

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERKEN YAŞ KORONER ARTER HASTALIĞINDA
PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖR 1 GENİ (4G/5G)
ve
PARAOKSONAZ 1 GENİ (L55M ve Q192R)
POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ

Bio. Didem SAVAŞ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. F. Ajlan TÜKÜN

ANKARA

2010

**ERKEN YAŞ KORONER ARTER HASTALIĞINDA
PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖR 1 GENİ (4G/5G)**

ve

**PARAOKSONAZ 1 GENİ (L55M ve Q192R)
POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ**

ÖZET

Koronar arter hastalığı (KAH) dünya genelinde, mortalite ve morbiditenin ciddi bir kısmını oluşturması sebebiyle tıp ve bilim dünyasında büyük öneme sahip bir hastalıktır. Gen-gen ve gen-çevre etkileşimlerinin çoklu kombinasyonlarından etkilenen, multifaktöriyel etiyojisi olan KAH'a yatkınlık oluşturan genetik faktörlerin erken yaştaki bireylerde belirlenmesi hastalığın genetik altyapısını anlaşılır kılacaktır. Çalışmamızda plazminojen aktivatörünün ana fizyolojik inhibitörü olan plazminojen aktivatör inhibitör 1 (*PAII*) geninin -675 promotor bölgesindeki 4G/5G polimorfizmi ile, lipid metabolizmasında HDL'ye bağlı bulunan ve HDL'nin anti-aterojenik özelliğine etkisi olan insan paraoksonaz 1 (*PONI*) genindeki Leu55Met ve Gln192Arg polimorfizmlerinin erken yaş (≤ 45 yaş) KAH ile ilişkisini araştırdık.

26 erken yaş koroner arter hastası ile yaş ve cins açısından eş 26 sağlıklı kontrolde *PAII* ve *PONI* polimorfizmlerini inceledik. DNA izolasyonunun ardından, PCR ve RFLP yöntemleri ile bireylerin genotiplerini belirledik.

İncelenen polimorfizmlerde hasta ile sağlıklı gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmezken, *PAII* 5G allelinin sıklığı hasta grubunda 0.481, kontrol grubunda 0.500, 4G alleli ise sırasıyla 0.519 ve 0.500 olarak bulunmuştur. *PONI* L55M polimorfizminde, L allelinin sıklığı hasta grubunda 0.577, kontrol grubunda 0.635, M alleli ise sırasıyla 0.423 ve 0.365 olarak bulunmuştur. *PONI* Q192R polimorfizminde Q allelinin sıklığı hasta grubunda 0.710, kontrol grubunda 0.652, R alleli ise sırasıyla 0.290 ve 0.342 olarak

bulunmuştur. Erken yaş KAH ile çalıştığımız polimorfizmler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

2010, 98 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kardiyovasküler Hastalıklar, Koroner Arter Hastalığı, Erken Yaş (Prematür) Koroner Arter Hastalığı, Polimorfizm, Plazminojen aktivatör inhibitör 1, Paraoksonaz 1.

**THE ROLE OF
PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR 1 GENE (4G/5G)
and
PARAOXONASE 1 GENE (L55M and Q192R) POLYMORPHISMS
IN PREMATURE CORONARY ARTERY DISEASE**

ABSTRACT

Because of consisting the serious part of mortality and morbidity, coronary artery disease (CAD) is one of the most important disease in medicine and science worldwide. Determining the genetic factors that predispose to CAD in the early age of life, which has a multifactorial etiology, and is affected by the multiple combinations of gene-gene and gene-environment interactions will make the genetic background of the disease clear. We investigated the relationship between premature CAD (≤ 45 years) and 4G/5G polymorphism in the -675 promoter region of the plasminogen activator inhibitor 1 (*PAII*) gene, which is the main physiological inhibitor of the plasminogen activator in the fibrinolytic pathway, Leu55Met and Gln192Arg polymorphisms in the human paraoxonase 1 gene, which is bound to HDL and has an effect on anti-aterogenic property of HDL.

We examined *PAII* and *PONI* polymorphisms in 26 premature CAD patients with 26 age and gender matched healthy controls. After DNA isolation, we determined the genotypes of the individuals by PCR and RFLP methods.

While there is no significant difference observed between patients and healthy groups in the examined polymorphisms in patient and control group, *PAII* 5G allele frequency was found 0.481 and 0.500, 4G allele frequency was found 0.519 and 0.500, respectively. In *PONI* L55M polymorphism, the frequency of L allele was found 0.577 in patients, 0.635 in controls; M allele was found 0.423 and 0.365, respectively. In *PONI* Q192R polymorphism, the frequency of Q allele was found 0.710 in patients, 0.652 in controls; R

allele was found 0.290 and 0.342, respectively. In conclusion, no statistically significant relationship between the polymorphisms of *PAII* and *PONI* and premature CAD was found in our study.

2010, 98 pages

Key Words: Cardiovascular Disease, Coronary Artery Disease, Premature Coronary Artery Disease, Polymorphism, Plasminogen activator inhibitor 1, Paraoxonase 1.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve beni yönlendiren değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. F. Ajlan TÜKÜN'e,

Tezimin en önemli öğelerinden olan hasta kanlarını bana sağlayan ve bilgilerini paylaşmaktan çekinmeyen Sayın Prof. Dr. Sadi GÜLEÇ'e, kanların ve hasta bilgilerinin alınıp saklanması ve bana ulaşmasında yardımcı olan Hemşire Selda YILDIRIM'a,

Laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Birimi'ndeki iş arkadaşlarım Gizem ALİŞ BURGUCU, Semin GÜRSOY, İsmigül AKIN ve diğer birimlerde gülyüzleriyle, ve sağlıklı kontrol kanlarıyla çalışmama katkıları olan tüm iş ARKADAŞLARIM'a,

Araştırma ve laboratuvar çalışmalarım sırasında, benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve tezimin bitmesinde psikolojik katkılarıyla ilkokul ve lise hayatımdan bu yana halen görüştüğüm tüm DOSTLARIM'a, üniversite hayatımı renkli kılan, yüksek lisans eğitimim sırasında istemeden de olsa ihmal ettiğim Ankara Üniversitesi Fen ve Mühendislik Fakültesi Tiyatro Topluluğu (AFTİT)'ndaki ARKADAŞLARIM'a,

Tezimin bitim aşamasına kadar tüm sıkıntılarında beni dinleyen ve rahatlatan, uzakta bile olsalar manen varlıkları ile her zaman yanımda hissettiğim Ege'deki kocaman yürekli AİLEM'e, tez yazım aşamasında üniversite sınavı hazırlığında olmasına rağmen hayatımdaki rengarenk varlığından dolayı kardeşim Ecem SAVAŞ'a, en önemlisi ayaklarımın yere bastığı ilk günden bugüne kadar, yemeden içmeden eğitimim ve kişisel gelişimim için çarpınan, haklarını asla ödeyemeyeceğim, mutluluklarımızın üzüntülerimizin paylaşıldığı sıcak yuvamın en değerli varlıkları annem Kerime ve babam Mehmet SAVAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi tarafından Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü 10B3330016 No.lu projesi kapsamında desteklenmiştir.

Didem SAVAŞ

Ankara, 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	1
2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar.....	1
2.2. Kardiyovasküler Hastalıkların Sıklığı.....	2
2.3. Koroner Arter Hastalığı.....	4
2.3.1. Koroner Arterler.....	4
2.3.2. Erken Yaş Koroner Arter Hastalığı.....	4
2.4. KAH Risk Faktörleri.....	5
2.5. KAH için Tanımlanmış Genetik Risk Faktörleri.....	8
2.5.1. Endotel Fonksiyonları ile İlişkili Genler.....	9
2.5.2. İnflamasyon.....	9
2.5.3. Koagülasyon Mekanizmasında Rol Alan Genler.....	10
2.5.4. Fibrinoliz.....	11
2.5.4.1. <i>PAII</i> ve KAH.....	12
2.5.4.1.1. <i>PAII</i> Fizyolojisi ve Gen Ekspresyonunun Regülasyonu.....	12
2.5.4.1.2. t-PA ve <i>PAII</i> 'in Kalıtımı.....	14
2.5.4.1.3. Plazminojen aktivatör-1: SERPINE1.....	14
2.5.4.1.4. <i>PAII</i> Geni.....	16
2.5.4.1.5. <i>PAII</i> Gen Polimorfizmleri.....	17
2.5.4.1.6. Hastalıklarda <i>PAII</i>	19
2.5.4.1.7. <i>PAII</i> 'in Vasküler İnflamasyon ve Aterotrombozdaki Rolü.....	19
2.5.5. Lipid Metabolizması ve Erken Yaş KAH.....	21
2.5.5.1. Paraoksonaz ve KAH.....	22

2.5.5.1.1. Paraoksonaz (<i>PON</i>) Gen Ailesi.....	22
2.5.5.1.2. Paraoksonaz 1 Geni (<i>PONI</i>) Geni.....	24
2.5.5.1.3. <i>PON1</i> 'in Enzimatik Aktivitesi ve Antioksidan Özellikleri.....	25
2.5.5.1.4. <i>PONI</i> Ekspresyon ve Enzim Aktivitesinin Regülasyonu.....	26
2.5.5.1.5. <i>PONI</i> Polimorfizmleri.....	27
2.5.5.1.6. <i>PONI</i> Promotor Polimorfizmleri.....	27
2.5.5.1.7. <i>PONI</i> Gen Ekspresyonu.....	27
2.5.5.1.8. <i>PONI</i> Kodlayan Bölge Polimorfizmleri ve KAH.....	28
2.5.5.1.9. <i>PONI</i> ve Ateroskleroz.....	30
2.5.6. Amaç.....	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	33
3.1. Çalışma Grubu.....	33
3.2. Araç ve Gereçler.....	35
3.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	35
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	36
3.2.3. Kullanılan Bileşik ve Çözeltiler.....	37
3.2.4. 1X TBE Tamponu Hazırlanışı.....	39
3.2.5. Agaroz Jel Hazırlanışı.....	39
3.3. Yöntem.....	40
3.3.1. DNA İzolasyonu.....	40
3.3.2. Primerler ve Özellikleri.....	41
3.3.3. DNA Moleküler Ağırlık Belirteçleri.....	42
3.3.3.1. Hazırlanışı.....	42
3.3.3.2. GeneRuler 50bp DNA Belirteci.....	43
3.3.3.3. pUC19 DNA/MspI (HpaII) Belirteci.....	43
3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	44
3.3.4.1. <i>PAII</i> -675 4G/5G Polimorfizmi PCR Aşaması.....	44
3.3.4.2. <i>PONI</i> Leu55Met (L55M) Polimorfizmi PCR Aşaması.....	46
3.3.4.3. <i>PONI</i> Gln192Arg (Q192R) Polimorfizmi PCR Aşaması.....	48
3.3.5. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri İle Kesimi.....	50
3.3.5.1. <i>PAII</i> 4G/5G Polimorfizm Bölgesi Enzim Kesimi.....	51
3.3.5.2. <i>PONI</i> L55M Polimorfizm Bölgesi Enzim Kesimi.....	52

3.3.5.3. <i>PONI</i> Q192R Polimorfizm Bölgesi Enzim Kesimi.....	53
3.3.5.4. Enzim Kesimi Ürünleri.....	54
3.3.6. İstatistik.....	55
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	56
4.1. <i>PAII</i> 4G/5G Polimorfizm Bölgesi.....	56
4.2. <i>PONI</i> L55M Polimorfizm Bölgesi.....	58
4.3. <i>PONI</i> Q192R Polimorfizm Bölgesi.....	60
4.4. İkili genotip sıklıkları.....	62
4.5. Üçlü genotip sıklıkları.....	65
4.6. En az bir Q,R, L,M, 5G veya 4G alleli taşıma sıklıkları.....	67
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	68
5.1. <i>PAII</i> 4G/5G polimorfizmi.....	68
5.1.1. <i>PAII</i> 4G/5G polimorfizmi ve erken yaş KAH.....	70
5.2. <i>PONI</i> Leu55Met ve Q192R polimorfizmleri.....	74
5.2.1. <i>PONI</i> Leu55Met/Q192R polimorfizmleri ve erken yaş KAH.....	76
6. KAYNAKLAR.....	81
EK-1 ÖZGEÇMİŞ.....	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Fibrinolitik yolda <i>PAII</i> 'in rolü.....	15
Şekil 2.2. İnsan <i>PAII</i> geni promotör bölgesinin şematik lokalizasyonu.....	16
Şekil 2.3. <i>PAII</i> gen yapısı ve promotördaki 4G/5G polimorfik bölgesi.....	18
Şekil 2.4. PON Gen Ailesi Genetik Haritası, 7. kromozom üstünde paraoksonaz gen ailesi.....	22
Şekil 3.1. Soldan sağa markera kadar ilk 10 hastanın, markerdan sonra 11-19 numaralı hastaların <i>PAII</i> PCR ürünleri.....	45
Şekil 3.2. Soldan sağa markera kadar ilk 10 hastanın, markerdan sonra 11-19 numaralı hastaların <i>PONI</i> PCR ürünleri.	47
Şekil 3.3. Soldan sağa markera kadar ilk 10 hastanın, markerdan sonra 11-19 numaralı hastaların <i>PONI</i> PCR ürünleri.	49
Şekil 4.1. Hasta grubunun <i>PAII</i> enzim kesim sonuçları.....	56
Şekil 4.2. Hasta grubunun <i>PONI</i> L55M enzim kesim sonuçları.....	58
Şekil 4.3. Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun <i>PONI</i> Q192R enzim kesim sonuçları.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. 2006 yılı AHA verilerine göre ABD’de KVH’ dan muzdarip birey sayısı.....	2
Çizelge 2.2. KAH için geleneksel risk faktörleri.....	6
Çizelge 2.3. KAH için genetik risk faktörleri.....	7
Çizelge 3.1. Çalışma grubunu oluşturan hasta ve sağlıklı bireylerin özellikleri.....	34
Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan cihazlar.....	35
Çizelge 3.3. Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler.....	36
Çizelge 3.4. Araştırmada kullanılan bileşik ve çözeltiler.....	37
Çizelge 3.5. <i>PAII</i> ve <i>PONI</i> polimorfizm bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerler ve PCR ürün boyları.....	41
Çizelge 3.6. <i>PAII</i> , <i>PONI</i> 55 ve 192 polimorfizmlerinde, kullanılan enzimlerin konsantrasyonları, tamponları, kesim noktaları, inkübasyon ve inaktivasyon dereceleri.....	50
Çizelge 3.7. Çalışılan polimorfizmler, PCR ürün boyları, kesildikleri restriksiyon enzimleri, kesim ürün boyları.....	54
Çizelge 4.1. <i>PAII</i> 4G/5G genotip ve allel dağılımı ile sıklıkları.....	57
Çizelge 4.2. <i>PONI</i> L55M genotip ve allel dağılımı ile sıklıkları.....	59
Çizelge 4.3. <i>PONI</i> Q192R genotip ve allel dağılımı ile sıklıkları.....	61

Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol grubunda <i>PAII</i> ve <i>PONI</i> L55M genotip frekansları.....	62
Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol grubunda <i>PAII</i> ve <i>PONI</i> Q192R genotip frekansları.....	63
Çizelge 4.6. Hasta ve kontrol grubunda <i>PONI</i> Q192R ve <i>PONI</i> L55M genotip frekansları.....	64
Çizelge 4.7. Hasta ve kontrol grubunda <i>PAII</i> 4G/5G, <i>PONI</i> L55M ve <i>PONI</i> Q192R genotip frekansları.....	66
Çizelge 4.8. Hasta ve kontrol en az bir adet Q,R, L,M, 5G veya 4G alleli taşıma sıklıkları.....	67
Çizelge 5.1. Farklı popülasyonlardaki <i>PAII</i> geni 5G/5G, 4G/5G ve 4G/4G genotipleri ile 5G ve 4G allel sıklıkları.....	69
Çizelge 5.2. Farklı popülasyonlardaki <i>PONI</i> L55M genotipleri ile allel sıklıkları.....	75
Çizelge 5.3. Farklı popülasyonlardaki <i>PONI</i> Q192R genotipleri ile allel sıklıkları.....	75

SİMGELER DİZİNİ

ACE	Angiotensin Converting Enzyme (Anjiyotensin dönüştürücü enzim)
AHA	American Heart Assosiation (Amerikan Kalp Derneği)
α_2 AP	Alfa ₂ -antiplazmin
An II	Anneksin II
APOB	Apolipoprotein B
APOE	Apolipoprotein E
apoE ^{-/-}	Apo E geninden yoksun
APO ER2	Apolipoprotein E reseptör 2
bç	Baz çifti
CRP	C-reaktif protein
dH2O	distile su
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase (Endotelyal nitrik oksit sentetaz)
EPCR	Endothelial Protein C Receptor (Endotelyal protein C reseptörü)
FGB	Beta-Fibrinojen
HDL	High density lipoprotein (Yüksek yoğunluklu lipoprotein)
HDL-K	HDL-kolesterol
HPA 1	Human platelet antigen 1 (İnsan Trombosit Antijeni 1)
IL-1	Interleukin-1 (İnterlökin-1)
iPON	İnsan paraoksonaz
KAH	Koroner arter hastalığı

kDa	KiloDalton
kb	Kilo baz
KVH	Kardiyovasküler hastalık(lar)
LDL	Low Density Lipoprotein (Düşük yoğunluklu lipoprotein)
LDLR	LDL reseptörü
LRP	LDL reseptör-ilişkili protein
LTA	Lymphotoxin Alpha (Limfotoksin Alfa)
MEGF7	Multiple epidermal büyüme faktörü içeren protein 7
MI	Miyokard infarktüsü
MTHFR	5,10-Metilentetrahidrofolat redüktaz
NCEP	National Cholesterol Education Program (Ulusal Kolesterol Eğitimi Programı)
NHLBI	National Heart Lung and Blood Institute (Ulusal Kalp, Akciğer ve Kan Enstitüsü)
NO	Nitrik oksit
<i>PAII</i>	Plazminojen aktivatör inhibitör1
P-KAH	Prematür (erken yaş) koroner arter hastalığı
<i>PON1</i>	Paraoksonaz 1
<i>PON1^{-/-}</i>	<i>PON1</i> geninden yoksun
PTH	Protrombin
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi)
SNP	Single nucleotide polymorphism (Tek nükleotid polimorfizmi)

TNF- α	Tümör nekroz faktör-alfa
t-PA	Doku plazminojen aktivatörü
u-PA	Ürokinaz plazminojen aktivatörü
VLDL	Very low density lipoprotein receptor (çok düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü)
VN	Vitronektin
VSMC	Vascular smooth muscle cell (Vasküler düz kas hücresi)
WHO	World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

1. GİRİŞ

Bu tez çalışmasında, KAH'ın geleneksel risk faktörlerinin dışında, dünyada daha önceden tanımlanmış genetik risk faktörlerinden fibrinolizde rol alan plazminojen *PAII* ve lipid metabolizmasında rol alan *PONI* genlerindeki polimorfizmlerin erken yaş KAH olgularında incelenmesi, çıkacak anlamlı sonuçların Türk toplumunda erken yaş KAH'a yatkınlığın belirlenmesine katkı sağlaması ve oluşturulan risk profilinde bu polimorfizmlerin yerlerinin belirginleştirilerek erken yaş KAH riskinin bu faktörlerle birlikte değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) dünya genelinde, özellikle gelişmiş ülkelerde ölümlerin ciddi bir kısmını oluşturması sebebiyle tıp ve bilim dünyasında büyük öneme sahip bir hastalık grubudur. KVH, kalp ve kan damarlarında meydana gelen; KAH, serebrovasküler hastalıklar, periferik arter hastalığı, hipertansif kalp hastalığı, romatizmal kalp hastalığı, konjenital kalp hastalığı, derin ven trombozu ve pulmoner embolizm, kalp yetmezliği, kalp ritm bozukluğu ve inflamatuvar kalp hastalığı gibi bir grup hastalığı kapsamaktadır (WHO).

2.2. KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLARIN SIKLIĞI

Dünya Sağlık Örgütü (WHO=World Health Organisation) 2004 tahmini verilerine göre, tüm ölümlerin % 29'unun (17.1 milyon insan) nedenini KVH oluşturmaktadır. Bu ölümlerin 7.2 milyonu koroner arter, 5.7 milyonu serebrovasküler hastalık kaynaklıdır. KVH kaynaklı ölümlerin % 82'si düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmekte, erkek ve kadınlarda eşit dağılım göstermektedir. 2030 yılında, neredeyse 23.6 milyon kişinin KVH sebebiyle yaşamını yitireceği tahmin edilmektedir (WHO). Amerikan Kalp Derneği'nin (AHA=American Heart Association) 2006 yılı KVH istatistiklerine göre ise, Amerika'da 81.1 milyon kişi en az bir formda KVH'a sahiptir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. 2006 yılı AHA verilerine göre ABD'de KVH'dan muzdarip birey sayısı

ABD'de Kardiyovasküler Hastalıklar (2006)	KVH Muzdarip Birey Sayısı (milyon)
Yüksek Kan Basıncı	73.6
Koroner Kalp Hastalığı	17.6
Miyokard İnfarktüsü	8.5
Anjina Pektoris	10.2
İnme	6.4
Kalp Yetmezliği	5.8

AHA verileri doğrultusunda, 2006 yılında her 2.6 ölümden birinin KVH kökenli olduğu ve bunun da tüm ölümlerin % 34.3'ünü (831.272 insan) oluşturduğu öngörülmüştür. Bunlar içinde 151.000'i 65 yaş altıdır.

2002 yılının son verilerine göre, nüfusun 70 milyon (70.318.000) civarı olduğu ülkemizde sadece kalp hastalıklarından 2002 yılı içinde 102 bin (102.552) kişi yaşamını yitirmiştir (WHO).

Hemofili, kistik fibrozis, müsküler distrofi gibi monogenik hastalıkların aksine, KAH gen-gen ve gen-evre etkileşimlerinin çoklu kombinasyonlarından etkilenmektedir. Bu poligenik hastalığa yatkınlık oluşturan gen-gen ve gen-evre etkileşimlerinin belirlenmesi, diğerk bir deyişle erken yaş KAH patogenezinde etkili olabilecek genetik ve çevresel faktörlerin saptanması, hastalığın gelişiminin ve seyrinin anlaşılmasında kolaylık sağlayacaktır (Franchini *et al.* 2008). KAH'ların ortalama % 70'ini yüksek mortalite ve morbidite oranlarıyla KAH oluşturmaktadır (WHO).

2.3. KORONER ARTER HASTALIĞI

2.3.1. Koroner Arterler

Koroner arterler, ana atar damar olan aorttan aldıkları oksijence zengin kanı, diastol döneminde kalp hücrelerine taşıyan damarlardır. Majör koroner arterler, sol ön inen (LAD), sol sirkumfleks (Cx), ve sağ koroner arterler (RCA)'dir. Belirgin KAH herhangi bir majör epikardiyal koroner arterde \geq % 50 stenoz olması durumudur (Shaw *et al.* 2008). Bu durum, koroner arterlerin duvarında lipid birikimi sonucu oluşan aterosklerozla damar lümeninin tıkanması sonucu gelişir (NCEP=National Cholesterol Education Program 2002).

2.3.2. Erken Yaş Koroner Arter Hastalığı (P-KAH= prematür KAH, erken yaş KAH)

Anjiyografik olarak epikardiyal koroner arterlerde % 50'den fazla lümen diameter darlık ve/veya geçirilmiş miyokard infarktüsüne (MI) ait objektif bulguların erkeklerde 45, kadınlarda 50 yaş ve altında saptanması erken yaş KAH varlığını göstermektedir (Akbulut ve ark. 2004, Shen *et al.* 2007).

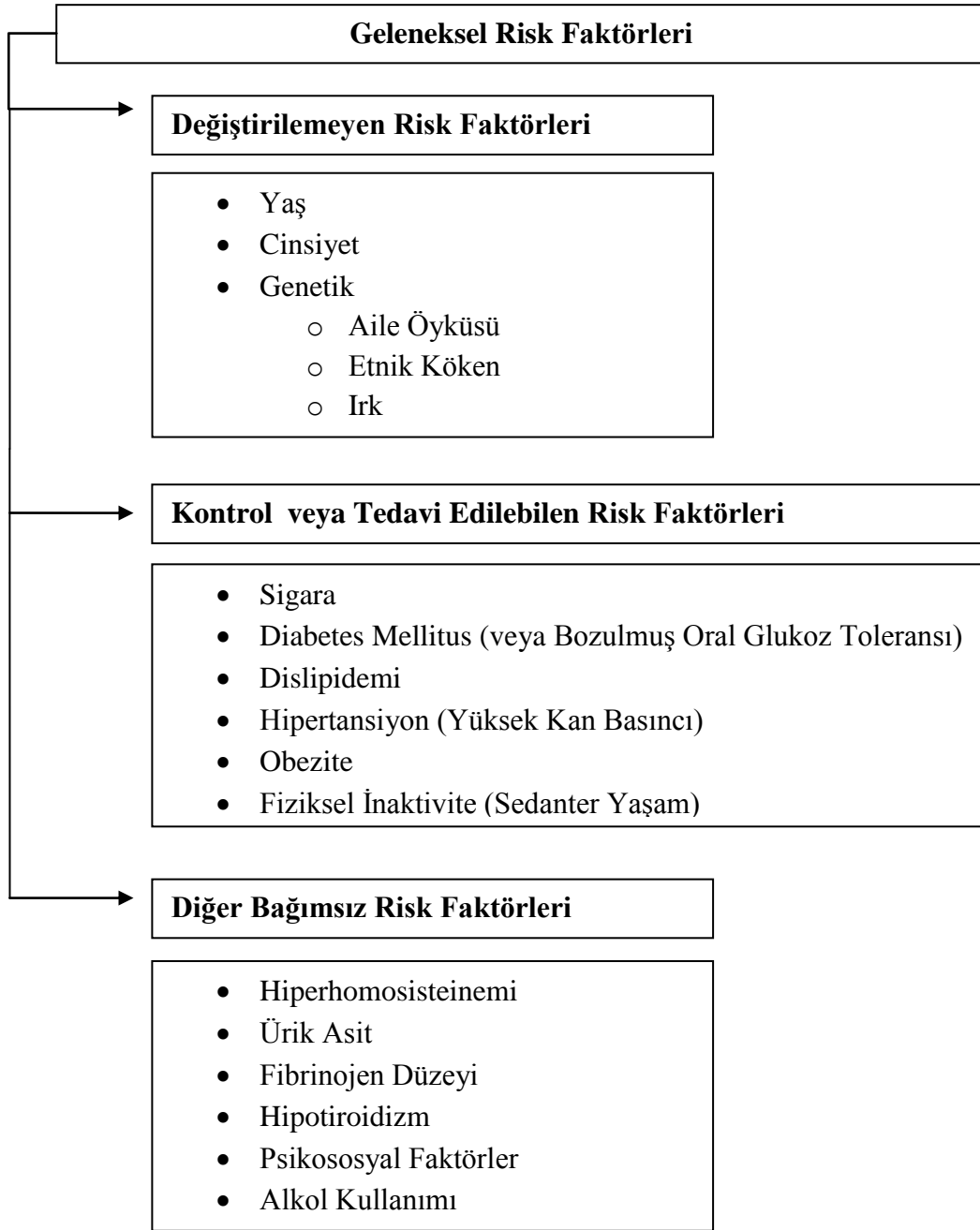
1. dereceden erkek akrabasının 55 yaşından önce, 1.dereceden kadın akrabasının 65 yaşından önce KAH tanısı almış olması erken yaş KAH için majör risk teşkil etmektedir. Diğer risk faktörlerinin ortadan kaldırılması bile bu riski indirgeyememektedir (NCEP 2002). 1. derece akrabalarda KAH hikayesi bulunması, bireyin KAH riskini 2-3 kat arttırırken, iki ya da daha fazla sayıdaki yakın akraba, hastalığa yakalanma riskini 3-6 kat arttırmaktadır (Scheuner 2004).

2.4. KAH RİSK FAKTÖRLERİ

Her ne kadar erken yaş KAH ve MI'nın klinik fenotiplerinin kalıtsal temelini olduğu bilinse de, hangi genetik varyantların yüksek riskle ilişkilendirildiği ispatlanmamıştır (Franchini *et al.* 2008). KAH ile mücadelede en etkin yöntem, tüm potansiyel risk faktörlerini ortaya çıkarmak, bu risk faktörlerinin gelişimi ve ilerleyişini önlemek olarak verilmektedir (WHO) (Çizelge 2.2.).

Değiştirilemeyen, değiştirilebilen ve bağımsız risk faktörleri hastalığın bireydeki etkisini güçlendirmektedir, çizelge 2.2.'de gösterilmiştir (AHA 2008).

Çizelge 2.2. KAH için geleneksel risk faktörleri



Son zamanlarda gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalarla multifaktöriyel etiyojisi olan KAH'ın tanı ve tedavisinde önemli olan risk faktörlerinin belirlenmesi, KAH yatkınlığının genetik belirteçlerle saptanabilmesinin önemini ortaya çıkarmıştır. Erken yaş KAH epidemiyolojik çalışmalarında ortaya çıkan yeni genetik risk faktörleri ile geleneksel risk faktörlerinin birlikte değerlendirilmesi KAH'ın anlaşılmasına model teşkil etmektedir (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. KAH için genetik risk faktörleri

KAH için Tanımlanmış Genetik Risk Faktörleri
<ul style="list-style-type: none">• Koagülasyon<ul style="list-style-type: none">○ Faktör V○ Protrombin (PTH; Faktör II)○ 5,10-Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR)○ Faktör XIII○ İnsan Trombosit Antijeni 1 (HPA1; Gp IIIa; integrin b3)• Fibrinolitik Yolak<ul style="list-style-type: none">○ Beta-Fibrinojen (FGB)○ Plazminojen Aktivatör İnhibitor 1 (PAI-1, Serpin E1)• Endotel işlevleri<ul style="list-style-type: none">○ Endotel Protein C Reseptörü (EPCR)• Lipid Metabolizması<ul style="list-style-type: none">○ Paraoksonaz 1 (PON 1)○ Apolipoprotein B (Apo B)○ Apolipoprotein E (Apo E)• Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE)• İnflamasyon<ul style="list-style-type: none">○ Endotel Nitrik Oksit Sintaz (eNOS; NOS3)○ Limfotoksin Alfa (LTA)

KAH için belirlenen risk faktörlerinin birden fazlasının varlığı, bireyin KAH gelişim riskini arttırmaktadır.

2.5. KAH İÇİN TANIMLANMIŞ GENETİK RİSK FAKTÖRLERİ

Yaygın görülen birçok genin ve çevresel etkenin işe karıştığı erken yaş KAH'ın genetik analizi tüm kompleks hastalıklarda olduğu gibi zordur ve uzun zaman almaktadır. Bu kompleks hastalıkların genetik temellendirmesini yapmak zordur. Son dönemlerde, var olan yeni teknolojileri kullanarak önemli bakış açıları ortaya çıkmaya başlamıştır.

Koroner arter hastalıklarında, birçok gen ve çevresel faktörlerin etkinliği ortaya konmuşsa da Mendelyen ya da multifaktöriyel kalıtım, her ailesel olgu için söylenememektedir. Genotipte oluşan polimorfik değişiklikler fizyolojiyi bozarak ya da çevresel faktörlerin davranışını değiştirerek hastalık tablosunun oluşmasını kolaylaştırmakta ve dolayısı ile hastalığa yatkınlık meydana getirmektedir.

Polimorfizm, bir gen lokusunda, nadir allel sıklığının % 1'i aşan birden çok normal allelin bulunması durumudur. Genetik polimorfizm, bir popülasyonda farklı allellere bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. SNP yani tek nükleotid polimorfizmi, bir popülasyondaki bireyler arasında DNA dizinindeki tek bir bazın (nükleotid) varyasyonudur. Toplumdaki sıklığı % 1'den fazla oluşuyla mutasyondan ayrılmaktadır (Passarge 1995).

KAH'ta damar lümeninin daralmasına yol açabilecek ya da kalp kasının beslenmesini etkileyebilecek pek çok fizyolojik yolakta işlev yapan proteini kodlayan genlerde oluşan polimorfik değişikliklerin bu proteinlerin miktar ya da işlevlerini değiştirerek etkili olabileceği düşünülmektedir. KAH'ta etkili olabilecek bu yollar endotel fonksiyonlarıyla ilişkili genler, inflamasyon, koagülasyon mekanizması, fibrinolitik yolak ve lipid metabolizması başlıkları altında toplanabilir. Ancak bu polimorfizmlerden hangilerinin hastalığın erken yaşta görülmesinde etkili olduğu tartışmalıdır.

2.5.1. Endotel Fonksiyonlarıyla İlişkili Genler

Nitrik oksit (NO); trombosit agregasyonunu, endotelial lökosit adezyonunu ve vasküler düz kas hücre (VSMC) büyümesini engellemektedir (Simionescu 2007). eNOS'un G894T polimorfizmi ile KAH/MI arasındaki ilişki bir çok çalışmada gözlenmiştir (Agema *et al.* 2004).

2.5.2. İnflamasyon

Ateroskleroz, kronik inflamatuvar hastalığı olarak kabul edilmiş olup inflamatuvar süreç, aterosklerotik plak oluşumunda önemli bir etkidir (Libby 2002). Aterosklerozun değişik evrelerinde, hücresel ve moleküler immün/inflamator bileşenler arasında karmaşık bir interaksiyon oluşur (Hansson *et al.* 2006).

C-reaktif protein (CRP) ve fibrinojen gibi inflamasyon biyobelirteçlerinin artmış plazma düzeyleri kardiyovasküler riskle ilişkilendirilmiştir (Rifai and Ridker 2001). Fibrinojen gen-kümesindeki bazı SNP ve haplotipleri (fibrinojen zincirleri olan α -FGA ve β -FGA) MI sonrası fibrinojen düzeyleriyle belirgin ölçüde ilişkili bulunmuştur (Jacquemin *et al.* 2008).

Proinflamatuvar sitokin TNF- α , endotel fonksiyonunu, koagülasyonu, insulin direncini ve lipid metabolizmasını etkilemektedir. Limfotoksin- α (LTA, TNF- β), immün sistemin regülasyonunda ve inflamatuvar reaksiyonlarda bir çok fonksiyona sahip olan bir sitokindir (Allen *et al.* 2001, BenjaWeld *et al.* 2001, Vendrell *et al.* 2003). Japonya'da genom boyunca yapılan asosiyasyon çalışmasında, LTA genindeki fonksiyonel SNP'lerin, MI ile belirgin ölçüde ilişkisi olduğu saptanmıştır (Ozaki 2002).

2.5.3. Koagülasyon Mekanizmasında Rol Alan Genler

Koagülasyon ve fibrinolitik yolağın hücrel ve moleküler bileşenleri arasındaki ilişki, pıhtı oluşumunda esansiyeldir. Koagülasyon faktörleri, fibrinolitik faktörler ve trombosit yüzey reseptörleri ile ateroskleroz arasındaki ilişkiyi araştıran sayısız çalışma bulunmaktadır (Voetsch B and Loscalzo J 2004). Hemostatik genler ile KAH arasındaki ilişkiyi inceleyen, 191 çalışmayı kapsayan bir meta-analizde, faktör V geninin G1691A ve faktör II geninin G20210A varyantlarının, bazı gruplarda erken KAH için risk taşıdığı sonucuna ulaşılmıştır (Ye Z *et al.* 2006).

2.5.4. Fibrinoliz - Fibrinolitik Yolak

Fibrinoliz, fibrinin kan pıhtılarını çözmesi ve sınırlaması için fizyolojik yıkılımdır. Fibrin birincil olarak zimogen, plazminogen olarak dolaşan serin proteaz olan plazmin tarafından degrade edilir. Otoregülatör sistemde, fibrin hem plazminojenin aktivasyonunda kofaktör, hem de plazminin substratı olarak görev yapar. Fibrin varlığında, doku plazminojen aktivatörü (t-PA) plazminojeni plazmine dönüştürür, bu da fibrini parçalar. Fibrin, reaksiyon için gerekli bir kofaktör olduğundan fibrinin degradasyonu, ilave plazminojen aktivasyonunu sınırlar. Serin proteaz olan t-PA, endotel hücreleri tarafından sentezlenip salınır (Wiman and Collen 1978, Loskutoff and Quigley 2000, Levi et al 2004, Cesarman-Maus and Hajjar 2005). Fibrine bağlanmasının yanısıra t-PA, Anneksin II (AnII) ve endotel hücresi ile trombosit yüzeyleri üstündeki diğer reseptörleri de bağlar (Miles et al 2005). Plazmin üretimi ve fibrinoliz, trombus oluşumu ile kesilir (Galis and Khatri 2002, Taraboletti *et al.* 2002). Plazminojen aynı zamanda, bir serin proteaz olan ürokinaz plazminojen aktivatör (u-PA) tarafından da plazmine dönüştürülebilir (Dano *et al.* 2005).

Fibrinolizin dolaşımdaki 2 ana inhibitöründen biri (t-PA ve u-PA'yı hızlıca inhibe etmede rol alan) *PAII*, diğeri ise (aktif faktör XIII tarafından polimerleşen fibrine, kovalent olarak bağlı bulunan spesifik bir plazmin inhibitörü olan) α_2 -antiplazmindir (α_2 AP) (Sprengers and Kluft 1987, Wiman and Collen 1978). α_2 AP, karaciğerde sentezlenen 452 aminoasitten oluşan, 63 kDa'luk bir glikoproteindir. Fibrinolitik yolakta plazminin primer fizyolojik inhibitörü olarak rol almaktadır (Coughlin 2005).

2.5.4.1 PAII ve KAH

2.5.4.1.1. PAII Fizyolojisi ve Gen Ekspresyonunun Regülasyonu

t-PA yoğun olarak vasküler endotel hücreleri tarafından üretilen bir glikoproteindir. Fibrin varlığında, plazminojeni plazmine dönüştürerek ve çapraz bağlı fibrini D-dimer ve diğer degradasyon ürünlerine ayrıştırarak pıhtı çözülümünü aktive eder. t-PA, tümör nekroz faktör (TNF), steroid hormonları, epidermal büyüme faktörü, bradikinin gibi bir çok faktör tarafından modüle edilmektedir (Brown *et al.* 1999, Medcalf 2007). t-PA'nın majör inhibitörü olan PAII, karaciğer (hepatositler), vasküler endotelyum (endotel hücreleri), ve adipoz dokuda (adipositler) eksprese olmaktadır (Chomiki et al 1994, Samad and Loskutoff 1996). Büyük miktarda aktif PAII trombositler tarafından da sentezlenip depolanmakta, trombosit aktivasyonu ile salınmaktadır. Trombositçe zengin pıhtı bu yüzden fibrinolize dirençlidir (Konkle *et al.* 1993).

PAII üretimi, interlökin-1 (IL-1) ve TNF- α gibi sitokinler; dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) gibi büyüme faktörleri; insülin ve östrojen gibi hormonlar ve trombin tarafından uyarılmaktadır (Sawdey *et al.* 1989, Kooistra *et al.* 1989, Brown *et al.* 2002, Dichek and Quertermous 1989). Aynı faktörlerin, vasküler inflamasyon ve aterosklerozu teşvik ettiği düşünülmektedir. Vasküler dokuda anjiyotensin-II'nin PAII mRNA ekspresyonunu indüklediği bulunmuştur (Vaughan *et al.* 1995).

PAII'in çoğunluğu plazmada bulunur. Salgılananın sadece bir kısmı plazma t-PA ile reaksiyona girerek inert kovalent bileşik olarak bulunmaktadır. PAII plazmada 3 formda dolaşmaktadır: aktif, inaktif ve latent form. Aktif form, kendiliğinden latent forma geçebilmekte ve bu durumdayken daha sonra reaktif olabilmektedir. İnaktif forma geçerek kendi spesifik proteinazları tarafından geri dönüşümsüz olarak degrade olabilmeleri de mümkündür (Cale and Lawrence 2007). Latent ve inaktif formlarının biyolojik rolleri belirsizdir.

Aktif PAI1'in yarı ömrü çok kısa olmakla birlikte, plazma PAI1 düzeyleri yetişkinlerde büyük değişkenlik gösterir. Fizyolojik koşullarda ortalama plazma konsantrasyonu 6-80 ng/ml'dir (Liu 2008). PAI1 seviyesi sabah en üst düzeydedir. Bu durum, sabahın erken saatlerinde gözlenen fibrinolitik aktivite seviyesinin düşüklüğüyle ve bu saatlerde akut MI insidansının yüksek oluşuyla örtüşmektedir (Andreotti *et al.* 1988, Angleton *et al.*1989, Muller *et al.*1989). PAI1 aktivitesinin fizyolojik ve patolojik koşullar altındaki regülasyonunun moleküler mekanizmaları geniş çapta çalışılmıştır. *PAI1* ekspresyonunun uyarıcıları içinde anjiyotensin, lipopolisakkarit, TNF, IL-1, etanol, aldosteron, glukokortikoidler, epidermal büyüme faktörü, protein kinaz C aktivatör forbol 12-miristat 13-asetat, insülin, hipoksi, lipoprotein, VLDL, ve yüksek glukoz düzeyleri bulunmaktadır (Massague 1990, Cale and Lawrence 2007, Liu 2008, Vaughan *et al.* 2007, Cesarman-Maus and Hajjar 2005). Heparin tedavisi endotel hücrelerinin *PAI1* üretimini düşürmektedir (Orbe *et al.* 1999).

2.5.4.1.2. t-PA ve PAII'in Kalıtımı

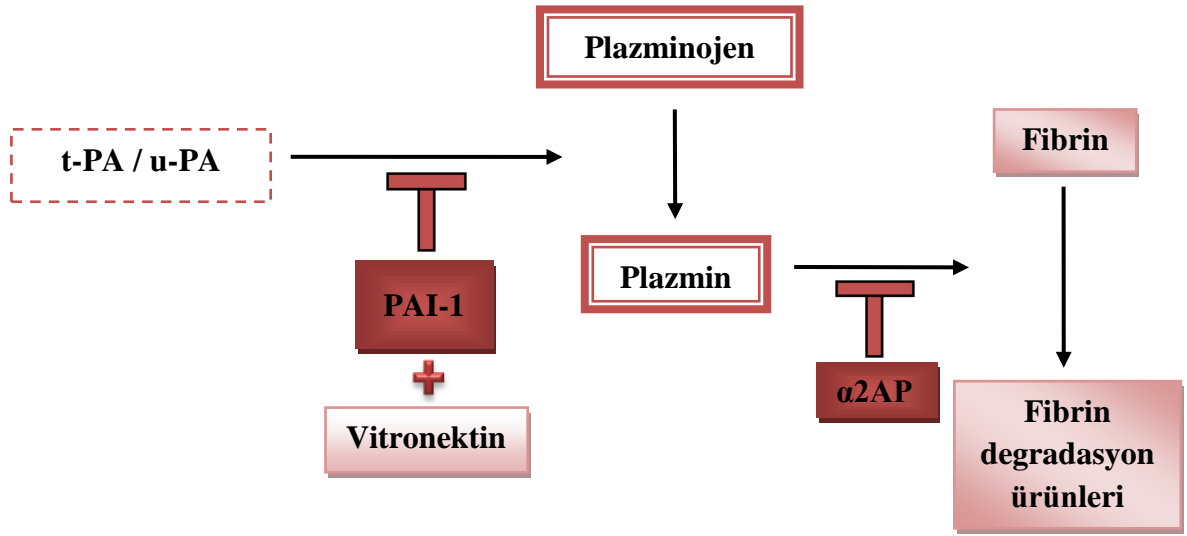
Bazı aile çalışmalarında t-PA ve PAII'in kalıtımı incelenmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Kan basıncı ve plazma PAII antijen değerleriyle sağlıklı ve genç ikiz çalışmasında kalıtılabilirliği 0.71 bulunmuş, diğer çalışmalar daha düşük fakat belirgin değerler saptamıştır (Cesari *et al.* 1999, de Lange *et al.* 2001, Peetz *et al.* 2004). Bu çalışmalarla, t-PA ve PAII çeşitliliğini belirlemede kaç genin rol aldığı, bu gen çeşitliliğinin popülasyondaki frekansları, ve sonuçta genetik etkilerin doğası anlaşılabilir (Asselbergs *et al.* 2008).

2.5.4.1.3. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1: SERPINE1

Serpinler, 16 sınıfta (A-P) gruplandırılan proteinlerin üst familyasıdır ve serin proteazları inhibe etmedeki yeteneklerine göre adlandırılırlar (Law *et al.* 2006). Serpin ailesinin (serin proteaz inhibitörü) üyesi olan PAII, endotel hücreleri, trombositler ve vasküler sistemi saran diğer mezenseyal hücreler tarafından sentezlenmektedir. İnsanda PAII geni 7.kromozom (7q21.3-q22) üstünde lokalize olup, 9 ekzon ve 8 intron içermekte, ve 379 aminoasitten oluşan 50 kDa'luk tek zincirli PAII glikoproteinini kodlamaktadır. (Strandberg *et al.* 1988, van Mourik *et al.* 1984, Sprengers and Kluft 1987, Fay 2004).

PAII, plazminojen aktivatörünün ana fizyolojik inhibitörü olarak bilinmektedir. PAII, t-PA veya u-PA'ya bağlanarak meydana getirdiği inaktif kompleksle, t-PA'yı inhibe edip, kandaki fibrinolizin negatif regülasyonunu meydana getirir (Sprengers and Kluft 1987). PAII'in bu önemli görevi, vitronektin glikoproteinini yardımıyla olmaktadır (Declerck *et al.* 1988) (Şekil 2.1.). PAII dolaşımında kararsız (yarı ömrü 1-2 saat) yapıda olmasına rağmen, 75 kDa'luk bir ekstrasellüler matriks glikoproteinini olan vitronektine (VN) bağlı olarak bulunur. Böylece vitronektin, PAII'in aktif konformasyonunu stabilize eder ve aktivitesini korur (Declerck *et al.* 1988, Lawrence *et al.* 1997, Keijer *et al.* 1991, Zhou *et al.* 2003).

Damar hasarını takiben aktifleşen trombositler, gelişen trombusu prematür fibrinolizden korumak için *PAII* 'i serbest bırakırlar. Daha sonra koagülasyon sürecinde trombus içinde, t-PA ve plazminojen/plazmin fibrine bağlanırlar. Bu da t-PA'yı, *PAII* inhibisyonundan koruyarak plazmin oluşumu ve fibrinoliz ile sonuçlanır (Cesarman-Maus and Hajjar 2005, Wiman and Collen 1978, Heimark *et al.* 1980).

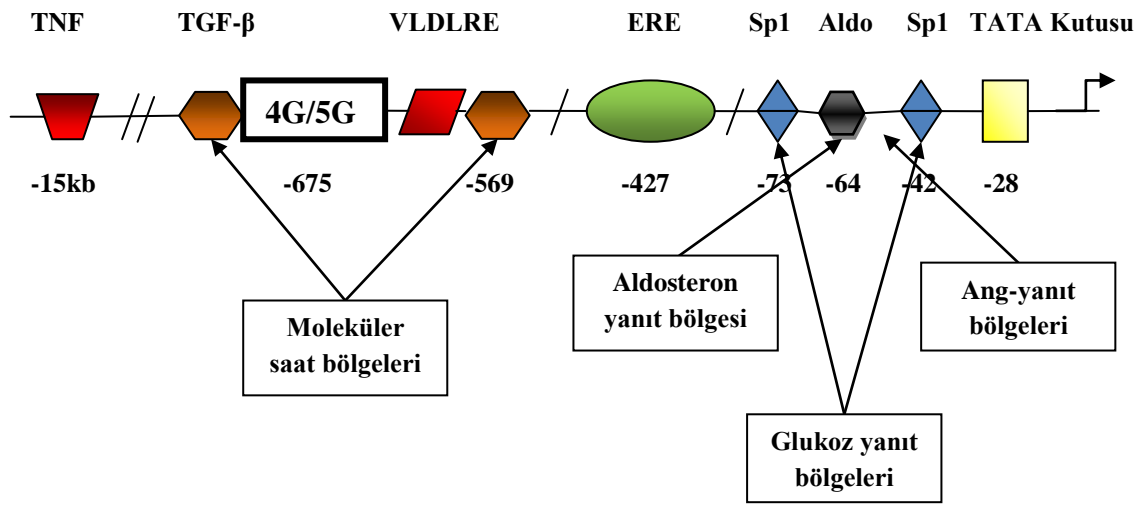


Şekil 2.1. Fibrinolitik yolda *PAII*'in rolü.

u-PA; ürokinaz plazminojen aktivatör, t-PA; doku plazminojen aktivatör.

2.5.4.1.4. PAII Geni

PAII geni, 7q21.3-q22'de lokalize olup, ortalama 12.2 kb uzunluğundadır ve 9 ekzon 8 introna sahip olmakla birlikte 50 kDa'luk bir protein kodlamaktadır (Strandberg *et al.* 1988, Dellas *et al.* 2005) (Şekil 2.2.).



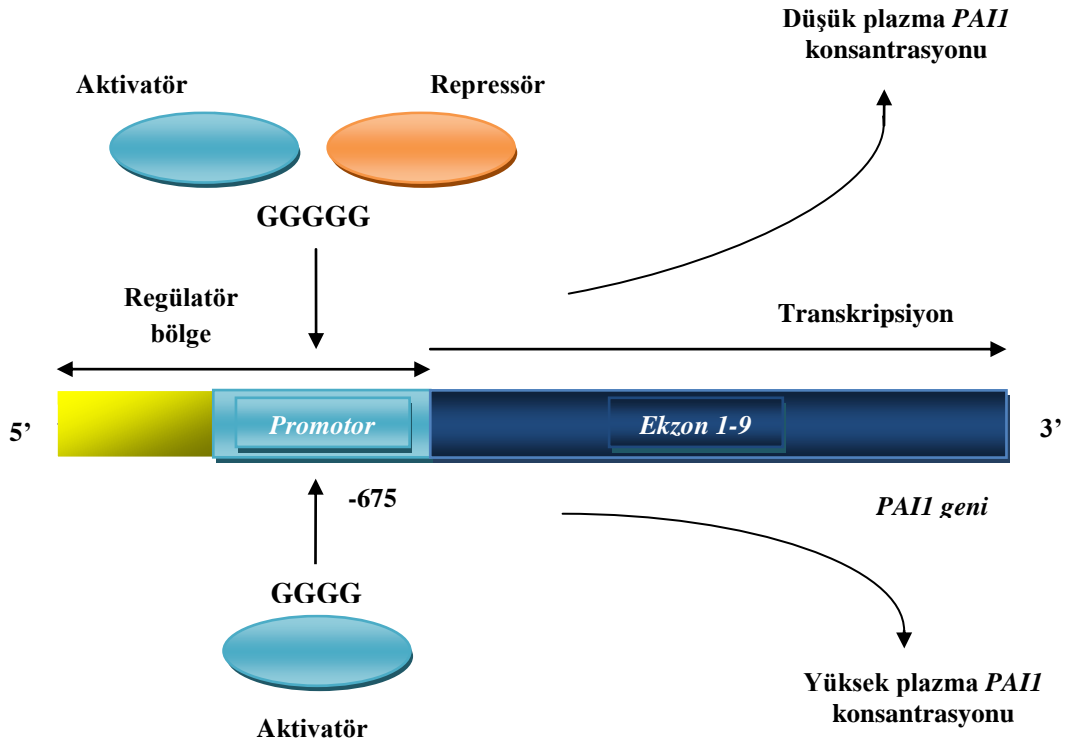
Şekil 2.2. İnsan *PAII* geni promotor bölgesinin şematik lokalizasyonu (Vaughan 2005)

2.5.4.1.5. *PAII* Gen Polimorfizmleri

PAII geninin, 3'HindIII, intron 3'de sitozin-adenin dinükleotid tekrarı ((CA)_n), 4G/5G'yi (insersiyon/delesyon) içeren bir çok polimorfizmi saptanmıştır. *PAII*'in belirlenen bu polimorfizmleri içinde, 4G/5G bölgesinin erken yaş KAH ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu insersiyon/delesyon bölgesi, transkripsiyonun başlangıç bölgesinden 675 bp yukarıda, promotor bölgede bulunmaktadır ve en sık çalışılmış genetik varyanttır (Dawson *et al.* 1991, Klinger *et al.* 1987, Dawson *et al.* 1993).

Plazma *PAII* konsantrasyonları, *PAII* geninin promotor bölgesinde meydana gelen 4G/5G polimorfizmi gibi bazı gen polimorfizmlerinden etkilenmektedir (Dawson *et al.* 1991). 4G alleli homozigot olan bireylerde, plazma *PAII* konsantrasyonunun homozigot 5G alleline sahip bireylere göre ortalama % 25 daha yüksek olduğu saptanmıştır (Eriksson *et al.* 1995). 45 yaşın altında MI geçirmiş hastaların aynı yaştaki sağlıklı bireylere göre, 4G prevalansları belirgin ölçüde yüksek bulunmuştur (Dawson *et al.* 1991, Eriksson *et al.* 1995).

In vitro çalışmalar transkripsiyon-regüle edici proteinlerin, bu polimorfizm bölgesine farklı bağlanmalar gösterdiğini bulmuştur. 5G allelinde; hem transkripsiyonu eksprese edici (transkripsiyonel aktivatör), hem de *PAII* transkripsiyon oranını düşüren repressör protein bağlarken, 4G allelinde; sadece eksprese edici protein bağlamaktadır. Aktivatörün bağlanmasını düşüren repressör protein bulunmadığından 4G alleleline sahip kişilerde, artmış gen ekspresyonuna bağlı olarak, 5G alleleline oranla *PAII* miktarı daha yüksektir (Dawson *et al.* 1993, Eriksson *et al.* 1995) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. *PAII* gen yapısı ve promotordaki 4G/5G polimorfik bölgesi (Kohler and Grant 2000).

2.5.4.1.6. Hastalıklarda *PAII*

Çalışmalar, *PAII* seviyesinin çok çeşitli patofizyolojik faktörlere karşı hassas olduğunu ve artmış *PAII* sentezinin çok sayıda kardiyovasküler olaya katkısının olduğunu göstermiştir (Mertens I *et al.* 2006). Tip 2 diyabetlerde hipergliseminin kontrolüyle birlikte *PAII* seviyesi düşmektedir (Bourcier and Libby 2000). Sirkadyan saat proteinlerinden *CLOCK*, *BMAL* ve *CRY*, *PAII* gen ekspresyonunu regüle etmektedir, bu durum kardiyovasküler olayların oluşum riskinin sabahları daha yüksek oluşunu açıklayabilir (Oishi *et al.* 2007). *PAII* ekspresyonunu ve dolayısıyla düzeyini arttıran 4G/5G promotor bölgesindeki polimorfizm, erken yaş KAH ve MI ile ilişkilendirilmiş, bazı çalışmalarda olumlu sonuç alınırken, bazılarında çelişkili sonuçlar ortaya konmuştur (Moore *et al.* 2002).

2.5.4.1.7. *PAII*'in Vasküler İnflamasyon ve Aterotrombozdaki Rolü

İnsanlarda yapılan bir çok çalışmada, aterosklerotik lezyonlarda artmış *PAII* ekspresyonu gözlenmiştir. Damar duvarlarında aşırı fibrin depozisyonu oluşumu ve yüksek plazma *PAII* düzeylerine bağlı olarak defektli fibrinoliz, koagülasyon ve fibrinoliz arasındaki dengenin bozulmasını, bu da aterotrombozu ve KAH'ı tetikleyebilir. Ateroskleroz başlangıcında, iltihaplı bölgelere yapışarak bu bölgede biriken monosit ve T lenfosit oluşumu, endotel ve lökositlerde adezyon moleküllerinin artmasıyla sonuçlanır (Ross 1999). Integrinler, sıkı bağlanmalarına aracılık eder. Aterom plakları tarafından üretilen proinflamatuvar sitokinler, yapışkan lökositlere kemotaktik bir uyarı göndererek, göçlerini intimaya yönlendirir (Libby 1995). Vasküler inflamasyon aynı zamanda plağın destabilizasyonu ile de ilişkilendirilmektedir. *PAII*, t-PA ve u-PA'nın başlıca fizyolojik inhibitörü olduğundan fibrinolitik sistemi regüle ederken, aynı zamanda akut faz protein olarak da görev almaktadır. Çeşitli çalışmalar, doku zedelenmesi sonrasında *PAII*'in inflamasyon bölgesinde lokal inflamatuvar sürecin regülasyonu sırasında oluştuğunu göstermiştir (Juhan-Vague *et al.* 1984, Kluft *et al.* 1985). *PAII*, vasküler inflamasyona katılarak proinflamatuvar özellik taşıyor olabilir.

Koagülasyon sistemi, koagülasyon moleküllerinin kompleks kaskadından oluşmuştur. Koagülasyon kaskadındaki ana basamak, kararlı çapraz-bağlı fibrin oluşumu, , fibrinojenin trombin-indüklü parçalanması ile çapraz-bağlı fibrin polimerlerinin eşzamanlı aktivasyonu ile olmaktadır. Koagülasyon kaskadında trombinin, çapraz-bağlı fibrin pıhtısı ve trombosit agregasyonu oluşumuyla sonuçlanan önemli rolleri bulunmaktadır. Fibrinolitik sistem, fibrin oluşumu sonrasında, plazminojen ve t-PA birlikte fibrinin yüzeyine bağlandığında aktif olur (Şekil 2.1.). Pıhtının spontan çözülümü büyük ölçüde fibrinolitik aktivite ile, plazmin oluşumu sonucu regüle edilmektedir.

Fibrinoliz sırasında insolubl fibrin, fibrin pıhtısının yüzeyinde, u-PA veya t-PA'nın etkisiyle inaktif öncüsü olan plazminojenden aktif forma dönüştürülerek, plazmin tarafından sindirilir. Fibrin degradasyonundan sorumlu enzim olan plazmin, fibrinolitik sistemde kritik bir rol oynamaktadır. Hiperkoagülabilitate, indirgenmiş fibrinoliz, veya her ikisi de koroner ve serebral arterlerde oklüzif pıhtı oluşumuna sebep olarak, KVH gelişimine katkıda bulunabilir (Kohler and Grant 2000, Aso 2007).

2.5.5. Lipid Metabolizması ve Erken Yaş KAH

Lipoproteinlerin kandaki düzeyleri ve bazı lipid metabolizması bozuklukları, ateroskleroz başlangıcı ve gelişimi ile yakından ilişkili bulunmuştur. Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDLR) gen ailesi, çok düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (VLDLR), LDL reseptör-ilişkili protein (LRP), LRP1b, megalin/LRP2, multiple epidermal büyüme faktörü içeren protein 7 (MEGF7)/LRP4, LRP5, LRP6 ve apolipoprotein E reseptör 2 (APO ER2)/LRP8 gen grupları aterosklerozda etkili olduğu düşünülen gen gruplarıdır (Boucher and Gotthardt 2004).

Apolipoprotein B (apo B) lipoprotein metabolizmasında görev alan anahtar glikoproteindir. LDL-reseptörü-bağlama domaininde meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlar, hiperkolesterolemi ve erken yaş KAH ile karakterize edilen familial ligand-defektif apo B-100'e neden olur (WhitWeld 2004). Apolipoprotein E (apo E), VLDL'nin primer bileşeni olup *APOE*'nin E4 alleli, yüksek LDL-K düzeyiyle ve erken yaş koroner aterosklerozla ilişkilendirilmiştir (Wilson 1996). Son zamanlarda yapılan bir genetik çalışmada, 2 erken yaş KAH vakasında *APOE* geninin Arg136Cys değişimi saptanmış, çalışma grubunu oluşturan hasta sayısı bakımından genelleme yapılmadıysa da, bu konuda çalışılma yapılması için bir zemin hazırlamıştır (Hubacek *et al.* 2009).

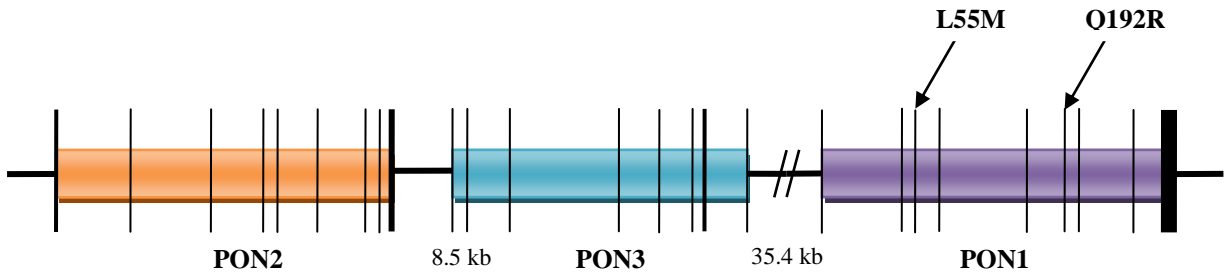
HDL kolesterol (HDL-K) ile ateroskleroz arasında ters ilişki olduğu iyi bilinmekteyken (Goldbourt 1997), düşük HDL-K düzeyine sahip bireylerin hepsi erken yaşta koroner kalp hastalığı riski taşımamaktadır (Rader 1993).

Lipid metabolizmasında yer alan *PONI* genindeki polimorfizmler de erken yaş KAH ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalar, PON1'in esterez, peroksidaz- ve fosfolipaz-benzeri aktiviteleriyle proinflamatuvar okside edici fosfolipidlerin oluşumunu önlediğini, veya bir kez oluşmaları durumunda, bunları degrade ettiğini göstermiştir (Costa *et al.* 2003).

2.5.5.1. Paraoksonaz (PON) ve KAH

2.5.5.1.1. PON Gen Ailesi

İnsanda *PON1*, *PON2* ve *PON3*'ten oluşan *PON* gen ailesi, 7q21.3-22'de birbirine komşu halde (Primo-Parmo *et al.* 1996) (Şekil 2.4.), farede 6q22.3-23.1 bölgelerinde lokalizedir (Rowles *et al.* 1996).



Şekil 2.4. PON Gen Ailesi Genetik Haritası

Bu 3 insan *PON* (*iPON*) geni, protein düzeyinde % 65, gen düzeyinde % 70'e yakın benzerlik göstermektedir. Evrimsel olarak, *PON2* en eski üye olmak üzere, *PON3* ve *PON1* onu takip etmektedir (Draganov and La Du 2004). İnsanlarda, *PON1* mRNA ekspresyonu, yalnız karaciğerle sınırlanmış olup benzer şekilde, *iPON3* de öncelikle karaciğerde eksprese olur, böbrekte de görülebilir (Reddy *et al.* 2001). *PON1* karaciğerden sentezlendikten sonra, serumda HDL ile ilişkili olarak bulunur (Durrington *et al.* 2001). *iPON2* kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, plasenta, ince bağırsak, dalak, mide, ve testis gibi doku çeşitlerinde bulunmasına rağmen, *PON2*'ye serumda rastlanmaz (Primo-Parmo *et al.* 1996, Ng *et al.* 2001).

PON, aromatik karboksilik asit gibi substratları da hidroliz eder. PON enzimi (EC.3.1.8.1) öncelikle, pestisitleri ve sarin gibi sinir gazlarını yıkma yeteneğinden dolayı çalışılmıştır. Son zamanlarda, lipidleri toksik oksidatif modifikasyonlardan korumak gibi analog bir rol yerine getirmesiyle adından söz ettirmektedir (Rowles *et al.* 1996).

2.5.5.1.2. *PONI* Geni

PONI, molekül ağırlığı 43 kDa olan, 354 amino asit kodlayan bir protein olup, bu proteini kodlayan genler 7q21.3-22'de lokalizedir (Primo-Parmo *et al.* 1996, Mackness *et al.* 1996, Hegele 1996) (Şekil 2.4).

Makrofaj kolesterol akümülayonu ve köpük hücre oluşumu, erken ateroskleroz için ayırt edici niteliklerdir. *PONI*'in antiaterosklerotik etkinliği, HDL partikülleri üzerine lokalizasyonu ile ilişkilidir. HDL'nin, aterosklerotik lezyonlardaki makrofaj hücrelerinden kolesterol akışına aracılık etme ve LDL'deki lipid oksidasyonunu kısıtlama olarak 2 anahtar rolü bulunmaktadır (Lund-Katz *et al.* 2003). *PONI*-knockout ve *PONI*-transgenik farelerin makrofajlarıyla yapılan çalışmalarda, *PONI*'in makrofaj köpük hücre oluşumunun engellenmesindeki katkısı incelenmiştir. *PONI*, okside LDL oluşumunu üç yolla gerçekleştirmektedir: 1) kolesterol alımını inhibe ederek, 2) okside LDL'deki okside lipidlerin yıkımını sağlayarak, ve 3) makrofaja daha fazla okside LDL alımına engel olarak (Aviram and Rosenblat 2004, Rosenberg *et al.* 2005, Barter *et al.* 2004).

2.5.5.1.3. PON1'in Enzimatik Aktivitesi ve Antioksidan Özellikleri

Serum PON1 kalsiyum-bağlı esteraz olup, paraokson gibi organofosfat substratlarına reverzibl bağlanarak onları hidroliz eder. Böylelikle, sinir sistemini, dolaşıma giren organofosfatların nrotoksisitesinden korumuş olur (La Du 1992). PON1'in paraoksonaz aktivitesinin yanısıra, arilesteraz, laktonaz, düşük düzeyde peroksidaz, ve fosfolipaz A2-benzeri aktivitelerinin de olduğu raporlanmıştır (Aviram *et al.* 1998, Teiber *et al.* 2003, Watson *et al.* 1995, Rodrigo *et al.* 2001, Rozenberg *et al.* 2003, Marathe *et al.* 2003).

PON'ların, trombosit-aktive edici faktörün hidrolizinde fosfolipaz A2 hareketi ve yine aterosklerotik vasküler hastalık için risk faktörü sayılan homosistein tiyolakton inaktivasyonu gibi çeşitli fizyolojik rolleri de önerilmektedir (Rodrigo *et al.* 2001, Ahmed *et al.* 2001, Jakubowski 2000). PON1'in fosfolipaz A2 aktivitesi, kültürdeki makrofajlardan doymuş yağ asidi ve lizofosfatidil kolin çıkışıyla sonuçlanır. Lizofosfatidil kolin, makrofajların kolesterol biyosentezinde, doz-bağımlı dş (inhibisyon) meydana getirir (Rozenberg *et al.* 2003). PON1, makrofajlarda kolesterol biyosentezini inhibe eder ve ATP-bağlı kaset protein A1 transporter aracılığıyla, makrofajlardan dışarı kolesterol akışını uyarır (Rozenberg *et al.* 2003, Rosenblat *et al.* 2005, Gaidukov *et al.* 2006). PON1 ayrıca, kolesteril esterlerinin peroksidlerini metabolize etmektedir (Aviram *et al.* 1998).

2.5.5.1.4. *PON1* Ekspresyon ve Enzim Aktivitesinin Regülasyonu

PON1 aktivitesi doğumdan itibaren 15-25 aya kadar artarak erişkin evrede en üst düzeye ulaşır (Cole *et al.* 2003). *PON1* aktivitesi ve konsantrasyonu bireyler arasında, ortalama 10 ile 40 kat varyasyon göstermektedir (Humbert *et al.* 1993). Genetik faktörlere ilave olarak, bir takım çevresel faktörlerin *PON1* ekspresyonu ve aktivitesini modüle ettiği (değiştirdiği) gösterilmiştir. Proaterojenik beslenen fare ve tavşanlarda *PON1* aktivitesinde düşüş saptanmıştır (Shih *et al.* 1996).

PON1 aktivitesi aynı zamanda fizyolojik ve patolojik durumlarda da değişebilmektedir. Örneğin, serum *PON1* aktivitesi, hamilelik ve menopoz döneminde belirgin şekilde düşmektedir. Düşük *PON1* aktivitesi aynı zamanda böbrek hastalıkları, diabetes mellitus, ve karaciğer sirozunda da görülmektedir (Ferre *et al.* 2001)

PON1 aktivitesini beslenme ve yaşam tarzı gibi faktörler de etkilemektedir. Sigara kullanımı, defalarca kullanılmış yemek yağı ve trans yağlar insanlarda *PON1* aktivitesini düşürmektedir. Tersine polifenoller, C ve E vitaminleri, ılımlı alkol kullanımı ve simvastatinin *PON1* aktivitesini güçlendirdiğine dair çalışmalar raporlanmıştır (Deakin *et al.* 2003, Jarvik *et al.* 2002, Tomas *et al.* 2000, van der Gaag *et al.* 1999, Sierksma *et al.* 2002, Aviram *et al.* 1998).

2.5.5.1.5. *PON1* Polimorfizmleri

PON1 geni 9 ekzon ve 8 introndan oluşmuştur. *PON1* geninin kodlayan sekansta 2, promotor bölgede ise 5 yaygın polimorfizmi belirlenmiştir (Şekil 2.4.).

2.5.5.1.6. *PON1* Promotor Polimorfizmleri

PON1 promotor geninin sekanslanmasıyla, kendi ekspresyonu üzerinden değişik seviyelerde etkisi olan, en az 5 polimorfizm keşfedilmiştir. Bu polimorfizmler, -909/907 (C/G), -832/824 (A/G), -162 (A/G), -126 (C/G) ve -108/-107 (C/T)'dir (Brophy and Hastings *et al.* 2001). Promotor polimorfizmleri ile serum *PON1* konsantrasyonunu gözlenmiş, fizyolojik olarak ilişkili bulunmuştur (Leviev and James 2000).

2.5.5.1.7. *PON1* Gen Ekspresyonu

Halen *PON1* gen ekspresyonu hakkında yeterli bilgi bulunmamakla birlikte, yapılan populasyon çalışmalarının ışığında, kodlayan bölgelerdeki polimorfizmleri *PON1*'in katalitik aktivitesini etkilerken, promotor bölge polimorfizmlerinin gen ekspresyon düzeyi üstüne etkisi olduğu düşünülmektedir (Leviev and James 2000, Brophy and Hastings *et al.* 2001, Brophy and Jampsa *et al.* 2001, Deakin *et al.* 2003).

2.5.5.1.8. *PONI* Kodlayan Bölge Polimorfizmleri ve KAH

Ekzonda sıklıkla meydana gelen bu 2 allelik varyant; ekzon 3'ün 55. kodonunda lösinin metiyonine (55 L→M) ve ekzon 6'nın 192. kodonunda glutaminin arjinine (192 Q→R) dönüşümüdür (Adkins *et al.* 1993). Erken yaş KAH ile ilişkilendirilen gen polimorfizmi, 192. kodonda meydana gelen Gln192Arg (Q192R) polimorfizmidir. L55M tek-nükleotid allelik varyantı, yani L alleli, 192. pozisyondaki glutamin veya arjinin varlığından bağımsız olarak daha yüksek enzim konsantrasyonuna yol açarken, Q192R allelik varyantı paraoksonaz-1 aktivitesinde değişikliğe yol açmaktadır (Rodriguez-Esparragon *et al.* 2005, Garin *et al.* 1997). *PONI*'in 192Q/R polimorfizmi, enzimin hidrolitik aktivitesinin substrat spesifitesindeki dikkat çekici farktan sorumludur (Adkins *et al.* 1993, Humbert *et al.* 1993, Davies *et al.* 1996). Paraokson'un HDL ile olan hidrolitik aktivitesi, *PONI*'in 192 RR allelinde, 192 QQ alleleline nazaran daha fazladır. Heterozigotluk durumu bu aktivitenin seviyesini düşürmektedir (Watson *et al.* 2001, Imai *et al.* 2000). Q192R polimorfizminin, *in vitro* olarak, enzimin LDL'yi oksidasyondan koruma yetisini değiştirdiği gözlenmiştir. *PONI*'in L55M polimorfizmi substratlarıyla olan interaksiyonunu etkilememekte, bunun yerine enzimin, serum aktivitesi ve konsantrasyonunda düşüklük ile ilişkilendirilmektedir (Oliveira *et al.* 2004). *PONI* 192Q'nun antioksidan kapasitesinin oksidasyona uğramış lipidlerin üstünde, *PONI* 192R'e göre daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Aviram *et al.* 2000).

Paraokson 192R izoformunca (Adkins *et al.* 1993, Humbert *et al.* 1993), diazokson, soman ve sarin 192Q izoformu tarafından daha etkili hidroliz olmaktadır (Davies *et al.* 1996). Paraoksonaz aktivitesi, çok geniş çapta araştırılmış raporlanmıştır, ve enzim konsantrasyonundaki varyasyonu gibi 192 Q/R polimorfizminin kombine etkilerini yansıtmaktadır. *PONI* esteraz aktivitesi 192 Q/R polimorfizminden etkilenmezken, *PONI* konsantrasyonu dolaylı olarak arilesteraz aktivitesinin ölçümüyle değerlendirilebilir. *PONI* 55 polimorfizmi, 107 C/T'yi de içeren promotor bölgesindeki polimorfizmlerle bağlantılı bulunmuştur, bu nedenle enzim konsantrasyonundaki varyasyonlarla ilişkilendirilmiştir. (Garin *et al.* 1997). Leviev ve ark. (1997), *PONI* 55M alleli taşıyan bireylerde, mRNA düzeylerinde düşüş olduğunu saptamıştır.

Q192R ve L55M polimorfik formlarının LDL'yi oksidasyondan korumasındaki yeteneklerinin değişiminin KAH geliştirme riski üstüne etkileri bir çok vaka-kontrol çalışmasına konu olmuştur. Bu çalışmalar, sonuç ortaya koyacak bir kesinlik kazandırmamakla birlikte (Ko *et al.* 1998), bazıları KAH ile ilişki bulurken, bazıları bulmamıştır (Ombres *et al.* 1998). Wheeler ve ark. (2004), 43 genetik asosiyasyon çalışmasının dahil olduğu 11.000 vaka ve 13.000 kontrolle yaptığı metaanalizde, *PONI* 55, -108T veya *PON2* -310 bölgelerindeki polimorfizmlerden KKH arasında kaydadeğer bir ilişki bulmazken, *PONI* 192 polimorfizmiyle KAH arasında zayıf bir ilişki bulunmuştur. Bu metaanalizde, etnik köken faktörü göz önünde bulundurulmamış olduğundan *PON* polimorfizminin hala bazı bireyler için risk unsuru olabileceği düşünülmektedir (Wheeler *et al.* 2004). Çelişkili sonuçlar, az sayıda ve farklı populasyonlardan bireyle çalışmanın ve/veya farklı genotipleme yöntemleri kullanılmasının sonucu olabilir (Klimov *et al.* 1989).

İn vivo araştırmaların ışığında, geniş sayıda yapılan bazı populasyon çalışmaları bulgularında, *PONI* 192 Q/R ve 55 L/M polimorfizmleri KAH patogeneziyle ilişkilendirilmiştir (Serrato and Marian 1995, Chen *et al.* 2003, Garin *et al.* 1997, Brophy *et al.* 2001, Aynacioglu ve Kepekci 2000). Epidemiyolojik çalışmalarda *PONI* geninin allelik varyantları ile ilişkili KAH riski için çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (Zama *et al.* 1997, Sanghera *et al.* 1997, Wheeler *et al.* 2004, Antikainen *et al.* 1996, Herrmann *et al.* 1996).

2.5.5.1.9. *PON1* ve Ateroskleroz

İnsan serum paraoksonaz (iPON), organofosforlu bileşiklerin hidrolizinde, lipid metabolizmasında, kardiyovasküler hastalıklar ve aterosklerozda önemli rol oynamaktadır. *PON1*, yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) ve düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) ile sıkı bir ilişki içindedir. *PON1*'in hem HDL hem LDL'yi, ateroskleroz ve kalp hastalığının ilerleyişindeki majör basamak olan oksidasyondan koruduğu bilinmektedir (Aviram *et al.* 1998, Mackness *et al.* 1991, Mackness and Arrol *et al.* 1993, Mackness and Abbott *et al.* 1993, Mackness *et al.* 1998, Watson *et al.* 1995). Mackness ve arkadaşlarının (1995) *PON1* ile dolaşımdaki HDL arasındaki ilişkiyi keşfi, *PON1*'in lipid metabolizması ve aterogenezdeki rolünün anlaşılması için bir takım çalışmaların yapılmasını tetiklemiştir. Son on yılda, *PON1*'in LDL'yi oksidasyondan koruduğu, okside LDL'nin biyolojik etkilerini geri çevirdiği ve HDL'nin oksidasyonunu engelleyerek fonksiyonunu muhafaza ettiği ispatlanmıştır (Aviram *et al.* 1998, Watson *et al.* 1995).

Shih ve ark.ları, bu *in vitro* ortamdaki bulguları *in vivo* ortamda doğrulamak adına, gen hedefleme yöntemi ile *PON1* geni yoksun (*PON1*^{-/-}) fare oluşturmuşlardır. *PON1*^{-/-} farede, saptanabilir herhangi bir plazma paraoksonaz aktivitesi gözlenmemiştir. Bunun yanısıra heterozigot farelerde, yaban tip farelere nazaran % 50 düşük plazma paraoksonaz aktivitesi görülmüştür. *PON1*^{-/-} fare makrofajlarının yaban tiplerine göre LDL kolesterol oksidasyonunu (ve okside LDL'yi) indirgeme kapasitesi daha düşük olduğu ve daha çok okside LDL barındırdığı için *PON1*^{-/-} farenin HDL kolesterolü, kontrollerine göre arter duvarı kültür modelinde LDL'yi oksidasyondan koruyamamış ve fareyi ateroskleroza daha yatkın hale getirmiştir. Buna ilaveten, aşırı yağlı, yüksek kolesterollü, kolat içeren diyetle maruz bırakılan *PON1*^{-/-} farelerde, yaban tip ve heterozigot farelere göre belirgin büyüklükte lezyonlar olduğu gözlenmiştir (Shih *et al.* 1998).

Apolipoprotein E'den yoksun (apoE^{-/-}) fare, aterosklerotik lezyon gelişimi için iyi bir modeldir. apoE^{-/-} farelerde, *PONI*'in KAH oluşumunu önlemedeki rolü daha belirgin gözlenmektedir. *PONI*^{-/-} ile apoE^{-/-} fareler çiftleştirilmiş, *PONI*^{-/-}/apoE^{-/-} farelerde yalnız apoE^{-/-} farelere göre, daha büyük lezyonlar meydana gelmiştir. *PONI*^{-/-}/apoE^{-/-} farelerden taze izole edilen LDL incelendiğinde, yine sadece apoE^{-/-} farelere göre daha yüksek düzeylerde biyolojik olarak aktif fosfolipidler elde edilmiştir. Bu sonuç, çifte knockout farelerde oksidatif stresin daha yüksek düzeylerde olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde, *PONI*^{-/-}/apoE^{-/-} farelerin HDL'leri *PONI*^{-/-} farelerde olduğu gibi LDL'yi oksidasyondan korumakta başarısız olmuştur (Shih *et al.* 2000). Bu fonksiyon kaybı çalışmaları, *PONI*'in aterogeneze karşı koruyucu ve HDL'nin antioksidan kapasitesine yardımcı olduğu hipotezini desteklemektedir (Ng *et al.* 2005).

PONI'in overekspresyonunun HDL fonksiyonunu koruyup korumadığını belirlemek amacıyla, Oda ve ark., fare *PONI*'ini overeksprese eden transgenik fare geliştirmişlerdir. m*PONI*'i overeksprese olan fareden izole edilen HDL'de, yaban tipe ve apoE^{-/-} kıyasla, lipid peroksidasyonuna daha büyük direnç ve aterosklerotik lezyon oluşumunda belirgin bir düşüş göstermişlerdir (Oda *et al.* 2002).

Bu *in vivo* çalışmalar, *PONI*'in potansiyel olarak, ateromun önlenmesinde tedavi edici bir ajan olduğunu vurgulamaktadır. İlerki çalışmalar, *PONI*'in aterosklerotik lezyon regresyonunu indükleme kapasitesini belirlemek için dizayn edilerek önemli ilgi uyandırabilecektir (Ng 2005).

2.6. AMAÇ

Bu çalışmada fibrinolitik döngüde rol alan *PAII* ve lipid metabolizmasında yer alan *PONI* genlerindeki polimorfizmler ile erken yaş KAH arasındaki ilişki incelenmiştir. Daha önce dünyada ve Türkiye’de, *PAII* 4G/5G ve *PONI* gen polimorfizmleri ayrı ayrı olmak üzere, koroner arter hastalarında çalışılmış, fakat Türk populasyonunda her iki polimorfizmin erken yaş KAH olgularında çalışıldığına dair herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Elde edilecek verilerin bu bakımdan Türk toplumu için önem arz edebileceği düşünülmektedir. Dünya genelinde yapılan çalışmalarda ortaya çıkan, erken yaş KAH için risk unsuru sayılabilecek bu gen polimorfizmlerinin, Türk toplumunda risk unsuru ya da koruyucu olup olmayacağını görmek, ve elde edilen verilerin ilerki çalışmalarda mevcut bilgilere ilave veriler olması bakımından bu tez çalışmasının yapılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'na başvurmuş, erken yaş (≤ 45 yaş) KAH tanısı almış, KAH için belirlenen sigara, DM, dislipidemi, hipertansiyon ve aile hikayesi risk faktörlerine sahip 45 yaş ve altı 26 erkek hasta (1.grup) ile bu gruba yaş ve cins açısından eş 26 sağlıklı gönüllüden (2.grup) aydınlatılmış (bilgilendirilmiş) onamları ile kan örnekleri alınmıştır. Araştırma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 1 Mart 2010 tarihli toplantısında 08-146 no.'lu kararı ile onaylanmıştır.

Hasta ve kontrol grubuna ait aile öyküsü ve özgeçmiş bilgileri ile demografik verileri ve laboratuvar bulguları çizelge 3.1.de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma grubunu oluşturan hasta ve sağlıklı bireylerin özellikleri

Özellikler	Erken yaş KAH Hastaları (n=26) (%)	Sağlıklı Kontrol Grubu (n=26) (%)	<i>p</i>
Yaş	42.08 ± 3.90	41.42 ± 4.27	>0,50
Sigara	17 (% 65.38)	20 (% 76.92)	>0,10
Hipertansiyon	12 (% 46.15)	0 (%0.00)	<0,01
DM	6 (% 23.08)	0 (%0.00)	<0,01
LDL (mg/dl)	119.57 ± 42.55	95.07 ± 21.23	<0,01
Total Kolesterol (mg/dl)	209.38 ± 98.13	165.42 ± 20.69	<0,05
HDL (mg/dl)	34.3 ± 8.34	47.23 ± 10.63	<0,01
Aile Hikayesi	13 (% 50.00)	0 (%0.00)	<0,01
MI Hikayesi	16 (% 61.54)	0 (%0.00)	<0,01
Bel Çevresi	104.84 ± 25.59	93 ± 4.30	>0,05
BMI	25.38 ± 4.00	24.89 ± 1.44	>0,50

3.2. ARAÇ ve GEREÇLER

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

DNA izolasyonu, PCR, restriksiyon enzimi ile kesimi ve agaroz jel elektroforezi aşamalarında kullanılan cihazlar markaları ve kullanım amaçları ile, aşağıdaki Çizelge 3.2.'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan cihazlar

Adı / Model (Marka)	Kullanım Yeri / Amacı
Mikrosantrifüj (Eppendorf)	DNA izolasyonu, PCR, restriksiyon enzimi kesimi
Mini vorteks (Velp Scientifica)	DNA izolasyonu, PCR, solusyonların karıştırılması
Otomatik Mikropipet Seti (Eppendorf)	DNA izolasyonu, agaroz jel elektroforezi
Isıtıcı (Wealter Corp.)	DNA İzolasyonu
Termocycler (Peltier Thermocycler)	PCR ve enzim kesimi
Hassas Terazı (Mettler Toledo)	Agaroz, tris, EDTA, borik asit tartımı
pHmetre (Thermo)	TBE solüsyonunun pH'ını ayarlama
Mikrodalga fırın (Arçelik)	Agaroz jel hazırlama
Jel Görüntüleme Sistemi (Alpha Innotech)	PCR ve restriksiyon enzimi kesim ürünlerini UV altında görüntüleme
Yatay elektroforez cihazı ve güç kaynağı (Appatus Corp.)	Agaroz jel elektroforezi
Buzdolabı (+4°C) (Bosch)	PCR ürünlerini saklama
Derin dondurucu (-20 °C) (Bosch)	Hasta kanları ve DNA'larını uzun süreli saklama

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışma süresince kullanılan tüm kimyasal maddeler, markaları ve kullanım amaçları ile aşağıdaki Çizelge 3.3.'de listelenmiştir.

Çizelge 3.3. Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı (Marka)	Kullanım Yeri / Amacı
Absogene DNA İzolasyon Kiti (RTA, Türkiye)	DNA izolasyonu
Mutlak Ethanol (Merck, Almanya)	DNA izolasyonu
Taq DNA Polimeraz Enzimi (Fermentas, Kanada)	PCR
10X Buffer (PCR Tamponu) (Fermentas, Kanada)	PCR
MgCl ₂ (Fermentas, Kanada)	PCR
dNTP miks (Fermentas, Kanada)	PCR
DMSO (Dimetil sülfoksit) (CH ₃) ₂ SO (Finnzymes, Kanada)	PCR
<i>PAII -675 4G/5G</i> , <i>PONI L55M</i> ve <i>PONI Q192R</i> 'a özel primer dizileri (HPSF) (Alpha DNA, Kanada)	PCR
Agaroz (Prona, İspanya)	Agaroz jel hazırlama
EDTA (Merck, Almanya)	Agaroz jel hazırlama
Borik Asit (Merck, Almanya)	Agaroz jel hazırlama
Tris (Merck, Almanya)	Agaroz jel hazırlama
6X Jel Yükleme Tamponu (Fermentas, Kanada)	Agaroz jel elektroforezi
GeneRuler 50 bp DNA Moleküler Ağırlık Belirteci Belirteci (0.5 µg/µl) (50 µg) (Fermentas, Kanada)	Agaroz jel elektroforezi
pUC19 DNA/MspI (HpaII) Moleküler Ağırlık Belirteci, 23 (0.1 µg/µl) (50µg) (Fermentas, Kanada)	Agaroz jel elektroforezi
Etidyum Bromür (EtBr) (Fermentas, Kanada)	Agaroz jel elektroforezi
NlaIII Restriksiyon Enzimi ve Tamponu (NEB, İngiltere)	RFLP
Alw I Restriksiyon Enzimi ve Tamponu (NEB, İngiltere)	RFLP
BsII Restriksiyon Enzimi ve Tamponu (NEB, İngiltere)	RFLP

3.2.3. Kullanılan Bileşik ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan bileşik ve çözeltiler ile içerikleri, aşağıdaki Çizelge 3.4.de listelenmiştir.

Çizelge 3.4. Araştırmada kullanılan bileşik ve çözeltiler

Çözeltinin Adı	Çözeltinin İçeriği
PCR ve RFLP	
Taq DNA Polimeraz Enzimi (5 u/μl)	<i>Thermus aquaticus</i> YT1'den klonlanan <i>pol</i> geni ile E.coli hücreleri (Rekombinant)
10X Taq Tampon Çözeltisi (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	750 mM Tris-HCl (pH 8.8, 25C'de), 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, % 0.1 (v/v) Tween 20
MgCl ₂ (25 mM)	-
dNTP Solüsyonu (100 mM solüsyon, Her bir deoksiribonükleotidden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 μmol)	dATP C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₁₂ P ₃ Na ₃ ; MW = 557.2; λ _{max} =259 nm; ε=15.2x10 ³ M ⁻¹ cm ⁻¹ at pH 7.0; dCTP C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₁₃ P ₃ Na ₃ ; MW = 533.1; λ _{max} =271 nm; ε=9.1x10 ³ M ⁻¹ cm ⁻¹ at pH 7.0. dGTP C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₁₃ P ₃ Na ₃ ; MW = 573.2; λ _{max} =253 nm; ε=13.7x10 ³ M ⁻¹ cm ⁻¹ at pH 7.0. dTTP C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₁₄ P ₃ Na ₃ ; MW = 548.1; λ _{max} =267 nm; ε=9.6x10 ³ M ⁻¹ cm ⁻¹ at pH 7.0.
DMSO (Dimetil sülfoksit)	(CH ₃) ₂ SO
NlaIII ve AlwI Restriksiyon Enzimi Tamponu	1X NEBuffer 4'te; 20 mM Tris-asetat, 50 mM potasyum asetat, 10 mM magnezyum asetat, 1 mM DTT (Dithiothreitol), 25°C'de pH 7.9
Bsl I Restriksiyon Enzimi Tamponu	1X NEBuffer 3'te; 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DDT (Dithiothreitol), 25°C'de pH 7.9
Agaroz Jel Elektroforezi	
6X Jel Yükleme Tamponu	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), % 0.03 bromofenol mavisi, % 0.03 ksilen siyanol FF, % 60 gliserol ve 60 mM EDTA
Etidium bromür (0.1 μg/μL)	% 0.005 son konsantrasyonu

(Çizelge 3.4. devam)

pUC19 DNA/MspI(HpaII) Moleküler Ağırlık Belirteci, 23, (0.1 µg/µl) (50µg)	Saklama tamponu: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM EDTA, % 0.005 bromofenol mavisi, % 0.005 ksilen siyanol FF, % 10 gliserol. 6X Yükleme Tamponu ile karıştırılmış halde kullanıldı.
50 bp DNA Moleküler Ağırlık Belirteci (0.5 µg/µl) (50 µg)	Saklama tamponu : 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) ve 1 mM EDTA. 6X Yükleme Tamponu ve dH2O sonradan ilave edildi.

3.2.4. 1 X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Tamponu Hazırlanışı

Yatay elektroforez cihazının tankı ve agaroz jel için kullanılan 5 X TBE tamponundan 1 X TBE tamponu arastoğu hazırlandı. 1 X TBE tamponu; 0.089 M Tris bazik, 0.089 M Borik asit ve 0.002 M EDTA içermektedir (pH 8.3). 1 X TBE tamponu hazırlamak için; 54 gr. Tris bazik, 27.5 gr borik asit ve 2.72 gr EDTA tartılarak, 1lt distile suya tamamlandı. Elektroforez cihazının tankı için; 5 X TBE tamponundan 125 ml alıp, 500 ml distile suyla 1X TBE tamponu elde edildi.

3.2.5. Agaroz Jel Hazırlanışı

% 1'lik agaroz jel hazırlamak için 1.35 gr agaroz hassas terazide tartılıp, mezürde ölçülen 108 ml distile su ve 27 ml 5 X TBE tamponuyla beher içinde karıştırılarak mikrodalgada ısıtılmıştır. Kaynamaya başladıktan ve homojen bir karışım elde edildikten sonra, beher mikrodalgadan çıkarılmış, ortalama 60°C'ye gelen karışıma 0.1 µg/µL Etidium bromür (%0.005 final konsantrasyonu olacak şekilde) karıştırılarak yatay elektroforez tankına yerleştirilecek iki yanı kapalı 10 cm – 15 cm ebatlarındaki kasete dökülmüştür.

% 1.5'lük agaroz jel hazırlamak için 2.025 gr agaroz 108 ml distile su ve 27 ml 5 X TBE tamponu eklenip karıştırılarak mikrodalgada ısıtılmıştır. Kaynadıktan sonra ortalama 60°C'ye gelen karışıma EtBr ilave edilip karıştırılan jel, yatay elektroforez tankının kasetine dökülmüştür.

% 3'lük agaroz jel hazırlamak için 4.05 gr agaroz 108 ml distile su ve 27 ml 5 X TBE tamponu eklenip karıştırılarak mikrodalgada ısıtılmıştır. Kaynadıktan sonra ortalama 60°C'ye gelen karışıma EtBr ilave edilip karıştırılan jel, yatay elektroforez tankının kasetine dökülmüştür.

3.3. YÖNTEM

3.3.1. DNA İzolasyonu

EDTA'lı (etilendiamintetraasetikasit) tüplere alınan periferik kanlardan DNA izolasyonu, AbsoGene Kandan Genomik DNA İzolasyon kiti ile, kitte belirtilen prosedür uygulanarak gerçekleştirildi. DNA İzolasyonun Aşamaları;

- Kit açıldığında, liyofilize haldeki 5 mg Proteinaz K'ya 1 ml dH₂O eklenerek vortekslenmiştir. Konsantre 19 ml W1 solüsyonuna 19 ml, 28.5 ml W2 solüsyonuna 9.5 ml mutlak etanol ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.
 - İzolasyona başlamadan önce, ısıtıcı 65°C'ye ayarlanmıştır.
1. 1.5 ml'lik steril ependorf tüpüne 20 µl Proteinaz K, 250 µl EDTA'lı kan, 250 µl Solüsyon B konarak, kısaca vortekslenip, 15 dk. 65°C'de inkübasyona bırakıldı (her 5 dk.da bir karışım kısaca vortekslendi).
 2. 65°C'den çıkan karışıma, yine kısaca vorteks ve santrifüjden sonra, 200 µl mutlak etanol eklendi, vurum-vorteks yapılarak spin kolonlu toplama tüpüne aktarıldı. Bu arada ısıtıcı 70°C'ye yükseltildi, steril ependorf tüplerine hasta sayısı x 250 µl kadar solüsyon E ısıtıcıya yerleştirildi.
 3. Tüm içerik, 6.000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Spin kolonun altındaki toplama tüp atılarak, spin kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
 4. 700 µl W1 Solüsyonu eklenen spin kolon, yine 6.000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü değiştirildi.
 5. 700 µl W2 Solüsyonu eklenen spin kolon, 10.000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpünün içi boşaltılarak, boş bir şekilde spin kolon 14.000 RPM'de 30 sn. santrifüj edildi.
 6. Spin kolonlar, hasta bilgilerinin yazılı olduğu 1.5 ml'lik steril ependorf tüplerine yerleştirilip, önceden ısıtılmış olan Solüsyon E'den 200 µl kondu, oda sıcaklığında 3 dk. Inkübasyondan sonra 14.000 RPM'de 1 dk. santrifüj edildi.

7. Spin kolon atıldıktan sonra, 200 µl Solüsyon E içinde yaklaşık 6µg genomik DNA eldesi yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar % 1'lik agaroz jelde yürütülmüş, parlaklığına bakılmıştır.

3.3.2. Primerler ve Özellikleri

PAII ve *PONI* (L55M ile Q192R) gen polimorfizmlerinin PCR'ında kullanılacak primerler ve özellikleri Çizelge 3.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. *PAII* ve *PONI* polimorfizm bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerler ve PCR ürün boyları

Polimorfizm Bölgesi	Kullanılan Primer Dizileri	Ürün Boyu
<i>PAII</i> 4G/5G	F : 5' GCC CTC AGG GGC ACA GAG AGA GTC TGG CCA 3' R : 5' GCA ATG CAG CCA GCC ACG TG 3'	163 bç
L55M	F : 5' GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G 3' R : 5' TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC 3'	170 bç
<i>PONI</i> Q192R	F : 5' TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G 3' R : 5' CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC 3'	99 bç

3.3.3. DNA Moleküler Ağırlık Belirteçleri (Marker)

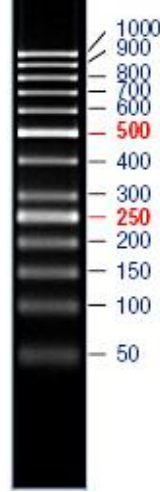
3.3.3.1. Hazırlanışı

DNA markerları kullanıma hazır gelmemiş ise, 4:1:1 (distile su : marker : 6X yükleme tamponu) oranında karıştırılarak ara stok hazırlandı.

3.3.3.2. GeneRuler 50bp DNA Belirteci

Aralıkları; 13 fragman üstten alta (bç) : 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50.

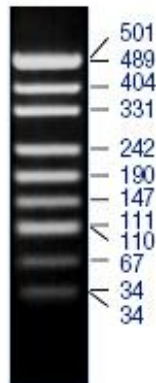
% 2.5'luk TopVision (Fermentas) LE GQ Agaroz jel ile 1X TBE, 5V/cm'de 1 saatlik görüntüsüdür.



3.3.3.3. pUC19 DNA/MspI (HpaII) Belirteç, 23 (50µg)

Aralıkları; 12 fragman üstten alta (bç) : 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34, 34.

% 1.7'lik TopVision (Fermentas) LE GQ Agaroz jel ile 1X TBE, 5V/cm'de 1.5 saatlik görüntüsüdür.



3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.3.4. 1. *PAII* -675 4G/5G Polimorfizmi PCR Aşaması

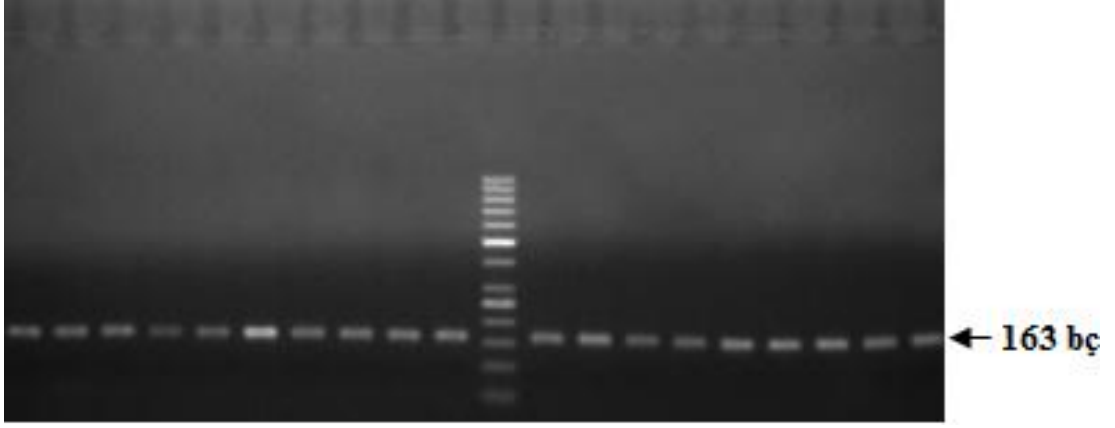
PAII -675 bölgesinin 4G/5G polimorfizmi için; 5 µl genomik DNA (100 ng), 2 µl F primeri (10 pmol/µl) (0.4 µM) ve 1.5 µl R primeri (10pmol/µl) (0.3 µM), 5 µl Taq Buffer (10 X), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 5 µl dNTP (2.5 mM), 0.25 µl DMSO (% 0.5) ve 1 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5u/µl) PCR grade suyla toplam hacim 50 µl olacak şekilde tamamlanarak PCR gerçekleştirilmiştir.

PAII -675 4G/5G polimorfizminin, uygun primerlerle yapılan PCR'ının thermocycler programı;

96°C'de	10 dk. başlangıç denatürasyonunu takiben	
95°C'de	1 dk. denatürasyon,	} 40 döngü
63 °C'de	1 dk. hibridizasyon,	
72 °C'de	2 dk. uzama	

ve son olarak 72 °C'de 10 dk. final uzaması şeklinde referans alınan kaynaktan yeniden düzenleme ile optimize edilmiştir (Doggen *et al.* 1999).

10 µl PCR ürünü ile 2 µl yükleme tamponu karışımı, % 1.5'luk jele yüklenerek 90 V'da 45 dk. yürütülmüş, 163 bp uzunluğundaki bantların varlığı kontrol edilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Soldan sağa markera kadar ilk 10 hastanın, markerdan sonra 11-19 numaralı hastaların *PAII* PCR ürünleri.

3.3.4. 2. *PONI* Leu55Met (L55M) Polimorfizmi PCR Aşaması

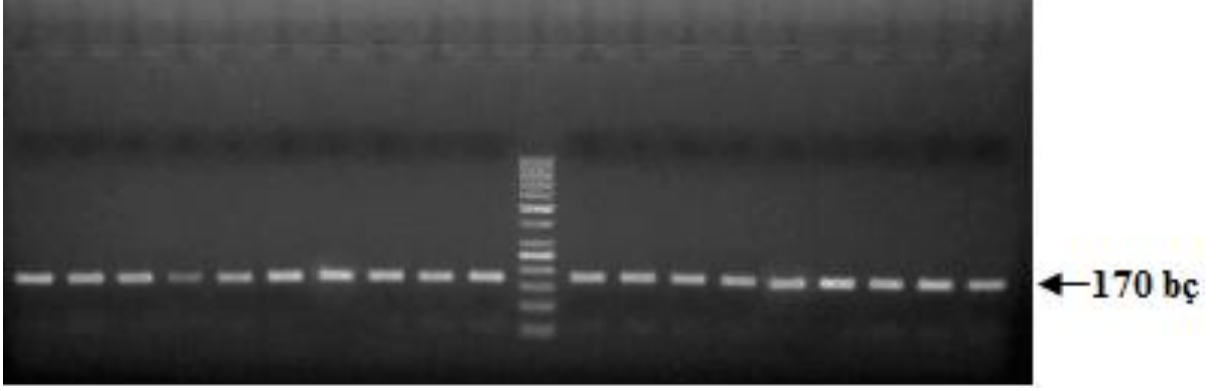
PONI L55M polimorfizmi için; 5 µl genomik DNA (100 ng), her bir primerden (F ve R) 1 µl (10 pmol/µl) (0.2 µM), 5 µl Taq Buffer (10 X), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 4 µl dNTP (2.5 mM), ve 0.5 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5 u/µl) PCR grade suyla toplam hacim 50 µl olacak şekilde tamamlanarak PCR gerçekleştirilmiştir.

PONI L55M polimorfizminin, uygun primerlerle yapılan PCR'ının thermocycler programı;

95°C'de	5 dk. başlangıç denatürasyonunu takiben	
94°C'de	45 sn. denatürasyon,	} 30 döngü
55 °C'de	45 sn. hibridizasyon,	
72 °C'de	1 dk. uzama	

ve son olarak 72 °C'de 5 dk. final uzaması şeklinde referans alınan kaynaktan yeniden düzenleme ile optimize edilmiştir (Humbert *et al.* 1993).

10 µl PCR ürünü ile 2 µl yükleme tamponu karışımı, % 1.5'luk jele yüklenerek 90 V'da 45 dk. kadar yürütülmüş, 170 bç uzunluğundaki bantların varlığı kontrol edilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Soldan sağa markera kadar ilk 10 hastanın, markerdan sonra 11-19 numaralı hastaların *PONI* L55M PCR ürünleri.

3.3.4. 3. *PONI* Gln192Arg (Q192R) Polimorfizmi PCR Aşaması

PONI Q192R polimorfizmi için; 7.5 µl genomik DNA (150 ng), her bir primerden (F ve R) 1.5 µl (10 pmol/µl) (0.3 µM), 5 µl Taq Buffer (10 X), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 5 µl dNTP (2.5 mM), ve 1 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5u/µl) PCR grade suyla toplam hacim 50 µl olacak şekilde tamamlanarak PCR gerçekleştirilmiştir.

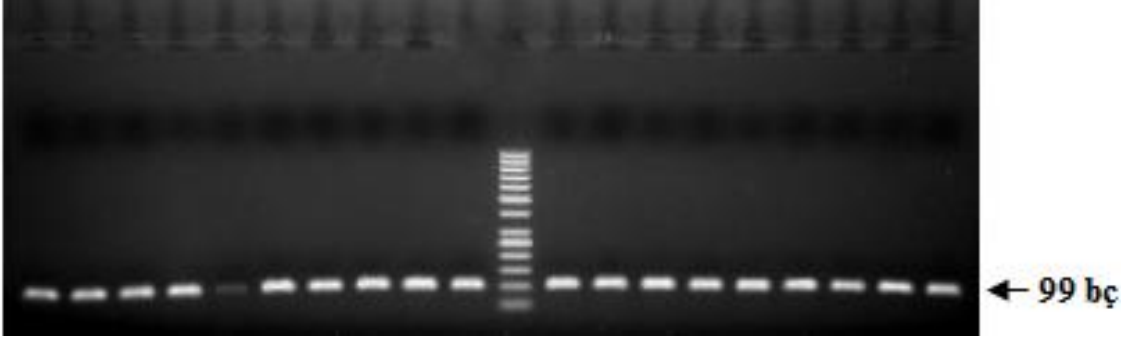
PONI Q192R polimorfizminin, uygun primerlerle yapılan PCR'ının thermocycler programı;

96°C'de 10 dk. başlangıç denatürasyonunu takiben

95°C'de	1 dk. denatürasyon,	} 35 döngü
58 °C'de	1 dk. hibridizasyon,	
72 °C'de	2 dk. uzama	

ve son olarak 72 °C'de 10 dk. final uzaması şeklinde referans alınan kaynaktan yeniden düzenleme ile optimize edilmiştir (Adkins *et al.* 1991).

Bant varlığına bakılmak üzere, 10 µl PCR ürünü ile 2 µl yükleme tamponu karışımı, % 1.5'lük jele yüklenerek 90 V'da 45 dk. kadar yürütülmüş, 99 bç uzunluğundaki bantların varlığı kontrol edilmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Soldan sağa markera kadar ilk 10 hastanın, markerdan sonra 11-19 numaralı hastaların *PONI* PCR ürünleri.

3.3.5. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri İle Kesimi

PCR ürünleri, spesifik restriksiyon enzimleri ile kesilerek ilgili polimorfizmin varlığı saptanmıştır. *PAII* 4G/5G, *PONI* L55M ve *PONI* Q192R polimorfizmlerinin belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enzimleri, özellikleri ve kesim bölgeleri Çizelge 3.6.'te verilmiştir.

Çizelge 3.6. *PAII*, *PONI* 55 ve 192 polimorfizmlerinde, enzim kesiminde kullanılan enzimlerin konsantrasyonları, tamponları, kesim noktaları, inkübasyon ve inaktivasyon dereceleri

Kullanılan Enzim	Konsant.	Tamponu	Kesim Bölgesi	İnkübasyon °C	Isı İnaktivasyonu
<i>PAII</i> 4G/5G Polimorfizmi					
Bsl I (NEB) (<i>Bacillus türleri</i>)	5.000 U 10.000 U/ml	10 X NE Buffer 3*	5'CCNNNNNNNGG3' 3'GGNNNNNNNCC5'	55 °C	80 °C'de 20dk
<i>PONI</i> L55M Polimorfizmi					
Nla III (NEB) (<i>Neisseria lactamica</i>)	2.500 U 10.000 U/ml	10 X NE Buffer 4*	5'CATG.3' 3'GTAC5'	37 °C	65 °C'de 20dk
<i>PONI</i> Q192R Polimorfizmi					
Alw I (NEB) (<i>Acinetobacter lwoffii</i>)	2.500 U 5.000 U/ml	10 X NE Buffer 4*	5'GATC(N) ₄ 5' 3'CTAG(N) ₅ 5'	37 °C	65 °C'de 20dk

Konsant.: Konsantrasyonu

N = A, C, G veya T.

* 1X NE Buffer 3 ve 4'ün içeriği Çizelge 3.4.'te verilmiştir.

3.3.5.1. *PAII* 4G/5G Polimorfizm Bölgesi Enzim Kesimi

15 µl'lik PCR ürünü, 0.5 µl (5 ünite) Bsl I restriksiyon enzimi (10 u/µl) ve 2 µl 10 X NE Buffer 3 ile son hacim 25 µl'ye tamamlanacak şekilde PCR grade su ilave edilerek;

55 °C'de 16 saat (tüm gece) }
80°C'de 20 dk } 1 döngü

olmak üzere kesildi.

25 µl'lik enzim kesim ürününün tamamı ile 5 µl yükleme tamponu karışımı, % 3'lük agaroz jelde pUC19 DNA moleküler ağırlık belirteci (Fermentas) ile 90 V'da 1 saat yürütüldü, UV altında görüntülendi. Kesim sonrası, 4G alleli 107- ve 56- bç'lik ürün verirken, 4G/5G alleli 107-, 74-, 56-, 34- bç'lik ürün vermektedir. 5G alleli ise 74-, 56-, 34- bç'lik uzunluğunda 3 bant vermektedir (Doggen *et al.* 1999) (Çizelge 3.6.). pUC19 DNA moleküler ağırlık belirtecinin bant aralıkları 3.3.3.3. konu başlığında bahsedilmiştir.

3.3.5.2. *PON1* L55M Polimorfizm Bölgesi Enzim Kesimi

15 µl'lik PCR ürünü, 0.5 µl (5 ünite) Nla III restriksiyon enzimi (10 u/µl) ve 2 µl 10X NE Buffer 4 ile son hacim 25 µl'ye tamamlanacak şekilde PCR grade su ilave edilerek;

37 °C'de 8 saat }
65°C'de 20 dk } 1 döngü

olmak üzere kesildi.

25 µl'lik enzim kesim ürünü ile 5 µl 6X yükleme tamponu karışımı, % 3'lük agaroz jelde pUC19 DNA moleküler ağırlık belirteci (Fermentas) ile 90 V'da 1 saat yürütülüp, UV altında görüntülenmiştir. Kesim ürünleri, MM polimorfizminde 126- ve 44- bç, ML polimorfizminde 170-, 126-, 44- bç'lik fragmanlar vermiştir. Yaban tip allele (LL) sahip bireylerin PCR ürünleri kesilmemiştir (Humbert *et al.* 1993) (Çizelge 3.6.).

3.3.5.3. *PONI* Q192R Polimorfizm Bölgesi Enzim Kesimi

15 µl'lik PCR ürünü, 1 µl (5 ünite) Alw I restriksiyon enzimi (5 u/µl) ve 2 µl 10X NE Buffer 4 ile son hacim 25 µl'ye tamamlanacak şekilde PCR grade su ilave edilerek;

37 °C'de 8 saat
65°C'de 20 dk

} 1 döngü

olmak üzere kesildi.

25 µl'lik enzim kesim ürünü ile 5 µl yükleme tamponu karışımı, % 3'lük agaroz jelde pUC19 DNA moleküler ağırlık belirteci (Fermentas) ile 90 V'da 1 saat yürütüldü, UV altında görüntülendi. Kesim ürünleri RR alleli 66- ve 33- bç, QR alleli 66-, 33- ve 99- bç fragmanlar vermiştir (Çizelge 3.6.). QQ (yaban tip) alleli kesilmemiştir (Adkins *et al.* 1993).

3.3.5.4. Enzim Kesimi Ürünleri

Çalışılan polimorfizmlere ait PCR ürün boyları ile kesildikleri restriksiyon enzimleri ve kesim ürünlerinin boyları Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

Çizelge 3.7. Çalışılan polimorfizmler, PCR ürün boyları, kesildikleri restriksiyon enzimleri, kesim ürün boyları

Polimorfizm	PCR Ürünü	Enzim	Kesim Ürünleri		
			Yaban Tip	Heterozigot	Mutant Tip
<i>PAII</i>	163 bç	Bsl I	5G/5G	4G/5G	4G/4G
				107	107
			74	74	
			56	56	56
			34	34	
L55M	170 bç	NlaIII	LL	LM	MM
			170	170	
				126	126
<i>PONI</i>	99 bç	AlwI	QQ	QR	RR
			99	99	
Q192R	99 bç	AlwI		66	66
				33	33

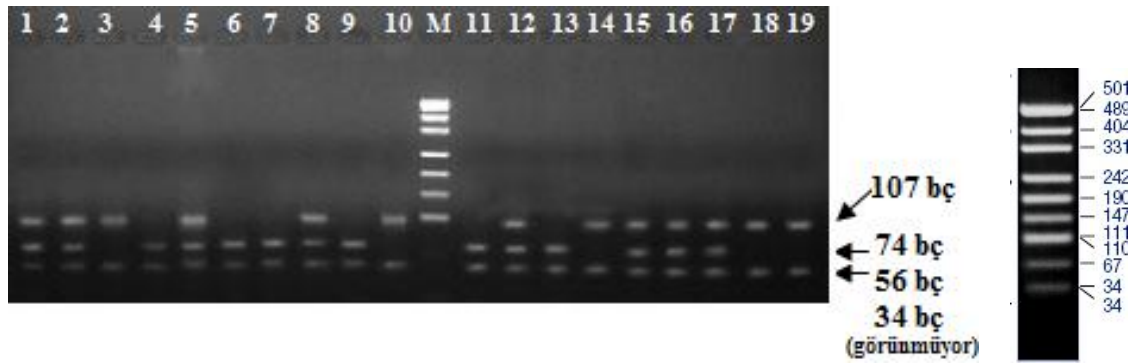
3.3.6. İstatistik

İstatistiksel açıdan *PAII*, *PONI* L55M ve Q192R genotip dağılım ve sıklığının gruplar arası farklılıkları Ki-kare testi ile, allelik dağılım ve sıklığının gruplar arası farklılıkları da Fisher's exact testi ile değerlendirildi, yüzdeleri ve p değerleri hesaplandı. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *PAII* 4G/5G Polimorfizm Bölgesi

Hasta grubunda 4, 6, 7, 9, 11, 13 no.lu bireyler 5G/5G genotipinde, 1, 2, 5, 8, 12, 15, 16, 17 no.lu bireyler 4G/5G genotipinde ve 3, 10, 14, 18, 19 no.lu bireyler 4G/4G genotipinde bulunmuştur



Şekil 4.1. Hasta grubunun *PAII* enzim kesim sonuçları

Her iki çalışma grubunun *PAII*, *PON1* L55M ve Q192R gen polimorfizmleri çalışıldı. *PAII* polimorfizminde, erken yaş KAH hasta grubunda heterozigotluk (4G/5G genotipi) % 42.31 iken, kontrol grubunda % 38.46 bulunmuştur. 4G/4G genotip yüzdeleri ise hasta ve kontrol grubunda eşit bulunmuştur (% 30.77). Hasta grubunun % 26.92'si ve kontrol grubunun % 30.77'sinde 5G/5G genotipi görüldü.

PAII 5G allelinin sıklığı hasta grubunda 0.481, kontrol grubunda 0.500, 4G alleli ise sırasıyla 0.519 ve 0.500 olarak bulunmuştur.

Hasta ve kontrol gruplarının *PAII* 4G/5G’de görülen genotip ve allel sıklıkları Çizelge 4.1.’de verilmiştir.

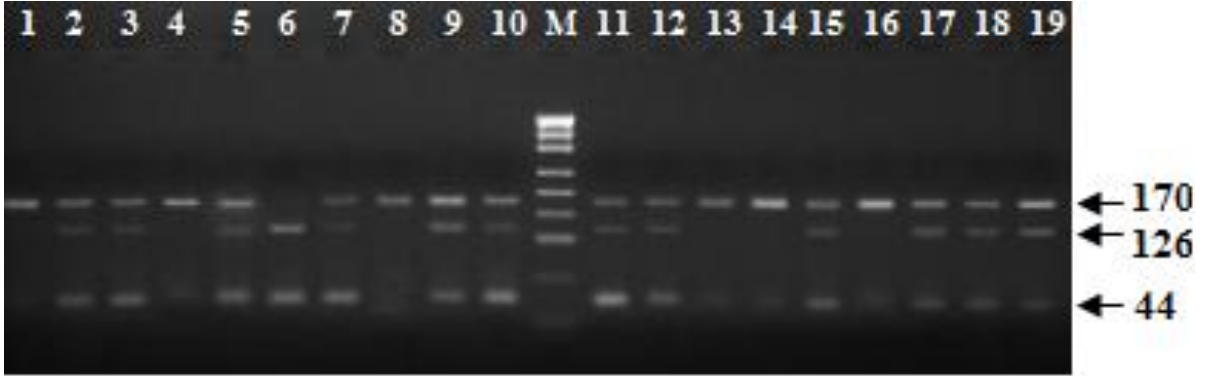
Çizelge 4.1. *PAII* 4G/5G genotip ve allel dağılımı ile sıklıkları

	Erken yaş KAH Hasta Grubu (n=26)	Sağlıklı Kontrol Grubu (n=26)	<i>p</i>
<i>PAII</i> 4G/5G Genotip Dağılımı ve Sıklıkları			
5G/5G	7 (% 26.92)	8 (% 30.77)	0.944*
4G/5G	11 (% 42.31)	10(% 38.46)	
4G/4G	8 (% 30.77)	8(% 30.77)	
<i>PAII</i> 4G/5G Allel Dağılımı ve Sıklıkları			
5G alleli	25 (% 48.08)	26 (% 50)	0.844*
4G alleli	27 (% 51.92)	26 (% 50)	

* $p = 0.05$ düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır.

4.2. *PONI* L55M Polimorfizm Bölgesi

Hasta grubunda 1, 4, 8, 13, 14, 16 no.lu bireyler LL genotipinde, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 15, 17, 18, 19 no.lu bireyler LM genotipinde ve 6 no.lu birey MM genotipinde bulunmuştur.



Şekil 4.2. Hasta grubunun *PONI* L55M enzim kesim sonuçları

PONI L55M polimorfizminde, erken yaş KAH hasta grubunda LM genotipi % 53.85 iken, kontrol grubunda % 57.69 bulunmuştur. MM genotip yüzdeleri ise hasta grubunda % 15.38, kontrol grubunda % 7.69 bulunmuştur. Hasta grubunun % 30.77'si ve kontrol grubunun % 34.62'sinde yaban tip (LL) görülmüştür.

PONI L allelinin sıklığı hasta grubunda 0.577, kontrol grubunda 0.635, M alleli ise sırasıyla 0.423 ve 0.365 olarak bulunmuştur.

Hasta ve kontrol gruplarının *PONI* L55M’de görülen genotip ve allel sıklıkları Çizelge 4.2.’de verilmiştir.

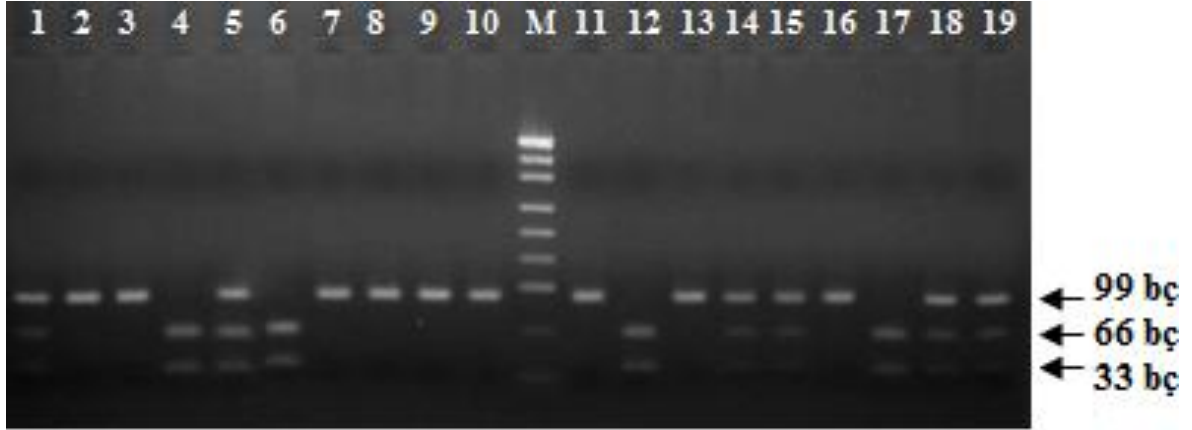
Çizelge 4.2. *PONI* L55M genotip ve allel dağılımı ile sıklıkları

	Erken yaş KAH Hasta Grubu (n=26)	Sağlıklı Kontrol Grubu (n=26)	<i>p</i>
<i>PONI</i> L55M Genotip Dağılımı ve Sıklıkları			
LL	8 (% 30.77)	9 (% 34.62)	0.684*
LM	14 (% 53.85)	15 (% 57.69)	
MM	4 (% 15.38)	2 (% 7.69)	
<i>PONI</i> L55M Allel Dağılımı ve Sıklıkları			
L alleli	30 (% 57.69)	33 (% 63.46)	0.547*
M alleli	22 (% 42.31)	19 (% 36.54)	

* $p = 0.05$ düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır.

4.3. PON Q192R Polimorfizm Bölgesi

Hasta grubunda 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 16 no.lu bireyler QQ, 1, 5, 14, 15, 18, 19 no.lu bireyler QR ve 4, 6, 12 no.lu bireyler ile sağlıklı kontrol grubunda 17 no.lu birey RR genotipine sahiptir.



Şekil 4.3. Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun *PON1* Q192R enzim kesim sonuçları

PON1 Q192R polimorfizminde, erken yaş KAH hasta grubunda QR genotipi % 34.62 iken, kontrol grubunda % 38.46 bulunmuştur. RR genotip yüzdeleri ise hasta grubunda % 11.54, kontrol grubunda % 15.38 bulunmuştur. Hasta grubunun % 53.85'i ve kontrol grubunun % 46.15'inde yaban tip (QQ) görülmüştür.

PON1 Q allelinin sıklığı hasta grubunda 0.712, kontrol grubunda 0.654, R alleli ise sırasıyla 0.290 ve 0.346 olarak bulunmuştur.

Hasta ve kontrol gruplarının *PONI* Q192R’de görülen genotip ve allel sıklıkları Çizelge 4.3.’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. *PONI* Q192R genotip ve allel dağılımı ile sıklıkları

	Erken yaş KAH Hasta Grubu (n=26)	Sağlıklı Kontrol Grubu (n=26)	<i>p</i>
<i>PONI</i> Q192R Genotip Dağılımı ve Sıklıkları			0.840*
QQ	14 (% 53.85)	12 (% 46.15)	
QR	9 (% 34.62)	10 (% 38.46)	
RR	3 (% 11.54)	4 (% 15.38)	
<i>PONI</i> Q192R Allel Dağılımı ve Sıklıkları			0.527*
Q alleli	37 (% 71.2)	34 (% 65.4)	
R alleli	15 (% 28.8)	18 (% 34.6)	

*p = 0.05 düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır.

4.4. İkili genotip sıklıkları

KAH için yatkınlık ya da koruma sağlayabilecek ikili genotiplerin değerlendirilmesi sonunda hasta ve sağlıklı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p=0.05$ aralığında) saptanmamıştır.

Ancak , *PAII* ve *PONI* L55M lokusları için ikili heterozigotluğun hasta grubunda, buna karşılık 4G4GLM genotipinin sağlıklı kontrol grubunda daha sık olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol grubunda *PAII* ve *PONI* L55M genotip frekansları

		Hasta (%)	Sağlıklı (%)	<i>p</i>
5G/5G	LL	11.5	11.5	1.000*
	LM	15.4	19.2	1.000*
	MM	-	-	-
4G/5G	LL	7.6	15.4	0.668*
	LM	30.8	19.2	0.337*
	MM	3.9	3.9	1.000*
4G/4G	LL	11.5	7.7	1.000*
	LM	7.7	19.2	0.419*
	MM	11.5	3.9	0.610*

* $p = 0.05$ düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır.

PAII ve *PONI* Q192R lokusları için, 4G5GQQ genotipinin hasta grubunda daha sık olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol grubunda *PAII* ve *PONI* Q192R genotip frekansları

		Hasta (%)	Sağlıklı (%)	<i>p</i>
5G/5G	QQ	11.5	19.2	0.703*
	QR	7.7	3.9	1.000*
	RR	7.7	7.7	1.000*
4G/5G	QQ	23.1	11.5	0.465*
	QR	15.4	19.2	1.000*
	RR	3.9	7.7	1.000*
4G/4G	QQ	19.2	15.4	1.000*
	QR	11.5	15.4	1.000*
	RR	-	-	-

**p* = 0.05 düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır.

PONI geni L55M ve Q192R lokusları için QQLL genotipinin hasta grubunda, buna karşılık QQLM genotipinin sağlıklı kontrol grubunda daha sık olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. Hasta ve kontrol grubunda *PONI* Q192R ve *PONI* L55M genotip frekansları

		Hasta (%)	Sağlıklı (%)	<i>p</i>
QQ	LL	11.5	-	0.235*
	LM	26.9	38.5	0.375*
	MM	15.4	7.7	0.668*
QR	LL	11.5	19.2	0.703*
	LM	23.1	19.2	0.734*
	MM	-	-	-
RR	LL	7.7	15.4	0.668*
	LM	3.9	-	1.000*
	MM	-	-	-

**p* = 0.05 düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır.

4.5. Üçlü genotip sıklıkları

KAH için yatkınlık ya da koruma sağlayabilecek üçlü genotiplerin değerlendirilmesi sonunda hasta ve sağlıklı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p=0.05$ aralığında) saptanmamıştır.

Ancak, 5G5GLMQR genotipinin hasta grubunda, 5G5GLMQQ, 4G5GLLRR genotiplerinin ise sağlıklı kontrol grubunda daha sık olduğu görülmüştür (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Hasta ve kontrol grubunda *PAII* 4G/5G, *PONI* L55M ve *PON1* Q192R genotip frekansları

			Hasta (%)	Sağlıklı (%)	p
5G/5G	LL	QQ	3.8	-	1.000*
		QR	-	3.8	1.000*
		RR	7.7	7.7	1.000*
	LM	QQ	7.7	19.2	0.419*
		QR	7.7	-	0.490*
		RR	-	-	-
	MM	QQ	-	-	-
		QR	-	-	-
		RR	-	-	-
4G/5G	LL	QQ	3.8	-	1.000*
		QR	3.8	7.7	1.000*
		RR	-	7.7	0.490*
	LM	QQ	15.4	7.7	0.668*
		QR	11.5	11.5	1.000*
		RR	3.8	-	1.000*
	MM	QQ	3.8	3.8	1.000*
		QR	-	-	-
		RR	-	-	-
4G/4G	LL	QQ	3.8	-	1.000*
		QR	7.7	7.7	1.000*
		RR	-	-	-
	LM	QQ	3.8	11.5	0.610*
		QR	3.8	7.7	1.000*
		RR	-	-	-
	MM	QQ	11.5	3.8	0.610*
		QR	-	-	-
		RR	-	-	-

*p = 0.05 düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır.

4.6. En az bir adet Q,R, L,M, 5G veya 4G alleli taşıma sıklıkları

En az bir adet Q,R, L,M, 5G veya 4G alleli taşıma sıklıkları karşılaştırıldığında hasta ve sağlıklı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p=0.05$ aralığında) saptanmamıştır (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. Hasta ve kontrol en az bir adet Q,R, L,M, 5G veya 4G alleli taşıma sıklıkları

En az bir	Hasta (%)	Sağlıklı (%)	<i>p</i>
5G	69.2	69.2	1.000*
4G	73.1	69.2	0.760*
L	84.6	92.3	0.668*
M	69.2	65.4	0.768*
Q	88.5	84.6	1.000*
R	46.2	53.8	0.579*

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Multifaktöriyel bir hastalık grubu olması nedeni ile KAH patogenezi tek bir risk faktörünün hastalık seyri için çok belirleyici olamayacağı bilinmektedir (Durrington *et al.* 2001, Adkins *et al.* 1993, Serrato and Marian 1995, Mackness *et al.* 1998, Aviram *et al.* 2000). Buna rağmen hastalığa yatkınlık yaratan bazı genetik faktörlerin bilinmesi hastalık tanı ve izleminde anlamlı bir etki yaratabilir. Bu çalışmada, *PAII* ve *PON1*'in daha önce KAH patogeneziyle ilişkilendirilmiş polimorfizmleri bu kez erken yaş KAH tanısı alan erkeklerde çalışılarak KAH'ın erken yaşta gelişmesi ile bu genetik değişikliklerin ilişkisi araştırılmıştır.

5.1. *PAII* 4G/5G Polimorfizmi

Farklı ülkelerde, sağlıklı popülasyonlarla yapılan *PAII* 4G/5G polimorfizm çalışmaları neticesinde, en düşük 4G alleleline sahip toplumun Afrikalı-Amerikalılar olduğu gözlenmektedir. Bununla birlikte, Afrikalı-Amerikalılara en yakın 4G alleli frekansının Isordia-Salas *et al.*'un Meksikalı çalışma popülasyonunda gözlenmesi, homojen bir toplulukla çalışmamalarının bir sonucu olabileceği belirtilmiştir. Popülasyondaki homojenite, bizim çalışmamızda söz konusudur, ve doğrudan Türk toplumunu yansıtmaktadır. Bunun yanısıra, Türklere yapılan 2 farklı çalışmada 4G allel frekansı % 46 ve % 50 bulunmuş, bu yüzdeler bizim allel frekansımızla neredeyse aynı değerdedir (% 50).

Çizelge 5.1. Farklı populasyonlardaki *PAII* geni 5G/5G, 4G/5G ve 4G/4G genotipleri ile 5G ve 4G allel sıklıkları

Populasyon	n	Genotip sıklığı (%)			Allel Sıklığı (%)	
		5G/5G	4G/5G	4G/4G	5G	4G
Afrikalı-Amerikalı (Crainich <i>et al.</i> 2003)	200	AD	AD	AD	75	25
Lübnanlı (Shammaa <i>et al.</i> 2008)	160	36.9	45.6	17.5	59.7	40.3
İspanyol (Segui <i>et al.</i> 2000)	152	38	42	20	58	42
Kıbrıslı Yunan (Xenophontos <i>et al.</i> 2002)	121	28	52	21	54	46
Türk (Balta ve ark. 2002)	281	34	40	26	54	46
Türk (Akar ve ark. 2000)	113	25	50	25	50	50
Türk (*)	26	30.77	38.46	30.77	50	50
İtalyan (Barcellona <i>et al.</i> 2003)	466	21	66	13	54	46
İtalyan (Thromb.Atheroscl.Vasc.Bio.Italian S.G.)	1210	28.3	48.6	23.1	53	47
İtalyan (Ardissino <i>et al.</i> 1999)	200	33	51	16	58.5	41.5
Avusturyalı ve Slovenyalı (Stegnar <i>et al.</i> 1998)	145	21.4	52.4	26.2	48	52
Avusturyalı (Endler <i>et al.</i> 2000)	115	16	42	42	37	63
Çinli (Su <i>et al.</i> 2006)	937	22.56	47.91	29.54	47	53
Çinli (Zhan <i>et al.</i> 2003)	83	7.2	62.7	30.1	39	61
İsveçli (Leander <i>et al.</i> 2003)	1556	20.63	50.63	28.74	45.9	54.1
İsveçli (Eriksson <i>et al.</i> 1995)	100	20	54	26	47	53
Meksikalı (Isordia-Salas <i>et al.</i> 2009)	127	56.6	30	13.4	71.6	28.4

AD : Anlamli değil.

(*) Bu alışma.

5.1.1. *PAII* 4G/5G Polimorfizmi ve Erken Yaş KAH

PAII 4G/5G polimorfizmi ile MI gelişim riski arasındaki ilişkiyi ele alan çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalar, *PAII* 4G/5G polimorfizmini artmış MI riski ile ilişkilendirmişken (Ossei-Gerning *et al.* 1997, Fu *et al.* 2001, Mikkelsson *et al.* 2000, Onalan ve ark. 2001, Zhan *et al.* 2003), bazı çalışmalar, belirgin bir ilişkiye rastlamadıklarını rapor etmiştir (Ye *et al.* 1995, Ridker *et al.* 1997, Anderson *et al.* 1999, Doggen *et al.* 1999, Crainich *et al.* 2003, Ding *et al.* 2006).

Ossei-Gerning ve arkadaşlarının (1997) 453 birey üzerinde (320 erkek ve 133 kadın) 4G/5G polimorfizmi ile *PAII* düzeyinin fenotipe yansımaları olan koroner ateroskleroz, koroner tromboz geçmişi arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada, en yüksek *PAII* antijen düzeylerinin (22.5 ng/mL) 4G/4G genotipinde gözlemlendiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada, 4G/4G genotipi ile MI öyküsü arasında anlamlı bir ilişki olduğu rapor edilmiştir ($P<.03$).

Fu ve arkadaşları da (2001), *PAII* düzeyleri ile *PAII* 4G/5G genotipi arasındaki ilişkiyi 50-51 yaşlarında 87 MI geçiren hasta ve 91 sağlıklı kontrol grubunda incelemişlerdir. Hasta grubunda 4G/4G, 4G/5G, 5G/5G genotiplerine ait sıklıkların sırasıyla % 44,8, % 33,3, % 21,8, sağlıklı kontrol grubunda ise % 27,2, % 48,8 ve % 23,9 olduğunu bildirmişlerdir ($p=0.04$).

Zhan ve arkadaşları (2003), Çin'de 56 MI geçirmiş, 54 serebrovasküler infarktüs (CI) geçirmiş hasta ve 83 kontrolle yaptıkları çalışmada; MI grubunda 4G/4G, 4G/5G ve 5G/5G genotip sıklıklarını sırasıyla % 71,4, % 25 ve % 3,6 olarak rapor etmişlerdir. MI grubu ile kontrol grubu arasında gözlemlenmiş oldukları anlamlı fark nedeni ile MI ve CI geçirmiş hastalarda 4G/5G polimorfizminin MI ve CI için önemli bir kalıtsal risk faktörü olabileceği sonucuna varmışlardır.

Onalan ve arkadaşlarının (2001), 156 akut MI hastası, 111 stabil KAH hastası (SKAH) ve 281 sağlıklı kan bankası donörü üzerinde (ortalama yaş=59), 4G/5G polimorfizminin koroner aterosklerozlu hastalarda, artmış MI riski ile ilişkilendirildiği hipotezini test etmek amacıyla yaptıkları bir vaka-kontrol çalışmasında, 4G/4G genotipinin sıklığını MI grubunda (% 32.7) SKAH grubuna (% 15.3) göre anlamlı derecede yüksek ($p=0.001$) bulmuşlardır. Ancak, aynı çalışmada MI grubu ile sağlıklı kontrol grubu (% 26.0) arasında belirgin fark gözlenmemiştir ($p=0.136$). Araştırmacılar tarafından bu sonuç; 4G/4G genotipinin, koroner stenoz gelişiminde koruyucu bir etki yaratmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Araştırmacılar bunun yanında, MI gelişimi için 4G/4G genotipinin bağımsız bir prediktör olabileceğini ileri sürmüşlerdir. *PAIL*'in 4G/4G genotipinin koroner stenoza karşı koruyucu etkisinin, KAH gelişimini etkilemediğini, ancak *PAIL*'in hücre göçü üstüne inhibitör etkisinin olabileceğini bildirmişlerdir.

11.763 vaka ve 12.905 kontrol içeren 37 çalışmanın meta-analizi, 4G alleli ile MI gelişiminin arasında zayıf bir ilişki bulmuştur (relatif risk 1.04, güven aralığı [CI] 1.00-1.09) (Ye *et al.* 2006).

Yaptıkları çalışmada *PAIL* 4G/5G polimorfizmi ile MI arasında anlamlı bir ilişki bulamayan Ye ve arkadaşları (1995), hasta ve kontroller arasında 4G allel frekansını bizim çalışmamızda olduğu gibi (0.52 ve 0.50) birbirine yakın değerler bulmuştur (0.55 ve 0.54). Bu çalışma, 4G homozigotluğunun artmış *PAIL* düzeyi ve fibrinolyze yatkınlık kazandırdığını göstermiş olmakla birlikte bu genotipin MI gelişimindeki etkisinin diğer genetik ve çevresel faktörlerle ilişkilendirilerek değerlendirilmesinin yararlı olacağı sonucuna götürmüştür.

Anderson ve arkadaşları (1999), yaş ortalaması 63.5 olan 1,353 Kuzey Amerikalı (% 70 erkek, % 30 kadın) üzerinde yaptıkları çalışmada 4G allel frekansını % 54.2 bulmuşlardır. Araştırma grubunu oluşturan gönüllülerin % 28'inin MI öyküsü bulunurken, % 66'sının KAH tanısı almış olduğu bildirilmiş ve hasta grubunda 4G taşıyıcısı sıklığının % 78 olduğu saptanmıştır.

Margaglione ve arkadaşları (1998), 1,179 sağlıklı birey ve bu bireylerin 1.dereceden yakınları üzerinde yaptıkları çalışmada, KAH'lı 1. dereceden yakınların olduğu grupta 4G/4G genotipi sıklığını, 1.dereceden yakını KAH olmayan gruba göre yüksek bulmuşlardır ($p=0.14$).

Ridker ve arkadaşlarının (1997) MI geçirmiş erkek bireylerle yaptığı çalışmada, 4G/4G, 4G/5G ve 5G/5G genotip sıklıkları sırasıyla % 0.27, % 0.51 ve 50.22 olup istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. ($P = 0.7$) Orta yaşlı erkeklerde *PAII*'in arteriyel veya venöz tromboz majör patojenik risk faktörü olmadığı sonucuna varmışlardır.

Genellikle orta yaş ve üstü gruplarla yapılan bu çalışmaların yanında, *PAII* 4G/5G polimorfizminin erken yaşta MI gelişimi ile ilgili değişken veriler mevcut olmakla birlikte sınırlıdır. Bu verilerden yine bazıları bu polimorfizmi erken yaş MI riski ile ilişkilendirmiş (Eriksson *et al.* 1995, Isordia-Salas *et al.* 2009) bazıları ilişkilendirmemiştir (Junker *et al.* 1998, Ardissino *et al.* 1999, Thrombosis Atherosclerosis Vascular Biology Italian Study Group 2003)

PAII aktivitesinde genotip-spesifik artışın koroner tromboz ve/veya koroner ateroskleroz için etiyolojik önemini incelemek amacıyla, MI geçirmiş 45 yaş altı 93 erkek hasta ve 100 sağlıklı kontrol ile yapılan çalışmada *PAII* 4G/5G gen polimorfizmi incelenmiş, 4G allel frekansı genç hastalarda (% 63), sağlıklı yaşlılarına (% 53) göre belirgin düzeyde yüksek bulunmuştur (Eriksson *et al.* 1995). Bizim çalışmamızda, iki grubun 4G allel sıklıkları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Bizim çalışmamıza benzer bir yol izleyen, Isordia-Salas *et al.*'un 45 yaş altı, 127 hasta ve 127 sağlıklı kontrol grubuyla yaptığı çalışmada, hastalarda 4G/5G genotipi (% 50.4) hakim olup, % 42.5'i 5G/5G, % 7.1'i 4G/4G bulunmuş, 4G allel frekansı % 32.3; 5G allel frekansı % 67.7 saptanmıştır. Kontrol grubunda bireylerin % 13.4'ü 4G/4G genotipinde, % 30'u 4G/5G genotipinde ve % 56.6'sı 5G/5G genotipinde bulunmuştur. Sağlıklı grupta 5G

allel frekansının % 71.6 olduğu saptanmıştır. 2 grup arasındaki 4G/4G genotip dağılım farkı belirgin olmasına rağmen ($p=0.02$), allel frekansında belirgin bir fark gözlenmemiştir ($p=0.46$). Dahası bu çalışmadaki kontrollerindeki % 28'lik 4G allel frekansı, daha önce rapor edilenler içinde oldukça düşük saptanmış olup, en düşük yüzde % 25 ile Afrikalı-Amerikalılarda saptanmıştır (Isordia-Salas *et al.* 2009).

Thrombosis Atherosclerosis Vascular Biology Italian Study Group (2003) tarafından, cinsiyetleri ve coğrafik kökenleri aynı, 1210 MI geçirmiş genç hasta ile 1210 sağlıklı bireyle (yaş ortalamaları 39 ± 5) yapılan çalışmada; geniş ve spesifik bir toplulukta çalışılmasına karşın PAII 4G allel sıklığında anlamlı bir fark saptanmadığı rapor edilmiştir.

Junker ve arkadaşlarının (1998), yaş ortalaması 38.6 (± 4.4) olan 241 MI geçirmiş genç erkek ve yaş ortalaması 47.1 (± 6.4) olan 179 sağlıklı erkek kontrolle yapılan çalışmada 4G homozigotluğu hasta kontrol grup arasında belirgin fark yaratmadığından genç erkeklerde MI için bir risk unsuru olmayacağı sonucuna varılmıştır.

Türkiye'de Taymaz ve arkadaşları (2007), 115 erken yaş (erkeklerde <45 , kadında <55 olmak üzere) koroner arter hastası ve 41 sağlıklı bireyden (kontrol) oluşan grupta 4G/5G polimorfizmini çalışmış ve hasta kontrol grubu arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark gözlememiştir. 4G alleli 54 hasta ve 21 kişilik kontrol grubunda sırasıyla % 52 ve % 62 bulunmuş, fakat istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır ($p>0.05$).

Bizim sonuçlarımız da bu araştırmaların sonuçları ile uyumlu olup, hasta ve kontrol gruplarımızda 4G/4G genotip frekansı eşit çıkmıştır (% 30.77)

5.2. *PONI* Leu55Met ve Q192R Polimorfizmleri

Leu55Met polimorfizmi ilk önce Met54Leu olarak belirlenmiş (Garin *et al.* 1997), ancak Brophy ve arkadaşlarının (2001) 55.pozisyonda lösinin daha sık olduğunu göstermesinden sonra OMIM’de Leu55Met (L55M) polimorfizmi olarak referans edilmiştir.

Aynacıoğlu ve arkadaşlarının (1999); Güneydoğu Anadolu’da, KAH için klasik bir risk faktörü taşımadığı ve herhangi bir hastalığı olmadığı bilinen 381 sağlıklı bireyle yaptığı bir başka çalışmada, genotip dağılımları L55M için % 52.5, % 38.6 ve % 8.9, Q192R için sırasıyla % 49.1, % 40.2 ve % 10.8 olarak bulunmuştur.

Bizim sağlıklı grubumuzda RR genotipi (% 15.38) ve R alleli (% 34.6) daha yüksek, MM genotipi (% 7.69) daha düşük fakat M alleli (% 36.54) daha yüksek bulunmuştur. Bizde L alleli sıklığı sağlıklı grupta (% 63.46) daha düşük saptanmıştır. Çalışmamızdaki allel ve genotip sıklıklarının daha önce Türkiye’de yapılan çalışmalardan farklı olmasının çalışılan gönüllü sayısının az olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Farklı ülke ve ırklara ait literatürde bildirilmiş *PONI* L55M ve Q192R genotip ve allel frekansları Çizelge 5.2. ve Çizelge 5.3'te verilmiştir.

Çizelge 5.2. Farklı populasyonlardaki *PONI* L55M genotipleri ile allel sıklıkları

Populasyon	n	Genotip sıklığı (%)			Allel Sıklığı (%)	
		LL	LM	MM	L	M
		Türkler (Kaman <i>et al.</i> 2009)	92	32.6	46.7	20.7
Türkler (Aynacioglu ve ark. 1999)	381	52.5	38.6	8.9	71.8	28.2
Türkler (*)	26	34.62	57.69	7.69	63.46	36.54
Brezilyalı (Voetsch <i>et al.</i> 2002)	118	47.4	40.7	11.9	68	32
Afrikanlı-Amerikalı (Jakubowski <i>et al.</i> 2000)	33	66.7	30.3	3.0	81.8	18.2
Hintliler (Sanghera <i>et al.</i> 1998)	183	65.0	29.5	5.5	79.8	20.2
Çinliler (Sanghera <i>et al.</i> 1998)	181	92.8	7.2	0.0	96.4	3.6
İngilizler (Mackness <i>et al.</i> 1997)	279	-	-	-	64	36
Japonlar (Zama <i>et al.</i> 1997)	115	-	-	-	91	9

(*) Bu çalışma.

Çizelge 5.3. Farklı populasyonlardaki *PONI* Q192R genotipleri ile allel sıklıkları

Populasyon	N	Genotip sıklığı (%)			Allel Sıklığı (%)	
		QQ	QR	RR	Q	R
		Türkler (Kaman <i>et al.</i> 2009)	92	46.7	44.6	8.7
Türkler (Aynacioglu ve ark. 1999)	381	49.1	40.2	10.8	69.2	30.8
Türkler (*)	26	46.15	38.46	15.38	65.4	34.6
Hintliler (Sanghera <i>et al.</i> 1997)	183	47	40	13	67	33
Çinliler (Sanghera <i>et al.</i> 1997)	181	17	50	33	42	58
Brezilyalı (Voetsch <i>et al.</i> 2002)	118	42.4	52.5	5.1	69	31
Amerikalı (Serrato <i>et al.</i> 1995)	247	49	40	11	69	31
Afrikanlı-Amerikalı (Jakubowski <i>et al.</i> 2000)	33	12.1	48.5	39.4	36.4	63.6
İngilizler (Mackness <i>et al.</i> 1997)	279	-	-	-	74	26
Japonlar (Zama <i>et al.</i> 1997)	115	-	-	-	41	59

5.2.1. *PONI* L55M / Q192R Polimorfizmleri ve Erken Yaş KAH

PONI genindeki allelik varyantlarla KAH gelişimi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çok epidemiyolojik çalışma, birbiriyle çelişen sonuçlar rapor edilmiştir (Serrato and Marian 1995, Antikainen *et al.* 1996, Herrmann *et al.* 1996, Sanghera *et al.* 1997, Zama *et al.* 1997, Wheeler *et al.* 2004). *PONI* Q192R polimorfizminde R varyantının Q varyantına göre KAH patogeneziyle diğer klasik risk faktörlerinin varlığında (yaş, DM gibi) ilişkilendirilmiş çalışmaları yayınlanmıştır (La Du *et al.* 1993, La Du 1996, Durrington *et al.* 2001). Buna karşın, bazı çalışmalar, R varyantı ile KAH arasında ilişki kuramamıştır (Senti *et al.* 2001, Herrmann *et al.* 1996). Aynı şekilde *PONI*'in diğer bir polimorfizmi L55M ile KAH arasında bazı çalışmalar anlamlı sonuç elde edememiştir (Sanghera *et al.* 1998). Garin ve arkadaşları (1997) Leu55 allelini yüksek paraoksonaz aktivitesi ile (beraberinde kardiyovasküler hastalık için bağımsız risk faktörü olarak) ilişkilendirmiştir.

Nassar ve arkadaşları (2002), erken yaş (<50 yaş) ve ileri yaş (>65 yaş) KAH hastalarıyla yaptığı çalışmada, *PONI* Q192R polimorfizmini incelemiş, erken ve ileri yaş KAH gruplarının R allel frekansında anlamlı bir fark gözlemlememiştir (sırasıyla % 46'ya % 52.7 ; $p=0.25$). Farklı yaş grubunda incelenen *PONI* Q192R polimorfizminin erken yaş KAH için risk faktörü olmadığı sonucuna varılmıştır.

Murray ve arkadaşlarının (2007) erken yaş MI geçirmiş hastalarda genetik risk faktörlerini incelediği çalışmasında, yaş ortalamaları 43.3 ± 5 ve 63.3 ± 9.1 olan hasta gruplarında analizi yapılan hiçbir gende belirgin bir frekans artışına rastlanmamıştır, fakat QR ve RR genotiplerine sahip hastaların yaş ortalamaları, QQ genotipine sahip hastalara göre belirgin ölçüde düşük bulunmuştur ($p=0.009$).

Sanghera ve arkadaşlarının (1997) Hintli ve Çinli, KAH olan ve olmayan populasyonla yaptığı araştırmada, Hintlilerde R alleli hastalarda daha yüksek bulunmuş olup, KAH için riskli olabileceği sonucuna varılmış, Çinlilerde ise hasta ve sağlıklılar arasında R alleli

sıklığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Irka özgü ilişkilendirmenin yapıldığı bu çalışmada, beyaz ırka özgü olası gen-gen interaksyonunun etkili olabileceği öngörülmüştür.

178 erken yaş KAH tanısı almış hasta ve 180 sağlıklı bireyle yapılan çalışmada, hastalarda Q allel frekansının % 78 bulunması ve hasta grupla kontrol grup arasındaki Q allel taşıyıcılığındaki belirgin fark, bu allelin erken yaş KAH için bir risk oluşturduğunu düşündürmüştür. Erken yaş KAH tanılı hastalarla yapılan çalışma sonunda, hastalıkta risk belirlemede genetik faktörlerin katılımının erken yaştaki bireylerde, çevresel etkenlere göre daha belirgin olduğu öngörüsü yapılmıştır (Balcerzyk *et al.* 2007).

Bizim çalışmamızda da, Q allel (% 71.2) sıklığı istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hasta grubunda, R alleli de (% 34.6) sağlıklı grupta daha yüksek çıkmıştır. Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı çıkmaması bize, sınırlı hasta ve kontrol sayısından kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

Serrato ve Marian (1995), Q192R polimorfizmini KAH ile ilişkilendirmiş, QQ genotipine sahip bireylerde RR genotipine sahip bireylere göre daha düşük enzimatik aktivite saptamıştır. 223 koroner arter hastası ve 247 kontrol ile yaptığı çalışmada, kontrol grubunda QQ ve RR genotipleri % 49 ve % 11 iken, KAH hasta grubunda sırasıyla % 30 ve % 18 bulunmuştur ($p=0.0003$). Aynı çalışmada Q allel frekansı kontrollerde % 69, hastalarda % 56 olarak bildirilmiştir ($p=0.0001$).

Gluba ve arkadaşları (2010), *PON1* ve *PON2* polimorfizmlerini 45 yaş altında MI geçiren 273 hasta ve 134 sağlıklı olmak üzere toplam 407 bireyde incelemiş, QR genotipi hastalarda kontrollerden daha yüksek saptanmıştır (% 43'e % 29, $p=0.0054$). Hastalık niteliklerinden olan aile öyküsü pozitifliği, 192 R ile ilişkili bulunmuştur ($p=0.0107$).

Aynacıoğlu ve Kepekçi'nin (2000) 96 koroner arter hastası (yaş ortalaması 49.3) ve 105 kontrolle yaptığı çalışmada, QQ, QR ve RR genotip frekanslarını koroner arter hasta grubunda sırasıyla % 36.5, % 52.0 ve % 11.5, kontrol grubunda ise sırasıyla % 48.6, % 41.0 ve % 10.4 bulmuştur. Hasta grubunda QR genotipinin, hasta grubunda QQ genotipinin yaygın olduğu gözlenmiştir. Kontrole göre hasta grubunda R allel frekansının daha yüksek olduğu sonucuna varılmış, ancak 192R polimorfizminin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olmadığı belirtilmiştir.

Bizim çalışmamızda, QQ, QR ve RR genotip frekansları erken yaş KAH grubunda sırasıyla % 53.85, 34.62 ve 11.54, kontrol grubunda ise sırasıyla % 46.15, 38.46 ve 15.38 bulunmuştur. Aynacıoğlu'nun çalışmasındaki KAH hastalarının QQ genotipine göre bizim erken yaş KAH hastalarımızda daha yüksek QQ genotipi bulunmuştur.

Hintliler ve Çinliler üzerine Sanghera ve arkadaşlarının (1998) yaptığı çalışmada, L55M ve Q192R'nin ikili genotip frekansları incelenmiştir. Çalışmada RRMM, QRMM ve RRLM genotiplerinin saptanmamış olması, bu populasyonlarda RM genotipinin nadir bulunduğunu düşündürmüştür. Bizim çalışmamızda da QRMM ve RRMM genotiplerinde bireye rastlanmamıştır. Hintli hastaların kontrollere göre QQLL genotip frekansı (% 14'e % 23.4) ve QQLM genotip frekansı (% 9.7'e % 18.3) daha düşük, QRML genotip frekansı (% 25.4'e % 10.3) daha yüksek bulunmuştur.

Etnik kökenin populasyonlar arasında farklılık yaratabileceğine dayanarak, Kaman ve arkadaşlarının (2009), Türkiye'de 277 koroner arter hastası ve 92 KAH olmayan bireyde yaptıkları çalışmada, her iki grupta da en yüksek *PONI* düzeyinin LL ve RR genotiplerinde olduğunu saptamıştır. LL, LM ve MM genotipleri hastalarda sırasıyla % 44.4, % 44.4 ve % 11.2 iken sağlıklı kontrollerde % 32.6, % 46.7 ve % 20.7 ($p=0.031$), L ve M allelleri de sırasıyla, hastalarda % 66.4 ve % 33.6 ile sağlıklılarda % 56 ve % 44 bulunmuştur ($p=0.011$). Bu çalışmada; hastalarda LL genotipi ve L alleli, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. *PONI* Q192R QQ, QR ve RR genotipleri hastalarda sırasıyla % 42.2, 41.2, 16.6 iken sağlıklı kontrollerde % 46.7,

44.6 ve 8.7, Q ve R allelleri de sırasıyla, hastalarda % 62.8 ve 37.2 ile sağlıklılarda % 69 ve 31 bulunmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. Araştırmacılar, bu sonuçlarla, çalıştıkları populasyonda KAH ile L55M polimorfizminin ilişkilendirilebileceğini, ama Q192R polimorfizmiyle ilişki kurulamadığını bildirmişlerdir.

Türkiye’de, ortalama yaşları 55-56 olan 139 KAH’lı ve 119 sağlıklı birey ile yapılan bir başka çalışmada (Ozkok ve ark. 2008), hastalarda sağlıklılara göre RR genotipi daha sık, QQ ile MM genotipleri belirgin ölçüde düşük bulunmuştur. Yapılan genotip analizi sonucunda, bir başka risk faktörü adayı olan matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3) ile *PON1* L55M ve Q192R genotipleri birlikte incelenmiş, RRLM kombine genotiplerinin KAH riskini arttırdığı öngörülmüştür.

Bonafè ve arkadaşlarının (2002), İtalya’da, yüzyıl yaşamış 308 birey ve yaşları 20-65 arasında değişen 579 bireyle yaptıkları çalışmada, R allelini yaşlı bireylerde genç bireylerle göre anlamlı düzeyde sık bulmuşlardır (0.539 ve 0.447, $p=0.011$). İki grupta L55M polimorfizm sıklıkları farklı görülmemiştir. Bu sonuçlarla, R allelinin taşıyıcılarda mortaliteyi düşürdüğünü, fakat *PON1* çeşitliliğindeki etkinin genel populasyonun mortalitesi üstüne etkisinin olmadığını ileri sürmüşlerdir. R allelinin yaşlı bireylerde, bizim çalışmamızdaki sağlıklı bireylerde olduğu gibi daha yüksek bulunması, literatür verileriyle çelişmektedir. Bunun yanısıra, Bonafè *et al.*un çalışmasında, çalışmamızda olduğu gibi Q192R ve L55M varyantları beraber analiz edilmiş, sadece R ve M allellere sahip (QRLM+QRMM+RRLM) gençlerde daha düşük (0.173) bulunmuş (yaşlılarda 0.263), burdan genotip kombinasyonunun taşıyıcılarda mortaliteyi düşürdüğü belirtilmiştir.

Bizim çalışmamızda bu varyantlar beraber değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, QQLL genotipinin hastalarda kontrollere oranla, QQLM genotipinin ise sağlıklı bireylerde hastalara oranla daha yüksek olması QQLL’nin erken yaş KAH için risk faktörü, QQLM genotipinin ise erken KAH için koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu hipotezin çalışma gruplarının genişletilmesi ve sağlıklı grubun daha spesifik seçilmesi ile test edilmesi gerekmektedir.

Taşkıran ve arkadaşları (2009) çalışmasında, erken yaş KAH olgularında *PONI* L55M ile Q192R polimorfizmini incelemiş, L55M polimorfizmini ilişkili bulurken, Q192R polimorfizmi ile ilişki kuramamıştır. Anlamli çıkan L55M polimorfizmindeki LL, LM ve MM genotipleri hastalarda sırasıyla % 46.7, % 46.7 ve % 6.7 ile kontrollerde % 65.7, % 29.4 ve % 4.9 olarak bildirilmiştir ($p=0.017$).

KAH patogeneziyle ilişkilendirilen *PAII* ve *PONI* gen polimorfizmleri, daha önce ayrı ayrı çalışılmasına rağmen, aynı populasyon grubunda üçlü genotipler halinde ilişkilendirilmemiş olmasıyla, bu çalışma KAH ile ilgili çalışmalar içinde ilktir.

PAII ile çalıştığımız diğer 2 polimorfizm olan *PONI* L55M ve Q192R'ın ikili genotip analizi sonunda, 4G5GLM ve 4G5GQQ genotipleri hasta grupta, 4G4GLM genotipi de sağlıklılarda daha yüksek bulunmuştur, fakat bu fark istatistiksel olarak anlamli değildir. Aynı şekilde, 5G5GLMQQ ve 4G5GLLRR genotipleri sağlıklı grupta, 5G5GLMQR genotipi ise hasta grubumuzda -istatistiksel olarak anlamli olmasa da- daha sık bulunmuştur.

Bu nedenle, erken yaş KAH için 4G5GLM ve 4G5GQQ ve 5G5GLMQR genotiplerinin risk yaratabileceği ve buna karşın 4G4GLM, 5G5GLMQQ ve 4G5GLLRR genotiplerinin ise koruyucu olabileceği düşünülebilir. Ancak, bu hipotezin hasta ve kontrol grubundaki gönüllü sayısının arttırılarak ve seçici nitelikler bakımından daha geniş bir araştırma yapılarak test edilmesine gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

AHA (American Heart Assosiation – Amerikan Kalp Derneği) www.americanheart.org/

AHA <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4440>

AHA <http://216.185.112.5/presenter.jhtml?identifier=4726>

WHO (World Healt Organisation - Dñnya Sağlık Örgütü) <http://www.who.int/en/>

WHO http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/

Adkins, S., Gan, K.N., Mody, M., La Du, B.N. 1993. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet*, 52;598–608.

Agema, W.R., de Maat, M.P., Zwinderman, A.H., Kastelein, J.J., Rabelink, T.J., van Boven, A.J., Feskens, E.J., Boer, J.M., van der Wall, E.E., Jukema, J.W. 2004. An integrated evaluation of endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphisms and coronary artery disease in men. *Clin Sci (Lond)*, 107;255–261.

Ahmed, Z., Ravandi, A., Maguire, G.F., Emili, A., Draganov, D., La Du, B.N. *et al.* 2001. Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxynitrite donor. *J Biol Chem*, 276;24473–81.

Akar, N., Yilmaz, E., Akar, E., Avcu, F., Yalcin, A., Cin, S. 2000. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thrombotic patients with and without FV1691 G-A. *Thromb Res*, 97;227–230.

Akbulut, T., Bilsel, T., Uyarel, H., Terzi, S., Sayar, N., Aydın, A., Dayi, Ş.Ü., Çiloğlu, F., Bağırtan, B., Peker, İ., Yeşilçimen, K. 2004. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Gen Polimorfizminin Erken Koroner Arter Hastalığı Gelişimindeki Rolü. *Türk Kardiyol Dern Arş*, 32;23-27.

Allen, R.A., Lee, E.M., Roberts, D.H., Park, B.K., Pirmohamed, M. 2001. Polymorphisms in the TNF-alpha and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*, 31;843–851.

Anderson, J.L., Muhlestein, J.B., Habashi, J., Carlquist, J.F., Bair, T.L., Elmer, S.P., Davis, B.P. 1999. Lack of association of a common polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene with coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 34;1778–1783.

- Andreotti, F. *et al.* 1988. Major circadian fluctuations in fibrinolytic factors and possible relevance to time of onset of myocardial infarction, sudden cardiac death and stroke. *Am. J. Cardiol.*, 62;635–637.
- Angleton, P. *et al.* 1989. Diurnal variation of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor (PAI- 1). *Circulation*, 79;101–106.
- Antikainen, M., Murtomaki, S., Syvanne, M., *et al.* 1996. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest*, 98(4);883-885.
- Asselbergs, F.W., Pattin, K., Snieder, H., Hillege, H.L., van Gilst, W.H., Moore, J.H. 2008. Genetic architecture of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *Semin Thromb Hemost. Sep*;34(6);562-8. PMID: 19085655
- Ardissino, D., Mannucci, P.M., Merlini, P.A., Duca, F., Fetiveau, R., Tagliabue, L., Tubaro, M., Galvani, M., Ottani, F., Ferrario, M., Corral, J., Margaglione, M. 1999. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood*, 94;46–51.
- Aynacioglu, A.S., Cascorbi, I., Mrozikiewicz, P.M., Nacak, M., Tapanyigit, E.E., Roots, I. 1999. Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicol Appl Pharmacol.*,157(3);174-7.
- Aynacioglu, A.S. and Kepekci, Y. 2000. The human paraoxonase Gln-Arg192 (Q/R) polymorphism in turkish patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol.*,74(1);33-7.
- Aso, Y. 2007. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Frontiers in Bioscience*, 12;2957-2966.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, S.L., La Du, B.N. 1998. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein and preserves its functions. *J ClinInvest*, 101;1581–90.
- Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffmann, A., Billicke, S., Draganov, D., Rosenblat, M. 2000. Human serum paraoxonase (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary an carotid arteriosclerotic lesions; PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*, 101;2510-7.
- Aviram, M., Rosenblat, M. 2004. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med*, 37;1304–1316.
- Balcerzyk, A., Zak, I., Krauze, J. 2007. Synergistic effects between Q192R polymorphism of paraoxonase 1 gene and some conventional risk factors in premature coronary artery disease. *Arch Med Res.*, 38(5);545-50.

- Balta, G., Altay, C., Gurgey, A. 2002. PAI-1 gene 4G/5G genotype: A risk factor for thrombosis in vessels of internal organs. *Am J Hematol*, 71;89–93.
- Barcellona, D., Fenu, L., Cauli, C., Pisu, G., Marongiu, F. 2003. Allele 4G of gene PAI-1 associated with prothrombin mutation G20210A increases the risk for venous thrombosis. *Thromb Haemost*, 90;1061–1064.
- Barter, P.J., Nicholls, S., Rye, K.A., et al. 2004. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*, 95;764–772.
- BenjaWeld. A.V., Wang, X.L., Morris, B.J. 2001. Tumor necrosis factor receptor 2 gene (TNFRSF1B) in genetic basis of coronary artery disease. *J Mol Med*, 79;109–115.
- Bonafè, M., Marchegiani, F., Cardelli, M., Olivieri, F., Cavallone, L., Giovagnetti, S., Pieri, C., Marra, M., Antonicelli, R., Troiano, L., Guerresi, P., Passeri, G., Berardelli, M., Paolisso, G., Barbieri, M., Tesei, S., Lisa, R., De Benedictis, G., Franceschi, C. 2002. Genetic analysis of Paraoxonase (PON1) locus reveals an increased frequency of Arg192 allele in centenarians. *Eur J Hum Genet.*, 10(5);292-6.
- Brophy, V.H., Hastings, M.D., Clendenning, J.B., Richter, R.J, Jarvik, G.P., Furlong, C.E. 2001. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics*, 11;77– 84.
- Brophy, V.H., Jampsa, R.L., Clendenning, J.B., McKinstry, L.A., Jarvik, G.P., Furlong, C.E. 2001. Effects of 5V regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am. J. Hum. Genet*, 68;1428–1436.
- Boucher, P., Gotthardt, M. 2004. LRP and PDGF signaling: a pathway to atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 14;55–60.
- Bourcier, T., Libby, P. 2000. HMG CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20;556–62. [PubMed: 10669656]
- Brown, N.J., Gainer, J.V., Stein, C.M., et al. 1999. Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature. *Hypertension*, 33;1431–1435.
- Brown, N.J., Abbas, A., Byrne, D., et al. 2002. Comparative effects of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibition on plasminogen activator inhibitor-1 in healthy postmenopausal women. *Circulation*, 105;304–309.
- Cale, J. M. and Lawrence, D. A. 2007. Structure–function relationships of plasminogen activator inhibitor- 1 and its potential as a therapeutic agent. *Curr. Drug Targets*, 8;971–981.

- Cesari, M., Sartori, M.T., Patrassi, G.M., et al. 1999. Determinants of plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1: A study of normotensive twins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19;316–320.
- Cesarman-Maus, G., Hajjar, K.A. 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*, 129;307– 21. [PubMed: 15842654]
- Chen, Q., Reis, S.E., Kammerer, C.M., McNamara, D.M., Holubkov, R., Sharaf, B.L., Sopko, G., Pauly, D.F., Merz, C.N.B., Kamboh, M.I. 2003. Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study. *Am. J. Hum. Genet*, 72;13-22. PubMed ID : 12454802
- Chomiki, N., Henry, M., Alessi, M.C., et al. 1994. Plasminogen activator inhibitor-1 expression in human liver and healthy or atherosclerotic vessel walls. *Thromb Haemost*, 72;44–53.
- Cole, T.B., Jampsa, R.L., Walter, B.J., Arndt, T.L., Richter, R.J., Shih, D.M., Tward, A., Lusis, A.J., Jack, R.M., Costa, L.G., Furlong, C.E. 2003. Expression of human paraoxonase (PON1) during development. *Pharmacogenetics*, 13;357–364.
- Costa, L.G., Cole, T.B., Jarvik, G.P., Furlong, C.E. 2003. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effect on pesticide sensitivity, cardiovascular disease and drug metabolism. *Annu Rev Med*, 54;371-92.
- Coughlin, P.B. 2005. Antiplasmin: the forgotten serpin? *FEBS J*, 272;4852–7. [PubMed: 16176259].
- Crainich, P., Jenny, N.S., Tang, Z., Arnold, A.M., Kuller, L.H., Manolio, T., Sharrett, A.R., Tracy, R.P. 2003. Lack of association of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism with cardiovascular disease in the elderly. *J Thromb Haemost*, 1;1799–1804.
- Dano, K., Behrendt, N., Hoyer-Hansen, G., Johnsen, M., Lund, L.R., Ploug, M., et al. Plasminogen activation and cancer. 2005. *Thromb Haemost*, 93;676–81. [PubMed: 15841311].
- Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J., Furlong, C.E. 1996. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet*, 14;334–336.
- Dawson, S., Hamsten, A., Wiman, B., Henney, A., Humphries, S. 1991. Genetic variation at the plasminogen activator-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arterioscler Thromb*, 11;183-90.
- Dawson, S.J., Wiman, B., Hamsten, A., Green, F., Humphries, S., Henney, A.M. 1993. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the

plasminogen activator-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin- 1 in HepG2 cells. *J Biol Chem*, 268;10739-45.

- Deakin, S., Leviev, I., Guernier, S., James, R.W. 2003. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 23;2083– 2089.
- Declerck, P.J., DeMol, M., Alessi, M.C., Baudner, S., Paques, E.P., Preissner, K.T., Muller-Berghaus, G., Collen, D. 1988. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin). *J Biol Chem*, 263; 15454–61.
- de Lange, M., Snieder, H., Ariens, R.A., et al. 2001. The genetics of haemostasis: a twin study. *Lancet*, 357;101–105.
- Dellas, C., Loskutoff, D.J. 2005. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost*, 93;631-40.
- Dichek, D., Quertermous, T. 1989. Thrombin regulation of mRNA levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Blood*, 74; 222–8.
- Ding, J., Nicklas, B.J., Fallin, M.D., de Rekeneire, N., Kritchevsky, S.B., Pahor, M., Rodondi, N., Li, R., Zmuda, J.M., Harris, T.B. 2006. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene polymorphisms and haplotypes are associated with plasma plasminogen activator inhibitor type 1 levels but not with myocardial infarction or stroke. *Am Heart J*, 152;1109–1115.
- Doggen, C.J., Bertina, R.M., Cats, V.M., Reitsma, P.H., Rosendaal, F.R. 1999. The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 82;115–120.
- Draganov, D.I., La Du, B.N. 2004. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 369;78–88.
- Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness, M.I. 2001. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21;473–80.
- Endler, G., Lalouschek, W., Exner, M., Mitterbauer, G., Haring, D., Mannhalter, C. 2000. The 4G/4G genotype at nucleotide position -675 in the promotor region of the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) gene is less frequent in young patients with minor stroke than in controls. *Br J Haematol*, 110;469–471.
- Eriksson, P., Kallin, B., van't Hooft, F.M., Bavenholm, P., Hamsten, A. 1995. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci*, 92;1851-5.

- Fay, W.P. 2004. Plasminogen activator inhibitor 1, fibrin, and the vascular response to injury. *Trends Cardiovasc Med*, 14;196–202. [PubMed: 15261892]
- Ferre, N., Camps, J., Cabre, M. 2001. Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism*, 50;997–1000.
- Franchini, M., Peyvandi, F., Mannucci, P.M. 2008. The genetic basis of coronary artery disease: from candidate genes to whole genome analysis. *Trends Cardiovasc Med*, Jul;18(5);157-62.
- Fu, L., Jin, H., Song, K., Zhang, C., Shen, J., Huang, Y. 2001. Relationship between gene polymorphism of the PAI-1 promoter and myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*, 114;266–269.
- Gaidukov, L., Rosenblat, M., Aviram, M., Dan, S. 2006. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J Lipid Res*, 47;2492–502.
- Galis, Z.S., Khatri, J.J. 2002. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*, 90;251–62. [PubMed: 11861412]
- Garin, M.C., James, R.W., Dussoix, P., Blanche, H., Passa, P., Froguel, P., Ruiz, J. 1997. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest*, 99;62–66. [PubMed ID : 9011577]
- Gluba, A., Pietrucha, T., Banach, M., Piotrowski, G., Rysz, J. 2010. The role of polymorphisms within paraoxonases (192 Gln/Arg in PON1 and 311Ser/Cys in PON2) in the modulation of cardiovascular risk: a pilot study. *Angiology.*, 61(2);157-65.
- Goldbourt, U., Yaari, S., Medalie, J.H. 1997. Isolated low HDL cholesterol as a risk factor for coronary heart disease mortality. A 21- year follow-up of 8,000 men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17;107–113.
- Herrmann, S.M., Blanc, H., Poirier, O., Arveiler, D., Luc, G., Evans, A., et al. 1996. The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON1 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Atherosclerosis*, 126;299-303.
- Hansson, G.K., Robertson, A.K., Söderberg-Nauclér, C. 2006. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, 1;297–329.
- Hegele, R.A. 1996. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med*. 1999;31: 217–224. 4. Clendenning JB, Humbert R, Green ED, Wood C, Traver D, Furlong CE. Structural organisation of the human PON1 gene. *Genomics*, 35;586–589.

- Heimark, R.L., Kurachi, K., Fujikawa, K., Davie, E.W. 1980. Surface activation of blood coagulation, fibrinolysis and kinin formation. *Nature*, 286;456–60. [PubMed: 6447254]
- Hsu, K., Hung, K., Tsai, Y., Lin, C., Li, C., Tsai, C. 2008. Off-pump beating coronary artery bypass grafting in a young adult with kawasaki disease. *Ann Saudi Med*, 28;307-8.
- Hubacek, J.R., Poledne, J., Aschermann P.M., Skalicka, H., Staněk, V. 2009. Apolipoprotein E Arg136 → Cys in Individuals with Premature Myocardial Infarction *Folia Biologica (Praha)*, 55;116-118.
- Humbert, R., Adler, D.A., Distech, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J., Furlong, C.E. 1993. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat. Genet*, 3;73–76.
- Imai, Y., Morita, H., Kurihara, H., Sugiyama, T., Kato, N., Ebihara, A., Hamada, C., Kurihara, Y., Shindo, T., Oh-hash, Y., Yazaki, Y. 2000. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis*, 149;435–442.
- Isordia-Salas, I., Leanos-Miranda, A., Sainz, I.M., Reyes-Maldonado, E., Borrayo-Sánchez, G. 2009. Association of the plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism with ST elevation acute myocardial infarction in young patients. *Rev Esp Cardiol*, 62;365–372.
- Jacquemin, B., Antoniades, C., Nyberg, F., Plana, E., Müller, M., Greven, S., Salomaa, V., Sunyer, J., Bellander, T., Chalamandaris, A.G., Pistelli, R., Koenig, W., Peters, A. 2008. Common genetic polymorphisms and haplotypes of Fibrinogen alpha, beta, and gamma chains affect Fibrinogen levels and the response to proinflammatory stimulation in myocardial infarction survivors: the AIRGENE study. *J Am Coll Cardiol*, 52;941–952.
- Jakubowski, H. 2000. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylolation. *J Biol Chem*, 275;3957–62.
- Jarvik, G.P., Tsai, N.T., McKinstry, L.A., Wani, R., Brophy, V.H., Richter, R.J., Schellenberg, G.D., Heagerty, P.J., Hatsukami, T.S., Furlong, C.E. 2002. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 22;1329–1333.
- Juhan-Vague, I., Moerman, B., De Cock, F., Aillaud, M.F., Collen, D. 1984. Plasma levels of a specific inhibitor of tissue-type plasminogen activator (and urokinase) in normal and pathological conditions. *Thromb Res*, 33;523-30.
- Junker, R., Heinrich, J., Schulte, H., Tataru, M., Kohler, E., Schonfeld, R., Nowak-Gottl, U., Assmann, G. 1998. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G-polymorphism

and factor V Q506 mutation are not associated with myocardial infarction in young men. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 9;597–602.

- Kaman, D., Ilhan, N., Metin, K., Akbulut, M., Ustundag, B. 2009. A preliminary study of human paraoxonase and PON1 L/M55-PON1 Q/R 192 polymorphisms in Turkish patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct*, 27;88–92.
- Keijer, J., Ehrlich, H.J., Linders, M., Preissner, K.T., Pannekoek, H. 1991. Vitronectin governs the interaction between plasminogen activator inhibitor 1 and tissue-type plasminogen activator. *JBC*, 266;10700–7.
- Klimov, A.N., Nikiforova, A.A., Pleskov, V.M., Kuz'min, A.A., Kalashnikova, N.N. 1989. Protective effect of high density lipoproteins, their subfractions and lecithin-cholesterolacyltransferases on the peroxidation modification of low density lipoproteins. *Biokhimiia*, 54;118-23.
- Klinger, K.W., Winqvist, R., Riccio, A., et al. 1987. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci*, 84;8548-52.
- Ko, Y.L., Ko, Y.S., Wang, S.M., Hsu, L.A., Chang, C.J., Chu, P.H., et al. 1998. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis*, 141;259-64.
- Kluft, C., Verheijen, J.H., Jie, A.F., Rijken, D.C., Preston, F.E., Sue-Ling, H.M., Jespersen, J., Aasen, A.O. 1985. The postoperative fibrinolytic shutdown: a rapidly reverting acute phase pattern for the fast-acting inhibitor of tissue-type plasminogen activator after trauma. *Scand J Clin Lab Invest*, 45;605-10.
- Kohler, H.P., Grant, P.J. 2000. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 342;1792-801. PubMed ID : 10853003
- Konkle, B.A., Schick, P.K., He, X., Liu, R.J., Mazur, E.M. 1993. Plasminogen activator inhibitor-1 mRNA is expressed in platelets and megakaryocytes and the megakaryoblastic cell line CHRF-288. *Arterioscler Thromb*, 13;669-74.
- Kooistra, T., Bosma, P.J., Tons, H.A., et al. 1989. Plasminogen activator inhibitor 1: biosynthesis and mRNA level are increased by insulin in cultured human hepatocytes. *Thromb Haemost*, 62;723–728.
- La Du, B.N. 1992. Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W, editor. *Genetic Factors Influencing the Metabolism of Foreign Compounds: International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*. New York: Pergamon Press, 51–91.
- La Du, B.N., Adkins, S., Kuo, C.L., Lipsig, D. 1993. Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem Biol Interact*, 87;25-34.

- La Du, B.N. 1996. Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med*, 2;1186-7.
- Law, R.H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A.M., Silverman, G.A., Wong, W., et al. 2006. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol*, 7;216. [PubMed: 16737556].
- Lawrence, D.A., Palaniappan, S., Stefansson, S., Olson, S.T., Francis-Chmura, A.M., Shore, J.D., et al. 1997. Characterization of the binding of different conformational forms of plasminogen activator inhibitor-1 to vitronectin. Implications for the regulation of pericellular proteolysis. *J Biol Chem*, 272;7676–80. [PubMed: 9065424]
- Leander, K., Wiman, B., Hallqvist, J., Sten-Linder, M., de Faire, U., Stockholm Heart Epidemiology Program 2003. PAI-1 level and the PAI-1 4G/5G polymorphism in relation to risk of non-fatal myocardial infarction: results from the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). *Thromb Haemost*, 89;1064–1071.
- Levi, M., van der Poll, T., Buller, H.R. 2004. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*, 109;2698–704. [PubMed: 15184294] .
- Leviev, I., Negro, F., James, R.W. 1997. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17;2935-9.
- Leviev, I., James, R.W. 2000. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20;516-21.
- Libby, P. 1995. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 91;2844-50.
- Libby, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420;868–874.
- Liu, R.M. 2008. Oxidative stress, plasminogen activator inhibitor 1, and lung fibrosis. *Antioxid. Redox Signal.*, 10;303–319.
- Loskutoff, D.J., Quigley, J.P. 2000. PAI-1, fibrosis, and the elusive provisional fibrin matrix. *J Clin Invest*, 106;1441–3. [PubMed: 11120750]
- Lund-Katz, S., Liu, L., Thuahnai, S.T., Phillips, M.C. 2003. High density lipoprotein structure. *Front Biosci*, 8;44–54.
- Mackness, B., Mackness, M., Arrol, S., Turkie, W., and Durrington, P. 1997. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br. J. Pharmacol*, 122;265–268.
- Mackness, B., Mackness, M.I., Arrol, S., Turkie, W., Durrington, P.N. 1998. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection

by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett*, 423;57–60.

- Mackness, M.I., Abbott, C., Arrol, S., Durrington, P.N. 1993. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J*, 294(Pt 3);829–34.
- Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N. 1991. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. [published correction appears in *FEBS Lett*, 292(1-2);307]. *FEBS Lett*, 286(1-2);152-154.
- Mackness, M.I., Arrol, S., Abbott, C., Durrington, P.N. 1993. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by highdensity lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 104;129–135.
- Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W., Hegele, R.A. 1996. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*, 7;69–76.
- Marathe, G.K., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. 2003. Platelet activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem*, 278;3937–3947.
- Margaglione, M., Cappucci, G., Colaizzo, D., Giuliani, N., Vecchione, G., Grandone, E. et al. 1998. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18;152–156.
- Massague, J. 1990. The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6;597–641.
- Medcalf, R.L. 2007. Fibrinolysis, inflammation, and regulation of the plasminogen activating system. *J Thromb Haemost*, 5(Suppl 1);132–142.
- Mertens, I., Verrijken, A., Michiels, J.J., van der Planken, M., Ruige, J.B., van Gaal, L.F. 2006. Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome. *Int J Obes*, 30;1308–14. [PubMed: 16389265]
- Mikkelsson, J., Perola, M., Wartiovaara, U., Peltonen, L., Palotie, A., Penttila, A., Karhunen, P.J. 2000. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism, coronary thrombosis, and myocardial infarction in middle-aged Finnish men who died suddenly. *Thromb Haemost*, 84;78–82.
- Miles, L.A., Hawley, S.B., Baik, N., Andronicos, N.M., Castellino, F.J., Parmer, R.J. 2005. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci*, 10;1754–62. [PubMed: 15769664] .
- Moore, J.H., Smolkin, M.E., Lamb, J.M., Brown, N.J., Vaughan, D.E. 2002. The relationship between plasma t-PA and PAI-1 levels is dependent on epistatic

effects of the ACE I/D and PAI-1 4 G/5 G polymorphisms. *Clin Genet*, 62;53–9. [PubMed: 12123488]

- Murray, B., Goldenberg, I., Moss, A.J., Zareba, W., Ryan, D., McNitt, S., Eberly, S.W., Glazko, G., Mathew, J. 2007. Polymorphisms in the paraoxonase and endothelial nitric oxide synthase genes and the risk of early-onset myocardial infarction. *Am J Cardiol.*,99(8);1100-5.
- Muller, J.E. et al. 1989. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation*, 79;733–743.
- Nassar, B.A., Darvesh, S., Bevin, L.D., Rockwood, K., Kirkland, S.A., O'Neill, B.J., Bata, I.R., Johnstone, D.E., Title, L.M. 2002. Relation between butyrylcholinesterase K variant, paraoxonase 1 (PON1) Q and R and apolipoprotein E epsilon 4 genes in early-onset coronary artery disease. *Clin Biochem.*, 35(3);205-9.
- Ng, C.J., Wadleigh, D.J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V.R., Navab, M., Fogelman, A.M., Reddy, S.T. 2001. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem*, 276;44444–44449.
- Ng, C.J., Shih, D.M., Hama, S.Y., Villa, N., Navab, M., Reddy, S.T. 2005. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.*, 38(2);153-63.
- Oda, M. N., Bielicki, J.K., Ho, T.T., Berger, T., Rubin, E.M., Forte, T.M. 2002. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 290;921–927.
- Oishi, K., Shirai, H., Ishida, N. 2007. Identification of the circadian clock-regulated E-box element in the mouse plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Thromb Haemost*, 5;428–31. [PubMed:17155957]
- Oliveira, S.A., Mansur, A.P., Ribeiro, C.C., Ramires, J.A., Annichino-Bizzacchi J.M. 2004. PON1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease. *Int J Cardiol*, 94;73-7.
- Ombres, D., Pannitteri, G., Montali, A., Candeloro, A., Seccareccia, F., Campagna, F., et al. 1998. The gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in italian patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18;1611-6.
- Onalan, O., Balta, G., Oto, A., Kabakci, G., Tokgozoglu, L., Aytemir, K., Altay, C., Gurgey, A., Nazli, N. 2008. Plasminogen activator inhibitor-1 4G4G genotype is associated with myocardial infarction but not with stable coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis*, 26;211–217.

- Orbe, J., Montes, R., Zabalegui, N., Pérez-Ruiz, A., Paramo, J.A. 1999. Evidence that heparin but not hirudin reduces PAI-1 expression in cultured human endothelial cells. *Thromb Res*, 94;137-45.
- Ossei-Gerning, N., Mansfield, M.W., Stickland, M.H., Wilson, I.J., Grant, P.J. 1997. Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17;33–37.
- Ozaki, K., Ohnishi, Y., Iida, A., Sekine, A., Yamada, R., Tsunoda, T., Sato, H., Sato, H., Hori, M., Nakamura, Y., Tanaka, T. 2002. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*, 32;650–654.
- Ozkok, E., Aydin, M., Babalik, E., Ozbek, Z., Ince, N., Kara, I. 2008. Combined impact of matrix metalloproteinase-3 and paraoxonase 1 55/192 gene variants on coronary artery disease in Turkish patients. *Med Sci Monit.*, 14(10);CR536-42.
- Passarge E. and Passarge M. 1995 *Color Atlas of Genetics*
- Peetz, D., Victor, A., Adams, P., et al. 2004. Genetic and environmental influences on the fibrinolytic system: a twin study. *Thromb Haemost*, 92;344–351.
- Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber, J., La Du, B.N. 1996. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*, 33;498–507.
- Rader, D.J., Ikewaki, K., Duverger, N., Feuerstein, I., Zech, L., Connor, W., Brewer, H.B. Jr. 1993. Very low high-density lipoproteins without coronary atherosclerosis. *Lancet*, 342;1455–1458.
- Reddy, S.T., Wadleigh, D.J., Grijalva, V., Ng, C., Hama, S., Gangopadhyay, A., Shih, D.M., Lusic, A.J., Navab, M., Fogelman, A.M. 2001. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 21;542–547.
- Renckens, R., Roelofs, J.J., de Waard, V., Florquin, S., Lijnen, H.R., Carmeliet, P., van der Poll, T. 2005. The role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the inflammatory response to local tissue injury. *J Thromb Haemost*, 3;1018-25.
- Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Lindpaintner, K., Stampfer, M.J., Miletich, J.P. 1997. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation*, 95;59–62.
- Rifai, N., Ridker, P.M. 2001. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin Chem*, 47;403–411.

- Rodrigo, L., Mackness, B., Durrington, P.N., Hernandez, A., Mackness, M.I. 2001. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem. J*, 354(Pt. 1);1–7.
- Rodriguez-Esparragon, F., Rodriguez-Perez, J.C., Hernandez-Trujillo, Y., et al. 2005. Allelic variants of the human scavenger receptor class B type 1 and paraoxonase 1 on coronary heart disease: genotype-phenotype correlations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Apr;25(4):854-860.
- Rosenblat, M., Vaya, J., Shih, D., Aviram, M. 2005. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDLmediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*, 179;69–77.
- Rosenberg, O., Shih, S.D., Aviram, M. 2005. Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis* 181(1);9-18.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340;115-26.
- Rowles, J., Scherer, S.W., Xi, T., Majer, M., Nickle, D.C., Rommans, J.M., Popov, K.M., Harris, R.A., Riebow, N.L., Xia, J. 1996. Cloning and characterisation of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *J Biol Chem*, 271;22376–22382.
- Rozenberg, O., Shih, D.M., Aviram, M. 2003. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 23;461–467.
- Samad, F., Loskutoff, D.J. 1996. Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. *Mol Med*, 2;568–582.
- Sanghera, D.K., Saha, N., Aston, C.E., Kamboh, M.I. 1997. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(6);1067-1073.
- Sanghera, D.K., Aston, C.E., Saha, N., Kamboh, M.I. 1998. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet*, 62;36-44.
- Sawdey, M., Podor, T.J., Loskutoff, D.J. 1989. Regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in cultured bovine aortic endothelial cells. Induction by transforming growth factor-beta, lipopolysaccharide, and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, 264;10396–10401.
- Scheuner, M.T. 2004. MPH Clinical application of genetic risk assessment strategies for coronary artery disease: genotypes, phenotypes, and family history. Department

of Health Services University of California Los Angeles School of Public Health, 31(3).

- Segui, R., Estelles, A., Mira, Y., Espana, F., Villa, P., Falco, C. et al. 2000. PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. *Br J Haematol*, 111;122–128.
- Sentí, M., Tomás, M., Vila, J., Marrugat, J., Elosua, R., Sala, J., et al. 2001. Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase1 gene: the REGICOR study. *Atherosclerosis*, 156;443-9.
- Serrato, M., Marian, A.J. 1995. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J. Clin. Invest*, 96;3005-3008. [PubMed ID : 8675673]
- Shaw, L.J., Shaw, R.E., Merz, C.N.B., Brindis, R.G., Klein, L.W., Nallamothu, B., Douglas, P.S., Krone, R.J., McKay, C.R., Block, P.C., Hewitt, K.R.N., Weintraub, W.S., Peterson, E.D. 2008. Impact of Ethnicity and Gender Differences on Angiographic Coronary Artery Disease Prevalence and In-Hospital Mortality in the American College of Cardiology–National Cardiovascular Data Registry *Circulation*, 117;1787-1801.
- Shen, G-Q., Li, L., Girelli, D., Seidemann, S.B., Rao, S., Fan, C., Park, J.E., Xi, Q., Li, J., Hu, Y., Olivieri, O., Marchant, K., Barnard, J., Corrocher, R., Elston, R., Cassano, J., Henderson, S., Hazen, S.L., Plow, E.F., Topol, E.J., and Wang, Q.K. 2007. An LRP8 Variant Is Associated with Familial and Premature Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction. *Am. J. Hum. Genet.*, 81; 780–791.
- Shammaa, D.M.R., Sabbagh, A.S., Taher, A.T., Zaatari, G.S., Mahfouz, R.A.R. 2008. Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G alleles frequency distribution in the Lebanese population *Mol Biol Rep*, 35;453–457.
- Shih, D.M., Gu, L., Hama, S., Xia, Y.R., Navab, M., Fogelman, A.M., Lusis, A.J. 1996. Genetic–dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest*, 97;1630–1639.
- Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y.R., Navab, M., Li, W.F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M., Lusis, A.J. 1998. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 394;284–287.
- Shih, D.M., Xia, Y.R., Wang, X.P., Miller, E., Castellani, L.W., Subbanagounder, G., Cheroutre, H., Faull, K.F., Berliner, J.A., Witztum, J.L., Lusis, A.J. 2000. Combined serum paraoxonase knockout/ apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem*, 275;17527–17535.

- Sierksma, A., van der Gaag, M.S., van Tol, A., James, R.W., Hendriks, H.F. 2002. Kinetics of HDL cholesterol and paraoxonase activity in moderate alcohol consumers. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 26;1430–1435.
- Simionescu, M. 2007. Implications of early structural–functional changes in the endothelium for vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27;266–274.
- Sprengers, E.D., Kluft, C. 1987. Plasminogen activator inhibitors. *Blood*, 69;381–7. [PubMed:3099859]
- Strandberg, L., Lawrence, D., Ny, T. 1988. The organization of the human plasminogen-activator-inhibitor-1 gene: implications on the evolution of the serine-protease inhibitor family. *Eur J Biochem*, 176;609-16.
- Stegnar, M., Uhrin, P., Peternel, P., Mavri, A., Salobir-Pajnic, B., Stare, J. et al. 1998. The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 [PAI-1] gene: relationship to plasma PAI-1 levels in venous thromboembolism. *Thromb Haemost*, 79;975–979.
- Su, S., Chen, S., Zhao, J., Huang, J., Wang, X., Chen, R. et al, 2006. Plasminogen activator inhibitor-1 gene: selection of tagging single nucleotide polymorphisms and association with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26;948–954.
- Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A., Dolo, V. 2002. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*, 160;673–80. [PubMed: 11839588] .
- Taskiran, P., Cam, S.F., Sekuri, C., Tüzün, N., Alioğlu, E., Altıntaş, N., Berdeli, A. 2009. The relationship between paraoxanase gene Leu-Met (55) and Gln-Arg (192) polymorphisms and coronary artery disease. *Turk Kardiyol Dern Ars.*, 37(7);473-8.
- Taymaz, H., Erarslan, S., Oner, E.T., Alkan, T., Ağırbaşlı, M., Kirdar, B. 2007. Sequence variations within the genes related to hemostatic imbalance and their impact on coronary artery disease in Turkish population. *Thromb Res.*, 119(1);55-62.
- Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B.N. 2003. Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. *Biochem. Pharmacol*, 66;887–896.
- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. 2002. National Cholesterol Education Program National Heart, Lung, and Blood Institute. National Institutes of Health, NIH Publication, 02-5215. <http://www.nhlbi.nih.gov/about/ncep/>

- Thrombosis Atherosclerosis Vascular Biology Italian Study Group. 2003. No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation*, 107;1117–1122.
- Tomas, M., Senti, M., Garcia-Faria, F., Vila, J., Torrents, A., Covas, M., Marrugat, J. 2000. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 20;2113–2119.
- van der Gaag, M.S., van Tol, A., Scheek, L.M., James, R.W., Urgert, R., Schaafsma, G., Hendriks, H.F. 1999. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis*, 147;405–410.
- van Mourik, J.A., Lawrence, D.A., Loskutoff, D.J. 1984. Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells. *J Biol Chem*, 259;14914–21. [PubMed:6438106]
- Vaughan, D.E., Lazos, S.A., Tong, K. 1995. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. *J Clin Invest*, 95;995–1001.
- Vaughan DE. 2005. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost*, 3;1879–83.
- Vaughan, D.E. et al. 2007. PAI- 1 antagonists: predictable indications and unconventional applications. *Curr. Drug Targets*, 8;962–970.
- Vendrell, J., Fernandez-Real, J.M., Gutierrez, C., Zamora, A., Simon, I., Bardaji, A., Ricart, W., Richart, C. 2003. A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor-alpha gene (-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*, 167;257–264.
- Voetsch, B., Benke, K.S., Damasceno, B.P., Siqueira, L.H., Loscalzo, J. 2002. Paraoxonase 192 Gln-->Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. *Stroke.*, 33(6);1459-64.
- Voetsch, B. and Loscalzo, J. 2004. Genetics of thrombophilia: impact on atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*, 15;129–143.
- Xenophontos, S.L., Hadjivassiliou, M., Ayrton, N., Karagrigoriou, A., Pantzaris, M., Nicolaides, A.N. et al. 2002. Spectrum and prevalence of prothrombotic single nucleotide polymorphism profiles in the Greek Cypriot population. *Int Angiol*, 21;322–329.
- Ye, S., Green, F.R., Scarabin, P.Y., Nicaud, V., Bara, L., Dawson, S.J., Humphries, S.E., Evans, A., Luc, G., Cambou, J.P. et al. 1995. The 4G/ 5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of

myocardial infarction in the ECTIM study. Etude CasTemoins de l'infarctus du Myocarde. *Thromb Haemost*, 74;837–841.

- Ye, Z., Liu, E.H., Higgins, J.P., Keavney, B.D., Lowe, G.D., Collins, R., Danesh, J. 2006. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet*, 367;651–658.
- Watson, A.D., Berliner, J.A., Hama, S.Y., La Du, B.N., Faull, K.F., Fogelman, A.M., Navab, M. 1995. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest*, 96;2882–2891.
- Watson, C.E., Draganov, D.I., Billecke, S.S., Bisgaier, C.L., La Du, B.N. 2001. Rabbits possess a serum paraoxonase polymorphism similar to the human Q192R. *Pharmacogenetics*, 11;123–134 45.
- Wheeler, J.G., Keavney, B.D., Watkins, H., Collins, R., Danesh, J. 2004. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*, 363(9410);689-695.
- WhitWeld, A.J., Barrett, P.H., van Bockxmeer, F.M., Burnett, J.R. 2004. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clin Chem*, 50;1725–1732.
- Wilson, P.W., Schaefer, E.J., Larson, M.G., Ordovas, J.M. 1996. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16;1250–1255.
- Wiman, B. and Collen, D. 1978. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature*, 272;549–50. [PubMed: 151233]
- Zama, T., Murata, M., Matsubara, Y., Kawano, K., Aoki, N., Yoshino, H., Watanabe, G., Ishikawa, K., and Ikeda, Y. 1997. A 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 17;3565–3569.
- Zhan, M., Zhou, Y., Han, Z. 2003. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphism in patients with myocardial or cerebrovascular infarction in Tianjin, China. *Chin Med J (Engl)*, 116;1707–1710.
- Zhou, A., Huntington, J.A., Pannu, N.S., Carrell, R.W., Read, R.J. 2003. How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol*, 10;541–4. [PubMed: 12808446]

EK-1

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Didem SAVAŞ

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 23 Kasım 1985

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce ve Almanca

Eğitim Durumu

Lise: TED Ankara Koleji / Matematik Fen Bölümü

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü / Temel Biyoteknoloji Bölümü

Çalıştığı Kurum: Düzen Laboratuvarı / Mart 2008-Halen

Yayınları (SCI ve diğer): -