

HAZİRAN 2013

Yüksek Lisans-Biyoloji Bölümü

HATİCE YÜCEL KOCAOĞLU

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİYOKARD İNFARKTÜSLÜ
HASTALARDA
TROMBOSPONDİN GEN
POLİMORFİZMLERİNİN
İNCELENMESİ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATİCE YÜCEL KOCAOĞLU
HAZİRAN 2013**

**Miyokard İnfarktüsli Hastalarda Trombospondin Gen
Polimorfizmlerinin İncelenmesi**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN**

**Hatice YÜCEL KOCAOĞLU
Haziran 2013**

©2013 [Hatice Yücel Kocaoğlu]

T.C. GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Miyokard İnfarktüsli Hastalarda Trombospondin Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi


Öğrencinin, Adı Soyadı: Hatice YÜCEL KOCAOĞLU

Tez Savunma Tarihi:27/06/2013

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı


Doç. Dr. Metin BEDİR
FBE Müdürü

Bu tezin yüksek lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.


Prof. Dr. Canan CAN
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

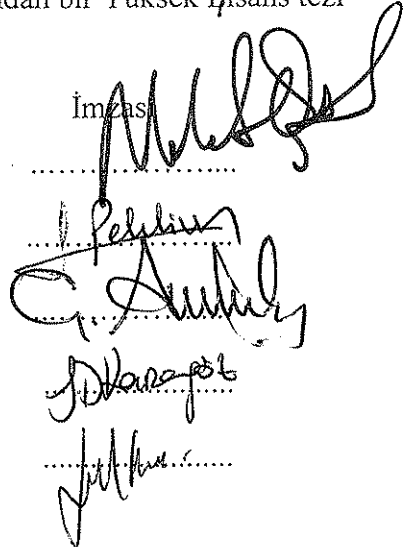
Doç. Dr. Sacide PEHLİVAN

Doç. Dr. Abuzer ÇELEKLİ

Yrd. Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

Yrd. Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

İmzası


.....
.....
.....
.....
.....

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Hatice YÜCEL KOCAOĞLU

*Varlığıyla bana güç veren, hayattaki tüm güzellikleri hak eden
canım **BABAM**'a...*

ÖZET

Miyokard İnfarktüsli Hastalarda Trombospondin Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi

KOCAOĞLU YÜCEL, Hatice

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Haziran 2013, 59 Sayfa

Ekstrasellüler matrikste bulunan protein ailelerinden biri olan trombospondinler (TSP), hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini sağlayan adeziv proteinler olup, 5 subtipi tanımlanmıştır. Her biri farklı bir gen ürünü olan ve miyokardiyal damar tıkanıklığı ile ilişkili üyeler, TSP1, TSP2 ve TSP4 farklı kromozomlar üzerinde bulunmaktadır. TSP, anjiyogenik uyarıların değişik türlerine cevap olarak endotel hücrelerde hücre göçünü durdurma, apoptozu uyarma ve yeni damar oluşumunu önleme yeteneğine sahip potansiyel bir anjiyogenez baskılayıcısı olup miyokard infarktüsü (MI) gelişiminde rol almaktadır. Bu çalışmada anti-anjiyogenik faktörlerden olan TSP1, TSP2 ve TSP4 genlerinde meydana gelen SNP lerin MI ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla akut MI tanısı konmuş 150 hasta ile kendisinde ve birinci derece yakınında herhangi bir kalp rahatsızlığı bulunmayan 150 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. TSP1 (N700S), TSP2 (3'UTR) ve TSP4 (A387P) gen bölgelerinde meydana gelen polimorfizmler PCR-RFLP yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi sonucunda TSP2 (3'UTR) gen bölgesinde meydana gelen SNP'lerin MI ile ilişkisi anlamlı bulunmuştur. TSP1 ve TSP4 ile MI arasında ise herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: MI (Miyokard İnfarktüs), TSP (Trombospondin), SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi).

ABSTRACT

The Determination of Thrombospondine Gene Polymorphisms in Patients with Myocardial Infarction

KOCAOGLU YUCEL, Hatice

Master Thesis, Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Haziran 2013, 59 pages

Thrombospondines (TSPs) are proteins that are in extracellular matrix as nature and they are adhesive proteins interact with cell-cell and cell-matrix, their 5 subtype was defined. Each of these subtypes are encoded from different genes and some of them which are related with myocardial vascular obstruction, TSP1, TSP2 and TSP4 are in different chromosomes. TSP, that stops cell migration in endothelial cells in response to different kinds of angiogenic stimulus, stimulates apoptosis and prevents from occurring neovascularization, is a potential suppressive for angiogenesis and has a role in MI progression. In this study, the determination of association between MI and single nucleotide polymorphisms that occur in TSP1, TSP2 and TSP4 genes which are anti-angiogenic factors was aimed. This study was studied on 150 patients with MI and 150 controls. Polymorphisms in TSP1 (N700S), TSP2 (3'UTR T/G) and TSP4 (A387P) were analyzed with PCR-RFLP. As a result of statical data analysis, SNPs in TSP2 are significant and association with MI highly. In contrast to TSP2, TSP1 and TSP4 are not significant and they have no association with MI.

Key words: MI (Myocard İnfarktüs), TSP (Thrombospondin), SNP (Single Nucleotide Polymorphisms).

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince maddi manevi her türlü desteği sağlayan, deneyimleriyle her türlü konuda bana yol gösteren sevgili hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN'a;

Çalışmamın tüm aşamalarında tecrübelerini ve bilgilerini benimle paylaşan, çalışmam süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ'e;

Çalışmam süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her türlü sorunumda tecrübelerinden yararlandığım sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ'a;

Çalışmam boyunca örnek materyal toplanmasında büyük emeği geçen sayın Uzman Dr.Alper KARAGÖZ'e ve Uzman Dr.Serdar TÜRKMEN'e;

Çalışma sonuçlarının istatistiksel olarak yorumlanmasında engin bilgi ve görüşlerini benden esirgemeyen sayın hocam Prof.Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK' e;

Tezimin her aşamasında yanımda olan, büyük bir özveriyle çalışan ve hakkını asla ödeyemeyeceğim sevgili arkadaşım Ceyda UYAR'a;

Hayatım boyunca desteğini benden hiç esirgemeyen, manevi dünyamda en özel yerde olan canım babam Mehmet YÜCEL'e ve varlığımın yegane sahibi canım ANNEM' e;

Hayatıma girdiği andan itibaren attığım her adımda yanımda olan ve beni ben yapan canım eşim Eyüp KOCAOĞLU'na;

teşekkürlerimi sunarım...

Ve son olarak hayatımın neşesi meleğime, gülen yüzüme... AYBÜKE' me kucak dolusu sevgiler...

Bu tez çalışması FEF12.12 nolu proje olarak Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (GAÜNBAAP) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
RESİM LİSTESİ.....	xii
TABLO LİSTESİ.....	xiii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Damar Oluşum (Vaskülarizasyon) Çalışmalarının Tarihçesi.....	3
2.2 Anjiyogenezis	5
2.2.1.Anjiyogenezi Uyaran ve Engelleyen Etmenler.....	6
2.3. Koroner Kalp Hastalığı	7
2.4. Koroner Arter	8
2.4.1.Koroner Arterlerin Anatomisi.....	8
2.4.2 Koroner Arterlerin Histolojisi.....	9
2.5.Ateroskleroz	11
2.5.1. Epidemiyoloji.....	11
2.5.2 Aterosklerozun Risk Faktörleri.....	12
2.6. Miyokard İnfarktüsü (MI)	17
2.6.1.Epidemiyoloji.....	18
2.6.2.Fizyopatoloji	18
2.7.Trombospondinler	19
BÖLÜM 3	23
LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ.....	23
BÖLÜM 4	27
MATERYAL-METOT	27
4.1. CİHAZLAR, KİMYASAL MADDELER ve SOLÜSYONLAR	27

4.1.1. DNA İzolasyon Aşaması	27
4.1.2. DNA Amplifikasyonu.....	27
4.1.3. Enzim Kesimi	29
4.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi	29
4.2. Metot	30
4.2.1. Kan Örneklerinin Eldesi	30
4.2.2. DNA İzolasyonu	30
4.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	32
4.2.4. Agoroz Jel Elektroforezi.....	35
4.2.5. RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) ile Trombospondin Genine ait TSP1, TSP2, TSP4 Polimorfizmlerinin Analizi.....	36
4.2.5. İstatistiksel Analiz.....	37
5.1. TSP1 Geni N700S Bölgesi İçin Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları.....	39
5.1.1. TSP1 (N700S) Bölgesi PCR Ürünü İle İlgili Bulgular.....	39
5.1.2. TSP1 (N700S) Bölgesi PCR Ürünlerinin BseNI Enzimi İle Kesim Sonuçları	39
5.2. TSP2 Geni 3' UTR T/G Bölgesi İçin Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları ..	40
5.2.1. TSP2 (3' UTR T/G) Bölgesi PCR Ürünü İle İlgili Bulgular	40
5.2.2. TSP2 (3' UTR T/G) Bölgesi PCR Ürünlerinin AluI Enzimi İle Kesim Sonuçları	41
5.3. TSP4 Geni A387P Bölgesi İçin Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları.....	42
5.3.1. TSP4 A387P Bölgesi PCR Ürünü İle İlgili Bulgular	42
5.3.2. TSP4 (A387P) Bölgesi PCR Ürünlerinin AvaII Enzimi İle Kesim Sonuçları	43
BÖLÜM 6	45
TARTIŞMA VE SONUÇ	45

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Yeni Damar Oluşumu	5
Şekil 2.2. Kalbin arterleri	9
Şekil 2.3. Kroner arterlerin yapısı	10
Şekil 2.4. TSP1 ve TSP2 ' nin domain yapısı	21
Şekil 2.5.TSP2 deki t3949g polimorfizmi	22
Şekil 2.6.TSP4' ün domain yapısı	22

RESİM LİSTESİ

Resim 4.1. TSP1 (N700S) Bölgesi Gradyent PCR Jel Görüntüsü.....	34
Resim 4.2. TSP2 (3'UTR T/G) Bölgesi Gradyent PCR Jel Görüntüsü.....	34
Resim 4.3. TSP4 (A387P) Bölgesi Gradyent PCR Jel Görüntüsü.....	34
Resim 5.1. TSP1 N700S Gen Bölgesi PCR Sonuçlarının Kontrol Edildiği Agaroz Jel Fotoğrafi.....	39
Resim 5.2. TSP1 Geninin N700S Bölgesi Polimorfizminin BseNI Enzimi İle Kesimi Sonucu Oluşan Bantlar.....	39
Resim 5.3. TSP2 3'UTR T/G Gen Bölgesi PCR Sonuçlarının Kontrol Edildiği Agaroz Jel Fotoğrafi.....	41
Resim 5.4. TSP2 Geninin 3' UTR T/G Bölgesi Polimorfizminin AluI Enzimi İle Kesimi Sonucu Oluşan Bantlar.....	41
Resim 5.5. TSP4 A387P Gen Bölgesi PCR Sonuçlarının Kontrol Edildiği Agaroz Jel Fotoğrafi.....	42
Resim 5.6. TSP4 Geninin A387P Bölgesi Polimorfizminin AvaII Enzimi İle Kesimi Sonucu Oluşan Bantlar.....	43

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Anjiyogenezi Uyaran ve Engelleyen Etmenler.....	6
Tablo 2.2. Aterosklerozun Risk Faktörleri.....	12
Tablo 4.1. Primerlerin ileri ve geri dizilimleri, ürün büyüklüğü ve bu bölgelere ait kesim enzimleri.....	33
Tablo 4.2. TSP1 (N700S), TSP2(3'UTR T/G) ve TSP4 (A387P) Bölgelerinin PCR Reaktifleri.....	35
Tablo 4.3. TSP1 (N700S), TSP2 (3'UTR), TSP4 (A387P) Bölgelerinin Primer Bağlanma Sıcaklıkları ve Döngü Sayısı.....	35
Tablo 4.4. TSP1 (N700S) için Kesim Karışım Protokolü.....	36
Tablo 4.5. TSP2 (3' UTR T/G) için Kesim Karışım Protokolü.....	37
Tablo 4.6. TSP4 (A387P) için Kesim Karışım Protokolü.....	37
Tablo 5.1 MI Hastaları Demografik Özellikler.....	38
Tablo 5.2 Hasta Grubu Klinik Bilgilerinin İstatiksel Olarak Karşılaştırılması.....	38
Tablo 5.3 Trombospondin geni TSP1(N700S) polimorfizminin genotip ve allel dağılımı.....	40
Tablo 5.4 Trombospondin geni TSP2 (3'UTR T/G) polimorfizminin genotip ve allel dağılımı.....	42
Tablo 5.5 Trombospondin Geni TSP4 (A387P) Polimorfizminin Genotip ve Allel Dağılımı.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

- MI: Miyokard İnfarktüsü
- TSP1: Trombospondin1
- TSP2: Trombospondin2
- TSP4: Trombospondin4
- TAF: Tümör Anjiyogenik Faktör
- VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
- FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
- PGF: Plasental Büyüme Etmeni
- FGF-3: Fibroblast Büyüme Etmeni-3
- FGF-4: Fibroblast Büyüme Etmeni-4
- TGF- β : Transforme Edici Büyüme Etmeni- β
- TGF- α : Transforme Edici Büyüme Etmeni- α
- EGF: Epidermal Büyüme Etmeni
- HGF: Hepatosit Büyüme Etmeni
- TNF- α : Tümör Nekroz Etmeni- α
- PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Etmeni
- GCSF: Granülosit Koloni Uyarıcı Etmen
- IL- 8: İnterlökin-8

KAH: Koroner Arter Hastalığı

LAD: Sol Ön İnen Arter

Cx: Sirkumfleks Arter

MCP-1: Monosit/Makrofaj Kemotaktik Protein-1

MCSF: Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör

IL-1: İnterlökin-1

TNF α : Tümör Nekrozis Faktör-alfa

PDGF: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktör

FGF: Fibroblast Growth Faktör

TGF- β : Transforming Growth Faktör Beta

Ang II: Anjiyotensin II

ET: Endotelin

İKH: İskemik Kalp Hastalığı

AMI: Akut Miyokard İnfarktüsü

DM: Diabetes Mellitusun

PKG: Peruktan Koroner Girişimleri

ADP: Adenozin Difosfat

TXA2: TromboksanA2

PGF2 α : ProstaglandinF2 α

kDA: Kilo Dalton

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmleri

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RFLP: Restriksiyon Enzimi ile Fragment Uzunluk Poliformizmi

VWF: On Willebrand Faktörü

MMP-9: Matriks mettallo proteinaz-9

TBE: Tris Borat Tamponu

VKİ: Vücut Kütle İndeksi

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

TE: Tris-EDTA

Bç: Baz Çifti

UV: Ultra Viole

BÖLÜM 1

GİRİŞ

İskemik kalp hastalıkları, tüm dünyada ana sağlık problemlerinden biridir. İskemik kalp hastalığı, miyokardın oksijen ihtiyacı ile kan akımı arasındaki dengesizlik sonucu gelişen birbiri ile yakından ilişkili sendromlar grubuna verilen isimdir. İskemik kalp hastalığının en sık görülen sebebi, koroner arter lümenlerinin halk arasında damar sertliği diye de bilinen ateroskleroz nedeniyle tıkanma veya daralmasıdır. Bu nedenle iskemik kalp hastalığı sıklıkla koroner kalp hastalığı veya koroner arter hastalığı olarak adlandırılır.

Koroner arter hastalığı, Birleşik Devletler ve Avrupa dâhil olmak üzere, dünyanın ekonomik olarak gelişmiş ülkelerindeki ölümlerin tek başına en sık nedenidir ve bu ülkelerde ölümlerin yaklaşık üçte birinden sorumludur (Güleç, 2006) Koroner arter daralmasının oranı ve ciddiyeti ile ilişkili olarak bazı sendromlar görülür. Bu sendromlardan biri akut miyokard infarktüsüdür (MI) (Kumar vd., 2003). MI uzamış iskemi sonucu meydana gelen geri dönüşümsüz kalp kası nekrozudur. MI'ün şiddeti, miyokardın O₂ talebi ile koronere kan sunumu arasındaki dengesizliğin derecesi ve süresi ile yakın ilişkilidir. MI'ün %85'i aterosklerozla daralmış bir koroner arteri tıkayan akut bir trombüsle oluşur (Gök, 1996). Birleşik Devletlerde, her yıl 1,5 milyon kadar kişi MI geçirmekte, bunların yaklaşık 500.000 'i ölmektedir (Güleç, 2006). Akut MI riski hayat boyunca progresif olarak artmaktadır. 45 ve 54 yaşlar arasında, erkekler de kadınlara kıyasla MI gelişme olasılığı 4-5 kat daha fazladır. Bununla birlikte iskemik kalp hastalığı riski 80 yaşından sonra her iki cinste eşit olarak görülmektedir (Kumar vd., 2003). Akut MI için bir çok risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar kalıtsal ve edinilen olarak iki gruba ayrılır. Cinsiyet, yaş, aile öyküsü ve genetik faktörler kalıtsal risk faktörleri olarak verilebilir. Sigara, kolesterol, yüksek kan basıncı, obezite, stres, diyet, alkol de edinilen risk faktörlerine örnek olarak verilebilir (Kumar vd., 2003). Bu tip risk faktörlerinin etkileşimlerinin ortaya konması MI'ün ortaya çıkışı hakkında önemli bilgiler vermesi ve doğru

yaklaşımlar geliştirilmesi için önemlidir. Koroner arter hastalıklarıyla ilgili yapılan çalışmalar, MI ile ilgili genetik faktörlerin ve aday genlerin bulunması, hastalıkların altında yatan ve çoğu bilinmeyen genetik etkilerin ortaya çıkarılması açısından önemlidir. Bu çalışmada anjiyogenik uyaranların değişik türlerine cevap olarak endotel hücrelerde hücre göçünü durduran, apoptozu uyaran ve yeni damar oluşumunu önleme yeteneğine sahip potansiyel bir anjiyogenez baskılayıcısı olup MI'ü gelişiminde rol alan trombospondin (TSP) gen ailesine ait TSP1, TSP2 ve TSP4 genlerinin polimorfik sıklıklarının araştırılması ve öngörülen sonuçların anlamlı bulunmasıyla beraber bu genlerin MI erken tanısında aday belirteç ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde ideal hedefler olarak rol oynayabileceklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Damar Oluşum (Vaskülarizasyon) Çalışmalarının Tarihçesi

Yeni damar oluşumu, anjiyogenezis ya da vaskülarizasyon, hakkındaki çalışmaların genellikle 18. yüzyılda başladığı görülmektedir. 1747 yılında Boerhaave, yaralarda bulunan cerahatın farklı damarların birbirlerine bağlantı yapmasına yardım ettiğini düşünmüştür. Kapiller damar büyümesi hakkında ilk çalışmalardan biri kurbağa larvaları (tadpole) üzerinde Platner (1844) tarafından ortaya konulmuştur. Meyer (1852) ve Travers (1844) yara iyileşmesinde yeni kan damarlarının oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Cıvciv embriyosunda ve farklı tümörlerde kapillerin çoğaldığı Billroth (1856) tarafından gözlenmiştir. Arnold ise 1871 ve 1872 yıllarında inflamasyon ve rejenarasyon dönemlerinde kapillerin oluştuğunu bildirmiştir (Hudlicka, 1984a ve 1984b).

Yeni kan damarlarının oluşması ile ilgili önemli çalışmalar 19.yüzyılın başlarında Goldman tarafından tümörde yapılmaya başlanmıştır. Goldman gözlemlerini, “normal olarak gelişen dokunun kan damarları anormal şekilde gelişmekte olan ve aşırı kan damarı içeren tümör tarafından bozulmakta ve özellikle tümöre komşu olan bölgelerdeki kan damarları genişlemiş ve düzensiz bir şekil almıştır” diye bildirmiştir (Goldman, 1907). Clark ve arkadaşları tavşanların kulaklarında geliştirdikleri transparan çemberleri kullanarak implante ettikleri tümörlerde damar büyümesini gözlemleyerek radyografik bulgular elde etmişlerdir (Clark vd., 1931).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda vaskülarizasyonun oluşmasında endotel hücrelerinin rolünün son derece önemli olduğu gösterilmiştir. Yeni kan damarlarının oluşmasının “anjiyogenezis (angiogenesis)” terimi ile tanımlanması 1935 yılında Hertig’in hamile maymunların plasentası üzerinde yaptığı bir çalışmayla yapılmıştır (Hertig, 1935).

Sonraki yıllarda yeni kan damarlarının oluşumu endometriyumda, kıl folikülleri çevresinde, dişlerde, iskelet ve kalp kasında, beyinde vb. dokularda çalışılmaya başlanmıştır. Anjiyojenezis konusunda özellikle iskelet ve kalp kasında yapılan araştırmalarda egzersiz, hipoksik ve kalbin bradikardik olarak işlediği şartlarda çalışılmıştır (Hudlicka, 1984a).

Araştırmacılar kan damarlarının bazı organlarda fazla bazılarında az olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu gözlemlerden yola çıkarak Sobin ve Tremer (Sobin ve Tremer, 1977) organlardaki kan damarlarının basitçe besin gereksinimleri için olan damar ağları (İskelet, kalp ve düz kaslar, merkezi sinir sistemi ve mesane vb) ve belli bir görev için olan damar ağları (Deri, akciğer, karaciğer, böbrek, endokrin bezler vb.) şeklinde bu iki koşula göre olabileceğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte kabaca metabolizması yüksek ya da yaptığı iş büyük olan organlarda kan damarları fazla, metabolizması düşük ya da yaptığı iş az olanlarda az bulunur diye bildirilmiştir (Hudlicka, 1984a). Kapiller sayısını araştıran ilk çalışmalardan birinde incelenen dokularda mm²'deki kapiller sayısının böbreklerde en fazla, yağ dokusunda en az olduğu gözlenmiştir (Kety, 1951).

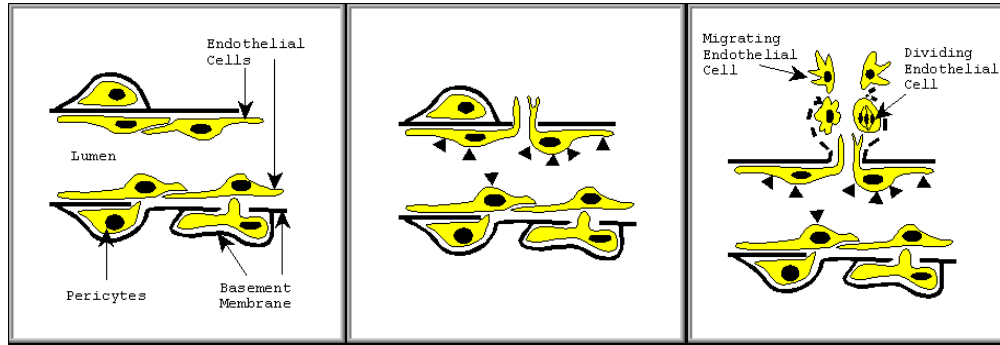
Tümör ve yara iyileşmesi gibi konularda oluşan fizyolojik ve patolojik anjiyojenezis hakkında ciddi çalışmalar ve tartışmalar 1970'li yıllarda, özellikle Folkman ve arkadaşlarının (Folkman, 1971a) çalışmalarıyla hız kazanmıştır. Yine aynı dönemde aynı grup tarafından ilk anjiyojenik faktör tümör anjiyojenik faktör (TAF) adı altında sıçan meme tümör ekstresinden izole edilmiştir (Folkman vd., 1971b). Sonraki yıllarda da tümör tarafından salınan ve etrafa difüze olabilen vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörleri (FGF) gibi birçok faktörün olduğu belirlenmiştir (Kerbel, 2000; Ribatti vd., 2002).

Anjiyogenezis oluşumunda önemli rolleri olan büyüme faktörlerinden aFGF, bFGF ve VEGF 1980'li yıllarda izole edilmiştir (Maciag vd., 1984). Bu faktörler ve diğer faktörlerin elde edilmesi ile sonraki yıllarda miyokard infarktüsü ve alt bacak ekstremitealarında görülen iskemik hastalıkların tedavisinde anjiyojenezisi stimüle eden değişik büyüme faktörlerinin kullanılması için çalışılmıştır (Hudlicka vd., 1992). Anjiyojenezisten sorumlu anjiyojenik faktörlerin keşfinden sonra antianjiyojenik etkili faktörlerin de bilinmesiyle kanser, diyabetik retinopati ve

romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisi yoluna gidilmeye başlanmıştır (Ferrara ve Henzel, 1989).

2.2 Anjiyogenezis

Anjiyogenez mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesidir. Proanjiyogenik ve antianjiyogenik etmenler tarafından kontrol edilir (Carmeliet, 2003). Anjiyogenezin fizyolojik ve patolojik olmak üzere 2 çeşidi vardır. Fizyolojik anjiyogenez gelişmekte olan fetüste başlar ve doğum sonrasında, erişkin dokulardaki normal kan damarlarını oluşturacak biçimde devam eder. Fizyolojik anjiyogenez kendi kendini sınırlayan bir olay olmasına rağmen patolojik anjiyogenez uzun süre devam eder (Dvorak, 2003). Fizyolojik anjiyogenezde kan damarları, düzenli, birbirinden yakın boşluklarla ayrılmış ve iyi düzenlenmiş bir dağılım gösterirler. Patolojik anjiyogenezde ise uyarılan yeni kan damarları (örneğin tümörler tarafından) son derece anormaldir, düzensiz dallanırlar ve belirli bir düzene uymazlar. Ayrıca yapısal ve işlevsel açıdan heterojen, plazma proteinlerine ve plazmaya karşı genellikle yüksek derecede geçirgendirler. Yüzeylerinde pek çok büyüme etmeni almaçları bulunmaktadır (Leung vd., 1989; Dibbens vd., 1999).



Şekil 2.1 Yeni Damar Oluşumu (Tıglı, 2009)

Anjiyogenezin sıkı biçimde denetlendiği döllenmeden sonra plasentanın gelişmesi, yara iyileşmesi, menstruasyondan sonra uterus iç tabakasının yenilenmesi gibi fizyolojik durumlar dışında anjiyogenez organizmada oldukça sınırlıdır (Allure, 2003). Normal koşullarda anjiyogenez, endotel hücrelerinin çoğalmasını ve etkinleşmesini sağlayan pek çok büyüme etmeni ile buna karşı gelen anti-anjiyogenik etmenler arasında oluşan bir denge ile düzenlenir (Haroon vd., 1999). Bu etmenler arasındaki denge bozulduğunda anjiyogenez kontrol edilemez. Bu olay özellikle

tümörlerin yayılmasında büyük öneme sahiptir. Anjiyogenez ayrıca iskemik kardiyovasküler hastalıklar, retinopatiler, yara iyileşmesi ve enflamasyon gibi pek çok önemli hastalık durumunu da önemli ölçüde etkiler (Dibbens vd., 1999; Ferrara vd., 2003). Kalbin koroner kan dolaşımının belli bir bölgede yetersiz kalması sonucu o bölgedeki kalp kası dokusunun ölmesi olarak tanımlanan miyokard infarktüsü sıklıkla koroner damarların ateroskleroz sonucu daralma ya da tıkanmalarına bağlıdır. Miyokard (kalp kası) o kadar kalındır ki kalp kanla dolu olmasına rağmen kanın kas dokusunun derinliklerine ulaşması için koroner damarlara gerek vardır. Dolayısıyla kalp kası dokusunun beslenmesi ve miyokard infarktüsü görülme sıklığının azalmasında anjiyogenez önemli bir yer tutmaktadır. Anjiyogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Hücre dışı matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme etmeni, sitokinler ve bunların almaçları anjiyogenezde temel rol oynar (Leung vd., 1989; Lawrence ve Diegelmann, 1994; Goodsell, 2003).

2.2.1. Anjiyogenezi Uyarıcı ve Engelleyen Etmenler

Anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörlerin önemli olan bazıları tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Anjiyogenezi Uyarıcı ve Engelleyen Etmenler

Anjiyogenezi Uyarıcı Etmenler	Anjiyogenezi Engelleyen Etmenler
VEGF (Vasküler endotelial büyüme etmeni)	Trombospondin- 1
PGF (Plasental büyüme etmeni)	Anjiostatin
FGF (Asidik, bazik fibroblast büyüme etmeni)	Endostatin
FGF-3 (Fibroblast büyüme etmeni-3)	Vazostatin
FGF-4 (Fibroblast büyüme etmeni-4)	Vasküler endotelial büyüme faktörü inhibitörü
TGF- α (Transforme edici büyüme etmeni- α)	Trombosit factor-4 parçacığı
TGF- β (Transforme edici büyüme etmeni- β)	Prolaktin derivesi
EGF (Epidermal büyüme etmeni)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme etmeni)	Proliferinle ilgili protein

Anjiyogenezi Uyarıcı Etmenler	Anjiyogenezi Engelleyen Etmenler
TNF- α (Tümör nekroz etmeni- α)	İnterferon- α - β
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme etmeni)	Anjiopoetin-2
GCSF (Granülosit koloni uyarıcı etmen)	Antitrombin-3 fragmanı
IL- 8 (İnterlökin-8)	İnterferon ile indüklenebilen protein- 10
Anjiogenin	
Proliferin	

2.3. Koroner Kalp Hastalığı

Kalp kasılmasını sağlayan miyokard adı verilen kas tabakasının beslenmesini, dolayısıyla kalbin beslenmesini sağlayan damarlara koroner damar (koroner arter) adı verilir (Hurst, 1990). Koroner arterlerde olabilecek hastalıklar doğrudan kalbin çalışmasını ve verimini etkileyeceğinden dolayı, bu damarlar büyük önem taşımaktadır. Bu damarlarda görülen en önemli hastalık koroner arter hastalığı (KAH)'dır. KAH genellikle ateroskleroz sonucu gelişmektedir. Koroner damarlarda başta kolesterol olmak üzere lipidler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve hücre dışı maddelerin birikmesi plak oluşumuna sebep olur. Oluşan plaklar zamanla damar içinde büyüyerek normalde esnek olan damarların esnekliğini azaltır ve damarın tıkanmasına yol açar. Damarın tıkanması sonucu oluşan hastalığa ateroskleroz denir. Ateroskleroz veya başka bir nedenle miyokardın ihtiyacı olan oksijenin yeterince karşılanamaması sonucu oluşan iskemi (dokunun kanlanamaması), koroner arter hastalığına sebep olur. Koroner arter hastalığı, genetik faktörler ile çevresel faktörlerin birbirlerini etkilemesi sonucu oluşan multifaktöriyel (çok yönlü) bir hastalıktır (Vassalli ve Winkelmann, 2004). Koroner arter hastalığı için belirlenen hipertansiyon, obezite, hiperkolesterolemi, diyabet, sigara, fiziksel inaktivite ve pozitif aile öyküsü gibi risk faktörlerinin yanı sıra, son zamanlarda aday genlerdeki DNA polimorfizmlerinin (gen çok yapılilik) neden olduğu genetik yatkınlık da önemli bir risk faktörü olarak gösterilmektedir (Gonzales vd., 2006).

2.4. Koroner Arter

Kanı pompalamakla görevli olan kalp, bu görevini yapabilmek için dakikada ortalama 70 kere kasılır ve her defasında ortalama 70 ml kanı organlara gönderir. Organların canlılığını koruyabilmeleri ve görevlerini yapabilmeleri için besin maddeleri ve oksijene ihtiyaçları vardır. Bunlar organlara atardamar (arter) yolu ile taşınan kan ile ulaştırılır. Kanın arterlere pompalanmasını sağlayan kalbin, ihtiyaç duyulan seviyede çalışabilmesi için kanlanması yani beslenmesi gerekir (Hurst, 1990). Koroner arter Kalp kasılmasını sağlayan miyokard adı verilen kas tabakasının beslenmesini, dolayısıyla kalbin beslenmesini sağlar.

2.4.1. Koroner Arterlerin Anatomisi

Aort damarından ayrılan, epikardial arterler şeklinde tanımlanan majör koroner arterler, kalbin dış yüzünde sulkus adı verilen oluklarda bulunurlar (Gök, 1996). Başlangıçta sağ ve sol koroner arter olmak üzere iki ana dal halindedir. Sol ana koroner arter, kısa bir segment sonrasında sol ön inen arter (LAD) ve sirkumfleks arter (Cx) olmak üzere ikiye ayrılır (Hurst, 1990).

2.4.1.1. Sağ koroner arter (RCA)

Aort kökünde sağ koroner valsalva sinüsünden çıkar (Gök, 1996). Uzunluğu 12–14 cm, çapı ise 1,5-5,5 mm olan bu arter, sağ kulakçık ve karıncık ile iki karıncık arası bölmenin arka kısmını besler. Bu koroner arterden, akut marjin, sol ventrikül, sinüs düğümü arteri gibi dallar çıkmaktadır (Hurst, 1990).

2.4.1.2. Sol koroner arter (LCA)

Aort kökündeki sol koroner valsalva sinüsünden çıkar (Gök, 1996). 1–25 cm uzunluğunda olup, çapı 2-5,5 mm'dir. Sol koroner arter kalbin daha büyük bir bölümünü beslediğinden dolayı daha önemlidir. (Gök, 1996; Hurst, 1990).

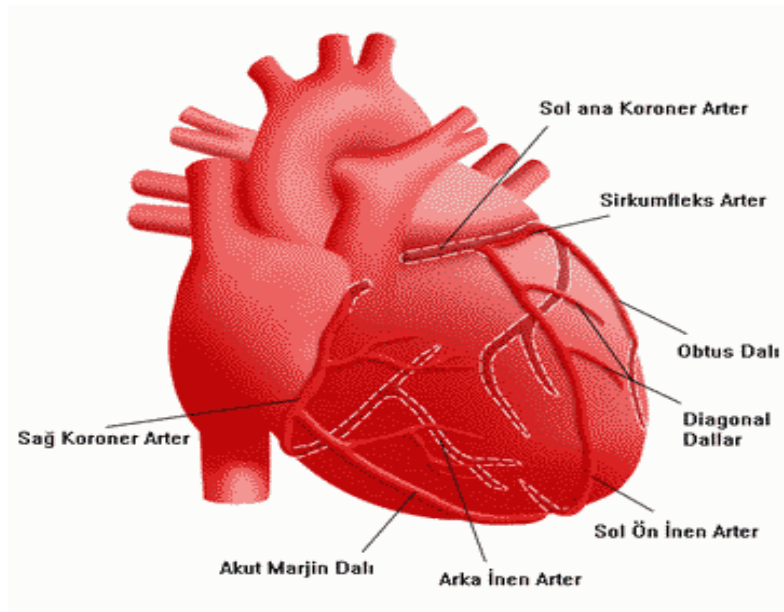
2.4.1.2.1. Sol ön inen arter (LAD)

Kalbin ön yüzünde yukarıdan aşağıya doğru uzanır. Uzunluğu 10-13 cm, çapı ise 2-5 mm'dir. Sol koroner arterden ayrılan bu arter, sol karıncığın ön yüzü ile iki karıncık arası bölmenin ön kısmını besler, dolayısıyla kalbin ön yüzünün kanlanmasını sağlar.

Kendisinden çıkan dallar diagonal ve septal dallar olarak adlandırılır. Kalp kasının en büyük bölümünü besleyen damar olduğundan dolayı, kalbin en önemli damarıdır. Bu damara bağlı MI'de kalp kası hasarı daha büyük olur (Ersöz, 2008)

2.4.1.2.2. Sirkumfleks arter (Cx)

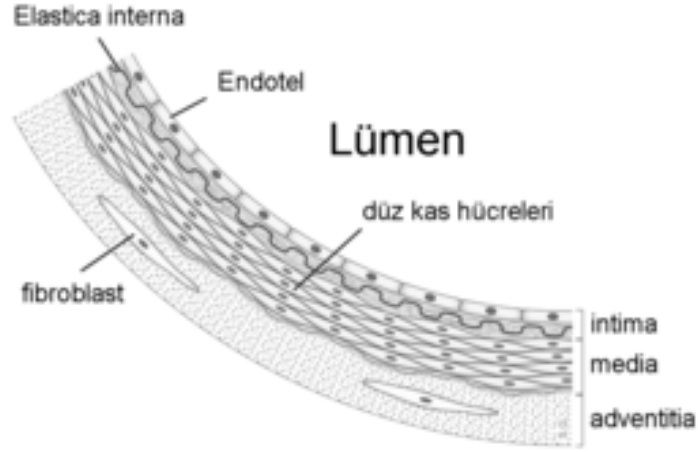
Uzunluğu 6–8 cm, çapı 1,5–5,5 mm olan sirkumfleks arter, atrium (kulakçık) ve ventrikülleri (karıncık) arasından dolanıp kalbin arkasına yönelerek, kalbin yan ve arkasını besler. Kendisinden çıkan yan dallara obtus adı verilir (Ersöz, 2008) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2 Kalbin arterleri (Hurst 1990)

2.4.2 Koroner Arterlerin Histolojisi

Arterler histolojik yapılarına göre elastik arterler, musküler arterler ve arterioller olmak üzere üç gruba ayrılırlar (Crowford 2004). Koroner arterler musküler arter yapısındadır. Musküler arterlerin çapları genellikle 0,5–10 mm arasındadır. Musküler arterler tüm arterlerde olduğu gibi, içten dışa doğru intima, media ve adventisya olmak üzere üç tabakadan oluşan bir duvar yapısına sahiptir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kroner arterlerin yapısı (Crowford, 2004)

2.4.2.1 İntima tabakası

Bu tabaka en içte bir sıra endotel hücresi, daha sonra kollajen ve elastik fibrillerin oluşturduğu ince bir subendotelyal tabaka ve bu tabakanın altındaki belirgin bir internal elastik laminadan oluşur. Endotel, arter duvarı ile kan elemanları arasında düzgün ve kesintisiz bir sınır oluşturan tek sıra dizilmiş hücrelerden oluşan bir tabakadır. Endotelin başlıca üç görevi vardır: Kan elemanları ile arter duvarı arasındaki geçirgenliği sağlamak, damar tonusunu kontrol etmek ve hemostaz ve inflamasyona (iltihaplanma) göre damar yüzeyinin özelliklerini düzenlemektir (Crowford, 2004).

2.4.2.2 Media tabakası

Bağ dokusu ile sarmalanmış olan bu tabaka çok katlı, spiral şekilli düz kas hücreleri ve bu hücreler arasındaki matriksten oluşmuştur (Crowford, 2004). Dış sınırlarını internal ve eksternal lamina oluşturur ve media'yı intima ve en dış katman olan adventisyadan ayırır. Damar duvarının en geniş tabakası olan bu tabakanın esas fonksiyonu, damar duvarındaki kontraksiyonu ve dilatasyonu sağlamaktır (Crowford, 2004).

2.4.2.3 Adventisya tabakası

Kroner arter duvarının en dış tabakasıdır. Bu tabaka genellikle uzunlamasına yerleşim gösteren fibroblastlar, elastik ve kollajen fibrillerin oluşturduğu gevşek

yapıda bir bağ dokusundan meydana gelir. Adventisya herhangi bir membranla sınırlanmaksızın, çevre bağ dokusu ile devam eder. Bu tabaka vaza vazorum da denilen kapiller, venül ve arteriollerle damar duvarının beslenmesini sağlar (Hurst, 1990; Crawford, 2004).

2.5.Ateroskleroz

Ateroskleroz lipidler, fibroblastlar, makrofajlar, düz kas hücreleri ve hücre dışı maddeleri değişik oranlarda içeren intimal plaklara bağlı olarak meydana gelen, arterlerin esneklik ve antitrombotik özelliklerinin bozulmasına yol açan bir hastalıktır. Ateroskleroz arter duvarının intima tabakasındaki değişimlerin eşlik ettiği, lipidlerin, kanın diğer yapı taşlarının ve fibröz dokunun yerel birikiminden doğan değişikliklerin bir kombinasyonu olarak da tanımlanır (Wilson,1994). Komplikasyonları ile birlikte gelişmiş ülkelerde mortalite ve morbiditenin en önde gelen nedenidir (Rudd vd., 2008). 4 major hastalık grubunu içerir. Bu hastalıklar şunlardır:

- 1) Koroner kalp hastalığı (MI, anjina pectoris, kalp yetersizliği ve koroner ölüm)
- 2) Serebrovasküler hastalıklar (Strok ve geçici iskemik atak)
- 3) Periferik arter hastalığı
- 4) Aortik ateroskleroz (Torasik veya abdominal aort anevrizması)

2.5.1. Epidemiyoloji

Kardiyovasküler hastalıklar genel popülasyonda yaygın olarak görülmekte ve özellikle 60 yaş üstü erişkinleri etkilemektedir. Gelişmekte olan ülkelerde önde gelen ölüm nedenidir. Son iki yüzyıl boyunca bu nedenle ABD’de 1 milyon kişi hayatını kaybetmiştir (Sümbül, 2010). Yaşam süresi uzadıkça kardiyovasküler hastalıklar, koroner kalp hastalıkları ve strok nedeniyle ölüm oranı artmaktadır. Ancak 1990’dan sonra artış hızı yavaşlamıştır (Murabi vd., 2003). Koroner kalp hastalıkları kardiyovasküler hastalıkların 1/3-1/2’sini oluşturmaktadır. Her yıl dünya genelinde 19 milyondan fazla insanın akut kardiyak olay (akut koroner sendrom veya ani kardiyak ölüm) geçirdiği tahmin edilmektedir. Bu sayı ABD’de 1 milyon, Türkiye’de 300.000’den fazladır (Sümbül, 2010).

2.5.2 Aterosklerozun Risk Faktörleri

Risk faktörleri;

- Aterosklerotik süreci uzatması (plak yaygınlığı),
- Oluşmuş plakların kararsız hale gelmesi (hassasiyet, erozyon ve rüptür),
- Lokal (plak trombojenitesi) ya da sistemik faktörlerle trombozun uyarılması şeklinde etkili olabilir (Davies, 2001). Aterosklerozun Risk Faktörleri tablo 2.2’te verilmiştir.

Tablo 2.2. Aterosklerozun Risk Faktörleri (Güzel, 2008)

Majör Risk Faktörleri		Minör Risk Faktörleri
a) Değiştirilebilir Olanlar	b) Değiştirilemeyenler	
* Dislipidemi: LDL-kolesterol yüksekliği, HDLkolesterol düşüklüğü, *Hipertrigliseridemi, *Lipoprotein (a) yüksekliği * Sigara * Diabetes Mellitus * Hipertansiyon * Obezite * Fiziksel inaktivite	* Genetik yatkınlık-aile öyküsü * Cinsiyet * Yaş	* Stres * Kişilik yapısı * Hiperürisemi * Hiperkoagülabilité * Hiperkalsemi * Homosistein * Alkol *Antioksidan düzeyinin düşüklüğü * Eser elementler (Demir, Çinko, Bakır, Selenyum..) * Vazektomi * Kalp transplantasyonu

2.5.2.1. Değiştirilebilir Majör Risk Faktörleri

2.5.2.1.1 LDL-Kolesterol Yüksekliği: Plazmadaki kolesterolün çok büyük bir kısmı LDL-kolesterol partikülleri içinde taşınır. Total plazma kolesterol düzeyi ile kardiyovasküler hastalıkların oluşumu arasında çok sıkı bir korelasyon vardır. Bir

çok çalışmada devamlı olarak plazma total kolesterolünün 180 mg/dl altında olduğu şahıslarda koroner arter hastalığı riskinin az olduğu gözlemlenmiştir (Neaton ve Wentworth, 1992). Risk faktörleri arasında en önemlisi yüksek serum LDL kolesterolü (ya da total kolesterol) dür. Total kolesterol düzeyinin 150 mg/dl altında olduğu toplumlarda başka bir majör risk faktörü olsa bile aterosklerotik olaylar seyrek olur (Roberts, 1995). Bu riskin çoğu LDL-kolesterol ile açıklandığı için total kolesterole oranla artık LDL kolesterol dikkate alınmaktadır. LDL-kolesterol düzeyindeki her % 1'lik bir farkın koroner arter hastalığı riskini %2 ile %3 arasında değiştirdiği görülmüştür (Güzel, 2008).

2.5.2.1.2 Trigliserid Yüksekliği: Trigliseridlerin aterosklerozla bağlantısı tartışma konusu olagelmıştır. Ateroskleroz; düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL-kolesterol), orta yoğunluklu lipoproteinler (IDL) ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinleri (VLDL) içeren aterojenik lipoproteinlerin intimaya girmesi, birikmesi ve modifiye edilmelerine bağlıdır. Lipoproteinlerin ateroskleroza yol açma kapasitelerinin kısmen büyüklüklerine bağlı olması arter duvarından geçemeyecek kadar büyük olan VLDL ve şilomikronların aterojenik olmamasını açıklar. Küçük VLDL ve IDL'lere bağlı daha az şiddetli hipertrigliseridemini aksine şilomikronlara ve büyük VLDL formlarına bağlı hipertrigliseridemi aterojenik değildir (Wood vd., 1998). Bazı çalışmalar HDL-kolesterol ve trigliseridlerin ayrı ayrı ele alınmaması gerektiği, yüksek trigliserid düzeyi ile düşük HDL kolesterol düzeyi kombinasyonunun birlikte koroner arter hastalığı riskini artırdığı sonucuna varmışlardır (Castelli, 1992). VLDL ile HDL kolesterol metabolik olarak yakından ilişkilidir ve trigliserid konsantrasyonu yüksek olduğunda HDL-kolesterol konsantrasyonu genellikle düşüktür (Wood vd., 1998). Hipertrigliseridemini koroner arter hastalığı riskini artırması; küçük ve yoğun LDL-kolesterol, postprandiyal lipemi, artmış şilomikron kalıntıları, artmış VLDL kalıntıları, azalmış HDL-kolesterol düzeyi, abdominal obezite, insülin direnci, trombosit agregasyonu ve tromboz oluşma yeteneğinde artışa bağlı görülmektedir (Genest ve Cohn, 1995).

2.5.2.1.3 HDL-Kolesterol Düşüklüğü: Ortalama kolesterol düzeyinin yüksek olduğu toplumlarda düşük HDL-kolesterol düzeyi iskemik kalp hastalığını (İKH) öngören güçlü bir ölçüttür. Ancak serum total ve LDL-kolesterol düzeylerinin düşük olduğu toplumlarda belirleyici olmayabilir. Bu açıdan düşük HDL-kolesterol düzeyi,

diğer majör risk faktörleri gibi (sigara, hipertansiyon ve diabet) koroner ateroskleroza ancak yüksek LDL-kolesterol düzeyleri söz konusu olduğunda uyarır (Grundy vd., 1990). Bu durum özellikle total ve LDL-kolesterol orta düzeyde yüksek olduğunda (190-250 mg/dl ve 115-175 mg/dl) geçerlidir. En küçük lipoprotein olan HDL-kolesterol damar duvarından kolesterolü uzaklaştırarak koruyucu etki yapmaktadır (Wood vd., 1998). HDL-kolesterol ile ateroskleroz arasında ters yönde sıkı bir ilişki mevcuttur. HDL kolesterolün her 1 mg/dl azaldığı durumda KAH olayları riskinin % 2 ile % 3 arasında arttığı bildirilmektedir (Gordon vd., 1989).

2.5.2.1.4 Lipoprotein(a) Yüksekliği: Yüksek plazma (Lp(a)) konsantrasyonları, iskemik kalp hastalığı riski yüksek olan bireyleri tanımlar. Ancak Lp(a) ile tıkaçıcı arter hastalığı arasında neden-sonuç ilişkisi olup olmadığı bilinmemektedir. Plazma Lp(a) düzeyi, KAH için anlamlı bir risk faktörü olarak görülmektedir. Lp(a) ön planda aterosklerotik plaklarda yerleşir (Scanu, 1998). Özellikle LDL-kolesterol seviyesi de yüksekse lipoprotein(a) risk faktörü olarak daha anlamlı hale gelmektedir (Fuster, 1994). Genç yaşta KAH saptanan hastaların % 10-20'sinde yüksek Lp(a) düzeyi saptanması Lp(a)'yı prematür koroner arter hastalıkları ile birlikte bulunan en olağan genetik geçişli lipoprotein bozukluğu durumuna getirmiştir (Genest, 1991).

2.5.2.1.5 Sigara: Sigara içen sağlıklı genç erişkinlerde endotel bağımlı vazodilatasyonda doza bağlı ve geriye dönebilen bir bozulma saptanmıştır (Celermajer vd., 1993). Koroner arter hastalığına bağlı ani ölümlerde, sigara içenlerde sigara içmeyenlerden daha sık koroner trombus saptanmıştır (Burke vd., 1998). Mevcut bilgiler, sigaranın doku faktör ekspresyonunu artırarak plağın trombojenitesini artırabileceğini düşündürmektedir (Moreno vd., 1998). Anjiyografik olarak sigara yavaş plak progresyonundan (ateroskleroz) çok koronerlerde hızla tıkanmayla (tromboz) ilişkilidir (Bottcher ve Falk,1990; Grines vd., 1995). Akut MI' da tromboliz sonrası sigara içenlerde, içmeyenlere oranla daha az rezidüel duvar hastalığı kalır (Grines vd., 1995). Sigara sistemik hipertrombotik durumla (trombin üretimi, aktive trombositler, yüksek fibrinojen) ilişkilidir (Roald vd., 1994). Sigara ile koroner tromboz arasındaki bağlantı altta yatan ateroskleroza göre daha güçlüdür ve sigaranın bırakılmasıyla akut MI riskinin hızla ve ciddi şekilde azalması, sorumlu sürecin gerilediğini gösterir (Bottcher ve Falk, 1999). Sigara içimine son verilmesi ile akut MI riskinde % 50-70 oranında azalma saptanmıştır (Manson vd., 1992).

2.5.2.1.6 Diabetes Mellitus: Diabetes Mellitusun (DM) her iki tipinde de koroner arter hastalığı riski yüksektir. Diyabet; KAH riskini orta yaşlı erkeklerde 2 kat, kadınlarda 3 kat artırmaktadır (Baret-Conner vd., 1991). İKH oluşumunda DM ve hiperkolesterolemi güçlü bir şekilde etkileşir (Grundy vd., 1990). Total kolesterolü 150 mg/dl'nin altında olan toplumlarda, DM olan bireylerde bile aterosklerotik olaylar seyrekdir (Roberts, 1995). Diyabetli erişkin hastaların % 75-80'inde ölüm sebebi KAH, serebrovasküler olaylar ve periferik damar hastalıklarıdır. İnsüline bağlı diabeti olan hastalarda Lp(a) yüksektir. İnsülin, damar duvarında düz kas proliferasyonunu uyararak ve arter duvarında kolesterol esterlerinin toplanmasını artırarak ateroskleroza katkıda bulunur (Güzel, 2008). DM, trombotik olayları artırarak ateroskleroza bağlı olay riskine katkıda bulunabilir. DM'de trombosit aktivitesi artar, plazma fibrinojen ve plazminojen aktivatör inhibitör-I düzeyleri yükselir (Falk ve Fuster, 2001). Endotel disfonksiyonu sıklıkla gözlenir ve DM'lu hastalarda koroner trombozdan, plak rüptüründen ziyade endotel erozyonu sorumlu gibi görünmektedir (Davies, 1997). Diyabetin; KAH risk faktörlerinin ortaya çıkmasını kolaylaştırırken, akut MI riskini bağımsız olarak artırdığı düşünülmektedir. Ancak diyabetli hastalarda kan glukoz düzeyinin sıkı kontrolünün koroner risk üzerine etkisi çözülememiştir (Manson vd., 1992).

2.5.2.1.7 Hipertansiyon: Sistemik arteriyel hipertansiyon, patogenetik olarak kolesterole bağımlı bir ateroskleroz hızlandırıcısı olmakla birlikte, İKH için bağımsız bir risk faktörüdür. Hipertansiyon ve hiperkolesterolemi koroner ateroskleroz oluşumunda güçlü bir şekilde etkileşir. Total kolesterol düzeylerinin 150 mg/dl'nin altında olduğu toplumlarda hipertansiyonu olan kişilerde bile aterosklerotik olaylar seyrekdir (Roberts, 1995). Hipertansiyonun ateroskleroza doğrudan kan basıncının artmasıyla hızlandığı genel olarak kabul edilen görüştür. Ama sistemik ve/veya bölgesel renin anjiyotensin sistemleriyle üretilen anjiyotensin II gibi eşlik eden hormonal değişikliklerin de rolü olabileceği ileri sürülmektedir (Ross, 1999). Hipertansiyonla KAH ve inme arasında doğrudan bir ilişki vardır. Diastolik kan basıncı arttıkça MI ve ölüm riski de artmaktadır. Örneğin; diastolik kan basıncı 76 mmHg'dan 105 mmHg'ya çıktığında KAH göreceli riski 5-6 kat artmaktadır. Hipertansiyon genelde diğer risk faktörleriyle birlikte etki gösterir (Güzel, 2008). Kan basıncının temel bileşenleri arasında kararlı bir bileşen (ortalama arter basıncı) ve pulsatil bir bileşen (nabız basıncı) yer almaktadır. Orta ve ileri yaşlarda büyük

arterlerin katılığı artığı için sistolik basınç yükselir ve diyastolik basınç düşer böylece nabız basıncı artar. Framingham çalışmasına göre İKH riskini öngörmede nabız basıncı sistolik ve diyastolik basınçtan daha üstündür. Yaşla birlikte arterlerin katılaşması yaşlılarda İKH riskinde önemli bir paya sahip olabilir (Franklin vd., 1999).

2.5.2.1.8 Obezite: Şişmanlığın özellikle kadınlarda olmakla birlikte her iki cinsiyette de koroner kalp hastalığı ile ilişkili olduğu görülmüştür (Hubert vd., 1983). Başlıca risk faktörlerinin tümü ile doğrudan ilişkisi olan şişman kişilerin ideal vücut ağırlığına sahip olanlara kıyasla % 35-45 oranında daha fazla AMI riski taşıdığı saptanmıştır (Manson vd., 1992) Obezitenin aterosklerotik ilerleyişe yardımı; hipertansiyon, bozulmuş glukoz toleransı, insülin rezistansı, hiperglisemi, LDL-kolesterol artışı ve HDL-kolesterol düşüklüğünü içerir. Abdominal obezitenin kalçada belirgin olan obeziteye göre KAH ile daha çok ilişkili olduğu bulunmuştur (Donahue vd., 1987).

2.5.2.1.9 Fiziksel İnaktivite: Fiziksel aktivite; HDL-kolesterol düzeyini artırır, insülin rezistansını düzeltir, vücut ağırlığını azaltır ve kan basıncını düzenler (Güzel, 2008). Düzenli olarak egzersiz yapan kişilerde ani ölüme daha az rastlandığı fakat hareketsiz kişilerde egzersiz programı başladığında ani kardiyak ölüm olasılığında bir artış olduğu belirtilmektedir. Aktif bir yaşam tarzı olanlarda akut MI riski sedanter yaşayanlara oranla %35-55 daha düşük olarak ölçülmüştür (Manson vd., 1992).

2.5.2.2. Değiştirilemeyen Majör Risk Faktörleri

2.5.2.2.1 Aile Öyküsü: Aile öyküsü olanlarda aterosklerozun çocukluk yaşlarında başladığı düşünülerek daha ciddi olarak ve erken yaşlarda araştırılması önerilmektedir. Aile öyküsü pozitif olanlarda; genetik yatkınlık, obezite, hipertansiyon, dislipidemi, DM gibi birkaç risk faktörü bir arada olabilir (Güzel, 2008)

2.5.2.2.2 Cinsiyet ve Yaş: KAH 'larının % 60'ı erkeklerde görülür. Erkeklerde KAH riski ve mortalitesinin kadınlara göre artmış olduğu gösterilmiştir (Vartiainen, 1994). MI'deki ölümlerin 4/5'inde yaş 65 ve üstüdür (Güzel, 2008).

2.6. Miyokard İnfarktüsü (MI)

MI uzamış iskemi sonucu meydana gelen geri dönüşümsüz kalp kası nekrozudur. Koroner arterler üzerindeki fiziksel stresler (her atımda miyokard kompresyonu ve çekilmesi gibi) ve oksijen talebindeki değişiklikler, miyokarda kan sunumunu belirler. Koroner arterler içindeki otopregülatuar mekanizmalar, aterosklerotik plaklar bulunsa bile miyokarda yeterli oksijen sunumunu genellikle devam ettirirler. Ancak bu koruyucu mekanizmalar bozulduğunda, uzamış iskemi veya MI gelişebilir (Ceylan, 2005).

Amerika'da her yıl 1,5 milyondan fazla insanın infarktüs geçirdiği belirlenmiştir. (Ufacık 2008). Geçen 30 yıl içerisinde, gerek insidans ve gerekse mortalitesinde belirgin düşüş sağlanmış olsa da günümüzde yine ana ölüm sebeplerinden biridir (bütün ölümlerin % 25'inden sorumludur). MI'den ölümlerin çoğu medikal tedaviye başlamadan önce gelişse de hastane içi mortalite oranı % 10-15'tir (Ceylan, 2005).

İKH'nın diğer klinik şekilleri gibi MI'nun şiddeti de, miyokardın O₂ talebi ile koroner kan sunumu arasındaki dengesizliğin derecesi ve süresi ile yakın ilişkilidir. İnfarktüsün uzun süreli sonuçları, büyük oranda nekroze olmuş miyokard yaygınlığına bağlıdır. Hastanın semptom ve bulguları uzamış iskemi sırasında gelişen fizyolojik, hücrel ve biyokimyasal değişiklikleri yansıtır (Ceylan, 2005).

MI'nın % 85'i aterosklerozla daralmış bir koroner arteri tıkayan akut bir trombüsle oluşur. Böyle bir trombüs; aterosklerotik plak, koroner damar endoteli, dolaşımdaki trombositler ve damar duvarının dinamik vazomototonusu arasındaki etkileşimlerle gelişir. Miyokard iskemisi ve infarktüsünü hazırlayan ateroskleroz dışı diğer mekanizmalar da bulunabilir (Ceylan, 2005).

Miyokard infarktüsünün sebepleri:

- Tıkayıcı trombüsle birlikte olan ateroskleroz
- Vaskülit sendromları
- Koroner emboli (suni kapak vb. sebeplerle)
- Konjenital koroner arter anomalileri

- Koroner arter travma veya anevrizması
- Ciddi koroner arter spazmı (primer veya nikotin yahut kokainle uyarılmış)
- Kan viskozite artışı
- Miyokard O₂ talebinde aşırı artma (aort darlığı gibi)

2.6.1.Epidemiyoloji

Akut MI Kuzey Amerika ve Avrupa'da ölümlerin önde gelen nedenidir. Amerika Birleşik Devletlerinde KAH'na bağlı yıllık ölüm 800.000 üzerindedir (Christofferson, 2010). ABD'de her yıl 1 milyondan fazla kişide akut MI görülmektedir. Ayrıca 300.000'den fazla kişinin hastaneye başvurmadan önce akut MI nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir. Her 25 saniyede bir Amerikalı akut MI geçirmekte ve yaklaşık her 36 saniyede bir kişi kardiyovasküler hastalık nedeniyle ölmektedir. Son 30 yıl içinde koroner bakım ünitelerinin (KBÜ) çoğalması, fibrinolitik tedavi ve kateterle reperfüzyonun gelişmesi nedeniyle sıklığı ve mortalite azalma gözlenmesine rağmen, akut MI'de hastaneye başvurmadan önce ölenler dahil tüm mortalite hızı % 30'dan fazladır. Primer peruktan koroner girişimlerin (PKG) mortaliteyi düşürücü etki göstermesine rağmen akut MI hastalarının büyük bir kısmı bu tedaviye uygun değildir. Hastaların çoğu akut MI için 24 saat doğrudan perkütan koroner girişim (PKG) uygulanabilecek hastanelere ulaşamamaktadır. Akut MI'nin insidans ve mortalitesinin yüksek olduğu ileri yaş nüfus oranının artması ve bu hastaların fibrinolitik tedaviye uygunluğunun azalması nedeniyle, ileriki yıllarda da yine ölümlerin en önde gelen nedeni olarak kalabileceği düşünülmektedir. Dahası, Batı tarzı diyet ve yaşam stiline global bir yönelmeden doğan obezite ve diyabet insidansındaki artış da gelecekte KAH bağlı gelişecek hasarları arttıracaktır (Christofferson, 2010).

2.6.2.Fizyopatoloji

Akut MI genellikle daha önceden ateroskleroz ile daralmış arterlerdeki koroner kan akımının kesintiye uğramasıyla oluşur (Libby, 2000). Yavaş koroner arter darlığı genellikle akut infarkta yol açmaz; çünkü bu durumda zaman içinde zengin kollateral dolaşım ağı gelişir. Ancak vasküler hasar bölgesinde koroner arter trombüsü aniden

oluşursa infarkt meydana gelir. Bu hasar sigara, hipertansiyon ve lipid birikimi ile kolaylaştırılır. Birçok vakada aterosklerotik plak çatladığında, rüptüre olduğunda ya da ülserleştiğinde ve lokal yada sistemik şartlar trombojenezi kolaylaştırdığında infarkt oluşur (Akbulut, 2006).

Aterosklerotik plağın rüptürü trombositlerin adezyon, agregasyon ve tromboksan A₂ (TXA₂), serotonin, adenosin difosfat (ADP), trombin, platelet aktive edici faktör, doku faktörü, serbest oksijen radikalleri, kollajen ve epinefrin gibi özel mediatörlerin salınımı ile sonuçlanır. Bu mediatörlerin birikimi trombosit agregasyonunu hızlandırır. TXA₂, serotonin, trombin ve platelet aktive edici faktör endotelial hasar çevresindeki vaso konstriktörlerdir. Serotonin, adenosin ve doku faktörünün mitojenik etkisi mevcuttur ve neointimal proliferasyonun gelişimine öncülük eder. Prostaglandin F₂ α (PGF₂ α), doku plazminojen aktivatörü ve endotel kaynaklı gevşetici faktör (nitrikoksit)'ün endotelial hasar bölgesindeki göreceli azlığında tromboz gelişimi, vaso konstriksiyon ve neointimal proliferasyon ile ilişkilidir (Akbulut, 2006).

Miyokardiyal hasarın miktarı etkilenen damarın beslediği duvarın büyüklüğüne, trombüsün erken spontan lizisini sağlayan doğal faktörlere, kollateral damarlarla getirilen kan miktarına ve kanlanması azalmış miyokardın oksijen ihtiyacına göre değişir. Artmış miyokard infarktüsü riski taşıyan hastalar kararsız ya da varyant anjinası olup, diğer koroner risk faktörlerini taşıyan hastalardır. Diğer nadir predispozan durumlar hiperkoagülabilite, kollajen vasküler hastalık, kokain bağımlılığı ve koroner emboli oluşturabilecek intrakardiyak trombüs ve kitlelerdir (Akbulut, 2006).

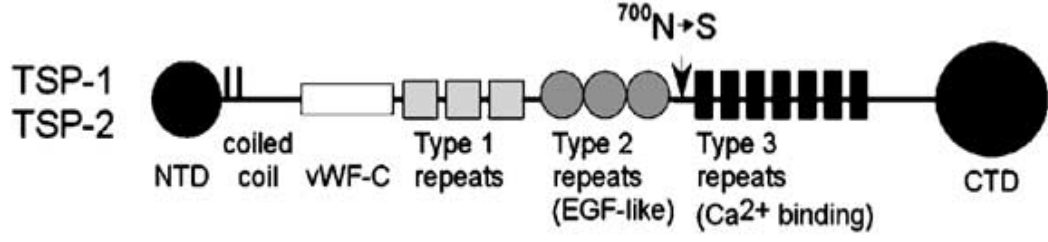
2.7. Trombospondinler

Trombospondinler, ekstrasellüler matrikste doğal olarak bulunan bir proteinlerdir. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini sağlayan adeziv proteinler olup, 5 altı tipi tanımlanmıştır. Her biri farklı bir genin ürünüdür ve miyokardiyal damar tıkanıklığı ile ilişkili üyeler (TSP1, TSP2 ve TSP4) farklı kromozomlar üzerinde bulunmaktadır (sırasıyla 15, 6 ve 5) (Olga vd., 2007).

TSP, anjiyogenik uyarıların değişik türlerine cevap olarak endotel hücrelerde hücre göçünü durdurma, apoptozu uyarma ve yeni damar oluşumunu önleme yeteneğine

sahip potansiyel bir anjiyogenez baskılayıcısı olup MI gelişiminde rol almaktadır (Schellings vd., 2009). MI'de birçok anjiogenetik inhibitörler rol almaktadır. Bu açıdan endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde oldukça düzenli bir şekilde yer alan anjiyogenez inhibitörü TSP gen ailesi önemli rol oynar. Bunlardan ilk tanımlanan TSP1 450 kDA, trimerik bir glikoproteindir (Goddard vd., 2002; Ioachim vd., 2006). İlk olarak trombositlerde keşfedilmiş olup sonradan endotelial hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, keratinositler, makrofajlar ve nötrofiller gibi çeşitli hücre tiplerinde de gösterilmiştir (İoachim vd., 2006). TSP1'in hem anjiyogenik hem de antianjiyogenik etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Bu multi fonksiyonel yapısı, makromolekül yapısı ve farklı hücre yüzey reseptörleri ile ilişkilendirilmiştir. Matriks proteinleri fibronektin, laminin ve kollojen içeren TSP1 ile etkileşir (Sargiannidou vd., 2004). TSP1, damar duvarı, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve fibroblastların 3 ana tipi tarafından eksprese edilir ve trombositlerde fazla miktarda bulunur (Lawler, 2000; Bornstein, 2001). TSP1, antianjiyogenik etkisini, endotelial hücre proliferasyonu ve göçünü inhibe ederek ve endotelial apoptozise neden olarak göstermektedir (Sargiannidou vd., 2004). TSP1 molekülünde 2 bölge, triptofandan zengin WSXW bölgesi ve CD36 bağlayan bölge antianjiyogenik aktiviteye sahiptir. Bu bölgelerden elde edilen sentetik peptidler, tümörde yeni damar oluşumunu inhibe etmekte kullanılmışlardır. Normalde CD36 ifade etmeyen endotel hücreleri, TSP1'in apoptotik aktivitesine duyarsızdırlar. Hücreler, CD36 ifade ettiklerinde TSP1'in apoptotik aktivitesine duyarlı hale gelmektedirler (Sargiannidou vd., 2004). Onkogen aktivasyonu ve tümör süpresör genlerdeki değişiklikler de direkt ve indirekt olarak TSP1 ifadesiyle ilişkilidir. TSP1'in, ekstrasellüler depolardan VEGF salınımının düzenlenmesinde etkili olması da önemli bir noktadır. TSP1'in yokluğunda VEGF'in ve reseptörü VEGFR'nin arttığı gösterilmiştir (Rodriguez-Manzaneque vd., 2001).

TSP2 daha önce aterogenez ile ilişkilendirilmemiş olmasına rağmen TSP1 ile yüksek derecede homologtur ve çok sayıda ortak fonksiyona sahiptir. Her iki protein de trimerdir ve benzer domain yapısına sahiptirler: her ikisi de Tip-1 tekrar bölgesine sahiptir ve bu bölge antianjiyogenik, MMP aktivitesini inhibe eden ve büyüme faktörlerinin bağlandığı bir bölgedir (Stenina vd, 2004) (Şekil 2.4).

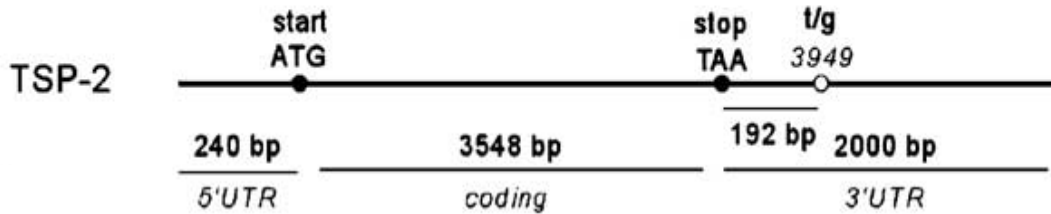


Şekil 2.4. TSP1 ve TSP2 ' nin domain yapısı.

Nitekim TSP2, TSP1' deki potansiyel anti-anjiogenik rol oynayan ve MMP aktivitesini inhibe eden TGF-1 bağlayıcı sekansa özdeş bir sekansa sahiptir. TSP2' nin Tip-2, Tip-3 tekrarları ve globuler C- terminal domaini içeren C-terminal kısmı gen ailesinin diğer üyeleri ile homologtur. Bu benzerlik TSP'lerin asıl fonksiyonunu göstermektedir. TSP1 ve TSP4 MI SNP'lerinin korunmuş bölgedeki lokalizasyonu TSP2 nin de içinde bulunduğu TSP üyelerinin vasküler hücre cevaplarında önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu yüzden TSP1 homolojisine bağlı olarak TSP2 vasküler hücreleri üzerinde benzer etki gösterir ve t3949g tek nükleotit polimorfizminden kaynaklanan ekspresyonundaki potansiyel değişiklik onun koruyucu etkisinden sorumlu olabilir.

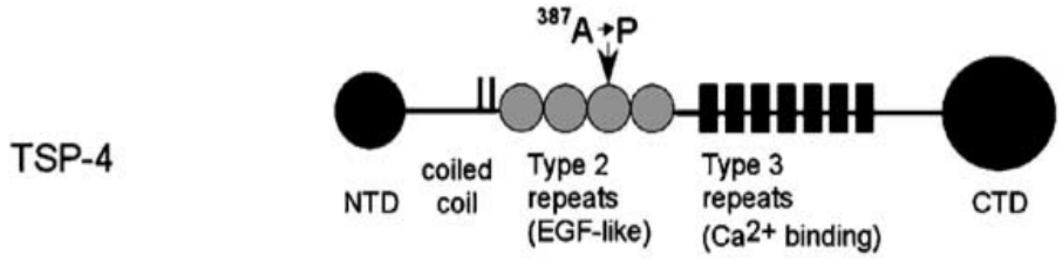
t3949g polimorfizmi TSP2 mRNA' nın protein ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde etkili yaygın bir bölge olan 3' UTR bölgesinde lokalizedir. TSP2 ekspresyonu yara iyileşme sürecinde belirleyicidir (Kyriakides vd., 1999) (Şekil 2.5.).

TSP2 3'UTR polimorfizmi protein ekspresyonu değişikliği için ve homolog bölgelerinin varlığına bağlı olarak TSP'lerin yaygın fonksiyonunun varsayımı için potansiyel taşımaktadır. 3'UTR bölgesindeki polimorfizmler, TSP2'nin ekspresyon seviyesini değiştirerek kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olabilmektedir.



Şekil 2.5. TSP2 deki t3949g polimorfizmi, mRNA' nın 3' UTR bölgesindedir ve translasyon stop kodonunun 192 nükleotid aşağısındadır.

TSP ailesinin bir üyesi olarak TSP4 ilk kez 1993 yılında *Xenopus* spp.'da ortaya çıkarılmıştır. mRNA s1 kurbağa, insan ve özellikle kalp ve çizgili kasta tespit edilmiştir. Tip-1 tekrarları dışında, Tip-3 ve C-terminal tekrar bölgelerinde diğer TSP genleri ile büyük bir homoloji göstermektedir (Şekil2.6.). İnsandaki TSP4 geni RGD sekansı içermektedir ve proteaz duyarlılığı üzerindeki Ca^{+2} etkisine bağlı olarak Ca^{+2} bağlayıcıdır. TSP4 proteini miyoblast adezyonunu, akson uzantısını ve kollajen ve kollajen olmayan matriks proteinleri ile interaksyonu destekler (Stenina vd, 2004).



Şekil 2.6.TSP4' ün domain yapısı.

BÖLÜM 3

LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Ailesel prematüre miyokardiyal infarktüs ile trombospondin gen ailesinde meydana gelen polimorfizmlerin ilişkili olduğunu bildiren Topol vd. (2001), miyokardiyal infarktüs, revaskülarizasyon ya da erkekte 45 ve bayanda 50 yaş öncesi olmak üzere önemli koroner arter lezyon oluşum hikayesi olan 398 aile üzerinde çalışma yapmışlardır. Toplamda 62 vasküler biyoloji geni ve 72 polimorfizmi değerlendirmişlerdir. TSP4 (A387P) polimorfizmi miyokardiyal infarktüs ile istatistiksel olarak en güçlü ilişkiyi veren gen olmuştur. Bunu TSP2 (3' UTR) ve TSP1 (N700S) polimorfizmleri takip etmiştir. Bu büyük ölçekli çalışma sonucunda ailesel prematüre miyokardiyal infarktüs ile trombospondin gen ailesinde meydana gelen polimorfizmler istatistiksel olarak büyük oranda ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

TSP1 (N700S), TSP2 (3' UTR T>G) ve TSP4 (A387P) genlerinde meydana gelen polimorfizmlerin erken koroner arter hastalığı ve erken MI riskini modüle edeceği düşüncesiyle (Boekholdt vd., 2002) 503 hasta üzerinde çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda erken koroner hastalığı ile TSP1 (N700S) polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığını, TSP4 (A387P) polimorfizmi için daha detaylı çalışmalar gerektiğini; ancak TSP2 (3' UTR T>G) polimorfizminin erken MI ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (Boekholdt vd., 2002).

Wessel vd. (2004), 474 MI hastası ve 472 MI riski taşımayan sağlıklı kişilerle yaptıkları olgu-kontrol çalışmasıyla TSP4 geni A387P polimorfizmi ile MI arasında önemli bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı zamanda yaş faktörünün önemli bir değişken olmadığını vurgulamışlardır.

Schroen vd. (2004), transgenik ratlar (Ren-2) ve aort darlığı olan hastalardan alınan biyopsi örnekleri üzerinde mikroarray teknolojisi kullanılarak 48 farklı genin ekspresyonuna bakılmışlardır. Hem ratlardan hem de insanlardan alınan örnekler üzerinde yapılan çalışmada diğer genlerden büyük farkla ifade edilen gen TSP2 geni

olmuştur. Yapılan çalışma sonuç olarak TSP2 geninin kardiyak matriksin bütünlüğünün sağlanmasında önemli bir regülatör olduğunu desteklemektedir. Ayrıca TSP2 ekspresyonu kalp yetmezliğine eğilimli hipertrofik kalplerde benzersiz bir şekilde aktive olan erken-evre moleküler programın göstergesidir.

Stenina vd.(2004), koroner arter hastalıkları ve trombospondin gen ailesinde meydana gelen SNP' ler arasındaki ilişkiyi GeneQuest analizini kullanarak incelemiştir. Ailesel ya da prematüre koroner arter hastalığı ve miyokardiyal infarktüsle en yüksek ilişkiye sahip polimorfizmin TSP1, TSP2 ve TSP4 genlerinde meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Zhou vd.(2004) tarafından Çin popülasyonunda yapılan çalışmada akut MI tanısı konmuş 406 hastada ve 400 sağlıklı bireyde TSP1 N700S polimorfizmi PCR-RFLP metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak Çin popülasyonunda MI ile TSP-1 N700S polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı rapor edilmiştir.

Newfoundland popülasyonunda 2006 yılında yapılan bir çalışmada MI ile TSP4 1186 G>C bölgesindeki homozigot CC genotipinin özellikle yaşlı kadınlarda zayıf bir risk faktörü olduğu ve cinsiyet bağımlı ilişkinin olduğu vurgulanmıştır (Cui vd. 2006).

Sporadik prostat kanserinde, TSP1 (N700S) ve MMP9 (-1562C/T) genlerinde meydana gelen polimorfizmlerin prostat kanseri karsinogenezinde ve agresifliğinde risk faktörü olup olmadığını incelemiştir. TSP1 GG ve MMP9 TT varyantları prostat kanseri için yüksek risk faktörü olarak rapor edilmiştir. Genetik risk faktörü olarak MMP9 T alelinin TSP1 varyantlarından daha fazla belirleyici olduğu vurgulanmıştır (Sfar vd., 2007).

Koch vd. (2008), Avrupalı ya da Avrupa kökenli Amerikanlardan oluşan 3657 MI tanısı konmuş hasta ve 1211 sağlıklı kişi ile yaptıkları çalışmada trombospondin gen polimorfizmlerinin MI ile ilişkisini meta-analiz ve olgu- kontrol çalışmalarıyla incelemiş ve TSP2 (rs8089)polimorfizmi ile MI arasında önemli derecede ilişki bulunmuşken TSP-1 (rs2228262) ve TSP-4 (rs1866389) polimorfizmleri ile MI arasında anlamlı ilişkiye rastlanmamıştır.

Kardiyak TSP4 ekspresyonunun MI ve basınç yükü ile ilişkisinin *in vivo* araştırıldığı çalışmada bilinçli normotansif ve hipertansif sıçanlar oluşturulmuş ve sol ön inen koroner arterin ligasyonu ile MI oluşturulmuştur. Sonuçta akut basınç yükünün ve MI'ın TSP4 gen ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiştir (Mustonen vd., 2008).

TSP1' in kardiyovasküler fizyolojide rol alıp almadığını tespit etmek için TSP1 ve onun reseptörü olan CD47 den yoksun farelerde vazoaktif stres cevaplarının test edildiği bir çalışmada vazoaktif stres oluşturmak için nitrik oksit (NO) kullanmışlardır. TSP1 ve CD47 yoksun farelerde periferal kan basıncı aşırı azalmış, kardiyak çıkışlar artmış ve NO' e yanıt olarak ejeksiyon fraksiyonu artmıştır. Sonuç olarak, TSP1 ve CD47 kan basıncının akut fizyolojik regülatör olarak görev yaptığı ve stres altında global hemodinamiği korumak için vazopressör aktivite sağladığı rapor edilmiştir (Isenberg vd., 2009).

Çeşitli koroner arter hastalıklarında TSP2 (3' UTR T>G) polimorfizminin sıklığının araştırıldığı çalışmada Burke vd. (2010), plak erozyondan ve plak rüptüründen kaynaklı akut tromboz ve akut tromboz dışındaki diğer koroner hastalıklardan aniden ölen ve kontrol grubu olarak herhangi bir koroner hastalığı olmadan ani ölüm gerçekleşen toplam 439 bireyden alınan doku örnekleriyle çalışmıştır. T>G TSP2 polimorfizminin sadece plak erozyonunda az olduğu ve diğer koroner arter hastalıklarla ve kontrol grubu arasında sıklık farkı olmadığı rapor edilmiştir.

Ashokkumar vd. (2011), Güney Hindistan halkı koroner arter hastalığı ve MI tanısı konmuş 511 hastada TSP1 ve TSP2 genlerinde meydana gelen tek nükleotit polimorfizmlerini araştırmıştır. Bu genlerde gözlenen polimorfizmlerle koroner arter hastalığı ya da MI arasında istatistiksel olarak önemli ilişki olmadığını; TSP1 ve TSP2 geninde meydana gelen polimorfizmlerin, bu hastalıklar için risk oluşturmadığı rapor edilmiştir.

HDL kolesterolü ve C-reaktif protein (CRP) seviyesi yüksek olan MI geçiren hastalarda TSP4 (A387P) polimorfizminin kardiyovasküler riskin habercisi olduğu (Corsetti vd., 2011) tarafından yapılan çalışmada rapor edilmiştir.

Matriks içeriğini ve hipertansiyon ya da yaşlanan kalpteki miyosit canlılığını düzenleyen TSP2 nin özellikle akut viral miyokarditis sırasında meydana gelen kardiyak inflamasyonu ve hasarını etkileyip etkilemediğini araştıran Papageorgiou

vd. (2012) TSP2 null farelerde insan Coxsackie virus B3 (CVB3) ile indüklenen miyokarditis oluşturmuşlardır. Yapılan çalışma sonucunda TSP2 nin kardiyak inflamasyona, hasara ve akut viral miyokarditisteki disfonksiyona karşı koruyucu bir rolü olduğu tespit edilmiştir.

BÖLÜM 4

MATERYAL-METOT

4.1. CİHAZLAR, KİMYASAL MADDELER ve SOLÜSYONLAR

4.1.1. DNA İzolasyon Aşaması

- Santrifüj (P Selecta Centronic-BL II, İspanya)
- Vorteks (Biometra, Almanya)
- Mikropipetler 1-10 µl,10-100 µl ve 100-1000 µl (Eppendorf, Almanya)
- Steril filtreli 10 µl, 100 µl ve 1000 µl'lik mikropipet uçları (Gilson, Amerika)
- 0,2 ml, 0,5 ml ve 1,5 ml'lik ependorf tüpler (Axygen, Kanada)
- Steril lateks eldiven (Helmed, Türkiye)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu (Uğur, Türkiye)

4.1.2. DNA Amplifikasyonu

- Thermal Cycler Gradient PCR (Takara, Japonya)
- Mikropipetler 1-10 µl,10-100 µl ve 100-1000 µl (Eppendorf, Almanya)
- Steril filtreli 10 µl, 100 µl ve 1000 µl'lik Mikropipet uçları (Gilson, Amerika)
- 0,2 ml, 0,5 ml ve 1,5 ml'lik ependorf tüpler (Axygen, Kanada)
- Vorteks (Biometra, Almanya)
- Otoklav (Nüve, Türkiye)

- 0,5 ml ve 1,5 ml'lik tüpler için standlar (Isolab, Almanya)
- Steril lateks eldiven (Helmed, Türkiye)
- Deiyonize su
- DNA Taq Polimeraz (Biolabs, İngiltere)
- dNTP karışımı (Fermentase, Amerika)

2mM stok dNTP için;

- 2 µl dATP
- 2 µl dGTP
- 2 µl dCTP
- 2 µl dTTP
- 92 µl dH₂O

Primerler;

TSP1 (N700S) bölgesi için;

(Forward) 5'-ACACTCTTCCAAATGGAGCCT-3'

(Reverse) 5'-CTCCCT TTGGGAGATTTAATC-3'

TSP2 (3'UTR T/G) bölgesi için;

(Forward) 5'-AACCCAAGTGCCTTCAGAGGAT-3'

(Reverse) 5'-CTCCACATAAAGTCTCATATATCAC-3'

TSP4 (A387P) bölgesi için;

(Forward) 5'-AATTCCGCATCTTCACTTCAC-3'

(Reverse) 5'-AACCGTTCTGCTTTGATAAC-3'

Primerler stok olarak 100 pmol/ μ l olacak şekilde seyreltilmiş ve 50 pmol/ μ l konsantrasyonunda hazırlanarak kullanılmıştır.

4.1.3. Enzim Kesimi

- Mikropipetler 1-10 μ l, 10-100 μ l ve 100-1000 μ l (Eppendorf, Almanya)
- Steril filtreli 10 μ l, 100 μ l ve 1000 μ l'lik mikropipet uçları (Gilson, Amerika)
- 0,2 ml, 0,5 ml ve 1,5 ml'lik ependorf tüpler (Axygen, Kanada)
- Etüv (Mettler, Almanya)
- Kesim enzimleri: AluI, AvaII, BseNI (Fermentas, Amerika)

4.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi

- Yatay Elektroforez (Cleaver, İngiltere)
- Güç Kaynağı (Cleaver, İngiltere)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik, Türkiye)
- Erlen Mayer (250ml) (Isolab, Almanya)
- Mezürler (100ml, 250ml) (Isolab, Almanya)
- 10X Tris Borat Tamponu (TBE) :
 - Trizma base-108 gr (Sigma, Almanya)
 - Borik asit-55 gr (Merck, Amerika)
 - Disodium- EDTA-9,37 gr (Amresco, Amerika)

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. pH: 8,3 olacak şekilde ayarlanıp, otoklavlanır. Agaroz jel elektroforezi için deiyonize su ile seyreltilerek 1XTBE olarak kullanılır.

1X Tris Borat Tamponu (TBE):

- 100 ml 10XTBE
- 900 ml dH₂O
- 6X Yükleme Tamponu (Fermentas, Amerika)
- Agaroz (Vivantis, Amerika)
- Etidyum Bromür (10 mg/ml) (Sigma, Almanya): Etidyum bromür 1 gr

Deiyonize su 100 ml

- DNA markır: 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Amerika)
- Görüntüleme Cihazı (Translüminatör) (BioRad, Almanya)

4.2. Metot

4.2.1.Kan Örneklerinin Eldesi

Çalışmaya Aralık 2010-Aralık 2012 tarihleri arasında Gaziantep bölgesinde MI geçirmiş 150 hasta ve 150 sağlıklı birey olmak üzere toplam 300 birey dahil edilmiştir. Bireylerden yaş, cinsiyet, diyabet, hipertansiyon, vücut kütle indeksi (VKİ), teşhis yaşı, anjiyo, bypass, perkütan koroner girişim gibi demografik bilgiler toplanmıştır. Bireylerden toplanan periferik kan örnekleri steril EDTA'lı tüpler içerisine alınmıştır. Toplanan kanlar DNA izolasyon aşamasına kadar -20°C' de saklanmıştır. Çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik araştırmalar Etik Kurulu'nun 14.02.2012 tarih ve 14.02.2012/36 nolu onayı alınarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. DNA İzolasyonu

Toplanan kan örneklerinden DNA izolasyonu tuz çöktürme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Sambrook ve Russell, 2001).

DNA İzolasyonunda Kullanılan solüsyonlar;

Amonyum Asetat:

148 gr amonyum asetat distile su ile çözülerek 200 ml'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Çekirdek Lizis Tamponu (pH: 8.2):

- 10 mM Tris-HCL 1,576 gr
- 400 mM NaCl 23,4 gr
- 2 mM Na₂EDTA 0,7 gr

Distile su ile çözülerek 1 L'ye tamamlandı. Çözelti pH'sı, NaOH ile 8,2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Çözelti otoklavlanarak buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilmiştir.

SDS %10:

SDS'den 10 gr alınıp distile su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Membran filtre ile sterilizasyon yapılarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

TE Tampon Çözeltisi (pH: 7.5):

- 1 Mm Tris-HCl 0,394 gr
- 1 Mm Na₂EDTA 0,093 gr

Distile su ile çözülerek 250 ml'ye tamamlanmış ve otoklavlanarak buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilmiştir.

- Proteinaz K (Fermentas, Amerika)

DNA İzolasyon Aşaması:

- 5 cc kan 50 ml'lik tüplere alınarak üzerine 20 ml soğuk steril distile su eklenmiş ve eritrositleri patlatmak amacıyla tüpler 1-2 dk aşağı yukarı çırpılmıştır.

- Tüpler 2000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine hacim 10 ml’ye tamamlanacak şekilde soğuk steril distile su eklenip, pellet çözülene kadar tüpler çırpılmıştır.
- Tüpler, 2000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine 1,5 ml Çekirdek lizis tamponu, 100 µl Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve 75 µl Proteinaz K eklendi ve karışım vorteks ile homojenize edilmiştir.
- Tüpler 37 °C’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 16 saatlik inkübasyondan sonra tüplerin içerisine 1 ml amonyum asetat eklenip 1 dk sallanmıştır ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir.
- Tüpler, 3500 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant toplanarak başka bir tüpe aktarılmış ve üzerine toplam örnek hacminin iki katı kadar etanol eklenmiştir.
- Tüpler yavaşça döndürülerek DNA’nın toparlanması sağlanmıştır.
- DNA 250 µl TE (Tris-EDTA) tamponunda çözdürüldükten sonra kullanılacağı zamana kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

4.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu çalışmada DNA analizi için kullanılan PCR tekniği, çalışılan DNA dizisinin in vitro şartlarda çoğaltılmasına dayanmaktadır. Günümüzde moleküler biyolojik çalışmalarda geniş kullanım alanına sahip bir tekniktir. PCR tekniğinin prensibi tekrarlanan üç basamağa bağlıdır;

1. Denatürasyon
2. Primerlerin bağlanması
3. Uzama basamaklarından oluşur.

Trombospondin gen bölgelerinin çoğaltılması işlemi PCR tekniği ile gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.1. Primer Tasarımı

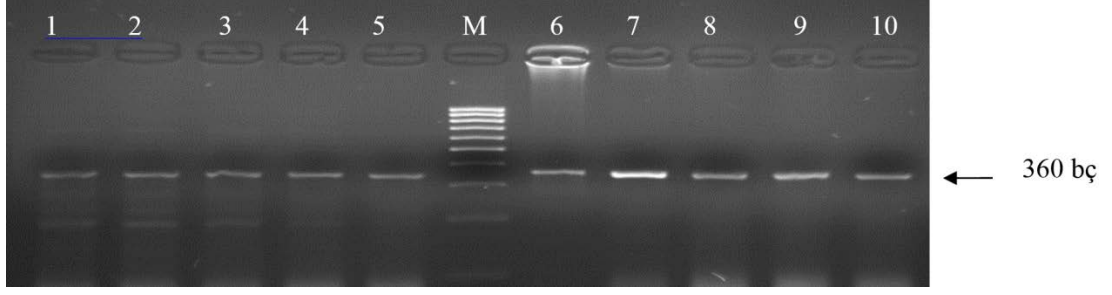
MI geçirmiş hastalarda ve sağlıklı grupta trombospondin gen ailesinden TSP1 (N700S), TSP2 (3'UTR T/G) ve TSP4 (A387P) gen bölgelerine ait primerler NCBI veri tabanından (www.ncbi.nlm.nih.gov.tr) elde edilmiştir. Ticari firmaya sentezletilen bu primerlerin ileri ve geri dizilimleri, ürün büyüklüğü ve bu bölgeler ait kesim enzimleri Tablo 1.3'te verilmiştir.

Tablo 4.1. Primerlerin ileri ve geri dizilimleri, ürün büyüklüğü ve bu bölgelere ait kesim enzimleri

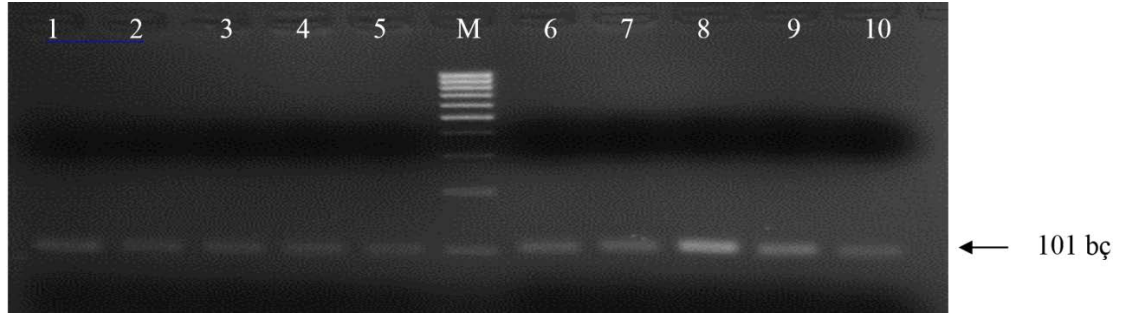
Primer Adı		Primer Baz Dizisi	Kesim Enzimi	Ürün Büyüklüğü
TSP1 (N700S) rs2228262	Sense	5'-AAG AAC GCC AAG TGC AAC TAC-3'	BseNI	360 bç
	Antisense	5'-AGA GCT AGC CCT GTT CAT GTT-3'		
TSP2 (3'UTR T/G) rs8089	Sense	5'-AACCCAAGTGCCTTCAGAGGAT -3'	AluI	101 bç
	Antisense	5'-CTCCACATAAAGTCTCATATATCAC-3'		
TSP4 (A387P) rs1866389	Sense	5'-AATTCCGCATCTTCACTTCAC -3'	AvaII	221 bç
	Antisense	5'-AACCGGTTCTGCTTTGATAAC -3'		

4.2.3.2. PCR koşullarının optimizasyonu

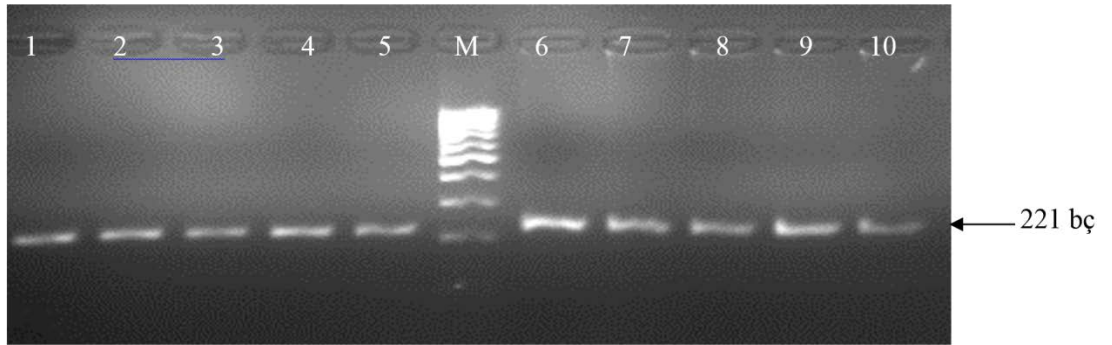
PCR tepkimesinde kullanılan primer çiftlerinin en verimli çalışabilecekleri bağlanma sıcaklıklarının tespit edilmesi ve çalışma koşullarının sağlanması amacı ile 300 örnek içerisinde 1 örnek DNA seçilmiş ve 3 çift primer takımı için iyileştirme ve gradiyent PCR yapılmıştır ve 3 ayrı bölge için bu işlem uygulanmıştır. Gradyentli PCR cihazında üç bölgeye ait primerlerin bağlanma sıcaklıkları çalışılıp, optimize edilmiştir (Resim 4.1., 4.2. ve 4.3.).



Resim 4.1.TSP1 (N700S) Bölgesi Gradyent PCR Jel Görüntüsü. (7 numaralı kuyucuktaki ürünün bağlanma sıcaklığı (64.5°C) bu bölge için standart alınmıştır.)



Resim 4.2.TSP2 (3'UTR T/G) Bölgesi Gradyent PCR Jel Görüntüsü. (8 numaralı kuyucuktaki ürünün bağlanma sıcaklığı (60°C) bu bölge için standart alınmıştır.)



Resim 4.3.TSP4 (A387P) Bölgesi Gradyent PCR Jel Görüntüsü. (6 numaralı kuyucuktaki ürünün bağlanma sıcaklığı (59°C) bu bölge için standart alınmıştır.)

Bu bölgeler ait son optimizasyon PCR karışımlarının miktarları ve primerlerin bağlanma sıcaklıkları Tablo 4.2.de verilmiştir.

Tablo 4.2. TSP1 (N700S), TSP2(3'UTR T/G) ve TSP4 (A387P) Bölgelerinin PCR Reaktifleri

Kimyasallar	Konsantrasyon
ddH ₂ O	-
10X Tampon	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1-4 mM
dNTP Karışımı (2 mM)	0.2 mM (herbiri için)
İleri Primer	0.1-1 µM
Geri Primer	0.1-1 µM
Taq Polimeraz (0,5 U)	1,25 u/50µl
DNA	10pg-1 µg/50 µl

Tablo 4.3.TSP1 (N700S), TSP2 (3'UTR), TSP4 (A387P) Bölgelerinin primer bağlanma sıcaklıkları ve döngü Sayısı

Bölge	Primer Bağlanma (Annealing) Sıcaklığı	Süre	Döngü Sayısı
TSP1(N700S)	64.5 °C	45 sn	32
TSP2(3'UTR T/G)	60°C	30 sn	35
TSP4(A387P)	59°C	30 sn	32

150 hasta 150 de sağlıklı olmak üzere 300 örnek için toplam 900 PCR reaksiyonu yapılmıştır. PCR sonunda elde edilen amplifikasyon ürünlerinin kontrol edilmesi için %2'lik agaroz jel hazırlanıp 120 voltta 30 dk yürütülerek UV ışık altında görüntülenmiştir.

4.2.4. Agoroz Jel Elektroforezi

2 gr agaroz hassas terazide tartılıp bir erlen içerisine alınmış ve üzerine 100 ml 1XTBE tampon solüsyonu ilave edilmiştir. Agorozun tampon solüsyonu içerisinde tam olarak çözünebilmesi için mikrodalga fırında 360 Watt'ta 6 dk kaynatılmıştır. Fırından alınan solüsyon içerisine 25 µl EtBr ilave edilip hava kabarcığı kalmayacak şekilde jel tankına dökülmüştür. Tarak yerleştirildikten sonra jel 40 dk donmaya

bırakılmıştır. Jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirilip üzerini örtecek şekilde 1XTBE tampon solüsyonu ilave edilmiştir. Her bir kuyucuğa üzerine 6X yükleme tamponu eklenen PCR ürünleri, orta kuyucuğa da 100 bç'lik DNA belirleyici ayrı ayrı yüklenmiştir. Örnekler 120 V'ta 30 dk yürütülmüştür. Bu işlemden sonra bantların UV ışık altında gözlenmesi sağlanmıştır.

Üç ayrı bölgeye ait PCR ürünlerinin amplifikasyon sonrası kontrolünün yapılması için % 2' lik agaroz jel elektroforezinden yararlanılmıştır.

4.2.5.RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) ile Trombospondin Genine ait TSP1, TSP2, TSP4 Polimorfizmlerinin Analizi

PCR amplifikasyonu yapılan ve agaroz jelde görüntülenen örneklerden net bant görülemeyenler için tekrar PCR yapılmıştır. Bant gözlenebilen örnekler kesim reaksiyonuna tabi tutulmuştur, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek jel üzerindeki bantlara göre değerlendirme yapıp, her bir bölge için bant gözlenemeyen örnekler çalışma dışı bırakılmıştır.

PCR ile çoğaltılan TSP1, TSP2, TSP4 gen bölgeleri özgül restriksiyon endonükleaz (RE) enzimlerle üretici firmanın önerdiği koşullarda kesilmiş ve etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Kesim enzimlerinin inkübasyon koşulları ve karışım miktarları Tablo 4.4, 4.5 ve 4.6' da verilmiştir.

Kesim sonucu oluşan DNA fragmanları agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş, etidyum bromür ile boyanmış ve UV ışık altında görüntülenerek büyüklüklerine göre yorumlanmıştır.

Tablo 4.4. TSP1 (N700S) için Kesim Karışım Protokolü

Kimyasallar	Miktar(µl)	İnkübasyon Koşulları
ddH ₂ O	9	65 °C'de 16 saat
10XBuffer B	1	
BseNI	0,5	
PCR ürünü	5	
Toplam	15,5	

Tablo 4.5. TSP2 (3' UTR T/G) için Kesim Karışım Protokolü

Kimyasallar	Miktar(μl)	İnkübasyon Koşulları
ddH ₂ O	9	37 °C'de 16 saat
Buffer Tango	1	
AluI	0.5	
PCR ürünü	5	
Toplam	15,5	

Tablo 4.6. TSP4 (A387P) için Kesim Karışım Protokolü

Kimyasallar	Miktar(μl)	İnkübasyon Koşulları
ddH ₂ O	4	37 °C'de 16 saat
10XBuffer R	1	
AvaII	0.5	
PCR ürünü	10	
Toplam	15,5	

4.2.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad InStat (version 3.05) program kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar standart sapma yada yüzde olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmış olup, genotip ve allellerinin görülme sıklığının, gruplar arası farklılıklarla beraber değerlendirilmesi için Ki kare (χ^2) testi ve Fisher's exact test kullanılmıştır. Gruplar arası farklar ve anlamlılık sınırları the unpaired Student's t test kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM 5

BULGULAR

MI geçiren hastalarda trombospondin gen ailesinden TSP1, TSP2 ve TSP4 genlerinde meydana gelen polimorfizm sıklığının incelendiği bu çalışmada; 150 bireyi kapsayan hasta grubu ve yine 150 bireyi kapsayan kontrol grubu olmak üzere 2 grup oluşturulmuştur. Ancak DNA izolasyonunu takiben elde edilemeyen ve dolayısıyla PCR-RFLP çalışması yapılamayan DNA'ların elenmesi neticesinde hasta grubundan 136, kontrol grubundan ise 119 örnekle çalışmaya devam edilmiştir. Deney grubunu oluşturan akut MI geçirmiş hastalar ve kontrol grubu hastalarından toplanan demografik bilgiler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Tablo 5.1., 5.2.).

Tablo 5.1 Demografik Özellikler

	Kontrol Grubu (n =119)	Hasta Grubu (n=136)	p Değeri
Yaş	48,13 ±13,13	64,70±13,24	<0.0001
Boy	165,88±6,744	166,16±7,622	0,758
Kilo	74.076±13.59	73,934±14,56	0,936
Cinsiyet n (E/K, %)	47/72 (39,5/60,5)	83/53 (61,0/39,0)	0,0009

Ayrıca hasta grubuna ait klinik bilgilerin ise yüzde değerleri bulunarak Tablo 4.2' de verilmiştir.

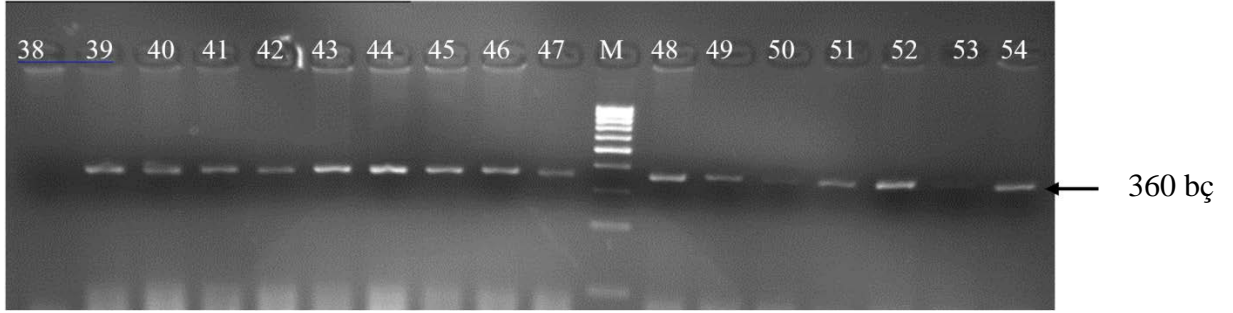
Tablo 5.2 Hasta Grubu Klinik Bilgilerinin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması

	Hasta Grubu (n=136)
Sigara n (%)	63 (46,3)
Diyabetes Mellitus n (%)	49 (36,0)
İnsülün n (%)	21 (15,3)
Hiper Tansiyon n (%)	76 (55,9)
Anjio n (%)	61 (44,7)
Bypass n (%)	23 (16,9)
Anjioplasti n (%)	40 (29,4)
Romatizmal Kapak n (%)	20 (14,7)
EF (<50%)n (%)	64 (47,1)

5.1. TSP1 Geni N700S Bölgesi İçin Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları

5.1.1. TSP1 (N700S) Bölgesi PCR Ürünü İle İlgili Bulgular

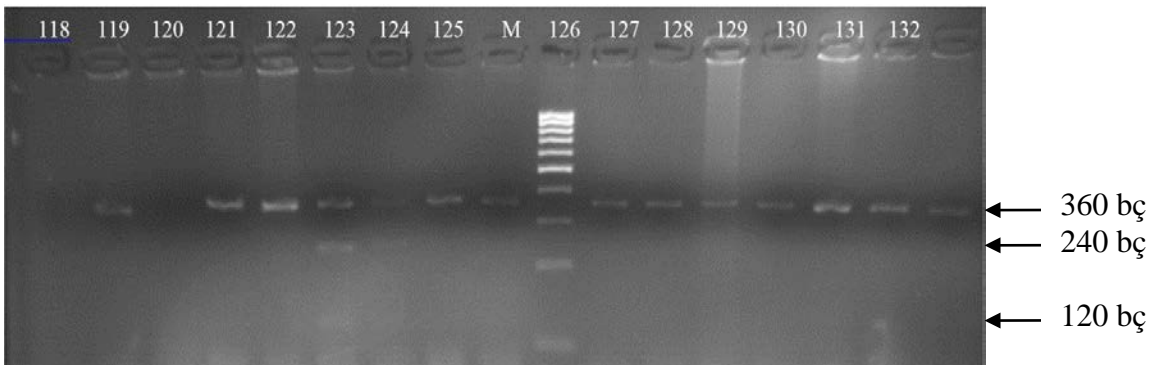
Bu bölgeye ait PCR ürünleri % 2' lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve 360 bç uzunluğundaki bant UV ışık altında görüntülenmiştir. 11. Kuyucuğa 100 bç lik DNA belirleyici yüklenmiştir. (Resim 5.1.)



Resim 5.1.TSP1 N700S Gen Bölgesi PCR Sonuçlarının Kontrol Edildiği Agaroz Jel Fotoğrafı.

5.1.2. TSP1 (N700S) Bölgesi PCR Ürünlerinin BseNI Enzimi İle Kesim Sonuçları

PCR tepkimesi sonrası 360 bç'lik PCR ürünü veren N700S bölgesi BseNI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede adenin (A) içeren allel kesim noktası taşımaktadır. Homozigot A alleli taşıyan bireylerde (AA) enzim bir noktadan kesim yaparak 360 bç olan DNA parçasını 240 bç ve 120 bç olarak 2 parçaya ayırır. Adeninden → Guanine (A→G) bir nükleotit değişimi olması halinde 360, 240 ve 120 bç uzunluğunda 3 bant oluşur. Homozigot G alleli taşıyan bireylerde enzimin tanıdığı bölge ortadan kalkmaktadır. Bu bireylerde (GG) 360 bç'lik tek bant gözlenmektedir (Resim 5.2.)



Resim 5.2.TSP1 Geninin N700S Bölgesi Polimorfizminin BseNI Enzimi İle Kesimi Sonucu Oluşan Bantlar.

N700S polimorfizmi incelendiğinde hasta grubunda 114 bireyde AA genotipi (%98.3), 2 bireyde AG genotipi (%1.7), 0 bireyde GG genotipi (%0) saptanırken kontrol grubunda 100 bireyde AA genotipi (%97.1), 3 bireyde AG genotipi (%2.9) saptanmış ve GG genotipine 0 (%0) sahip birey saptanmamıştır. Hasta grubunda A alleli görülme sıklığı %99.1 iken G alleli görülme sıklığı %0.9 olarak bulunmuş; kontrol grubunda ise A alleli görülme sıklığı %98.5 ve G alleli görülme sıklığı %1.5 olarak saptanmıştır (Tablo 5.3)

Tablo 5.3 Trombospondin geni TSP1(N700S) polimorfizminin genotip ve allel dağılımı

Genotipler/ Alleller	Kontrol (n=103) (%)	MI n (n=116) n (%)	p	OR (95% CI)
A/A	100 (97,1)	114 (98,3)		
A/G	3 (2,9)	2 (1,7)	0,6679	0,585 (0,096-3,572)
G/G	0 (0,0)	0 (0,0)		
A	203 (98,5)	230 (99,1)		
G	3 (1,5)	2 (0,9)	0,6696	0,588 (0,097-3,558)

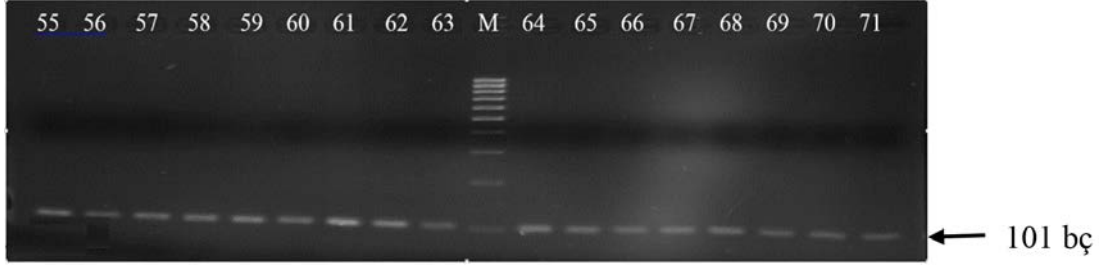
OR: Odds oranı, CI: güvenlik aralığı

TSP1(N700S) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında; Hasta ve kontrol grupları arasındaki fark hem genotip hem de allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

5.2. TSP2 Geni 3' UTR T/G Bölgesi İçin Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları

5.2.1.TSP2 (3' UTR T/G) Bölgesi PCR Ürünü İle İlgili Bulgular

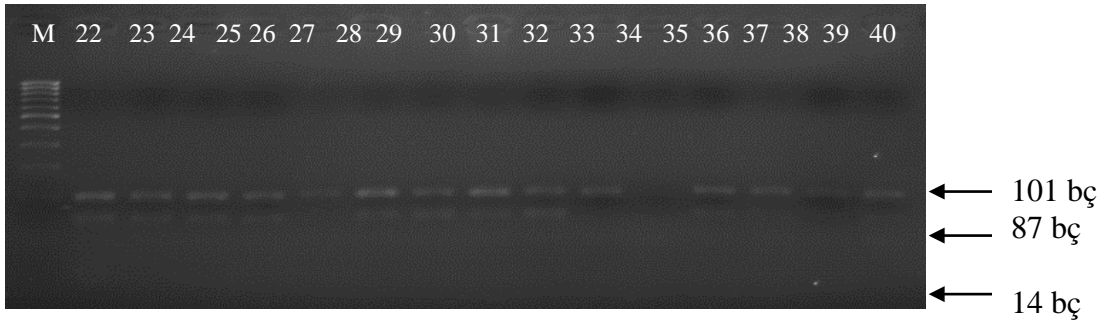
Bu bölgeye ait PCR ürünleri % 2' lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve 101 bç uzunluğundaki bant UV ışık altında görüntülenmiştir. Kuyucuğa 100 bç lik DNA belirleyici yüklenmiştir. (Resim 4.3.).



Resim 5.3.TSP2 3'UTR T/G Gen Bölgesi PCR Sonuçlarının Kontrol Edildiği Agaroz Jel Fotoğrafi.

5.2.2.TSP2 (3' UTR T/G) Bölgesi PCR Ürünlerinin AluI Enzimi İle Kesim Sonuçları

PCR tepkimesi sonrası 101 bç'lik PCR ürünü veren 3'UTR T/G bölgesi AluI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede timin (T) içeren allel kesim noktası taşımaktadır. Homozigot T alleli taşıyan bireylerde (TT) enzim bir noktadan kesim yaparak 101 bç olan DNA parçasını 87 bç ve 14 bç olarak 2 parçaya ayırır. Timinden→Guanine (T→G) bir nükleotit değişimi olması halinde 101, 87 ve 14 bç uzunluğunda 3 bant oluşur. Homozigot G alleli taşıyan bireylerde enzimin tanıdığı bölge ortadan kalkmaktadır. Bu bireylerde (GG) 101 bç'lik tek bant gözlenmektedir (Resim 5.4.)



Resim 5.4.TSP2 Geninin 3' UTR T/G Bölgesi Polimorfizminin AluI Enzimi İle Kesimi Sonucu Oluşan Bantlar.

3'UTR T/G polimorfizmi incelendiğinde hasta grubunda 133 bireyde GG genotipi (%98,5), 0 bireyde GT genotipi (%1,5), 0 bireyde TT genotipi (%0) saptanırken kontrol grubunda; 54 bireyde GG genotipi (%46.6), 62 bireyde GT genotipi (%53,4) saptanmış ve 0 bireyde TT genotipi (%0) saptanmıştır. Hasta grubunda G alleli görülme sıklığı % 99,3 iken T alleli görülme sıklığı % 0,7 olarak bulunmuş, kontrol

grubunda ise G alleli görülme sıklığı % 73.3 ve T alleli görülme sıklığı % 26.7 olarak saptanmıştır (Tablo 5.4).

Tablo 5.4 Trombospondin geni TSP2 (3'UTR T/G) polimorfizminin genotip ve allel dağılımı

Genotipler/ Alleller	Kontrol (n=116) (%)	MI n (n=135) n (%)	P	OR (95% CI)
G/G	54 (46,6)	133 (98,5)		
G/T	62 (53,4)	2 (1,5)	<0,0001	0,0131 (0,0031-0,0555)
T/T	0 (0,0)	0 (0,0)		
G	170 (73,3)	268 (99,3)		
T	62 (26,7)	2 (0,7)	<0,0001	0,0205 (0,0049-0,0848)

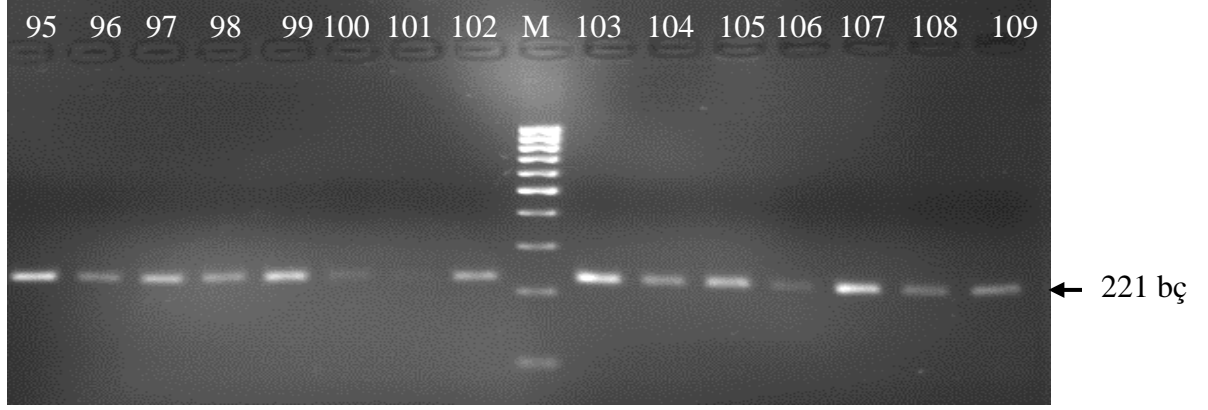
OR: Odds oranı, CI: güvenlik aralığı

TSP2 (3'UTR T/G) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında; Hasta ve kontrol grupları arasındaki fark hem genotip hem de allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

5.3. TSP4 Geni A387P Bölgesi İçin Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları

5.3.1. TSP4 A387P Bölgesi PCR Ürünü İle İlgili Bulgular

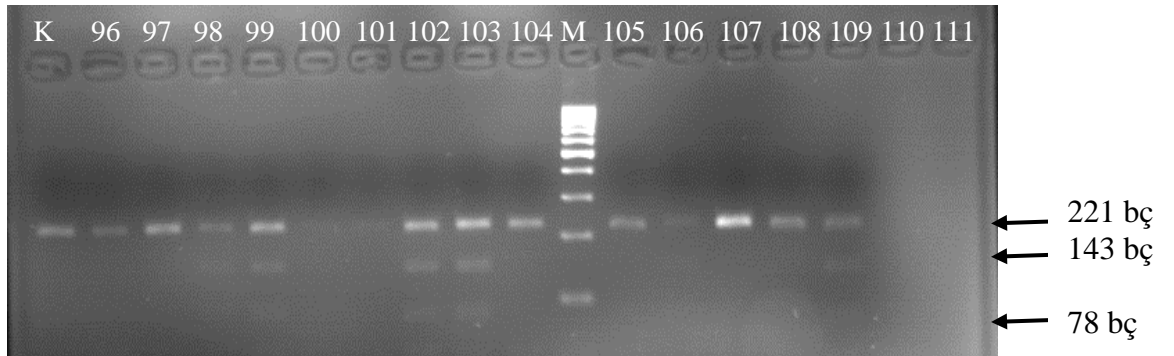
Bu bölgeye ait PCR ürünleri % 2' lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve 221 bç uzunluğundaki bant UV ışık altında görüntülenmiştir. 9. kuyucuğa 100 bç lik DNA belirleyici yüklenmiştir (Resim 5.5.).



Resim 5.5.TSP4 A387P Gen Bölgesi PCR Sonuçlarının Kontrol Edildiği Agaroz Jel Fotoğrafı.

5.3.2. TSP4 (A387P) Bölgesi PCR Ürünlerinin AvaII Enzimi İle Kesim Sonuçları

PCR tepkimesi sonrası 221 bç'lik PCR ürünü veren A387P bölgesi AvaII restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede sitozin (G) içeren allel kesim noktası taşımaktadır. Homozigot G alleli taşıyan bireylerde (GG) enzim bir noktadan kesim yaparak 221 bç olan DNA parçasını 143 bç ve 78 bç olarak 2 parçaya ayırır. Guaninden→Sitozine (G→C) bir nükleotit değişimi olması halinde 221, 143 ve 78 bç uzunluğunda 3 bant oluşur. Homozigot C alleli taşıyan bireylerde enzimin tanıdığı bölge ortadan kalkmaktadır. Bu bireylerde (CC) 221 bç'lik tek bant gözlenmektedir (Resim 5.6.).



Resim 5.6.TSP4 Geninin A387P Bölgesi Polimorfizminin AvaII Enzimi İle Kesimi Sonucu Oluşan Bantlar.

A387P polimorfizmi incelendiğinde hasta grubunda 92 bireyde GG genotipi (%67,6), 44 bireyde GC genotipi (%32,4), 0 bireyde CC genotipi (% 0) saptanırken, kontrol

grubunda, 88 bireyde GG genotipi (%73,9) 26 bireyde GC genotipi (%21,9) 5 bireyde CC genotipi (% 4,2) saptanmıştır. Hasta grubunda G alleli görülme sıklığı %83,8 iken C alleli görülme sıklığı %16,2 olarak bulunmuş, Kontrol grubunda ise G alleli görülme sıklığı %84,9 ve C alleli görülme sıklığı %15,1 olarak saptanmıştır. (Tablo 5.5).

Tablo 5.5 Trombospondin Geni TSP4 (A387P) Polimorfizminin Genotip ve Allel Dağılımı

Genotipler/ Alleller	Kontrol (n=119) (%)	MI n (n=136) n (%)	p	OR (95% CI)
G/G	88 (73,9)	92 (67,6)		
G/C	26 (21,9)	44 (32,4)	0,1253	1,619 (0,919-2,852)
C/C	5 (4,2)	0 (0,0)	0,0591	0,087 (0,005-1,597)
G	202 (84,9)	228 (83,8)		
C	36 (15,1)	44 (16,2)	0,8388	1,083 (0,670-1,749)

OR: Odds oranı, CI: güvenlik aralığı

TSP4 (A387P) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında; hasta ve kontrol grupları arasındaki fark hem genotip hem de allel sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

BÖLÜM 6

TARTIŞMA VE SONUÇ

MI' ın etiyojisi oldukça komplekstir ve bu etiyojide çevresel faktörlerle genetik faktörlerin karşılıklı olarak etkileşimine inanılır. Sigara ve diyet gibi yüksek kolesterol ve obeziteye neden olabilen çevresel faktörler kişilerin bu hastalığı neden kazandığı sorusunu kısmen yanıtlayabilirken genetik faktörlerin bu olgulara daha kesin yanıt olabileceği ortadadır.

KAH ve MI' a yatkınlık bakımından pozitif aile öyküsüne sahip olmanın hastalık riskini 12 kat arttırdığı bildirilmektedir (NCEP, 2002). Yüksek riskli ailelerde KAH ile ilişkili genlerin belirlenmesi için genetik çalışmalar yapılmış ve bugüne kadar dört genom taraması sonucunda 3 farklı kromozomun 5 farklı lokusunun ilişkili olduğu bulunmuştur (Pajukanta vd., 2000; Franche vd., 2001; Broeckel vd., 2002; Harrap vd., 2002).

Son zamanlarda MI' ın genetik temelini maskesini düşürmek için yapılan çalışmalar arasında alternatif bir yaklaşım da çalışmamıza benzer olarak aday bir gen üzerine vaka-kontrol ilişkili çalışmalardır.

TSP' ler ekstrasellüler matrikste doğal olarak bulunan ve 5 üyeye (TSP1, TSP2, TSP3, TSP4 ve TSP5) temsil edilen bir protein ailesidir. Vasküler sistemde çok farklı işlevlere sahip olan bu protein ailesinin kardiyovasküler patoloji ile ilgisi hala net değildir. Aterosklerotik KAH ve bunu patolojik sonucu olan MI gelişmiş ülkelerde ölüm nedenlerinin başında gelmesi ve ciddi bir sosyo-ekonomik kayıp olmaya başladığından beri MI patogeneğinde TSP' lerin rolünün anlaşılması için detaylı

araştırmalar açıkça bir görev haline gelmiştir ve bu araştırma görevini üstlenen bilim insanları tarafından çok çelişkili bulguların elde edilmesiyle sonuçlanmıştır (Wessel vd., 2004; Yamada vd., 2002; Ashokkumar vd. 2011;).

SNP ler insan genomundaki yaklaşık her 1200 bç nde bir meydana gelen sekans varyanslarının en yaygın şeklidir (Zheng vd., 2005). Bunlar insan genom dizisindeki belirli noktalardaki farklılıklardır ve insan vücudundaki haritalanmış polimorfik bölgeler genetik analizler için çok yararlıdır. Genomda farklılaşma olasılığının yüksek olduğu bölgeler tıbbi ve bilimsel amaçla özgül DNA dizilerini fenotip ile ilişkilendirmeye yarar. İnsan genom dizisindeki SNP' lerin çoğunun fenotipe etki etmediği düşünülse de bunların bir kısmının kalıtılan bireysel özelliklerden sorumlu olması beklenir. Bu noktada en zor olan ise insan genetiğinde doğal çeşitlilikten kaynaklanan farklar içinde işlevsel açıdan önem taşıyan çeşitlilikleri saptayabilmektedir (Alberts., 2002).

Bu zamana kadar KAH/MI ve seçilen aday genler arasındaki ilişkiyi araştırmak amaçlı 3 büyük ölçekli SNP analizi gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki 62 aday gende Kafkas Amerikalılarında 72 SNP' nin tarandığı ve en yüksek frekansa sahip olan TSP1, TSP2 ve TSP4 genlerinin MI ile ilişkisinin çok önemli bulunduğu; ikincisi Japon popülasyonunda KAH/MI hastalarında TSP4' teki değişimin önemli derecede ilişkili bulunduğu çalışmadır (Yamada vd., 2002). Üçüncüsü ise oldukça büyük ölçekli 92.788 SNP' nin tarandığı ve α -limfotoksin geniyle KAH arasında güçlü bir ilişkinin bulunduğu çalışmadır (Ozaki vd., 2002).

Bu çalışma ile Gaziantep ilinde Aralık 2010-2012 tarihleri arasında akut MI tanısı konmuş 150 hasta bireyde TSP1, TSP2 ve TSP4 genlerinde meydana gelen polimorfizm sıklığının incelenmesi ve bu hastaların demografik ve klinik bilgileri ile tespit edilen SNP ler arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır. Gaziantep

Güneydoğu Anadolu Bölgesi' nin hasta potansiyeli yüksek bir ilidir ve çevre illerden yoğun hasta transferi yapılmaktadır. Dolayısıyla hasta popülasyonumuzu oluşturan grup sadece Gaziantep ilinde yaşayan insanlarla sınırlı kalmamakta aynı zamanda Güneydoğu Anadolu Bölgesi' nin diğer illerini (özellikle; Şanlıurfa, Adıyaman ve Kahramanmaraş) de temsil etmektedir.

Bu çalışmada MI geçirmiş hastalar ile kendinde ve birinci derece yakınında herhangi bir kalp rahatsızlığı olmayan sağlıklı bireyler arasında boy ve kilo açısından anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Fakat hasta grubu kontrol grubundan hem yaşça büyük hem de çoğunlukla erkeklerden oluşmuştur. Hasta bireylerde erkek popülasyonu fazla iken ($p=0,0009$) hasta grubunu yaş ortalaması ise $64,98\pm 13,27$ şeklinde olup p değeri $<0,0001$ olarak bulunmuştur. Özellikle akut MI tanısı konmuş hastaların 60 yaş üzeri erkek bireylerde yoğunlaşmış olması hastalığın yaş ve cinsiyet ile ilişkisini artırmaktadır. Ancak 2004 yılında Beyaz Amerikan popülasyonunda yapılan çalışmada TSP-4 geni A387P polimorfizmi ile MI arasında önemli bir ilişki olduğunu rapor eden Wessel vd. (2004) aynı zamanda yaş faktörünün önemli bir değişken olmadığını vurgulamışlardır.

TSP1, TSP ailesinin en iyi karakterize edilen üyesidir ve endotelial hücreler, makrofajlar, fibroblastlar ve düz kas hücreleri (VSMC) gibi çok çeşitli hücrelerde ve plateletlerde sentezlenir ve salgılanır (Lawler vd., 1978). TSP1 primer endojen anjiyogenez inhibitörüdür ve endotelial hücre proliferasyonu ve migrasyonu inhibe etme kabiliyetine sahiptir (Iruela-Arispe vd., 2004; Taraboletti vd., 1990). Bunlardan dolayı TSP1' in ateroskleroz ve KAH patogeneğinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Kromozom 15q15' te lokalize lokalize olan TSP1 geninin 13. eksonunda 8831 A>G SNP' si, TSP1' in Ca^{+2} bağlama tekrar bölgelerinde bulunan 700. rezidüde asparajin yerine serin aminoasidinin geçmesine neden olur (N700S) li

bu da molekülün Ca^{+2} affinitesinin azalmasına ve TSP1 proteininin uzun zincirli konformasyonel yapısını değiştirir (Hannah vd., 2003; 2004; Lawler vd., 1985). Buradan yola çıkarak Topol ve ark. (2001) homozigot ser700 varyantına sahip bireylerin plazma TSP1 seviyelerinin 2 kat daha az olduğu ve 9 kat daha fazla MI riski taşıdıkları sonucuna varmıştır. Fakat bizim çalışmamızda TSP1 (N700S) ile MI arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır ($p<0,05$). Bu verilerin aksine İtalya popülasyonunda yapılan çalışmada TSP1 N700S polimorfizmi ile MI arasında anlamlı ilişkiye rastlanmış ve TSP1 N700S bölgesinin MI için potansiyel bir genetik risk faktörü olduğu vurgulanmıştır (Zwicker vd., 2006).

Ayrıca Koch vd. (2008) tarafından Avrupalılar üzerinde yapılan çalışmada da MI ile TSP1 N700S polimorfizmi arasında anlamlı ilişkiye rastlanmamıştır. Çalışmamıza paralel olarak Güney Hindistan popülasyonunda yapılan bir çalışmaya göre MI ile TSP1 polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin bulunmadığı rapor edilmiştir (Ashokkumar vd., 2011).

Alman ve Japon popülasyonlarında son zamanlarda 2 yeni çalışmada da benzer bulgular elde edilmiş ve TSP1 ile MI arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır. (Boekholdt vd., 2002; Yamada vd., 2002).

TSP2 (3'UTR T/G) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında; hasta ve kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

2002 yılında Boekholdt vd. tarafından yapılan çalışmada TSP2 (3'UTR T/G) polimorfizmi ile erken MI arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişkinin bulunması; bunun aksine TSP1 N700S polimorfizmi ile anlamlı bir ilişkinin bulunamaması TSP1 ve TSP2 için elde ettiğimiz istatistiksel bulguları destekler niteliktedir. Benzer şekilde Koch vd. (2008) tarafından Avrupalı ve Avrupa orijinli Amerikan popülasyonu üzerinde yapılan çalışmada da TSP2 (3'UTR T/G) polimorfizmi ile MI

arasında önemli derecede ilişki olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca transgenik ratlar ve aort darlığı olan hastalar üzerinde yapılan gen ekspresyonu çalışması ise TSP2 geninin kardiyak matriksin bütünlüğünün sağlanmasında önemli bir regülatör olduğunu vurgulayarak farklı bir açıdan TSP2 nin kardiyovasküler hastalıklar için önemini ortaya koymuştur (Schoren vd., 2004).

TSP2 geninin MI için prognostik bir faktör olduğunu gösteren bu çalışmaların aksine koroner arter hastaları üzerinde yapılan başka bir çalışmada TSP2 (3'UTR T/G) polimorfizminin istatistiksel açıdan önem taşımadığı vurgulanmıştır (Burke vd., 2010).

Fakat aynı çalışmada plak erozyonuna bağlı ani ölümlerde TSP2 (3' UTR T/G) SNP' nin frekansının azaldığı ve Topol vd. (2001) tarafından timinden guanine olan bu değişimin homozigot varyant bireylerde MI' a karşı koruyucu olduğu bulgusu desteklenmiştir. (Burke vd., 2010).

TSP2' nin t3949g SNP' si TSP2 mRNA' sının 3' UTR (3' untranslated region) bölgesinde yer alır ve genellikle protein ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde etkilidir. mRNA' nın sekonder yapısındaki bu tür bir değişiklik protein ekspresyonunu değiştirecektir. g3949 SNP' nin neden olduğu vasküler duvardaki TSP2 ekspresyonunun azalmasıyla MI' a karşı koruyucu bir aktivitenin görülmesini sağlar (Topol vd., 2001).

Topol vd. (2001) miyokardiyal infarktüs, revaskülarizasyon ya da erkekte 45 ve bayanda 50 yaş öncesi olmak üzere önemli koroner arter lezyon oluşum hikayesi olan aileler üzerinde yaptığı çalışmanın sonucunda TSP4 A387P polimorfizmi ile MI arasında istatistiksel olarak güçlü ilişkinin olduğunu vurgulamıştır. Yine Wessel vd. (2004), MI hastaları ve MI riski taşımayan sağlıklı kişilerle yaptıkları olgu-kontrol çalışmasıyla TSP-4 geni A387P polimorfizmi ile MI arasında önemli bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Cui vd., (2006) yalnızca yaşlı bayanlarda TSP4 387P

varyantının zayıf bir risk faktörü olduğunu vurgulamıştır. Corsetti vd., (2011) ise HDL kolestrolü ve C-reaktif protein (CRP) seviyesi yüksek olan MI geçiren hastalarda TSP-4 (A387P) polimorfizminin kardiyovasküler riskin habercisi olduğunu vurgulamışlardır.

Kromozom 5q13' te yer alan TSP4 geninin 9. eksonunda G29926C varyantı A387P missense varyantını oluşturur ve bu varyant KAH ve MI ile yüksek ilişkili bulunmuştur (Topol vd., 2001). TSP4 varyantları, TSP4 proteinini hem yapısal hem de fonksiyonel olarak etkiler. TSP1' e oldukça yakın olan TSP4 geninin Ca^{+2} bağlama bölgesindeki değişikliklerle beraber proteinin Ca^{+2} affinitesi azalır ve fonksiyonel olarak değişiklik görülür. Bu değişikliğin MI ile ilişkisinin bulunduğu bildirilse de (Topol vd., 2001; Corsetti vd., 2011) aksine bildiriler de mevcuttur (Boekholdt vd., 2002; Koch vd., 2008).

Çalışmamızda TSP1 gibi TSP4 (A387P)' ün de MI ile ilişkisine rastlanmamıştır. TSP4 A387P polimorfizm sıklığı ile MI arasındaki ilişkinin istatistiksel açıdan anlamlı olmaması Çin, Alman, Japon, Avrupalı ve Avrupa kökenli Amerikan popülasyonunda daha önce yapılan bazı çalışmalar tarafından desteklenmiştir (Koch vd., 2008; Zhou vd., 2004; Boekholdt vd., 2002; Yamada vd., 2002).

Sonuç olarak; TSP1, TSP2 ve TSP4 genlerindeki SNP' lerin MI ile ilişkisinin araştırıldığı bu çalışmada yalnızca TSP2 geninin 3' UTR bölgesindeki SNP' nin MI ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. TSP genlerinin MI ile ilişkisinin bulunduğu ilk büyük çalışma Toplo vd. (2001) tarafından yapılmış olup American Heart Association (AHA)' in 2001 yılında top 10' da yer almıştır. Bununla beraber ülkemizde TSP genleri ile MI arasındaki ilişkinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olup elde ettiğimiz veriler ülkemiz için ilk bulgulardır. Takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda ise destekleyen ve aksini iddia eden raporlar

yayınlanmıştır. Bu farklı bulguları açıklamak için en olası hipotez etnik kökene bağlı olarak görülen genetik heterojenitedir. Çünkü bu konuda gerçekleştirilen tüm çalışmalar farklı popülasyonlarda gerçekleştirilmiştir. KAH ve MI ile ilişkili olabileceği düşünülen TSP genleri için daha geniş ve bakir popülasyonlarda yeni çalışmaların yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Akbulut N. (2006). Akut Miyokard İnfarktüsli Hastalarda Ortalama Trombosit Hacmi ve Trombosit Sayısının Değerlendirilmesi. *Uzmanlık Tezi*. Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. And Walter, P.(2002). Hücrenin Moleküler Biyolojisi. 4. Baskı, 1313-1362.
- Allure R. (2003). Basement membranes: Structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. **3**, 422- 433.
- Baret-Conner EL., Cohn BA., Wingard DL. and Edelstein SL. (1991). Why is diabetes mellitus is stronger risk faktör for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo study. *Jama*. **265**,627-630.
- Boekholdt S.M., Trip M.D, Peters R.J.G., Engelen M., Boer J.M.A., Feskens E.J.M., Zwinderman A.H., Kastelein J.J.P. and Reitsma P.H. (2002). Thrombospondin-2 Polymorphism Is Associated With a Reduced Risk of Premature Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.**22**, 24-27.
- Bornstein P. (2001). Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest*. **107**, 929 –934.
- Bottcher M, Falk E. (1999). Pathology of the coronary arteries in smoker and nonsmokers. *Cardiovascular Risk*. **6**, 299-302.
- Broeckel, U., Hengstenberg, C., Mayer, B., Holmer, S., Martin, L. J., Comuzzie, A. G., Blangero, J., Nurnberg, P., Reis, A., Riegger, G. A., Jacob, H. J., & Schunkert, H. (2002). A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors. *Nature Genetics*, **30**, 210–214.

- Burke A., Creighton W., Tavora F., Li L., Fowler D. (2010). Decreased frequency of the 3'UTR TNG single nucleotide polymorphism of thrombospondin-2 gene in sudden death due to plaque erosion. *Cardiovascular Pathology*. **19**, 45–49.
- Burke A.P., Farb A., Malcom G.T. et al. (1998) Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women. *Circulation*.**97**, 2110-2116.
- Carmeliet P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. **9**, 653- 660.
- Castelli WP. (1992). Epidemiology of triglycerides. A view from Framingham. *Am. J. Cardiol*. **70**, 3-9.
- Celermajer D.S., Sorenson K.E., Georgakopoulos D. et al. (1993). Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endotheliumdependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. **88**, 2149-2155.
- Ceylan C. (2005). Akut Miyokard İnfarktüsünde Serum NT-proBNP Düzeyi ve Sol Ventrikül Ejeksiyon Fraksiyonu ilişkisi. *Uzmanlık Tezi*. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü. İstanbul.
- Clark ER, Hitschler WJ, Kirby-Smith HT, Rex RO, Smith JH. (1931). General observations on the in growth of new blood vessels into standardized chambers in the rabbit ear, and the subsequent changes in the newly grown vessels over a period of months. *Anat Rec*.**50**, 129-68.
- Crawford MH. (2004). Atherosclerosis and prevention, Cardiology, Spain.
- Cui İ., Randell E., Renouf J., Sun G., Green R., Han F.Y. and Xie Y.G. (2006). Thrombospondin-4 1186GNNNC (A387P) is a sex-dependent risk factor for myocardial infarction: A large replication study with increased sample size from the same population. *American Heart Journal*. **152**, 543;2-5.

- Davies M.J. (2001). Pathology of Coronary Atherosclerosis. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, editors. *Hurst's The Heart*. 10th ed. USA. *International Edition McGraw-Hill Medical Publishing Division*. **36**, 1095-1105.
- Davies M.J. (1997). The composition of coronary artery plaques (editorial). *N. Eng. J. Med.* **336**, 1312-1314.
- Dibbens JA, Miller DL, Damert A ve ark. (1999). Hypoxic regulations of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation multiple RNA elements. *Mol Biol Cell* .**10**, 907-19.
- Donahue R.P., Abbot R.D., Bloom E., Reed D.M. and Yano K. (1987). Central Obesity and coronary heart disease in men. *Lancet*. **1**,821-824.
- Dvorak HF. (2003). How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* . **162**, 1747-57.
- Ersöz N. (2008). Transkripsiyon faktörü MEF2A gen mutasyonlarının Türk toplumundaki koroner arter hastalarında taranması. *Yüksek Lisans Tezi*. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Konya.
- Falk E., Fuster V. (2001). Atherogenesis and its Determinants. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, editors. *Hurst's The Heart*. 10th ed. USA. *International Edition McGraw-Hill Medical Publishing Division*. **35**, 1065-1093.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*.**9**, 669-76.
- Ferrara N, Henzel WJ. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **161**, 851-5.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. (1971b). Isolation of tumor fraction responsible for angiogenesis. *J Exp Med* .**133**,275-88.

- Folkman J. (1971a). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Eng J Med* .**285**, 1182-6.
- Francke, S., Manraj, M., Lacquemant, C., Lecoecur, C., Lepretre, F., Passa, P., Hebe, A., Corset, L., Yan, S. L., Lahmidi, S., Jankee, S., Gunness, T. K., Ramjuttun, U. S., Balgobin, V., Dina, C., Froguel, P. (2001). A genome-wide scan for coronary heart disease suggests in Indo-Mauritians a susceptibility locus on chromosome 16p13 and replicates linkage with the metabolic syndrome on 3q27. *Human Molecular Genetics*, 10, 2751–2765.
- Franklin S.S., Khan S.A., Wong N.D., et al. (1999): Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart disease? The FraMIngham Heart Study. *Circulation*. **100**, 354-360.
- Fuster V. (1994). Mechanisms leading to myocardial infarction. Insights from studies of vascular biology. *Circulation*. **90(4)**, 2126-2146.
- Genest J., Cohn J.S. (1995). Clustering of cardiovascular risk factors: Targeting high-risk individuals. *Am. J. Cardiol.* (**13**), 76(2):8-20.
- Genest J.J., Jenner J.L., McNamara J.R. (1991). Prevalance of lipoprotein(a), Lp(a) excess in coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* **67**, 1039-1145.
- Goddard JC, Sutton CD, Jones JL, et al. (2002). Reduced Thrombospondin-1 at presentation predicts disease progression in superficial bladder cancer. *Eur Urol.***42**, 464-468.
- Goldman E. (1907). The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet*. **2**, 1236-40.
- Gonzales P, Castro MG, Reguero JR, Batalla A, Ordonez AG, Palop RL, Lozano I, Montes M, Alvarez V and Coto E (2006). The Pro279Leu variant in the transcription factor MEF2A is associated with myocardial infarction, *Journal of medical Genetics*. **43**, 167–169.

- Goodsell DS. (2003).The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells*.**21**, 118–119.
- Gordon D.J., Probstfield J.L., Garrison R.J. (1989): High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. **79**, 8-15.
- Gök H. 1996. İskemik Kalp Hastalıkları. Klinik Kardiyoloji. Ankara. Nobel Tıp Kitabevi. 97-172.
- Grines C.L., Topol E.J., O.neill W.W. et al. (1995). Effect of cigarette smoking on outcome after thrombolytic therapy for myocardial infarction. *Circulation*.**91**, 298-303.
- Grundey S.M., Wilhelmsen L., Rose G. et al. (1990): Coronary heart disease in high-risk populations: Lessons from Finland. *Eur. Heart J*. **11**, 462-471.
- Güleç Ş (2006). Miyosit Enhancer Faktör 2A (MEF2A) Gen Varyantlarının Erken Miyokard Enfarktüsülü Hastalarda İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü.
- Güzel S. 2008: Akut Miyokard infarktüsünde Serum Matriks Metalloproteinaz-9 Düzeyleri. *Uzmanlık Tezi*. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya. İstanbul.
- Hannah BL, Misenheimer TM, Annis DS, Mosher DF. (2003). A polymorphism in thrombospondin-1 associated with familial premature coronary heart disease causes a local change in conformation of the Ca²⁺-binding repeats. *J Biol Chem*. **278**:8929e34.
- Hannah BL, Misenheimer TM, Pranghofer MM, Mosher DF. (2004). A polymorphism in thrombospondin-1 associated with familial premature coronary artery disease alters Ca²⁺ binding. *J Biol Chem*. **279**:51915e22.
- Haroon ZA, Peters KG, Greenberg CS ve ark.(1999). Angiogenesis and Oxygen Transport in Solid Tumors. *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy*. Totowa, Humana Press.3- 21.

- Harrap, S. B., Zammit, K. S., Wong, Z. Y., Williams, F. M., Bahlo, M., Tonkin, A. M., & Anderson, S. T. (2002). Genome-wide linkage analysis of the acute coronary syndrome suggests a locus on chromosome 2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **22**, 874–878.
- Hertig AT.(1935). Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contrib Embryol.* **25**, 39-81.
- Hubert H.B., Feinleib M., McNamara P.M., Castelli W.P.(1983). Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: A 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation.* **67**, 968-977.
- Hudlicka O. (1984). Development of microcirculation: Capillary growth and adaptation. the Cardiovascular system Vol IV, part 1, microcirculation. Baltimore, Bethesda. p165-216.a.
- Hudlicka O. (1984). Growth of vessels – Historical review. *Prog Appl microcirc* .4:1-8.b.
- Hudlicka, O, Brown M, Egginton S. (1992). Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev.***72**, 369-417.
- Hurst J.W. (1990). Atherosclerotic coronary heart disease, factors influencing atherogenesis, *The Heart*. America.
- Ioachim E, Michael MC, Salmas M, et al. (2006). Thrombospondin-1 expression in urothelial carcinoma: prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. *BMC Cancer* **6**, 140-147.
- Iruela-Arispe ML, Luque A, Lee N. (2004). Thrombospondin modules and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.***36**:1070e8.
- Isenberg J.S., Qin Y., Maxhimer J.B., Sipes J.M., Despres D., Schnermann J., Frazier W A., Roberts D.D.(2009). Thrombospondin-1 and CD47 regulate blood pressure and cardiac responses to vasoactive stress. *Matrix Biology.* **28**, 110–19

- Karagoz ID, Ozaslan M, Cengiz B, Kalender M.E, Kilic İ.H, Oztuzcu S., Gogebakan B., Demiryurek A.T.(2010). CDC25A gene 263C/T, -350C/T, and -51C/G Polymorphisms In Breast Carcinoma. *Tumor Biology*. Volume 31, Issue 6, pp 597-604.
- Kerbel RS. (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* .**21**, 505-15.
- Kety SS. (1951). The theory and applications of the exchange of inert gas at the lungs and tissues. *Pharmacol Rev.***3**, 1-41.
- Koch W., Hoppmann P., Waha A.D., Scho A. and n Kastrati A. (2008). Polymorphisms in thrombospondin genes and myocardial infarction: a case – control study and a meta-analysis of available evidence. *Human Molecular Genetics*.**17**, 1120-1126.
- Kumar V., C. S., Robins S. (2003). Temel Patoloji, Nobel Kitap Evi.
- Kyriakides TJ, Tam JW, Bornstein, P. (1999). Accelerated wound healing in mice with a disruption of the thrombospondin 2 gene. *The Journal of Investigative Dermatology*, 113, 782–787.
- Lawler J, Derick LH, Connolly JE, Chen JH, Chao FC. (1985). The structure of human platelet thrombospondin. *J Biol Chem*. **260**:3762e72.
- Lawler J, Slayter HS, Coligan JE. (1978). Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem*. **253**:8609– 16.
- Lawler J. (2000). The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol*. **12**:634–640.
- Lawrence WT, Diegelmann RF. (1994). Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol*.**12**, 157- 169.
- Leung DW,Cachianes G, Kuang WJ ve ark. (1989).Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic tiogen. *Science*. **246**,1306-309.

- Libby P.(2000). Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am. J. Cardiol.* 86(8B):3J-8J.
- Maciag T, Mehlman T, Friesel R, Schreiber AM. (1984). Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal cell mitogen in bovine brain. *Science.* **225**, 932-5.
- Manson J.E., Tostesan H., Ridker P.M., Satterfield S., Hebert P., O'Connor G.T., Buring J.E. and Hennekens C.H.(1992).(Review). *N. Eng. J. Med.*326(21):1406-1416.
- Moreno P.R., Leon M.N., Vyalkov V.A. et al. (1998). Coronary plaque composition and tissue factor in cigarette smokers (abstr). *Circulation.* **98**(suppl I), I-145.
- Murabi to, JM, Evans, JC, Larson, MG. (2003). The ankle-brachial index in the elderly and risk of stroke coronary disease and death: the Framingham Study. *Arch Intern Med.*163.
- Mustonen E., Aro J., Puhakka J., a Ilves M., Soini Y., Leskinen H., Ruskoaho H., a Rysä J. (2008). Thrombospondin-4 expression is rapidly upregulated by cardiac overload. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **373**, 186–191.
- Neaton J.D., Wentworth D. (1992). Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking and death coronary heart disease. Overall findings and differences by age for 316099 white man.
- 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. *Nature Genetics*, **32**, 650–654.
- Pajukanta, P., Cargill, M., Viitanen, L., Nuotio, I., Kareinen, A., Perola, M., Terwilliger, J. D., Kempas, E., Daly, M., Lilja, H., Rioux, J. D., Brettin, T., Viikari, J. S., Ronnema, T., Laakso, M., Lander, E. S., & Peltonen,

- L. (2000). Two loci on chromosomes 2 and X for premature coronary heart disease identified in early- and late-settlement populations of Finland. *American Journal of Human Genetics*, **67**, 1481–1493.
- Papageorgiou A., Swinnen M., Vanhoutte D., VandenDriessche T., Chuah M., Lindner D., Verhesen W., Vries B., D’hooge J., Lutgens E., Westermann D., Carmeliet P. and Stephane Heymans S. (2012). Thrombospondin-2 prevents cardiac injury and dysfunction in viral myocarditis through the activation of regulatory T-cells. *Cardiovascular Research*. **94**, 115–124.
- Ribatti D, Vacca A, Presta M. (2002). The discovery of angiogenic factors: A historical review. *Gen Pharmacol*. **35**, 227-31.
- Roald H.E., Orvim U., Bakken I.J. et al. (1994). Modulation of thrombotic responses in moderately stenosed arteries by cigarette smoking and aspirin ingestion. *Arterioscler. Thromb*. **14**, 617- 621.
- Roberts WC. (1995). Preventing and arresting coronary atherosclerosis. *Am. Heart. J.* **130**, 580-600.
- Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, et al. (2001). Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98(22)**: 12485-12490.
- Ross R.(1999). Atherosclerosis: An inflammatory disease. *N. Eng. J. Med.* **340**,115-126.
- Rudd J , Daavies J, Weisberg P. Topol Textbook of Cardiovascular Medicine. 3th Ed., Lipincot Williams Wilkins, 2008. 32.
- Sargiannidou I, Qiu C, Tuszynski GP.(2004). Mechanisms of Thrombospondin-1 Mediated Metastasis and Angiogenesis. *Semin Thromb Hemost*.**30**, 127-136.
- Scanu A.M.(1998). Atherothrombogenicity of lipoprotein (a): *The debate*. *Am. J. Cardiol*. **82**, 260-330.

- Schellings & Geert C. van Almen & E. Helene Sage & Stephane Heymans. (2009). Thrombospondins in the heart: potential functions in cardiac remodeling.
- Sfar S., Saad H., Mosbah F., Gabbouj S., Lotfi Chouchane L. (2007). TSP1 and MMP9 genetic variants in sporadic prostate cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. **172**, 38-44.
- Sobin SS, Tremer HM. (1977). Three-dimensional organization of Microvascular beds as related to function. In: Kaley G and Altura BM, editor. Microcirculation. Baltimore, MD: University Park.. **vol 1**. p 43-67.
- Stenina O. I., Topol E.J. and Plow E.F. (2007). Thrombospondins, Their Polymorphisms, and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **27**;1886-1894.
- Stenina O.I., Byzova T.V., Adams J.C., McCarthy J.J., Topol E.J., Plow E.F. (2004). Coronary artery disease and the thrombospondin single nucleotide polymorphisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 1013–1030.
- Sümbül Z. (2010). Koroner arter hastalığında CD 34, VEGF, Homosistein ve Lipoprotein A Düzeylerinin Koroner Kollateral Gelişimi ile İlişkisi. *Uzmanlık Tezi*. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı. Adana.
- Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. (1990). Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol*. **111**: 765e72.
- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). (2002). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), Final Report. *Circulation*, **106**, 3143.
- Tıgılı H. (2009). Anjiyogenez ile ilgili Trombospondin-1, HIF-1 Ve CA9 Moleküllerinin Böbrek Kanseri Hastalarda Araştırılması. *Uzmanlık Tezi*.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı.

Topol, E. J., McCarthy, J., Gabriel, S., Moliterno, D. J., Rogers, W. J., Newby, L. K., Freedman, M., Metivier, J., Cannata, R., O'Donnell, C. J., Kottke-Marchant, K., Murugesan, G., Plow, E. F., Stenina, O., & Daley, G. Q. (2001). Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin genes may be associated with familial premature myocardial infarction. *Circulation*, **104**, 2641–2644.

Ufacık O.(2008). Akut İnförior Miyokard infarktöslü Hastaların İzleminde Osteoprotegerinin Prognostik değeri. *Uzmanlık Tezi*. Trakya ÜniversitesiTıp Faköltesi Kardiyoloji Anabilim Dalı. Edirne.

Vassalli G and Winkelmann BR (2004). Molecular genetics of myocardial infarction: many genes, more questions than answers. *European Heart Journal*. **25**, 451–453.

Wessel J., J. Topol E.J., Ji M., Meyer M., McCarthy J.J.(2004).Replication Of The Association Between The Thrombospondin-4 A387P Polymorphism and Myocardial İnfarction. *American Heart Journal*.**147**,905-909.

Wilson PW. (1994). Established risk factors and coronary artery disease: The Framingham study. *Am JHypertens*. **7**,7-12.

Wood D., Backer G.D., Faergeman O. et al. (1998). Prevention of coronary heart disease in clinical practice:Recommendations of the Second Joint Task Force of European and Other Societies on Coronary Prevention. *Eur Heart J*. **19**,1434-1503.

www.ncbi.nlm.nih.gov.tr

Yamada Y., İzawa H., İchihara S., Takatsu F.,İshihara H., Hirayama H., Hirayama H., Sone T., Tanaka M. And Yokoto M. (2002). Prediction Of The Risk Of Myocardial İnfarction From Polymorphisms İn Candidate Genes. *The New Eng land Jour nal of Medicine*.**Vol 347**,916-923.

Zheng H.T., Peng Z.H., Li Sheng., (2005). Loss of heterozygosity analyzed by single nucleotide polymorphism array in cancer. *World J Gastroenterol.***11**,43:6740-6743.

Zhou X., Huang J., Chen J., Zhao J., Ge D., Yang W., Gu D.(2004). Genetic association analysis of myocardial infarction with thrombospondin-1 N700S variant in a Chinese population. *Thrombosis Research.***113**, 181–186.

Zwicker J.I, Peyvandi F., Palla R., Lombardi R., Canciani M.T., Cairo A., Ardissino D., Luisa Bernardinelli L., Bauer K.A., Lawler J. and Mannucci P. (2006).The Thrombospondin-1 N700S polymorphism is associated with early myocardial infarction without altering von Willebrand factor multimer size. **Vol 108**,1280-1282.