

T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**İZOLE KORONER ARTER EKTAZİ HASTALARINDA
ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ GEN
POLİMORFİZMİNİN (T-786 C) ARAŞTIRILMASI**

Dr. Atilla İÇLİ

UZMANLIK TEZİ

KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahmet ALTINBAŞ

ISPARTA - 2011

ÖNSÖZ

Tezimin tüm aşamalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Altınbaş'a, ihtisas sürem boyunca bana emeği geçen Prof. Dr. Abdullah Doğan'a, Prof. Dr. Mehmet Özaydın'a Doç. Dr. Doğan Erdoğan'a, Yrd. Doç. Dr. Süleyman Murat Aslan'a, Doç. Dr. Ercan Varol'a ve Kardiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm asistan arkadaşlarım ile tüm anabilim dalı çalışanlarına teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı olan Doç. Dr. Recep Sütçü'ye, Prof. Dr. Namık Delibaş'a ve biyokimya teknisyeni Aziz Özdemir'e teşekkür ederim. Ayrıca sevgi ve hoşgörleriyle her zaman yanımda olan aileme, eşim ve çocuklarıma tüm içtenliğim ve sevgilerimle teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Atilla İÇLİ
ISPARTA - 2011

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİN	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Koroner Arter Ektazisi	4
2.1.1. Tanım	4
2.1.2. Epidemiyoloji.....	4
2.1.3. Etiyoloji.....	5
2.1.4. Koroner Arter Ektazisinin Sınıflandırılması ve Şiddeti	7
2.1.5. Koroner Arter Ektazi Patofizyolojisi ve Histopatolojik Bulgular.....	8
2.1.6. Koroner Arter Ektazisinin Anjiyografik Özellikleri	11
2.1.7. Koroner Ektazili Hastalarda Semptomlar, Tedavi ve Prognoz	12
2.2. Nitrik Oksit	14
2.2.1. Tanımı ve Tarihçesi.....	14
2.2.2. Nitrik Oksidin Yapısı ve Özellikleri	15
2.2.3. Nitrik Oksit Sentaz (NOS)	15
2.2.4. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Enzimi	18
2.2.5. Nitrik Oksidin Kardiyovasküler Sisteme Özgü Etkileri	18
2.3. Kalıtım Modelleri ve Genetik Polimorfizm	21
2.3.1. Tanım	21
2.3.2. Fenotip ve Genotip.....	21
2.3.3. Alel.....	22
2.3.4. Dominans İlişkileri.....	22
2.3.5. Dominantlık ve Resesifliğin Moleküler Anlamı	23
2.3.6. Genetik Polimorfizm.....	23
2.4. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Geni Polimorfik Özellikleri	24
2.4.1. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen İntron Bölge Varyasyonları	26

2.4.2. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen Promotor Bölge Polimorfizimleri...	27
2.4.3. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Geni Ekson 7 Tek Nükleotid Polimorfizimleri	27
2.4.4. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizminin Kardiyovasküler Hastalıklardaki Rolü.....	27
3. MATERYAL ve METOD	32
3.1. Çalışmanın Yapıldığı Yer	32
3.2. Çalışmaya Alınan Olguların Seçimi.....	32
3.3. Çalışmadan Dışlama Kriterleri.....	32
3.4. Çalışmanın Dizaynı.....	33
3.5. Koroner Anjiyografi İşlemi.....	33
3.6. Biyokimyasal Analizler.....	34
3.7. Moleküler Analiz	34
3.7.1. Deoksiribonükleik Asit İzolasyonu.....	34
3.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Yapılışı	35
3.7.3. Agaroz Jel Elektroforeziyle PCR Kontrolü	35
3.7.4. Revers İn situ Hibridizasyon Yöntemi.....	36
3.7.5. Promotor Bölge eNOS T-786C Polimorfizminin Analizi.....	36
3.8. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR	37
4.1. Hastaların Klinik Özellikleri	37
4.2. Koroner Arter Ektazi Hastalarının Anjiyografik Özellikleri	38
4.3. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen T-876C Polimorfizm Genotipleri.....	39
4.4. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen T-876C Polimorfizm Alel Frekansları ..	42
4.5. Tek Damar ve Çok Damar Tutulumunda Mutasyon Seviyeleri.....	43
4.6. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz T-786C Mutasyonu ve Kardiyovasküler Risk Faktörleri.....	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ.....	51
ÖZET.....	52
SUMMARY	53
KAYNAKLAR	54

SİMGELER ve KISALTMALAR

KAE	: Koroner arter ektazisi
KAH	: Koroner arter hastalığı
NO	: Nitrik oksid
Mİ	: Miyokard enfarktüsü
SAP	: Stabil angina pectoris
LM	: Left main coronary artery
LAD	: Left anterior desenden coronary artery
RCA	: Right coronary artery
Cx	: Circumflex coronary artery
TIMI	: Trombolysis in Myocardial Infarction
MBG	: Myokardiyal blush grade
HT	: Hipertansiyon
DM	: Diabetes mellitus
CRP	: C reaktif protein
Ach	: Asetilkolin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
mRNA	: Mesenger Ribonükleik asit
Ala	: Alanin
Thr	: Treonin
Asp	: Aspartat
Glu	: Glutamat
Cys	: Sistein
T	: Timin
C	: Sitozin
G	: Guanin
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
VNTR	: Variable Number of Tandem Repeat / Değişken Ardışık Tekrarlar
SSCP	: Single Stranded Conformational Polimorfizm/Tek İplikçik Yapısal Çeşitlilik

MMP	: Matrix metalloproteinaz
EDRF	: Endotel bağımlı gevşetici faktör
NOS	: Nitrik oksit sentaz
eNOS	: Endotelyal NOS
cNOS	: Yapısal NOS
iNOS	: İndüklenebilir NOS
NO₂⁻	: Nitrit
NO₃⁻	: Nitrat
L-NMMA	: N monometil arginin
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FMN	: Flavin mononükleotid
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
ACE	: Anjiotensin dönüştürücü enzim
BH4	: Tetrahidrobiyopiterin
ATP	: Adenozin trifosfat
Na	: Sodyum
K	: Potasyum
ICAM	: İntersellüler adezyon molekülü
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VCAM	: Vasküler hücre adezyon molekülü
NADPH	: Nikotinamid dinükleotid fosfat
MCP	: Monosit kemoatraktan protein
İL	: İnterlökin
EDTA	: Etilenediaminetetraasetik asit

TABLolar DİZİN

Tablo 1. Koroner ektazi sınıflaması	8
Tablo 2. Hastaların demografik özellikleri	38
Tablo 3. Grubların hiperlipidemi özellikleri	38
Tablo 4. KAE hastalarının anjiyografik karakteristikleri.....	39
Tablo 5. Ektatik segment dağılımı	39
Tablo 6. eNOS geni T-876C polimorfizminin genotip frekansları	40
Tablo 7. KAE, KAH ve normal koroner (kontrol) grubların dominant ve resesif modele göre genotip dağılımları	41
Tablo 8. eNOS geni T-876C polimorfizminin allel frekansları	42
Tablo 9. Tek damar ve çok damar tutulumunda mutasyon varlığı	43
Tablo 10. eNOS T-786 C mutasyonu ve kardiyovasküler risk faktörleri	44
Tablo 11. Mutasyon (CC+TC ile TT (dominant model)) varlığı ile ilişkili bağımsız risk faktörlerinin belirlenmesi için uygulanan çok değişkenli lojistik regresyon analizi sonuçları	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. eNOS geninin kromozomal yerleşimi.....	24
Şekil 2. eNOS geni ve çalışılan polimorfizm bölgeleri.....	26

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Koroner arter ektazisi (KAE), koroner arterlerin anormal dilatasyonu ile karakterize olan ve koroner arter hastalığı (KAH) varyantı olarak kabul edilen bir hastalıktır (1,2). Anjiyografik olarak epikardiyal koroner arterlerde normal koroner arter çapına oranla 1,5-2 kat arasındaki genişleme KAE, iki kattan daha fazla genişleme de koroner arter anevrizması olarak tanımlanmaktadır (3,4).

Koroner arter ektazilerin anjiyografik olarak sıklığı % 0,3–9,9 arasında olup giderek artan oranlarda bildirilmektedir. Anjiyografik olarak 20087 hastanın değerlendirildiği “Coronary Artery Surgery Study” (CASS) çalışmasında KAE sıklığı % 4,9 olarak tespit edilmiştir (5,6). Merkezimizde ise bu oran % 9,9 olarak saptanmıştır (7).

Koroner arter ektazi etyopatogenezinin büyük oranda ateroskleroz sorumlu tutulmaktadır (3,8). Aterosklerotik koroner arterlerde özellikle plak kümelenmesinin olduğu erken evrede plak rüptürü ve plak yükünde artmaya bağlı olarak damarda genişleyici biçimde yeniden şekillenme olduğu bilinmektedir. KAE oluşumu henüz tam bir kesinlik kazanmamakla birlikte ateroskleroza farklı biçimde gelişen genişleyici bir yeniden şekillenmenin yanıtı olarak değerlendirilmektedir (9-11). Ayrıca etyopatogenezinde kesin olarak açıklanmamış birçok nokta vardır (11). KAE izole olabilmekle birlikte aterosklerotik KAH ile anlamlı birliktelik göstermektedir (5, 12). KAH ve KAE patogenezinde ortak mekanizmalar olup birçok histopatolojik özellikleri benzerdir (11). KAE histopatolojisinde media takakasının enzimatik yıkımı anahtar rol oynamaktadır (11). KAE’inde media ve adventisya tabakasında yaygın kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile sitokinlerde, matriks metalloproteinaz (MMP) aktivasyonunda ve plak inflamasyonunda artma tespit edilmiştir (11, 13-15).

Koroner arter ektazi etyolojisinden sorumlu diğer faktörler arasında konjenital koroner anomaliler (%20–30), inflamatuvar hastalıklar (%10–20) ve konnektif doku hastalıkları (%10–20) literatürde bildirilmiştir (16). Ek olarak bakteriyel ve mikotik enfeksiyonlar, herbisit, nitrit ürünlerine maruz kalma ve travma da yer almaktadır (17, 18). Tarımda kullanılan herbisitlere uzun süreli maruz kalınması asetilkolin (Ach) konsantrasyonunu artırarak nitrik oksit (NO) üzerinden

vasküler düz kaslarda relaksasyona neden olmaktadır. Fakat herbisit maruziyetine bağlı ortaya çıkan düz kas relaksasyonunun KAE'ye neden olup olmadığı açık değildir (17).

Nitrik oksit endotel fonksiyonun kritik bir belirteçidir. NO ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimi damar duvarında yapısal ve fonksiyonel önemli rol oynamaktadır. NO vasküler endotelde eNOS enzimi tarafından L-argininden sentezlenen vazoaktif bir madde olup vasküler düz kas gevşetici etkisi ile endotel bağımlı vazodilatasyonun ana mediyatörüdür (19). NO'nun vasküler dokuda anjiogenez, proliferasyon, yeniden yapılanma ve enflamatuvar olaylarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (20-24).

Nitrik oksit bahsedilen bu özellikleri ile kan damarlarını endojen hasarlardan koruyucu özellikleri olup bunların dışında nörotransmitter, immunomodülatör ve yabancı maddelere karşı sitotoksik etkiler de göstermektedir (25). Endotelial NO'nun aterogenezin hem erken hemde geç evrelerini etkileyebilen güçlü bir antiinflamatuvar ajan olduğu ve ateroskleroza karşı koruyucu rol oynadığı tespit edilmiştir (26). Yapılan çalışmalarda; NO ve eNOS defektlerinde endotelial fonksiyon bozukluğu ile ateroskleroz sürecinin başladığı ve komplike olduğu saptanmıştır. Ayrıca damar duvarında yapısal, morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerinde geliştiği bildirilmiştir.(19, 21, 27-31) Deneysel modellerde eNOS'un damar duvarı geometrisinin kontrolünde rol oynadığı, eNOS eksikliğinde lümen remodelliginin bozulduğu ve damar duvarı kalınlığının arttığı gösterilmiştir (21, 32).

Nitrik oksit ve eNOS enzimi kromozom 7q35-36'da lokalize eNOS geni tarafından düzenlenmektedir (33). eNOS geninde meydana gelebilecek bir varyasyonun NOS enziminde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açabileceği ve bu durumda da çeşitli hastalıklara yatkınlık oluşabileceği bilinmektedir (34).

Deoksiribonükleik asit (DNA)'deki eNOS geni varyasyonları ile vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Abdominal aort anevrizması (28), koroner arter spazmı (35), KAH ve yaygınlığı (36, 37), miyokard infarktüsü (38), hipertansiyon (39), inme ve renal hastalıklar gibi pek çok vasküler bozukluk (40) eNOS gen polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur.

Endotelden düzenli olarak salınan NO'nun düzenli bir vazodilatasyon sağlayarak vasküler yatakta koruyucu etki gösterdiği iddia edilmektedir (33). Düzensiz salınan NO'nun damar duvarında zayıflıklara ve hasara neden olarak anevrizma gelişimine yol açtığı düşünülmektedir (33). NO sentezinin düzensizliği, ekstrasellüler matriksin önemli bir yapıtaşı olan elastin proteini etkilemek sureti ile damar duvarının zayıflamasına neden olduğu da bildirilmiştir (40).

Şu ana kadar ki bilgilerimiz ışığında, eNOS gen polimorfizmi ile KAE arasında bir ilişki araştırılmamıştır. KAE patogenezinde rol oynayan endotel disfonksiyonu, hızlanmış ateroskleroz, ekstrasellüler matriks yıkımı gibi tanımlanmış birçok olayda NO ve eNOS önemli fonksiyon görmektedir. Bütün bu faktörler düşünüldüğünde KAE patofizyolojisinde NO ve eNOS fonksiyonlarında değişikliklere neden olabilen eNOS gen polimorfizminin rol oynayabileceği hipotezi düşünülebilir. Bu çalışmada KAE ile T-786C eNOS gen polimorfizmi arasındaki ilişki araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koroner Arter Ektazisi

2.1.1. Tanım

Koroner arter ektazisi; koroner arterlerin anormal dilatasyonu ile karakterize olup aterosklerotik KAH varyantı olarak kabul edilmektedir (2, 41). Anjiyografik olarak koroner arterin bir bölümünün komşu normal koroner arter çapına göre tıkaçıcı lezyon olmaksızın 1,5-2 kat arasındaki genişlemesi KAE, iki kattan daha fazla genişlemesi ise koroner arter anevrizması olarak tanımlanmaktadır (42). KAE'si ise literatürde ilk olarak 1929'da Packard ve Wechsler tarafından rapor edilmiştir (43). KAE'si büyük oranda aterosklerotik KAH'na eşlik edebilmekle birlikte izole olarakta görülebilmektedir (12).

2.1.2. Epidemiyoloji

Koroner arter ektazilerin anjiyografik sıklığı değişik serilerde %0,3 ile %9,9 arasında olup giderek artan oranlarda bildirilmektedir. KAE insidansının farklı oranlarda bildirilmesinin tanı kriterleri farklılığından ve farklı ölçümler kullanılmasından kaynaklanmaktadır (5, 6, 44, 45). Koroner arter ektazi ile ilgili çalışmaların en büyüğü olan CASS çalışmasında 20087 hastanın 978'inde (%4,9) KAE saptanmıştır (5, 46). Merkezimizde de KAE sıklığı % 9,9 tespit edilmiştir. Bu çalışmada KAE saptanan hastaların cinsiyet bakımından %53'i erkek saptanmıştır (7). KAE insidansı; 4993 koroner anjiyografinin yapıldığı geniş kapsamlı bir çalışmada %1,4 olarak bildirilmiştir. RCA (sağ koroner arter) %40 oranında en sık tutulan damar olup bunu %34 tutulum ile CX (sirkumfleks koroner arter) oranı %29 tutulum ile LAD (sol ön inen arter) takip etmiştir (42). Daoud ve arkadaşları (47) yaptıkları başka bir çalışmada lokalize diskret ektazilerin daha sıklıkla LAD'yi tuttuğu ve arterlerin proksimal kısımlarının en çok etkilendiği gösterilmiştir.

Koroner arter ektazisine büyük oranda stenotik KAH eşlik eder. İzole KAE nadirdir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada tanısal amaçlı 3815 koroner anjiyografide izole KAE sıklığı %1,08 olarak saptanmıştır (48). Merkezimizde yapılan bir

çalışmada bu oran %3 olarak saptanmıştır (49). CASS çalışmasında da KAE hastalarının %90,8'inde stenotik KAH tespit edilmiştir (5).

2.1.3. Etiyoloji

Koroner arter ektazisi doğuştan veya edinsel olabilir (50, 51). Yetişkinlerde KAE'nin en sık nedeni aterosklerotik KAH'dır (%50) (5, 16, 42, 50, 52). Yapılan çalışmalarda KAE ile aterosklerotik KAH'nın %90,8 ve %82 gibi çok büyük oranlarda birliktelik gösterdiği saptanmıştır (5, 51). KAH ile olan bu sık birliktelik ve ortak patofizyolojik mekanizmaların olması nedeniyle KAE; KAH'nın farklı bir yansıması olarak değerlendirilmektedir (5, 12, 53, 54).

Koroner arter ektazi etyolojisinden ikinci sıklıkla %20-30 oranında konjenital anomaliler sorumludur (42). Genetik geçiş gösteren Marfan sendromu, nörofibromatozis, polikistik böbrek hastalığı ve hemorajik telenjektaziler de konjenital nedenler arasında sayılabilir (55-59).

Etyolojinin %10-20 kadarında da inflamatuvar ve bağ doku hastalıkları yer almaktadır (3, 4). İnflamatuvar hastalıklar olarak; Kawasaki hastalığı, Takayasu hastalığı, sifiliz ve mikotik hastalıklardan bahsedilebilir (16, 42). Bağ doku hastalıklarından; poliarteritis nodosa (PAN), sistemik skleroderma, sistemik lupus eritematosus (SLE) ve romatoid artrit, Ehler-Danlos sendromu ve Marfan sendromu etyolojik nedenlerdendir (12, 16, 60).

Koroner arter ektazi ve koroner anevrizmaya direksiyonel atektomi, perkütan translüminal koroner anjioplasti, perkütan koroner invaziv girişimler ve travmanın nadiren neden olduğu sayılmaktadır (61).

Koroner arter ektazisi etyolojisinde genetik faktörlerin rolü ile ilgili veriler sınırlıdır. KAE için anjiotensin dönüştürücü enzim-1 (ACE-1) gen delesyon polimorfizminin bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmüştür (62).

Koroner arter hastalığı risk faktörlerinden hiperlipidemi, tütün kullanımı ve hipertansiyon ektazinin eşlik ettiği KAH'larında sık rastlanılan risk faktörleridir. KAE risk faktörlerinin incelendiği bir çalışmada; 197 ailesel hiperkolesterolemisi olan ve 198 ailesel hiperkolesterolemisi olmayan iki grubun karşılaştırılmasında; ailesel hiperkolesterolemisi olan grupta KAE %15, kontrol grubunda %2,5 olarak

saptanmıştır. Aynı çalışmada ektazi saptanan tüm hastalarda LDL/HDL oranı ve LDL değeri yüksek tespit edilmiş ayrıca düşük HDL düzeyi ile ektazi arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur. Bu çalışma, lipoprotein metabolizmasındaki bozukluğun KAE gelişmesinde rolü olabileceğini düşündürmektedir (63).

Koroner arter ektazisinin erkeklerde daha sık görüldüğü belirtilmekle birlikte (5), cinsiyet açısından fark olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (42, 50, 53).

Koroner arter ektazi ile sistemik hipertansiyon arasında bağımsız bir ilişki olduğu ve daha sık gözleendiği bildiren çalışmalar vardır (5, 12, 64). Hipertansiyonun patogeneizde rol oynayabileceğini, medianın aterosklerotik yıkımını hızlandırabileceğini öne sürülmüştür. Bu durumun aksine; hipertansiyon sıklığının kontrol grubuna göre farklı olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (50, 51, 53).

Koroner arter ektazilerinin abdominal ve asendan aort anevrizmaları ile sıklıkla birlikte görülebildikleri saptanmıştır. Abdominal aort anevrizması nedeniyle opere olan hastalarda %26,8 oranında, asenden aort anevrizma operasyonu uygulanan hastaların %25,6 'ında KAE tespit edilmiştir (55, 65, 66). Aortik ve koroner ektazilerin temelinde benzer patogenetik mekanizmaların olduğunu ileri sürülmüştür (55).

Koroner arter ektazi gelişiminde bildirilen bir diğer faktör NO'nun endotel bağımlı gevşetici faktör (EDRF:Endothelium-derived relaxing factor) aracılığı ile kronik aşırı sitimülasyonu sonucu koroner dilatasyona neden olabilmesidir. Diğer bir olasılık da, bu hastalarda genellikle KAH vardır ve ateroskleroz varlığında endotelden uygunsuz NO salınımı olmaktadır. Aterosklerotik damarların Ach'le sitimülasyonu ile paradoksik vazokonstriksiyon görülebilir. Bu NO'e bağlı vazodilatasyon ile endotelin bağımlı vazokonstriksiyon arasındaki ilişkiden kaynaklanmaktadır. NO'in Ach ile stimülasyonu sonucu biyoyararlılığı azalmakta, endotelin dominant hale gelmekte ve vazokonstrüksiyon oluşmaktadır (17, 67).

Uzun süreli herbisidlere maruziyet ile KAE arasında ilişki olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Avusturalya çiftçilerinde bireysel olarak herbisit sprey kullanımı ile KAE arasında ilişki bildirilmiştir (17, 67). Herbisidlerde yaygın olarak kullanılan 2,4-D (dichlorophenoxy acetik acid) ve 2,4,5-T (trichlorophenoxy acetik

acid) Ach esteraz inhibitörüdürler. Bu ajanlarla uzun süreli maruziyet koroner intertisyumda Ach konsantrasyonunu kronik olarak artırmakta olup Ach NO'un potent bir sitimülatörüdür. Herbisidler fokal olarak NO konsantrasyonunu artırabilirler. NO sitimülasyonu guanilat siklaz yoluyla ve endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımıyla vasküler düz kaslarda relaksasyona neden olmaktadır.

2.1.4. Koroner Arter Ektazisinin Sınıflandırılması ve Şiddeti

Koroner arter ektazi sınıflamasında çeşitli tanımlama kullanılmıştır (61). Ektazi; koroner arterdeki yaygınlığına göre fokal ve diffüz olarak tanımlanır (61). Koroner arterin tamamı ektazik ise diffüz, lokalize tutulum ise fokal olarak tanımlanır (61). Morfolojik olarak ise sakküler ektazi transvers çapın, fuziform ektazi ise longitudinal çapın daha büyük olması olarak tanımlanmıştır (68). KAE; koroner arter lümen çapına göre de üçe ayrılır. 5 mm'nin altı küçük ektazi, 5-8 mm arası orta çapta ektazi ve 8 mm'nin üzeri ise dev ektazi olarak tanımlanır (69). Markis ve arkadaşları (12) KAE'yi dört gruba ayırmış olup, tip 1; iki yada üç damarda diffüz ektazi, tip 2; bir damarda diffüz ve başka damarda lokalize ektazi, tip 3; sadece bir damarda diffüz ektazi, tip 4; lokalize yada segmental ektazi olarak tanımlanmıştır.

Tunick ve arkadaşları (70) fusiform genişlemeleri "ektazi" olarak değerlendirmiş, lokal olan sferik veya sakküler genişlemeler için "diskret anevrizma" ifadesini kullanmıştır. RCA'nın proksimal ve orta segmentleri ektazinin en sık görüldüğü yerlerdir (5). Bunu sırasıyla CX ve LAD izler (5). Sol ana koroner arterde (LMCA) ektazi oldukça nadirdir (8). Giannoglou ve arkadaşları (71) 331 ektazili hastada damar tutulum oranları; RCA %44.4, CX %24.8, LAD %24.5 ve LMCA %3.9 olarak tespit edilmiştir.

İlia ve arkadaşları (52) KAE'ni komşu normal koroner segmente olan genişlemelerine göre üç dereceye ayırmışlardır. Birinci derece; komşu normal segmentten 1.2-1.5 kat daha fazla genişleme, ikinci derece; komşu normal segmentten 1.5-2 kat daha fazla genişleme, üçüncü derece; komşu normal segmentten 2 kattan daha fazla genişleme olarak tanımlamışlardır. Tablo 1'de KAE sınıflaması özetlenmiştir.

Tablo 1. Koroner ektazi sınıflaması (11, 12).

Ektazi çapına göre	Küçük : Ektazi çapı 5 mm'den küçük Orta : Ektazi çapı 5-8 mm arasında Dev : Ektazi çapı 8 mm'den büyük
Transvers-longitudinal boyuta göre	Sakküler Fusifform
Damar duvar bütünlüğüne göre	Gerçek; Ektazi tüm damar duvarını içerir Psödoanevrizma; Damar duvar bütünlüğünde bozulma vardır
Topografik sınıflama	Tip 1:İki veya daha fazla damarda diffüz ektazi Tip 2: Bir damarda diffüz ektazi, diğer bir damarda lokalize ektazi Tip 3: Bir damarda diffüz ektazi Tip 4: Bir damarda lokalize ektazi

2.1.5. Koroner Arter Ektazi Patofizyolojisi ve Histopatolojik Bulgular

Koroner arter ektazisi patogenezindeki temel nokta; media tabakasının mükuloelastik elementlerinin destrüksiyonu, kollajen ve elastin birikimi ve sonuçta damar duvarının incelmesidir (55, 72). Media hasarı, intralüminar basıncın azalmış stres toleransında azalmaya neden olarak, progresif dilatasyona ve ektazi gelişimine sebep olmaktadır (12). Aynı zamanda damar duvarının incelmeye ve duvar stresinin artması kısır bir döngü oluşturmaktadır (73). Bu kısır döngü ile ilerleyici genişleme sonucu diffüz ya da lokal ektazi gelişmektedir (73).

Yetişkinlerde altta yatan en sık patoloji aterosklerozdur (3, 8). Aterosklerotik KAH ile anlamlı oranda birlikteliği (5, 51) patofizyolojide ortak mekanizmalar olduğunu ve ektazinin KAH'ın farklı bir yansıması olduğunu düşündürmektedir (11). KAE patofizyolojisine benzer şekilde aterosklerozda da vasküler media tabakasının incelmesi gösterilmiştir (72, 73). KAE'nin patolojik incelemesinde; ateroskleroz bulguları olan; tipik diffüz hiyalinizasyon, lipid depozisyonu, intima ve media hasarı, fokal kalsifikasyon ve fibrozis, kolesterol kristalleri, intramural kanama ve yabancı cisim dev hücresi, düz kasların yerini hiyalinize kollajenin aldığı ve damar çeperinin incelmesi tespit edilmiştir (12, 47, 49, 72)

Glagov ve arkadaşları (9) aterosklerotik plağın insan koroner arter yüzey alanını daraltmaya başladığı alanlarda kompensatuvar genişlemenin de başladığını

belirtmişlerdir. Mekanizması tam olarak ortaya konamamakla birlikte, plak hacmi iç elastik laminanın %40'ına ulaştığında bu kompensatuar genişleme duraklamaktadır Berkoff ve arkadaşları (65) KAE'lerde ilk olarak medianın atrofiye uğradığını ve intimanın ikincil olarak etkilendiğini öne sürmüşlerdir.

Koroner arter ektazisinde intimada elastin ve kollajen fibrillerinin çevresinde immünohistokimyasal olarak LDL'nin temel proteini olan Apolipoprotein B gösterilmiştir (74). Aterogenez oluşumunda önemli rol oynayan Okside LDL'nin elastin, kollajen ve proteoglikanlara bağlandığı gösterilmiştir (74, 75). LDL'nin kollajen ve elastin ile etkileşimi düz kas hücrelerinde ve makrofajlarda endositozisi artırmaktadır (74, 76) kollajen ve elastin fibriller, lipit hidroperoksitler ve diğer reaktif ara ürünler aracılığı ile hasara uğramaktadır (76). Okside LDL'nin makrofajlar ve düz kas hücreleri tarafından yutulmasıyla köpük hücreler matriks proteazlar vasıtasıyla damar duvarı bağ dokusunun zayıfladığı tespit edilmiştir (77).

Makrofajlar kollajenaz aktivitede dahil bir çok proteazı inflamatuvar yanıtın bir parçası olarak düzenler. Makrofajlar modifiye edilmiş LDL'nin endositozuna yanıt olarak elastaz salgırlar (78, 79). Endotelial hücreler tarafından salgılanan trombosit aktive edici faktörde elastaz salınmasını uyararak endotelial hasara katkıda bulunur (80). Koroner arter duvarının bağ dokusunun özellikle proteaz aktivite ile zayıflaması pozitif koroner yeniden biçimlenmeye neden olmaktadır (78, 79, 81). Ayrıca okside LDL-C MMP'ları etkilemekte ve aktive edebilmektedir (82).

İnflamasyonun koroner arterlerde aterosklerozda ve anevrizma oluşumunda anahtar bir rol oynadığı bilinmektedir. Ateroskleroz patogezinde adezyon molekülleri dolaşımdaki monositlerin endotele adezyonuna ve geçişine aracılık ederek katılırlar. Yapılan çalışmalarda plazma E selektin, intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler adezyon molekülü ve CRP seviyeleri izole KAE hastalarında tıkaçıcı KAH ve normal koroner olanlara göre oldukça yüksek olarak tespit edilmiştir (83, 84). Ayrıca bu adezyon molekülleri ile ektatik segment uzunluğu arasında da önemli korelasyon tespit edilmiştir (84). Bütün bu verilerden KAE hastalarında ciddi ve yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve inflamasyon olduğu sonucuna varılmıştır (83).

Matriks metalloproteinazlar ekstraselüler matriks yıkılmasında önemlidir (85). Deneysel hayvan modellerinde matriks metalloproteinazların aşırı sentezlenmesi ekspansiv arteriyel remodeling ile ilişkili olduğu ve MMP'lerin baskılanmasının koruyucu olduğu gösterilmiştir (14, 85). Postmortem çalışmalarda da MMP'lerin koroner arterlerin ekspansiv remodeling gelişmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (15). MMP-3 geninin artmış ekspresyonu koroner anevrizmaların bağımsız bir prediktörü olarak rapor edilmiştir (86). Merkezimizde yapılan bir çalışmada da Doğan ve arkadaşları tarafından MMP-3, MMP-9 ve IL-6 seviyelerinin KAE'de artmış olarak tespit edilmiştir (13).

Sistein protezlar (Katepsin K, Lve S) ile serin proteazlar (Nötrofil elastaz, plazminojen aktivatör, plazmin, kimaz ve triptaz) gibi diğer proteolitik enzimler KAE patogenezinde önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir (87-90).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) anjiogeneziste ve inflamatuvar süreçte önemli rol oynayan bir faktör olup diffüz KAE hastalarında anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (91). Ayrıca VEGF MMP'lerin oluşumunu tetikleyerek damar duvarında kötü yönde ilerleyici yapısal değişikliklerin döngüsünü başlatabilmektedir (92).

Koroner arter ektazisi gelişimi için bir başka olasılık da NO'nun, endotel bağımlı gevşetici faktör (EDRF) aracılığı ile kronik aşırı stimülasyon sonucu koroner dilatasyona neden olabilmesidir (67, 93). NO'nun vazodilatatör, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve antitrombotik etkileri bilinmekte olup NO metabolitleri ile ektaziye predispozan olduğu bildirilmiştir. Bu ilişkiyi gösteren indirek kanıtlar vardır. Herbisit spreylerine maruz kalan bireylerde ektazi sıklığında artma bildirilmiştir. Herbisit spreyler Ach'i artırarak NO üretimini stimüle ettiği bilinmektedir (67). Diğer bir olasılıkta aterosklerozun endotelden uygunsuz NO salınmasına neden olmasıdır (67, 93).

Deneysel modellerde abdominal aort anevrizmasında indüklenebilir NO sentaz (iNOS) ekspresyonu ve plazma NO metabolitlerinin arttığı ve iNOS inhibisyonu ile anevrizma genişlemesinin sınırlandığı gösterilmiştir (93). Bir diğer çalışmada iNOS upregülasyonu MMP ekspresyonu artırdığı saptanmıştır (94). Ayrıca

NO ürünleri (peroksinitrit gibi) latent MMP'ları aktive ederek KAE'de önemli rol oynadığı bildirilmiştir (95, 96).

Koroner arter ektazisi gelişmesinde anjitenin konverting enzim genotipi (97) ve herediter bir durum olan ailesel hiperkolesterolemi (98, 99) gibi genetik etkilere yönelik bazı indirek kanıtlar vardır. Genetik çeşitlilik belirli coğrafik bölgelerde ektazi sıklığındaki farklılıkları açıklayabilir (6). Ancak henüz KAE'ye neden olabilen tanımlanmış bir genetik defekt tespit edilmemiştir.

Histopatolojik olarak KAE'nin nonaterosklerotik formlarında intima tabakası intaktır. Ancak yaygın media dejenerasyonu, düz kas hücre göçü ve kollajen hiyalinizasyonu ve bunlara bağlı olarak damar duvarında belirgin incelme vardır (8, 49). Hipertansiyonda, arter duvarındaki elastin zayıflama sonucu dilatasyon ve diseksiyon gelişebildiği ve medianın aterosklerotik yıkımını hızlandırabileceğini öne sürülmüştür (5, 12, 64).

İzole KAE'li hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda, diğer arter yada ven çaplarında ve damar duvarlarında da bir takım değişikliklerin oluştuğunu göstermiştir (100). Bu çalışmalarda KAE'li bireylerde abdominal aort anevrizması (66), iliofemoral arterlerde de anevrizma (47), alt ekstremitte venlerinde variköz genişlemelerin, baziller arter anevrizmalarının, varikosellerin, anlamlı oranda daha sık olduğu gösterilmiştir (100). Anevrizmatik bacak damarlarının histopatolojik incelemesinde mevcut lezyon olarak ateroskleroz tespit edilmiştir (66).

2.1.6. Koroner Arter Ektazisinin Anjiyografik Özellikleri

Koroner arter ektazisinde anjiyografik olarak koroner kan akımında bozulma vardır ve üç akım paterni izlenmektedir (12). 1. Yavaş koroner akım; radyopak maddenin dolması ve boşalmasında gecikme, 2. Segmental ileri-geri akım fenomeni "Backflow" (milking phenomenon) 3. Dilate koroner segmentte radyopak maddenin lokal birikimi (staz) dir. Anjiyografik bulgular, genişlemiş koroner arter lümeninde akımın laminar özellikten türbülant akıma dönüşmesine bağlı bulgularıdır (81).

Koroner arter ektazisi bulunan hastalarda iskemi mekanizması açık değildir. Yapılan çalışmalarda izole KAE'deki bozulmuş koroner kan akımının miyokard iskemisine ve hatta miyokard infarktüsüne sebep olabileceği belirtilmiştir (52). Güleç

ve arkadaşları (101) ektazili hastalarda epikardiyal ve mikrovasküler perfüzyonun bozulduğunu göstermişlerdir. Ektatik segmentlerde kan akımının türbülant özellik kazanması, aksiyal akımın kaybına bağlı gelişen eritrosit agregasyonları ve ektatik bölgede oluşan trombojenite artışı ve bunun sonucunda oluşan trombüslerin distale embolizasyonu, koroner ektazi ile mikrovasküler perfüzyon bozukluğu arasındaki ilişkinin önemli nedenleri olarak bildirilmiştir (16).

Başka bir çalışmada ise koroner akım hızı ölçülmüş, akım hızının anevrizma içerisinde belirgin olarak azaldığı, komşu normal segmentte ise normal olduğu görülmüştür (102). Akyürek ve arkadaşları (48) izole diffüz KAE'si olan hastalarda koroner akım rezervinin kontrol grubundan daha düşük olduğu bildirilmiştir. Fakat volümetrik koroner kan akımı anlamlı olarak KAE grubunda daha yüksek bulunmuştur. Azalmış koroner akım rezervi mikrosirkülatuar disfonksiyonu yansıtmakta ve egzersize bağlı miyokardial iskeminin nedeni olarak açıklamışlardır (48).

Koroner arter ektazili hastaların ektatik arterleri, ektatik olmayan arterler veya kontrol grubuyla kıyaslandığında "Trombolysis in Myocardial Infarction (TIMI)", kare sayısı ve miyokardiyal blush grade'i (MBG), mikrovasküler perfüzyon bozukluğunu öngördürecek düzeyde düşük bulunmuştur (101). Sonuç olarak, KAE'li hastalarda miyokard iskemisi ve angina pectorisin temel nedeni, mikrovasküler perfüzyon ve akım rezervindeki bozulmalar olarak kabul edilmektedir (48, 55, 81).

2.1.7. Koroner Ektazili Hastalarda Semptomlar, Tedavi ve Prognoz

Koroner arter ektazi ve anevrizmaları klinik olarak asemptomatik olmasından atipik göğüs ağrısına, stabil anginadan akut koroner sendromlara kadar çok çeşitli semptomlar gösterebilir. İzole koroner arter ektazisi genellikle asemptomatik seyreder. Semptomatik olgular genellikle efor anginası şeklinde ortaya çıkmakla beraber daha az olarak kararsız angina ve Mİ ile de karşımıza çıkabilir (5, 12, 16, 42).

Semptomlar genellikle birlikte olan stenotik KAH'a bağlı olabileceği gibi ektazi bölgesinde gelişen diseksiyon ve trombüs oklüzyonuna da sekonder olabilir (12). Ayrıca ektazik segmentlerde gelişen trombüsler distal damarlarda embolinin

neden olduğu mikroinfarktlara yol açabilmektedir (12, 80). Anlamli koroner darlığın eşlik ettiği KAE olguları ile sadece koroner arter darlığı olan hastalar arasında angina, Mİ ve ölüm oranı açısından anlamli fark bulunmamıştır (50, 51). Eşlik eden anlamli koroner arter darlığı olmayan KAE'li hastalarda, koroner olay sıklığı koroner arterleri normal olan bireylere göre daha fazladır (12, 50). İzole KAE hastalarında yapılan bir çalışmada sadece KAE olan hastaların %39'unda, başka bir çalışmada ise %29'unda geçirilmiş Mİ veya angina öyküsü bildirilmiştir (50, 51). Bu çalışmalarda Mİ yerleşimi ile ektatik olan arter uyumlu bulunmuştur.

Koroner arter ektazisi hastalarında egzersiz testi genellikle pozitifdir. Kliniğimizden Altınbaş ve arkadaşların (49) yaptıkları bir çalışmada koroner darlığın eşlik etmediği diffüz ektazisi olan hastaların %70'inde, segmental ektazisi olan hastaların ise %26'sında egzersiz testi pozitif tespit edilmiştir. Bu çalışmada; ektazinin derecesi, yaygınlığı ve sol ön inen arterde geri-akım (backflow) fenomeni, eforla oluşan iskeminin en önemli öngördürücülerini olarak belirtilmiştir. Ektazinin rüptürü, tamponad ve ani kardiyak ölüme neden olabilir (103, 104). Bunun yanında sakküler ektaziler sağ atriyum, sol atriyum, vena kava inferiyor ve süperiyora bası yapabilir, pulmoner arter veya koroner sinüse fistül formasyonu ile karşımıza çıkabilir (103, 104).

Ciddi koroner damar hastalığının eşlik etmediği KAE'lilerde belirlenmiş kesin bir tedavi yaklaşımı yoktur (105). Ektazi yönetimine genel yaklaşım etyolojiye (KAH, infeksiyon, inflamatuvar hastalıklar), ilişkili semptomlara ve ektazinin komplikasyonlarına (fistül formasyonu, anevrizma içi trombüs ve distal embolizasyon) bağlıdır (106). Trombüs oluşumu ve mikroemboliye bağlanan iskemik sendromları önlemek için profilaktik olarak trombosit inhibitörlerinin kullanılması gereklidir (105). KAE'de ilk aşamada antiagregan tedavi için aspirinin yeterli olacağı önerilmektedir (60, 107, 108). Tiklopidin ve klopidogrel gibi diğer antiagreganların, aspirin kullanmakta iken koroner olay geçiren veya aspirin alamayan hastalarda kullanılabileceği belirtilmektedir (60, 107, 108). Ektazinin çok ilerlediği, insitu tromboz ve distal embolizasyon riski olan hastalarda ise antikoagülan tedavi tercihi tartışmalıdır (60, 107, 108). Aterosklerotik olmayan ektatik koroner arterler spazm, intimal hasar ve staz nedeniyle tromboza meyil oluşturduğundan, KAE hastalarında kronik warfarin tedavisinin gerekli olabileceği

olgu bildirilerine dayanarak ileri sürülmüştür (105). Antikoagülan tedavinin uzun süreli kullanımının riski de göz önüne alındığında ve KAE'si olan hastaların uzun süreli takip edildiği çalışmalarda, sadece ektazi olan hastalarda yeni infarktüs ve ölüm izlenmemiş olması ve koroner darlığın eşlik ettiği KAE hastaları ile ektazinin eşlik etmediği KAH arasında kararsız angina, Mİ ve ölüm açısından fark bulunmamış olması warfarin tedavisinin pek gerekli olmadığını bildirilmiştir (50).

Aterosklerotik ektazilerde tedavi kararı birlikte olan KAH'ın ciddiyetine bağlıdır (108). Miyokard oksijen tüketimini azaltması ve negatif kronotropik etkisi nedeniyle β -bloker verilmesi önerilmektedir (16). Arteryel spazmı azaltmak içinde diltiazem önerilmektedir (60). Kliniğimizden Doğan ve arkadaşlarının (109) yaptığı bir çalışmada ise; trimetazidinin izole KAE'li hastalarda egzersize bağlı anginayı azalttığı ve egzersiz performansını artırdığı gösterilmiştir. Bu tedaviler ile uzun dönemde yeni MI vakalarının azaltıldığı ve sol ventrikül fonksiyonlarının korunduğu gösterilmiştir (60). KAH'lığı ile olan sık birliktelik nedeniyle, KAH risk faktörlerine yönelik koruyucu ve tedavi edici yaklaşımlar hedeflenmelidir (108).

Koroner arter ektazili hastaların prognozu tartışmalıdır. İzole KAE'li hastalar, birlikte stenotik KAH olanlarla karşılaştırıldığında daha iyi prognoza sahiptir (52). Stenotik KAH'ın eşlik ettiği KAE olguları ile sadece KAH olan hastalar arasında angina, Mİ ve ölüm oranı açısından anlamlı fark bulunmamıştır (12). Demopoulos ve arkadaşları (50) izole KAE'li hastalarda 2 yıllık gözlemde MI, cerrahi, ani kardiyak ölüm veya girişimi KAH'a göre daha az bulmuştur. Markis ve arkadaşları (12) KAE prognozunu medikal tedavi ile takip edilen üç damar hastaları ile aynı olduğu ve yıllık mortalite oranının %15 olduğu bildirilmiştir

2.2. Nitrik Oksit

2.2.1. Tanımı ve Tarihçesi

Nitrik oksit (NO) renksiz, kokusuz, lipofilik, kimyasal olarak stabil, reseptör bağımsız, bilinen en düşük molekül ağırlıklı (30 Dalton), zehirli ve serbest radikal bir gazdır (110). Furchgott ve Zawadzki (20) isimli araştırmacılar 1980 yılında endotel hücrelerinin ürettiği bir faktörün damar gevşemesine neden olduğunu bildirmiş ve bu faktöre endotelyumdan elde edilen gevşeme faktörü (EDRF) adını vermişlerdir (20).

Daha sonra Palmer ve arkadaşları (111) EDRF' nin kimyasal yapısının NO olduğunu ortaya koymuşlardır. Günümüzde NO'nun farklı tipte birçok hücre tarafından üretildiği ve çok çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Araştırmalar arttıkça NO'nun fizyolojik ve patolojik olaylardaki rollerinin boyutları genişlemiş ve Amerika'da 1992 yılında 'Science' dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiş ve 1998'te kardiyovasküler sistemde NO ile ilgili çalışmaları Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, Ferid Murad'a nobel ödülü kazandırmıştır.

2.2.2. Nitrik Oksidin Yapısı ve Özellikleri

Nitrik oksit, membranlardan kolayca geçebilen, hidrofobik, küçük bir molekül olup 6-30 saniye yarılanma ömrü olan bir gazdır (27, 112). Pek çok hücrede nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından, endojen bir aminoasit olan L-argininin terminal guanidin grubunun NO'ya çevrilmesiyle üretilir (27, 112).

Nitrik oksit, oksijen ve süperoksitle tepkime vermesinden dolayı dokularda çok kısa ömürlü olup solüsyonlarda hızla okside olarak nitrit (NO₂) ve nitrat (NO₃) dönüşür (113). NO₂ doku hasarı yapabilecek toksik bir gazdır (114). NO lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir (115). NO suda ve yağda çözünür bu şekilde hücrelerin çevresinde serbestçe diffüze olabilmektedir. NO ve O₂ reaksiyona girerek her biri nitrojendioksit ve peroksinitrit gibi kuvvetli okside moleküle dönüşür. Oluşan bu molekül potansiyel olarak NO'in kendisinden daha toksiktir ve doku hasarına yol açabilir (116). Düşük konsantrasyonlarda ise NO toksik olmayıp çok önemli fizyolojik işlevlerin gerçekleşmesinde rol alır. Ekstrasellüler ve intrasellüler olarak fonksiyon görebilir (19, 113).

2.2.3. Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

Nitrik oksit sentaz, oldukça kompleks bir enzim ailesi olup NOS'un endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere üç farklı NOS izoformu tanımlanmıştır. NO, bu enzim ailesi tarafından, L-arginininden sentezlenir. NOS enzimi sitokrom P-450 gibi Fe içeren protoporfirin IX'a sahiptir. Bu reaksiyonda moleküler oksijen ile kofaktör olarak; flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), Hem, kalmodulin, tetrahidrobiyopterin (BH₄) ve iki divalent katyon (kalsiyum ve "Hem" demiri)

gerekmektedir. Bütün NOS izoformlarında bu kofaktörler için bağlanma bölgeleri vardır (117).

Kaynağına bağlı olarak NOS enzimleri monomer veya heterodimer olarak aktivite gösterirler. Monomerik alt birimlerin kütleleri 125-155 kDa'dur. Bütün NOS izoformları birer flavoproteindir. Yine bütün NOS izoformlarında memeli hücrelerine özel bir enzim olan sitokrom P-450 redüktaza homolog bölgeler vardır. Bu homoloji NO biyosentezinin oksidatif doğasını yansıtmaktadır ve NOS'ın "hem" grubu içermesi de onun bir sitokrom P-450 enzimi olduğunu göstermektedir. Nöronal, endotelial ve hepatik NOS'larda protein kinaz A fosforilasyon bölgeleri vardır. Bunun anlamı bu tür NOS'ların aktivitelerinin protein kinazlardan etkilenebileceğidir (118).

Endotelial ve nöronal nitrik oksit sentaz izoenzimi dokularda devamlı olarak bulunmakta ve yapısal (konstitütif) NOS olarak adlandırılmaktadır. Nöronal NOS izoenzimi temel olarak periferik ve santral sinir sisteminin bazı nöronlarında bulunur. eNOS izoenzimi NOS-III olarakta bilinmekte ve temel olarak vasküler endotelde bulunmaktadır. Nitrik oksidin az bir kısmı bu iki NOS izoenzimi tarafından oluşturulur ve biyolojik ortamda çok kısa bir sürede yıkılır. Üçüncü izoenzimi immünolojik ya da bir uyarı sonucu spesifik olmayarak bir çok hücreden sentezlenebilir; bu nedenle uyarılabilir (112, 119). NOS'lar L-arginin nitrik oksit dönüşümünü iki basamakta katalizler. Birincisi; argininden hidroksiarginin oluşumudur ve kofaktör olarak NADPH, moleküler oksijen, kalsiyum, kalmodülin ve tetrahydrobiopterin kullanılır. Bu basamağı karbonmonoksit bloke eder. İkincisi hidroksi argininden NO ve sitrülün oluşumudur bu durum aynı zamanda bir oksidasyon işlemidir. NADPH, moleküler oksijen, kalsiyum, kalmodülin ve BH4 kullanılır. Karbonmonoksit ve arginin analogları bu basamakta blokaj yapar. Ayrıca üretilen NO, NOS' un hem prostatik grubuna bağlanarak, bu basamakta negatif feed back ile üretimi azaltarak kontrolü sağlar (120). NOS türleri hem buldukları hücre tipleri hem de NO'nin miktarı, moleküler hedefleri ve işlevleri bakımından farklılıklar gösterirler. iNOS keratinositler, langerhans hücreleri, fibroblastlar endotel ve damar düz kasları, makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri gibi birçok hücrede bulunurken, eNOS esas olarak endotel hücrelerde ekrin berrak hücrelerde bulunur (121). nNOS ise insan beyinde, kasda, periferik sinir sisteminde bulunur (121).

Nitrik oksit sentaz 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. Periferik sinir sisteminde NO nörotransmitter gibi davranarak gastrointestinal sistem, ürogenital sistem ve solunum sisteminde nNOS içeren nonadrenerjik nonkolinerjik sinirler yoluyla düz kas gevşemesini düzenler. Büyük serebral damarları innerve eden vazodilatör sinirlerde de bulunur. İskelet kasında, kalp ve retinadaki katekolaminlerin salgılanmasını düzenleyen sinir terminallerinde de bulunur (122). iNOS yüksek miktarlarda üretilerek enflamatuvar olaylarda rol alır ve hücre aracılı immün cevapta etkilidir (123). Dolaşımdaki NO'nun asıl kaynağı ise eNOS izoenzimidir (124).

Nitrik oksit sentezi damarlarda başlıca "shear stres" ile tetiklenir. Bu fenomen, kalbin her sistolde kanı damarlara göndermesi sonucu damar endoteli yüzeyinde oluşturduğu mekanik etki (sürtünme) olarak ifade edilebilir. Endotel hücreleri bu mekanik etki ile şekil değişikliğine zorlanırken hücre iskeleti aracılığı ile hücre içine sinyaller gönderir. Bunun sonucunda Protein Kinaz G aktive edilerek eNOS'u fosforile eder. Fosforilasyon, bu enzimin aktivasyonuna neden olur. Sonuçta, endotel hücresinden sürekli NO üretilir. Bu şekilde NO üretimi için Ca^{2+} 'a gerek yoktur, eNOS'un fosforile edilerek aktive edilmesi yeterlidir. Diğer taraftan hücre içi Ca^{2+} düzeylerini arttıran bileşikler de (Ach, histamin, bradikinin, trombin, glutamat, P maddesi, serotonin, noradrenalin, tromboksan A2, endotelin-1, Adenozin trifosfat (ATP), anjiotensin II, vd.) vasküler endotelyumda fosfolipaz C enzimi üzerinden Ca^{2+} 'a bağımlı bir enzim olan eNOS enzimini aktive ederler (125).

Nitrik oksit sentaz enziminin her üç izoformu kalpte mevcuttur. Kalpte kolinerjik sinir uçları ile non-adrenerjik/ non-kolinerjik sinirlerde nNOS'un, immünoreaktivitesi gösterilmiş olmasına rağmen miyositlerden, esasen yüksek miktarda eNOS eksprese edilmektedir (126). Diğer taraftan inflamatuvar sitokinlerle uyarıldığında miyositler iNOS enzimini eksprese etmektedir (127). Kalp yetmezliği olan hastalarda da iNOS ekspresyonları artarken eNOS azaldığı bildirilmiştir (128).

2.2.4. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Enzimi

Endotelyal nitrik oksit sentaz 134 kD'luk iki benzer monomerdan oluşan bir dimerdir. eNOS monomeri, fonksiyonel olarak iki farklı bölgeye, N-terminal oksijenaz bölgesi ve C-terminal redüktaz bölgesine sahiptir. Enzimin fonksiyonel olabilmesi için dimerik formda olması gerekir. Redüktaz bölgesi, NADPH, FAD ve FMN flavinleri ve kalmodülin için bağlanma bölgeleri içerir. Katalitik bölge içeren N-terminal oksijenaz bölgesi, L-arjinin, BH4 ve 'hem' için bağlanma bölgeleri içerir. Redüktaz bölgesi, flavinlerden oksijenaz bölgesine bağlı 'hem' grubuna elektron transfer eder. Enzimin dimerik hale gelmesi hem molekülünün bağlanması ile başlar; 'hem'in yokluğunda enzim monomer halde kalır. Dimerik halde enzime BH4 bağlanabilir ve dimeri kararlı hale getirir, kararlı hale geçiş aynı zamanda çinko iyonları ile de sağlanır. eNOS dimerinin fonksiyonel aktivitesi BH4 moleküllerinin bağlanma sayısına bağlıdır. BH4'in bağlanmamış bir eNOS dimeri O₂-üretmeye eğilimlidir, BH4 molekülünün birinin bağlanması, eNOS dimerinin NO ve O₂ -'nin her ikisini üretme eğilimi ile sonuçlanır. Yüksek seviyede BH4 varlığı ise doymuş bir dimer oluşturarak yalnızca NO sentezleyen bir enzim oluşmasını sağlar (129). Enzimin hücre içindeki yeri net olarak belirsizdir. Golgi cisimciği, plazma membranı ve en çok da plazmalemmal kaveolada bulunduğu tespit edilmiştir. Kaveolada kaveolin adlı kaplayıcı proteinle sarılı olan eNOS inaktif haldedir. Hücre içi serbest kalsiyum seviyelerinin artması kalsiyum/kalmodülin kompleksinin oluşumuna yol açar ve bu kompleks kaveolinle yer değiştirerek, NOS enzimidaki kalmodülin bölgesine bağlanarak ve enzimi aktive eder ve serbest kalsiyum düzeyi düşene kadar aktif kalır. (50).

Nitrik oksit ve eNOS endotel fonksiyonlarında, damar duvarı gerginliğinin düzenlenmesinde ve vasküloprotektif özellikleri ile önemli rol oynamaktadır (28, 130, 131). NO ve eNOS defektlerinde hızlanmış ateroskleroz ve damar anevrizma gelişimi bildirilmiştir (131).

2.2.5. Nitrik Oksidin Kardiyovasküler Sisteme Özgü Etkileri

Nitrik oksidin tüm vücutta çok farklı etkileri vardır. Küçük miktarlarda yapılan NO hedef hücrede başlıca guanilat siklaz aktivitesini artırır ve hedef

hücrenin cinsine göre fizyolojik etkiler ortaya çıkar. NO endotelyumdan salgılanan en önemli mediyatördür. Endotelyal disfonksiyonda ilk görülen, NO aracılığı ile olan endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulmasıdır. NO üretimi veya aktivitesindeki bozukluk endotelyal disfonksiyonun ana mekanizması olduğu ve ateroskleroza tetiklediği öne sürülmektedir (26). Arteriyel sistemde belirli bir damar tonusunu sağlayan devamlı bir NO sentezinin olduğunu ve NO'nun kan akımı ve basıncını vasküler düz kasa etki ederek düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (112).

Kardiyovasküler sistemde NO yapımı vasküler endotelin içinde bulunduğu ortamdaki değişikliklere yanıt veren bir uyum mekanizması olarak işlemektedir. NO yapımını sağlayan fizyolojik uyarılar henüz tam olarak anlaşılammıştır. Ancak pulsatil kan akımı ve makaslama gerilimi en önemli iki faktör gibi görünmektedir. Endojen NO yapımının büyük arteriyollerde en fazla ve venöz yatakta en az olması bunu doğrulamaktadır. NO eksikliği hipertansiyon ve ateroskleroz gibi patolojilerin gelişmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca NO, endotel ile trombositler ve olasılıkla da diğer kan hücreleri arasındaki ilişkiyi düzenler ve vasküler düz kasın proliferasyonunu kontrol eder. Daha önceleri endotelde sadece yapısal NOS enzimi bulunduğu sanılırken domuz endotel hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar bu hücrelerde indüklenebilir NOS'un da bulunduğunu göstermiştir. Aynı şekilde vasküler düz kas tabakasında da indüklenebilir NOS vardır (132)

Asetilkolin ile endotelyal dokudan NO salınımının gösterilmesinin ardından, bradikinin, serotonin, adenosin difosfat (ADP), ATP, vasopresin, endotelin, substans-P, trombin gibi birçok farmakolojik ajanın endotelyal dokudan NO salgılattığı gösterilmiştir (20).

Araştırmalar, esansiyel hipertansiyon ve vazospastik fenomenlerde NO yolu ile gerçekleşen vazodilatatör tonusun kaybının en azından bu gibi patolojilerde daha önce tanımlanan vazokonstriktör faktörler kadar önemli olduğunu düşündürmektedir. Endojen NO'nun azalması ile rol aldığı fizyolojik etkiler ortadan kalkmakta, hipertansiyon ve ateroskleroza yatkınlık oluşmaktadır. Olumsuz yönde etkilenen bu aktiviteler; renin salınımının azalması, vasküler düz kas hücrelerinin

proliferasyonunun inhibisyonu, prostasiklin ile birlikte trombosit agregasyonu ve adezyonunu düzenleyici etkiler olarak sayılabilir (133).

Nitrik oksit endotele lökositlerin adezyonunu, aktivasyonunu ve agregasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (134). Lökosit adezyonunun sadece aterosklerozun erken evrelerinde değil, plak instabilitesinde ve yırtılmasında da belirgin önemi olduğu bilinmektedir (135). NOS inhibisyonu mikrovasküler geçirgenliği artırarak lökositlerin göçünü ve adezyonunu artırmaktadır. NOS inhibitörü olan L NAME ile platelet ve lökosit adezyonu arttığı tespit edilmiştir (136).

Nitrik oksit vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1), intraselüler hücre adezyon molekülü (ICAM), monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve E-selektin gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonu düzenlemektedir (137). NO ve NO donörlerinin VCAM-1 ekspresyonunu inhibe ettiği ve bu etkinin redoks duyarlı transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör B ekspresyonunun inhibisyonu ve buna bağlı olarak oksidatif stresin azalması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (138).

Nitrik oksitin trombosit adezyonunu ve agregasyonu inhibe etme etkisi de vardır (139). NO, trombositlerdeki P-selektin ekspresyonunu inhibe ederek fibrinojen bağlayan glikoprotein IIB-IIIa (GP IIB-IIIa) reseptör de kalsiyuma bağlı yapısal değişikliği baskılar (140).

Nitrik oksit ve NO donörlerinin vasküler düz kas hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (23). Ayrıca trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi proliferasyon uyaranlarına karşı hassasiyet artmış durumdadır. eNOS baskılanmış farelerde balon anjioplasti sonrası gözlenen intimal hiperplazinin normal farelere göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (141).

Nitrik oksitin antioksidan etkileri de vardır; vasküler oksidatif stres kardiyovasküler hastalıkların patogenezi açısından önemli bir faktördür. NO, antioksidan etkisiyle vasküler yapıda koruyucu bir rol üstlenmektedir. NO, serbest yağ asitleri, fosfotidilkolin ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu inhibe eder ve okside lipidlerin proaterojenik etkilerine engeller (142). eNOS'tan fizyolojik koşullarda üretilen NO, SOD'un fizyolojik konsantrasyonlarının varlığında

antioksidan etki gösterirken, iNOS aracılığı ile üretilen çok yüksek konsantrasyonlardaki NO, peroksinitrit oluşumuna neden olur (142).

Nitrik oksitin kalp üzerinde oluşturduğu etkiler sGMP'ye bağımlı ve bağımsız etkiler olarak ayrılabilir. NO'nun hem pozitif hem de negatif inotropik etkisi bulunmaktadır. Vagal sitimülasyonu takiben gelişen vazodilatasyonda ve miyokardiyal kontraktilitede de rolü olduğu düşünülmektedir (143).

Hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara içme ve diyabet gibi ateroskleroza zemin hazırlayan faktörlerin tümü, anormal endotel fonksiyonları ve biyoaktif NO seviyelerinde azalma ile birlikte (144).

Ayrıca NO, bunların dışında nörotransmitter, immunomodülatör ve yabancı maddelere karşı sitotoksik etkiler de göstermektedir (116). NO çift uçlu bir kılıç gibidir. NO'in farklı konsantrasyonlarda değişik etkilere sahiptir. Yüksek dozlarda toksik ve öldürücü bir moleküldür. NO üretimindeki azalmanın ateroskleroz gelişimine veya komplike olmasına yol açan olayların artması ile sonuçlanmaktadır (139).

2.3. Kalıtım Modelleri ve Genetik Polimorfizm

2.3.1. Tanım

Kalıtım modelleri, genlerin bir kuşaktan diğerine aktarımında görülen ve organizmadaki gen ekspresyonundan etkilenen tahmin edilebilir kalıplardır (145).

2.3.2. Fenotip ve Genotip

Bir organizmanın boy, saç yapısı, cilt rengi ya da kulak şekli gibi gözlenebilir karakteristikleri, o organizmanın fenotipi olarak bilinir. Fenotip, hem çevre ve hem de organizmanın ebeveynlerinden aldığı bir grup genin etkisiyle oluşur. Fenotip, boy uzunluğu gibi gözle görülebilir karakterlerin yanısıra, organizmanın her bir hücresinde üretilen proteinlerin tipleri ve miktarlarını da içeren eksprese olmuş özellikleri kapsar (145).

Bir organizmaya aktarılan gen topluluğu ise genotip olarak bilinir. Genler hücre çekirdeğindeki kromozomlarda taşınır. Hayvanlar ve diğer çok hücreli

organizmaların çoğu her bir hücrede biri anneden, diğeri babadan olmak üzere kromozomun iki kopyasını içerirler. İnsanlarda, maternal (anneye ait) ve paternal (babaya ait) kopyaların her biri 23 adet kromozom içerir, bu yüzden insanlar her bir hücrede 46 kromozoma sahiptirler (145, 146).

2.3.3. Alel

Kromozomlarda bulunan genler, "allel" denilen genlerden oluşmuş çiftler halinde bulunurlar. Biri anneden diğeri babadan gelen ve bireyin bir gen çiftini oluşturan genlere alel gen yada alel genler denir. Genlerde aynı karakteristik özelliği kodlayan fakat farklı kodlar taşıdığı için farklı özelliklerin ortaya çıkmasını sağlayan genlerden her biri aleldir. Örneğin göz rengini belirleyen genin ela rengi ortaya çıkaran versiyonu ile kahverengi rengi ortaya çıkaran versiyonundan her biri aleldir. A kan grubu aleli ve B kan grubu alelini taşıyan bir birey "AB" kan grubuna sahip olur (145).

2.3.4. Dominans İlişkileri

Gen çiftlerini benzer alleller şeklinde taşıyan bireyler homozigot genotipli, gen çiftlerini farklı alleller şeklinde taşıyan bireyler ise heterozigot genotipli olarak ayrılırlar. İki farklı allelin varlığı, allellerden hangisinin ya da kaç tanesinin organizmanın fenotipini belirleyeceği sorusunu gündeme getirir. Bezelyelerle yaptığı çalışmalarda Mendel, her iki allelin varlığında da fenotipi tamamıyla belirleyen özellikleri seçti. Mendel belirleyici alleli "dominant" (baskın), diğeri alleli ise "resesif" (çekinik) olarak adlandırdı. Diğeri bir ifadeyle; çekinik alel yalnızca homozigot genotipte fenotipik olarak kendini gösterilebilirken, baskın alel heterozigot genotipte kendini gösterebilmektedir. Organizma sadece resesif bir allel bakımından homozigotsa fenotip resesif bir özellik göstermektedir. İki benzer aleli taşıyanlar (AA veya gg), "homozigot"; farklı aleli taşıyanlar, (Aa) "heterozigot" olarak isimlendirilir. Örneğin; AA homozigot baskın, aa homozigot çekinik ve Aa heterozigotdur. Bazı allel grupları tam dominantlık-resesiflik ilişkisi gösteriyorken, çoğu allel grupları bu duruma uymamaktadır. Bunun yerine, her bir allel fenotipe katkıda bulunmaktadır. Bu gibi bir ilişki kodominans olarak adlandırılır (145, 146)

2.3.5. Dominantlık ve Resesifliğin Moleküler Anlamı

Dominant ve resesif terimleri, alleller arasındaki rekabet ilişkisini yani hangi allelin fenotipi kontrol edeceğini belirtir. Genler proteinleri kodlar ve fenotip üzerine etkileri oluşturdukları proteinler üzerindedir. Her bir allelin ürettiği proteinin miktar ve karakteristikleri analiz edilerek, çoğu durumda resesif allelerin defektif bir proteini ya da az miktarda proteini kodladıkları gösterilmiştir. Diğer allel normal fonksiyonel proteini kodlarsa ve organizma proteinin normal seviyesinin yarısı ile yapabiliyorsa (ya da normal allelden protein üretimi artabiliyorsa), defektif allelin fenotip üzerine hiçbir etkisi olmayacak, bu yüzden hasarlı allel resesif bir biçimde davranacaktır. Allelik değişikliğin bu tipi “loss-of-function mutation” (fonksiyon kaybı mutasyonu) olarak adlandırılır. Bununla beraber, defektif proteini kodlayan alleller diğer durumlarda dominant bir biçimde davranabilir. Eğer elde edilen protein diğer hücre bileşenleri tarafından uygun olarak regüle edilmezse, bu durum hücreye zarar verici olayların gerçekleşmesine yol açabilir. Bu durum bir “toxic-gain-of-mutation” (Toksik kazanç mutasyonu) olarak adlandırılır (145, 146).

Defektif bir proteinin yokluğu diğer fonksiyonel allel tarafından kompanse edilemezse, bu durum defektif allelin dominant bir etkiye sahip olduğunu gösterir (145)

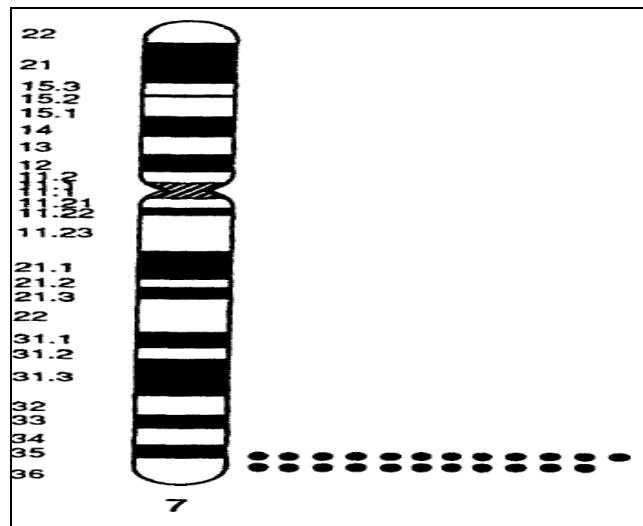
2.3.6. Genetik Polimorfizm

Doğada aynı türde organizmalar genellikle bazı görünüşleri ile farklıdır. Bu farklılıklar genetik olarak belirlenmiştir ve polimorfizm olarak isimlendirilir. Birçok gen lokusunda iki ya da daha fazla allel yer alabilir ve buna genetik polimorfizm adı verilir. Genetik polimorfizm, bir populasyonda, farklı allellere bağlı olarak genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Eğer bir lokusdaki allel frekansı en az %1 ise ve bu alleli taşıyan heterozigotların frekansı %2’den büyükse bu gen lokusuna polimorfik denebilir. İnsanlarda proteinleri kodlayan gen lokuslarının en az üçte birinin polimorfik olduğu saptanmıştır (147). Gen lokusu kromozom üzerinde belirli bir karaktere ait genetik bilginin yer aldığı bölgedir. (145, 147).

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 (147). Gen varyasyonlarının ırk, cinsiyet, çevre şartları (DNA yapısını etkileyen radyoaktivite, ultraviyole ışınlar, kimyasal maddeler, çevre kirliliği, serbest radikaller vs.) ve diğer faktörlerden etkilendiği bilinmektedir (148).

2.4. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Geni Polimorfik Özellikleri

Endotelyal NOS geninin yapısı ve lokalizasyonu ilk olarak 1993'te Marsden ve arkadaşları (124) tarafından tespit edilmiş olup o yıllardan itibaren bu genin pek çok spesifik allellik varyasyonları tanımlanmıştır. eNOS monomerleri; 7. kromozomun uzun kolunun 35. ve 36. loküsünde yerleşmiş olup, 21kb'lık 26 ekzon içerir ve 4052 nükleotidlik bir haberci ribonükleik asit (mRNA) tarafından kodlanır (Şekil-1) (33). Bu gende meydana gelebilecek bir varyasyon eNOS enziminde yapısal ve fonksiyonel değişikliklerine yol açabileceği ve bu durumda da çeşitli hastalıkların gelişebileceği bildirilmiştir (34).



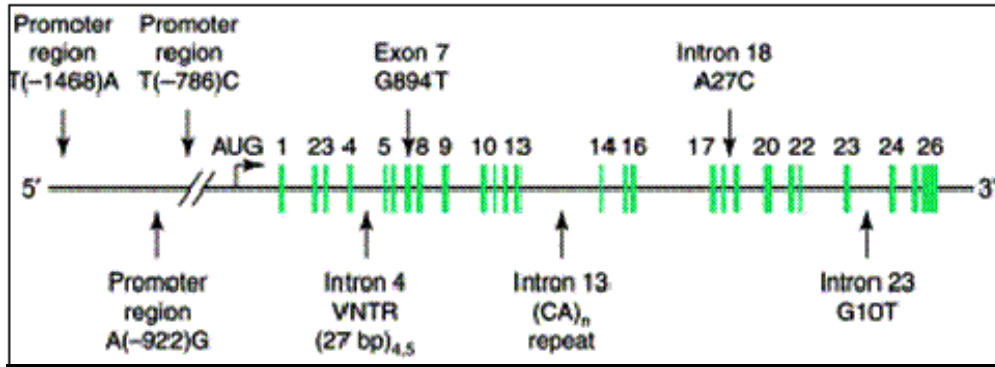
Şekil 1. eNOS geninin kromozomal yerleşimi (124).

Endotelyal nitrik oksit sentaz enzimini kodlayan gende şimdiye kadar yapılan araştırmalarda dizideki tek bir bazın değişmesinden kaynaklanan tek nükleotid

polimorfizmleri başta olmak üzere, bazı dizilerin tekrarlanmasından kaynaklanan tekrar polimorfizmleri bulunmuştur. DNA'daki eNOS geni varyasyonları ile vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılmış pek çok araştırma mevcuttur. eNOS gen polimorfizmi veya mutasyonunun çeşitli kardiyovaskülerin patogeneğinde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (149). Bugüne kadar KAH, miyokard enfaktüsü, hipertansiyon, inme ve renal hastalıklar gibi pek çok vasküler bozuklukta eNOS gen polimorfizminin risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (33). Ancak araştırma sonuçları ırklar arasında değişkenlik gösterdiğinden spesifik genetik varyantların sadece belli ırklara özgü olduğu düşünülebilir. Yakın zamanda yapılan çalışmada eNOS gen polimorfizminin eNOS geninde ve ürününde fonksiyonel değişiklikler ile ilişkili olduğu saptanmıştır (150). Bu gen için çeşitli polimorfizmler tanımlanmış ve bu polimorfizmlerin NOS sentezinde ve salınımlarında düzensizliğe, bunun sonucunda da defektif vazodilatasyona neden olarak damar duvarının zayıflaması ile anevrizma gelişimine zemin hazırlamaktadır (33).

Polimorfizmlerin biyolojik sistemlerdeki etkileri açısından değişikliğin oluş şekli kadar genin hangi bölgesinde meydana geldiği de önemlidir. Promotor bölge, genin dışında bulunan ve kopyalanmanın başladığı kısa DNA dizisidir. Genelde promotor bölgedeki polimorfizmler mRNA kopyalanmasını etkileme, dolayısıyla enzimin düzeyini değiştirme potansiyeline sahiptir. Ekzon bölgeleri kodlanan kısımlardır. Buradaki polimorfizmler protein yapısını etkileyerek enzim aktivitesini değiştirebilir. İntronlar genlerdeki kodlamayan bölgelerdir. Bu yüzden intronlardaki polimorfizmlerin promotor veya Ekzon bölgesi varyantlarına göre daha az işlevsel role sahip olduğu düşünülür (151).

Bu güne kadar eNOS geninde intron, ekson ve promotor bölgesinde olmak üzere üç çeşit varyasyon tanımlanmıştır. İntronlarda, bir tanesi intron 18'deki Ala27Cys, diğeri ise intron 23'teki Gly10Thr olmak üzere iki tek nükleotid polimorfizmi bulunmuştur. İntron 4, 13, 23'te de bazı tekrar değişiklikleri tanımlanmıştır. Promotor bölgede Thr786Cys, Ala922Gly, Thr1468Ala olarak adlandırılan üç tek nükleotid değişimi tanımlanmıştır. Ekson bölgesi polimorfizmi ise Glu298Asp'dir (129). Şekil-2'de eNOS geninde çalışılan polimorfizm bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 2. eNOS geni ve çalışılan polimorfizm bölgeleri (150).

2.4.1. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Gen İtron Bölge Varyasyonları

Endotelial nitrik oksit sentaz geninde tanımlanmış varyasyonların büyük çoğunluğu intronlar üzerinde bulunmaktadır (150). İtron 2, intron11, intron 12, İtron 18 (ala 27 cys), intron 22 ve intron 23 (gly 10 thr)'de tek nükleotid varyasyonları ile intron 2, intron 8, intron 13 ve intron 4 bölgelerinde VNTR (variable number tandem repeat) polimorfizmi tanımlanmıştır (150).

İtronlar proteinlerin amino asit diziliminde etkili olmadıkları halde ekzonların doğru okunmalarında ve gen regülasyonunda etkilidirler. Dolayısı ile intronlardaki polimorfizm ekzonların yanlış okunmalarına ve sonuçta proteinin hatalı sentezine sebep olurlar. eNOS geni çeşitli intron polimorfizmlerinde hipertansiyon ve KAH riskinde artma tespit edilmiştir (150, 152).

Tusukado ve arkadaşları (153) sağlıklı bireylerde eNOS gen intron 4 polimorfizmi ile plazma NO düzeyi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmada minör alelli homozigot deneklerin plazma NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ayrıca, polimorfik alellerin sayısı ile plazma nitrat düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tesbit edilmiştir. Bu çalışma, NOS genindeki polimorfizmle NOS enzim aktivitesinin, istatistiksel olarak anlamlı işlevsel ilişkisini gösteren bir çalışmadır.

2.4.2. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Gen Promotor Bölge Polimorfizimleri

İkinci bir tip alellik varyasyonuna promotor bölgede keşfedilmiştir. Bu varyant tipinin, transkripsiyonu ve dolayısı ile enzim seviyelerini direkt olarak etkileme potansiyeli vardır. Nokayama ve arkadaşları eNOS geninin 5' flanking bölgesinde, bağlantılı 3 tane mutasyon olduğunu kanıtlamışlardır (48). Bunlar; "Thr 786 Cys", "Ala 922 Gly", "Thr 1468 Ala" varyasyonlarıdır. eNOS -786 T>C genin promotor bölgesindeki 786 numaralı timin (T) bazı ile sitozin (C) bazının yer değiştirdiği nokta mutasyonu olarak ifade edilmesidir. Bu polimorfizmlerin insidansı, koroner vazospazmlı Japon'larda, kontrollere oranla daha yüksek bildirilmiştir. eNOS varyasyonuna sahip olmanın koroner vazospazm için bağımsız bir risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür (35).

2.4.3. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Geni Ekson 7 Tek Nükleotid Polimorfizimleri

Üçüncü tip alelik varyasyon da eNOS için ekson 7'de tanımlanmıştır. Bu varyant proteinin piriler yapısını değiştirir ve direkt olarak enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel özelliğini değiştirme potansiyeli vardır. Bu tek nükleotid polimorfizmi; Glu298Asp Ekson polimorfizmidir. Glu298Asp Ekson polimorfizmi ilk olarak 1998'de Yoshimura ve arkadaşları (154) tarafından eNOS geninin ekson 7'sinde gösterilmiştir. Sekizyüzdoksan dört'üncü pozisyondaki guanin (G) bazının timin (T) bazı ile yer değiştirmesi ile meydana gelir. Bu durumda eNOS geninde 298. pozisyonda ifade edilen amino asit Glutamat (Glu) yerine Aspartat (Asp) olur. Geniş çaplı yeni bir çalışmada, bu varyantın diğer eNOS varyasyonlarına göre kardiyovasküler hastalık riskiyle nisbeten daha fazla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (35).

2.4.4. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizminin Kardiyovasküler Hastalıklardaki Rolü

Bugün eNOS polimorfizimlerini ve hastalıklarla potansiyel ilişkilerine tanımlayan çok sayıda çalışma vardır. Araştırmalar tipik olarak 'aday gen' yaklaşımı

ile yapılmış olup hasta genotipleri, hastalıkların insidansı ile ve yapılan testlerin istatistiksel olarak anlamlı sonuçları ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmalarda ana prensip; eNOS enzimideki değişikliklerin (seviyesi, aktivitesi, lokalizasyonu gibi), kardiyovasküler hastalığa olan yatkınlıktaki değişikliklerle ilişkilendirilebileceğidir. eNOS enzimideki spesifik alelik varyasyonlar, eNOS enzim özelliklerini direkt olarak etkiler ya da eNOS gen yapısında doğrudan etkiler yapabilecek başka keşfedilmemiş varyasyonlarla indirekt olarak ilişkilendirilir (150).

Endotelial nitrik oksit sentaz gen polimorfizmi ile ilgili çalışmaların sonucunda; değişmiş gen ekspresyonunun ve aktivitesinin endotelin bütünlüğünü ve işlevini etkileyerek bazı patolojilere neden olduğu belirtilmiştir. Bu değişimlere neden olan faktörlerin ne olduğu her zaman bilinmemekle birlikte hipoksi, stres, hormonlar veya gen polimorfizmi gibi etkenler olabilir. Ancak başlıca endotel işlevlerinin bozukluğu ile de ilişkili olabilmektedir. Değişmiş olan eNOS aktivitesinde endotel işlevlerindeki bozukluğunun neden mi yoksa sonuç mu olduğu henüz tam olarak açıklanabilmiş değildir (155).

Endotelial nitrik oksit sentaz gen polimorfik varyantları enziminin ekspresyonunun ve fonksiyonel aktivitesini etkileyerek NO yararlanımını azaltabilmektedir (156). eNOS G894T polimorfizmi eNOS enziminin primer yapısında değişikliğe neden olabildiği (157) ve eNOS geninin bu polimorfizmi eNOS geninin diğer komponentler ile etkileşimini ve enzimatik stabilitesinde değiştirebildiği bildirilmiştir (150).

Endotelial nitrik oksit sentazın katalizlediği reaksiyonla endotel hücrelerinde meydana gelen NO'nun endotelial fonksiyonların sürdürülmesinde major rol oynamaktadır ve vasküler protektif özellikleri ile aterosklerozun oluşumunu önleyen birçok fizyolojik etkisi vardır. Aterosklerozda NO üretiminin olumsuz yönde etkilendiği ve NO eksikliğinin de aterosklerozu hızlandırdığı bilinmektedir (28). NO üretimindeki kazanılmış veya herediter defektler endotel disfonksiyonuna ve ateroskleroz gelişmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (28). Ayrıca yapılan deneysel ve klinik çalışmalar NO'nun endotel fonksiyonunun ve damar içi antitrombotik durumun sürdürülmesinde, damar duvarı tonusunun sağlanmasında (131, 158), trombosit agregasyonunun inhibisyonunda (159), vasküler endotele lökosit

adezyonu inhibisyonunda (134), vasküler düz kas hücre göçünün ve proliferasyonun inhibisyonunda (160) anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca eNOS tarafından üretilen NO'nun vazodilatör rolü ile damar duvarı geometrisinin kontrolünde rol oynadığı bildirilmiştir (21). Kuhlencordt ve arkadaşları (131) da deneysel fare çalışmalarında NO baskılanmasının çeşitli vasküler hastalıklar ve özellikle aort anevrizması geliştiği göstermişlerdir.

Endotelyal tabakada eNOS ekspresyonu lümen içi ve lümen dışı süreçleri etkileyen stratejik bir konumu vardır. Deneysel fare modellerinde NO eksikliğinin ateroskleroz hastalık paterninde değişikliğe neden olabildiği bu yüzden abdominal aort anevrizması oluşumu ve aort diseksiyonu gibi vasküler komplikasyonlar ile miyokardiyal iskemi ve PAH'da önemli rol oynadığı gösterilmiştir (28, 158).

Endotelyal nitrik oksit sentaz baskılanmış deneysel fare modellerinde NO'nun remodeling uyaranına yanıtta damar reorganizasyonunun major düzenleyici olduğu ve eNOS ve NO yolundaki primer defektlerin anormal remodelinge ve damar duvarı morfolojisinde anormal patolojik değişikliklere neden olabileceği bildirilmiştir. eNOS yokluğunda lümenal remodelingin bozularak damar duvarı kalınlığının arttığı rapor edilmiştir (21).

İnflamatuvar bir ortamda iNOS tarafından üretilen NO ile NO seviyesi artması ile sonuçlanır bu durum elastin ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinin bozulmasına neden olabildiği gösterilmiştir (95, 161). Deneysel çalışmalarda iNOS tarafından kontrolsüz üretilen NO veya eNOS tarafından üretilen unstabil NO'nun damar duvarı bütünlüğünde yıkıma neden olabileceği bildirilmiştir (21, 162). T-786C mutasyonu eNOS geninin promotor aktivitesinde, G894T mutasyonu ve intron 4 VNTR ise eNOS gen ekspresyonunda belirgin azalmaya neden olur (163, 164). Farelerde yapılan bir çalışmada bozulan eNOS gen fonksiyonunun Ach'e vasküler ve hemodinamik cevap verebilmesi için gerekli olduğu ve eNOS geninin bozulmasının hipertansiyona neden olduğu görülmüştür (165).

Endotelyal nitrik oksit sentaz genindeki varyasyonların da ateroskleroza neden olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. NO'nun aterosklerozdaki farklı rollerini gösteren çeşitli deneysel çalışmalar yapılmıştır. Moroi ve arkadaşları (141) eNOS mutant farelerde yeni intimal çoğalmanın arttığı ve yeniden yapılanmanın

azalmış olduğu saptanarak NO eksikliğinde ateroskleroza eğilim olabileceği bildirilmiştir. Rudic ve arkadaşları (21) da eNOS mutant farelerin vasküler hasara aşırı çoğalma ile cevap verdiği bulunmuştur. Damarların yeniden yapılanmasının kontrolünde, başlıca rolün endotelden kaynaklanan mediyatörler arasında NO'ya ait olduğu, NO üretimindeki bozuklukların ateroskleroz ve hipertansiyona neden olabileceği sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmalarda eNOS aktivitesindeki artışın ateroskleroza karşı koruma sağladığını bildirilmiştir (166).

İnsanlarda eNOS ve ateroskleroz ile ilgili çalışmalarda da hayvan deneyleriyle benzer sonuçlar bulunmuştur. Pritchard ve arkadaşları (167) NO'nun süperoksit anyonu miktarının sınırlandırılmasında önemli bir rolü olduğu ve bu sayede LDL'nin oksidasyonunda koruyucu olduğu bildirilmiştir. Buttery ve arkadaşları (168) insan umbilikal venin aterosklerotik bölgelerinde eNOS düzeyinin anlamlı miktarda düşük olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde Wilcox ve arkadaşları (169) da aterosklerotik damarlarda eNOS mRNA ve proteinlerinin azaldığını göstermişlerdir. Oemar ve arkadaşları (170) aterosklerotik insan karotid arter plaklardaki endotel hücrelerinde eNOS'un immunoreaktivitesinin ve NO düzeyinin azaldığını saptamışlardır. Quyyumi ve arkadaşlarının (29) ateroskleroz risk faktörleri ve NO düzeyi ile ilgili çalışmasında ise yas, cinsiyet, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, sigara içimi, diyabetes mellitus gibi risk faktörlerine sahip kişilerde bazal NO düzeyinin düşük olduğu ve Ach'le uyarılmaya cevabın azaldığı bulunmuştur. Ghilardi ve arkadaşları (171) eNOS T-786C polimorfizminin homozigot CC genotipine sahip hastaların, kontrol grubundaki hastalara oranla 2 kat daha fazla ülseratif plak oluşumu saptanmıştır. Yine bu çalışmada orta dereceli ve ciddi ICA stenozu ile eNOS geninde (T-786C) polimorfizmi ilişkisi saptanmıştır.

Fatini ve arkadaşları da (28) etyolojisinde temel olarak ateroskleroz olduğu ve damar genişlemesi olan abdominal aort anevrizmasında eNOS G894T polimorfizminin predispozan bir faktör olduğunu bildirmişlerdir. Aort ve intrakranial anevrizmaların moleküler patogenezi farklı gibi görünmesine rağmen bu bilgiler eNOS'un ekstrasellüler matriks remodelinginde rolü olabileceği söylenmiştir (24).

Tangürek ve arkadaşları (172) eNOS T-786C gen polimorfizminin ülkemizde KAH varlığı ve yaygınlığı için bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceğini rapor

etmişlerdir. Berdeli ve arkadaşlarıda Türk toplumunda Glu298Asp polimorfizminin prematür KAH için bir risk faktörü olabileceğini ortaya koymuşlardır (173).

Etyopatogezinde bozulmuş NO metabolizması ve endotel disfonksiyonunun rol oynadığı koroner arter spazmı (35), miyokard infarktüsü (38) ve hipertansiyon (39) gibi pek çok vasküler bozukluk eNOS T-786C mutasyonu ile ilişkili saptanmıştır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Çalışmanın Yapıldığı Yer

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

3.2. Çalışmaya Alınan Olguların Seçimi

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Hemodinami ve Anjiyografi Laboratuvarı'nda 2008–2009 tarihleri arasında, stabil angina pectoris ve atipik göğüs ağrısı ile müracaat eden ve efor testi pozitif çıkması üzerine koroner anjiyografisi yapılan hastalar ardışık olarak çalışmaya alındı. Çalışmaya dahil edilen hastalar 3 gruba ayrıldılar. Birinci grup; tıkaçıcı KAH olmayan, bir veya daha fazla damarında KAE tespit edilen ardışık 65 hastadan oluşmaktaydı. İkinci grup; aterosklerotik KAH (%50 ve üzerinde obstrüksiyon) olan 51 hastadan oluşmaktaydı. Üçüncü grup ise KAE ve KAH tespit edilmemiş koroner arterleri normal olan 65 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu olarak seçildi.

3.3. Çalışmadan Dışlama Kriterleri

Çalışmanın dışlama kriterleri olarak; sistemik hastalığı olanlar, nefropatili hastalar (Creatin > 1,8mg/dl), herhangi bir kronik inflamatuvar-otoimmün hastalığı bulunan hastalar, aşırı alkol (günlük 70 gramdan az alkol alımını 'ılımlı içici', 70 gram ve daha fazla alkol alanları 'ağır içici' olarak tanımlanmıştır) alımı (174), tıbbi tedavi gerektiren psikiyatrik hastalığı bulunanlar, kognitif fonksiyonları bozuk olan hastalar, sol ventrikül hipertrofisi olanlar (İnterventriküler septum >12mm ve sol ventrikül arka duvar >12mm), orta-ciddi kapak hastalığı olanlar, hipertirodi veya hipotiroidisi olanlar, kronik karaciğer hastalığı olanlar, KAE ile birlikte %50 ve üzerinde tıkaçıcı koroner lezyonu olan hastalar, diyabetes mellitus hastalığı olanlar, anemisi olanlar, akut koroner sendrom hastaları dışlandı.

3.4. Çalışmanın Dizaynı

Çalışmaya alınma özelliklerini taşıyan ve KAE olan 65 hasta, aterosklerotik tıkaçıcı KAH olan 51 hasta ile koroner anjiyografisi tamamen normal olan 65 hasta alındı. 29 hastada belirtilen dışlama kriterleri olması nedeniyle çalışmadan dışlandı. Tüm hastaların demografik özellikleri ayrıntılı olarak sorgulandı. Sistolik kan basıncı 140 mmHg'nin, diyastolik kan basıncı 90 mmHg'nin üzerinde olanlar ya da antihipertansif ilaç kullananlar hipertansif; açlık total kolesterol düzeyi 200 mg/dl'nin üzerinde olanlar, 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 diyabetes mellitus tanısıyla tedavi görenler diyabetik kabul edildi. Olgular sigara içenler ve hiç içmemiş olanlar şeklinde ayrıldı. Birinci derece yakınlarında KAH olanlar (Erkeklerde 55 yaş, kadınlarda 65 yaşın üstünde) için aile öyküsü pozitif kabul edildi. Kadın hastalara menapozda olup olmadıkları, menapoza girmişler ise kaç yaşında girdikleri soruldu. Kadın hastaların, menapoza 40 yaş altında girmeleri erken menapoz olarak değerlendirildi. Hastaların kilogram cinsinden vücut ağırlıkları, metre cinsinden boyları ölçülerek kaydedildi. Vücut kitle indeksi (VKİ), literatüre uygun olarak ≥ 30 kg/m² olan olgular obez kabul edildi (175).

3.5. Koroner Anjiyografi İşlemi

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 kullanıldı. Sol koroner sistemi için en az dört, sağ koroner sistemi için en az iki projeksiyonda görüntü alınıp dijital hafızaya ve sine filme kaydedildi. Görsel olarak arterleri ektatik olduğu düşünülen hastalarda kantitatif ölçümler yapıldı. Automated Coronary Analysis bilgisayar yazılımı kullanılarak dijital hafıza üzerinden arter ölçümleri yapıldı. Arter lümen genişliğinin gerçek değerini elde etmek için, kateter çapından faydalanılarak kalibrasyon yapıldı. LAD, Cx ve RCA proksimal, mid ve distal segmentlerinden; sol ana koroner arter'in (LM) mid bölgesinden ölçüm yapıldı. LAD'de LM ayırımından birinci septal dal

hizasına kadar olan bölge proksimal, birinci septal dal hizasından ikinci septal dal hizasına kadar olan bölge mid, ikinci septal dal sonrası distal; Cx’de LM ayırımından birinci optus dalına kadar olan bölge proksimal, birinci ve ikinci optus arası mid, ikinci optus sonrası distal; RCA’da ostiumdan sağ ventrikül dalına kadar olan bölge proksimal, sağ ventrikül dalı ile akut marjinal dal arası mid, akut marjinal dal sonrası distal segmentler olarak değerlendirildi. Koroner arter ektazisi, aynı damarın normal kısmına göre 1,5 kat ve üzerinde genişlemesi olarak tanımlandı. Ayrıca KAE, diffüz ve fokal olmak üzere iki sınıfa ayrıldı. Diffüz ektazide damarın tüm segmentleri geniş iken, fokal ektazide tek bir segment geniş idi.

3.6. Biyokimyasal Analizler

Çalışmaya dahil edilmesi planlanan hastaların her birinden 10 saat açlık sonrasında sabah 08:00–09:00 arasında açlık kan şekeri, üre, kreatinin, aspartat transaminaz, alanin transaminaz, tiroid fonksiyon testleri, total kolesterol, trigliserid, yüksek dansiteli lipoprotein ve düşük dansiteli lipoprotein düzeyi ölçümü ve tam kan sayımı için venöz kan örneği alındı. Tüm tetkikler Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi biyokimya laboratuvarında çalışıldı.

3.7. Moleküler Analiz

3.7.1. Deoksiribonükleik Asit İzolasyonu

Tüm katılımcılardan eNOS786 T>C gen 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

3.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Yapılışı

Endotelyal nitrik oksit sentaz T-786C 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 siklуста 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 siklуста yapıldı. Son siklustan sonra 72 °C’de 180 saniye süren bir siklus daha yapılarak tamamlandı.

3.7.3. Agaroz Jel Elektroforeziyle PCR Kontrolü

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 oluşuncaya 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’den çıkarılan DNA örneğinden alınan 5 µl ile 1 µl loadin dye solusyonu karıştırıldı ve jelin kuyucuğuna ekildi. 90 volt, 22 amper akımda 10 dakika yürütüldü. Jel, Kodak Image Station 2000 MM cihazında görüntülenerek PCR’da amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.

3.7.4. 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 alkalin fosfataz kullanılarak ilgili gen dizilerine ait bantların renk gelişimi gözlemlendi.

3.7.5. Promotor Bölge eNOS 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.

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizi SPSS sürüm 15.0 programı kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenler, aritmetik ortalama \pm standart sapma kategorik değişkenler % olarak ifade edildi. Sürekli değişkenlerin grup karşılaştırılmasında two-tailed Student t-testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ise ki-kare testi kullanıldı. İki'den fazla grup ortalamaları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile normal dağılım göstermeyen ikiden fazla grup ortalamaları ise Kruskal-Wallis testiyle karşılaştırıldı. KAE için bağımsız risk faktörlerinin belirlenmesinde çok değişkenli lojistik regresyon analizi uygulandı. İstatistiksel olarak anlamlılık $p < 0.05$ olduğunda kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Klinik Özellikleri

KAE grubunda 65 hastanın yaş ortalaması 53 ± 6 (38-69), KAH grubunda 51 hastanın yaş ortalaması 55 ± 7 (35-68), kontrol grubundaki 65 bireyin ise yaş ortalaması 51 ± 7 (35-68)'idi. Gruplar arasında istatistiksel yönden fark yoktu ($p>0,05$). KAE grubundaki bireylerin 32'si (%49,2) erkek, 33'sü (%50,8) kadındır; KAH grubundaki bireylerin 25'i (%49) erkek, 26'ü (%51) kadındır, kontrol grubundaki bireylerin 33'i (%50,8) erkek, 32'ü (%49,2) kadındır. Cinsiyet yönünden de gruplar arasında fark yoktu ($p>0,05$) (Tablo-2).

Tüm hastaların KAH risk faktörleri kaydedildi. Gruplar arasında yaş, cinsiyet, hipertansiyon, heredite yönünden istatistiki olarak anlamlı fark yokken, hiperlipidemi her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0,05$) (Tablo-2). Hastaların demografik özellikleri Tablo-2'de özetlenmiştir.

Hiperlipidemi (HL) açısından üç grup ikili ikili karşılaştırıldıklarında; KAE ile normal koroner arasında ve KAE ile KAH grupları arasındaki fark önemsizdi (sırasıyla, $p>0,05$ ve $p>0,05$). Hiperlipidemi KAH grubunda normal koroner grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek saptandı ($p<0,05$). Hiperlipidemi açısından üç grup arasında yapılan anova analizinde anlamlılığın nedeni KAH grubunda normal koroner ve KAE grubuna göre önemli oranda HL'nin yüksek olmasıydı (Tablo-3).

Tablo 2. Hastaların demografik özellikleri

	KAE (n:65)	KAH (n:51)	Normal koroner (n:65)	P değeri
Yaş ortalaması (yıl)	53 ± 6	55 ± 7	51 ± 7	0,065
Cinsiyet(Erkek/kadın)	32/ 33 (%49,2/%50,8)	25/ 26 (%49 /%51)	33 / 32 (%50,8/%49,2)	0,978
Risk Faktörleri				
Hipertansiyon	20 (%30,8)	16 (%31,4)	12 (%18,5)	0,184
Hiperlipidemi	23 (%35,4)	27 (%52,9)	20 (%30,8)	0,041
Hereditate	11 (%16,9)	8 (%15,7)	16 (%24,6)	0,416
Sigara içimi	14 (%21,5)	16 (%31,4)	13 (%20)	0,376
VKİ (kg/m ²)	27,6±5,3	28,0±3,9	27,5±4,3	0,831
Sistolik TA (mmHg)	123,7±16,2	118,6±11,4	119,4±11,4	0,119
Diyastolik TA(mmHg)	76,1±10,7	74,7±8,2	74,2±8,3	0,527

Tablo 3. Grupların hiperlipidemi özellikleri

	KAE		KAH		Normal Koronerler		P1	P2	P3	P4
	n	%	n	%	n	%				
HL	23	(%35,4)	27	(%52,9)	20	(%30,8)	0,058	0,576	0,016	0,041

KAE: koroner ektazi, KAH: koroner arter hastalığı, p1: KAE ile KAH arası, p2: KAE ile normal koronerler arası, p3: KAH ile normal koronerler arası, p4: tüm gruplar arasındaki anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

4.2. Koroner Arter Ektazi Hastalarının Anjiyografik Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen 65 KAE hastasının %95,4'ünde LAD'de, %63,1'ünde Cx'de ve %67,7'sında RCA'da KAE bulunmakta idi. KAE bulunan hastalardan 7'inde tek damarda mevcut iken 58 hastada birden fazla damarda (25(%38,5)'i iki damar, 33 (%50,8)'ü üç damar) KAE vardı. KAE hastalarının anjiyografik özellikleri Tablo-4'de gösterilmiştir.

Koroner arter ektazili hastalarda ektatik segment dağılımı Tablo-5'de gösterilmiştir Çalışmamızda koroner arter ektazisi en sık LAD proksimal segmentte tespit edilmiş ve bunu LAD mid segmenti ve takiben RCA proksimal segmenti

izlemiştir. Ana koroner arterde ektazi oranı %18,5 olarak bulunmuştur. Etkilenen koroner arterlerde diffüz ektazi ise yine en çok sol ana koroner arterde gözlenmiştir.

Tablo 4. KAE hastalarının anjiyografik karakteristikleri

Ektazi lokalizasyonu	n	%
Sol ana koroner arter	12	(%18,5)
Sol ön inen koroner arter	62	(%95,4)
Sirkumfleks koroner arter	41	(%63,1)
Sağ koroner arter	44	(%67,7)
Ektatik damar sayısı		
Tek damar	7	(%10,8)
Çok damar	58	(%89,2)
İki damar	25	(%38,5)
Üç damar	33	(%50,8)

Tablo 5. Ektatik segment dağılımı

	LM	LAD prox.	LAD mid	LAD distal	Cx Prox.	Cx mid	Cx distal	RCA prox	RCA mid	RCA distal
n	12	62	51	40	41	38	35	43	42	42
%	18,5	95,4	79,7	61,5	63,1	58,5	53,8	66,2	64,6	64,6

LM: Ana koroner; LADp-LADm-LADd: Sol ön inen arter proksimal-mid-distal segmentler; Cxp, Cxm-Cxd: Sirkumfleks arter proksimal-mid-distal segmentler; RCAp-RCAm-RCAd: Sağ koroner arter proksimal-mid-distal segmentler.

4.3. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Gen T-876C Polimorfizm Genotipleri

eNOS Geni T876C polimorfizminin genotip açısından incelendiğinde KAE grubunda 6 (%9,2) olguda CC genotipi; 23 (%35,4) olguda TT genotipi; 36 (%55,4) olguda TC genotipi tespit edildi. KAH grubunda 5 (%9,8) olguda CC genotipi; 18(%35,3) olguda TT genotipi; 28(%54,9) olguda ise TC genotipinde tespit edildi. Ellibir bireyden oluşan kontrol grubunda ise 2 (%3,1) birey CC genotipi, 42 (%64,6) birey TT genotipi, 21 (%32,3) birey TC genotipinde bulundu (Tablo-6).

Her üç grup genotip dağılımlarına göre karşılaştırıldığında TT genotipleri yönünden aralarında anlamlı fark vardı (p=0,001). TT genotipi açısından üç grup ikili

ikili karşılaştırıldıklarında; KAE ile normal koroner arasında ve KAH ile normal koroner arasında anlamlılık tespit edildi (sırasıyla, $p= 0,001$ ve $p=0,003$). Ancak TT genotipi açısından KAE ile KAH grupları arasındaki fark önemsizdi ($p>0,05$). TT genotipi açısından üç grup arasında yapılan anova analizinde anlamlığın nedeni normal koroner grubun KAE ve KAH grubuna göre önemli oranda TT genotipinin yüksek olmasıydı (Tablo-6).

Her üç grup genotip dağılımlarına göre karşılaştırıldığında TC genotipleri yönünden aralarında fark anlamlı bulundu ($p=0,013$). TC genotipi açısından üç grup ikili ikili karşılaştırıldıklarında; KAE ile normal koroner arasında ve KAH ile normal koroner arasında anlamlılık tespit edildi (sırasıyla, $p= 0,008$ ve $p=0,014$). KAE ve KAH grubunda TC genotipi normal koroner grubuna göre anlamlı oranda yüksekti. Ancak TC genotipi açısından KAE ile KAH grupları arasındaki fark önemsizdi ($p>0,05$). TC genotipi açısından üç grup arasındaki anlamlığın nedeni normal koroner grubun KAE ve KAH gruplarına göre önemli oranda TC genotipinin düşük olmasıydı (Tablo-6).

Her üç grup genotip dağılımlarına göre karşılaştırıldığında; KAE ve KAH grubunda CC genotip sıklığı normal koroner grubuna göre yüksek oranda olmasına rağmen istatistiksel olarak bu fark önemsiz bulundu ($p=0,276$). Grupların ikili ikili karşıştırmalarında da aralarındaki fark önemsizdi ($p>0,05$), (Tablo-6).

Tablo 6. eNOS geni T-876C polimorfizminin genotip frekansları

	KAE		KAH		Normal Koronerler		P1	P2	P3	P4
	n	%	n	%	n	%				
TT genotipi	23	35,4	18	35,3	42	64,6	0,992	0,001	0,002	0,001
CC genotipi	6	9,2	5	9,8	2	3,1	0,917	0,144	0,131	0,276
TC genotipi	36	55,4	28	54,9	21	32,3	0,959	0,008	0,014	0,013

KAE: koroner ektazi, KAH: koroner arter hastalığı, p1: KAE ile KAH arası, p2: KAE ile normal koronerler arası, p3: KAH ile normal koronerler arası, p4: tüm gruplar arasındaki anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

En az bir C alleli (TC+CC, dominant model) taşıyan bireyler ile TT homozigot bireyler karşılaştırıldığında, üç grup arasında TC+CC genotipine sahip olanlarla TT genotipine sahip olanlar arasında anlamlı fark mevcuttu ($p=0,001$). TC+CC genotipi olanlar ile TT genotipi olanlar ikili ikili karşılaştırıldıklarında ise; KAE ile normal koroner arasında ve KAH ile normal koroner arasında anlamlı farklılık vardı (sırasıyla, $p= 0,001$ ve $p=0,002$). Ancak KAE ile KAH grupları arasında TC+CC genotipi olanlar ile TT genotipi olanlar arasındaki fark anlamsız olarak tespit edildi ($p>0,05$). Dominant modele göre üç grup arasındaki anlamlılığın nedeni; KAE ve KAH gruplarında kontrol grubuna göre TC+CC genotipi taşıyan bireylerin TT genotipi olan bireylerden önemli oranda yüksek olmasıydı (Tablo-7).

Resesif modele göre gerek üç grup arasında ve gerekse grupların ikili olarak karşılaştırılmalarında ise KAH ve KAE grubunda CC genotipi yüksek oranda olma olarak saptanmasına rağmen TT+TC genotipi genotipine sahip olanlar ile CC genotipine sahip olanlar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$). (Tablo-7).

Tablo 7. KAE, KAH ve normal koroner (kontrol) grupların dominant ve resesif modele göre genotip dağılımları

		KAE		KAH		Normal Koroner		P1	P2	P3	P4
		n	%	n	%	n	%				
Dominant Model	CC+TC genotipi	42	64,6	33	64,7	23	35,4	0,992	0,001	0,002	0,001
	TT genotipi	23	35,4	18	35,3	42	64,6				
Resesif Model	TT+TC genotipi	59	90,8	46	90,2	63	96,9	0,917	0,144	0,131	0,276
	CC genotipi	6	9,2	5	9,8	2	3,1				

KAE: koroner ektazi, KAH: koroner arter hastalığı, p1: KAE ile KAH arası, p2: KAE ile normal koronerler arası, p3: KAH ile normal koronerler arası, p4: tüm gruplar arasındaki anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

4.4. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen T-876C Polimorfizm Alel Frekansları

eNOS gen T-876C polimorfizmi allel açısından incelendiğinde; KAE grubunda; T aleli sıklığı 82 (KAE grubundaki alellerin %63,1'i), C aleli 48 (KAE grubundaki alellerin %36,9'u), KAH grubunda; T aleli 64 (KAH grubundaki alel sayısının %62,7'si), C aleli 38 (KAH grubundaki alel sayısının %37,3'ü) ve kontrol grubunda T aleli 105 (Kontrol grubundaki alellerin %80,8'i) ve C aleli 25 (Kontrol grubundaki alellerin %19,2'si) tespit edildi (Tablo-7). Her üç grub arasında hem T aleli sıklığı ve hemde C aleli sıklığı açısından anlamlı farklılık tespit edildi ($p=0,001$), (Tablo-8).

T aleli açısından üç grup ikili olarak kıyaslandığında; KAE ve KAH ile normal koroner arasında anlamlılık tespit edildi (sırasıyla, $p=0,001$ ve $p=0,001$). KAE ve KAH gruplarında T aleli kontrol grubuna göre anlamlı oranda daha düşüktü. Ancak T aleli açısından KAE ile KAH grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız tespit edildi ($p>0,05$), (Tablo-8).

C aleli açısından üç grup ikili olarak karşılaştırıldığında; KAE ve KAH ile kontrol grubu arasında anlamlılık tespit edildi (sırasıyla, $p=0,001$ ve $p=0,001$). KAE ve KAH grubunda C aleli normal koroner grubuna göre anlamlı oranda daha yüksekti. Ancak C aleli açısından KAE ile KAH grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız tespit edildi ($P=0,955$), (Tablo-8). KAE hastalığı olanlarda C alleli bulunması riski normal koroner grubuna göre 3.2 kez daha fazla tespit edildi (OR: 3.29, 95% CI: 0,133-0,553, $P:0.01$).

Tablo 8. eNOS geni T-876C polimorfizminin allel frekansları

	KAE		KAH		Normal Koronerler		P1	P2	P3	P4
	n	%	n	%	n	%				
T aleli	82	63,1	64	62,7	105	80,8	0,955	0,001	0,001	0,001
C aleli	48	36,9	38	37,3	25	19,2	0,955	0,001	0,001	0,001

KAE: koroner ektazi, KAH: koroner arter hastalığı, p1: KAE ile KAH arası, p2: KAE ile normal koronerler arası, p3: KAH ile normal koronerler arası, p4: tüm gruplar arasındaki anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

4.5. Tek Damar ve Çok Damar Tutulumunda Mutasyon Seviyeleri

KAE hastaları tek damar tutulumu olan hasta sayısı 4, çok damar tutulumu olan hasta sayısı 19 idi. Dominat modele (CC+TC) göre tek damar ve çok damar açısından bakıldığında; mutasyon değerleri çok damar tutulumunda daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Tek damar ve çok damar tutulumunda mutasyon seviyeleri Tablo-9'da özetlenmiştir.

Tablo 9. Tek damar ve çok damar tutulumunda mutasyon varlığı

	Tek damar tutulumu	Çok damar tutulumu	P
Mutasyon (CC+TC, dominant Model)	4(%57,1)	19(%32,8)	0,202
Normal genotip(TT)	3(%42,9)	39(%67,2)	

4.6. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz T-786C Mutasyonu ve Kardiyovasküler Risk Faktörleri

Üç grubun toplam 181 hastasında heterozigot veya homozigot mutasyonu olanlar (En az bir C alleli, TC+CC, dominat model) ile TT homozigot (mutasyonu olmayan bireyler) olanlar kardiyovasküler risk faktörleri açısından değerlendirildi. Heterozigot veya homozigot mutasyonu olan 98 hasta ile mutasyonu olmayan 83 hasta kardiyovasküler risk faktörleri açısından karşılaştırıldığında; HT ve sigara içimi mutasyonu olanlarda anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla, $p:0,002$ ve $p:0,001$). Yaş, cinsiyet, hiperlipidemi ve VKİ mutasyonu olanlar ve olmayanlar arasında anlamlı fark yoktu (Tablo-10).

Tablo 10. eNOS T-786 C mutasyonu ve kardiyovasküler risk faktörleri

Risk faktörleri	Mutasyon (+) (TC+CC genotipleri) n:98	Mutasyon (-) (TT genotipi) n:83	P
Yaş	54±8	52±7	0,213
Cinsiyet(E/K)	51(%52)/47(%48)	39(%47)/44(%53)	0,498
Hipertansiyon	35(%35,7)	13(%15,7)	0,002
Sigara içimi	33(%34)	11(%13,3)	0,001
Hiperlipidemi	40(%40,8)	30(%36,1)	0,520
Hereditate	21(%21,6)	14(%16,9)	0,419
KAE varlığı	23(%27,7)	42(%42,9)	0,034

KAE ile mutasyon arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için mutasyon ile ilişkili değişkenlerden p değeri 0,10'den küçük olan değişkenler (Hipertansiyon, sigara, KAE varlığı) çoklu regresyon analizine tabi tutuldu. Yapılan çoklu regresyon analizinde mutasyon (Dominat model, CC+TC ile TT) ile ilişkili tek değişken KAE varlığı idi (P:0,002, odds oranı:3,30, %95 güven aralığı: 1,57-6,93). Tablo 11'da mutasyonu olan ve olmayan (Dominat model, CC+TC ile TT) hastalar arasında bağımsız risk faktörlerinin belirlenmesi için uygulanan çok değişkenli lojistik regresyon analizi sonuçları gösterildi. Elde edilen veriler KAE'nin heterozigot veya homozigot mutasyon varlığı (En az bir C alleli (TC+CC, dominant model) için bağımsız bir belirleyici olduğunu göstermektedir.

Tablo 11. Mutasyon (CC+TC ile TT (dominant model)) varlığı ile ilişkili bağımsız risk faktörlerinin belirlenmesi için uygulanan çok değişkenli lojistik regresyon analizi sonuçları

	ODDS Oranı	%95 güven aralığı	P
CC+TC ile TT (dominant model)	3,3	1,57-6,93	0,002

5. TARTIŞMA

Endotel; damar yapısının korunmasında ve damar işlevlerinin devamlılığının sağlanmasında en önemli homeostatik düzenleyicidir. NO endotelin en önemli görevleri olan vazodilatasyonun sağlanması, düz kas hücre büyümesinin ve inflamatuvar yanıtın baskılanması gibi fonksiyonlarında temel rol oynadığı bilinmektedir (176). Endotelden düzenli olarak salınan ve eNOS enzimi tarafından sentezlenen NO vasküler yatakta koruyucu etki göstermektedir (33). Endotelyal NO; eNOS enzimi tarafından eNOS enzimide 7. kromozomda bulunan eNOS geni tarafından düzenlenmektedir

Son yıllarda eNOS enzimini kodlayan gende ekson, intron ve promotor bölgelerinde pek çok polimorfizm ve çeşitli mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonların gen ekspresyonunda ve eNOS enziminde çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olduğu ve bunlara bağlı olarak da NO dengesinin bozulduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (150, 151). eNOS gen polimorfizminde NO metabolizmasının bozulması ve endotel disfonksiyonuna bağlı olarak; hızlanmış ateroskleroz, vasküler remodelingde bozulma, aort anevrizma gelişimi ve çeşitli kardiyovasküler hastalıkların gelişebildiği yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (21, 33, 131).

Endotelyal nitrik oksit sentaz T-786C polimorfizmi genin promotor bölgesindeki 786 numaralı timin (T) bazı ile sitozin (C) bazının yer değiştirdiği nokta mutasyonu olarak ifade edilmektedir.

Düzensiz salınan NO'nun damar duvarında zayıflıklara ve hasara neden olarak vasküler anevrizma gelişimine yol açtığı düşünülmektedir (33). NO sentezinin düzensizliği, ekstrasellüler matriksin önemli bir yapıtaşı olan elastin proteininin miktarını etkileyerek damar duvarının zayıflamasına neden olduğu bildirilmiştir (40). NO'nun anevrizmal hastalıklarda belirgin bir rol oynadığını gösteren kanıtlar giderek artmaktadır (93). İnsan aort anevrizmalarında NO'nun major metaboliti olan nitrit düzeylerinin normal aortu olanlara göre yedi kat arttığı ve artan nitritin invitro olarak elastini parçalayacak seviyede olduğu tespit edilmiştir (95).

Endotelial nitrik oksit sentaz gen polimorfizminin; hızlanmış ateroskleroz, ateroskleroz hastalık paterninde değişme, endotel disfonksiyonu, artmış vasküler inflamasyon, matriks metalloproteinaz aktivitesi ve proliferatif etki gibi bir çok patolojik durumlarda rol oynadığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (24, 28, 95, 134, 141, 155, 158, 161, 162). Bütün bu faktörlerin KAE patofizyolojisinde de temel rol oynadığı bilinmektedir (11, 13, 50, 83, 84). Bu çalışmada eNOS geninde sık karşılaşılan polimorfizmlerden olan, promotör bölge T-786 C mutasyonu ile KAE gelişimi arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla çalışma ve kontrol gruplarının bireylerinden elde edilen DNA'larda eNOS geninin polimorfizmlerine bakılarak her iki grup arasında alel ve genotip dağılımı açısından farklılık olup olmadığı incelenmiştir.

Colombo ve arkadaşları (36) eNOS genindeki T-786 C mutasyonunun İtalyan toplumunda KAH ve yaygınlığı ile olan ilişkisini incelemişler ve CC homozigot bireylerin TT homozigotlara göre 2.5 kat daha fazla KAH'ye yakalanma riski gösterdiklerini ve koroner ateroskleroz yaygınlığının da bu bireylerde artmış olduğunu bildirmişlerdir. Rossi ve arkadaşları (37) da KAH'larında eNOS T-786C polimorfizmi ile ilgili yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar elde etmişler ve hastalık riskini daha yüksek (%69) bulmuşlardır. C allelinin diğer koroner risk faktörleriyle birlikte değerlendirildiği çok değişkenli lojistik regresyon analizinde, C alleli taşıyan bireylerde KAH riski 3.6 kat fazla görülmüştür.

Ülkemizden Tangürek ve arkadaşlarının (172) eNOS T-786 C gen polimorfizminin KAH ile ilişkisini araştırdıkları çalışmada; C dominant bireylerde KAH'nin 2.9 kat fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Türk toplumunda KAH varlığı ve yaygınlığı için bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceğini bildirmişlerdir. Berdeli ve arkadaşları'da (173) Türk toplumunda Glu298Asp polimorfizminin prematür KAH için bir risk faktörü olabileceğini ortaya koymuşlardır.

Yapılan bir çalışmada, T-786C polimorfizminin homozigot CC genotipine sahip hastalarda kontrol grubundaki hastalara oranla 2 kat daha fazla ülseratif plak oluşumu saptanmıştır (171). Ayrıca eNOS T-786C mutasyonunda koroner arter spazmı (35), miyokard infarktüsü (38) ve hipertansiyonla (39) gibi çeşitli kardiyovasküler patolojilerle olan ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda; eNOS promotor bölge T-786C polimorfizmi değerlendirilmesinde TC genotipi ve en az bir C alleli taşıyan (TC+CC, dominant model) genotiplerin frekansı hem KAE, hemde KAH grublarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olarak saptanmıştır. KAE hastalığında bağımsız risk faktörlerinin belirlenmesi için uygulanan çok değişkenli “lojistik regresyon analizinde” de mutasyon varlığı (TC+CC, dominant model) ile ilişkili tek değişken olarak KAE varlığı tespit edilmiştir. Yine alel bazında yapılan değerlendirme sonuçlarında da KAE hastalığı olanlarda C alleli bulunması riskinin normal koroner grubuna göre 3.2 kez daha fazla olduğu tespit edildi. Çalışmamız, bu şekliyle yapılan ilk çalışma olup literatür taramasında KAE ve eNOS gen polimorfizmi ile ilgili veriye rastlamadık.

Çalışmamızdaki KAH grubu ile KAE grubu genotip ve alel dağılımı açısından değerlendirildiğinde iki grup arasında istatistiksel farklılık yoktu (sırasıyla, $p>0,05$ ve $p>0,05$). Yani KAH ve KAE grupları eNOS T-786C gen polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde benzer polimorfik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmadaki KAH grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında; TC genotipi ve en az bir C alleli taşıyan (TC+CC, dominant model) bireyler TT homozigot bireylere göre anlamlı olarak daha yüksek oranda idi (sırasıyla, $p= 0,014$ ve $p=0,002$). Alel dağılımı açısından da KAH grubunda C aleli sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı oranda daha fazla tespit edildi ($p=0,001$). KAH açısından çalışma bulgularımız yukarıda bahsedilen literatür bulguları ile benzer özellikler göstermektedir.

Bu bulgulardan hareketle; istatistiksel olarak KAH ve KAE’de eNOS T-786C polimorfizminin anlamlı saptanması ve KAH ile KAE’nin eNOS T-786C polimorfizmi açısından benzer polimorfik özellik göstermesi nedeniyle etyopatogenezinde büyük oranda aterosklerozun sorumlu tutulduğu ve KAH varyantı olarak değerlendirilen KAE gelişmesinde eNOS T-786C polimorfizmi önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Literatürde, eNOS polimorfizmi ve damar genişlemesi arasındaki ilişkiyi gösteren veriler sınırlıdır. Fatini ve arkadaşlarının (28) abdominal aort anevrizmalı hastalarda yaptığı çalışmada; anevrizmalı hastalarda ve kontrol grubunda eNOS

Glu298Asp (G894T) polimorfizmini araştırmıştır. Yaptığı alışma sonucunda geleneksel risk faktörleri dışında eNOS Glu298Asp (G894T) polimorfizminin abdominal aort anevrizmasına yatkınlık oluşturan bir faktör olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada araştırılan diğer bir eNOS polimorfizm olan intron 4 VNTR polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ülkemizden Atlı ve arkadaşları (177) yaptıkları çalışmada ise abdominal aort anevrizma hastalarında eNOS Glu298Asp polimorfizminin risk faktörü olabileceğini bildirmişlerdir.

Literatürde eNOS T-786 C mutasyonunun damar genişlemesi ile pozitif ilişkisi olduğunu gösteren tek alışması Khurana ve arkadaşlarının (33) yaptıkları intrakranial anevrizma (İA) apı ile ilgili çalışmadır; bu çalışmada eNOS T-786 C polimorfizminin büyük İA apı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Anevrizması apı >10mm olan 13 hastanın hepsinin heterozigot polimorfizmi olduğu, İA'lı hastaların %56'sında anevrizma çapı 0-5 mm olan 9 hasta (İA hastaların %56'sı) ve anevrizma çapı 6-9 mm olan 22 hastanın (İA hastaların %53'si) heterozigot polimorfizmi olduğu tespit etmişlerdir. Oysa Akagawa ve arkadaşları (178) yaptıkları bir çalışmada kafa içi anevrizma boyutu ile eNOS geni T-786C polimorfizmi arasında bir ilişki saptamamışlardır. Ayrıca Krex ve arkadaşları da (24) Avrupa toplumunda eNOS 786T >C, 894G > T ve VNTR polimorfizimleri ile intrakranial anevrizma arasında ilişki tespit etmemişlerdir. İntrakraniyal anevrizma ve eNOS geni T-786C polimorfizmi arasındaki bu farklı verilerin olması diğer gen polimorfizminde de olduğu gibi polimorfizm bulgularının yapılan ülkelere ve ırklara göre farklılıklar göstermesinden dolayı kaynaklanabileceği düşündürmektedir (40, 150).

Göz önünde bulundurulması gereken diğer bir konu ise, dominat modele göre mutasyonu olan (TC+CC) ve mutasyonu olmayan (TT) genotipindeki bireyler karşılaştırıldığında sigara içimi ve hipertansiyonun mutasyonu olan hastalarda yüksek oranda tespit edilmiş olmasıdır. Ancak bu risk faktörlerinin KAE'sinde mutasyon olup olmasına etkisinin değerlendirildiği regresyon analizinde istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmemiştir. Bu durum, gen mutasyonuna neden olabilecek risk faktörlerinin ve çevresel faktörlerin olup olmadığı sorusunu akla getirebilir. Bu konuyla ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

Risk faktörlerinden sigara kullanımı ile T-786 C mutasyonunun birlikte olduğu durumlarda KAH riskinin, koroner ateroskleroz ciddiyetinin ve Mİ sıklığının arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (179-181). Bütün bu çalışmalar, sigara tüketimi ve eNOS genindeki mutasyonların birlikteliğinin endotel disfonksiyonu ve aterosklerozu hızlandırdığını gösterebilir; ancak, sigaranın bu mutasyonlara neden olabileceği konusuna çalışma verilerine göre açıklık getirmemektedir.

Çalışma grublarının toplamında dominant modele (TC+CC genotipi) göre mutasyon varlığı ile hipertansiyon birlikteliği; yapılmış çok sayıda çalışmada eNOS gen polimorfizmin hipertansiyona predispozan bir faktör olduğu tespit edilmiştir (39, 150, 152). Bizim çalışma verilerimizde literatürle aynı doğrultuda olup dolayısıyla eNOS T-786C polimorfizminin hipertansiyona yatkınlığı artırdığını düşündürmektedir.

Koroner arter ektazilerinin abdominal ve asendan aort anevrizmaları ile sıklıkla birlikte görülebildikleri, aortik ve koroner ektaziler arasında ateroskleroz gibi benzer patogenetik mekanizmaların olduğu bilinmektedir (55). eNOS gen polimorfizminin aort anevrizmalarında risk faktörü olarak tespit edilmesi ve çalışmamızda da KAE'sinde eNOS T-786 C mutasyonunun anlamlı olarak saptanması nedeniyle literatür verileri dolaylı olarak çalışmamızı desteklemektedir.

Kim ve arkadaşlarının (40) Behçet hastalığı ve vaskülitli olan diğer romatizmal hastalarında yaptıkları araştırmada eNOS gen polimorfizminin bazı vaskülitler gibi damarsal patolojilerin gelişiminde katkıda bulunduğu göstermişlerdir. KAE etyopatogezinde artmış vasküler inflamatuvar yanıt ve çeşitli vaskülitlerin rol oynadığı bilinmekte olup eNOS polimorfizmi ile vaskülitler arasında tespit edilmiş olan bu anlamlılık çalışma bulgularımızı destekleyen bir diğer veridir (3, 4, 11, 42).

Rudic ve arkadaşlarının (21) çalışmalarında sıçan modellerinde elde ettikleri deneysel veriler göstermiştir ki eNOS yokluğunda damarsal remodeling bozulmakta, damar duvar kalınlığı artmakta ve damar duvarı geometrisi bozulmaktadır. Kuhlencordt ve arkadaşları da (131) NO baskılanmasıyla çeşitli vasküler hastalıkların ve özellikle aort anevrizmasının geliştiğini göstermişlerdir. Krex ve arkadaşları (24) anevrizma gelişmesinde eNOS'un ekstrasellüler matriks remodelingini etkileyerek rol oynayabileceğini bildirmiştir. Bütün bu verilerin KAE

patogenezinde de direkt veya indirekt olarak rol oynadığı bilinmektedir (11). Bütün deneysel ve klinik veriler ışığında eNOS gen polimorfizminin KAE etyopatogenezinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları olarak şunlar sayılabilir; hasta sayısının az olması, çalışma gruplarının oluşturulduğu göller bölgesinde gen polimorfizmini etkileyebileceği düşünülen herbisit maruz kalma ve florozis gibi faktörlerin olmasıdır. Herbisit ve florozis gibi faktörlerin kantitatif olarak çalışma gruplarında araştırılmaması ve gen polimorfizmi ile ilişkisinin değerlendirilememesi, eNOS gen polimorfizmi ile senkronize olarak eNOS, NO ve cGMP'nin moleküler düzeylerinin belirlenmemesi ve polimorfizm ile bunlar arasında bunlar arasındaki direkt bir ilişki olup olmadığının bildirilmemesidir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızın bulguları, eNOS T-786 C mutasyonunun Isparta bölgesinde KAE için bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceği yönündedir. Bu bulgu potansiyel anlamda önemlidir. Ancak bu birliktelik ırklar arasında farklılık gösterebileceğinden bizim çalışmamıza benzer çalışmalar başka ırklarda da yapılmalıdır. KAE hastalığından sorumlu genlerin bulunması, hastalıkların erken tanısına ve tedavisine bireysel olarak sağlayacaktır.

ÖZET

İzole Koroner Arter Ektazi Hastalarında Endotelial Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizminin (T-786 C) Araştırılması

Koroner arter ektazisi (KAE), koroner arterlerin anormal dilatasyonu ile karakterize olan ve koroner arter hastalığı (KAH) varyantı olarak kabul edilen bir hastalıktır. KAE etyopatogenezinden büyük oranda ateroskleroz sorumlu tutulmaktadır. Aterosklerotik koroner arterlerde özellikle plak kümelenmesinin olduğu erken evrede plak rüptürü ve plak yükünde artmaya bağlı olarak damarda genişleyici şekilde yeniden şekillenme olduğu bilinmektedir. KAE henüz tam bir kesinlik kazanmamakla birlikte ateroskleroza farklı şekilde gelişen genişleyici bir yeniden şekillenme yanıtı olarak değerlendirilmektedir. KAE patogenezinde temel nokta media tabakasının mükuloelastik elementlerinin destrüksiyonu, kollajen ve elastin birikimi ve sonuçta damar duvarının incelmesidir.

Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ezimini damar duvarı düz kas hücre tonusunun ve damar çapının düzenlenmesinde önemli görevleri olup damar duvarında yapısal, morfolojik ve fonksiyonel önemli rol oynamaktadır. eNOS T-786 C gen polimorfizmi gen ve buna bağlı ürünlerinde önemli fonksiyonel değişikliklerle ilişkili olabilmektedir. Deneysel ve klinik çalışmalarda eNOS yokluğunda endotelial fonksiyonlarda ve lümenal remodellingin bozulduğu, damar duvarı kalınlığında artma, ateroskerozda hızlanma ve komplike hale geldiği gösterilmiştir. Bu çalışmada göller bölgesinde izole KAE hastalarında eNOS T-786 C gen polimorfizmi araştırıldı.

Çalışmaya 65 izole KAE hastası, 51 koroner arter hastalığı ve kontrol grubu olarak normal koronerlerden oluşan 65 birey dahil edildi. eNOS T-786 C gene polimorfizmi polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi yöntemi ile tespit edildi. KAE için risk faktörleri multivariyet lojistik regresyon analizine tabi tutuldu. Gruplar arasında Genotipik ve alelik dağılım açısından gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edildi. Genotip dağılımında; TC genotip sıklığı KAE grubunda anlamlı derecede yüksek olarak tespit edildi. (Üç grup arasında; p:0,013, TC genotip sıklığı KAE ile kontrol grubu arasında; p: 0,008). KAE hastalarında en az bir C aleli taşıyan (TC+CC, C dominant model) genotipi TT homozigot normal genotipe göre anlamlı derecede yüksek olarak tespit edildi. (Üç grup arasında p: 0.001, KAE ile kontrol grubu arasında p:0,001). Alel dağılımında da C aleli sıklığı KAE grubunda anlamlı derecede yüksek olarak tespit edildi (Üç grup arasında; p:0,001, KAE ile kontrol grubu arasında; p: 0,001). Multivariyet lojistik regresyon analizinde C dominant bireylerde KAE 3,3 kat daha yüksek olarak tespit edildi. (odds oranı: 3,3, 95% güven aralığı: 1,57-6,93; p: 0,002).

Sonuç olarak çalışmamızın bulguları; eNOS gen T-786 C mutasyonunun göller bölgesinde KAE varlığı için bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceği yönündedir.

Anahtar kelimeler: Alel, koroner ektazi/genetik, DNA/analiz, nitrik oksit/genetik, polimorfizim

SUMMARY

The Relationship Between Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism (T-786 C) and Isolated Coronary Artery Ectasia

Coronary artery ectasia (CAE) is defined as local or generalized aneurysmal dilatation of the coronary arteries. Although the etiology of CAE has not been identified completely, the most frequent cause is coronary atherosclerosis. It is known that an expansive remodelling occurs in atherosclerotic coronary arteries due to plaque rupture and increased plaque burden particularly in early stages. Enzymatic degradation of the extracellular matrix of the media, accumulation of collagen and elastine and eventually slimming of the vessel wall are the basic points of underlying pathophysiologic process that leads to ectasia.

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) has important role in modulating smooth muscle tonus and vessel diameter. T-786 C polymorphism of the eNOS gene has been associated with altered function of this gene and its products. Experimental and clinical data suggesting that; in the absence of eNOS, endothelial functions and luminal remodeling is impaired, the vessel wall thickness is increased, atherosclerosis accelerated and got complicated. In this study, we investigated the eNOS gene polymorphism (T-786 C) in patients with CAE who live in the lakes district.

65 patients with isolated CAE, 51 patients with CAD and 65 controls were included in the study. eNOS T-786 C gene polymorphisms were analysed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (RFLP). Risk factors for CAE were analyzed by a multivariate logistic regression analysis.

Genotypical and allelic distribution significantly differed among the groups. With respect to genotypical distribution (TT, TC, vs CC), the frequency of the TC genotype was higher in CAE and CAD groups (TC genotype frequency among three groups; p: 0,013, between CAE and control group; p: 0,008). Compared with TT homozygotes, the number of patients carrying at least one C allele (TC+CC, C dominant model) was significantly higher in CAE and CAD patients (Among the three groups p: 0.001, between CAE and control group; p: 0,001). With respect to allelic distribution (T vs C, additive model), the frequency of the C (cytosine) allele was higher in CAE and CAD patients (C allele frequency among the three groups; p: 0,001, between CAE and control groups; p: 0,001). Multivariate logistic regression showed that C-dominant individuals had a 3,3-fold likelihood of CAE (odds ratio 3,3, 95% confidence interval 1,57-6,93; p: 0,002).

In conclusion; our data suggest that the T-786 C polymorphism of the eNOS gene may be assessed as a risk factor in the occurrence of CAE in people living in the lakes district.

Key words: Alleles; coronary ectasia/genetics; DNA/analysis; genetic predisposition to disease; nitric oxide synthase/genetics; polymorphism.

KAYNAKLAR

1. Pahlavan PS, Niroomand F. Coronary artery aneurysm: a review. *Clin Cardiol.* 2006 Oct;29(10):439-43.
2. Manginas A, Cokkinos DV. Coronary artery ectasias: imaging, functional assessment and clinical implications. *Eur Heart J.* 2006 May;27(9):1026-31.
3. Falsetti HL, Carrol RJ. Coronary artery aneurysm. A review of the literature with a report of 11 new cases. *Chest.* 1976 May;69(5):630-6.
4. Befeler B, Aranda MJ, Embi A, Mullin FL, El-Sherif N, Lazzara R. Coronary artery aneurysms: study of the etiology, clinical course and effect on left ventricular function and prognosis. *Am J Med.* 1977 Apr;62(4):597-607.
5. Swaye PS, Fisher LD, Litwin P, Vignola PA, Judkins MP, Kemp HG, et al. Aneurysmal coronary artery disease. *Circulation.* 1983 Jan;67(1):134-8.
6. Sharma SN, Kaul U, Sharma S, Wasir HS, Manchanda SC, Bahl VK, et al. Coronary arteriographic profile in young and old Indian patients with ischaemic heart disease: a comparative study. *Indian Heart J.* 1990 Sep-Oct;42(5):365-9.
7. Akcay S, Turker Y, Ozaydin M, Yucel H, Altinbas A. Frequency of coronary artery ectasia among patients undergoing cardiac catheterization. *Anadolu Kardiyol Derg.* Apr;10(2):191.
8. Rath S, Har-Zahav Y, Battler A, Agranat O, Rotstein Z, Rabinowitz B, et al. Fate of nonobstructive aneurysmatic coronary artery disease: angiographic and clinical follow-up report. *Am Heart J.* 1985 Apr;109(4):785-91.
9. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1987 May 28;316(22):1371-5.
10. Schoenhagen P, Ziada KM, Kapadia SR, Crowe TD, Nissen SE, Tuzcu EM. Extent and direction of arterial remodeling in stable versus unstable coronary syndromes: an intravascular ultrasound study. *Circulation.* 2000 Feb 15;101(6):598-603.
11. Antoniadis AP, Chatzizisis YS, Giannoglou GD. Pathogenetic mechanisms of coronary ectasia. *Int J Cardiol.* 2008 Nov 28;130(3):335-43.
12. Markis JE, Joffe CD, Cohn PF, Feen DJ, Herman MV, Gorlin R. Clinical significance of coronary arterial ectasia. *Am J Cardiol.* 1976 Feb;37(2):217-22.
13. Dogan A, Tuzun N, Turker Y, Akcay S, Kaya S, Ozaydin M. Matrix metalloproteinases and inflammatory markers in coronary artery ectasia: their relationship to severity of coronary artery ectasia. *Coron Artery Dis.* 2008 Dec;19(8):559-63.
14. Mason DP, Kenagy RD, Hasenstab D, Bowen-Pope DF, Seifert RA, Coats S, et al. Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res.* 1999 Dec 3-17;85(12):1179-85.
15. Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, de Kleijn DP, Teepen H, van der Wal AC, et al. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis.* 2000 Jun;150(2):245-53.

16. Kruger D, Stierle U, Herrmann G, Simon R, Sheikhzadeh A. Exercise-induced myocardial ischemia in isolated coronary artery ectasias and aneurysms ("dilated coronopathy"). *J Am Coll Cardiol*. 1999 Nov 1;34(5):1461-70.
17. Sorrell VL, Davis MJ, Bove AA. Current knowledge and significance of coronary artery ectasia: a chronologic review of the literature, recommendations for treatment, possible etiologies, and future considerations. *Clin Cardiol*. 1998 Mar;21(3):157-60.
18. Ge J, Liu F, Kearney P, Gorge G, Haude M, Baumgart D, et al. Intravascular ultrasound approach to the diagnosis of coronary artery aneurysms. *Am Heart J*. 1995 Oct;130(4):765-71.
19. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30;329(27):2002-12.
20. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373-6.
21. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*. 1998 Feb 15;101(4):731-6.
22. Pipili-Synetos E, Sakkoula E, Maragoudakis ME. Nitric oxide is involved in the regulation of angiogenesis. *Br J Pharmacol*. 1993 Apr;108(4):855-7.
23. Nakaki T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 1990 Dec 15;189(6):347-53.
24. Krex D, Fortun S, Kuhlisch E, Schackert HK, Schackert G. The role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genetic variants in European patients with intracranial aneurysms. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006 Oct;26(10):1250-5.
25. Fernandez-Hernando C, Fukata M, Bernatchez PN, Fukata Y, Lin MI, Bredt DS, et al. Identification of Golgi-localized acyl transferases that palmitoylate and regulate endothelial nitric oxide synthase. *J Cell Biol*. 2006 Jul 31;174(3):369-77.
26. Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, Charbonneau F, Delagrangé D, Creager MA, et al. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1995 Feb 23;75(6):71B-4B.
27. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide*. 2006 Dec;15(4):265-79.
28. Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Bolli P, Sestini I, Falciani M, et al. eNOS G894T polymorphism as a mild predisposing factor for abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2005 Sep;42(3):415-9.
29. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, et al. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1995 Apr;95(4):1747-55.
30. Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, et al. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest*. 1998 Dec 15;102(12):2061-71.
31. Kugiyama K, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Fujimoto K, Nakao K, et al. Nitric oxide activity is deficient in spasm arteries of patients with coronary spastic angina. *Circulation*. 1996 Aug 1;94(3):266-71.

32. Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1994 May;14(5):753-9.
33. Khurana VG, Sohni YR, Mangrum WI, McClelland RL, O'Kane DJ, Meyer FB, et al. Endothelial nitric oxide synthase T-786C single nucleotide polymorphism: a putative genetic marker differentiating small versus large ruptured intracranial aneurysms. *Stroke*. 2003 Nov;34(11):2555-9.
34. 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.
35. 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.
36. Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem*. 2003 Mar;49(3):389-95.
37. 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.
38. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, et al. T(-786)--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am J Cardiol*. 2000 Sep 15;86(6):628-34.
39. 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.
40. Kim JU, Chang HK, Lee SS, Kim JW, Kim KT, Lee SW, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis*. 2003 Nov;62(11):1083-7.
41. Yetkin E, Waltenberger J. Novel insights into an old controversy: is coronary artery ectasia a variant of coronary atherosclerosis? *Clin Res Cardiol*. 2007 Jun;96(6):331-9.
42. Hartnell GG, Parnell BM, Pridie RB. Coronary artery ectasia. Its prevalence and clinical significance in 4993 patients. *Br Heart J*. 1985 Oct;54(4):392-5.
43. Packard M, Wechsler HF: Aneurysm of coronary arteries. *Arch Intern Med* 1929;43:1-14.
44. Yamanaka O, Hobbs RE. Coronary artery anomalies in 126,595 patients undergoing coronary arteriography. *Cathet Cardiovasc Diagn*. 1990 Sep;21(1):28-40.
45. Oliveros RA, Falsetti HL, Carroll RJ, Heinle RA, Ryan GF. Atherosclerotic coronary artery aneurysm. Report of five cases and review of literature. *Arch Intern Med*. 1974 Dec;134(6):1072-6.
46. National Heart, Lung, and Blood Institute Coronary Artery Surgery Study. A multicenter comparison of the effects of randomized medical and surgical treatment of mildly symptomatic patients with coronary artery disease, and a registry of consecutive patients undergoing coronary angiography. *Circulation*. 1981 Jun;63(6 Pt 2):11-81.

47. Daoud AS, Pankin D, Tulgan H, Florentin RA. Aneurysms of the coronary artery. Report of ten cases and review of literature. *Am J Cardiol.* 1963 Feb;11:228-37.
48. Akyürek O, Berkalp B, Sayın T, Dinçer İ, Kervancıoğlu C, Oral D. İzole koroner arter ektazisinde azalmış koroner arter rezervi. *MN kardiyoloji Dergisi* 2001;8:161-7.
49. Altınbaş A, Nazlı C, Kinay O, Ergene O, Gedikli O, Ozaydin M, et al. Predictors of exercise induced myocardial ischemia in patients with isolated coronary artery ectasia. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2004 Feb;20(1):3-17.
50. Demopoulos VP, Olympios CD, Fakiolas CN, Pissimissis EG, Economides NM, Adamopoulou E, et al. The natural history of aneurysmal coronary artery disease. *Heart.* 1997 Aug;78(2):136-41.
51. Sadr-Ameli M, Sharifi M. The natural history of ectatic coronary artery disease. *Iranian Heart J.* 2001;2:12-6. .
52. Iliá R, Kafri C, Carmel S, Goldfarb B, Gueron M, Battler A. Angiographic follow-up of coronary artery ectasia. *Cardiology.* 1995;86(5):388-90.
53. Swanton RH, Thomas ML, Coltart DJ, Jenkins BS, Webb-Peploe MM, Williams BT. Coronary artery ectasia--a variant of occlusive coronary arteriosclerosis. *Br Heart J.* 1978 Apr;40(4):393-400.
54. Nyamu P, Ajit MS, Joseph PK, Venkitachalam L, Sugirtham NA. The prevalence and clinical profile of angiographic coronary ectasia. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2003 Jun;11(2):122-6.
55. Chrissoheris MP, Donohue TJ, Young RS, Ghantous A. Coronary artery aneurysms. *Cardiol Rev.* 2008 May-Jun;16(3):116-23.
56. Onoda K, Tanaka K, Yuasa U, Shimono T, Shimpo H, Yada I. Coronary artery aneurysm in a patient with Marfan syndrome. *Ann Thorac Surg.* 2001 Oct;72(4):1374-7.
57. Trevelyan J, Been M, Patel R. Multiple coronary aneurysms in a patient with neurofibromatosis type 1: case report and intravascular ultrasound of aneurysm. *Postgrad Med J.* 2001 Jan;77(903):45-7.
58. Hadimeri H, Lamm C, Nyberg G. Coronary aneurysms in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 1998 May;9(5):837-41.
59. Hsi DH, Ryan GF, Hellems SO, Cheeran DC, Sheils LA. Large aneurysms of the ascending aorta and major coronary arteries in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Mayo Clin Proc.* 2003 Jun;78(6):774-6.
60. Koletis T, Seferlis C, Galanis C. Aneurysm of the left coronary artery stem. *Hellenic J Cardiol.* 2002;43:68-70.
61. Maehara A, Mintz GS, Ahmed JM, Fuchs S, Castagna MT, Pichard AD, et al. An intravascular ultrasound classification of angiographic coronary artery aneurysms. *Am J Cardiol.* 2001 Aug 15;88(4):365-70.
62. Gulec S, Aras O, Atmaca Y, Akyurek O, Hanson NQ, Sayin T, et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is a potent risk factor for coronary artery ectasia. *Heart.* 2003 Feb;89(2):213-4.
63. Sudhir K, Ports TA, Amidon TM, Goldberger JJ, Bhushan V, Kane JP, et al. Increased prevalence of coronary ectasia in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation.* 1995 Mar 1;91(5):1375-80.

64. Yilmaz H, Sayar N, Yilmaz M, Tangurek B, Cakmak N, Gurkan U, et al. [Coronary artery ectasia: clinical and angiographical evaluation]. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2008 Dec;36(8):530-5.
65. Berkoff HA, Rowe GG. Atherosclerotic ulcerative disease and associated aneurysms of the coronary arteries. *Am Heart J*. 1975 Aug;90(2):153-8.
66. Stajduhar KC, Laird JR, Rogan KM, Wortham DC. Coronary arterial ectasia: increased prevalence in patients with abdominal aortic aneurysm as compared to occlusive atherosclerotic peripheral vascular disease. *Am Heart J*. 1993 Jan;125(1):86-92.
67. Sorrell VL, Davis MJ, Bove AA. Origins of coronary artery ectasia. *Lancet*. 1996 Jan 20;347(8995):136-7.
68. Aqel RA, Zoghbi GJ, Iskandrian A. Spontaneous coronary artery dissection, aneurysms, and pseudoaneurysms: a review. *Echocardiography*. 2004 Feb;21(2):175-82.
69. Dajani AS, Taubert KA, Takahashi M, Bierman FZ, Freed MD, Ferrieri P, et al. Guidelines for long-term management of patients with Kawasaki disease. Report from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation*. 1994 Feb;89(2):916-22.
70. Tunick PA, Slater J, Kronzon I, Glassman E. Discrete atherosclerotic coronary artery aneurysms: a study of 20 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1990 Feb;15(2):279-82.
71. Giannoglou GD, Antoniadis AP, Chatzizisis YS, Damvopoulou E, Parcharidis GE, Louridas GE. Prevalence of ectasia in human coronary arteries in patients in northern Greece referred for coronary angiography. *Am J Cardiol*. 2006 Aug 1;98(3):314-8.
72. Isner JM, Donaldson RF, Fortin AH, Tischler A, Clarke RH. Attenuation of the media of coronary arteries in advanced atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1986 Nov 1;58(10):937-9.
73. Gussenhoven EJ, Frietman PA, The SH, van Suylen RJ, van Egmond FC, Lancee CT, et al. Assessment of medial thinning in atherosclerosis by intravascular ultrasound. *Am J Cardiol*. 1991 Dec 15;68(17):1625-32.
74. Le Lous M, Boudin D, Salmon S, Polonovski J. The affinity of type 1 collagen for lipid in vitro. *Biochem Biophys Acta* 1982;708:26-32.
75. Camejo G. The interaction of lipids and lipoproteins with the intercellular matrix of arterial tissue: its possible role in atherogenesis. *Adv Lipid Res*. 1982;19:1-53.
76. Grande J, Davis HR, Bates S, Mathews MB, Glagov S. Effect of an elastin growth substrate on cholesteryl ester synthesis and foam cell formation by cultured aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1987 Nov;68(1-2):87-93.
77. Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jan 17;92(2):402-6.
78. Yla-Herttuala S, Jaakkola O, Solakivi T, Kuivaniemi H, Nikkari T. The effect of proteoglycans, collagen and lysyl oxidase on the metabolism of low density lipoprotein by macrophages. *Atherosclerosis*. 1986 Oct;62(1):73-80.
79. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Nerem RM. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin Cardiol*. 1991 Feb;14(2 Suppl 1):11-16.

80. Bussolino F, Camussi G, Baglioni C. Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 alpha. *J Biol Chem*. 1988 Aug 25;263(24):11856-61.
81. Turkmen M, Bitigen A, Esen A. Coronary artery ectasia: Review. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2006;26:68-72.
82. Huang Y, Mironova M, Lopes-Virella MF. Oxidized LDL stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Nov;19(11):2640-7.
83. Turhan H, Erbay AR, Yasar AS, Balci M, Bicer A, Yetkin E. Comparison of C-reactive protein levels in patients with coronary artery ectasia versus patients with obstructive coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2004 Nov 15;94(10):1303-6.
84. Turhan H, Erbay AR, Yasar AS, Aksoy Y, Bicer A, Yetkin G, et al. Plasma soluble adhesion molecules; intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin levels in patients with isolated coronary artery ectasia. *Coron Artery Dis*. 2005 Feb;16(1):45-50.
85. Prescott MF, Sawyer WK, Von Linden-Reed J, Jeune M, Chou M, Caplan SL, et al. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on progression of atherosclerosis and aneurysm in LDL receptor-deficient mice overexpressing MMP-3, MMP-12, and MMP-13 and on restenosis in rats after balloon injury. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:179-90.
86. Lamblin N, Bauters C, Hermant X, Lablanche JM, Helbecque N, Amouyel P. Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Jul 3;40(1):43-8.
87. Liu J, Sukhova GK, Yang JT, Sun J, Ma L, Ren A, et al. Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells. *Atherosclerosis*. 2006 Feb;184(2):302-11.
88. Schneiderman J, Bordin GM, Engelberg I, Adar R, Seiffert D, Thinnis T, et al. Expression of fibrinolytic genes in atherosclerotic abdominal aortic aneurysm wall. A possible mechanism for aneurysm expansion. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):639-45.
89. Cheng XW, Kuzuya M, Sasaki T, Arakawa K, Kanda S, Sumi D, et al. Increased expression of elastolytic cysteine proteases, cathepsins S and K, in the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Am J Pathol*. 2004 Jan;164(1):243-51.
90. Dollery CM, Owen CA, Sukhova GK, Krettek A, Shapiro SD, Libby P. Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation*. 2003 Jun 10;107(22):2829-36.
91. Savino M, Parisi Q, Biondi-Zoccai GG, Pristipino C, Cianflone D, Crea F. New insights into molecular mechanisms of diffuse coronary ectasiae: a possible role for VEGF. *Int J Cardiol*. 2006 Jan 26;106(3):307-12.
92. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1992 Dec;153(3):557-62.
93. Johanning JM, Franklin DP, Han DC, Carey DJ, Elmore JR. Inhibition of inducible nitric oxide synthase limits nitric oxide production and experimental aneurysm expansion. *J Vasc Surg*. 2001 Mar;33(3):579-86.

94. Johanning JM, Armstrong PJ, Franklin DP, Han DC, Carey DJ, Elmore JR. Nitric oxide in experimental aneurysm formation: early events and consequences of nitric oxide inhibition. *Ann Vasc Surg.* 2002 Jan;16(1):65-72.
95. Paik DC, Ramey WG, Dillon J, Tilson MD. The nitrite/elastin reaction: implications for in vivo degenerative effects. *Connect Tissue Res.* 1997;36(3):241-51.
96. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest.* 1996 Dec 1;98(11):2572-9.
97. Uyarel H, Okmen E, Tartan Z, Kasikcioglu H, Dayi SU, Karabulut A, et al. The role of angiotensin converting enzyme genotype in coronary artery ectasia. *Int Heart J.* 2005 Jan;46(1):89-96.
98. Mabuchi H, Michishita I, Sakai Y, Sakai T, Ikawa T, Genda A, et al. Coronary ectasia in a homozygous patient with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1986 Jan;59(1):43-6.
99. Genda A, Nakayama A, Shimizu M, Nunoda S, Sugihara N, Suematzu T, et al. Coronary angiographic characteristics in Japanese patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1987 Jul;66(1-2):29-36.
100. Yetkin E, Kilic S, Acikgoz N, Ergin H, Aksoy Y, Sincer I, et al. Increased prevalence of varicocele in patients with coronary artery ectasia. *Coron Artery Dis.* 2005 Aug;16(5):261-4.
101. Gulec S, Atmaca Y, Kilickap M, Akyurek O, Aras O, Oral D. Angiographic assessment of myocardial perfusion in patients with isolated coronary artery ectasia. *Am J Cardiol.* 2003 Apr 15;91(8):996-9, A7.
102. Hamaoka K, Onouchi Z, Kamiya Y, Sakata K. Evaluation of coronary flow velocity dynamics and flow reserve in patients with Kawasaki disease by means of a Doppler guide wire. *J Am Coll Cardiol.* 1998 Mar 15;31(4):833-40.
103. Yamagishi M, Yasumura Y, Bando K. Images in cardiology. A giant aneurysm in coronary-pulmonary artery fistula associated with mural thrombus. *Heart.* 2000 Oct;84(4):364.
104. Gunduz H, Akdemir R, Binak E, Tamer A, Uyan C. Spontaneous rupture of a coronary artery aneurysm: a case report and review of the literature. *Jpn Heart J.* 2004 Mar;45(2):331-6.
105. Perlman PE, Ridgeway NA. Thrombosis and anticoagulation therapy in coronary ectasia. *Clin Cardiol.* 1989 Sep;12(9):541-2.
106. Dralle JG, Turner C, Hsu J, Replogle RL. Coronary artery aneurysms after angioplasty and atherectomy. *Ann Thorac Surg.* 1995 Apr;59(4):1030-5.
107. Lin CT, Chen CW, Lin TK, Lin CL. Coronary Artery Ectasia. *Tzu Chi Med J* 20:270-4.
108. Gziut AI, Gil RJ. Coronary aneurysms. *Pol Arch Med Wewn.* 2008 Dec;118(12):741-6.
109. Dogan A, Ozaydin M, Gedikli O, Altinbas A, Ergene O. Effect of trimetazidine on exercise performance in patients with coronary artery ectasia. *Jpn Heart J.* 2003 Jul;44(4):463-70.
110. Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Miller R, Huster G. Intracerebral hemorrhage more than twice as common as subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 1993 Feb;78(2):188-91.

111. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988 Jun 16;333(6174):664-6.
112. Marin J, Rodriguez-Martinez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther*. 1997 Aug;75(2):111-34.
113. Murray RK, Muscle. In, Murray RK, Granner OK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. Twenty-fourth edition Appleton & Lange 1996:686-706.
114. Borland CD, Higenbottam TW. A simultaneous single breath measurement of pulmonary diffusing capacity with nitric oxide and carbon monoxide. *Eur Respir J*. 1989 Jan;2(1):56-63.
115. 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.
116. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*. 1994 May 14;343(8907):1199-206.
117. Richard K. Nitric oxide synthases. *The Biochemist* 1994;16(5):3-6.
118. Forstennan U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterisation, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994;23(6:2):1121-31.
119. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995 Jun;376(6):327-43.
120. Moon J, Yoon S, Kim E, Shin C, Jo SA, Jo I. Lack of evidence for contribution of Glu298Asp (G894T) polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Thromb Res*. 2002 Aug 15;107(3-4):129-34.
121. Mansur T. Deri Biyolojisiinde ve Tedavisinde Nitrik Oksit. *T klin Dermatoloji*. 2002;12(5):143-8.
122. Atalık K, Dogan N. Nitrik Oksit ve Fizyolojik Etkileri. *Genel Tıp Derg* 1997;7(3):167-9.
123. Cekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, Gozukara EM. Nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS)'ın fizyolojik ve patolojik özellikleri. *T Klin Pediatri*. 2001;10:226-35.
124. 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.
125. Kılınc A, Kılınc K. Nitrik Oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Ankara Palme Yayıncılık. 2003.
126. Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1995 Jun 16;270(24):14582-6.
127. Smith TW, Balligand JL, Kaye DM, Wiviott SD, Simmons WW, Han X, et al. The role of the NO pathway in the control of cardiac function. *J Card Fail*. 1996 Dec;2(4 Suppl):S141-7.

128. Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, Mann MJ, Keeling PJ, Trindade PT, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation*. 1996 Mar 15;93(6):1087-94.
129. 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.
130. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III27-32.
131. 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.
132. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J*. 1992 Sep;6(12):3051-64.
133. Corbett JA, McDaniel ML. Intraislet release of interleukin 1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 1995 Feb 1;181(2):559-68.
134. Lefler DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, et al. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol*. 1999 Jun;276(6 Pt 2):H1943-50.
135. Crea F, Biasucci LM, Buffon A, Liuzzo G, Monaco C, Caligiuri G, et al. Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1997 Sep 4;80(5A):10-6.
136. Nabah YN, Mateo T, Cerda-Nicolas M, Alvarez A, Martinez M, Issekutz AC, et al. L-NAME induces direct arteriolar leukocyte adhesion, which is mainly mediated by angiotensin-II. *Microcirculation*. 2005 Jul-Aug;12(5):443-53.
137. Carreau A, Kieda C, Grillon C. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Exp Cell Res*. Sep 8.
138. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 20;93(17):9114-9.
139. Kawashima S. Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: endothelial nitric oxide (NO) synthase/NO system in atherosclerosis. *J Pharmacol Sci*. 2004 Dec;96(4):411-9.
140. Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwoldt WL, Rohrer MJ, Barnard MR, et al. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol*. 1996 May;270(5 Pt 2):H1640-8.
141. Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, et al. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest*. 1998 Mar 15;101(6):1225-32.
142. Patel RP, Levonen A, Crawford JH, Darley-Usmar VM. Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2000 Aug 18;47(3):465-74.

143. Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jan 1;90(1):347-51.
144. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik Oksit ve Nörofizyopatolojik Etkileri. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2000;20:107-11.
145. Friedman JM, Dill FJ, Hayden MR. *Medical Genetics*. ABD: Harwal Pupliching; 1976.
146. Başaran N. *Tıbbi Genetik Ders Kitabı*. Ankara: Güneş ve Nobel tıp kitabevleri; 1999,120-131. [cited.
147. Passarge M, Passarge E. *Color Atlas of Genetics*. TMP, New York. 1995.
148. Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem*. 2000 Oct;46(10):1626-30.
149. Robinson LJ, Weremowicz S, Morton CC, Michel T. Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. *Genomics*. 1994 Jan 15;19(2):350-7.
150. 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.
151. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999 Oct 5;100(14):1515-20.
152. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*. 1998 Jul;32(1):3-8.
153. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Apr 7;245(1):190-3.
154. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet*. 1998 Jul;103(1):65-9.
155. Tsikas D. Analysis of the L-arginine/nitric oxide (NO) pathway. The unique role of mass spectrometry. *Curr Pharm Anal* 2005;1:15-30.
156. Veldman BA, Spiering W, Doevendans PA, Vervoort G, Kroon AA, de Leeuw PW, et al. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. *J Hypertens*. 2002 Oct;20(10):2023-7.
157. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2832-5.
158. Kotani K, Shimomura T, Murakami F, Ikawa S, Kanaoka Y, Ohgi S, et al. Allele frequency of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in abdominal aortic aneurysm. *Intern Med*. 2000 Jul;39(7):537-9.
159. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. 1987 Nov 7;2(8567):1057-8.

160. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989 May;83(5):1774-7.
161. Paik D, Tilson MD. Neovascularization in the abdominal aortic aneurysm. Endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and elastolysis. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Nov 18;800:277.
162. Dosenko VE, Zagoriy VY, Haytovich NV, Gordok OA, Moibenko AA. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. *Acta Biochim Pol.* 2006;53(2):299-302.
163. Rusai K, Vannay A, Szebeni B, Borgulya G, Fekete A, Vasarhelyi B, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene T-786C and 27-bp repeat gene polymorphisms in retinopathy of prematurity. *Mol Vis.* 2008;14:286-90.
164. Zintzaras E, Kitsios G, Stefanidis I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. *Hypertension.* 2006 Oct;48(4):700-10.
165. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* 1995 Sep 21;377(6546):239-42.
166. van Haperen R, de Waard M, van Deel E, Mees B, Kutryk M, van Aken T, et al. Reduction of blood pressure, plasma cholesterol, and atherosclerosis by elevated endothelial nitric oxide. *J Biol Chem.* 2002 Dec 13;277(50):48803-7.
167. Pritchard KA, Jr., Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, et al. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res.* 1995 Sep;77(3):510-8.
168. BATTERY LD, CHESTER AH, SPRINGALL DR, BORLAND JA, MICHEL T, YACOUB MH, et al. Implanted vein grafts with an intact endothelium demonstrate reduced focal expression of endothelial nitric oxide synthase specific to atherosclerotic sites. *J Pathol.* 1996 Jun;179(2):197-203.
169. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Nov;17(11):2479-88.
170. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation.* 1998 Jun 30;97(25):2494-8.
171. Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Bernini M, Turri O, Massaro F, et al. Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Clin Chem.* 2002 Jul;48(7):989-93.
172. 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.
173. Berdeli A, Sekuri C, Sirri Cam F, Ercan E, Sagcan A, Tengiz I, et al. Association between the eNOS (Glu298Asp) and the RAS genes polymorphisms and premature coronary artery disease in a Turkish population. *Clin Chim Acta.* 2005 Jan;351(1-2):87-94.
174. 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.

175. Peter GK, Ian DC, William HD. *Clinical Obesity in Adults and Children*. third ed. Singapore; 2010:3-14.
176. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995 Sep-Oct;38(2):87-104.
177. Atli FH, Manduz S, Katrancioglu N, Ozum U, Disli OM, Atahan E, et al. eNOS G894T polymorphism and abdominal aortic aneurysms. *Angiology*. 2010 Feb;61(2):125-30.
178. Akagawa H, Kasuya H, Onda H, Yoneyama T, Sasahara A, Kim CJ, et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase T-786C single nucleotide polymorphism on aneurysm size. *J Neurosurg*. 2005 Jan;102(1):68-71.
179. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*. 1996 Jan;2(1):41-5.
180. Wang XL, Wang J. Smoking-gene interaction and disease development: relevance to pancreatic cancer and atherosclerosis. *World J Surg*. 2005 Mar;29(3):344-53.
181. Jo I, Moon J, Yoon S, Kim HT, Kim E, Park HY, et al. Interaction between -786TC polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene and smoking for myocardial infarction in Korean population. *Clin Chim Acta*. 2006 Mar;365(1-2):86-92.