin içine girerek etkisini göstermektedir (13).

#### **2.3.1.1. Nitrik Oksit Biyosentezi**

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesinden bir enziminin katalizlediği reaksiyon ile nonaromatik bir aminoasit olan L-arginin'in terminal

guanidin grubunun NO'ye çevrilmesiyle sentezlenir. Bu oluşum esnasında L-arginin ile oksijen molekülleri NO ve sitrüllin moleküllerine dönüştürülmektedir. Bu reaksiyon için moleküler oksijenle, kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahydrobiopterine (BH4) ihtiyaç vardır. Normalde L-arginin seviyesi sürekli olarak salınan NO biyosentezi için yeterlidir. Bu reaksiyonun yan ürünü olan L-sitrüllin bir azotla birleşerek tekrar L-arginine dönüşür ve bu suretle de L-arginin sağlanır (57). Şekil-2'de NO'nin biyosentezi gösterilmiştir.



Şekil 2. Nitrik oksitin biyosentezi (57)

Asetilkolin, histamin, trombin, serotonin, ADP, bradikinin, norepinefrin, substans P ve izoproterenol gibi çeşitli agonistler endotelden NO sentez ve salınımını arttırabilmektedirler. Bununla birlikte, NO salınımı için fizyolojik agonist, süregelen shear stresdir. Shear stres endotelial hücre yüzeyindeki kan akımı tarafından oluşturulan kuvvetin teğetsel vektörüdür. Endotelial hücrelerin shear strese maruz kalması NO salınımında artışa neden olur (57, 58).

### 2.3.1.2. Nitrik Oksit Metabolizması

Yarı ömrü çok kısa olan NO kararsız bir bileşik olarak endotel hücrelerinden salınır. Damar hücrelerinde ve trombositlerde çözülmüş guaniat siklazı aktive eder. Enzimlerden ayrılan NO nitrit'e (NO<sub>2</sub>) dönüşür ve ilk önce plazmaya daha sonrada eritrositlere geçer. Eritrositlerde hemoglobin ile reaksiyona giren NO<sub>2</sub>, nitrat'a (NO<sub>3</sub>) indirgenir. Kan akımı içine difüze olan NO'nin bir kısmı direkt olarak eritrositler

tarafından alınır, oksî-hemoglobin (HbO<sub>2</sub>)’den gelen oksijenin ilavesiyle NO<sub>3</sub>’e dönüştürülür. Oluşan NO<sub>3</sub> plazmaya verilerek böbrekler yoluyla atılır (14).

### 2.3.1.3. Nitrik Oksitin Genel Fonksiyonları

Nitrik oksitin çok sayıda ve kompleks biyolojik aktiviteleri vardır (Tablo 2). NO’nun vazodilatör, nörotransmitter, antimikrobiyal efektör molekül ve immünomodülatör olarak fizyolojik ve patofizyolojik rolleri bulunmaktadır. NO bir haberci veya düzenleyici molekül olarak ve konak savunmasında yararlıyken, aynı zamanda potansiyel olarak toksik ve öldürücü bir moleküldür. Bu durum NO’nun farklı konsantrasyonlarda değişik etkilere sahip olması ve ortamda NO ile etkileşen diğer maddelerin varlığına bağlıdır (57-59).

Serbest radikal olan NO’nun etkileri üretildiği dokuya göre değişmektedir. EDRF’nin tanımlanmasını takiben makrofaj, endotel hücreler, nöronlar, fibroblastlar, epitelyal hücreler, düz kas hücreleri kardiyak miyositler ve daha fazla hücre tipinin NO ürettiği belirlenmiştir (57).

Nitrik oksit endotel hücresinde sentezlendikten sonra damar düz kas hücrelerine difüzyon ile girer. Burada sitozolik enzimlerden solubl guanilat siklazı stimüle eder. Siklik 3’5’-guanozin monofosfat (cGMP) artar. Vasküler düz kas hücrelerinde relaksasyon meydana gelir (59).

Endotel hücresi NO’yu sadece damar düz kaslarına doğru salgılamaz, ayrıca damar lümenine doğru da salgılar. Böylece NO trombositlerin ve lökositlerin endotel üzerine yapışmasını önler. Prostosiklinle sinerjik çalışarak trombosit agregasyonunu inhibe eder. Damar düz kas hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder (14).

Nitrik oksit hem santral sinir sisteminde hemde periferik sinir sisteminde aracı madde olarak işlev görmektedir. Beyindeki NO sentezi belirli nöronal grupların içinde gerçekleşmekte ancak spesifik yolları bilinmemektedir. NO’nun özellikle serebellar nöronlarda bulunması sebebi ile koordinasyon ve denge sağlanmasında görev aldığı belirtilmektedir. Serebral iskemi veya epilepside aşırı NO üretimi nörotoksositeye yol açmaktadır. Ortamdaki yüksek miktardaki NO ile aşırı derecede uyarılma sinir hücrelerinin tahribine yol açar (59, 60).

Nitrik oksit antioksidan ve oksidan etkileri de sahiptir (57-59). Lipid peroksid radikalleri ile reaksiyona girerek antioksidan etki gösterirken süperoksid radikali ile reaksiyona girerek oldukça zararlı olan peroksinitrit anyonu oluşturabilir. Antioksidan özelliği ile arter duvarında LDL oksidasyonunu önleyebilmektedir (61).

**Tablo 2.** Nitrik oksit fonksiyonları (57-59)

<b>Nitrik oksitin fonksiyonları</b>
Antioksidan fonksiyonu
Trombosit agregasyonunun inhibisyonu
Antiinflamatuvar etkileri
Düz kasların gevşemesi
TNF toksisitesine karşı etkileri
Hücre adezyonunun kontrolü
Damar geçirgenliğine etkileri
İmmün sistemdeki fonksiyonlar

#### **2.3.1.4. Nitrik Oksitin Kardiyovasküler Sistemdeki Fonksiyonları**

Nitrik oksitin tanımlanan ilk fonksiyonu vasküler düz kas hücreleri üzerindeki etkisidir (56). Daha sonra kardiyovasküler sistem fonksiyonları üzerine diğer etkileri tanımlanmıştır. Bu etkiler; damar bütünlüğünün korunması, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasının ve düz kas proliferasyonunun önlenmesi, vazomotor tonusunun düzenlenmesi, miyokardiyal kasılmanın modülasyonu, trombosit aktivasyonu ve agregasyonunun inhibisyonu şeklinde özetlenebilir (56, 59).

Nitrik oksit miyokard hücrelerinde sadece koroner akımın değil aynı zamanda miyokardiyal performansın düzenlenmesinde de rol alır. Yüksek konsantrasyonda negatif inotropik etki gösterirken, düşük konsantrasyonda farklı inotropik etkileri olduğu bilinmektedir (59, 62)

Sinoatrial ve atrioventriküler nodlar yoğun bir nitrik oksit sentaz (NOS) immünoreaktivitesine sahiptirler. Bu durum NO'nun kalp hızının kontrolünde rolü olduğu fikrini vermektedir. İdiyopatik dilate kardiyomiyopati hastalarda plazma nitrat düzeyinin yükselmesine sebep olan miyokardiyal indükleyebilir nitrik oksit



sentaz (iNOS) ekspresyon artışı saptanmıştır. Bu durum insan miyokardında NO'nun fizyolojik ve patolojik rolleri olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, bu hastalarda aşırı NO üretiminde de görülen yüksek nöronal vazokonstriktör ürün düzeyleri tespit edilmiştir (62, 63).

Endotel vazomotor tonusu NO gibi vazodilatörler ile ET gibi vazokonstriktörler arasındaki dengeyi düzenleyerek sağlar. Kan akımı ve kan basıncını sürdürmede endotel otokrin bir organ olarak rol oynadığı için endotel hasarı, kardiovasküler hastalığa neden olmaktadır. Endotel fonksiyonları bozulduğunda, biyolojik açıdan yararlanılabilir NO düzeyleri azalır. Bu durum, NO sentezinde azalma ya da lokal olarak reaktif oksijen türevlerinin (ROT) yapımının artmasına bağlı NO inaktivasyonundaki artışın sonucu olarak ortaya çıkabilir (64). NO ve prostasiklin gibi endotelial faktörlerin üretimi, salınımı ve etkilerindeki bozukluk; mental ve fiziki streslerde vazodilatör tonusun azalmasına ve paradoksik vasküler cevap oluşumuna neden olur (65).

Hipertansiyon, HL, DM ve sigara kullanımı gibi farklı patolojik durumların fizyopatolojisinde NO üretiminin ve/veya biyoaktivitesinin kaybı önemli bir rol oynamaktadır. Esansiyel HT'li hastaların damarlarında ve trombositlerinde NO oluşumunda azalma vardır. Koroner aterosklerozlu hastalarda koroner arterlerden NO salınımı ile HT ve bozulmuş Ach gevşemesi arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Hiperlipidemi, endotel fonksiyonlarını bozmasından dolayı endotel bağımlı vazodilatasyon baskılanması ve vasküler adezyonun artması ile ilişkilidir. Ayrıca yapılan araştırmalarda hiperkolesterolemik hayvanlara ve insanlara L-arjinin verildiğinde bozulmuş olan endotelial NO üretiminin düzeldiği ve ilişkili vasküler lezyonların azaldığı gösterilmiştir (65, 66).

### **2.3.2. Nitrik Oksit Sentaz Enzimi**

Nitrik oksit üretimi NOS enzim ailesi tarafından düzenlenmektedir. NOS enzim ailesi üç izoenzimden oluşmaktadır.

Bunlar;

- Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS): Endotelial izoformdur. Vasküler endotel, trombositler ve endokartta bulunur.

- Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS): Nöronal izoformdur. Sempatik sinir sonlarında bulunur.
- İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS): Uyarılabilir izoformdur. Aktif makrofajlar ve miyositlerde bulunur (15).

Bu izoenzimlerin amino asit dizilimi ve biyokimyasal özellikleri benzerlik gösterir ancak farklı kromozomlar üzerindeki ayrı genler tarafından kodlanır ve başlıca buldukları yerler ile üstlendikleri roller birbirlerinden farklıdır. NOS enzim ailesinin genel özellikleri Tablo 3 'te özetlenmiştir (16, 57, 67).

**Tablo 3.** NOS izoenzimlerinin genel özellikleri (16,57,67)

<b>NOS izomerleri</b>	<b>Alternatif İsimler</b>	<b>Enzimin Bulunduğu Yerler</b>	<b>Kromozomal Lokalizasyonu</b>
<b>eNOS</b>	a) Yapısal NOS, endotelial tip, b) ecNOS, c) NOS3	Endotel hücreleri Mast hücreleri Trombositler Düz kas hücreleri Nötrofiller	7q35-7q36
<b>nNOS</b>	a) Yapısal NOS, nöronal tip, b) ncNOS, c) NOS1, d) Beyin NOS	Merkezi sinir sistemi (serebral korteks, hipokampus) Periferik sinir sistemi Nonadrenarjik, Nonkolinerjik nöronlar	12q24.2-12q24.3
<b>iNOS</b>	a) İndüklenebilir NOS b) NOS2 c) makrofaj NOS	Makrofajlar Nötrofiller Solunum yolu epitelyum hücreleri Fibroblastlar Mast hücreleri	17q11.2-17q12

eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz, nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz, iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz.

Nitrik oksit sentaz enzimleri oksijenaz ve redüktaz bölge olmak üzere iki parçalı yapıya sahiptirler. Oksijenaz bölgesi, protoporfirin IX (hem), BH4 ve arjinin için bağlanma kısımları içerir. Redüktaz bölgesi ise FAD, FMN ve indirgenmiş NADPH için bağlanma kısımları içerir (68). 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 (69).

Nitrik oksit sentaz enzim 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 (67). Dolaşımdaki NO'nun asıl kaynağı ise eNOS izoenzimidir (16).

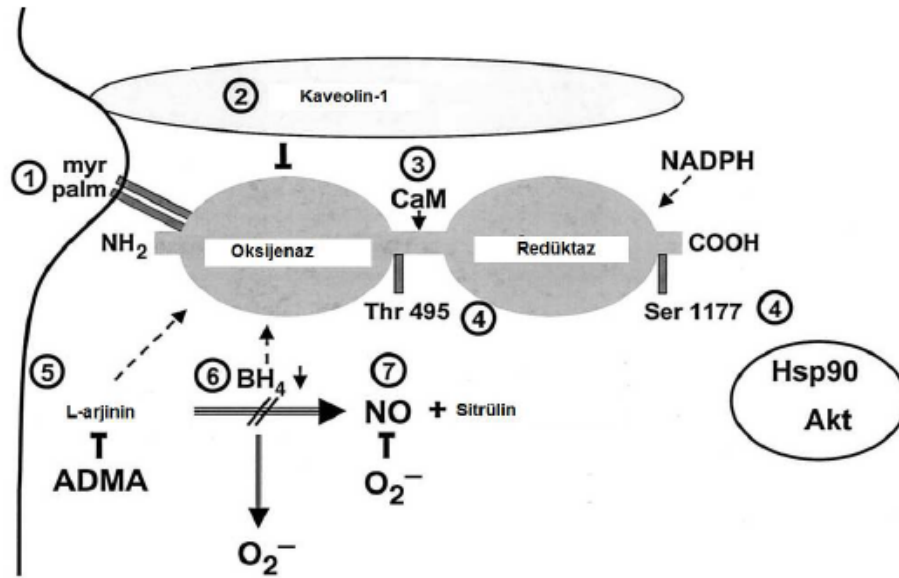
Vücutta NO konsantrasyonu düzenli olarak düşük seviyelerde dalgalanmalar gösterir ve eNOS ve nNOS tarafından kontrol edilir. iNOS enfeksiyon, enflamasyon veya vasküler travma durumlarında diğer iki NOS formunun ürettiğinin 100 - 1000 katı kadar daha fazla NO üretir. Ayrıca iNOS Ca ve uyarıcı ajanlardan bağımsız çalıştığı için aktivitesi daha uzundur. Bunlara bağlı olarak, iNOS'un ürettiği NO seviyesi, fizyolojik sınırların oldukça üstündedir. Bu durum, hücresel süperoksit anyon ( $O_2^-$ ) varlığında ileri derecede toksik olan peroksinitrit molekülünün oluşmasına neden olur. Bunun sonucunda da lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, plazma antioksidanlarının azalması, protein hasarı ve endotelial düz kas gevşemesinin engellenmesi gibi nedenlerle hücresel hasar oluşabilir. Sonuç olarak, düşük konsantrasyondaki NO, hücresel fonksiyonları pozitif olarak düzenlerken, yüksek konsantrasyonlarda hücre üzerinde toksik etkiler yaratabilir (56, 62, 69)

Fizyolojik durumlarda NO doku hasarına yol açmaz, çünkü düzenli olarak oksihemoglobin tarafından ortamdan temizlenir. Tam aksine enfeksiyöz ya da sitokinler tarafından indüklenen iNOS ise çok yüksek miktarlarda NO salınımına neden olur ve konağın dokularında hasara yol açmanın yanı sıra hastalığında gidişatını değiştirebilir (56, 62, 69)

### **2.3.2.1. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS)**

İlk defa endotel hücrelerinde tanımlanmış olan eNOS aktif hale gelmek için kalsiyuma ihtiyaç duyar. eNOS'un sentez süresi kısa olup, üretilen NO miktarı çok

düşüktür. Bunun sebebi hücre içi Ca konsantrasyonunun azalmasıyla enzimin inaktif duruma geçmesidir (70). Hücre içi artan Ca seviyeleri Ca/CaM kompleksinin oluşumuna yol açar ve bu kompleks kaveolinle yer değiştirerek, NOS enzimidaki kalmodulin bölgesine bağlanır ve enzimi aktifleştirir (Şekil 3) (71).



Şekil 3. eNOS enzimi aktivasyonun kontrolü (72)

1-eNOS'un kaveole yerleşmesi. 2- Kaveolin-1'in eNOS aktivitesini baskılaması. 3- CaM'in eNOS aktivitesini uyarılması 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  $O_2^-$  oluşumu. 7-  $O_2^-$  ile NO'nun inaktivasyonu. myr: Miristik asit, palm: Palmitik asit, CaM: Kalmodülün, Hsp90: Isı şok proteini 90, Akt: Protein kinaz B, ADMA: Asimetrik dimetil arjinin, BH4: Tetrahidrobiyopterin, NO: Nitrik oksit, Thr: Treonin, Ser: Serin, NADPH: indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

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 (72). L-arjininin eNOS'a bağlanması da endojen yarışmalı antagonisti olan asimetrik dimetil arjinin tarafından inhibe edilebilir (73). BH4 de NO sentezi için kofaktör olarak gereklidir ve eksikliğinde eNOS'da ayrışma meydana gelir. Sonuç olarak da eNOS tarafından NO'nun yerine süperoksit ( $O_2^-$ ) üretilir (74).

## 2.4. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizmi

### 2.4.1. Genetik Polimorfizm

Her populasyonun kendine özgü bir genetik yapısı vardır. Bu genetik yapı populasyonun içerdiği genotip ve genlerin frekansı ile tanımlanabilir. Bir populasyonun genetik yapısını anlamak için o populasyondaki bireylerin genotiplerini tanımak ve her bir genotipteki bireylerin sayısını bilmek gerekir. Çünkü populasyonun genetik yapısı, onu oluşturan bireylerin genotipinden kaynaklanır. Örneğin otozomal bir gen lokusunda eğer iki allel varsa (A, a) populasyonda bu gen bakımından üç genotip bulunabilir: AA, Aa, aa. Bir genotipteki birey sayısının populasyondaki toplam birey sayısına oranı, genotip frekansıdır. Bir populasyondaki farklı genotip frekanslarının toplamı o populasyonun genotipik yapısını oluşturur (75).

Genetik polimorfizm bir populasyonda farklı allellere bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin aynı anda görülmesi durumudur. Populasyon genetikçilerine göre bir gen lokusu nadir alleller en az %1 frekansına sahip oldukları ve sonuçta bu alleller için heterozigotlar en az %2 oranında görüldükleri takdirde polimorfik olarak tanımlanır. Genetik polimorfizmlerinin belirlenmesinde PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats=Değişken Ardışık Tekrarlar), SSCP (Single Stranded Conformational Polimorfizm=Tek İplikçik Yapısal Çeşitlilik) laboratuvar yöntemleri kullanılmaktadır. Polimorfizm çalışmalarında elde edilen bulgular, hastalıklara yatkınlığın belirlenmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde önem taşımaktadır (76).

Eğer belli bir allelin varlığı ya da yokluğu herhangi bir avantaj ya da dezavantaj sağlamıyorsa polimorfizm doğal olarak kabul edilir. Bir polimorfizm populasyon için yarar belirtebilir. Polimorfik bir populasyonda genetik tek tip populasyona kıyasla belirli çevre şartlarına ve değişikliklere daha iyi hazırlanmış bireylerin bulunma şansı vardır (77).

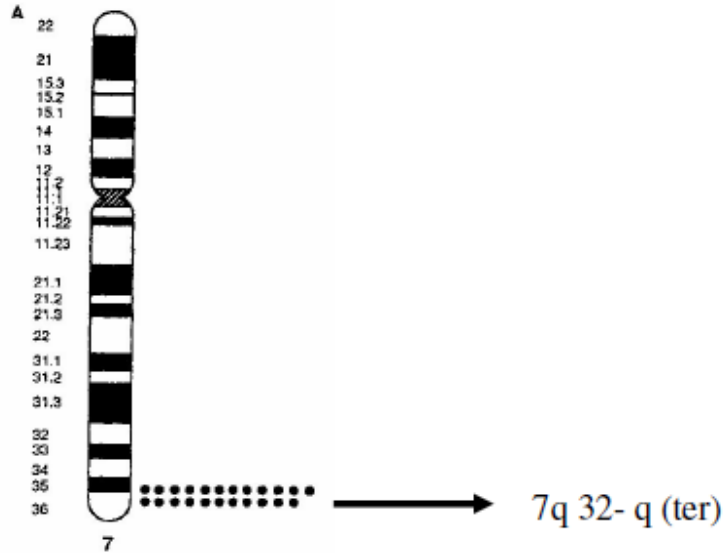
Genellikle polimorfizm fenotipten anlaşılmaz. Daha çok laboratuvar yöntemleri ile saptanır. DNA'nın nükleotid baz dizilerindeki bireysel farklılık

belirlenebilir. Eğer dizideki bir değişiklik kodonda da bir değişikliğe neden oluyorsa, ilgili bölgeye farklı bir amino asit katılacaktır. Bu, gen ürünü incelenmesi ile gösterilebilir (77).

Polimorfizm kimi zaman geçici olabilir, kimi zaman da fenotipler kuşaklar boyu aynı sıklığı sürdürebilir; heterozigot üstünlüğün de söz konusu olduğu bu durum dengeli polimorfizm olarak adlandırılır (78).

#### 2.4.2. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Geni

Endotelial nitrik oksid sentaz geni 7q 32-q terminal (ter) bölgesinde yer alır (Şekil 4) (16). eNOS geni 1203 amino asitten oluşan eNOS enziminin transkripsiyonundan ve sentezinden sorumludur.



Şekil 4. eNOS genine ait kromozomal yerleşimi (16)

İnsan eNOS genine ait genomik klonlar kodlanmış ve genin yapısal organizasyonu belirlenmiştir. eNOS geninde intron-ekson sınırlarında donör-akseptör kuralına uygun olarak intronların 5' ucunda GT, 3' ucunda ise AG baz çiftleri bulunmaktadır (16).

##### 2.4.2.1. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Genindeki Polimorfizm

İnsan eNOS geninde intron, ekson ve promotor bölgesinde olmak üzere üç çeşit polimorfizm tanımlanmıştır. eNOS geninde tanımlanmış polimorfizm büyük

çoğunluğu intronlar içindedir. Promotor bölgede tanımlanan polimorfizm transkripsiyonu ve dolayısı ile enzim seviyelerini direkt olarak etkileme potansiyeli vardır. Nokayama ve ark. eNOS geninin 5' flanking bölgesinde, bağlantılı 3 tane mutasyon olduğunu kanıtlamışlardır. Bunlar; “Thr 786 Cys”, “Ala 922 Gly”, “Thr 1468 Ala” varyasyonlarıdır (79).

Üçüncü tip alellik polimorfizmi de eNOS için ekson 7'de tanımlanmıştır. Bu varyant proteinin primer yapısını değiştirir ve direkt olarak enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel özelliğini değiştirme potansiyeli vardır. Bu tek nükleotid polimorfizmi; pozisyon 894'te guanin'den timin'e, amino asid pozisyon 298'de glutamik asidin aspartik aside değişimiyle uyumludur (79).

İnsan eNOS geninde tanımlanmış bazı polimorfizmlerin kardiyovasküler hastalıklarla muhtemel bağlantıları Tablo 4'de gösterilmiştir.

#### **2.4.2.1.1. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen T-786C Polimorfizmi**

eNOS genin promotor bölgesinde tanımlanmıştır. Promotor bölgedeki 786 numaralı timin (T) bazı ile sitozin (C) bazının yer değiştirdiği nokta mutasyonu olarak ifade edilir. Promotor bölgedeki polimorfizmlerin, transkripsiyonu ve dolayısıyla enzim seviyelerini değiştirebildiği gösterilmiştir.

Endotelyal nitrik oksit sentaz gen T-786C gen polimorfizminin KAH (18) ve HT(80) ile ilişkisi bildirilmiştir.

**Tablo 4.** İnsan eNOS Gen Polimorfizmi ve hastalıklarla İlişkisi (17)

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



### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Çalışmanın Yapıldığı Yer

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Tüm hastalar çalışma öncesi bilgilendirilmiş ve çalışmaya katılmayı kabul etmişlerdir.

#### 3.2. Hastalar

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı kardiyak kateterizasyon laboratuvarında 2008–2009 tarihleri arasında, stabil angina pektoris ve atipik göğüs ağrısı ile müracaat eden ve efor testi pozitif çıkması üzerine koroner anjiyografi yapılan hastalar ardışık olarak çalışmaya alındı.

Çalışmaya alınan hastalar 3 gruba ayrıldılar:

Grup 1- Tıkaçıcı koroner lezyonu (%30 ve üzerinde çap daralması) olmayan, LAD TIMI kare sayısı  $\geq 40$  olan ve YKA tespit edilen ardışık 40 hasta,

Grup 2- Anlamlı koroner arter hastalığı (%50 ve üzerinde darlık) olan, herhangi bir koroner arterde YKA tespit edilmemiş 35 hasta,

Grup 3- Normal koroner akım ve normal koronerlere sahip 30 hasta.

#### Çalışmadan Dışlama Kriterleri:

- Hipertansiyonu olanlar
- Diyabetes mellitusu olanlar
- Kalp yetersizliği ve/veya EF  $< 50$  olanlar
- Koroner ektazisi olanlar
- Atriyal fibrilasyonu olanlar
- Sistemik hastalığı olanlar

- Akut koroner sendrom tanısı ile takip edilen hastalar
- Herhangi bir kronik inflamatuvar-otoimmün hastalığı olanlar
- Aşırı alkol (günlük 70 gramdan az alkol alımını 'ılımlı içici', 70 gram ve daha fazla alkol alanları 'ağır içici' olarak tanımlanmıştır) alımı (81)
- Tıbbi tedavi gerektiren psikiyatrik hastalığı olanlar
- Kognitif fonksiyonları bozuk olan hastalar
- Sol ventrikül hipertrofisi olan hastalar
- Orta-ciddi kapak hastalığı olan hastalar
- Hipertirodi veya hipotiroidisi olan hastalar
- Kronik böbrek ve karaciğer hastalığı olan hastalar
- YKA ile birlikte %30 ve üzerinde tıkayıcı koroner lezyonu olan hastalar

Çalışmaya alınma özelliklerini taşıyan tıkayıcı koroner lezyonu olmayan ve YKA tespit edilen 40 hasta, aterosklerotik tıkayıcı KAH'ı olan 35 hasta ile koroner anjiyografisi tamamen normal ve koroner akımı normal olan 30 hasta çalışmaya dahil edildi. Tüm hastaların demografik özellikleri ayrıntılı olarak sorgulandı. Hastaların yaşı, kilosu ve kullandıkları ilaçları kaydedildi. Hiperlipidemi, HT, DM, ailesel kalp hastalığı öyküsü, tütün içiciliği gibi risk faktörleri ayrıntılı sorgulandı.

Sistolik kan basıncı 140 mmHg'nin ve/veya diyastolik kan basıncı 90 mmHg'nin üzerinde olanlar ya da antihipertansif ilaç kullananlar hipertansif kabul edildi. Açlık LDL düzeyi 130 mg/dl'nin üzerinde olanlar ya da statin kullananlar hiperkolesterolemik; açlık trigliserid düzeyi 150 mg/dl'nin üzerinde olanlar ya da antilipidemik ilaç kullananlar hipertrigliseridemik olarak belirlendi. Açlık kan şekeri 126 mg/dl'nin üzerinde olanlar veya DM tanısıyla tedavi görenler diyabetik kabul edildi. Olgular sigara içenler ve hiç içmemiş olanlar şeklinde ayrıldı. Birinci derece yakınlarında KAH olanlar için aile öyküsü pozitif kabul edildi. Hastaların kilogram cinsinden vücut ağırlıkları, metre cinsinden boyları ölçülerek kaydedildi. Vücut kitle indeksi (VKİ), kg cinsinden vücut ağırlığının, metre cinsinden boy uzunluğunun

karesine bölünmesiyle elde edildi. Dünya sağlık örgütü ve uluslararası kılavuz komitelerince kabul edilen sınır değerlere göre VKİ  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> olan olgular obez kabul edildi (82).

### 3.3. Koroner Anjiyografi

Hastaların koroner anjiyografi işlemi Shimadzu Digitex 2400 cihazı ile yapıldı. Anjiyografi femoral arter ponksiyonu ile standart 6 F Judkins sağ ve sol kateterler kullanılarak yapıldı. Sol ventrikülografi pigtail kateter kullanılarak yapıldı. Radyopak olarak iopamidol (IOPAMİRO) kullanıldı. Sol koroner sistemi için en az dört, sağ koroner sistemi için en az iki projeksiyonda görüntü alınıp dijital hafızaya ve sine filme kaydedildi. Koroner akım hızları, ilk olarak Gibson ve ark. tarafından açıklanan TIMI kare sayısı yöntemi ile tespit edildi (50). Çalışmaya alınan tüm olguların koroner arter akım hızları her bir major koroner arter için ayrı ayrı belirlendi. LAD ve CX için kaudal açılı sağ anterior oblik projeksiyonda alınan görüntü, RCA için ise kraniyal açılı sol anterior oblik projeksiyonda kaydedilen görüntü kullanıldı. (50). Her olgu için ortalama TIMI kare sayısı hesaplandı. Bu amaçla LAD için düzeltilmiş TIMI kare sayısı ve CX ile RCA için tespit edilen TIMI kare sayıları toplanarak üçe bölündü. Her üç arter için TIMI kare sayısı tespiti ve bunların ortalamalarının alınarak ortalama TIMI kare sayısı hesaplanması işini iki kardiyolog üstlendi. Birbirinden bağımsız yapılan bu değerlendirmeler sırasında yaşanan bir uyumsuzluk durumunda üçüncü bir kardiyolog tarafından yeniden değerlendirme yapıldı ve olgular için nihai ortalama TIMI kare sayıları belirlendi. Her bir koroner arter için literatürde bildirilmiş olan yavaş ve normal koroner akım paterni sınırları LAD için  $36.2 \pm 2.6$  kare, CX için  $22.2 \pm 4.1$  kare ve RCA için  $20.4 \pm 3$  kare idi (50). TIMI kare sayısı LAD için  $\geq 40$ , CX için  $\geq 27$  ve RCA için  $\geq 24$  olanlar YKA olarak kabul edildi.

Sadece LAD'de YKA saptanan hastalar tek damar tutulumu, LAD ile birlikte diğer koronerlerin bir veya ikisinde YKA saptanan hastalar çok damar tutulumu olarak sınıflandırıldı.

### 3.4. Biyokimyasal Analizler

Çalışmaya alınan hastaların her birinden 10 saat açlık sonrasında sabah 08:00–09:00 arasında açlık kan şekeri, kreatinin, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>,-AST, ALT ve tam kan sayımı için venöz kan örneği alındı. Tüm tetkikler Süleyman Demirel üniversitesi tıp fakültesi biyokimya laboratuvarında çalışıldı.

### 3.5. Moleküler Analiz

#### 3.5.1. DNA İzolasyonu

Tüm katılımcılardan eNOS gen T-786C mutasyon ve polimorfizmlerini saptamak için alınan 3 ml kan, 1 ml EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma E- 5134, ABD) (%2) içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. Daha sonra yalıtım aşamasına kadar -20°C'de saklandı. DNA yalıtımı, DNA izolasyon kiti Invisorb Spin Blood Mini (İnvitex, Berlin) kiti kullanılarak yapıldı. Yöntemin esası, lökositlerde bulunan DNA dışındaki tüm yapıların bozularak parçalanması, kalan genomik DNA'nın kit kullanılarak ayrıştırılmasıdır.

DNA izole edilerek multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile bu mutasyonların gen dizileri invitro olarak çoğaltıldı. Revers insitu hibridizasyon yöntemi ile “Cardiovasculer Disease Strip Assay” (Vienna Lab, Austria) kiti kullanılarak mutasyonlar çalışıldı.

#### 3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Yapılışı

eNOS786T>C gen zincirlerine çift primerler kullanılarak PCR multipleks tekniği ile invitro amplifikasyon yapılmıştır. Her bir hasta için PCR karışımı; 15 µl amplifikasyon mix A (Vienna Lab, Austria), 5 µl taq polimeraz (Applied Biosystems, Germany), 5 µl DNA birinci reaksiyon tüpüne eklendi ve 15 µl amplifikasyon mix B (Vienna Lab, Austria), 5 µl taq polimeraz (Applied Biosystems, Germany), 5 µl DNA ikinci reaksiyon tüpüne eklendi. Tüpler, “thermal cycler”a (Applied Biosystems, Germany) yerleştirildi, PCR ilk siklusta 94 °C'de iki dakika denaturasyonu takiben; 94 °C'de 15 saniye (denatürasyon), 58 °C'de 30 saniye (renatürasyon) ve 72 °C'de 30 saniye (elongation: uzama) olacak şekilde 35 siklusta

yapıldı. Son siklustan sonra 72 °C'de 180 saniye süren bir siklus daha yapılarak tamamlandı.

### **3.5.3. Agaroz Jel Elektroforeziyle PCR Kontrolü, Elektroforez İşlemi**

Tris asetik asit EDTA (TAE) hazırlarken 121 gr tris amino metan, 28,55 ml glasiyel asetik asit ve 0,5 M, pH=8 EDTA alındı ve hacim 500 ml olacak şekilde distile suyla tamamlandı. Bu çözelti 50 kat konsantre olduğundan kullanırken bir kat olacak şekilde distile su ile seyreltildi. % 2'lik agaroz jel hazırlanırken 50 ml TAE çözeltisi içerisine 0,8 gr agaroz eklendi ve homojenize eriyik oluncaya kadar kaynatıldı. Homojen hale gelen karışım içerisine 3 µl etidium bromid eklendi. Karışım bir miktar soguduktan sonra kalıba dökülerek donduruldu. Agaroz jelde DNA örneklerinin yürümesi için kullanılan loading dye solüsyonunu hazırlamak için 50 µl % 1'lik bromfenol blue, 50 µl % 1'lik ksilen cyanol, 10 µl % 50'lik gliserol ve 880 µl % 10'luk tris-EDTA kullanıldı. Tris EDTA, 1 ml 1 M'lık pH=8 olan tris ve 1 ml pH=8 olan EDTA'nın 99 ml distile suda çözülmesiyle hazırlandı. PCR'dan çıkarılan DNA örneğinden alınan 5 µl ile 1 µl loadin dye solusyonu karıştırıldı ve jelin kuyucuguna ekildi. 90 volt, 22 amper akımda 10 dakika yürütüldü. Jel, Kodak Image Station 2000 MM cihazında görüntülenerek PCR'da amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.

### **3.5.4. Revers İnsitu Hibridizasyon Yöntemi**

Amplifikasyon ürünleri oligonükleotid probalar içeren test striplerle hibridize edilerek mutasyon incelemesi yapılmıştır. Hibridizasyon otomatik inkübatör (Auto Lipa Innogenetics, Sweden) içerisinde 2,5 saat süren bir işlemle gerçekleştirildi. Hibridizasyon sonrasında streptavidin alkalen fosfataz kullanılarak ilgili gen dizilerine ait bantların renk gelişimi gözlemlendi.

### **3.5.5. Promotor Bölge eNOS Gen T-786C Polimorfizminin Analizi**

eNOS geni 786 bölgede C aleli polimorfik varyant, T aleli normal olarak belirlendi. Genotip tiplendirmede ise; TT genotipi homozigot normal genotip, TC genotipi heterozigot mutant genotip, CC genotipi homozigot mutant olarak belirlendi.

### **3.6. Dominant ve Resesif Modelin Anlamı**

Gen çiftlerini benzer alleller şeklinde taşıyan bireyler homozigot genotipli, gen çiftlerini farklı alleller şeklinde taşıyan bireyler ise heterozigot genotipli ayrılırlar. İki farklı allellin varlığında, allellerden hangisinin ya da kaç tanesinin organizmanın fenotipini belirleyeceği dominantlık-resesiflik ilişkisi belirler. Resesif alel yalnızca homozigot genotipte fenotipik olarak kendini gösterilebilirken, dominant allel heterozigot genotipte kendini gösterebilmektedir. eNOS geni 786 bölgede C alleli polimorfik varyant, T alleli normal olarak kabul edildiğinden TC genotipine sahip bireylerde C alleli dominant kabul edilirse (dominant model) fenotip olarak etkilenme beklenirken, C alleli resesif olarak kabul edilirse (resesif model) etkilenme beklenmez.

### **3.7. İstatistiksel Analiz**

Çalışmanın istatistiksel analizi SPSS sürüm 15.0 programı kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenler, aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma kategorik değişkenler yüzde olarak ifade edildi. Sürekli değişkenlerin ikili karşılaştırılmasında "Student t-testi" kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ise ki-kare testi kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hastaların Klinik Özellikleri:

Yavaş koroner akım grubuna alınan 40 hastanın 23 (%57,5)'ü erkek ve yaş ortalaması 52±9 yıl idi. KAH grubuna alınan hastaların 24 (%68,5)'ü erkek ve yaş ortalaması 55±9 yıl idi. Kontrol grubunda ise hastaların 15 (%50)'i erkek ve yaş ortalaması 51±8 yıl idi. Üç grup yaş ve cinsiyet yönünden benzerdi.

Aterosklerotik risk faktörleri değerlendirildiğinde gruplar arasında heredite ve obezite yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Hastaların demografik ve klinik özellikleri Tablo 5'te özetlenmiştir. KAH grubunda YKA ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sigara içenlerin yüzdesi anlamlı olarak yüksekti. Benzer olarak KAH grubunda HL olan hasta yüzdesi değeri diğer iki gruba göre daha yüksek olma eğilimindeydi.

**Tablo 5.** Hastaların bazal demografik ve klinik özellikleri.

Değişkenler	YKA n= 40	KAH n=35	Kontrol n=30	P değeri		
				P1	P2	P3
Yaş, yıl	52±9	55±9	51±8	0.104	0,953	0,103
Erkek / Kadın	23/17	24/11	15/15	0.323	0,533	0,128
Sigara, n	8 (%20)	19(%54,2)	8 (%26,6)	0.002	0,511	0,024
Hiperlipidemi, n	11 (%27,5)	17(%48,5)	8 (%26,6)	0.060	0,938	0,070
Heredite, n	8(%20)	3(%8,5)	6 (%20)	0,163	0.99	0,184
Obezite, n	15 (%37,5)	12(%34,2)	10 (%33,3)	0,772	0,719	0,936
VKİ(kg/m <sup>2</sup> )	28,6±3	27,2±4	27,4±5	0,120	0,271	0,846
SKB, mmHg	121±10	118±12	117±12	0,417	0,171	0,589
DKB, mmHg	74±9	73±3	73±8	0,787	0,822	0,998

YKA: Yavaş koroner akım, KAH: koroner arter hastalığı, VKİ: Vücut-kitle indeksi DKB: Diyastolik kan basıncı, SKB: sistolik kan basıncı. p1: YKA ile KAH arası, p2: YKA ile normal koronerler arası, p3: KAH ile normal koronerler arası anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

Tablo 6'da çalışma gruplarındaki hastaların laboratuvar değerleri yer almaktadır. Gruplar arasında laboratuvar değerleri yönünden anlamlı fark saptanmadı.

**Tablo 6.** Hastaların laboratuvar testleri.

Değişkenler	YKA, n=40	KAH, n=35	Kontrol, n=30	P		
				P1	P2	P3
<b>Glukoz, mg/dL</b>	98±11	99,1±13	93,9±11	0,682	0,157	0,124
<b>Kreatinin,mg/dL</b>	0,92±0,2	0,97±0,2	0,9±0,1	0,304	0,591	0,238
<b>Sodyum, mmol/L</b>	138±3	139±2	139±2	0,265	0,231	0,752
<b>Potasyum,mmol/L</b>	4,4±0,3	4,4±0,4	4,4±0,4	0,821	0,423	0,586
<b>AST, mg/dL</b>	20±12	22±4	20±7	0,473	0,947	0,258
<b>ALT, mg/dL</b>	21±9	22±6	20±9	0,493	0,698	0,291
<b>Hemoglobin,gr/dL</b>	14,4±1	14,9±1	14,3±1	0,139	0,905	0,193
<b>Hemotokrit, %</b>	42,1±3	44±4	41,4±5	0,282	0,492	0,167
<b>Trombosit,x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	258,5±6,8	239,3±6,4	256,8±7,1	0,229	0,923	0,357
<b>Beyaz küre, /mm<sup>3</sup></b>	7670±2157	8019±1909	7146±1850	0,480	0,321	0,103

ALT: Alanin transaminaz, AST: Aspartat transaminaz, p1: YKA ile KAH arası, p2: YKA ile normal koronerler arası, p3: KAH ile normal koronerler arası anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

#### 4.2. eNOS Gen T-876C Polimorfizmi Genotipleri

Tüm gruplar eNOS geni T-876C polimorfizminin genotipi açısından incelendi. YKA grubunda 3 (%7,5) hastada CC genotipi, 25 (%62,5) hastada TT genotipi, 12 (%30) hastada ise TC genotipi tespit edildi. KAH grubundaki 3 (%8,5) hastada CC genotipi, 16 (%45,7) hastada TT genotipi, 16(%45,7) hastada TC genotipinde tespit edildi. 30 hastadan oluşan kontrol grubunda ise 3 (%10) hastada CC genotipi, 17 (%56,6) hastada TT genotipi, 10 (%33,3) hasta TC genotipinde bulundu. Gruplar genotip dağılımlarına göre karşılaştırıldığında TT, TC ve CC genotipleri yönünden aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Grupların eNOS geni T-876C polimorfizminin genotip frekansları Tablo 7'de gösterilmiştir.



**Tablo 7.** eNOS geni T-876C polimorfizminin genotip frekansları

	YKA		KAH		Kontrol		P1	P2	P3
	n	%	n	%	n	%			
<b>TT genotipi</b>	25	62,5	16	45,7	17	56,6	0,145	0,622	0,379
<b>CC genotipi</b>	3	7,5	3	8,5	3	10	0,865	0,712	0,843
<b>TC genotipi</b>	12	30	16	45,7	10	33,3	0,160	0,766	0,310

YKA: Yavaş koroner akım, KAH: koroner arter hastalığı, p1: YKA ile KAH arası, p2: YKA ile normal koronerler arası, p3: KAH ile normal koronerler arası anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

Gruplar dominant modele göre karşılaştırıldığında, gruplar arasında TC+CC genotipine sahip olanlar ile TT genotipine sahip olanlar arasında anlamlı fark bulunmadı. Resesif modele göre de, grupların ikili olarak karşılaştırılmasında, anlamlı bir fark tespit edilmedi. Grupların dominant ve resesif modele göre genotip dağılımları Tablo 8'de gösterilmiştir.

**Tablo 8.** Grupların dominant ve resesif modele göre eNOS geni T-876C polimorfizminin genotip dağılımları

		YKA		KAH		Kontrol		P1	P2	P3
		n	%	n	%	n	%			
<b>Dominant Model</b>	<b>CC+TC genotipi</b>	15	37,5	19	54,3	13	43,3	0,145	0,622	0,379
	<b>TT genotipi</b>	25	62,5	16	45,7	17	56,7			
<b>Resesif Model</b>	<b>TT+TC genotipi</b>	37	92,5	32	91,4	27	90	0,865	0,712	0,843
	<b>CC genotipi</b>	3	7,5	3	8,6	3	10			

YKA: Yavaş koroner akım, KAH: koroner arter hastalığı. p1: YKA ile KAH arası, p2: YKA ile normal koronerler arası, p3: KAH ile normal koronerler arasındaki anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

#### 4.3. eNOS Geni T-876C Polimorfizmi Allel Frekansları

eNOS geni T-876C polimorfizmi allel açısından incelendiğinde; YKA grubunda 62 T alleli (YKA grubundaki alellerin %77,5'i), 18 C alleli (YKA grubundaki alellerin %22,5'i) tespit edildi. KAH grubunda 48 T alleli (KAH grubundaki allel sayısının %68,6'sı), 38 C alleli (KAH grubundaki allel sayısının

%31,4'ü) ve kontrol grubunda 44 T alleli (kontrol grubundaki allellerin %71'i) ile 18 C alleli (kontrol grubundaki allellerin %29'u) tespit edildi. Gruplar arasında hem T alleli sıklığı ve hem de C alleli sıklığı açısından anlamlı fark tespit edilmedi (Tablo 9).

**Tablo 9.** Grupların eNOS geni T-876C polimorfizminin allel frekansları

	YKA		KAH		Kontrol		P1	P2	P3
	n	%	n	%	n	%			
<b>T alleli</b>	62	77,5	48	68,6	44	71	0,233	0,601	0,578
<b>C alleli</b>	18	22,5	22	31,4	18	29	0,233	0,601	0,578

YKA: Yavaş koroner akım, KAH: koroner arter hastalığı, p1: YKA ile KAH arası, p2: YKA ile normal koronerler arası, p3: KAH ile normal koronerler arası anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

#### 4.4. Hastalarının Anjiyografik Özellikleri

Yavaş koroner akım grubunda; her üç majör epikardiyal koroner arterdeki TIMI kare sayıları ve bunların ortalaması alınarak hesaplanan ortalama TIMI kare sayıları kontrol grubuna göre belirgin olarak daha fazlaydı (tümü  $p < 0,001$ ) (Tablo 10).

**Tablo 10.** YKA ve kontrol grubunun TIMI kare sayıları

	YKA (n=40)	Kontrol, (n=30)	P değeri
<b>LAD</b>	57±14	27±3	<0,001
<b>CX</b>	28±10	18±3	<0,001
<b>RCA</b>	21±5	16±2	<0,001
<b>Ortalama TIMI Kare Sayısı</b>	27±6	17±2	<0,001

LAD: Sol ön inen koroner arteri, Cx: Sirkumfleks koroner arteri, RCA: Sağ koroner arteri.

Çalışmaya alınan 40 YKA hastasının tamamında (%100'ünde) LAD tutulumu vardı. Buna ilave olarak, bu hastaların %40'ında Cx ve %20'sinde RCA'da YKA bulunmakta idi. YKA bulunan hastalardan 22'sinde tek damarda YKA saptanırken 18 hastada birden fazla damarda (12'sinde iki damar, 6'sında üç damar) YKA vardı. YKA hastalarının anjiyografik özellikleri Tablo 11'de gösterilmiştir.

**Tablo 11.** YKA grubundaki hastalarının anjiyografik karakteristikleri

<b>YKA Saptanan Koroner Damar</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
LAD	40	(%100)
Cx	16	(%40)
RCA	8	(%20)
<b>YKA saptanan Koroner Damar Sayısı</b>		
Tek damar	22	(%55)
Çok damar	18	(%45)
İki damar	12	(%30)
Üç damar	6	(%15)

LM: Sol ana koroner arteri, LAD: Sol ön inen koroner arteri, Cx: Sirkumfleks koroner arteri, RCA: Sağ koroner arteri.

Çalışmaya alınan 35 KAH hastasının %83'ünde LAD'de, %60'ında Cx'de ve %57'sinde RCA'da anlamlı koroner lezyon (%50 ve üzerinde darlık) bulunmakta idi. KAH hastalarının 13'ünde tek damarda anlamlı koroner darlık mevcut iken, 22 hastada birden fazla damarda (9'unda iki damar, 13'ünde üç damar) anlamlı koroner darlık vardı. KAH hastalarının anjiyografik özellikleri Tablo 12'de gösterilmiştir.

**Tablo 12.** KAH grubundaki hastalarının anjiyografik karakteristikleri

<b>Anlamlı Lezyon Saptan Koroner Damar</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
LAD	29	(%83)
Cx	21	(%60)
RCA	20	(%57)
<b>Anlamlı Lezyon Saptan Koroner Damar Sayısı</b>		
Tek damar	13	(%37)
Çok damar	22	(%63)
İki damar	9	(%26)
Üç damar	13	(%37)

LM: Sol ana koroner arteri, LAD: Sol ön inen koroner arteri, Cx: Sirkumfleks koroner arteri, RCA: Sağ koroner arteri.

#### 4.5. Tek Damar ve Çok Damar Tutulumunda eNOS gen T-786C Gen Mutasyon Genotipleri

Dominant modele göre CC+TC genotipi saptanan YKA hastalarından 8'inde tek damar tutulumu, 7'sinde çok damar tutulumu tespit edilmiştir. Dominant modele göre CC+TC genotipi tek damar ve çok damar tutulumunda benzerdi ( $p=0.876$ ) (Tablo 13).

**Tablo 13.** YKA hastalarında tek damar ve çok damar tutulumunda dominant modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi genotipleri

	Tek damar tutulumu n:22	Çok damar tutulumu n:18	P
<b>CC, TC genotipi (dominant model)</b>	8 (%36)	7 (%39)	0,876
<b>Normal genotip (TT)</b>	14 (%64)	11 (%61)	

Resesif modele göre eNOS gen T-786C gen polimorfizmi CC genotipi saptanan YKA hastalarından 1 hastada tek damar tutulumu, 2 hastada çok damar tutulumu tespit edilmiştir. Resesif modele göre tek damar ve çok damar açısından bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.433$ ) (Tablo 14).

**Tablo 14.** YKA hastalarında tek damar ve çok damar tutulumunda resesif modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi genotipleri

	Tek damar tutulumu n:22	Çok damar tutulumu n:18	P
<b>CC genotipi (resesif model)</b>	1 (%5)	2 (%11)	0,433
<b>Normal genotip (TT, TC)</b>	21 (%95)	16 (%89)	

#### 4.6. eNOS Gen T-786C Gen Polimorfizmi ve Kardiyovasküler Risk Faktörleri

Çalışmaya alınan toplam 105 hasta dominant modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi olan (en az bir C alleli, TC+CC) ve olmayan (TT homozigot hastalar) olarak iki gruba ayrıldı ve kardiyovasküler risk faktörleri arasındaki ilişki

değerlendirildi. CC+TC genotipi tespit edilen 47 hasta ile TT genotipi tespit edilen 58 hasta kardiyovasküler risk faktörleri açısından karşılaştırıldı. TC+CC genotipi olanlarda HL anlamlı olarak yüksek saptandı (p=0,015). Yaş, cinsiyet, sigara içimi ve obezite açısından genotipler arasında önemli farklılık yoktu (Tablo15).

**Tablo 15.** Çalışmaya alınan tüm hastalarda dominant modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi genotip dağılımı ve kardiyovasküler risk faktörleri

<b>Risk faktörleri</b>	<b>CC+TC genotipi</b> n:47	<b>TT genotipi</b> n:58	<b>P</b>
<b>Yaş</b>	53 ±9	53±9	0,803
<b>Cinsiyet(E/K)</b>	28/19	34/24	0,921
<b>Sigara içimi</b>	16 (%34)	19 (%33)	0,890
<b>Hiperlipidemi</b>	22 (%47)	14 (%24)	0,015
<b>Heredite</b>	9 (%19)	8 (%14)	0,459
<b>Obezite</b>	17 (%36)	24 (%41)	0,586

YKA grubundaki hastalar dominant modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi olan (en az bir C alleli, TC+CC) ve olmayan (TT homozigot hastalar) olarak iki gruba ayrıldı ve kardiyovasküler risk faktörleri arasındaki ilişki değerlendirildi. Çalışmaya alınan tüm hastalar ile kardiyovasküler risk faktörleri arasındaki ilişkiye benzer olarak YKA grubunda TC+CC genotipi olanlar hastalarda da HL anlamlı olarak yüksek saptandı (p=0,015). YKA grubundaki hastaların dominant eNOS geni T-786C polimorfizmi genotip dağılımı ve kardiyovasküler risk faktörleri Tablo 16'da gösterilmiştir.

**Tablo 16.** YKA'lı hastalarda dominant modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi genotip dağılımı ve kardiyovasküler risk faktörleri

<b>Risk faktörleri</b>	<b>TC+CC genotipi</b> n:15	<b>TT genotipi</b> n:25	<b>P</b>
<b>Yaş</b>	53±9	51±9	0,67
<b>Cinsiyet(E/K)</b>	9/6	14/11	0,80
<b>Sigara içimi</b>	3 (%20)	5 (%20)	0,99
<b>Hiperlipidemi</b>	7 (%47)	4 (%16)	0,03
<b>Heredité</b>	3 (%20)	5 (%20)	0,99
<b>Obezite</b>	6 (%40)	9 (%36)	0,80

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda YKA ile eNOS gen T-786C polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki saptamadık. eNOS gen T-876C polimorfizminin allel frekansları açısından da YKA, KAH ve kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Yavaş koroner akım ilk kez 1972 yılında tanımlanmıştır (1). Ondan günümüze kadar YKA'ya neden olabilecek etyolojik faktörlerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmış ve birçok patofizyolojik mekanizma öne sürülmüştür (10). YKA hastalarında saptanan yapısal değişikliklerden dolayı küçük damar disfonksiyonuna bağlı gelişebileceği düşünülmüştür. Ektatik veya anevrizmal şekilde dilate olmuş koroner arterlerde YKA saptandığından dolayı YKA'nın bir dilate koronaropati olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca etyolojide trombosit fonksiyon bozukluğunun veya inflamasyonun rol oynayabileceği de düşünülmüştür (12).

Yavaş koroner akımın etyopatogenizinde öne süren hipotezlerden iki tanesi öne çıkmaktadır. Bunlar koroner arterlerin tıkalı hastalığı ve vazodilatör - vazokonstriktör faktörler arasındaki dengesizliktir. YKA'nın aterosklerozun erken evresinin bir formu olduğu düşünülmüştür (7). Bu hipotezi araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. IVUS kullanılarak yapılan bir çalışmada YKA saptanan hastaların koroner arterlerinde boylu boyunca lümeni daraltmayan yaygın kalsifikasyon, diffüz intimal kalınlaşma ve damar duvarında ateromlar saptanmıştır. (8). YKA'nın etyopatogenizinde ET-1 ve NO salınımları arasındaki dengesizliğin rolü olabileceği düşünülmüş de bazı çalışmalar yapılmıştır. Ülkemizde yapılan iki çalışmada plazma NO seviyesi YKA'lı hastalarda kontrol grubuna kıyasla düşük bulunmuştur (6, 11). Yine bu çalışmalarda plazma ET-1 seviyeleri YKA'lı hastalarda daha yüksek bulunmuştur (11). YKA'lı hastalarda plazma homosistein ve ADMA düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Bu moleküller NO sentezini inhibe ederek endotel fonksiyonlarını etkilemektedir (43, 44).

NO'nun vücutta pek çok farklı fizyolojik olayda yer aldığı ve serum seviyelerindeki hafif artışların doku perfüzyonu için önemli koruyucu role sahip olduğunun bilinmektedir (57-59). Güçlü bir vazodilatör olan NO sentezinin inhibisyonunun vazokonstriktörlere karşı duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (13).

Birçok dokuda NO sentezlenmektedir. Endotel hücrelerinde eNOS aktivitesi sonucu üretilen NO endotel tabakası altındaki düz kas dokusuna difüzyon ile ulaşır ve damar düz kasında gevşemeye yol açarak vasküler tonusun ve kardiyovasküler hemostazın düzenlenmesinde önemli rol oynar (58).

Nitrik oksitin biyoaktivitesinin bozulmasının ateroskleroz gelişim sürecinde önemli rolü vardır ve kardiyovasküler olayları tetikleyebilir (83). Bundan dolayı kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde NO metabolizmasını etkileyen tüm durumlar araştırılmıştır.

Nitrik oksit sentezi eNOS'un katalizlediği bir reaksiyon ile gerçekleşir (57). NO ve eNOS defektlerinde hızlanmış ateroskleroz gelişimi bildirilmiştir (22). eNOS geni 1993 yılında 7. kromozomun uzun kolunda tanımlanmıştır (16). eNOS enzimini kodlayan genin ekson, intron ve promotor bölgelerinde pek çok polimorfizm ve çeşitli mutasyonlar bildirilmiştir (79). Bu gendeki potansiyel bir varyasyon eNOS enziminde yapısal ve fonksiyonel değişikliklerine yol açabildiği ve bu değişiklikler sonucunda çeşitli hastalıkların gelişebileceği bildirilmiştir (84).

Yapılan gen çalışmasında eNOS geninin promotor bölgesindeki T-786C baz değişiminin eNOS transkripsiyonunda %50 azalmaya neden olduğu ve bunun serum NO seviyelerinde azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (18). Mutant C alleli sağlıklı Japonlarda çok nadir (%3) iken koroner spazmı olan hastalarda daha yaygın (%15) saptanmıştır. Bu çalışmada eNOS gen T-786C polimorfizminin endotelial NO sentezi azalttığı ve koroner spazmı tetiklediği ileri sürülmüştür (79).

Daha önce yapılan çalışmalar ışığında YKA'nın etyopatogeneğinde ateroskleroz ve NO biyosentezini etkileyen faktörlerin rolü olduğu düşünülmektedir. eNOS gen polimorfizminin ise NO biyosentezini etkilediği ve ateroskleroz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bütün bu sonuçlar da eNOS gen polimorfizmi ile YKA arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda YKA grubunun yaş ortalaması  $52 \pm 9$  yıl idi. Daha önce yapılan çalışmalarda hasta gruplarının yaş ortalamalarına benzerdi (23, 24, 85). Önceki çalışmalarda (3, 85) olduğu gibi, YKA hastalarının % 57'si erkekti.

Yavaş koroner akımla yapılan çalışmaların çoğunda hipertansif ve diyabetik hastalar çalışmaya alınmıştır (24, 43, 85, 86). Çalışma grubumuzun daha homojen



olması için hipertansif ve diyabetik hastaları çalışmaya almadık. YKA grubunda sigara içme yüzdesi KAH grubundan daha düşük iken, kontrol grubu ile benzerdi. Literatüre göre YKA sigara içenlerde daha sık gözlenmektedir (3, 85) ancak bizim çalışmamızda YKA grubunda sigara içme kontrol grubu ile benzerdi. Sigaranın ateroskleroza yol açtığı düşünüldüğünde sigara içme yüzdesinin KAH grubunda yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Ancak sigara içme yüzdesinin YKA ve kontrol grubunda benzer olması YKA'nın etyopatogenezinde ateroskleroz dışı faktörlerin olduğunu düşündürülebilir. Hiperlipidemi en sık KAH grubunda gözlendi. YKA ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hiperlipidemi sıklığında anlamlı fark yoktu. Önceki çalışmalarda da HL ile YKA arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (24, 43, 85, 86).

Çalışmamızda eNOS gen T-786C polimorfizmi ile YKA arasında anlamlı bir ilişki saptamadık. Literatürde eNOS gen polimorfizmi ile YKA arasındaki ilişkiyi araştıran 2 çalışma vardır (23, 24). Bunlardan ilkinde eNOS gen T-786C polimorfizminin YKA için bir risk faktörü olduğu bulunmuştur (24). Bu çalışmanın bulguları; bizim çalışmamızdan farklıdır. Her iki çalışma da Türk toplumunda yapıldığından dolayı, bu farkın nedeni toplumlar arası genetik değişkenliğe bağlanamaz. Ancak önceki çalışmada hipertansif ve diyabetik hastalar çalışmaya alınmıştır. Oysa, biz bu hastaları dışladık. eNOS gen polimorfizmi ile HT (80) ve insülin direnci (87, 88) arasında anlamlı ilişki gösterildiğinden dolayı bizim hasta grubumuz önceki çalışmaya göre daha homojendir ve bu da çalışma sonuçlarını etkileyebilir. İki çalışmadaki hasta popülasyonlarının yaş ortalaması ve hasta sayıları birbirine yakındır. Ülkemizde yapılan ikinci çalışmada, eNOS genin farklı bir polimorfizmi olan eNOS gen Glu298Asp polimorfizmi değerlendirilmiş ve YKA ile arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (23). Bizimkine benzer olarak da hipertansif ve diyabetik hastalar çalışmaya alınmamıştır. Her iki çalışmada hipertansif ve diyabetik hastaların alınmamasının sonuçların benzer çıkmasında etkisi olabilir. Sonuç olarak hipertansif ve diyabetik hastaların alınmamasının çalışmaların sonuçlarını etkilediğini düşünmekteyiz.

Ülkemizde eNOS gen polimorfizmi ve YKA ile ilgili yapılan çalışmalardan farklı olarak çalışma grubumuzu tek ve çok damar tutulumu olarak ikiye böldük. Dominant modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi açısından tek ve çok damar

tutulumu arasında fark bulmadık. Yine YKA grubunda dominant modele göre eNOS gen T-786C polimorfizmi olan ve olmayanların aterosklerotik risk faktörlerini karşılaştırdık. eNOS gen T-786C polimorfizmi saptanan YKA'lı hastalarda HL daha sık rastlandı ancak ailesel hiperlipidemi ile eNOS gen polimorfizmi arasında ilişki olmadığını gösterilmiştir (89). Buna karşın çalışmamızda HL ile eNOS T-786C gen mutasyonu olan YKA'lı hastalar arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. YKA ile eNOS gen polimorfizm arasındaki ilişkiyi inceleyen önceki 2 çalışmada (23, 24) mutasyonu olan ve olmayanlar arasında HL sıklığı açısından anlamlı fark yoktu. Hiperlipidemisi olan YKA'lı hastalar ile eNOS gen polimorfizmi arasındaki ilişkinin daha büyük çalışmalarda araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda eNOS T-786C gen polimorfizmi açısından KAH grubu ve kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulmadık. Literatürde ise KAH ile eNOS T-786C gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir (18-21, 90-93).

”Genetic and ENvironmental factors In Coronary Atherosclerosis study” GENICA koroner anjiyografi yapılan hastalarda KAH'ın genetik belirteçlerini araştıran prospektif büyük bir çalışmadır. Bu çalışmada 1225 hastanın genotiplendirilmesi yapılmıştır ve eNOS T-786C gen polimorfizminin KAH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. C alleli taşıyanlar TT homozigotlar ile karşılaştırıldığında iki veya üç damar KAH riskinin arttığı saptanmıştır ve eNOS T-786C gen polimorfizmindeki C allelinin çok damar KAH için yüksek riskle ilişkili olduğu bildirilmiştir (18). Diyabetik ve hipertansif hastalar bu çalışmaya alınmıştır. Çalışmamızda bu çalışmadan farklı sonuç elde etmemizin nedeni hipertansif ve diyabetik hastaları almadığımızdan dolayı çalışma grubumuzun daha homojen olması olabilir.

Çeşitli toplumlarda da eNOS gen polimorfizmi ile KAH arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çin halkı üzerinde yapılan ve 622 hastanın dahil edildiği bir çalışmada eNOS gen T-786C polimorfizminin KAH için bağımsız bir risk faktörü olduğu bulunmuştur (20). Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada eNOS gen 894G>T ve T-786C polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (19). Mısır toplumunda yapılan başka bir çalışmada eNOS gen Glu298Asp polimorfizmi için

homozigot genotipinin KAH riskini arttırdığı gösterilmiştir (21). Çalışmamızda önceki çalışmalardan farklı sonuç elde etmemizin nedeni toplumlar arası genetik farklılıktan dolayı olabilir.

eNOS gen polimorfizminin iskemik kalp hastalığı üzerine etkisini inceleyen, 23028 hastanın alındığı 26 çalışmanın meta analizi yapılmıştır. eNOS gen Glu298Asp, T-786C ve intron-4 polimorfizmleri incelenmiştir ve eNOS gen Glu298Asp ve intron polimorfizmlerinin iskemik kalp hastalığı için orta dereceli risk artışına neden olduğu bulunmuştur (94).

eNOS gen polimorfizminin koroner in-stent restenoz üzerine etkisi araştıran bir çalışmada eNOS Glu298Asp gen polimorfizminin restenoz için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (95).

Ülkemizde yapılan ve KAH tespit edilen 473 hastanın alındığı bir çalışmada koroner kollateral gelişimi ile eNOS gen Glu298Asp polimorfizmi arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmada eNOS geni Asp298 allelinin azalmış koroner kollateral gelişimi ile anlamlı olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir (96).

eNOS gen polimorfizminin kardiyovasküler mortalite üzerine etkisi araştırılmıştır. Koroner anjiyografi yapılan yüksek riskli hastalarda eNOS gen T-786C polimorfizminin diğer klasik aterosklerotik risk faktörlerinden bağımsız olarak kardiyovasküler ölümleri tetiklediği gösterilmiştir (83). Yine bu çalışmada TT ve CC homozigot gene sahip hastalarda oksidatif stres belirteçlerinde değişiklikler saptanmıştır

Türk toplumunda da eNOS gen polimorfizmi ile KAH arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmalarda eNOS T-786C gen polimorfizminin ve Glu298Asp genotipinin KAH için bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (97, 98). Çalışmamız ile önceki çalışmalar arasında bazı farklılıklar vardır. Önceki çalışmalardaki hasta populasyonun yaş ortalaması bizim çalışmamıza göre yüksektir. Ayrıca önceki çalışmalarda hipertansif ve diyabetik hastalar çalışmaya alınmıştır. Oysa, biz bu hastaları dışladık. Bu farklılıklar çalışma sonuçlarını etkilemiş olabilir.

eNOS gen polimorfizminin MI üzerine etkisini araştıran birçok çalışma (99-105) yapılmıştır ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak çalışmaların çoğu MI ile eNOS gen Glu298Asp arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Hasta sayısı daha fazla

olan 4 çalışmada, MI geçiren hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, eNOS gen Glu298Asp polimorfizmi daha sık saptanmıştır (102-105). Ancak diğer çalışmalarda ise eNOS T-786C ve Glu298Asp gen polimorfizminin MI için bir risk faktörü olmadığı gösterilmiştir (99-101). Türk toplumunda ise akut koroner sendromlu hastalarda eNOS -786C/C genotipi daha sık saptanmıştır (106).

Literatürde eNOS gen polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı ilişki olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (90-92). İngiltere’de yapılan bir çalışmada, 3052 erkek hasta iskemik kalp hastalığı açısından ortalama 8 yıl takip edilmiş ve çalışma sonunda iskemik kalp hastalığı gelişen ile gelişmeyen hastalar karşılaştırılmıştır. eNOS gen polimorfizminin NO biyoaktivitesini azaltmadığı ve iskemik kalp hastalığı riskini arttırmadığı saptanmıştır (91). Benzer olarak Çin toplumunda yapılan çalışmada eNOS gen T-786C polimorfizmi ile KAH arasında ilişki olmadığı gösterilmiştir (92). Hint toplumunda da eNOS gen Glu298Asp polimorfizmi ile KAH arasında ilişki saptanmamıştır (90).

Ülkemizde de eNOS gen T-786C ve Glu298Asp polimorfizmleri ile KAH arasında ilişki olmadığı gösterilmiştir (93). Bu çalışmaya benzer olarak da bizim çalışmamızın sonuçları, KAH ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, eNOS gen T-786C polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı ilişki olmadığını desteklemektedir.

## 6. SONUÇ

Bulgularımız eNOS gen T-786 C polimorfizmi ile YKA arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermektedir. Ancak bazı çalışmalar da eNOS gen T-786C polimorfizmi ile YKA arasında anlamlı ilişki bildirilmiştir. Her populasyonun kendine özgü genetik yapısı olduğundan genetik polimorfizm bölgeler arasında farklılık gösterebilir. Bundan dolayı çalışmamızın sonuçları bölgemizdeki populasyonun genetik yapısını yansıttığını düşünmekteyiz. YKA'nın etyopatogenezinden sorumlu genlerin bulunması hastalığın erken tanısında ve tedavisinde yardımcı olacaktır.

## ÖZET

### Yavaş Koroner Akımı Olan Hastalarda Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizmin (T-786C) Araştırılması

**GİRİŞ:** Yavaş koroner akım (YKA), koroner anjiyografide tıkaçıcı lezyon yokluğunda koroner arterlerde opak maddenin gecikmesiyle karakterizedir. Patofizyolojik mekanizmaları belirsizdir. YKA için çeşitli hipotezler sürülmüştür; aterosklerozun erken fazının bir formu, mikrovasküler disfoksiyon, inflamasyon, vazokonstriktör ve vazodilatör faktörler arasındaki dengesizlik ve tromobist fonksiyon bozukluğudur. Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) geni T-786C polimorfizminin birçok damarsal hastalıkla ilişkisi bildirilmiştir.

**AMAÇ:** Bu çalışmanın amacı YKA ile eNOS gen T-786C polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

**METOD:** Koroner arterleri normal ancak YKA olan 40 hasta (ortalama yaş  $52 \pm 9$  yıl), koroner arter hastalığı (KAH) olan 35 hasta (ortalama yaş  $55 \pm 9$  yıl) ve koroner anjiyografisi normal olan 30 hasta (ortalama yaş  $51 \pm 8$  yıl) çalışmaya alındı. Sol ön inen arterde, TIMI kare sayısı 40 ve üzeri olması YKA olarak kabul edildi. eNOS geni T-786C polimorfizimleri polimeraz zincir reaksiyonu ile analiz edildi. Çalışma gruplarının demografik özellikleri ve ateroskleroz için major risk faktörleri değerlendirildi. YKA ve KAH ciddiyeti etkilenen damar sayısına göre değerlendirildi.

**BULGULAR:** Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı fark yoktu. Sigara içme yüzdesi, KAH grubunda diğer gruplardan daha yüksekti. Gruplar arasında genotip dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. YKA grubunda genotip dağılımı; TT genotip sıklığı 25 (%62,5), TC genotip sıklığı 12 (%30) ve CC genotip sıklığı 3'tü (%7,5). KAH grubunda genotip dağılımı; TT genotip sıklığı 16 (%45,7), TC genotip sıklığı 16 (%45,7) ve CC genotip sıklığı 3'tü (%8,5). Kontrol grubunda genotip dağılımı; TT genotip sıklığı 17 (%56,6), TC genotip sıklığı 10 (%33,3) ve CC genotip sıklığı 3'tü (%10). Dominat ve resesif modellerin istatistiksel analizinde gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu.

**SONUÇ:** Bulgularımız eNOS gen T-786C polimorfizmi ile YKA arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Endotelyal nitrik oksit sentaz, polimorfizm, yavaş koroner akım.

## SUMMARY

### **Evaluation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism (T-786 C) in Patients with Slow Coronary Flow**

**BACKGROUND:** Slow coronary flow (SCF) is characterized by delay of opacification of coronary arteries in coronary angiography in the absence of any evident obstructive lesion. Its pathophysiological mechanisms are uncertain. Several hypotheses have been suggested for SCF, including a form of early phase of atherosclerosis, microvascular dysfunction, inflammation, imbalance between vasoconstrictor and vasodilatory factors, and platelet function disorder. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene T-786 C polymorphism have been reported to be associated with many vascular disease.

**OBJECTIVE:** The aim of this study was to investigate the association between SCF and eNOS gene T-786 C polymorphism.

**METHODS:** Forty patients with SCF and otherwise normal coronary arteries (mean age 52±9 years), 35 patients with coronary artery disease (CAD) (mean age 55±9 years) and 30 patients with normal coronary angiograms (mean age 51±8 years) were included in the study. TIMI frame count  $\geq 40$  frames for the left anterior descending artery was considered as SCF. T-786 C polymorphisms of the eNOS gene were analysed by polymerase chain reaction. Demographic characteristics and major risk factors for atherosclerosis were evaluated in the study groups. The severity of SCF and CAD was assessed based on the number of involved vessel.

**RESULTS:** There was no significant difference with respect to age and gender between groups. The percentage of smoking was higher in the CAD group than in the SCF and control groups. There was no statistical difference in genotype distribution among the groups. The genotype distribution in SCF group was as follows: TT genotype frequency was 25 (62,5%), TC genotype frequency was 12 (30%) and CC genotype frequency was 3 (7,5%). The genotype distribution in CAD group was as follows: TT genotype frequency was 16 (45,7%), TC genotype frequency was 16 (45,7%) and CC genotype frequency was 3 (8,5%). The genotype distribution in control group was as follows: TT genotype frequency was 17 (56,6%), TC genotype frequency was 10 (33,3%) and CC genotype frequency was 3 (10%). In the dominant and recessive models of statistical analysis, there was no statistically significant difference among groups.

**CONCLUSIONS:** Our findings show that there is no significant association between T-786 C polymorphism of eNOS gene and SCF in the present study.

**Keywords:** Endothelial nitric oxide synthase, polymorphism, slow coronary flow

## KAYNAKLAR

1. Tambe AA, Demany MA, Zimmerman HA, Mascarenhas E. Angina pectoris and slow flow velocity of dye in coronary arteries--a new angiographic finding. *Am Heart J*. 1972 Jul;84(1):66-71.
2. Gupta MP, Zoneraich S, Zeitlin W, Zoneraich O, D'Angelo W. Scleroderma heart disease with slow flow velocity in coronary arteries. *Chest*. 1975 Jan;67(1):116-9.
3. Wang X, Geng LL, Nie SP. Coronary slow flow phenomenon: a local or systemic disease? *Med Hypotheses*. 2010 Sep;75(3):334-7.
4. Fineschi M, Gori T. Coronary slow-flow phenomenon or syndrome Y: a microvascular angina awaiting recognition. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Jul 13;56(3):239-40; author reply 40.
5. Burckhardt BA, Mukerji V, Alpert MA. Coronary artery slow flow associated with angina pectoris and hypotension--a case report. *Angiology*. 1998 Jun;49(6):483-7.
6. Sezgin N, Barutcu I, Sezgin AT, Gullu H, Turkmen M, Esen AM, et al. Plasma nitric oxide level and its role in slow coronary flow phenomenon. *Int Heart J*. 2005 May;46(3):373-82.
7. Mangieri E, Macchiarelli G, Ciavolella M, Barilla F, Avella A, Martinotti A, et al. Slow coronary flow: clinical and histopathological features in patients with otherwise normal epicardial coronary arteries. *Cathet Cardiovasc Diagn*. 1996 Apr;37(4):375-81.
8. Pekdemir H, Cin VG, Cicek D, Camsari A, Akkus N, Doven O, et al. Slow coronary flow may be a sign of diffuse atherosclerosis. Contribution of FFR and IVUS. *Acta Cardiol*. 2004 Apr;59(2):127-33.
9. Li JJ, Qin XW, Li ZC, Zeng HS, Gao Z, Xu B, et al. Increased plasma C-reactive protein and interleukin-6 concentrations in patients with slow coronary flow. *Clin Chim Acta*. 2007 Oct;385(1-2):43-7.
10. Li JJ, Xu B, Li ZC, Qian J, Wei BQ. Is slow coronary flow associated with inflammation? *Med Hypotheses*. 2006;66(3):504-8.
11. Camsarl A, Pekdemir H, Cicek D, Polat G, Akkus MN, Doven O, et al. Endothelin-1 and nitric oxide concentrations and their response to exercise in patients with slow coronary flow. *Circ J*. 2003 Dec;67(12):1022-8.
12. Varol E, Yücel H, Özaydın M, Doğan A, Erdoğan D. Trombosit Hacmi Yavaş Koroner Akımlı Hastalarda Artmıştır. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci* 2010;22(3):279-83.
13. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med*. 2000 Apr;28(4 Suppl):N37-52.
14. Onder MR, Barutcuoglu B, editors. *Endotel*. 2 ed. Istanbul 2007.
15. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*. 1997 Dec;22(12):477-81.
16. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993 Aug 15;268(23):17478-88.
17. Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci*. 2001 Jul;22(7):361-8.



18. Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G, Pedon L, et al. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Mar 19;41(6):930-7.
19. Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS, Draz HM, Hussain T. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (894G > T and -786T > C) and risk of coronary artery disease in a Saudi population. *Arch Med Res*. 2010 Feb;41(2):134-41.
20. Han Y, Xu W, Zhang W, Liu N, Ji Y. T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Pharmacology*. 2010;85(4):211-6.
21. Motawi T, Shaker O, Taha M, Sedrak H, Nabil M. Endothelial Nitric Oxide Synthase and Angiotensinogen Gene Polymorphism in Coronary Artery Diseases in Egypt. *Angiology*. 2010 Jun 13.
22. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation*. 2001 Jul 24;104(4):448-54.
23. Caglayan AO, Kalay N, Saatci C, Yalcyn A, Akalyn H, Dundar M. Lack of association between the Glu298Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase and slow coronary flow in the Turkish population. *Can J Cardiol*. 2009 Mar;25(3):e69-72.
24. Nurkalem Z, Tangurek B, Zencirci E, Alper AT, Aksu H, Erer B, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene (T-786C) polymorphism in patients with slow coronary flow. *Coron Artery Dis*. 2008 Mar;19(2):85-8.
25. Bassenge E, Heusch G. Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1990;116:77-165.
26. Hanley FL, Messina LM, Grattan MT, Hoffman IE. The effect of coronary inflow pressure on coronary vascular resistance in the isolated dog heart. *Circ Res*. 1984 Jun;54(6):760-72.
27. Bevan JA. Vascular myogenic or stretch-dependent tone. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1985;7 Suppl 3:S129-36.
28. Franco-Cereceda A, Bengtsson L, Lundberg JM. Inotropic effects of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin on the human right atrium in vitro. *Eur J Pharmacol*. 1987 Jan 28;134(1):69-76.
29. Bache RJ, Dymek DJ. Local and regional regulation of coronary vascular tone. *Prog Cardiovasc Dis*. 1981 Nov-Dec;24(3):191-212.
30. Stiles GL, Lefkowitz RJ. Cardiac adrenergic receptors. *Annu Rev Med*. 1984;35:149-64.
31. Armour J, editor. Anatomy and function of intrathoracic neurons regulating the mammalian heart. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The Heart and Cardiovascular System*. 2d ed. New York: Raven; 1991.
32. O'Rourke S, Vanhoutte P. Vascular Pharmacology. In: Loscalzo J, Creager MA, Dzau VJ, eds. *Vascular Medicine: A Textbook of Vascular Biology and Diseases*. Boston: Little, Brown. 1992;133-135.

33. Rose C, Goresky C. Interactions between capillary exchange, cellular entry, and metabolic sequestration processes in the heart. In: Renkin EM, Michel CC, eds. *Handbook of Physiology*, sec: The Cardiovascular System, vol IV: Microcirculation, part 2 Bethesda, MD: American Physiological Society.29: 293-323.
34. Yokoyoma M, Goldman M, Henry P. Supersensitivity of atherosclerotic arteries to ergonovine is partially mediated by serotonergic mechanism(abs). *Circulation*. 197;60(suppl 2): 100.
35. Yause H, Horio Y, Nakamura N, Fujii H, Imoto N, Sonoda R, et al. Induction of coronary artery spasm by acetylcholine in patient with variant angina: Possible role of the parasympathetic nerve system in the pathogenesis of coronary artery spasm. *Circulation*. 1986;74:955–963.
36. Nakatani S, Yamagishi M, Tamai J, Goto Y, Umeno T, Kawaguchi A, et al. Assessment of coronary artery distensibility by intravascular ultrasound. Application of simultaneous measurements of luminal area and pressure. *Circulation*. 1995 Jun 15;91(12):2904-10.
37. Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, Ziada KM, Hobbs RE, McCarthy PM, et al. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation*. 2001 Jun 5;103(22):2705-10.
38. Beltrame JF, Limaye SB, Wuttke RD, Horowitz JD. Coronary hemodynamic and metabolic studies of the coronary slow flow phenomenon. *Am Heart J*. 2003 Jul;146(1):84-90.
39. Yaymaci B, Dagdelen S, Bozbuga N, Demirkol O, Say B, Guzelmeric F, et al. The response of the myocardial metabolism to atrial pacing in patients with coronary slow flow. *Int J Cardiol*. 2001 Apr;78(2):151-6.
40. Erdogan D, Caliskan M, Gullu H, Sezgin AT, Yildirim A, Muderrisoglu H. Coronary flow reserve is impaired in patients with slow coronary flow. *Atherosclerosis*. 2007 Mar;191(1):168-74.
41. Papadakis MC, Manginas A, Cotileas P, Demopoulos V, Voudris V, Pavlides G, et al. Documentation of slow coronary flow by the TIMI frame count in patients with coronary ectasia. *Am J Cardiol*. 2001 Nov 1;88(9):1030-2.
42. Pekdemir H, Polat G, Cin VG, Camsari A, Cicek D, Akkus MN, et al. Elevated plasma endothelin-1 levels in coronary sinus during rapid right atrial pacing in patients with slow coronary flow. *Int J Cardiol*. 2004 Oct;97(1):35-41.
43. Riza Erbay A, Turhan H, Yasar AS, Ayaz S, Sahin O, Senen K, et al. Elevated level of plasma homocysteine in patients with slow coronary flow. *Int J Cardiol*. 2005 Jul 20;102(3):419-23.
44. Selcuk MT, Selcuk H, Temizhan A, Maden O, Ulupinar H, Baysal E, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations and L-arginine/asymmetric dimethylarginine ratio in patients with slow coronary flow. *Coron Artery Dis*. 2007 Nov;18(7):545-51.
45. Celik T, Yuksel UC, Bugan B, Iyisoy A, Celik M, Demirkol S, et al. Increased platelet activation in patients with slow coronary flow. *J Thromb Thrombolysis*. 2010 Apr;29(3):310-5.
46. Yazici M, Demircan S, Aksakal E, Sahin M, Meric M, Dursun I, et al. [Plasma insulin, glucose and lipid levels, and their relations with corrected TIMI frame count in patients with slow coronary flow]. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2003 Sep;3(3):222-6.

47. Cutri N, Zeitz C, Kucia AM, Beltrame JF. ST/T wave changes during acute coronary syndrome presentation in patients with the coronary slow flow phenomenon. *Int J Cardiol.* 2010 Nov 30.
48. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial. Phase I findings. TIMI Study Group. *N Engl J Med.* 1985 Apr 4;312(14):932-6.
49. Cannon CP, McCabe CH, Diver DJ, Herson S, Greene RM, Shah PK, et al. Comparison of front-loaded recombinant tissue-type plasminogen activator, anistreplase and combination thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 4 trial. *J Am Coll Cardiol.* 1994 Dec;24(7):1602-10.
50. Gibson CM, Cannon CP, Daley WL, Dodge JT, Jr., Alexander B, Jr., Marble SJ, et al. TIMI frame count: a quantitative method of assessing coronary artery flow. *Circulation.* 1996 Mar 1;93(5):879-88.
51. Kurtoglu N, Akcay A, Dindar I. Usefulness of oral dipyridamole therapy for angiographic slow coronary artery flow. *Am J Cardiol.* 2001 Mar 15;87(6):777-9, A8.
52. Beltrame JF, Turner SP, Leslie SL, Solomon P, Freedman SB, Horowitz JD. The angiographic and clinical benefits of mibefradil in the coronary slow flow phenomenon. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jul 7;44(1):57-62.
53. Chang SF, Ma JY, Qian JY, Shu XH, Ge JB. [Effects of intracoronary administration of nitroglycerin and verapamil for treatment of coronary slow flow phenomenon]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2010 Jan;38(1):27-30.
54. Fan Y, Yang SS, Yu JB, Hao JH, Han W, Gan RT, et al. [Atrovastatin use and coronary flow reserve in patients with coronary slow flow]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2010 Feb;38(2):143-6.
55. Albayrak S, Ordu S, Yuksel H, Ozhan H, Yazgan O, Yazici M. Efficacy of nebivolol on flow-mediated dilation in patients with slow coronary flow. *Int Heart J.* 2009 Sep;50(5):545-53.
56. Barbato JE, Tzeng E. Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg.* 2004 Jul;40(1):187-93.
57. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev.* 1998 Mar;17(1):7-23.
58. Sessa WC. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Mar;100 Suppl 1:15-8.
59. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger. *Annals of Internal Medicine.* [Article]. 1994;120(3):227-37.
60. Rejdak K, Petzold A, Sharpe MA, Smith M, Keir G, Stelmasiak Z, et al. Serum and urine nitrate and nitrite are not reliable indicators of intrathecal nitric oxide production in acute brain injury. *J Neurol Sci.* 2003 Apr 15;208(1-2):1-7.
61. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 1989 Jun 1;38(11):1709-15.
62. Marin J, Rodriguez-Martinez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther.* 1997 Aug;75(2):111-34.
63. Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 1999 Aug 15;43(3):580-94.

64. Calver A, Collier J, Vallance P. Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp Physiol*. 1993 May;78(3):303-26.
65. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*. 1994 May 14;343(8907):1199-206.
66. Busse R, Fleming I, Schini VB. Nitric oxide formation in the vascular wall: regulation and functional implications. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;196:7-18.
67. 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):226-35.
68. Ghosh DK, Stuehr DJ. Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry*. 1995 Jan 24;34(3):801-7.
69. Knudsen GM, Nishida CR, Mooney SD, Ortiz de Montellano PR. Nitric-oxide synthase (NOS) reductase domain models suggest a new control element in endothelial NOS that attenuates calmodulin-dependent activity. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22;278(34):31814-24.
70. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2000(20):107-11.
71. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*. 2003 Jan;199(1):8-17.
72. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III27-32.
73. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*. 2002 Nov 21;90(10C):40L-8L.
74. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001 Mar 6;103(9):1282-8.
75. Oraler G. I. Temel Genetik.8. Basım. İÜ Fen Fakültesi, İstanbul. 1990;215(51-52):248-9.
76. Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö. Renkli Genetik Atlası ISBN; 975-420-035-1. 1995:156-9.
77. Passarge E. Renkli Genetik Atlası, Yüce Yayıncılık ve Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, 2000.
78. Basaran N. Tıbbi Genetik,7. Baskı,Günes ve Nobel Kitabevi. Bursa, 1999.
79. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999 Jun 8;99(22):2864-70.
80. Hyndman ME, Parsons HG, Verma S, Bridge PJ, Edworthy S, Jones C, et al. The T-786-->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension*. 2002 Apr;39(4):919-22.
81. Matsuka Y, Wang DH, Sukanuma N, Imai K, Ikeda S, Taketa K, et al. Differential responses of serum gamma-glutamyltransferase to alcohol intake in Japanese males. *Acta Med Okayama*. 2003 Aug;57(4):171-8.

82. Peter GK, Ian DC, William HD. *Clinical Obesity in Adults and Children*. third ed. Singapore 2010:3-14.
83. Rossi GP, Maiolino G, Zanchetta M, Sticchi D, Pedon L, Cesari M, et al. The T(-786)C endothelial nitric oxide synthase genotype predicts cardiovascular mortality in high-risk patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Sep 19;48(6):1166-74.
84. Tajouri L, Martin V, Ovcaric M, Curtain RP, Lea RA, Csurhes P, et al. Investigation of an inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) polymorphism in a multiple sclerosis population. *Brain Res Bull*. 2004 Jul 30;64(1):9-13.
85. Beltrame JF, Limaye SB, Horowitz JD. The coronary slow flow phenomenon--a new coronary microvascular disorder. *Cardiology*. 2002;97(4):197-202.
86. Selcuk H, Selcuk MT, Temizhan A, Maden O, Saydam GS, Ulupinar H, et al. Decreased plasma concentrations of adiponectin in patients with slow coronary flow. *Heart Vessels*. 2009 Jan;24(1):1-7.
87. Monti LD, Barlassina C, Citterio L, Galluccio E, Berzuini C, Setola E, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 2003 May;52(5):1270-5.
88. Ohtoshi K, Yamasaki Y, Gorogawa S, Hayaishi-Okano R, Node K, Matsuhisa M, et al. Association of (-)786T-C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene with insulin resistance. *Diabetologia*. 2002 Nov;45(11):1594-601.
89. Hirata RD, Salaza LA, Cavalli SA, Yoshioka KK, Matsumoto LO, Santos ST, et al. A method to detect the G894T polymorphism of the NOS3 gene. Clinical validation in familial hypercholesterolemia. *Clin Chem Lab Med*. 2002 May;40(5):436-40.
90. Mathew J, Narayanan P, Sundaram R, Jayaraman B, Dutta TK, Raman SK, et al. Lack of association between Glu(298) asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene and coronary artery disease in Tamilian population. *Indian Heart J*. 2008 May-Jun;60(3):223-7.
91. Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Vallance P, et al. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension*. 2001 Nov;38(5):1054-61.
92. Jaramillo PC, Lanasa C, Lanasa F, Salazar LA. -786T>C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in Chilean subjects with coronary artery disease and controls. *Clin Chim Acta*. 2008 Jan;387(1-2):105-8.
93. Alp E, Menevse S, Tulmac M, Kan D, Yalcin R, Erkan AF, et al. Lack of association between matrix metalloproteinase-9 and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in Turkish population. *DNA Cell Biol*. 2009 Jul;28(7):343-50.
94. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation*. 2004 Mar 23;109(11):1359-65.
95. Suzuki T, Okumura K, Sone T, Kosokabe T, Tsuboi H, Kondo J, et al. The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis. *Int J Cardiol*. 2002 Nov;86(1):71-6.
96. Gulec S, Karabulut H, Ozdemir AO, Ozdol C, Turhan S, Altin T, et al. Glu298Asp polymorphism of the eNOS gene is associated with coronary collateral development. *Atherosclerosis*. 2008 Jun;198(2):354-9.

97. Tangurek B, Ozer N, Sayar N, Terzi S, Yilmaz H, Dayi SU, et al. The relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786 C) and coronary artery disease in the Turkish population. *Heart Vessels*. 2006 Sep;21(5):285-90.
98. Cam SF, Sekuri C, Tengiz I, Ercan E, Sagcan A, Akin M, et al. The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population. *Thromb Res*. 2005;116(4):287-92.
99. Gluba A, Banach M, Rysz J, Piotrowski G, Fendler W, Pietrucha T. Is polymorphism within eNOS gene associated with the late onset of myocardial infarction? A pilot study. *Angiology*. 2009 Oct-Nov;60(5):588-95.
100. Popova LV, Nikolaev K, Nikolaeva AA, Voronina EN. [The features of myocardial infarction clinical course at gene of endothelial NO-synthase polymorphisms]. *Klin Med (Mosk)*. 2008;86(4):32-5.
101. Andrikopoulos GK, Grammatopoulos DK, Tzeis SE, Zervou SI, Richter DJ, Zairis MN, et al. Association of the 894G>T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with risk of acute myocardial infarction. *BMC Med Genet*. 2008;9:43.
102. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*. 1998 Sep;32(3):521-6.
103. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Jun;31(7):1506-10.
104. Antoniadis C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Pitsavos C, Chrysochoou C, Panagiotakos D, et al. Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Sep 20;46(6):1101-9.
105. Morray B, Goldenberg I, Moss AJ, Zareba W, Ryan D, McNitt S, et al. Polymorphisms in the paraoxonase and endothelial nitric oxide synthase genes and the risk of early-onset myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2007 Apr 15;99(8):1100-5.
106. Ciftci C, Melil S, Cebi Y, Ersoz M, Cagatay P, Kilicgedik M, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease. *Lipids Health Dis*. 2008;7:5.