

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ESANSİYEL HİPERTANSİYONLU HASTALARDA VE SAĞLIKLI
KONTROLLERDE ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ
(eNOS) VE METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ
(MTHFR) GEN POLİMORFİZMLERİ VE BU
POLİMORFİZMLERİN NİTRİK OKSİT (NO), OKSİDE LDL
(OX-LDL) VE HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ İLE OLAN
İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Süleyman NERGİZ

DOKTORA TEZİ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. İdris MEHMETOĞLU

KONYA-2011

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ESANSİYEL HİPERTANSİYONLU HASTALARDA VE
SAĞLIKLI KONTROLLERDE ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT
SENTAZ (*eNOS*) VE METİLENTETRAHİDROFOLAT
REDÜKTAZ (*MTHFR*) GEN POLİMORFİZMLERİ VE BU
POLİMORFİZMLERİN NİTRİK OKSİT (NO), OKSİDE LDL
(OX-LDL) VE HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ İLE OLAN
İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Süleyman NERGİZ

DOKTORA TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. İdris MEHMETOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09202039 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2011

ÖNSÖZ

Akademik hayatın en önemli dönüm noktası olan doktora aşamasında bana verdiği sonsuz destek ve gösterdiği sabır için kıymetli hocam Prof.Dr.İdris Mehmetoğlu'na; beni her türlü konuda maddi ve manevi olarak destekleyen kıymetli fikirlerinden her anlamda faydalandığım değerli hocam Prof.Dr.Hasan Acar'a, tezimin istatistiksel analizinde yardımcı olan Dr.Aydın Karakoca ve Arş.Gör.Aysel Kalaycı'ya; laboratuvar çalışmalarında destek veren lisansüstü öğrencilerimiz V.Betül Kocabıyık ve Z.Betül Bulut'a; materyal toplama aşamasında yardımcı olan Arş.Gör.Dr. Hayrudin Alibaşıç ve Hemşire Sevim Kuru'ya; son olarak yollarında yürümekten hep gurur duyacağım babam, annem ve ablam'a minnet ve şükranlarımı arz ediyorum.

Bu tezi, gücümü her daim ardımda hissettiğim çok kıymetli aileme, eşime, oğluma ve kızıma ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hipertansiyon.....	1
1.1.1 Hipertansiyonun Tanımı ve Sınıflandırılması.....	1
1.1.2 Hipertansiyonun Klinik Özellikleri ve Sıklığı	2
1.1.3 Esansiyel Hipertansiyon Patogenezi	3
1.1.4 Esansiyel Hipertansiyonun Etyolojisi	4
1.1.5 Esansiyel Hipertansiyonun Fizyopatolojisi.....	5
1.1.6 Esansiyel Hipertansiyonda Rol Oynayan Etkenler	5
1.1.7 Esansiyel Hipertansiyonun Genetiği.....	7
1.2. Nitrik Oksit	9
1.2.1 Nitrik Oksitin Yapısı ve Fonksiyonları.....	9
1.2.2 Nitrik Oksitin Sentezi	12
1.2.3 Nitrik Oksit Sentetaz İnhibitörleri	13
1.2.4 Nitrik Oksitin Biyolojik Etkileri	14
1.2.5 Kardiyovasküler Sistemde Nitrik Oksit.....	14
1.3. eNOS Enzimi ve eNOS Gen Polimorfizmleri	15
1.3.1 Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enzimleri	15
1.3.2 eNOS Geni ve Polimorfizmleri.....	18
1.4. MTHFR (Metilentetrahidrofolat Redüktaz) Enzimi ve MTHFR Gen Polimorfizmleri	21
1.4.1 MTHFR Enziminin Yapısı ve Görevi.....	21
1.4.2 MTHFR Geninin Yapısı ve Özellikleri.....	22
1.4.3 MTHFR Geni C677T Polimorfizmi.....	22
1.4.4 MTHFR Geni A1298C Polimorfizmi	23
1.4.5 MTHFR Geni C677T ve A1298C Polimorfizm Kombinasyonu	23
1.5. Homosistein	24
1.5.1 Homosistein Metabolizması.....	25
1.5.2 Homosisteinin İn vitro Etkileri	27
1.5.3 Homosistein Düzeyini Etkileyen Faktörler.....	29
1.5.4 Hiperhomosisteinemi Nedenleri	29
1.5.5 Kongenital Homosistinürinin Klinik Göstergeleri.....	31
1.5.6 Hiperhomosisteinemi'deki Fizyopatolojik Mekanizmalar.....	31
1.5.7 Hipertansiyon ve Homosistein	33
1.6. Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL)	37
1.6.1 LDL'nin Mekanizması ve Oksidasyonu	38
1.6.2 Aterosklerozda Okside LDL'nin Rolü.....	42
2. MATERYAL VE METOD	45
2.1. Materyal	45
2.1.1 Hasta ve Kontrol Grubu	45
2.1.2 Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	46
2.1.3 Kullanılan Kit ve Kimyasallar	46

2.2. Metod	47
2.2.1 Kan Basıncı Ölçümleri.....	47
2.2.2 Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması.....	47
2.2.3 DNA İzolasyonu	47
2.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi	48
2.2.5 Sınırlanmış Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP-Restriction Fragments Length Polymorphism)	49
2.2.6 Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Eden Dizinler (VNTR-Variable Number of Tandem Repeats)	55
2.2.7 Plazma Nitrat / Nitrit Düzeyi Ölçümü	57
2.2.8 Plazma Homosistein Düzeyi Ölçümü	58
2.2.9 Plazma Okside LDL Düzeyi Ölçümü	59
2.2.10 İstatistik Analiz	60
3. BULGULAR	61
3.1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Biyokimyasal Parametrelerin Bulguları	61
3.2. eNOS Geninde İtron 4 a/b ve Exon 7 Glu298Asp (G894T) Polimorfik Bölgelerinin Bulguları	61
3.3. MTHFR Geninde C677T ve A1298C Polimorfik Bölgelerinin Bulguları	62
3.4. eNOS Geni intron 4a/b ve exon 7 Glu298Asp (G894T) Polimorfik Bölgelerinin Genotip ve Allel Dağılımı Bulguları.....	63
3.5. MTHFR Geninin C677T ve A1298C Polimorfik Bölgelerinin Genotip ve Allel Dağılımı Bulguları	65
3.6. Hasta ve Kontrol Grubunda eNOS Geni intron 4a/b ve exon 7 Glu298Asp (G894T) Polimorfik Bölgelerinin Genotip Dağılımları ile NO Düzeyleri Arasındaki İlişki.....	67
3.7. Hasta ve Kontrol Grubunda MTHFR Geni C677T ve A1298C Polimorfik Bölgelerinin Genotip Dağılımı ile Homosistein Düzeyleri Arasındaki İlişki.....	68
3.8. eNOS Geni İtron 4a/b ve exon 7 Glu298Asp (G894T) Polimorfik Bölgelerinin Birleştirilmiş Genotip Dağılımı ile NO Düzeyleri Arasındaki İlişki	70
3.9. MTHFR Geni C677T ve MTHFR A1298C Polimorfik Bölgelerinin Birleştirilmiş Genotip Dağılımı ile Homosistein Düzeyleri Arasındaki İlişki.....	71
4. TARTIŞMA	72
4.1. eNOS Gen Polimorfizmi ile Nitrik Oksit Bulgularının Tartışılması	72
4.2. MTHFR Gen Polimorfizmi ile Homosistein Bulgularının Tartışılması	77
4.3. Ox-LDL Bulgularının Tartışılması	80
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
6. ÖZET	83
7. SUMMARY	84
8. KAYNAKLAR	85
9. ÖZGEÇMİŞ	95

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADMA	: Asimetrik Dimetilarjinin
ADP	: Adenozin difosfat
ACS	: Akut Koroner Sendrom
BH4	: Tetrahidrobiyopterin
BHMT	: Betain-homosistein metil transferaz
C-A	: Sitozin-Adenin
CBS(SBS)	: Sistation- β sentaz
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
CH2THF	: 5,10,-metilen tetrahidrofolat
CH3THF	: 5-metil tetra hidrofolat
DKB	: Diyastolik Kan Basıncı
EHT	: Esansiyel Hipertansiyon
FAD	: Flavin adenin dinükleotit
FMN	: Flavin mononükleotit
G>A	: Guanin Adenin baz değişimi
G>T	: Guanin Timin baz değişimi
GİS	: Gastro İntestinal Sistem
eNOS	: Endoteliyal nitrik oksit sentaz
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HT	: Hipertansiyon
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KKH	: Koroner Kalp Hastalığı
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
L-NAMA	: NG-nitro-L-arginin
L-NMMA	: L-nitro monometil arginin
MTHFR	: Metilen tetra hidrofolat redüktaz
MS	: Metiyonin Sentaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NO	: Nitrik oksit
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
OH·	: Hidroksil radikali

O₂⁻	: Süperoksit radikali
Ox-LDL	: Okside LDL
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Tepkimesi)
RE	: Restriksiyon Enzimi
RFLP	: Restriction Fragments Length Polymorphism (Sınırlandırılmış Parçacık Uzunluk Polimorfizmi)
SAM	: S-adenozil metiyonin
SAH	: S-adenozil homosistein
SKB	: Sistolik Kan Basıncı
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizm
tHcy	: Total homosistein
VNTR	: Variable Number of Tandem Repeat (Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Eden Dizinler)

1. GİRİŞ

1.1. Hipertansiyon

1.1.1. Hipertansiyonun Tanımı ve Sınıflandırılması

Hipertansiyon (HT); antihipertansif ilaç almayan bir kişide sistolik kan basıncı (SKB)'nın 140 mmHg veya üzerinde, diyastolik kan basıncı (DKB)'nında 90 mmHg veya üzerinde bulunması ya da kişinin antihipertansif ilaç kullanıyor olması olarak tanımlanmıştır (le Noble ve ark 1998, Chobanian ve ark 2003).

Hipertansiyon etyolojisine göre; primer HT (esansiyel, idiyopatik, nedeni bilinmeyen, birincil) ve sekonder HT (ikincil, nedeni bilinen) olmak üzere iki gruba ayrılır. Esansiyel hipertansiyon kesin nedeni belirlenemeyen hipertansiyon türüdür ve hipertansif hastaların yaklaşık %95'inde görülür. Klinik ve etiyolojik olarak kalıcı kan basıncı yükselmesiyle karakterize; renovasküler hastalık, böbrek yetmezliği, feokromasitoma ve aldosteronizm gibi sekonder nedenlerin bulunmadığı yüksek kan basıncı olarak tanımlanır (Crawford ve DiMarco 1997).

Sekonder hipertansiyon ise başka bir hastalığa ikincil olarak gelişen kalıcı kan basıncı artışı olup tüm hipertansiyon olgularının %5'ini oluşturur. Başlıca nedenleri arasında renal, endokrin ve damar anomalileri sayılabilir. Gençlerde veya hipertansiyon hikâyesi olmayan yetişkinlerde, hızlı kan basıncı artışı gözlemlendiğinde sekonder hipertansiyon ihtimalinin varlığını gösterir. Ayrıca antihipertansif tedaviye çok zayıf cevap veren hipertansiyonlu bireylerde de bu ihtimal düşünülür. Hem SKB hem de DKB'nin arttığı durum "kombine hipertansiyon" olarak tanımlanırken, DKB'nin 90 mmHg altında olduğu ancak SKB'nin yüksek olduğu (SKB>140 mmHg) duruma ise "izole sistolik hipertansiyon" denir (Kaplan 1998).

WHO/ISH (World Health Organization/International Society of Hypertension) klavuzuna göre kan basıncı düzeylerinin sınıflandırılması Çizelge 1.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. WHO-ISH Hipertansiyon Tanımlama ve Sınıflaması

Kategori	Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	Diyastolik Kan Basıncı (mmHg)
Optimal	<120	<80
Normal	<130	<85
Yüksek-Normal	130-139	85-89
1.Derece HT (hafif)	140-159	90-99
2.Derece HT (orta)	160-179	100-109
3.Derece HT (ağır)	≥180	≥110

HT: Hipertansiyon

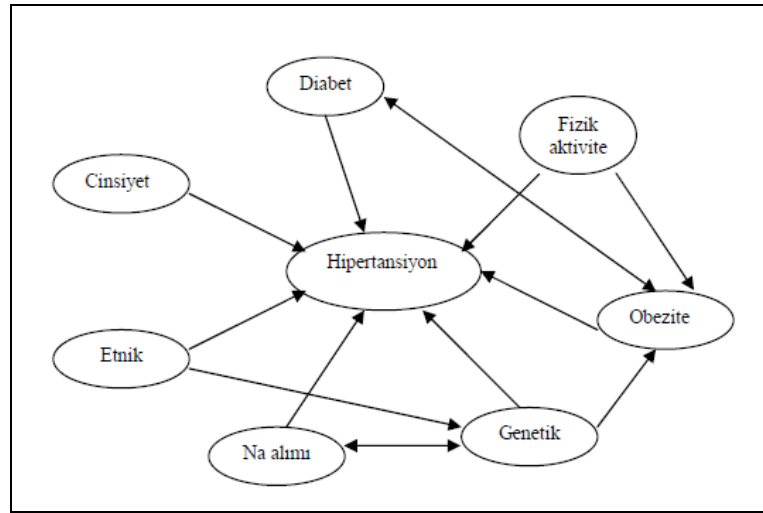
Sınıflandırmada, sistolik ve diyastolik kan basınçları farklı gruplara düşerse kişinin kan basıncı durumunu değerlendirmek için daha yüksek olan kan basıncı dikkate alınmalıdır.

1.1.2. Hipertansiyonun Klinik Özellikleri ve Sıklığı

Hipertansiyonun sıklığı, hipertansiyonun tanımında kullanılan kriterlere ve çalışılan popülasyonun yaşına ve ırka göre değişir. Sınır düzey olarak 140/90 mmHg ve üzeri göz önüne alındığında, özellikle batı ülkelerinde tüm toplumun yaklaşık %20 'sinde HT görülmektedir. Bu oran 18-29 yaş grubunda %4, 30-39 yaş grubunda %10-15, 40-49 yaş grubunda %50 bulunmuştur. 80 yaş üzerinde ise %65' e kadar çıkar. TEKHARF (Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri) 2003-2004 kohortu hipertansiyonlu sıklığı erişkin erkeklerde %33,6 kadınlarda ise %49,1'dir. Genelde hipertansiyonun prevalansı erkeklerde biraz daha yüksektir. Ancak 50 yaş ve üzeri kadınlarda hipertansiyon sıklığı erkeklere oranla daha yüksek bulunur. Bu artış kadınlarda menopozdaki hormonal değişikliklerle ilgili kabul edilir. Bu nedenle K/E hipertansiyon oranı 30 yaşında 0,6-0,7 iken, 65 yaşında 1,1-1,2'dir (Süleymanlar ve ark 2000)

1.1.4. Esansiyel Hipertansiyonun Etyolojisi

Esansiyel hipertansiyonun etiyolojisine bakıldığında, hastalığın ailevi bir özellik göstermesinden dolayı çevresel faktörlerin yanısıra diğer önemli bir faktörün de genetik faktörler anlaşılmaktadır. Genetik ve çevresel faktörlerin esansiyel hipertansiyonun oluşumunda %30-70 gibi bir oranda önemli rol oynadığı ve genetik faktörlerden birden fazla genin sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. İnsanda kan basıncı varyasyonunun %25-40' ı genetik faktörler ile belirlenir (Şekil 1.2.). Buna bağlı olarak, kan basıncının yükselmesinde ve düşmesinde genlerin rol aldığı kaydedilmiştir (Lifton 1996, Oparil ve Weber 1999).



Şekil 1.2. Hipertansiyonda etkili faktörler

Kan basıncı artışı sistemik damar direncindeki kalıcı artışa bağlıdır ve bunun için öne sürülen pek çok neden vardır. Kalp debisi artışı, periferik direnç artışı, sıvı ve kan hacmi artışı stres ve aşırı sempatik aktivite gibi etkileri barındıran mekanizmaların yanında renin-anjiyotensin sisteminin katkısı da üzerinde durulan bir diğer konudur (Ross 1990, Cooke ve Dzau 1997, Kaplan 1998). Bunun yanında endotel dokusunun işlevindeki bozulma da esansiyel hipertansiyonun nedenleri arasında sayılabilir. Endotelden salgılanan vazoaaktif maddeler lokal kan akımı kontrolünde önemlidir (Kornitzer ve ark 1999). Bunlardan biri olan Nitrik oksit (NO)'in azalması veya eksikliği de hipertansiyon oluşumuna katkıda bulunan etkenlerden biridir (DeArtinano ve Gonzalez 1999).

1.1.5. Esansiyel Hipertansiyonun Fizyopatolojisi

Arteriyel kan basıncı kalp debisi ve sistemik vasküler direnç tarafından belirlenir ve şğıdaki şekilde formüle edilebilir:

$$\begin{aligned} \text{Arteriyel kan basıncı} &= \text{Kardiyak debi} \times \text{Sistemik vasküler direnç} \\ \text{Kardiyak debi} &= \text{Atım hacmi} \times \text{Kalp hızı} \end{aligned}$$

Arteriyel kan basıncının yükselmesi kalp debisinde ve/veya sistemik vasküler dirençte artma sonucunda ortaya çıkar (Kaplan 2001)

Kalp atım hacmi ve periferik vasküler direnci etkileyen birçok faktör vardır. Kalp atım hacmi; preload (kalbin ön yükü), afterload (kalbin ard yükü) ve kontraktilite gibi faktörlerden etkilenir. Periferik vasküler direnç ise; damar çapı, damar duvarının yapısı ve damar düz kas tonusundan etkilenir. Hipertansiyonun başlangıç dönemlerinde ve hafif hipertansiyonda kalp debisi, kalp hızı ve sol ventrikül kontraktilitesinde artma ve periferik vasküler dirençte yükselme görülür. Bu dönemde hastalarda hiperkinetik olarak adlandırılabilen bir hemodinami söz konusudur. Yıllar geçtikçe ve özellikle hipertansiyonun tedavi edilmediği durumlarda periferik vasküler dirençte artma ve kalp debisinde azalma ortaya çıkar. Yani hiperdinamik tablo yavaş yavaş geriler (Ren ve ark 1994)

1.1.6. Esansiyel Hipertansiyonda Rol Oynayan Etkenler

- 1) Hemodinamik değişiklikler
 - a. Kardiyak değişiklikler (hiperkinetik dolaşım, sıvı volüm artışı, kardiyak hipertrofi, otonöregülasyon)
 - b. Periferik arter değişiklikleri (vazokonstriksiyon, yapısal değişiklikler, damar duvarı/lümen oranında artış, yeniden yapılanma)
- 2) Genetik etkenler
- 3) Aşırı tuz alımı
- 4) Renal sodyum retansiyonu
 - a. Basınç -Sodyum ilişkisinin değişmesi (Guyton hipotezi)
 - b. Edinsel natriüretik hormon (Na fazlalığı)

- c. Renin ve nefron heterojenitesi
- d. Azalmış nefron kütlesi
- 5) Renin - anjiyotensin sistemi değişiklikleri
- 6) Stres ve aşırı sempatik aktivite
- 7) Hücre membran değişiklikleri
 - a. İyon transportundaki değişiklikler
 - b. Hücre membranındaki anormallikler
- 8) Endotel disfonksiyonu
 - a. Nitrik oksit azalması
 - b. Endotelin artışı
- 9) İnsülin rezistansı ve hiperinsülinemi
- 10) Obezite
- 11) Diğer muhtemel mekanizmalar
 - a. Anormal steroid metabolizması
 - b. Vazoaktif peptidler
 - c. Prostaglandinler
 - d. Medüllipin:Renomedüller vazodepressör lipid
- 12) Katkıda bulunan faktörler
 - a. Fötal etkenler
 - b. Kalsiyum-paratiroid hormon metabolizması
 - c. Diğer mineral değişiklikleri
 - d. Sigara
 - e. Alkol
 - f. Fiziksel inaktivite

Yukarıdaki faktörlerin eşzamanlı ve karmaşık etkisi hipertansiyon gelişimine neden olur (Kornitzer ve ark 1999). Esansiyel hipertansiyonun nedeni bilinmemekle birlikte; kalp debisi, sistemik damar direnci, sodyum dengesi ve kan volümünü düzenleyen kontrol mekanizmalarının bozulması ile ortaya çıkmaktadır (Kaplan 2001, Yeksan 2005).

1.1.7. Esansiyel Hipertansiyonun Genetiği

Esansiyel hipertansiyonun veya kan basıncı varyasyonunun moleküler temelini belirlemek karmaşık ve zor bir süreçtir. Hipertansiyonla ilgili genetik çalışmalarda en büyük problem, kan basıncının biyolojik değişkenliğidir. Fenotip belirlenmesi; kan basıncı ölçüm tekniğinin, ölçüm yapacak kişilerin eğitiminin, tekrarlanan ölçümlerin veya 24 saatlik kayıtların dikkatli bir şekilde standardizasyonu ile daha doğru olarak gerçekleştirilebilir. Ancak, kan basıncında diurnal, mevsimsel ve postural varyasyonlar, diyet ve uyanıklık durumu ile ilişkili değişkenlik, optimal ölçüm tekniklerine rağmen fenotipin belirlenmesinde zorluklar oluşturmaktadır. Diğer taraftan bazı ailelerde kan basıncı yüksekliğinin daha sık gözlemlendiği ve buna babaların katkısının annelerden daha fazla olduğu bildirilmektedir. Bu ailelerde hipertansiyon, ortak çevre etkisine bağlı olabileceği gibi genetik bir faktöre de bağlı olabileceği vurgulanmaktadır. Hem çevresel hem de genetik mekanizmaların kan basıncı yüksekliğine neden olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır (Mongeau ve ark 1986, Lifton ve ark 1996). Kalıtsal olan hipertansiyonda genetik faktörlerin etkisinin %30 ile %60 arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Harrap 1994). Hipertansiyonun moleküler ve genetik heterojenitesine ek olarak fenotip belirlenmesindeki bu zorluklar nedeniyle hipertansiyondan sorumlu genler (major hipertansif genler) henüz tanımlanmamıştır. Buna karşılık yüksek ve düşük kan basınçlarının genetik temeli tanımlanmıştır.

Kan basıncı varyasyonunun kalıtsal özelliği, kan basıncının ailesel agregasyonu, monozigot ve dizigot ikizlerde kan basıncı karşılaştırması ile biyolojik ve evlat edinilmiş kardeşlerin kan basıncını karşılaştıran epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalar, akrabalar arasında kan basıncı ilişkisinin, kan basıncı sınırları boyunca görüldüğünü ortaya koymuştur. Yüksek kan basıncı olan anne babaların yüksek kan basıncı; düşük kan basıncına sahip anne babaların ise düşük kan basıncına sahip çocuklarının olma eğilimleri vardır. Bu bulgular, bir insanda kan basıncının, her birisi kan basıncını yükseltme etkisine sahip bir dizi gen ile belirlendiği kavramını desteklemektedir. Kan basıncı varyasyonundan sorumlu olan spesifik genleri tanımlamak için çeşitli yaklaşımlar kullanılmıştır. Bunlar, linkaj çalışmaları ve aday genlerin direkt olarak fonksiyon analiz çalışmalarıdır (Crawford ve DiMarco 1997).

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmeler sonucunda birçok hastalığa neden olan moleküler mekanizmalar açıklanmıştır. Günümüzde bazı nadir gözlenen kalıtsal hastalıklarda hipertansiyonla genler arasındaki ilgi tanımlanmıştır. Tek gene ait mutasyonun tanımlandığı hipertansif olgular genellikle adrenal ve renal kaynaklı hipertansiyon olgularıdır (Lalovel 2001).

Kan basıncının genetik yönü aile çalışmaları ile incelenmektedir. Aile çalışmalarında en değerli veri tek yumurta ikizleri ve evlat edinilmiş çocuklardan elde edilmektedir. Evlat edinilmiş çocuklar çevresel etkileri, tek yumurta ikizleri ise genetik nedenleri çalışmak için uygun denekler oluşturmaktadır. Ancak hemen hatırlatmak gerekir ki her iki modelde kusursuz değildir. Evlat edinilmiş bireylerde genetik, tek yumurta ikizlerinde ise çevresel nedenler tümüyle dışlanamaz (Mongeau ve ark 1986, Harrap 1994). Yapılan bir araştırmada, evlat edinme çalışmasında sistolik kan basıncının karı koca arasındaki ilişkisi 0,15 gibi düşük, evlat edinilmiş çocuklarla ebeveynler arasında ise 0,09 gibi çok daha düşük bir değerdir. Biyolojik çocuklar ile ebeveynler arasındaki bu ilişki 0,27' ye çıkmakta, aynı anne ve babadan olma kardeşler arasında ise 0,38 gibi yüksek bir değere ulaşmaktadır. Anne veya babaları farklı olan kardeşler arasında 0,16 olarak bulunan ilişki evlat edinilmiş çocuklarla ailenin biyolojik çocukları arasında da 0,19 olarak bulunmaktadır. Bu bulgular benzer genetik yapıyı taşıyan bireylerde benzer fenotip yapının ortaya çıktığını göstermektedir.

Diastol kan basıncının karı koca arasındaki ilişki 0,18 gibi düşük, evlat edinilmiş çocuklarla ebeveynler arasında ise 0,13 gibi daha düşük bir değerdir. Ailenin bu çocukları ile ebeveynleri arasındaki bu ilişki 0,26 ya çıkmakta aynı anne babadan olma kardeşler arasında ise 0,53 gibi yüksek bir değere ulaşmaktadır. Anne ve babaları farklı kardeşler arasında 0,29 olarak bulunan ilişki, evlat edinilmiş çocuklarla ailenin biyolojik çocukları arasındaki değer ise 0,27 olarak bulunmaktadır (Mongeau ve ark 1986, Norman ve Liberman 1998).

Çift yumurta ikizlerinin kan basıncı ilişkisi, ikiz olmayan kardeşlere göre daha yüksektir. Fakat bu genetik faktörlere bağlı olabileceği gibi aynı çevreyi uzun süre paylaşmaya da bağlı olabileceği kabul edilmektedir. Anne ve babadan biri hipertansif

ise çocuklarda hipertansiyon gelişme riski iki kat artmaktadır (Norman ve Liberman 1998).

Basit bir hastalık olmayan hipertansiyon pek çok patolojik sürecin başlamasına yol açar. Pek çok risk faktörü hipertansiyon gelişimine katkıda bulunabilir. Yaş ve cinsiyet etkenleri dışında genetik, psikososyal ve metabolik faktörler de kalıcı kan basıncı yükselmesine neden olabilir. Genetik ön koşullar aynı ailedeki hipertansiyon gelişim riskini genelde artırır ve kalıtsal geçiş söz konusudur.

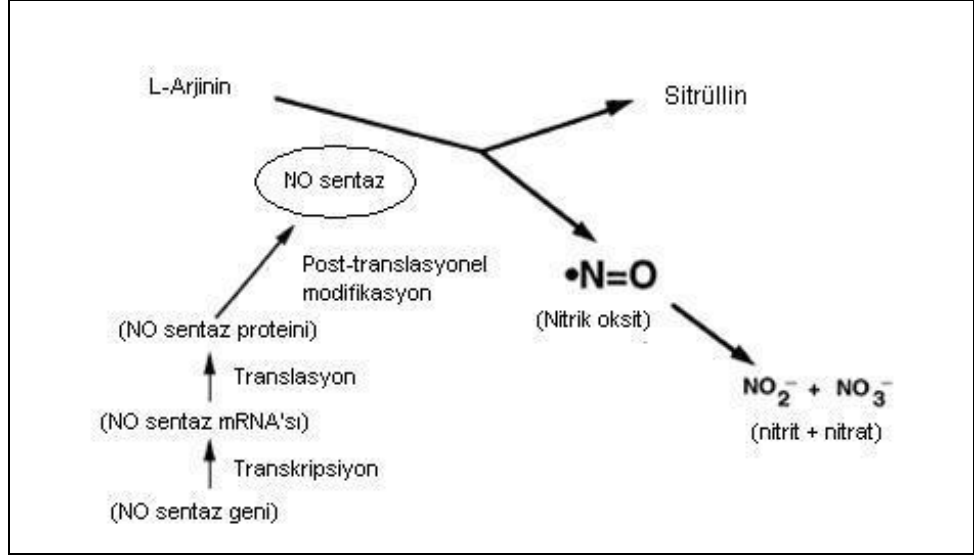
Hipertansiyonun belli formlarında vazokonstriktör maddelerin arttığı bilinmektedir. Endojen vazodilatatör olan NO'nun boşalmasına bağlı olarak hipertansiyon meydana gelmektedir. Ayrıca anjiyotensin II' nin fizyolojik antagonisti olması ve renin salınımını düzenlemesi nedeniyle nitrik oksit hipertansiyon üzerinde etkilidir (Soydan 1996).

1.2. Nitrik Oksit

1.2.1. Nitrik Oksitin Yapısı ve Fonksiyonları

Nitrik oksit, bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşan, eşleşmemiş elektron içeren, pek çok reaksiyonu etkileyen zayıf bir oksidan veya indirgeyici bir bileşen olarak görev yapan, serbest radikal olarak da nitelendirilen, reseptöre bağımlı olmadan kolayca diffüze olabilen, renksiz, gaz halinde bulunan inorganik bir moleküldür (Nathan 1992, Lowenstein ve ark 1994, Marin ve Rodriguez-Martínez 1997, Geller ve Billiar 1998).

Nitrik oksit, oksijenle oksitlenerek NO₂ (nitrit) ve NO₃ (nitrat) oluşturabilmektedir. Dolayısıyla eşleşmemiş elektronu N ve O atomları üzerinde yer değiştirerek rezonans stabilitesi özelliği kazanabilmekte ve böylelikle membranlardan kolayca diffüze olabilmektedir (Lowenstein ve ark 1994) (Şekil 1.3). Oksijene göre hemoglobine 3000 kat daha fazla afinite ile bağlanabilmektedir. Ancak oksihemoglobin, NO'ı nitrata (NO₃) oksitleyerek bu etkisini kısa sürede nötrleştirmektedir (Hegesh ve Sniloah 1982, Geller ve Billiar 1998).



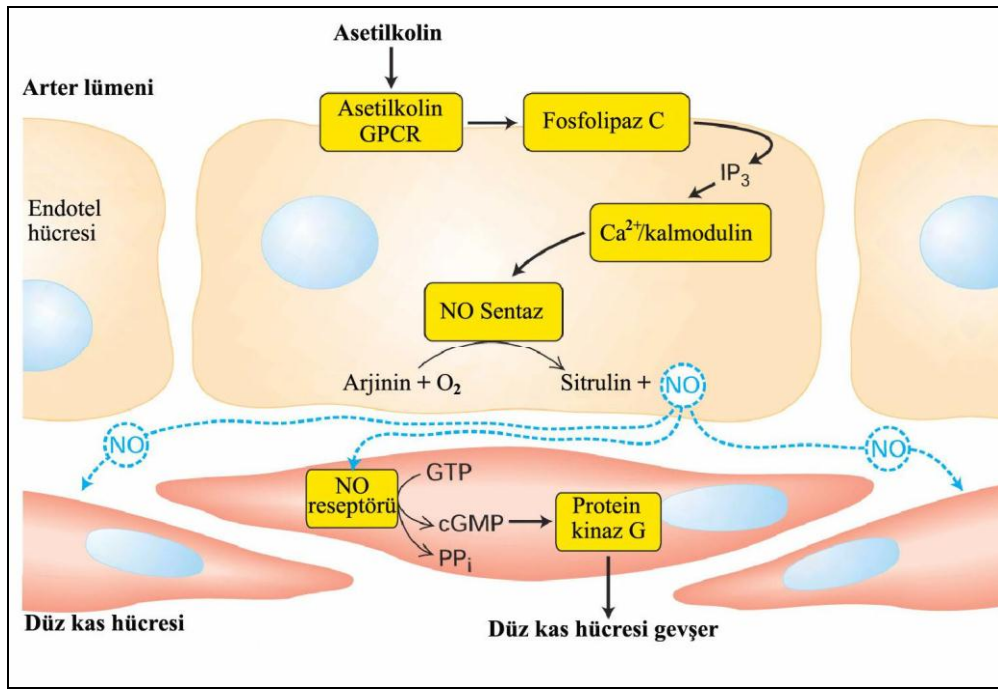
Şekil 1.3. NO'nun L-argininden NOS geni tarafından sentezi

Nitrik oksit, 1998 yılında kardiyovasküler sistemde bir sinyal molekülü olarak keşfedilmiştir. NO'nun bu özelliğinin tanımlanmasından sonra vasküler etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış ve NO/eNOS hücre biyolojisi ve moleküler biyolojide önemli araştırma konularından biri haline gelmiştir (Bogdan 2001, Barbato ve Tzeng 2004)

Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken, NO'nun düşük konsantrasyonları çok önemli fizyolojik olaylarda rol oynayabilir. Ancak gereğinden fazla konsantrasyonlarda sentezlendiğinde hücrelerde patolojik olaylar meydana getirebilmektedir (Grisham 1997).

Nitrik oksit çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik işlemlerde yer alan, organizmanın hemen her yerinde bulunan biyolojik bir mediatördür (Lucas ve ark 2000). NO karakteristik özellikleri sebebi ile ideal mesajcı molekül olarak nitelendirilmektedir. Kimyasal yapısındaki paylaşılmayan elektronu ile yüksek derecede reaktif bir moleküldür (yarılanma ömrü 2-30 saniye) ve sinyal iletimi sonrasında kendiliğinden nitrite dönüşmektedir (Lowenstein ve ark 1994). Hücreler arasında sinyal iletiminde yer alan hormon, nörotransmitter ve büyüme faktörleri gibi moleküllerin çoğu sıklıkla plazma membranı ile bağlantılı olan spesifik protein reseptörleri olarak görev yaparken, NO üretildiği hücreden dışarı diffüze olmakta ve spesifik moleküler hedeflerinin bulunduğu hedef hücrenin içine girerek etkisini göstermektedir (Lowenstein ve ark 1994, Jeremy ve ark 1999, Lucas ve ark 2000).

Nitrik oksit, damar düz kasında Guanilat Siklazı (GC) aktive ederek siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyini artırır. İntraselüler Ca^{+2} düzeyini ve miyozin hafif zincirinin defosforilasyonunu azaltarak kasın gevşemesine katkıda bulunur. Ayrıca endotel yüzeyindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek endoteli korur. Vasküler düz kas proliferasyonunu engelleyerek, vasküler tonusun kontrolünde de önemli bir role sahiptir (McDonald ve ark 2004).

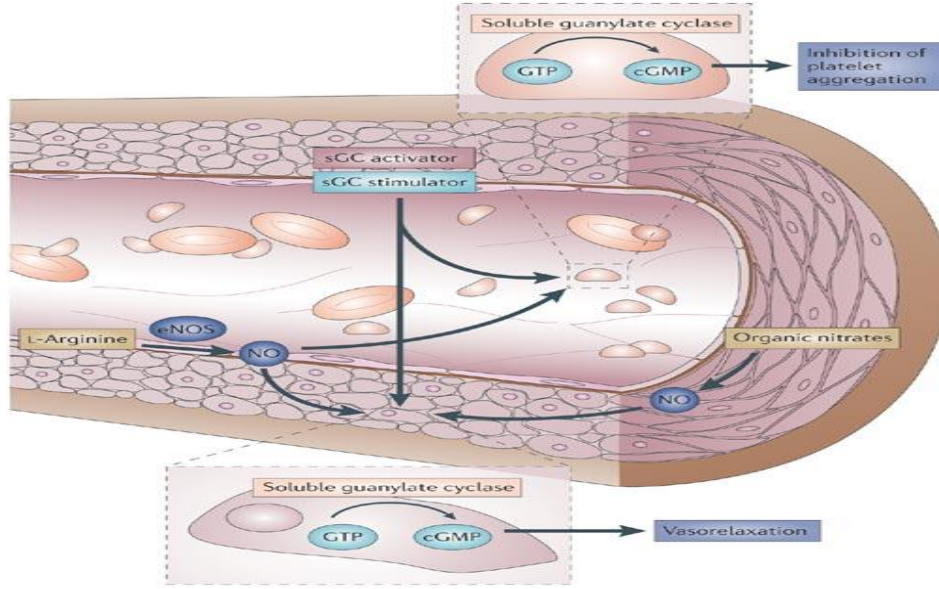


Şekil 1.4. Nitrik oksit etki mekanizması

Endotel hücrelerinden salınan NO, düz kas hücrelerine difüzyon ile geçer. Kas hücresi içerisinde artan NO konsantrasyonu, cGMP artışını tetikleyerek protein kinaz G'yi aktive eder (Şekil 1.4). Hücre içi Ca^{2+} düzeyi azalır ve kas hücresi gevşer (Powell ve Higman 1994, Alvarez ve ark 2001, Güneş 2003).

Nitrik oksit sentazı inhibe eden çeşitli arginin türevlerinin deney hayvanlarına verildiğinde gözlenen kan basıncındaki ani yükselme, NO'nun fizyolojik rolünü desteklemektedir. Normal kan basıncının korunması için NO'nun tonik salınımı gerekmektedir.

NO'nun cGMP aracılığıyla, trombositlerin hem agregasyonunu hem de adezyonunu inhibe ederek, trombus oluşumunu engellediği ve trombus oluşmuş ise vazodilatasyon ile lokal hemeostaza katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 1.5) (Katusic ve ark 2003).



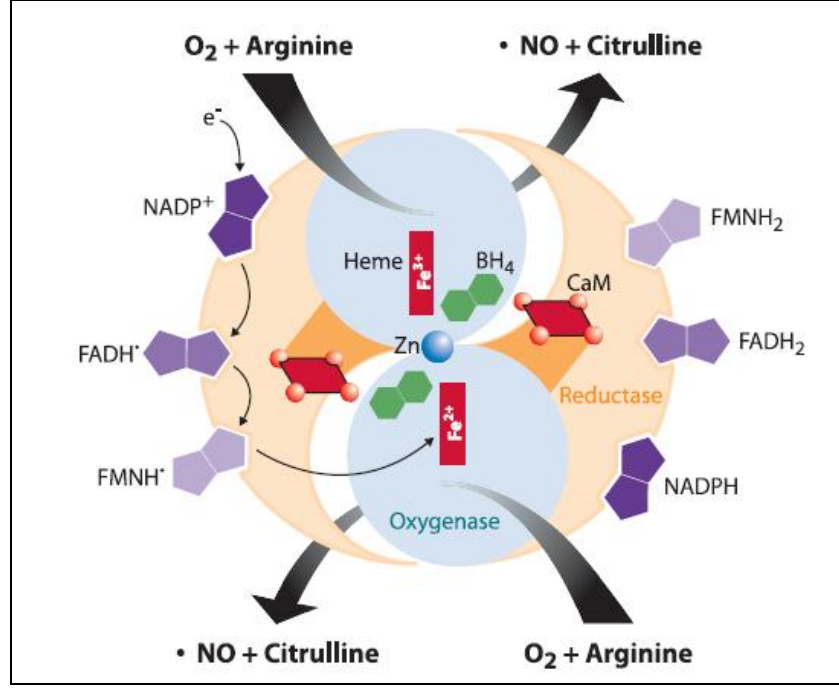
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Şekil 1.5. eNOS'un damar duvarındaki fonksiyonu.
<http://www.nature.com/nrd/journal/v5/n9/images/nrd2038-f4.jpg>

1.2.2. Nitrik Oksitin Sentezi

NO, pek çok hücrede sitokrom p-450 redüktazın homoloğu nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından, endojen bir aminoasit olan L-argininin terminal guanidin grubunun NO'ya çevrilmesiyle sentezlenir (Marin ve Rodriguez-Martinez 1997, Cylwik ve ark 2005). Bu reaksiyon sırasında moleküler O₂ ile kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotit (FAD), flavin mononükleotit (FMN), tetrahydrobiopterin (BH₄) ve hem kullanılır.

NO sentezi iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamak, L-argininin N^G-hidroksi-L-arginine hidrosilasyonudur. İkinci basamak ise, N^G-hidroksi-L-argininin, L-sitrülin ve NO'ya oksidasyonudur (Albrecht ve ark 2003). Sentez sonunda NO, nötralize edilerek çok kısa sürede nitrit ve nitrata dönüştürülür (Juan ve ark 2006) Şekil 1.6' da NO'nun sentezi gösterilmiştir.



Şekil 1.6. NO'nun sentezi

Asetilkolin, histamin, trombin, serotonin, ADP, bradikinin, norepinefrin, substant P ve izoproterenol gibi çeşitli agonistler, endotelden NO sentez ve salınımını arttırabilmektedirler (Cannon 1998, Carr ve Frei 2000, Sessa 2005). Bununla birlikte, NO salınımı için en fizyolojik agonist, süregelen shear stresdir (Crabos 1997)

1.2.3. Nitrik Oksit Sentetaz İnhibitörleri

Nitrik oksit sentetaz inhibitörleri biyolojik sistemlerde NO'in rollerini araştırmada çok yararlı olmuşlardır. Nitrik oksit biyosentezinde L-arginin, NO'ya dönüşmektedir. Buna karşılık çeşitli L-arginin analogları ise L-arginin yerine geçerek NO yapımını kompetitif bir yolla önleyebilirler (Moncada ve ark 1991, Nathan 1992, O'Donnell ve Liew 1994).

Nitro-arginin (NNA) kovalent bağ oluşturarak NOS proteinini değiştirmeden irreversibl inhibisyon yapar. L-nitro monometil arginin (L-NMMA) NOS inhibitörlerinin prototipidir ve bir arjinin analogudur. NG-nitro-L-arjinin metilester (L-NAME) de arjinin analogu olarak NO sentezini geri dönüşümlü olarak inhibe ederek glukokortikoidlerin vitro olarak iNOS'in indüklenmesini önlerler. Ancak indüklenmiş iNOS aktivitesi üzerine etkileri yoktur (Stefanovic-Racic ve ark 1993).

1.2.4. Nitrik Oksitin Biyolojik Etkileri

Nitrik oksidin tüm vücutta çok farklı etkileri vardır. İnvivo çalışmalar kan akımı ve basıncının düzenlenmesinde NO'nun önemli rolü olduğunu göstermiştir (Stefanovic-Racic ve ark 1993, Usmar ve Radomski 1994).

NO, cGMP aktivasyonu ile damar düz kasında gevşeme ve damar direncinde azalmaya neden olur (Vanhoutte 1995). Bunun anlamı da kan basıncının düşmesidir. Nitrik oksidin sistemik kan basıncı yanında kan akımını ayarlayabildiği kabul edilmektedir (Bedarida ve ark 1993). Hipertansiyonda tuz alımı, Renin-Anjiyotensin sistemi, genetik ve çevresel faktörler gibi birçok karmaşık olayın rol oynadığı bilinmekle beraber, L-arjinin/NO sisteminde de bir anormallik olabileceği hipotezini destekleyen kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır. Çoğu hayvan ve insan modelinde bozuk NO salınımı, hipertansif görülmektedir. Nitrik oksit eksikliği, hipertansiyon ve ateroskleroz gibi patolojilerin gelişmesinde rol oynamaktadır (Moncada ve ark 1989, Nathan 1992).

Fizyolojik etkilerin ortadan kalkmasıyla endojen NO'nun azalması sonucu hipertansiyon ve ateroskleroza yatkınlık oluşmaktadır (Stefanovic-Racic ve ark 1993, Corbett ve McDaniel 1995).

1.2.5. Kardiyovasküler Sistemde Nitrik Oksit

Vasküler endotelin esas görevi trombosit ve diğer kan hücrelerinin adezyon ve agregasyonunu engellemek, kan damarlarını yeterli akımı sağlayacak kadar dilate tutmaktır. Bunu sağlamak için sentezlediği maddelerden biri NO'dur. NOS inhibitörlerinin sistemik kullanımları küçük arter ve arteriollerde kan basıncını artırır. Bu durum damar endotelinde yapılan NO'nun kan basıncını ve kan akımı düzenlemedeki rolüne işaret eder (Anggard 1994, Güray ve ark 1997)

Endotel kaynaklı NO'nun damar bütünlüğünün korunması, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasının ve düz kas proliferasyonunun önlenmesi gibi etkilerinin yanında trombosit adezyonu ve agregasyonunu inhibe etme etkileri de vardır. Bu yüzden kardiyovasküler hemostazda kritik rolü olan endotel kaynaklı NO'nun

aterogenezi inhibe ettiği söylenbilir. NO bu etkisini, prostasiklinle sinerjist bir etkileşimle sağlar. Hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara içme ve diyabet gibi ateroskleroza zemin hazırlayan faktörlerin tümü, anormal endotel fonksiyonları ve biyoaktif NO seviyelerinde azalma ile birlikte dir (Türkoz ve zerol 1997, Aladağ ve ark 2000).

1.3. eNOS Enzimi ve eNOS Gen Polimorfizmleri

1.3.1. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enzimleri

NOS'un  izoformu tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi yapısal, diğeri ise sitokin ve diğer bileşikler tarafından uyarılabilen formudur. Yapısal izoformlarından biri endotelial NOS (eNOS veya NOS3), diğeri ise nöronal NOS (nNOS veya NOS1) olarak adlandırılmıştır (Marin ve Rodriguez-Martinez 1997). İndüklenen izoformu (iNOS veya NOS2) ise hücrede infeksiyon ve inflamasyon gibi anormal durumlarda uyarılır (Wang ve Wang 2000).

Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS)

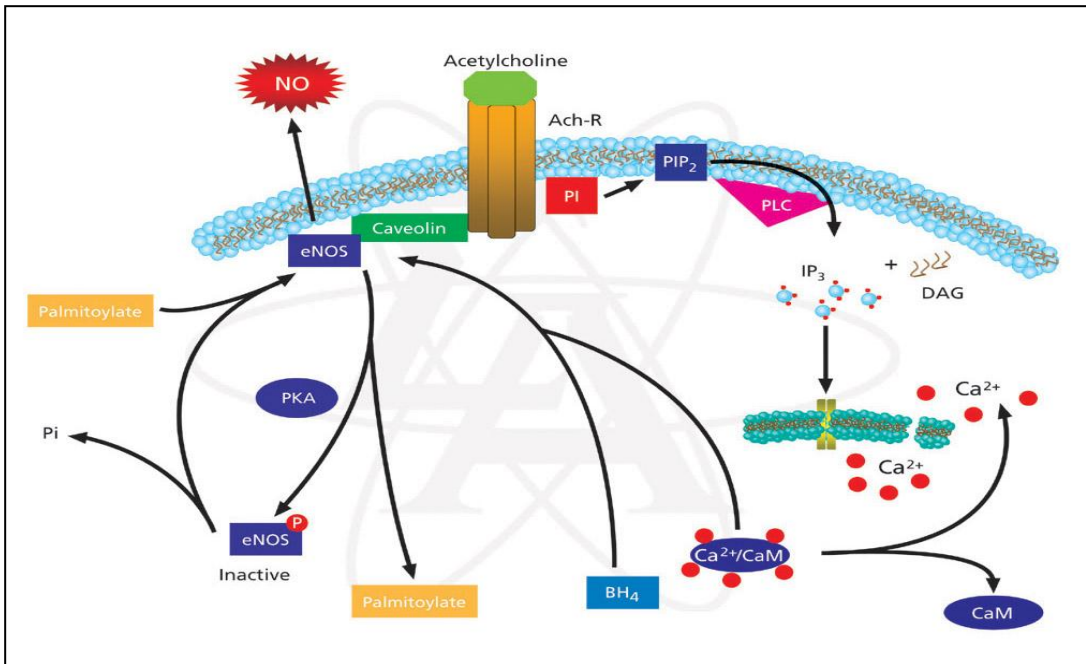
İlk kez endotel hücrelerinde tanımlanan eNOS enzimi, kalsiyum ile aktif hale gelir. eNOS ve nNOS'un sentez süresi kısa olup, üretilen NO miktarı çok düşüktür. Bunun sebebi, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun azalmasıyla enzimin inaktif duruma geçmesidir (Aladağ ve ark 2000).

eNOS'un aminoasit dizilimi nNOS ile % 60 oranında benzerlik göstermektedir. FAD, FMN, NADPH, kalmodulin ve protein kinaz A fosforilasyon bölgeleri hem eNOS hem de nNOS'da benzerlik gösterir (Anggard 1994, Forstermann ve ark 1994). eNOS'un NH₂ terminalinde, nNOS'da bulunan 220 aminoasitlik bölge eksiktir ve eNOS 2. pozisyonunda glisinin N-miristollenmesi ile 15. ve 26. pozisyonlarında post translasyonel sisteinin palmitoillenmesi ile modifiye edilmiştir. Bu durum eNOS'un membranla ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Cooke ve Dzau 1997, Albrecht ve ark 2003).

eNOS, 134 kDa'luk iki benzer monomerden oluşan bir dimerdir. eNOS monomeri, fonksiyonel olarak iki farklı bölgeye, N-terminal oksijenaz bölgesi ve

C-terminal redüktaz bölgesine sahiptir. eNOS enzimi sadece dimerik formda fonksiyoneldir (Cooke ve Dzau 1997, Albrecht ve ark 2003). Redüktaz bölgesi, NADPH, FAD ve FMN flavinleri ve kalmodulin için bağlanma bölgeleri içerir. Katalitik bölge içeren N-terminal oksijenaz bölgesi, L-arjinin, BH4 ve hem için bağlanma bölgeleri içerir. Redüktaz bölgesi, flavinlerden oksijenaz bölgesine bağlı “hem” grubuna elektron transfer eder.

Enzimin dimerik hale gelmesi “hem” molekülünün bağlanması ile başlar; hem’in yokluğunda enzim monomer halde kalır. Dimerik halde enzime BH4 bağlanabilir ve dimeri kararlı hale getirir. Kararlı hale geçiş aynı zamanda çinko iyonları ile de sağlanır. eNOS dimerinin fonksiyonel aktivitesi BH4 moleküllerinin bağlanma sayısına bağlıdır. BH4 bağlanmamış bir eNOS dimeri O_2^- üretmeye eğilimlidir. BH4 molekülünün birinin bağlanması, eNOS dimerinin NO ve O_2^- ‘nin her ikisini üretme eğilimi ile sonuçlanır. Yüksek seviyede BH4 varlığı ise doymuş bir dimer oluşturarak yalnızca NO sentezleyen bir enzim oluşmasını sağlar. Hücre içi artan Ca seviyeleri kalsiyum/kalmodulin kompleksinin oluşumuna yol açar ve bu kompleks kaveolinle yer değiştirerek, NOS enzimidaki kalmodulin bölgesine bağlanır ve enzimi aktifleştirir (Cooke ve Dzau 1997, Albrecht ve ark 2003). Şekil 1.7’de eNOS’un etki tarzı gösterilmiştir.

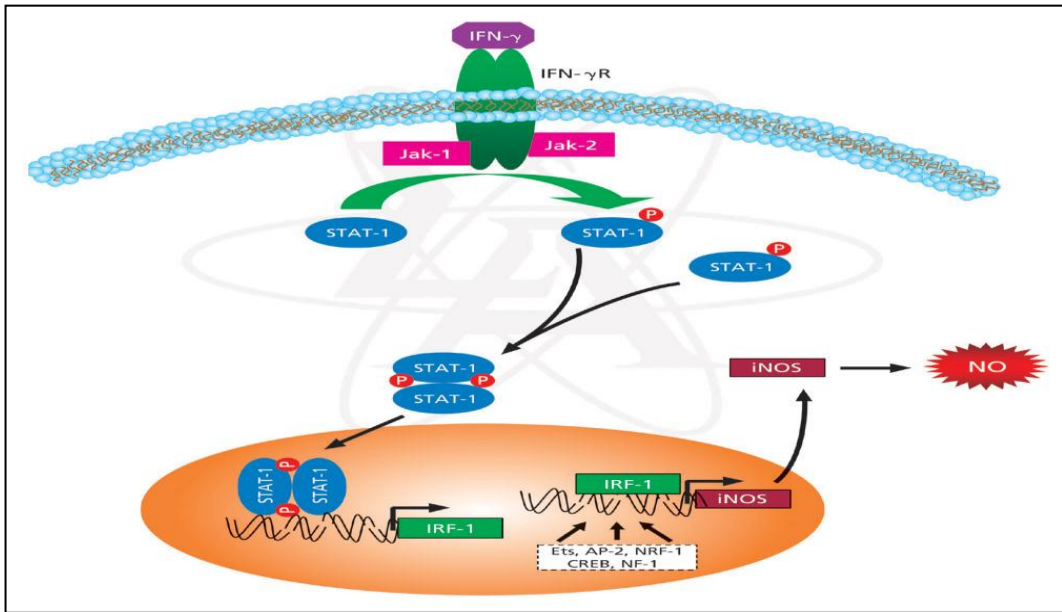


Şekil 1.7. eNOS enziminin etki mekanizması (www.sigmaaldrich.com)

İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)

130 kDa'luk sitozolik bir enzimdir (Cooke ve Dzau 1997, Marletta ve ark 1998). Makrofaj, endotel hücresi, nötrofil ve düz kas hücresi gibi pek çok hücre tipinde sitokinler, endotoksin ve lipopolisakkarit gibi bakteriyel ürünlerle uyarılır (Sethi ve Dikshit 2000, Blaise 2005). eNOS ve nNOS gibi aktivasyon için eksojen kalsiyum ve kalmoduline bağımlı olmadığı için aktivitesi uzun sürer ve fazla miktarlarda NO üretimine yol açar (Cooke ve Dzau 1997, Blaise 2005).

Makrofajlardan salınan NO, yabancı mikroorganizmalara karşı nonspesifik bir savunma yapar. Bunun yanısıra artmış NO'nun doku tahribatı yaparak damar geçirgenliğini artırdığı ve septik şoktaki vazodilatasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir. NO sentezinin tamamen bozulması da inflamasyonu hızlandırmaktadır (Bruhwyler ve ark 1993, Minc-Golomb ve ark 1994, Nathan 1997). Şekil 1.8'de iNOS'un etki mekanizması gösterilmiştir.

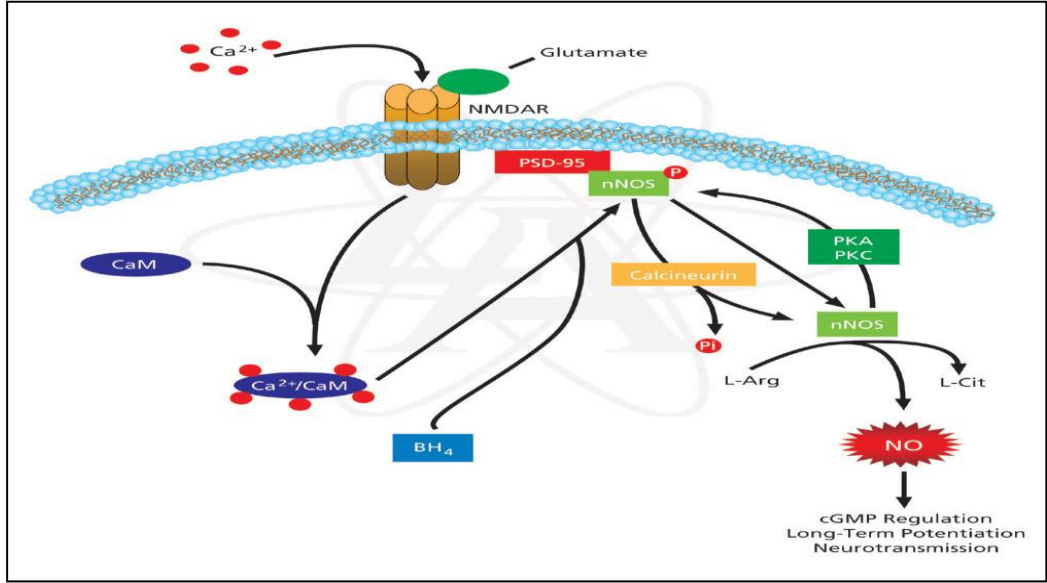


Şekil 1.8. iNOS enziminin etki mekanizması (www.sigmaaldrich.com)

Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS)

160 kDA'lık bir polipeptiddir ve sitokrom P₄₅₀ ile %36 benzerlik göstermektedir. NADPH, FAD, FMN ve kalmodulin için bağlanma bölgesi içermektedir (Bruhwyler ve ark 1993, Stuehr ve Griffith 1994). nNOS başta beyin, spinal kord, sempatik gangliyon gibi sinir sisteminde bulunur (Cekmen ve ark 2001).

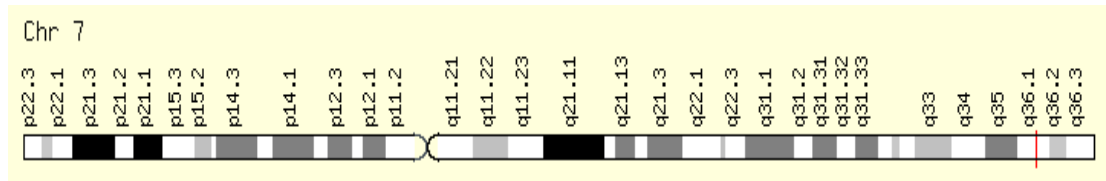
nNOS; solunum fonksiyonlarında, gastrointestinal sistem (GİS) motilitesinde, tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde rol alır (Şekil 1.9) (Aladağ ve ark 2000).



Şekil 1.9. nNOS enziminin etki mekanizması (www.sigmaaldrich.com)

1.3.2. eNOS Geni ve Polimorfizmleri

Endotelial nitrik oksit sentaz geni 7q 32-q terminal (ter) bölgesinde yer alır (Şekil 1.10). 21 kb uzunluğunda ve 26 exon içermektedir (Kim ve ark 2003). eNOS geni 1203 amino asitten oluşan eNOS enziminin transkripsiyonundan ve sentezinden sorumludur.



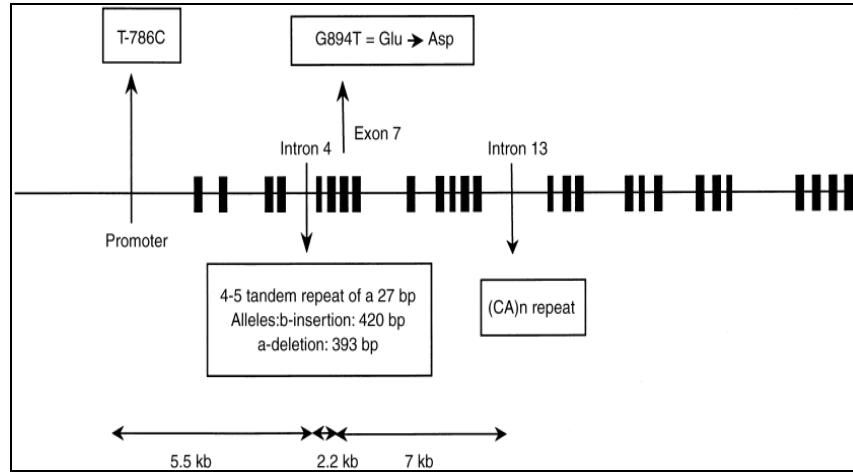
Şekil 1.10 eNOS geninin yerleşimi

Bu gende meydana gelecek polimorfizm NOS'da üretim aşamasında bir bozukluğa yol açar ve devamında bir hastalık süreci gelişir (Marsden ve ark 1993).

1990 yıllarının ortalarında eNOS geninin özellikleri bulunduğundan beri bu genin pek çok özgün allelik polimorfizmleri tanımlanmıştır ve kardiyovasküler hastalıklarla muhtemel bağlantıları araştırılmıştır (Suvara ve ark 2001).

Bugüne kadar koroner arter hastalığı, myokard infarktüsü, hipertansiyon, strok ve renal hastalıklar gibi pek çok vasküler bozukluk eNOS geni polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur (Johanning ve ark 2001).

eNOS geninin dizisi belirlendikten sonra DNA dizi çalışmaları ile promoter bölgede, exonlarda ve intronlarda pek çok dizi varyasyonları rapor edilmiştir (Wang 2000, Casas ve ark 2004, Gerritsen 2005). İntron 4’de tekrar eden tandem değişkeni sayısı (Variable Number of Tandem Repeat-VNTR), intron 13’de CA (Cytosine-Adenin) mikrosatellit tekrarları ve birçok tek nükleotit polimorfizmler (Single Nükleotid Polymorphism-SNP) yer almaktadır. (Wang ve ark 1996, Hingorani ve ark 1999). Bu çalışmalarda, en sık gözlenen polimorfizmin ise exon-7’deki G>T olduğu belirtilmiştir (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. eNOS gen polimorfizmleri.

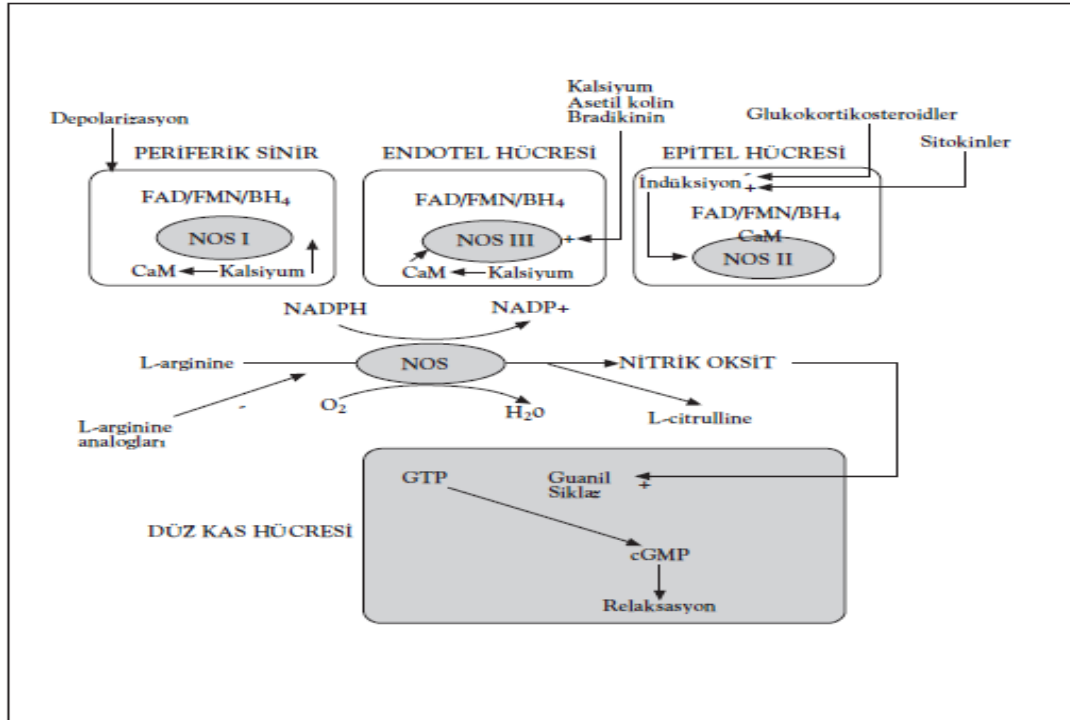
<http://www.nature.com/ki/journal/v57/n2/thumbs/4491346f1th.gif>

Yapısal bir proteinin aminoasit değişimine neden olan G894T polimorfizmi için, exon 7’de guanin yerine timin geçmektedir. Bu değişimin sonucunda da genin 298. kodonunda glutamat yerine aspartat aminoasidi sentezlenmektedir (Hingorani ve ark 1999).

eNOS geninin etki mekanizmasının daha çok vasküler sistemle ilişkili olduğu bilinmektedir. Düz kasların gevşemesini sağlayarak kan basıncını ve kan akış hızını düzenleyerek endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde antiproliferatif etki gösterip trombosit adhezyon ve agregasyonunu inhibe edebilmektedir (Bossenge 1994, Usmar ve Radomski 1994).

Glutamat, glutaminaz ve glutamin sentetaz enzimleri aracılığı ile glutaminden sentezlenmektedir. Glutamatın NO öncüllerinden arginin sentezi içinde önemli bir endojen kaynağı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle eNOS geninin G894T polimorfizmi sonucu, glutamat aminoasidinin sentezlenememesi dolayısıyla da arginin ve nitrik oksit metabolizmasının etkilenebileceği düşünülebilir.

Bazı araştırmacılar; eNOS geninin 298. kodonundaki bu aminoasit değişiminin, endotel hücreleri ve vasküler dokularda da seçimli proteolitik bölünmelere neden olabileceğini bildirmişlerdir (Tesauro ve ark 2000). Eğer bu görüş doğruysa, bölünmüş fragmanların NOS aktivitesini engelleyebileceği ya da bozabileceği tahmin edilmektedir (Şekil 1.12) (Savvidou ve ark 2001, Leeson ve ark 2002).



Şekil 1.12. eNOS'un enzimatik aktivasyonu
<http://toraks.dergisi.org/text.php3?id=312>

1.4. MTHFR (Metilentetrahidrofolat Redüktaz) Enzimi ve MTHFR Gen Polimorfizmleri

1.4.1. MTHFR Enziminin Yapısı ve Görevi

5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi, MTHFR enzim ailesinin bir üyesidir (EC 1.5.2.20). MTHFR enzimi folat metabolizmasında görevli 656 aminoasitten oluşan flavoproteindir (Homberger ve ark 2000).

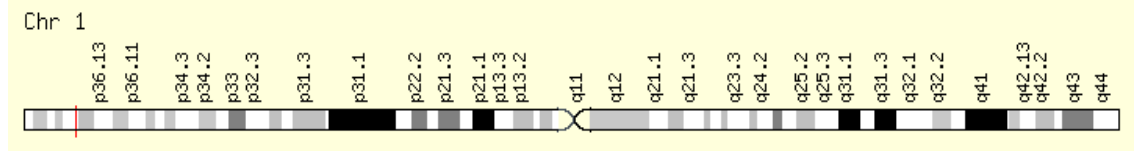
Enzimin katalitik bölgesi olan N-terminal ucu substrat ve koenzimlerin bağlanma kısımlarına sahiptir. N-terminal uca FADH, NADPH ve 5,10- metilentetrahidrofolat bağlanır. FAD koenzimi NADPH'ın metilentetrahidrofolata transferini sağlar. Enzimin regülatör bölgesi olan C-terminal uç bölgesi ise SAM inhibitörünün bağlandığı kısımdır (Fodinger ve ark 2000).

MTHFR enzimi iki alt birimden oluşan homodimer yapıdadır. 70 kDa'luk küçük alt birimlere sahip izoform karaciğerden, 77 kDa'luk büyük alt birimlere sahip izoform ise diğer dokulardan purifiye edilmiştir. Memeli enzimi kendisine nonkovalent olarak bağlı FAD (Flavin Adenozin Dinükleotit) koenzimi içerir. Bu koenzim, NADPH'ın metilentetrahidrofolata transferini sağlar (Morita ve ark 1998, Choi 2003).

MTHFR enzimi, homosisteinin remetilasyon döngüsünde görev yapar. MTHFR enzimi, 5-10 MTHF'ı geri dönüşümsüz olarak 5 MTHF'ye dönüştürür. 5 MTHF, DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. Bunun için 5 MTHF, metil grubunu vererek homosisteinin dönüşümünde rol oynar. 5-10 MTHF ise deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil THF'ye okside olmaktadır. MTHFR geninde meydana gelen bir mutasyon enzim aktivitesini azaltmaktadır (Frosst ve ark 1995). Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5 MTHF düzeyi azalmakta, 5-10 MTHF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır. MTHFR enziminin eksikliği durumunda klinik semptomların geniş bir dağılım gösterdiği anlaşılmaktadır (Lopaciuk ve ark 2001).

1.4.2. MTHFR Geninin Yapısı ve Özellikleri

MTHFR geni, kromozom 1p36.3'de lokalize olmuştur. MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) geriye dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür (Weisberg ve ark 1998, Homberger ve ark 2000).



Şekil 1.13. MTHFR geninin yerleşimi

MTHFR enziminin iki tane düşük fonksiyonlu varyantı vardır. Bunlar 677. nükleotitteki T varyantı (MTHFR C677T) ve 1298. nükleotitteki C varyantıdır (MTHFR A1298C). MTHFR geni C677T polimorfizmi enzimin katalitik bölgesinde, A1298C bölgesi ise enzimin regülatör bölgesinde ortaya çıkmaktadır (Shpichinetsky ve ark 2000).

1.4.3. MTHFR Geni C677T Polimorfizmi

C677T polimorfizmi, MTHFR proteinin N terminal katalitik bölgesini etkileyen 4.ekzonda meydana gelir. MTHFR C677T polimorfizminde, MTHFR enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan C (Sitozin)'in →T (Timin)'e değişimi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonu vardır. Bu mutasyon, genin ürünü olan proteinin 226. pozisyonunda Alanin'in yerine Valin'in geçmesine neden olur. Bunun sonucu MTHFR aktivitesi azalır. Azalan MTHFR aktivitesi, 5-metil tetrahidrofolat düzeyinde azalmaya ve bunun sonucu olarak da homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein düzeyinde artmaya neden olur. MTHFR'nin C677T polimorfizminde, CC (Alanin/ Alanin) homozigot normal, CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir (Demuth ve ark 1998, Schneider ve ark 1998, Sell ve Lugemwa 1999).

677TT varyantına sahip insanların MTHFR aktivitesi %30, 677CT varyantına sahip insanların MTHFR enzim aktivitesi %65 civarındadır. Toplumun yaklaşık %15'i homozigot 677TT varyantına sahiptir. Bu varyant yüksek seviyede homosisteine ve düşük folat düzeyine sebep olur. Bu da vasküler hastalıkların ortaya çıkma riskini artırır.

C677T mutasyonunda, MTHFR aktivitesi, homozigot mutant TT genotipinde, heterozigot CT ve homozigot normal CC genotiplerine göre azalırken, homosistein düzeyi önemli oranda yükselir. MTHFR eksikliğinde, homosisteinden metiyonin oluşumundaki bir bozukluk, organizmayı hem metiyonin (ve S-adenozilmetiyonin) azalmasına hem de homosistein birikiminden doğan toksik etkilere maruz bırakır (Bagley ve Jacob 1998, Lievers ve ark 2001).

1.4.4. MTHFR Geni A1298C Polimorfizmi

MTHFR geninde belirlenen başka bir mutasyon da, enzimi kodlayan genin 7. ekzondaki 1298. nükleotid olan A(Adenin)'in→C(Sitozin)'e değişim sonucu, MTHFR proteinindeki Glutamat'ın→Alanin'e değişimine neden olan nokta mutasyondur ve enzimin C-uç regülatör bölgesinde etkilidir. Bu mutasyonda da diğer mutasyon tipinde olduğu gibi MTHFR aktivitesi azalır. A1298C polimorfizminin, plazma homosistein konsantrasyonundaki artışı MTHFR C677T polimorfizmi kadar etkilemediği ileri sürülse de, bu polimorfizmin önemi henüz tam olarak açıklanamamıştır (Shpichinetsky ve ark 2000, Langman ve ark 2003).

Homosisteinin kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde öneminin yanında A1298C mutasyonunun da kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir (Lievers ve ark 2001, Szczeklik ve ark 2001).

1.4.5. MTHFR Geni C677T ve A1298C Polimorfizm Kombinasyonu

C677T ve A1298C mutasyonunun sıklığı popülasyonlara göre ve yaşla birlikte önemli farklılık göstermektedir (Fodinder ve ark 2000).

C677T ve A1298C mutasyonlarının birlikte heterozigot olduğu durumda, MTHFR enzim aktivitesi, her iki allelin normal homozigot olduğu durumdaki enzim aktivitesinin %50-60'ı kadardır. Bu aktivite, C677T mutasyonunun heterozigot bireylerinin enzim aktivitesinden daha düşüktür. 677CC/1298CC genotipine sahip bireylerde 677CC/1298AA genotipli bireylere göre plazma total homosisteininde azalma olduğu açıklanmıştır. Tek başına C677T homozigot mutasyonlu (TT)

genotipine sahip bireylerde de plazma homosisteini önemli düzeyde artmaktadır. Van der Put ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, her iki mutasyon bakımından çift heterozigot olan (A1298C/C677T) bireylerde total plazma homosistein konsantrasyonunun önemli derecede arttığı görülmüştür (Van der Pu ve ark 1998).

A1298C mutasyonu, MTHFR enziminin C-uç regülatör bölgesinde meydana gelmesine karşılık, C677T mutasyonu genin N-uç katalitik bölgesinde meydana gelmekte ve bu nedenle A1298C mutasyonlu bireylerde MTHFR enzim aktivitesindeki azalma C677T mutasyonlu bireylerin enzim aktivitesinden daha az olmaktadır. A1298C polimorfizminde MTHFR aktivitesinde önemli etkiler görülmesine rağmen ne 1298AC, ne de 1298CC genotipinde artan homosistein düzeylerine rastlanmamıştır (Kim 2000).

677CC/1298AC ve 677CC/1298CC genotiplerinde MTHFR aktiviteleri, 677CC/1298AA genotip enzim aktivitesi ile karşılaştırıldığında sırasıyla %60-92 ve %52-66 olarak bulunmuştur. Heterozigot (677CT/1298AC) genotip durumunda MTHFR aktivitesi ise 677CC/1298AA genotipi ile karşılaştırıldığında, %36-62 olarak bulunmuştur (Lievers ve ark 2001).

1.5. Homosistein

Homosistein proteinlerin yapısına katılmayan, kükürlü bir aminoasittir. Normal olarak diyetle alınmaz. Vücuttaki tek kaynağı esansiyel bir aminoasit olan metionindir. Homosistein, metionin metabolizması esnasında bir ara ürün olarak oluşmakta, serin ve glutasyonu oluşturarak veya tekrar metionine dönüşerek metabolize olmaktadır. Homosistein metabolizması bazı vitaminlerle yakından ilişkilidir ve homosistein metabolizmasındaki değişiklikler ateroskleroz, venöz tromboz, malignite ve nöral tüp defekti gibi pek çok patolojide etkili bir faktör olarak görülmektedir (D'Angelo ve Selhub 1997).

İlk olarak 1969 yılında Mc Cully otopsi sonucunu değerlendirirken, yoğun arteriyel tromboz ve ateroskerozu olan çocuklarda plazma ve idrarda yüksek homosistein düzeylerinin görüldüğünü rapor etmiştir. Bu gözlemlerine dayanarak, yüksek plazma homosistein düzeyleri ile vasküler hastalıklar arasında bir ilişki

olabileceği hipotezini ortaya atmıştır. Bu çalışmayı homosisteinin vasküler hastalıklardaki fizyolojik ve patofizyolojik rolünü araştıran pek çok çalışma takip ve teyit etmiştir. Plazma homosistein düzeylerindeki artışın sonuçta prematüre vasküler hastalıklara (serebral, koroner, periferik) yönelik vasküler lezyonların oluşumunu tetiklediği ve diğer risk faktörlerinin bulunmaması durumunda dahi tek başına risk oluşturduğu öne sürülmüştür (Kang ve ark 1992, Vollset ve ark 2001).

Ağır hiperhomosisteinemi durumları nadir görülürken (1/40000-100000), hafif hiperhomosisteineminin toplumda görülme sıklığı yaklaşık % 5-7'dir. Hafif hiperhomosisteinemili hastalar, genellikle 30-40'lı yaşlarında, tekrarlayıcı arteriyel ve venöz tromboz veya prematüre koroner arter hastalığı oluşana kadar asemptomatiktirler.

Ağır hiperhomosisteinemi vakaları genellikle homozigot enzim defektlerinde, hafif hiperhomosisteinemi vakaları ise genellikle heterozigot enzim defektlerinde veya edinsel nedenlerden meydana gelmektedir (Stampfer ve ark 1992). Homosisteinin aterotrombozis patogenezindeki rolünün moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemesine rağmen vasküler endotel tabakasının vazoprotektif ve antitrombotik özelliklerinin değiştiğini ve dolayısıyla yapısal ve fonksiyonel harabiyetin geliştiğini yoğun araştırmalar göstermektedir (Verhoef ve ark 1999).

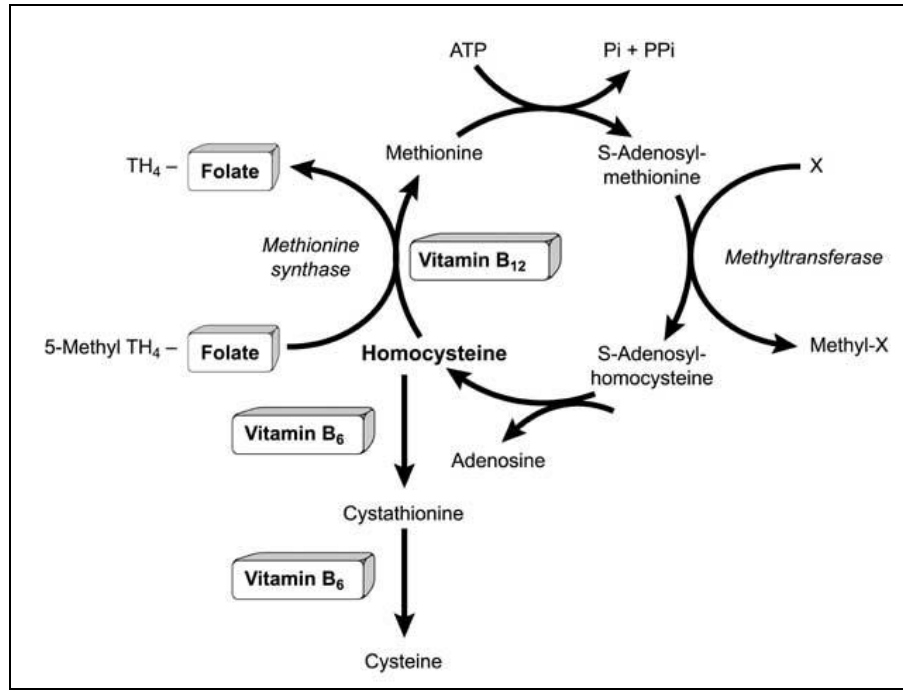
1.5.1. Homosistein Metabolizması

Homosistein, vücuttaki tüm hücrelerde, diyetle alınan metioninden demetilasyon sonucunda oluşan, sülfür içeren yapıda ve esansiyel olmayan bir aminoasittir. Remetilasyon yoluyla tekrar metionine dönüşerek ya da transsülfürasyon yoluyla sistein, metilmalonik asit ve 2-metilsitrik aside dönüşerek metabolize edilir. Homosistein (Hcy) plazmada dört formda bulunur.

- 1- %1- 2'si serbest form
- 2- %70-80'i plazma proteinlerine özellikle de albumine bağlı form
- 3- %20-30'u homosistein dimerleri oluşturmak üzere kendi kendisiyle bağlı form
- 4- Sistein gibi diğer tiol yapılarıyla birleşmiş homosistein-sistein karışık disülfid formu

Günümüzde, plazmadaki farklı homosistein formlarını topluca ölçebilen birçok teknik vardır. Bu metodlarla ölçüm sonuçları, total homosistein (tHcy) olarak verilir (Still ve McDowell 1998, Hankey ve Eikelboom 1999).

Homosisteinin katabolizması, sistatyonin sentezi dâhil primer olarak ince barsak, karaciğer, böbrek ve pankreasta meydana gelen irreversibl bir yoldur (Rodrigo ve ark 2003). Plazmadaki homosistein hücreler tarafından salınmaktadır. Farklı hücre tipleri değişik oranlarda homosistein salgılamaktadır. Hepatositler çok yüksek oranda homosistein salgımlarken, fibroblastlar ve lenfositler çok daha yavaşlardır (Nakano ve ark 2005).



Şekil 1.14. Homosistein metabolizması

Homosistein, 5-metil tetra hidrofolat varlığında B12'ye bağımlı metiyonin sentaz (MS) tarafından metiyonine remetile olur. Metilasyon yolunda homosistein metil grubunu ya betainden (özellikle karaciğerde meydana gelen bir reaksiyon) ya da 5-metiltetrahidrofolattan (B12 vitaminine bağımlı bütün dokularda meydana gelen bir reaksiyon) alır (Hankey ve ark 2004). Daha sonra, metilen tetra hidrofolat redüktaz ile 5-metil tetra hidrofolata indirgenir. Karaciğer ve böbrekte homosistein remetilasyonu betain-homosistein metil transferaz (BHMT) aracılığıyla gerçekleşir. Metiyonin

siklusunda, diyetle alınan metiyonin, metil transferaz için metil grubu vericisi olarak yardım eden S-adenozil metiyonin (SAM)'e dönüşür. Bu reaksiyonda oluşan diğer bir ürün, S-adenozil homosistein SAH hidrolaz tarafından homosistein ve adenezine hidrolizlenen SAH'dir. Homosistein, ayrıca, katabolik transsülfürasyon yoluna da girer. Bu yoldaki ilk enzim B6'ya bağımlı sistatyonin β -sentaz (CBS)'dir. Sistatyonin, B6'ya bağımlı sistatyonaz aracılığıyla sisteine dönüşür. Oluşan sistein daha sonra inorganik sülfata dönüşerek idrarla atılır. Transsülfürasyon yolu, sınırlı doku dağılımı gösterir (karaciğer, böbrek, pankreas ve beyin) (Still ve McDowell 1998, Jacobsen 1998, Rodrigo ve ark 2003)(Şekil 1.14).

1.5.2. Homosisteinin İnvitro Etkileri

Aterogenez

1-DNA hipometilasyonu, hücre büyüme ve differansiyonu aracılı genlerin ekspresyonunu indükler.

2-Oksidatif stresi indükler.

3-İndüklenebilir NO sentaz ve tümör nekroz faktör- α 'nın ekspresyonunu değiştirerek vasküler inflamasyonu indükler.

4-Artan inflamasyon, artan asimetrik dimetilarjinin (ADMA), azalan nitrik oksitin kullanılabilirliği (artan oksidatif stres sebebiyle) ve artan oksidatif stresin bir sonucu olarak endotelial disfonksiyonu indükler.

5-Modifiye LDL'nin alınımını kısmen artırarak hepatik ve makrofaj lipoprotein metabolizmasını değiştirir.

6- Hipertrofiyi indükler ve intima kalınlığını artırır.

Trombogenez

1- Monositlerde doku faktör ekspresyonunu indükler

2- Lökosit-endotelyum interaksiyonlarını düzenler.

3- Platelet agregasyonunu artırır.

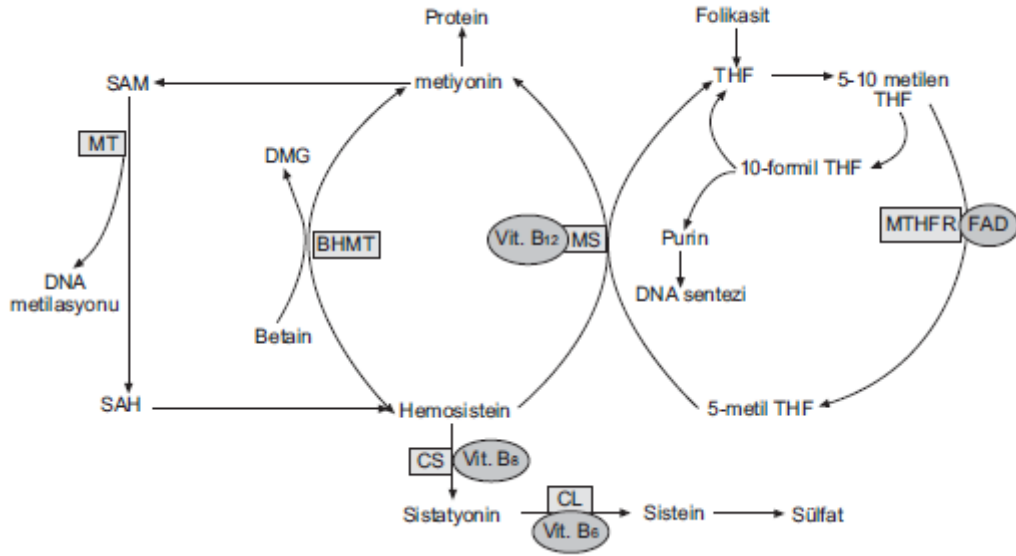
4- Lipoprotein (a)'nın fibrine bağlanmasını artırır.

5- Çeşitli pıhtılaşma faktörleriyle invitro etki eder (Hankey ve ark 2004).

Hücresel homosistein metabolizması, metionin kullanılabilirliğine, homosisteinin metionine remetilasyonuna ve sisteine transsülfürasyonuna bağlıdır (Şekil 1.15). Oluşan homosistein, ya bir metil grubu olarak tekrar metionine dönüşür veya transsülfürasyon yolağında kullanılarak, farklı yapıların sentezinde kullanılır.

Homosisteinin metabolize olabileceği iki yolu vardır:

- Remetilasyon yolu
- Transsülfürasyon yolu (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. Transsülfürasyon ve remetilasyon metabolize yolları (Kim 2000).

Remetilasyon ve transsülfürasyonun herbiri homosistein metabolizmasında yarı yarıya paya sahiptir. Homosistein, sisteinden farklı olarak protein sentezinde polipeptitlerle birleşmez.

Remetilasyon döngüsünde homosistein, genellikle metionin sentaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla bir metil grubu olarak metionini oluşturur. Metionin sentaz, B12 vitaminine bağımlı bir enzimdir. B12 vitamini bu reaksiyonda kofaktör görevi görür ve N5-metil-tetrahidrofolat metil donörüdür ve N5,N10-metilentetrahidrofolat redüktaz katalizör görevi görür. Bir kısım homosistein ise, karacigerde alternatif bir yol ile remetilasyona uğrar (Dinavahi ve Falker 2004).

Fazla miktarda metionin varlığında veya sistein sentezi gerektiğinde homosistein transsülfürasyon yoluna girer. Transsülfürasyon yolunda, B6 vitaminine

bağımlı sistation-b sentaz (SBS) homosisteini bir başka aminoasit olan serinle irreversibl olarak bağlar ve bu sülfokonjugasyon olayıyla sistation oluşur. Sistation sonunda başka bir B6 bağımlı enzim olan g-sistationaz ile sisteine ve a-ketobütirata metabolize olur. Yeni oluşan sistein hücreler tarafından sentezlenen proteinlerin yapısına girerek glutasyon yapısına katılır ya da sülfata dönüşerek glikozaminoglikanların (heparan sülfat, kondraitin sülfat gibi) sentezinde kullanılır ya da idrarla atılır. Sistein aynı zamanda homosistein ile birleşerek miks disülfid sistein-homosistein formunu oluşturur (Raymond ve ark 1997).

1.5.3. Homosistein Düzeyini Etkileyen Faktörler

Normal total plazma homosistein düzeyi 5-12 $\mu\text{mol/L}$ 'dir. Fakat yapılan çalışmalar, vasküler patolojinin 10 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üzerinde başladığını göstermektedir (Pfeiffer ve ark 1999, Tripodi ve ark 2001).

- Hafif hiperhomosisteinemi (15-30 $\mu\text{mol/L}$)
- Orta hiperhomosisteinemi (31-100 $\mu\text{mol/L}$)
- Ağır hiperhomosisteinemi (>100 $\mu\text{mol/L}$)

Plazma homosistein konsantrasyonları genetik ve beslenme faktörleri tarafından düzenlenir. Hiperhomosisteinemi, homosistein metabolizmasında rol oynayan enzimlerdeki genetik bir defektten, nutrisyonel olarak vitamin yetmezliğinden veya her ikisinin birlikte mevcudiyetinden oluşabilmektedir (Alftan ve ark1994, Sans ve ark 1997).

1.5.4. Hiperhomosisteinemi Nedenleri

Homosistein Metabolizmasındaki Edinsel Bozukluklar

Bu bozukluklar en sık rastlanan ve kolaylıkla tedavi edilebilen bozukluklardır. Edinsel nutrisyonel hiperhomosisteinemi nedenlerinden, folat ve kobalaminin yetersiz alınması en yaygın görülen nedenlerdir. B6 vitamininin yetersiz alımı da özellikle transsülfürasyon yolu bozukluğuna neden olabilmektedir. Verhoef ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada diyetle alınan folik asit, B6 ve B12 vitamin yetersizliğinin, Kuzey Amerika ve Avrupa'da özellikle de yaşlılar arasında oldukça yaygın olduğu

saptanmıştır (Verhoef ve ark 1996). Bu maddeler homosistein metabolizmasında kosubstrat ve kofaktörlerdir. Bu vitaminlerin hafif veya orta düzeylerde, nadir olarak ta ağır düzeyde hiperhomosisteinemiye neden olabileceği bilinmektedir (De Bree ve ark 2002, Kavey ve ark 2003).

B6, B12 ve folik asit düzeyi ile kan homosistein konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki vardır. Hiperhomosisteinemili vakaların 2/3'ünde bir veya daha fazla B vitamin noksanlığı saptanmaktadır (Tsimikas ve Witztum 2002).

Edinsel hiperhomosisteinemi nedenlerinden bir diğer grubu ise hastalık durumları oluşturmaktadır. Bunların içinde en önemlisi böbrek fonksiyon bozukluklarıdır. Glomerüler filtrasyon hızı ile kan homosistein konsantrasyonu arasında negatif ilişki vardır. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda kreatinin artışı ile birlikte kan homosistein düzeyi artarak normalin 4 katına kadar çıkabilmektedir. Bu artış son dönem böbrek yetmezlikli hastalardaki aterosklerozis oluşumundaki hızlanmayı kısmen açıklayabilmektedir (Arnesen ve ark 1995).

Bunun dışında birçok çalışma ile hipotroidizmi hastalarda hiperhomosisteinemi gösterilmiştir. Hipotroidide artmış vasküler hastalık insidansında bu faktörün rol alabileceği belirtilmektedir. Çeşitli malignitelerde de (meme, over, pankreas) hiperhomosisteinemi gösterilmiştir. Transforme hücrelerin homosisteini kullanmadığı ve proliferen olan hücrelerin endojen homosisteini metabolize edemediği belirtilmektedir (Welch ve Loscalzo 1998).

Pek çok ilaç kullanımı hiperhomosisteinemiye neden olmaktadır. Nitroz oksit ve in vitro koşullarda nitrik oksit metionin sentazı inaktive etmektedir. Metotreksat, karbamazepin, valproik asit, fenitoin, folat metabolizmasını bozarak hiperhomosisteinemi oluşturur. Menopoz sonrası östrojen replasman tedavisi homosisteini düşürmektedir. Bu da östrojen tedavisinin osteoporoz yanında kardiovasküler hastalıklardan korunmak için de kullanılması gerektiği düşüncesini desteklemektedir. Teofilin (fosfodiesteraz inhibitörü) pridoksal fosfat sentezini antagonize ederek hiperhomosisteinemiye neden olmaktadır. Sigara, pridoksal fosfat sentezini azaltır. Sigara içen kadınlarda %23, erkeklerde %12 yüksek plazma homosistein düzeyi saptanmıştır (Ubbink ve ark 1991, Moghadasian ve ark 1997).

Homosistein Metabolizmasındaki Genetik Bozukluklar

Ağır genetik defektler içinde en yaygın görüleni homozigot SBS yetmezliğidir. Bu form “kongenital homosistinüri” olarak da adlandırılır. Hastaların plazma ve idrar homosistein düzeyleri çok fazla yükselerek 400 µmol/L'nin üzerine çıkabilmektedir. Homosistinüri doğuştan otozomal resesif bir metabolizma hastalığıdır. Toplumda görülme sıklığı 1/200.000'dir. SBS enzim aktivitesi %0-2 arasındadır. Bu enzimin geni 21. kromozomdadır ve bugüne kadar tanımlanmış 17 tane mutasyonu mevcuttur. Bu farklı mutasyonlar plazma total homosistein düzeylerindeki farklılıklara neden olmaktadır (Frosst ve ark1995).

1.5.5. Kongenital Homosistinürinin Klinik Göstergeleri

Homosisteinin B12-bağımlı metionine remetilasyonuna katılan MTHFR'nin homozigot yetmezliği ağır hiperhomosisteinemiye neden olabilir. Otozomal resesif geçişlidir. Tedavi seçeneklerinin pek olmaması SBS'ye göre daha kötü prognoza yol açmaktadır. Enzim aktivitesi %0-20 arasındadır ve hiperhomosisteinemi yanı sıra klinik tabloda nörolojik fonksiyon bozukluğu, psikomotor retardasyon, inme ve periferik nöropati mevcuttur. Vakaların %70'inde arteriyel ve venöz tromboz gelişir. Heterozigot MTHFR yetmezliğinde ise %50 normal enzim aktivitesi vardır. Bu yüzden enzim aktivitesi nörolojik yetmezliklere karşı koruyucudur (Raymond ve ark 1997).

MTHFR'nin C677T mutasyonu enzim aktivitesinde azalma ve termolabilite ile karakterizedir. Hafif veya orta düzeyde hiperhomosisteinemiye eğilim vardır. Bu mutasyon özellikle kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olmasından dolayı etnik farklılıklar göstermektedir. Farklı toplumlarda %5-18 arasında değişen oranlarda bulunduğu saptanmıştır (Frosst ve ark 1995).

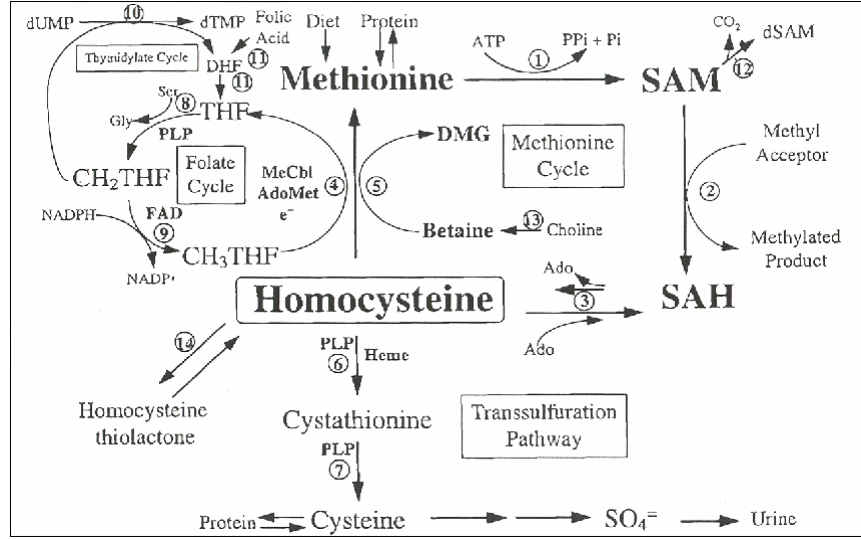
1.5.6. Hiperhomosisteinemideki Fizyopatolojik Mekanizmalar

Hiperhomosisteinemi ile ilişkili aterojenik olaylar endotel hasarı, bunu takip eden trombosit aktivasyonu ve trombüs formasyonudur. Çalışmalarda, homosistein aracılı endotel hasarının subendotelyal matrikste başladığı ve takibinde trombosit aktivasyonu oluştuğu gösterilmiştir (Kuch ve ark 2001, Pfanzağl ve ark 2003).

Homosistein ile endotel hücrelerinin kültür ortamında maruziyeti, prostasiklin ve nitrik oksit üretimini azaltmaktadır ki bunlar endotel aracılı gevşemeleri sağlayan ve aşırı trombosit agregasyonunu inhibe edici etkileri olan maddelerdir. Homosistein lipid peroksidasyonunu artırır ve bu endotelden nitrik oksit sentaz ekspresyonunu azaltarak nitrik oksiti azaltmış olur (Blann 1993).

Homosisteinin bir diğer aterojenik etkisi de lipoproteinlerle ilişkisidir ki özellikle LDL ile olur ve apolipoprotein B proteininin serbest aminoasit gruplarının tiolasyonu sonucunda gelişir. LDL'nin makrofajlara internalizasyonunu artırır ve intersellüler kolesterol birikimine sebep olur. Makrofajlardan LDL'nin hidrolitik olaylarla homosistein salımı, serbest radikal oluşumuna ve sonrasında lipitlerin oksidasyonuna neden olur. Homosisteinin tiolaktan formu LDL ile reaksiyona girerek yoğun ve çökmüş lipoprotein oluşumuna neden olarak makrofajlarla alınır ve köpük hücresi oluşur (Hajjar 1993).

Homosisteinin düşük dansiteli lipoproteinlerin in vitro oksidasyonunu arttırdığı ve hem invivo hem de invitro çalışmalarda, okside LDL'nin de endotel fonksiyonlarını bozduğu gösterilmiştir. Bu görüşler antioksidan mekanizmaların, homosistein aracılı toksik etkilerden endoteli korumada etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu mekanizmalardan biri, endotel hücrelerinin, homosisteinin oksidatif potansiyelini nitrik oksit (NO) üretimi ile düzenlemesidir. Bu durumda, homosisteinin NO tarafından s-nitrosilasyonu, tiol bağımlı peroksit oluşumunu önlemekte ve s-nitrosohomosistein trombosit agregasyonunu inhibe etmekte, sitoprotektif özellik göstermekte ve vazokonstriksiyonu önleyici etki yapmaktadır (Şekil 1.16). Bu protektif mekanizma hiperhomosisteinemi durumunda inefektif gibi görünmektedir, çünkü homosistein aracılı hidrojen peroksit ve süperoksit radikali oluşumu, NO'ı inaktive edebilir ve bu olay çok daha potent oksidan olan singlet oksijen ve peroksinitritleri oluşturabilir (Nishinaga ve Ozawa 1993).



Şekil 1.16. Homosistein aracılı endotel hasarı

Hiperhomosisteinemi'deki diğer bir oksidan strese koruma mekanizması hidrojen peroksidin ve lipid peroksidlerin redüksiyonunu katalizleyen antioksidan enzim, glutatyon peroksidazdır. Homosisteinin oksidasyon ürünlerine karşı endoteli korumaktadır. Çünkü homosisteinden peroksid üretimi ile invitro endotel hücre toksisitesi arasında ilişki vardır. Glutatyon peroksidaz nitrik oksidin oksidatif inaktivasyonunu önlemektedir. Endotelyal glutatyon peroksidaz aktivitesi, homosistein maruziyetinden sonra azalmaktadır ki bu antioksidan mekanizmanın kronik hiperhomosisteinemi esnasında azaldığını düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda homosisteinin endotelde glutatyon peroksidaz ekspresyonunu suprese ettiği ve bu olayın lipid peroksidasyonunu artırdığı gözlenmiştir.

1.5.7. Hipertansiyon ve Homosistein

İlk kez 1969 yılında Mc Cully, plazma homosistein düzeyi ile aterosklerotik vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiye dikkat çekerek, hiperhomosisteineminin aterosklerotik hastalıklara yol açtığını bildirmiştir (Chen ve ark 2000).

Hiperhomosisteinemi ve kardiyovasküler hastalık ilişkisini kurmaya yönelik prospektif çalışma sonuçları karmaşıktır. Plazma homosistein yüksekliği sigara ve hiperlipidemi gibi kardiyovasküler hastalık riskini arttırmaktadır. ABD'de kardiyovasküler hastalıkların %10'unun artmış total plazma homosistein düzeylerinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Son 10 yılda total plazma homosistein

taininde metodolojik ilerlemeler olmuş ve mikronütrientlerin sağlıklı ve dengeli beslenmedeki rolleri daha fazla ilgi çekmiştir (Cesari ve ark 2005).

Son zamanlarda plazma tHcy'nin kardiyovasküler hastalıklı Norveçli hastalarda mortalitenin kuvvetli bir habercisi olduğu bildirilmiştir (Bellamy ve McDowell 1997).

Bazı prospektif çalışmalarda ise homosisteinin KKH'larda etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Alfthan ve ark 1994, Evans ve ark 1997, Folsom ve ark 1998). Total homosistein (tHcy)'deki 5 µmol/L artışa karşılık KKH riskinin kadınlarda %80 ve erkeklerde %60 arttığı tespit edilmiştir (Folsom ve ark 1998). Yapılan bir metaanalizde tHcy'deki 5 µmol/L'lik bir artış ile total kolesterol düzeylerinde 0,5 mmol/L'lik artışın koroner arter hastalığı yönünden eşdeğer olduğu bildirilmektedir (Dunn ve ark 1998).

Homosisteinin kardiyovasküler hastalıktaki etkisi tartışmalı olduğu için hiperhomosisteinin vasküler hastalıklara neden olduğuna dair daha fazla veriye ve etki mekanizmasının açıklanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. İleri sürülen mekanizmalarda, tHcy'in endotelial disfonksiyona, düz kas proliferasyonuna, ekstrasellüler matriks proliferasyonuna, lipid oksidasyonuna, sitotoksositeye veya koagülasyon ve trombositlere etkisi sonucu vasküler hasara neden olabileceği ileri sürülmüştür (Tsai ve ark 1994).

Homosisteinin aterogenez, ateroskleroz ve trombozda oynadığı roller tam olarak bilinmemesine rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalar hiperhomosisteininin direkt olarak vasküler endotel hücrelerinde hasara neden olabildiği, endotelinin antikoagülan özelliğini prokoagülana dönüştürebildiği ve in vitro düz kas hücrelerinde proliferasyona neden olabildiği gösterilmiştir (Tang 1998).

Homosistein, vasküler düz kas hücrelerinde mitogeneze ve sitotoksik etkiye de neden olabilmektedir (Chen ve ark 2000).

Bazı araştırmacılar, güçlü bir vazodilatatör ve trombosit agregasyon inhibitörü olan nitrik oksitin sıgır endotelial hücrelerinden salınımının bozulduğunu

göstermişlerdir (Stamler ve ark 1993). Aterosklerozda, endotel hasarı kritik öneme sahip olup hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur (Ross 1993).

Bu nedenle, homosisteinin bazı etkileri endotelial disfonksiyon ve daha spesifik olarak nitrik oksitin salınımı etkilerinin azalması sonucu ortaya çıkmaktadır. Endotelial disfonksiyonda, damar içi kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon azalmaktadır. Orta yaşlı Çinlilerden oluşan ve belirli bir vasküler risk faktörü saptanmayan 14 kişilik bir grupta yapılan çalışmada, damar içi kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon ölçümleri yapılmış ve hiperhomosisteineminin (tHcy=34,8µmol/L) endotelial disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir (Woo ve ark 2000).

Başka bir çalışmada, ailesinde ateroskleroz anamnezi ve klinik bulguları olmayan hiperhomosistinemili (19,2µmol/L) 26 yaşlı hastada da damar içi kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon ölçümlerinin azaldığı gösterilmiştir (Tawakol ve ark 1997).

Endotelial disfonksiyon, klasik homosistinürlü çocuklarda gösterilmiş iken serbest homosistein ve metiyonin seviyeleri normal heterozigot sistationin β -sentaz enzimi (SBS) eksikliği olan çocuklarda endotel hasar saptanmamıştır (Celermajer ve ark 1993). Normal sağlıklı kişilere standart metiyonin yükleme (0,1 g/kg) ile zaman içinde damar içi kan dolaşımına bağlı dilatasyonun bozulabildiği gösterilmiştir (Chambers ve ark 1998). Akut metiyonin yüklemesinin birkaç metabolik etkisi vardır ve plazma homosisteinini yükseltebilmesine rağmen insanlarda homosisteinin endotel fonksiyonları üzerine toksik etkilerinin delili sayılmamaktadır. Yapılan çalışmalarda bir hafta süre ile günde 0,1 g/kg metiyoninle beslenen kişilerde endotel fonksiyonlarının bozulmadığı ancak tHcy seviyelerinin anlamlı oranda yükseldiği tespit edilmiştir (Bellamy ve ark 1998). Lambert ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda; erken koroner, serebral veya periferik vasküler hastalıklı ve metiyonin yüklenmesinden sonra hiperhomosisteinemi tanısı konan 60'ı birbiri ile birinci dereceden akraba 123 sağlıklı kişide endotelial disfonksiyon ve arteriyel distansibilite arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Bu çalışmada; endotelial fonksiyon, brakial arterin kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon ile damar duvarının fiziki özellikleri karotis

arterinin arteriyel distansibilitesi ölçülerek tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan kişilerde açlık tHcy ve metiyonin yükleme testi yapılmıştır (Hanratty ve ark 1998).

Hafif hiperhomosisteinemili kişilerden oluşan bu grupta, önceki raporların aksine brakial arterdeki kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon ile açlık tHcy arasında ilişki bulunamamış ancak metiyonin yüklemesinden elde edilen veriler incelenince kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon ve homosistein arasında zayıf fakat istatistiksel olarak anlamlı zıt bir ilişki tespit edilmiştir (Lambert ve ark 1999).

Erkek cinsiyeti, total kolesterol, sigara içme, hipertansiyon gibi klasik risk faktörleri ile damar içi kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon arasında ilişki bulunamamış iken post menapozdaki kadınlarda damar içi kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyonla ilişki bulunmuştur. Yine damar içi kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon ve asemptomatik erkek ve kadınlardaki risk faktörleri arasındaki ilişkiyi “multiple stepwiseregresion” analizi ile inceleyen diğer bir çalışmada damar içi kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyondaki azalmanın sigara içen yaşlı erkeklerde daha büyük damarlarla, ilişkili olduğu bildirilmiştir. Toplam risk faktör skorunun damar içi kan dolaşımının oluşturduğu dilatasyon ile kuvvetli ilişki göstermesi risk faktörlerini bir birine karşılıklı etkileyebileceği düşünülmektedir (Celemajer ve ark 1992).

Klasik homosistinüriye göre koroner arter hastalıkları, serebro vasküler hastalıklar ve periferik vasküler hastalıkların eşlik ettiği hafif hiperhomosisteinemide, homosisteinin oynadığı rol daha azdır. Ancak önceden miyokard enfaktüsü geçiren serebrovasküler trombozlu yaşlı erkeklerde total homosisteinin 10µmol yüksek olduğu tespit edilmiştir (Adunsky ve ark 2000). Akut koroner arter hastalığı olan kişilerde pıhtılaşma faktörleri ile homosistein arasında ilişki bulunmuştur ve koroner yetmezlikli hastalarda folik asit ve antioksidan vitaminler verilerek total homosistein konsantrasyonu azaltılmıştır (Buonout ve ark 2000). Hiperhomosisteinemi tedavisinde folik asitle desteklenmiş diyetle beslenmenin tavsiye edilmesi gerektiği, günümüzde klinik sonuçlarla ortaya çıkmıştır. Günlük diyetle 0,5 mg folik asit eklenerek total homosistein düzeyi %25 azaltılabilmektedir (Andreotti ve ark 2000).

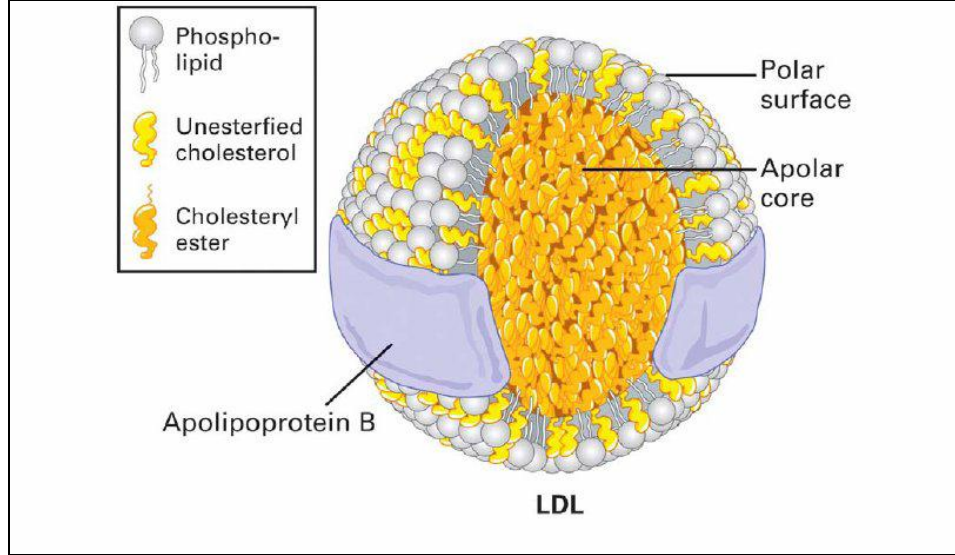
Homosisteinüri ile ilişkili olan hiperhomosisteinemi metiyonin sentaz ve vitamin B12 metabolizmasındaki defektler, sistatyonin β -sentaz (SBS), metilen tetra hidrofolat redüktaz (MTHFR) eksikliği gibi nadir kalıtsal bozukluklar sebebiyle meydana gelmektedir. Homozigot sistatyonin β -sentaz eksikliği yaklaşık 150.000 doğumda bir görülmektedir (Eikelboom ve ark 1999).

1.6. Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL)

LDL; moleküler ağırlığı, partikül boyu, yoğunluğu gibi fiziksel özellikleri ile lipit alt sınıfları, içerdiği yağ asitleri, proteinler, elektriksel yüzey ve hidrodinamik özellikler gibi kimyasal özellikleri bakımından heterojen olan bir moleküldür (Özekin 2001, Hevonoja ve ark 2000).

Plazma kolesterolünün yaklaşık % 70'ini taşıyan LDL, kolesterolce zengin ana lipoproteindir. Yoğunluğu 1.019-1.063 g/ml'dir. Küreye benzer yapıda hidrofobik bölgede az miktarda trigliserit ile kolesterol esterlerini içeren çoklu kompleks moleküldür. Polar yüzeyde; fosfolipidler, serbest kolesterol ve apolipoprotein B-100 yer alır. Bileşiminin % 10'u trigliserit, % 20'si fosfolipid, % 45'i kolesterol ve % 25'i proteindir. Apolipoprotein B-100 4536 aminoasit içerir ve LDL'nin ana yapısını oluşturur (Şekil 1.17).

Bir LDL molekülünde yaklaşık 2700 yağ asidi bulunmakta ve bunların yarısını poliansatüre yağ asitleri oluşturmaktadır. Bu yağ asitlerinden özellikle linolenik asit fazla miktarda bulunurken, araşidonik ve dokosaheksaenoik asitler daha azdır.

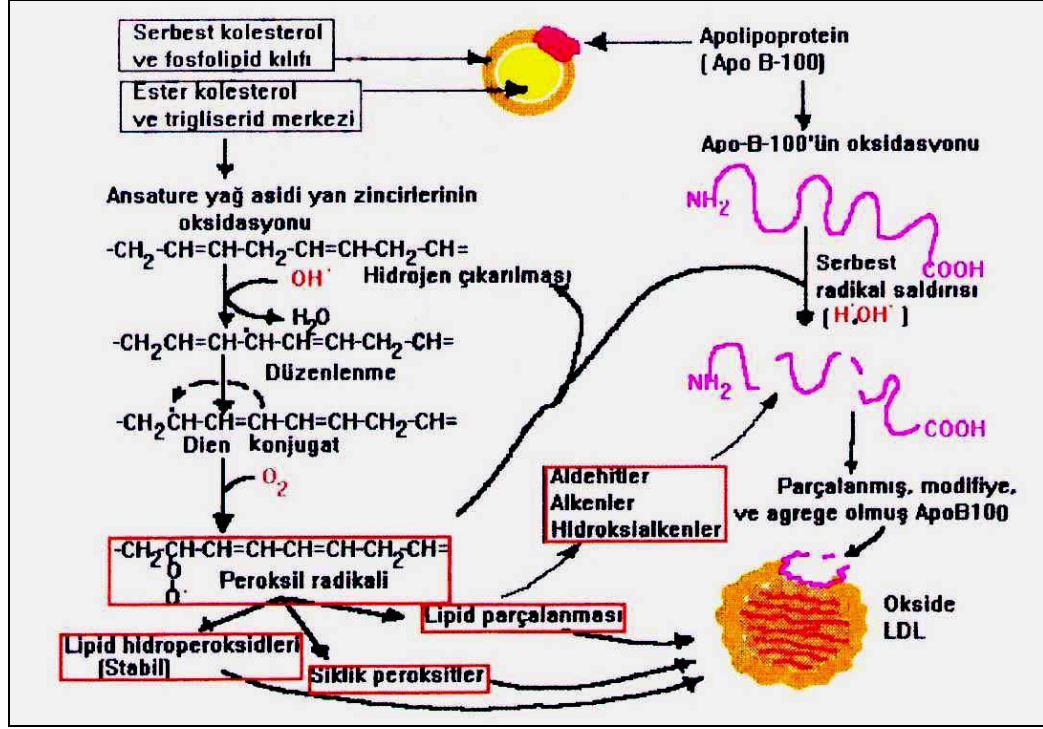


Şekil 1.17. Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Yapısı

İn vitro LDL, bakır ve demir gibi geçiş metallere varlığında oksidatif olarak modifiye olabilmektedir. LDL'nin yapısında bulunan poliansatüre yağ asitleri serbest radikal hasarı ve oksidasyona karşı çeşitli antioksidanlarla korunmaktadır. Bunlardan en önemlisi yağda çözünen E vitamini (α -tokoferol) dir. Her bir LDL partikülü yaklaşık olarak 6 molekül α -tokoferol, az miktarda da karotenoidler, kriptoksantin, ubiquinol-10 ve Gamma-tokoferol içerir (Mertens ve Holvoet 2001, Jıalal ve Devaraj 1996). Ox-LDL oluşumunun en erken safhası içeriğindeki poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonudur (Weinbrenner ve ark 2003).

1.6.1. LDL'nin Mekanizması ve Oksidasyonu

Plazma yüksek oranda antioksidan içermektedir. Bu yüzden LDL oksidasyonu temelde endotelial hücreler ve aktif lökositler tarafından fazla miktarda reaktif oksijen ürünlerinin üretildiği arter duvarının subendotelial alanında meydana gelmektedir (Şekil 1.18) (Orem C ve ark 2002).



Şekil 1.18. LDL' nin Oksidasyon Mekanizması

LDL'nin oksidasyonu monositler, makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri, fibroblastlar ve düz kas hücrelerinde de oluşabilmektedir (Young ve McEneny 2001).

Vasküler hücrelerde oksidatif stres ve süperoksit anyonunun artması LDL'nin Ox-LDL'ye dönüşümünü arttırmaktadır (Weinbrenner ve ark 2003).

Makrofajlar, LDL için reseptör taşırlar. Doğal LDL'ler makrofajlara genellikle bağlanamazken, özellikle Ox-LDL makrofaj içine alınarak köpük hücrelerini oluşturur (Violi ve ark 2002). Bundan dolayı modifiye LDL'ler makrofajlar tarafından doğal LDL'den 8-10 kat daha hızlı alınabilmektedir. Bu modifiye LDL'ler makrofajlarda LDL reseptörlerinden farklı olarak "asetil LDL reseptörleri" tarafından alınırlar (Baykal ve ark 1998). LDL'nin yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu malondialdehit (MDA) gibi reaktif ürünleri oluşturmaktadır. Bu ürünler daha sonra proteinlerin lizin kalıntılarıyla etkileşmektedir (Shaw ve ark 2001) (Çizelge 1.2.).

Çizelge 1.2. LDL Oksidasyon Ürünleri

Hedef	Oksidasyon ürünleri	Örnekler
Kolesterol (serbest ve EK)	Oksisterol	7-hidroksi kolesterol 7-ketosterol 7-hidroksi kolesterol
Yağ asitleri	Hidroperoksitler Hidroksitler Keton F2-İzoprostan Aldehitler	Linoleil Hidroperoksit Linoleil hidroksit Okzo-detadekadienoat 8-Epi-Prostoglandin F 2 α 9-okzonanoat
Apo B	Parçalanma Çapraz Bağlanma Aminoasit Oksidasyonu Aminoasit türevlendirilmesi	3-klorotrozin Ditrozin Hidroksiknolin

LDL'nin oksidasyonu, LDL fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonu ile başladığı bilinen, hücre içinde ve dışında yer alan kompleks bir prosestir. Oksidasyon, PUFA'ların konjuge dien, hidroperoksit ve diğer ara ürünlerin oluştuğu peroksidasyon dizisi sonucu alkan ve reaktif aldehitlere dönüşmesiyle oluşmaktadır (Steineroa A ve ark 2001).

LDL'nin oksidasyonu üç fazda gerçekleşir.

- 1) Antioksidanların miktarının azaldığı lag fazı
- 2) Doymamış yağ asitlerinin lipit hidroperoksitlere oksidasyonunun olduğu progresyon (ilerleme) fazı
- 3) Hidroperoksitler, 4-hidroksinonenal ve malondialdehit (MDA) gibi ürünlerin oluştuğu dekompozisyon (parçalanma) fazı

PUFA'ların % 70-80'i okside olduğunda dekompozisyon baskın olur ve son yıkım ürünleri olan bu aldehitler meydana gelir. Bunlar LDL'nin yapısında bulunan ApoB-100'ün lizin rezidüleriyle kovalent bağ yaparak modifiye ApoB immünojenik özellik kazanır (Weinbrenner 2003).

LDL metal iyonları (bakır ve demir gibi), lipoksijenaz, miyeloperoksidaz, ve reaktif nitrojen türleriyle okside olabilmektedir (Gaut ve Heinecke 2001, Mertens ve Holvoet 2001).

Lipoksijenaz

Lipoksijenaz poliansatüre yağ asitlerini (özellikle linoleat ve araşidonat) katalizleyen intraselüler bir enzimdir (Gaut ve Heinecke 2001). Aterosklerotik dokularda hem lipoksijenaz mRNA hem de lipoksijenaz protein tespit edilmiştir (Heinecke 1998). 15-lipoksijenaz, endotelial hücreler ve monosit/makrofajlar tarafından üretilir. Poliansatüre yağ asitlerini lipid hidroperoksitlerine dönüştürür. Böylece Ox-LDL oluşur (Mertens ve Holvoet 2001).

Myeloperoksidaz

Miyeloperoksidaz, mikroorganizmalara karşı savunma mekanizmalarının bir komponentidir. Nötrofil proteininin %5'ini, monosit proteininin %2'sini oluşturur (Gaut ve Heinecke 2001).

Aktif fagositler hipokloröz asit (HOCl), kloraminler, tirozil radikalleri ve nitrojen dioksit (NO₂) dâhil reaktif maddeleri oluşturan myeloperoksidazı salgırlar. Bu reaktif türleri antioksidanları, lipidleri ve LDL proteinini oksitler (Mertens ve Holvoet 2001).

Reaktif Nitrojen Türleri

Nitrik oksit çeşitli vasküler hücreler tarafından salgılanan bir serbest radikaldir. LDL'nin bakır aracılı ve hücre aracılı oksidasyonunu inhibe eder. NO aerobik koşullarda nitrite dönüşür. Nitritin düşük konsantrasyonları LDL'nin myeloperoksidaz aracılı oksidasyonunu inhibe etmektedir (Mertens ve Holvoet 2001). NO, serbest oksijen radikali ile reaksiyona girerek, güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit, LDL oksidasyonuna neden olur (Heinecke 1998).

Ox-LDL doğal LDL'den birçok yönden farklılık göstermektedir. Bunlardan birkaçı şöyledir:

- Endotel hücrelerde adezyon moleküllerinin ekspresyonuna yol açar (Violi ve ark 2002).

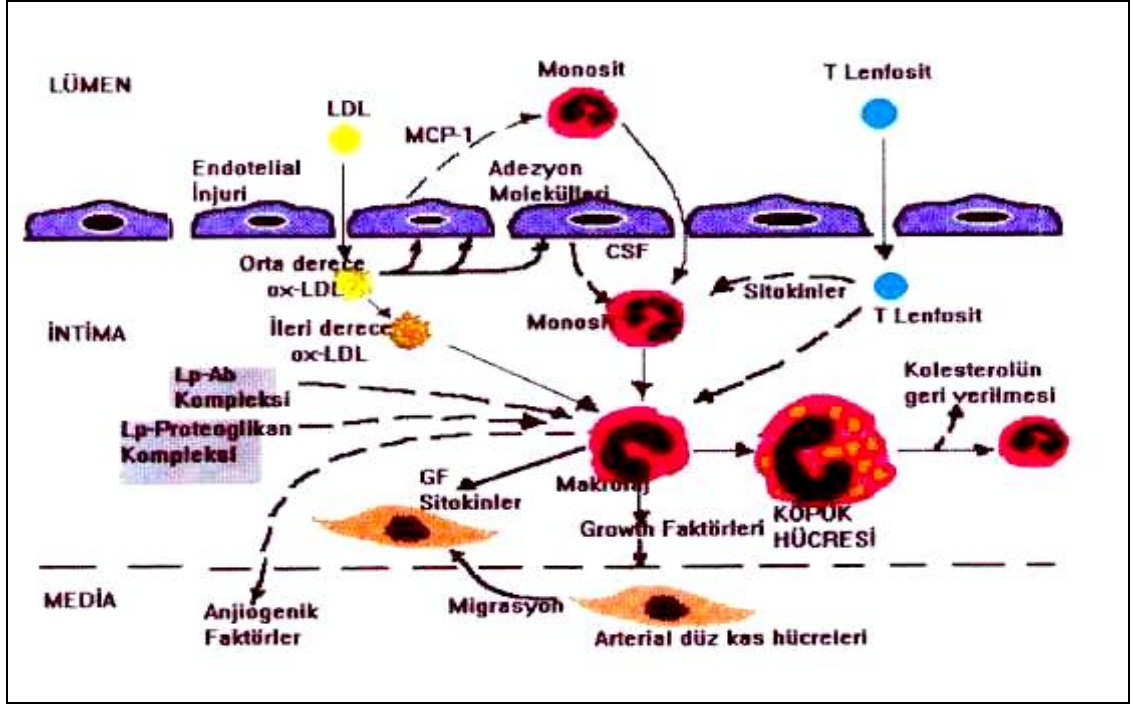
- NO'nun endotelial üretimini azaltarak, prostasiklin üretimini artırarak, prostaglandin ve prostaglandin prokürsörlerini stimüle ederek platelet adezyonunu ve agregasyonunu stimüle eder (Mertens ve Holvoet 2001).
- Metalloproteinazların oluşumunu ve ROS oluşumunu artırırken eNOS gen ekspresyonunu azaltmaktadır (Mehta 2006)

Lipoproteinlerin yapı ve fonksiyonlarını etkileyebilen çeşitli modifikasyonlara maruz kaldıkları bildirilmiştir. Lipoproteinlerin modifikasyonlara uğramasının ateroskleroz patogeneğinde önemli bir rol oynadığı özellikle aterosklerotik lezyon gelişimini hızlandırdığı, proinflatuar sitokinlerin salınımını indüklediği, vazodilatasyonu azalttığı ve endotelial hücrelerde toksisiteye neden olduğu bildirilmektedir (Kovacs ve ark 1997, Shen ve Sevanian 2001, Luoma ve ark 2005).

1.6.2. Aterosklerozda Okside LDL'nin Rolü

LDL oksidasyonu ve ateroskleroz arasındaki ilişki ilk olarak endotelial hücrelere Ox-LDL aracılı hasar ispatlandığı zaman ortaya çıkmıştır. İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda karotis ve koroner arterlerden alınan aterosklerotik plak örneklerinde Ox-LDL'nin varlığı dikkat çekmiştir. Aterosklerotik lezyonlarda Ox-LDL'nin miktarı ile plazma Ox-LDL arasında da ilişki olduğu bildirilmiştir (Ndrepepa ve ark 2005).

Ateroskerozu başlatan mekanizmalar tam olarak bilinmemekle beraber zedelenmeye yanıt hipotezi yaygın olarak kabul edilmektedir (Morin ve Peng 1989, Steinberg ve Witztum 1990). Sigara, artmış LDL, Ox-LDL, hipertansiyon ve dejeneratif değişiklikler zedelenmeye yol açan faktörler arasında sayabiliriz. Endotel hücrelerinde lipid peroksidlerinin zedelenmeye yol açtığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Halliwell 1989) (Şekil 1.19).



Şekil 1.19. Okside LDL ve Ateroskleroz

Aterosklerotik plaklardan izole edilen LDL'nin yapı ve biyolojik özellikleri açısından doğal LDL'den farklı olduğu, ancak modifiye olmuş Ox-LDL'ye benzediği ve aterosklerotik plaklarda Ox-LDL'nin biriktiği belirtilmiştir (Akkuş 1995, Itabe ve ark 2000, Ehara ve ark 2001). Bu bulgu LDL değişikliğinin ateroskleroz ile ilgili olabileceğini gösterir. Steinberg ve arkadaşları LDL'nin endotel veya düz kas hücre kültürüyle veya bakır gibi ağır metal iyonu ile inkübe edildiğinde modifiye olduğunu ve bu şekilde makrofajlar tarafından daha hızlı alındığını göstermişlerdir (Özkin 2001).

LDL'nin bir kısmı LDL reseptörleri aracılığı ile karaciğer tarafından kullanılabilir ayrıca subendotelial bölgeye geçerek okside olabilir ve köpük hücre oluşumunu uyarabilir.

LDL'nin oksidasyon ürünleri sitotoksiktir ve bu sitotoksite endotelial hücreler için tehlikelidir. Bu hücrelerin kan elemanlarıyla teması büyüme faktörlerinin olaya karışmasına yol açar. Bu da düz kas hücrelerinin migrasyonuna ve proliferasyonuna neden olarak daha kompleks lezyonlara dönerler. Ox-LDL makrofajlardan interlökin-1 salınımını uyarır. İnterlökin-1 düz kas hücre proliferasyonuna ve lökositlerin endotele adezyonuna yol açar. Ox-LDL doku faktörü

ve Plazminojen aktivator inhibitörü (PAI) sentezini indükleyerek pıhtılaşma sistemini etkiler.

Yapılan çalışmalarda Ox-LDL miktarı koroner kalp hastalığı olan kişilerde anlamlı yüksek bulunmuştur (Toshima ve ark 2000, Wallenfeldt ve ark 2004).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu

Bu çalışma, 50-73 yaşları arasında (ortalama 61.37 ± 11.42) toplam 129 EHT hastası (62 erkek, 67 kadın) ile hiçbir şikâyeti ve bulgusu olmayan ve 41-64 yaşları arasında (ortalama 52.86 ± 11.64) 108 sağlıklı birey (59 erkek, 49 kadın) üzerinde gerçekleştirildi. Hasta grubu S.Ü.Meram Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalına başvurup EHT teşhisi konulan kişilerden seçildi. Hastaların yaş, cinsiyet, kilo, boy, sigara ve alkol kullanımı, hipertansiyon, diyabet ve aile öyküsü sorgulandı. Çalışma için S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 25.04.2008 tarih ve 2008/114 sayılı Etik Kurul Kararı ile onay alındı ve çalışmaya katılan bütün bireyler araştırma öncesinde bilgilendirildi ve yazılı onamları alındı.

Çalışma, S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı ve S.Ü. Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi. Hasta ve kontrol grubuna ait demografik bilgiler ve rutin olarak ölçülen laboratuvar bulguları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Hasta ve kontrol gruplarına ait değerler

	EHT Hasta Grubu (ortalama \pm SS)	Kontrol Grubu (ortalama \pm SS)	p değeri
Birey sayısı (n)	129	108	
Yaş	61.37 ± 11.42	52.86 ± 11.64	
Cinsiyet (Erkek / Kadın)	62 / 67	59 / 49	
Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	$147.1 \pm 18,09$	123.2 ± 6.48	0,000
Diastolik Kan Basıncı (mmHg)	$91.2 \pm 11,59$	80.9 ± 5.21	0,000
Total Kolesterol (mg/dl)	184.08 ± 37.06	191.07 ± 35.47	0,701
Trigliserit (mg/dl)	154.13 ± 85.77	129.62 ± 51.20	0,010
HDL Kolesterol (mg/dl)	40.74 ± 9.63	49.01 ± 19.23	0,038
LDL Kolesterol (mg/dl)	112.95 ± 31.14	119.66 ± 34.15	0,376
VLDL Kolesterol (mg/dl)	$29,3 \pm 13,4$	$29,25 \pm 21,53$	0,458

2.1.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

- Soğutmalı santrifüj (Sigma)
- Vortex (IKA-GENIUS3)
- Hassas terazi (ACCULAB)
- HPLC (Agilent 1100)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler
- Shaker (BIO-TDB100)
- Otomatik Eliza okuyucusu ve yıkayıcısı (BioTek, ELx 50)
- Thermal Cycler (Applied Biosystems 2700)
- Görüntüleme cihazı (BIORAD)
- Elektroforez Tankı (SCI-PLUS)
- Güç Kaynağı (NYXTECHNIK)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik)
- Spektrofotometre (Wealtec)
- -80 °C ve -20 °C derin dondurucu (Sanyo)

2.1.3. Kullanılan Kit ve Kimyasallar

- Taq Polimeraz (Fermantas)
- dNTP seti (Fermantas)
- PCR buffer (Fermantas)
- 25mM MgCl₂ (Fermantas)
- Reverse-forward primer (IDT)
- Restriksiyon enzimi (Hinf I, Mob II, Mob I-Fermantas)
- Ladder 100 bp (Vivantis)
- Agaroz (Lonza)
- Etidyum Bromid (Olerup)
- Tris (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Asetik Asit (Merck)
- 6 x loading dye (Vivantis)
- Etanol (Merck)

- DNA İzolasyon Kiti (Vivantis)
- NO kiti (Cayman)
- NO düzeyinin ölçümü için filtre (MILLIPORE)
- Ox-LDL ELISA Kiti (İmmun Diagnostik)
- Homosistein Kiti (Chromsystems)

2.2. Metod

2.2.1. Kan Basıncı Ölçümleri

Çalışmaya katılan bireylerin kan basınçları hep aynı kişi tarafından ölçüldü. Bireyler en az 5 dakika dinlendirildikten sonra, oturur vaziyette, sağ koldan manşonlu ERKA perfect aneroid (Germany) tansiyon aleti ile tansiyon ölçümleri yapıldı. Manşon nabzın kaybolma noktasının 30-40 mmHg üzerine kadar şişirildi. Daha sonra yavaşça boşaltıldı ve sesin duyulmaya başladığı nokta sistolik kan basıncı, sesin kaybolduğu ya da çok hafiflediği nokta diastolik kan basıncı olarak belirlendi.

2.2.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Hasta ve kontrol grubuna ait bireylerden sabah aç karna EDTA'lı tüplere 10 ml kadar kan alındı. Kanlar 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve çalışma gününe kadar -80°C'de derin dondurucuda saklandı. Daha sonra bu numunelerde NO, homosistein ve Ox-LDL düzeyleri çalışıldı.

Plazmaları ayrılmış kan örneklerinin pelletlerinde DNA izolasyonu yapılarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve restriksiyon enzim kesimi (RFLP) çalışmaları gerçekleştirildi.

2.2.3. DNA İzolasyonu

Alınan kan örneklerinden steril şartlarda Vivantis (Malezya) Firmasından sağlanan DNA izolasyon kiti kullanılarak spin klon yöntemiyle aşağıdaki şekilde DNA izolasyonu yapıldı.

- 1,5 ml'lik steril boş bir ependorf tüp içine 200 µl lizis tamponu konuldu.
- Lizis tamponun üzerine 200 µl pellet ilave edildi.

- Pellet ve Lizis tamponu karışımının üzerine 20 µl Proteinaz-K ilave edilerek karıştırıldı.
- Karışım 56 °C'lik hot plate`de 10 dakika inkübasyonda tutuldu.
- Sürenin sonunda karışım vortekslendi.
- İnkübasyonun sonunda karışıma 200 µl %100 etil alkol ilave edilerek pipetaj yapıldı ve spin kolona aktarıldı.
- 5000 g'de 1 dk santrifuj edildi.
- Spin kolon her defasında yeni bir ependorf tüpe aktarılarak üzerine 500'er µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 500 g'de 1'er dk ara ile yıkama işlemi yapıldı.
- İnkübatörde daha önce 56 °C' de ısıtılmış 200 µl distile su, spin kolona ilave edildi ve 5000 g'de 1 dk santrifuj edilerek spin kolondaki filtreye tutunan DNA ayrılmış oldu.
- Elde edilen DNA, PCR analizinde kullanana kadar -20 °C' de saklandı.

2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

- 2 gr agaroz tartılarak 250 ml'lik bir erlenmayere konuldu ve üzerine 100 ml 1X TAE (Tris, Asetik asit ve EDTA) tamponu eklendi. Mikrodalga fırınında agar eriyene kadar yaklaşık 2 dakika tutuldu ve kaynatıldı.
- Eriyen agar solüsyonu oda ısısında bekletilerek yaklaşık 75°C'ye kadar soğutuldu ve 0.5mg/ml'lik etidyum bromür'den 100 µl ilave edildi.
- Daha önceden tarakları tabana yaklaşık 1 mm boşluk kalacak şekilde yerleştirilen elektroforez kabına, hazırlanan agaroz jel döküldü ve donması için oda sıcaklığında 20-30 dk. bekletildi.
- Taraklar her iki uçtan tutularak dikkatlice çıkartıldı ve jel kabı elektroforez tankına yerleştirildi.
- Jelde ortaya çıkan kuyucuklara total 12 µl olacak şekilde uygun DNA marker ve PCR ürünleri (10 µl PCR ürünü + 2 µl 6X loading dye yükleme tamponu) aktarıldı.
- Elektroforez 125 volt'da (12.5 volt/cm²) 20-30 dakika süreyle yapıldı.
- Ortaya çıkan bandlar UV illüminatörde (görüntü analiz sistemi) marker ile kıyaslanarak DNA'ların yürüdüğü mesafe belirlendi.

2.2.5. Sınırlandırılmış Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP-Restriction Fragments Length Polymorphism)

RFLP, Genomik DNA' nın spesifik bir restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi ve DNA segmentlerinin agaroz jel elektroforez sisteminde ayrıştırılmasıyla oluşturulan, DNA profillerinin incelenmesine imkan tanıyan bir yöntemdir. Bakterilerde bulunan bu enzimler DNA' daki özgün dizileri tanıyarak kesme işlemini, tanıma bölgesinde veya bu bölgenin dışında başka özel bir dizide gerçekleştirirler. Bu yöntem ile tek nükleotit polimorfizmlerinin genotiplendirilmesi iki basamakta gerçekleştirilmektedir. İlk basamak DNA bölgesindeki SNP (Single Nucleotid Polymorphism-Tek Nükleotid Polimorfizmi) çevresindeki yaklaşık 200 baz çiftinin milyarlarca kez PCR ile çoğaltılarak, polimorfik bölgenin genotiplenmesi amacı ile PCR ürününün sekanslanmasına veya jel elektroforezinin ardından enzimle kesilmesine dayanmaktadır (Linn ve Arber 1968).

RFLP yönteminde, örnek DNA bir veya daha fazla restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildikten sonra, elde edilen DNA fragmentlerinin moleküler büyüklükleri göre jel elektroforezde yürütülerek moleküler ağırlık standardı (marker) yardımıyla belirlenebilmektedir. Jel, ethidium bromid ile muamele edildikten sonra fragmentler UV ışık altında görünür hale getirilerek jel profilindeki bantların sayılarına, büyüklüklerine bakılarak genotiplenebilir ve lokusa ait genotip/allel sıklıkları saptanabilir.

Çalışmamızda MTHFR geni C677T, MTHFR geni A1298C ve eNOS geni exon7 Glu298Asp (G894T) polimorfik bölgelerinin genotip analizleri RFLP yöntemi ile yapıldı.

MTHFR Geni C677T Polimorfizm Analizi

MTHFR geninin 677. Nükleotidinde C>T baz değişimi bulunmaktadır. Bu polimorfizm analizi için PCR-restriksiyon enzim kesimi metodu kullanılarak elde edilen kesim ürünlerinin uzunluk değişimine bakılarak (PCR-RFLP; PCR- restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi) analiz yapıldı.

Bunun için Forward: 5'-CAAAGGCCACCCCGAAGC-3' ve Reverse: 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' primerleri kullanılarak polimorfik olabilecek bölge çoğaltıldı. Reaksiyon için aşağıdaki karışım hazırlandı (Linve ark 2010).

dNTP (her biri 10 pmol).....	1,5 µl
10 x PCR tamponu.....	2,5 µl
10 pmol primer	1 µl
Molekuler Grade dH ₂ O.....	17,25 µl
DNA Taq polimeraz enzimi	0,25 µl
Genomik DNA	2,5 µl
TOPLAM	25 µl

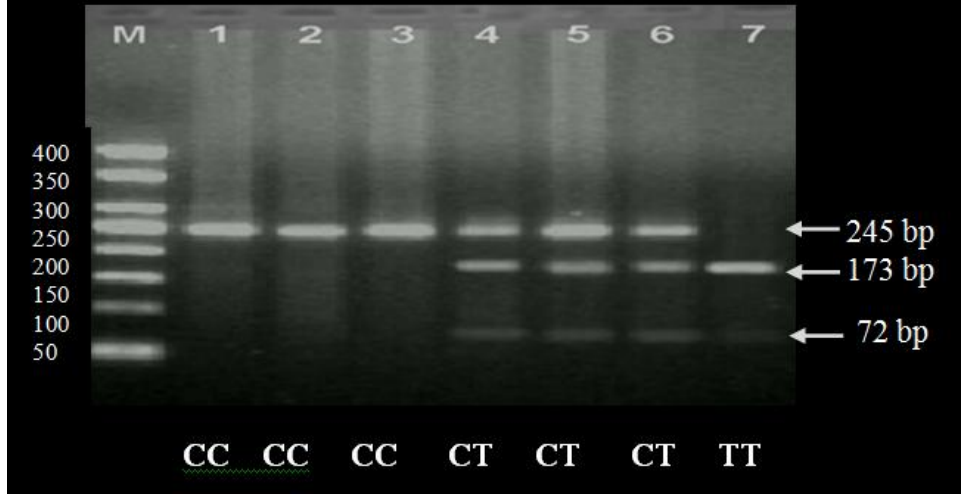
PCR reaksiyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

94 °C'de 5 dakika	}	1 döngü
94 °C'de 45 saniye		
61,5 °C'de 40 saniye	}	34 döngü
72 °C'de 50 saniye		
72 °C'de 7 dakika		

PCR ürününün 5 µl'si hazırlanan agaroz jelde yürütülerek 245 bp büyüklüğünde spesifik bandların olup olmadığının tespit edildi. Geri kalan 15 µl'lik PCR ürünü Hinf I (RE) kullanılarak kesildi. Bunun için aşağıdaki karışım kullanıldı:

Molekuler Grade dH ₂ O	7 µl
Restriksiyon Enzim Buffer.....	2 µl
Restriksiyon Enzimi (HinfI)	1 µl
PCR ürünü.....	15 µl

Karışım su banyosunda 37°C'de 12–16 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda elde edilen enzim kesim ürünleri jelde yürütüldükten sonra UV illüminator kullanılarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. MTHFR geni 677. Nükleotidi C>T değişimi için PCR jel elektroforez görüntüsü, M: 50 bp ladder, 1-3 bireyler (CC:homozigot normal), 4-6 bireyler (CT: heterozigot), 7 nolu birey (TT: homozigot mutant), bp: baz çifti

MTHFR Geni A1298C Polimorfizm Analizi

MTHFR geninin 1298. Nükleotidinde A>C baz değişimi bulunmaktadır. Bu polimorfizm analizi için PCR-RFLP metodu kullanılarak yapıldı. Bunun için Forward: 5'-CAA GGA GGA GCT GCT GAA GA-3' ve Reverse: 5'-CCA CTC CAG CAT CAC TCA CT-3' primerleri kullanılarak polimorfik olabilecek bölge çoğaltıldı. Bu bölgenin çoğaltılması için PCR reaksiyonu 50 µl'de hazırlandı. Reaksiyon için aşağıdaki karışım hazırlandı (Deeparani ve ark 2009).

dNTP (her biri 10 pmol).....	3 µl
10 x PCR tamponu.....	5 µl
10 pmol primer	2 µl
Molekuler Grade dH ₂ O.....	34,5 µl
DNA Taq polimeraz enzimi	0,5 µl
Genomik DNA	5 µl
TOPLAM	50 µl

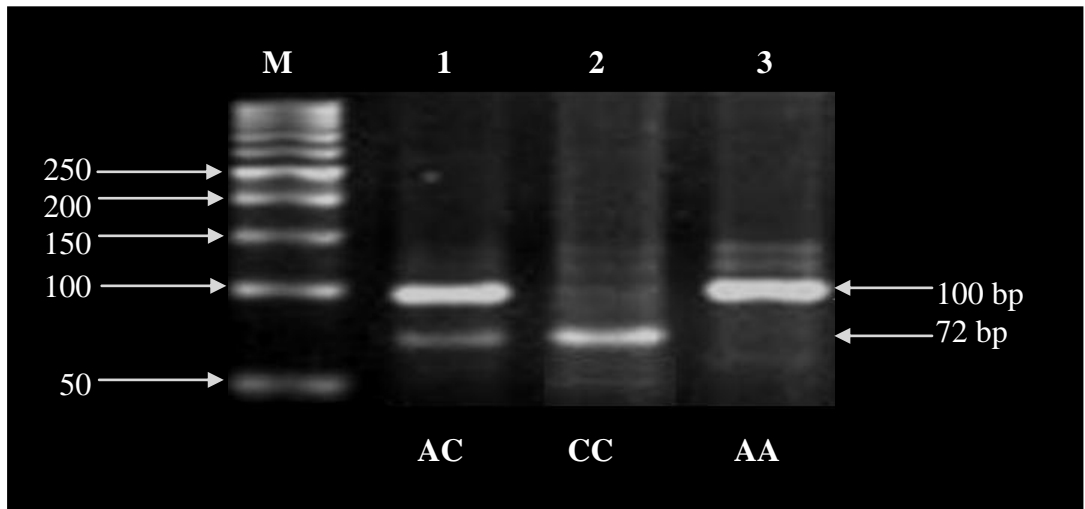
PCR reaksiyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

94 °C'de 8 dakika	}	1 döngü
94 °C'de 1 dakika		
63 °C'de 1 dakika	}	40 döngü
72 °C'de 1 dakika		
72 °C'de 7 dakika		
	}	1 döngü

PCR ürününün 5 µl'si hazırlanan agaroz jelde yürütülerek 128 bp büyüklüğünde spesifik bandların olup olmadığının tespit edildi. Geri kalan 15 µl'lik PCR ürünü Mob II (RE) kullanılarak kesildi. Bunun için aşağıdaki karışım kullanıldı:

Molekuler Grade dH ₂ O	7 µl
Restriksiyon Enzim Buffer.....	2 µl
Restriksiyon Enzimi (Mob II)	1 µl
PCR ürünü.....	15 µl

Karışım su banyosunda 37°C'de 12–16 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda elde edilen enzim kesim ürünleri jelde yürütüldükten sonra UV illüminator kullanılarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. MTHFR geni 1298. nükleotidi A>C değişimi için PCR jel elektroforez görüntüsü, M: 50 bp ladder, 1 nolu hasta AC: heterozigot, 2 nolu hasta CC: homozigot mutant, 3 nolu hasta AA: normal, bp: baz çifti

eNOS Geni Exon7 Glu298Asp (G894T) Polimorfizm Analizi

eNOS geninin 7. exonunda 894. nükleotitte G>T baz değişimi bulunmaktadır. Bu polimorfizmin analizi PCR-RFLP metodu kullanılarak yapıldı. Bunun için Forward: 5'-CAG GAG ACA GTG GGA GGG-3' ve Reverse: 5'-CCA GTC AAT CCC TTT GGT GCT CA-3' primerleri kullanılarak polimorfik olabilecek bölge çoğaltıldı. Reaksiyon için aşağıdaki karışım hazırlandı (Colombo ve ark 2002).

dNTP (her biri 10 pmol).....	1,6 µl
10 x PCR tamponu.....	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
10 pmol primer	1,2 µl
Molekuler Grade dH ₂ O.....	11,8 µl
DNA Taq polimeraz enzimi	0,4 µl
Genomik DNA	2 µl
TOPLAM	20 µl

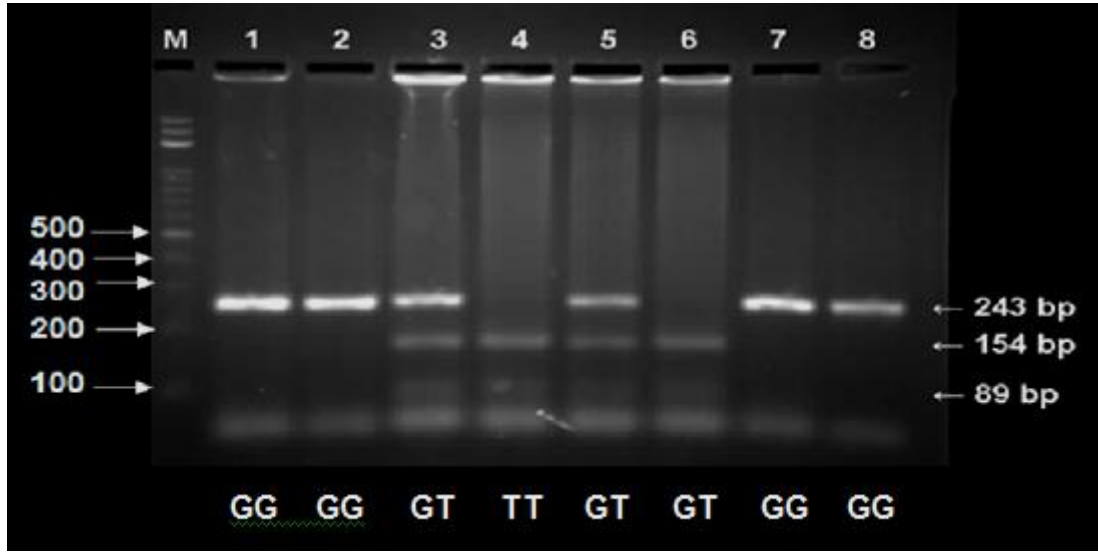
PCR reaksiyonu termal cycler'da aşağıdaki şekilde yapıldı.

94 °C'de 3 dakika	}	1 döngü
94 °C'de 15 saniye		
60 °C'de 15 saniye	}	10 döngü
72 °C'de 15 saniye		
94 °C'de 15 saniye		
59 °C'de 15 saniye	}	20 döngü
72 °C'de 15 saniye		
72 °C'de 3 dakika		
	}	1 döngü

PCR ürününün 5 µl'si hazırlanan agaroz jelde yürütülerek 243 bp büyüklüğünde spesifik bandların olup olmadığının tespit edildi. Geri kalan 15 µl'lik PCR ürünü RE (Restriksiyon Enzimi) Mob I kullanılarak kesildi. Bunun için aşağıdaki karışım kullanıldı:

Moleküler Grade dH ₂ O	3,5 µl
Restriksiyon Enzim Buffer.....	2 µl
Restriksiyon Enzimi (MobI)	0,5 µl
PCR ürünü	15 µl

Karışım su banyosunda 37°C'de 12–16 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda elde edilen enzim kesim ürünleri jelde yürütüldükten sonra UV illüminator kullanılarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. eNOS geni 7. exondaki G>T polimorfizmi için PCR-RFLP jel elektroforez görüntüsü. M:100bp ladder, 1-8 hastalar, GG: normal, GT: heterozigot, TT: homozigot mutant, bp: baz çifti.

2.2.6. Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Eden Dizinler (VNTR-Variable Number of Tandem Repeats)

Ökaryotik genomda yüzlerce kez tekrarlanan kısa DNA bölgeleri bulunur. Bu tekrar bölgeleri bazı restriksiyon enzim bölgelerine bağlı olduğu için VNTR'ları taşıyan kromozom segmentlerini bu enzimlerle kesmek mümkündür. VNTR lokuslarını çoğaltmada günümüzde PCR tekniği kullanılmaktadır. PCR analizleri için primerler VNTR lokuslarının yan tarafında olacak şekilde dizayn edilir ve PCR ürünlerinin boyutları böylece tekrar sayılarına bağlı olmuş olur. PCR ile çoğaltılan fragmentler jel üzerinde yürütülerek uzunluklarına bakılır.

VNTR lokuslarındaki tekrar sayıları insandan insana çok çeşitlidir ve heterozigot bireylerde daha fazladır. Farklı alleller farklı uzunluktaki fragmentlerdir. Bilinen VNTR'lar 10-100 bp uzunluğunda 1-30 kez tekrar ederler. Çalışmamızda 27 kez tekrar eden eNOS geni intron 4a/b polimorfik bölgesi bu metod ile analiz edilmiştir.

eNOS Geni İtron 4a/b Polimorfizm Analizi

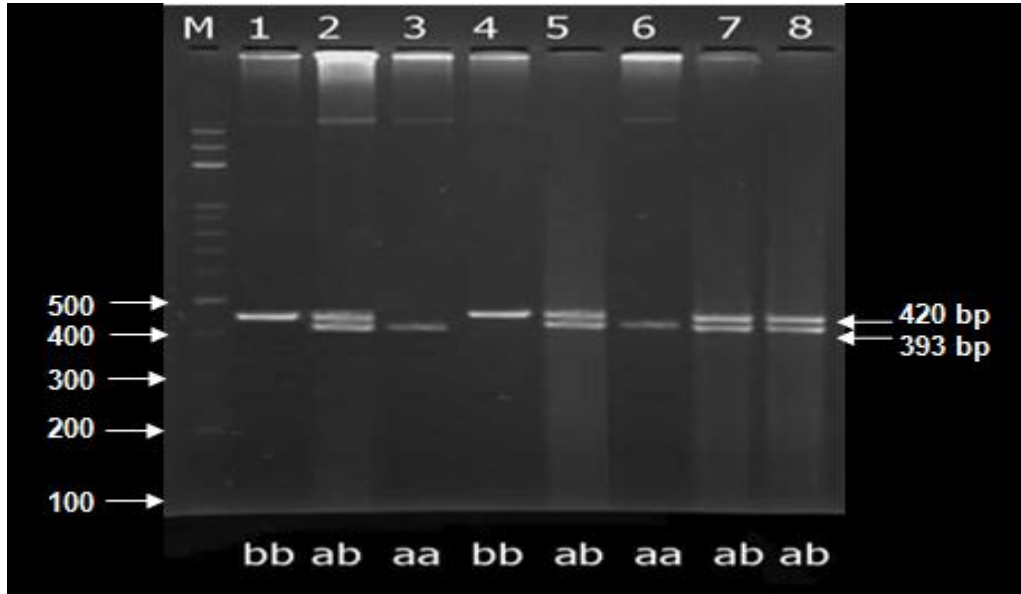
eNOS intron 4 a/b VNTR polimorfizminin değerlendirilmesinde PCR tekniği kullanıldı. Bunun için forward 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT-3` (lokalizasyon: 5111. - 5130. bp arası) ve revers 5'-TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC-3` (lokalizasyon: 5111. - 5130. bp arası) primerleri kullanıldı. Reaksiyon için aşağıdaki karışım hazırlandı (Trabetti ve ark 2006).

dNTP (her biri 10 pmol).....	1,6 µl
10 x PCR tamponu.....	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
10 pmol primer (eNOS intron 4a/b)	1,2 µl
Moleküler Grade dH ₂ O.....	11,8 µl
DNA Taq polimeraz enzimi (Fermantes, UK)	0,4 µl
Genomik DNA	2 µl
TOPLAM	20 µl

PCR reaksiyonu aşağıdaki şekilde yapıldı.

94 °C'de 3 dakika } 1 döngü
94 °C'de 15 saniye }
59 °C'de 15 saniye } 10 döngü
72 °C'de 15 saniye }
94 °C'de 15 saniye }
58 °C'de 15 saniye } 20 döngü
72 °C'de 15 saniye }
72 °C'de 3 dakika } 1 döngü

PCR ürünü jelde yürütülerek 420 ve 393 bp büyüklüğünde spesifik bandların olup olmadığı tespit edildi (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. eNOS geni 4. introndaki 4a/b polimorfizmi için PCR jel elektroforez görüntüsü, M: 100 bp ladder, 1-8 hastalar, bb: normal, ab: heterozigot, aa: homozigot mutant, bp: baz çifti.

2.2.7. Plazma Nitrat / Nitrit Düzeyi Ölçümü

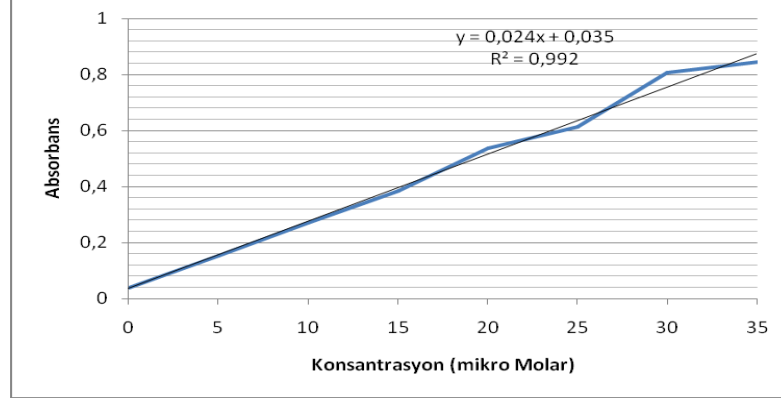
Nitrit ve nitrat düzeylerinin ölçümü Cayman marka ticari kit (Nitrate / Nitrite Colorimetric Assay Kit Catalog No. 780002 Cayman Chemical Company) kullanılarak gerçekleştirildi.

Metodun prensibi, nitrat'ın nitrat redüktaz enzimi ile nitrit'e çevrilmesine dayanır. Böylece total nitrit düzeyleri Griess reaksiyonuyla ölçülür. Daha sonra enzimatik dönüşüm olmaksızın nitrit düzeyleri yine Griess reaksiyonu ile ölçülür. Böylece total nitrit'ten bu ölçülen nitrit düzeyleri çıkarılınca nitrat düzeyleri elde edilmiş olur. Oluşan nitrit pembe renk verir ve konsantrasyonları 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. NO düzeyi nitrat ve nitrit toplamı şeklinde hesaplanır.

NO düzeyinin ölçümü için;

- 100 µl numune alınıp üzerine 100 µl Assay Buffer eklendi.
- Bu karışım filtreye yüklendi ve +4 °C' de 5000 g' de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen berrak süzüntü kullanıldı
- 0,9 mL Assay buffer üzerine 0,1 mL Nitrat standardı eklenip vortekslendi. Böylece 200 µM stok standart hazırlanmış oldu. Stok standart solüsyondan sırasıyla 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM ve 35 µM olmak üzere standartlar hazırlandı.
- Numunelerin süzülen kısımlarından her kuyucuğa 80 µl süzüntü konuldu.
- Blank kuyucuğuna ise sadece 200 µl Assay Buffer konuldu.
- Her kuyucuğa önce 10 µl enzim kofaktör ardından 10 µl nitrat redüktaz eklendikten sonr pleytin üzeri foil ile kapatıldı.
- Pleyt oda ısısında 3 saat bekletildi.
- Süre sonunda kuyucuğa 50 µl Griess 1 reaktifi (sülfanilamid) hemen ardından da 50 µl Griess 2 reaktifi (N-naftil etilendiamin) eklendi.
- Optimal renk oluşumu için 10 dakika oda ısısında bekletildi.
- Absorbanslar 540 nm'de okutuldu.
- Nitrat ve nitrit için standart eğriler oluşturuldu.
- Standart eğrisinden karşılık gelen total nitrat ve nitrit değerleri hesaplandı.

Çalışmamızda elde edilen kalibrasyon eğrisi ve denklemi Şekil 2.4’de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Nitrit/nitrat düzeyi kalibrasyon eğrisi

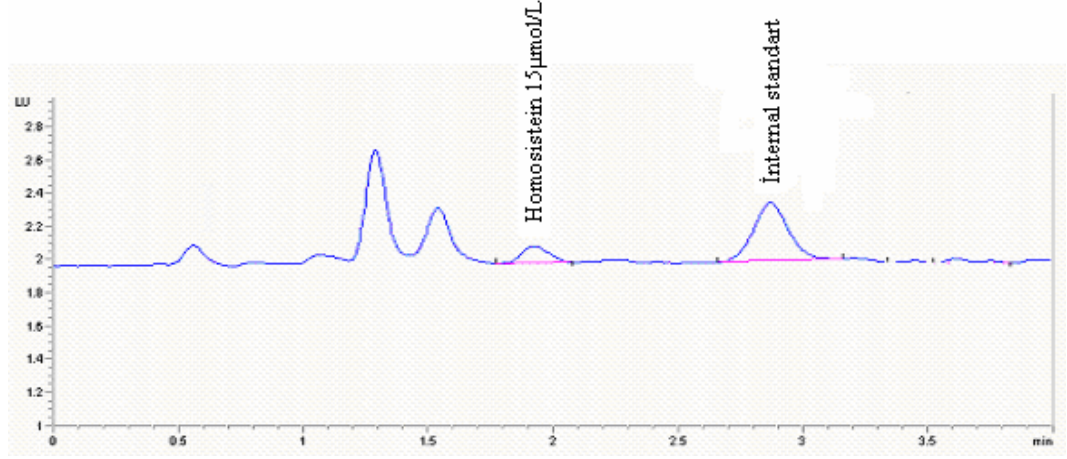
2.2.8. Plazma Homosistein Düzeyi Ölçümü

Klinik çalışmalarda genel olarak homosistein düzeyi “Total Plazma Homosistein” şeklinde ölçülmektedir. Bu ölçüm; homosistein, miks disülfid içeren homosistein, homosistein tiolakton, serbest homosistein ve proteine bağlı homosistein formlarını içermektedir. Total miktarın %70- 80’i proteine bağlı formdur.

Çalışmamızda, homosistein düzeyi Chromsystems marka ticari kit (Lot no:503) kullanılarak Agilent 1100 marka HPLC cihazında aşağıdaki şekilde ölçüldü:

- 100µl serum, 25µl internal standart ve 25µl indirgeyici reaktif kahverengi bir ependorf tüp içerisinde 2-3 sn kadar vorteks ile karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Daha sonra 100µl çöktürücü reaktif aynı ependorf tüpe ilave edilip 30 saniye karıştırıldı ve 9000 rpm’de 6 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatandan 50µl alınarak, içerisinde 100µl derivatizasyon reaktif-1 bulunan şeffaf renkli ependorf tüpe konularak 1-2 saniye karıştırılıp 50-55°C’de su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
- Daha sonra buz banyosunda soğutulup 20µl enjeksiyona ayarlanmış HPLC Agilent 1100 cihazında ölçüm yapıldı.

Çalışmamızda elde ettiğimiz homosistein ölçümüne ait standart kromatogram örneği şekil 2.5.'de verilmiştir.



Şekil 2.5. Homosistein ölçümüne ait standart kromatogram

2.2.9. Plazma Okside LDL Düzeyi Ölçümü

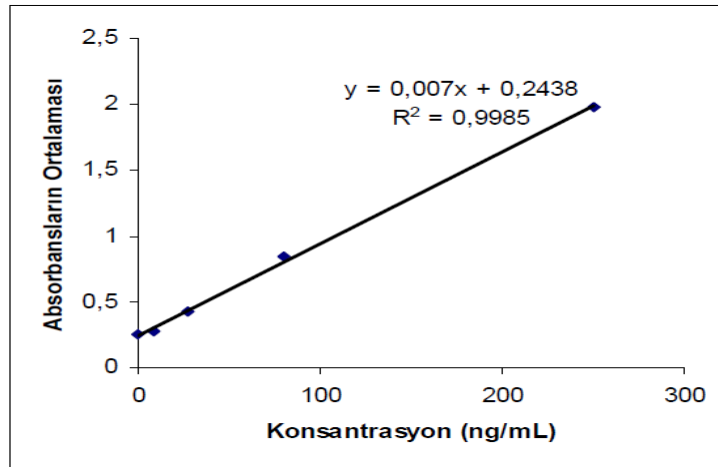
Çalışmamızda, Ox-LDL ölçümleri ELISA prensibi ile çalışan Immun Diagnostik marka (Cat. No: 7810) ticari kit kullanılarak ölçüldü.

Metodun prensibi şöyledir: Ox-LDL içeren örnekler yüksek affiniteli antikorla kaplanmış mikropleytin kuyucuklarına ilave edilir. Birinci inkübasyon periyodu sırasında kuyucukların duvarına yapışan antikorlar hasta örneklerindeki antijenleri yakalar. Hasta örneklerindeki bağlanmayan bileşenler yıkama yoluyla uzaklaştırıldıktan sonra peroksidaz konjuge antikorlar her bir kuyucuğa ilave edilir. Tetrametil benzidin (TMB) peroksidaz substratı olarak kullanılır. Son olarak asidik sonlandırma solüsyonu reaksiyonu sonlandırmak için eklenir. Sarı rengin şiddeti hasta örneklerindeki Ox-LDL miktarıyla doğru orantılıdır.

- Bütün hasta örnekleri ve reaktifler oda sıcaklığına getirildi ve iyice karıştırıldı.
- Plate'nin her bir kuyucuğu dilüe yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı.

- Seyreltme tamponuyla 10 kat seyreltilen örneklerden 100'er µl ilgili kuyucuklara ilave edildi.
- Yatay karıştırıcıda oda sıcaklığında 4 saat bekletildi.
- Her bir kuyucuk aspire edildi. Sonra yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 100'er µl peroksidaz konjuge antikor ilave edildi.
- Yatay karıştırıcıda oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Her bir kuyucuk aspire edildi. Sonra yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı.
- Her bir kuyucuğa substrat olarak tetrametil benzidin ilave edildi.
- Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15-25 dakika inkübasyona bırakıldı
- Reaksiyonu sonlandırmak için her bir kuyucuğa durdurma solüsyonu ilave edildi.
- ELISA okuyucusunda 620 nm referans alınarak 450 nm'de okuma yapıldı ve sonuçlar standart grafiğinden hesaplandı.

Çalışmamızda elde ettiğimiz Ox-LDL kalibrasyon eğrisi Şekil 2.6'de gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Ox-LDL ölçümüne ait kalibrasyon eğrisi

2.2.10. İstatistik Analiz

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen veriler SPSS 15.0 programı kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı. Hasta ile kontrol grubunun karşılaştırılması t-testi ile, genotip dağılımı X^2 testi ile, allel frekansı Fisher Exact Testi ile, genotip dağılımı ile biyokimyasal değerlerin karşılaştırılması One Way ANOVA testi ile değerlendirildi.

Değerlendirme sonucunda $p < 0.05$ olan sonuçlar önemli olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Biyokimyasal Parametrelerin Bulguları

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol grubuna ait biyokimyasal parametre sonuçları Çizelge 3.1.'da verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmaya katılan hasta ve kontrol gruplarına ait biyokimyasal parametrelerin sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Biyokimyasal Parametreler	EHT Grubu (n=129)	Kontrol Grubu (n=108)	p Değeri
Homosistein ($\mu\text{mol/L}$)	22.39 \pm 13.72	12.77 \pm 5.42	0,001
Nitrik Oksit (μM)	36.75 \pm 13.28	27.27 \pm 12.31	0,001
Okside LDL (U/L)	64.99 \pm 71.42	42.66 \pm 26.27	0,012

Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi EHT hastalarına ait homosistein, NO ve Ox- LDL düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli oranda yüksek bulunmuştur.

3.2. eNOS Geninde İtron 4 a/b ve Exon 7 Glu298Asp (G894T) Polimorfik Bölgelerinin Bulguları

Hasta ve kontrol grubunun eNOS geni intron 4 a/b polimorfik bölgesi PCR metoduyla analiz edildi. PCR sonucu elde edilen ürün jel elektroforezde yürütüldükten sonra 420 ile 393 bp büyüklüğündeki bantlar gözlemlendi. Bu bantlardan 420 bp büyüklüğündeki bantlar eNOS geni 4. intronu VNTR (4a/b) polimorfizmi için bb (homozigot normal); 420 ve 393 bp büyüklüğündeki bantlar aynı bireyde görüldüğünde eNOS geni 4. intron için ab (heterozigot); 393 bp büyüklüğündeki bant tek başına görüldüğünde ise eNOS geni 4. intron için aa (homozigot mutant) formda genotipinin olduğu tespit edildi (Şekil 2.4).

Hasta ve kontrol grubunda eNOS geni 7. exonundaki Glu298Asp (G894T) G>T değişimi analizi PCR-RFLP yöntemiyle Mob I enzimi kullanarak yapıldı. Enzim kesim sonucu edilen ürün jel elektroforezde yürütüldükten sonra 243, 154 ve 89 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi. Sadece 243 bp büyüklüğünde bant görüldüğünde eNOS geni 7. exon için GG (homozigot normal); 243–154-89 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte aynı bireyin örneğinde görüldüğünde eNOS geni 7. exon için GT (heterozigot); 154 ve 89 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde ise eNOS geni 7. exon için TT (homozigot mutant) formda genotipinin olduğu tespit edildi (Şekil 2.3).

3.3. MTHFR Geninde C677T ve A1298C Polimorfik Bölgelerinin Bulguları

Hasta ve kontrol grubunda MTHFR geninin 677.nükleotidindeki C>T değişimi analizi PCR-RFLP yöntemiyle HinfI enzimi kullanılarak yapıldı. Enzim kesim sonucu elde edilen ürün jel elektroforezde yürütüldükten sonra 245, 173 ve 72 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi. Sadece 245 bp büyüklüğünde bant görüldüğünde CC (homozigot normal); 245-173-72 bp büyüklüğündeki bantlar görüldüğünde CT (heterozigot); 172 ve 72 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde ise MTHFR 677. nükleotidi için TT (homozigot mutant) formda genotipinin olduğu tespit edildi (Şekil 2.1).

Hasta ve kontrol grubunda MTHFR geninin 1298.nükleotidindeki A>C değişimi analizi PCR-RFLP yöntemiyle MboII enzimi kullanılarak yapıldı. Enzim kesim sonucu elde edilen ürün jel elektroforezde yürütüldükten sonra 100, 72 ve 28 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi. Sadece 100 bp büyüklüğünde bant görüldüğünde AA (homozigot normal); 100-72-28 bp büyüklüğündeki bantlar görüldüğünde (28 bp primer dimerleri ile karışabildiği için her zaman gözlenememektedir) AC(heterozigot); 72 ve 28 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde ise MTHFR geninin 1298. nükleotidi için CC (homozigot mutant) formda genotipinin olduğu tespit edildi (Şekil 2.2).

3.4. eNOS Geni intron 4a/b ve exon 7 Glu298Asp (G894T) Polimorfik Bölgelerinin Genotip ve Allel Dağılımı Bulguları

eNOS geni intron 4 a/b polimorfizm bulguları çizelge 3.2.'de verilmiştir. Çizelge 3.2.'den görüldüğü gibi, hastaların ve kontrol gruplarının kendi içlerinde cinsiyetler arasında genotip (sırayla, p=0,145 ve p=0,461) ve allel dağılımında (sırayla, p=0,072 ve p=0,353) herhangi bir fark tespit edilmedi. Yine, hasta ve kontrol grupları arasında da genotip ve allel dağılımı açısından istatistiksel açıdan herhangi bir anlamlılık tespit edilmedi (sırasıyla, p=0,244; p=0,152 OR=0,729 %95; CI =0,273-1,216).

Çizelge 3.2. Hasta ve kontrol bireylerindeki eNOS geni intron 4 a/b polimorfik bölgesi için genotip dağılımı ve allel sıklığı.

HASTA KONTROL		GENOTİP DAĞILIMI			P değeri (E/K)	ALLEL SIKLIĞI		p* ve OR** değeri (E/K)
		bb (%)	ab (%)	aa(%)		b (%)	a (%)	
HASTA	E	56 (%42,6)	6 (%4,6)	0 (%0,0)	0,145	118 (%44,9)	6 (%2,3)	*0,072 **2,578
	K	53 (%41,1)	14 (%10,8)	0 (%0,0)		120 (%46,5)	14 (%6,1)	
	T	109 (%83,7)	20 (%15,4)	0 (%0,0)		238 (%91,4)	20 (%8,5)	
KONTROL	E	55 (%49,9)	4 (%3,7)	0 (%0,0)	0,461	114 (%51,8)	4 (%1,8)	*0,353 **2,108
	K	44 (%40,7)	5 (%4,6)	0 (%0,0)		93 (%43,1)	5 (%3,2)	
	T	99 (%90,6)	9 (%8,3)	0 (%0,0)		207 (%94,9)	9 (%5,0)	
Hasta ve kontrol grupları		p=0.094				p=0.105, OR=1.933 %95 CI = (0.860-4.333)		

E:Erkek, K:Kadın, T:Toplam, OR: Odds Ratio (Olasılık Oranı), CI: Common Interface(Güven Aralığı)

eNOS geni exon 7 Glu298Asp (G894T) G>T değişimi bulguları çizelge 3.3.'de verilmiştir. Çizelge 3.3.'den görüldüğü gibi, hasta ve kontrol grubunun kendi içlerinde cinsiyetler arasında genotip (sırayla, p=0,444 ve p=0,897) ve allel dağılımında (sırayla, p=0,877 ve p=0,879) herhangi bir fark tespit edilmedi. Bununla birlikte hasta ve kontrol grupları arasında da genotip ve allel dağılımında istatistiksel açıdan herhangi bir anlamlılık tespit edilmedi (sırasıyla, p=0,200; p=0,083 OR=1,463 %95; CI =0,956-2,238).

Çizelge 3.3. Hasta ve kontrol bireylerindeki eNOS geninin exon 7 Glu298Asp (G894T) polimorfik bölgesi için genotip dağılımı ve allel sıklığı.

HASTA KONTROL		GENOTİP DAĞILIMI			P Değeri (E/K)	ALLEL SIKLIğI		p* ve OR** Değeri (E/K)
		GG (%)	GT (%)	TT (%)		G (%)	T (%)	
HASTA	E	36 (%27,9)	24 (%18,6)	1 (%0,7)	0,444	96 (%9,9)	26 (%9,9)	*0,877 **0,915
	K	44 (%34,1)	21 (%16,2)	3 (%2,3)		109 (%10,6)	27 (%10,6)	
	T	80 (%62,0)	45 (%34,8)	4 (%3,1)		205 (%20,6)	53 (%20,6)	
KONTROL	E	31 (%28,7)	23 (%21,2)	4 (%3,7)	0,897	84 (%14,3)	31 (%14,3)	*0,879 **1,054
	K	25 (%23,1)	22 (%20,3)	3 (%2,7)		72 (%12,9)	28 (%12,9)	
	T	56 (%51,8)	45 (%41,6)	7 (%6,4)		156 (%27,3)	59 (%27,3)	
Hasta ve kontrol grupları		p=0.200			p=0,083 OR=1.463 %95 CI = 0.956-2.238			

E:Erkek, K:Kadın, T:Toplam, OR: Odds Ratio (Olasılık Oranı), CI: Common Interface(Güven Aralığı)

3.5. MTHFR Geninin C677T ve A1298C Polimorfik Bölgelerinin Genotip ve Allel Dağılım Bulguları

Hasta ve kontrol grubu bireylerinde MTHFR C677T genotip dağılımı çizelge 3.4.'de verilmiştir. Çizelge 3.4'den görüldüğü gibi, MTHFR 677 C>T değişimi için hasta ve kontrol gruplarının kendi içlerinde cinsiyetler arasında genotip (sırayla, p=0,544 ve p=0,113) ve allel dağılımında (sırayla, p=0,406 ve p=0,250) önemli bir fark tespit edilmedi. Buna karşılık hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımında önemli bir fark (p=0,003) bulundu. Allel dağılımı açısından ise T allelinin hastalık açısından risk oluşturabileceği tespit edildi (p=0,000; OR=0,482 %95; CI =0,326–0,713).

Çizelge 3.4. Hasta ve kontrol bireylerindeki MTHFR geni C677T polimorfik bölgesi için genotip dağılımı ve allel sıklığı.

HASTA KONTROL		GENOTİP DAĞILIMI			p Değeri (E/K)	ALLEL SIKLIĞI		p* ve OR** Değeri
		CC(%)	CT (%)	TT (%)		C (%)	T (%)	
HASTA	E	21 (%24,0)	24 (%17,0)	13 (%6,1)	0,544	66 (%27,8)	50 (%20,1)	*0,406 **0,766
	K	26 (%29,4)	30 (%19,4)	15 (%3,9)		82 (%33,5)	60 (%18,5)	
	T	47 (%36,4)	54 (%41,8)	28 (%21,7)		148 (%57,3)	110 (%42,6)	
KONTROL	E	30 (%27,7)	17 (%19,44)	6 (%6,48)	0,113	77 (%32,1)	29 (%20,7)	*0,250 **1,418
	K	31 (%15,8)	20 (%25,92)	4 (%4,62)		82 (%24,6)	28 (%22,4)	
	T	61 (%56,4)	37 (%34,2)	10 (%9,2)		159 (%72,9)	57 (%26,1)	
Hasta ve kontrol grupları		p=0,003			p=0.000; OR=0,482 %95 CI = (0,326-0,713)			

E:Erkek, K:Kadın, T:Toplam, OR: Odds Ratio (Olasılık Oranı), CI: Common Interface(Güven Aralığı)

MTHFR 1298 A>C değişimi bulguları çizelge 3.5.'de verilmiştir. Çizelge 3.5.'den görüldüğü gibi, hasta ve kontrol grubunun kendi içlerinde cinsiyetler arasında genotip (sırayla, p=0,345 ve p=0,536) ve allel dağılımında (sırayla, p=0,666 ve p=0,881) herhangi bir fark tespit edilmedi. Buna karşılık hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulundu (p=0,031). Ancak allel sıklığı açısından gruplar arasında önemli bir fark tespit edilmedi (p=0,384; OR=0,845 %95; CI =0,579-1,234).

Çizelge 3.5. Hasta ve kontrol bireylerindeki MTHFR geni A1298C polimorfik bölgesi için genotip dağılımı ve allel sıklığı.

HASTA KONTROL		GENOTİP DAĞILIMI			p Değeri (E/K)	ALLEL SIKLIğI		p* ve OR** Değeri (E/K)
		AA (%)	AC (%)	CC(%)		A (%)	C (%)	
HASTA	E	23 (%37,7)	24 (%39,3)	14 (%22,9)	0,345	70 (%57,3)	52 (%42,6)	*0,114 **0,666
	K	34 (%50,0)	23 (%33,8)	11 (%16,1)		91 (%66,9)	45 (%33,1)	
	T	57 (%44,1)	47 (%36,4)	25 (%19,3)		171 (%59,3)	97 (%33,7)	
KONTROL	E	23 (%39,6)	29 (%50,0)	6 (%10,3)	0,536	75 (%64,6)	41 (%35,4)	*0,644 **0,881
	K	24 (%40,0)	23 (%55,0)	3 (%5,0)		71 (%67,5)	29 (%32,5)	
	T	47 (%42,7)	52 (%47,2)	9 (%8,1)		146 (%67,5)	70 (%32,5)	
Hasta ve kontrol grupları		p=0,031				p=0,384 ; OR=0,845 %95CI= 0,579-1,234		

E:Erkek, K:Kadın, T:Toplam, OR: Odds Ratio (Olasılık Oranı), CI: Common Interface(Güven Aralığı)

3.6. Hasta ve Kontrol Grubunda eNOS Geni intron 4a/b ve exon 7 Glu298Asp (G894T) Polimorfik Bölgelerinin Genotip Dağılımları ile NO Düzeyleri Arasındaki İlişki

eNOS geni intron 4 a/b polimorfik bölgesinde oluşan bb (homozigot normal), ab (heterozigot) ve aa (homozigot mutant) genotiplerden, bu genotipe sahip bireylerin NO seviyeleri ile olan ilişkisi incelendi. Hasta grubundan b/b ve a/b genotipe sahip bireylerin NO seviyelerinin kontrol grubundaki aynı genotipe sahip bireylerdeki NO seviyelerinden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi (Çizelge 3.6).

Bu bulgu da intron 4a/b polimorfik bölgesindeki genotip dağılımının hasta ve kontrol gruplarına ait NO düzeyleri ile bir ilişkinin olmadığını göstermektedir.

Çizelge 3.6. eNOS geni intron 4 a/b polimorfik bölgesi genotip dağılımı ile hasta ve kontrol grubu NO düzeylerinin karşılaştırılması.

Genotip	Hasta ve Kontrol	Birey Sayısı	NO Düzeyi $\bar{x}\pm SD$	p Değeri
bb	Hasta	106	34,21±12,57	0,014
	Kontrol	89	26,64±9,59	
ab	Hasta	23	35,80±14,75	0,027
	Kontrol	19	27,20±7,49	
aa	Hasta	0		
	Kontrol	0		

b/b: Homozigot normal, b/a: Heterozigot, a/a: Homozigot mutant, \bar{x} : Ortalama, SD:Standart Sapma

eNOS geni exon 7 Glu298Asp (G894T) G>T değişimi sonucu oluşan GG (homozigot normal), GT (heterozigot) ve TT (homozigot mutant) genotiplerden, bu genotipe sahip bireylerin nitrik oksit seviyeleri ile olan ilişkisi incelendi. Hasta grubundan GG ve GT genotipe sahip bireylerin nitrik oksit seviyelerinin kontrol grubundaki aynı genotipe sahip bireylerdeki nitrik oksit düzeyinden anlamlı derecede yüksek olduğu (sırasıyla; p=0,029, p=0,017), TT genotipine sahip bireylerin ise hasta ve kontrol grubunun NO düzeylerinin istatistiksel açıdan önemli bir fark olmadığı tespit edildi (Çizelge 3.7). Tüm bu bulgular eNOS geni exon 7 Glu298Asp (G894T) polimorfik bölgesinin genotip dağılımlarının NO düzeyi ile arasında bir ilişkinin olmadığını göstermektedir.

Çizelge 3.7. eNOS geni exon 7 Glu298Asp (G894T) polimorfik bölgesi genotip dağılımı ile hasta ve kontrol grubu NO düzeylerinin karşılaştırılması.

Genotip	Hasta ve Kontrol	Birey Sayısı	NO Düzeyi $\bar{x} \pm SD$	p Değeri
GG	Hasta	72	34,63±11,98	0,029
	Kontrol	59	27,03±12,73	
GT	Hasta	51	33,67±14,59	0,017
	Kontrol	45	24,14±10,17	
TT	Hasta	6	25,86±0,04	0,560
	Kontrol	4	23,72±9,17	

G/G: Homozigot normal, G/T: Heterozigot, T/T: Homozigot mutant, \bar{x} : Ortalama, SD:Standart Sapma

3.7. Hasta ve Kontrol Grubunda MTHFR Geni C677T ve A1298C Polimorfik Bölgelerinin Genotip Dağılımı ile Homosistein Düzeyleri Arasındaki İlişki

MTHFR geni 677. nükleotitteki C>T değişimi sonucu oluşan CC (homozigot normal), CT (heterozigot) ve TT (homozigot mutant) genotiplerden, bu genotipe sahip bireylerin homosistein seviyeleri ile olan ilişkisi incelendi. Hasta grubundan CC, CT ve TT genotipe sahip bireylerin homosistein seviyelerinin kontrol grubundaki aynı genotipe sahip bireylerdeki homosistein düzeyinden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi (Çizelge 3.8). Bu bulgu, MTHFR geninin C677T polimorfik bölgesindeki genotip dağılımının plazma homosistein düzeyini etkilemediğini göstermektedir.

Çizelge 3.8. MTHFR geninin C677T polimorfik bölgesi genotip dağılımı ile hasta ve kontrol grubu homosistein düzeylerinin karşılaştırılması.

Genotip	Hasta ve Kontrol	Birey Sayısı	Homosistein Düzeyi $\bar{x} \pm SD$	p Değeri
CC	Hasta	47	21,57 ± 12,93	0,001
	Kontrol	61	12,85 ± 5,32	
CT	Hasta	54	23,15 ± 14,36	0,000
	Kontrol	37	12,9 ± 6,94	
TT	Hasta	28	25,61 ± 19,6	0,000
	Kontrol	10	12,88 ± 4,58	

C/C: Homozigot normal, C/T: Heterozigot, T/T: Homozigot mutant, \bar{x} : Ortalama, SD:Standart Sapma

MTHFR geninde 1298. nükleotitteki A>C değişimi sonucu oluşan AA (homozigot normal), AC (heterozigot) ve CC (homozigot mutant) genotipe sahip bireylerin homosistein seviyeleri ile olan ilişkisi incelendi. Hasta grubundan normal, heterozigot ve mutant genotipe sahip bireylerin homosistein seviyelerinin kontrol grubundaki aynı genotipe sahip bireylerdeki homosistein düzeyinden anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (Çizelge 3.9). Ancak bu polimorfik bölgede de hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımları ile plazma homosistein düzeyleri arasında bir ilişki kurulamadı.

Çizelge 3.9. MTHFR geninin A1298C polimorfik bölgesinin genotip dağılımı ile hasta ve kontrol grubu homosistein düzeylerinin karşılaştırılması.

Genotip	Hasta ve Kontrol	Birey Sayısı	Homosistein Düzeyi $\bar{x}\pm SD$	P Değeri
AA	Hasta	57	21,76±11,17	0,001
	Kontrol	47	12,9±2,76	
AC	Hasta	47	22,52±14,14	0,001
	Kontrol	52	12,8±4,07	
CC	Hasta	25	23,21±15,30	0,002
	Kontrol	9	12,34±5,4	

A/A: Homozigot normal, A/C: Heterozigot, C/C: Homozigot mutant, \bar{x} : Ortalama, SD:Standart Sapma

3.8. eNOS Geni İtron 4a/b ve exon 7 Glu298Asp (G894T) Polimorfik Bölgelerinin Birleştirilmiş Genotip Dağılımı ile NO Düzeyleri Arasındaki İlişki

eNOS geni intron 4a/b ve exon 7 894. nükleotitteki G>T değişimi sonucu oluşan GG (homozigot normal), GT (heterozigot) ve TT (homozigot mutant) genotipe sahip bireylerin nitrik oksit seviyeleri ile olan ilişkisi incelendi (Çizelge 3.10). Hasta ve kontrol gruplarının kendi içinde ayrı ayrı bileşik genotipleri ile nitrik oksit seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Hasta ve kontrol grupları arasında, eNOS geni intron 4a/b ile exon 7 (G894T) G>T birleştirilmiş polimorfik bölgelerinin tüm formlarının kombinasyonlarıyla nitrik oksit değerleri arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulundu (sırasıyla, $p=0.004$; $p=0.000$; $p=0.000$; $p=0.002$; $p=0.048$)

Çizelge 3.10. Hasta ve kontrol grubunda eNOS geni intron 4a/b ve Exon 7 Glu298Asp (G894T) polimorfik bölgelerinin birleştirilmiş genotip dağılımları ile NO düzeylerinin karşılaştırılması.

Birleştirilmiş Genotip İtron 4a/b + Exon 7 G>T	Hasta ve Kontrol	Birey Sayısı	NO Düzeyi $\bar{x}\pm SD$	p Değeri
bb + GG	Hasta	54	34,51±7,7	0,004
	Kontrol	43	28,15±12,23	
bb + GT	Hasta	43	39,48±10,77	0,000
	Kontrol	23	23,29±8,32	
bb + TT	Hasta	4	24,92±4,16	0,000
	Kontrol	4	12,5±1,08	
ab + GG	Hasta	17	46,97±11,83	0,002
	Kontrol	5	28,13±7,75	
ab + GT	Hasta	7	33,66±5,86	0,048
	Kontrol	5	25,54±9,13	
ab + TT	Hasta	0		
	Kontrol	0		
aa + GG	Hasta	0		
	Kontrol	0		
aa + GT	Hasta	0		
	Kontrol	0		
aa + TT	Hasta	0		
	Kontrol	0		

3.9. MTHFR Geni C677T ve MTHFR A1298C Polimorfik Bölgelerinin Birleştirilmiş Genotip Dağılımı ile Homosistein Düzeyleri Arasındaki İlişki

MTHFR Geninde C677T ve MTHFR A1298C polimorfik bölgelerinin birleştirilmiş genotip dağılımı ile homosistein düzeyleri arasındaki ilişki çizelge 3.11’de verilmiştir. Çizelge 3.11’den görüldüğü gibi hasta ve kontrol gruplarının kendi içinde ayrı ayrı bileşik genotipleri ile homosistein seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadı ($P>0,05$). Hasta ve kontrol grupları arasında; MTHFR geninde C677T ile A1298C polimorfik bölgelerinin birlikte heterozigot ve homozigot genotipleri ile C677T bölgesinin heterozigot (CT), A1298C bölgesinin normal (AA) olduğu formların homosistein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (sırasıyla, $p=0,043$; $p=0,020$; $p=0,034$). Diğer bileşik genotipe sahip bireylerin homosistein seviyeleri arasında ise önemli fark bulunmadı.

Çizelge 3.11. Hasta ve kontrol grubunda MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfik bölgelerinin birleştirilmiş genotip dağılımı ile homosistein düzeylerinin karşılaştırılması.

Birleştirilmiş Genotip C677T+A1298C	Hasta ve Kontrol	Birey Sayısı	Homosistein Düzeyi $\bar{x}\pm SD$	p Değeri
CC +AA	Hasta	15	20,89±11,79	0,201
	Kontrol	31	13,73±9,06	
CC +AC	Hasta	16	21,99±15,86	0,101
	Kontrol	28	13,88±6,30	
CC +CC	Hasta	16	21,98±11,37	0,043
	Kontrol	5	13,55±5,34	
CT + AA	Hasta	30	23,86±16,35	0,020
	Kontrol	15	13,89±8,16	
CT + AC	Hasta	20	23,52±12,73	0,034
	Kontrol	15	13,52±9,59	
CT + CC	Hasta	4	19,08±9,12	0,588
	Kontrol	3	15,00±8,06	
TT + AA	Hasta	16	27,7±29,12	0,411
	Kontrol	3	10,4±2,26	
TT + AC	Hasta	11	19,05±9,04	0,372
	Kontrol	7	15,28±4,65	
TT + CC	Hasta	0		
	Kontrol	0		

4. TARTIŞMA

4.1. eNOS Gen Polimorfizmi ile Nitrik Oksit Bulgularının Tartışılması

Literatür bulgularına göre hipertansiyonda en fazla etkilenen NOS tipinin eNOS olduğu görülmektedir. (Green ve ark 1996, Maiorana ve ark 2003, Green ve ark 2004).

Bugüne kadar eNOS geninde populasyon temelli ve hastalıklar ile ilişkili genotip ve allel dağılım çalışmaları yapılarak eNOS geninin exon, intron ve promotor bölgelerinde pek çok polimorfik yapılar tespit edilmiştir (Wattanapitayakul ve Mihm 2001, Casas ve ark 2004, Gerritsen 2005).

eNOS geninde exon 7'deki Glu298Asp (G894T) ve intron 4'deki a/b (VNTR) en çok çalışılan polimorfik bölgelerdir. Yapılan çalışmalar toplumlara göre farklılıklar göstermekle birlikte bu polimorfizmlerin her ikisinde hipertansiyon, koroner arter hastalığı, koroner spazm ve bazı vaskülitler gibi pek çok damarsal patolojilerin gelişiminde katkıda bulunduğunu göstermektedir (Nakayama ve ark 1999, Stangl ve ark 2000, Suvara ve Michael 2001, Cinzia ve ark 2005).

Çalışmamızda, EHT hastalarda ve kontrollerde eNOS geninin intron 4 a/b ve exon 7 Glu298Asp (G894T) polimorfik bölgelerinin genotip ve allel dağılımları arasında önemli fark bulamadık.

Literatürde esansiyel hipertansiyonlu hastalarda eNOS geni intron ve exon bölge polimorfizmi hakkında bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bir kısmının bulguları bizim bulgularımızı desteklemekte bazılarının ise desteklememektedir. Biz bunun toplumlar arası genetik varyasyondan kaynaklandığı kanaatindeyiz. Örneğin, Deng ve arkadaşları (2007) Çin (Xinjiang Kazakh) toplumunda eNOS geni intron 4 genotip ve allel dağılımlarının hasta ve kontrol bireyleri arasında istatistiksel açıdan farklı bulunmadığını dolayısı ile hastalık açısından majör genetik risk oluşturmayacağını bildirmişlerdir.

Yine Benjafield ve Morris (2000) eNOS intron4 a/b ve exon 7 Glu298Asp (G894T) polimorfik bölgelerinin esansiyel hipertansiyon ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir.

Khawaja ve arkadaşları da (2006) yetişkin Pakistan (Pathan) toplumunda esansiyel hipertansiyonlu hastalarla eNOS geni Glu298Asp (G894T) polimorfizminin ilişkili olmadığını bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi bu çalışmaların bulguları bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Öte yandan Tan ve ark (2004) Çin (Chongqing) toplumunda eNOS geni Glu298Asp (G894T) polimorfizminin esansiyel hipertansiyon hastalığının patogenezinde direkt olarak önemli bir rol oynamadığını, dolaylı olarak risk faktörü olabileceğini bildirmişlerdir.

Tang ve ark (2007) Çin (Hani ve Yi) toplumunda esansiyel hipertansiyonlu hastalarda eNOS geni Glu298Asp (G894T) polimorfizmini çalışmışlar ve Hani toplumunda 894G allel sıklığını EHT ve kontrol grubunda karşılaştırdıklarında önemli bir fark bulmamışlardır. Ancak GG+TT genotip sıklığını GG genotipine göre karşılaştırdıklarında kontrol grubunu EHT grubuna göre anlamlı derecede düşük bulmuşlardır. Ayrıca GG genotipine sahip bireylerle T allel taşıyıcılarını karşılaştırdıklarında, Hani toplumunda T allel taşıyıcılarını EHT açısından yüksek riskli (OR=1.8 95% CI 1.11-2.92, p=0,02), Yi toplumunda ise düşük riskli (OR=0.49 95% CI 0.28-0.85, p= 0,01) bulmuşlardır. Buradan aynı ülkede farklı toplumlarda belli bir hastalık açısından farklı risk gruplarında olabilecekleri anlaşılmaktadır.

Men ve ark (2011) Çin toplumunda 190 EHT'li hasta ve 94 kontrol grubunda eNOS GT+TT genotipine sahip EHT hastalarının GG genotipi taşıyanlara göre anlamlı derecede yüksek (OR=2.82, 95% CI:1.05-7.60, p=0.033) olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca bu EHT hasta grubunda T allel sıklığını kontrollere göre yüksek bulmuşlardır (OR=3.48, 95% CI:1.34-9.07; p=0.007). Dolayısı ile bu araştırmacılar Çinli hastalarda eNOS Glu298Asp (G894T) polimorfizminin EHT hastalığı için bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir.

Wang ve ark (2011) Çin toplumu için yaptıkları bir meta analiz çalışmasında eNOS geninin Glu298Asp (G894T) polimorfik bölgesinin esansiyel hipertansiyon hastalığıyla ilişkili olduğunu kaydetmişlerdir.

Periaswamy ve ark (2008) Hindistan (Tamilian) toplumunda yaşayan esansiyel hipertansiyonlu kadınlarda eNOS geni Glu298Asp (G894T) polimorfik bölgesinin hem GT hem de TT genotipinin hastalıkla pozitif yönde bir ilişkisinin olduğunu ayrıca aynı toplumda kadınların erkelere göre daha yüksek oranda T alleli taşıdıklarını bildirmişlerdir.

Jia ve ark (2003) aşırı kilolu esansiyel hipertansiyonlu grupta, eNOS geni Glu298Asp (G894T) polimorfizminin ve aşırı kilonun hastalık açısından önemli rol oynadığını, kilo kontrolü ile birlikte G894T mutasyonunun hastalık riski açısından belirgin bir şekilde azalacağını bildirmişlerdir.

Diğer sık gözlenen 4a/b polimorfizmi ise eNOS geninin 4. intronunda lokalize olup tekrarlayan DNA dizi (27 VNTR) polimorfizmidir. Bu dizinin de NO oluşumu ile ilişkili olduğunu öne sürülmektedir (Tsukada ve ark 1998).

eNOS geni intron 4 a/b polimorfik bölgesi aa genotipi nadir olup sıklığı farklı populasyonlar arasında %1 - 10.6 arasında değişmektedir (Matyar ve ark 2005, Jemaa ve ark 2008).

Çalışmamızda, eNOS geni intron 4a/b polimorfik bölgesini 129 EHT hastası ve 108 kontrol grubunda çalıştık. Çalışma gruplarımızda a/b ve b/b genotipi bireyler mevcut iken a/a genotipine sahip birey tespit etmedik. Çalışmamızda a/a genotipine sahip bireyin olmamasını, çalışmaya katılan birey sayısı ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Dolayısıyla mevcut a/b ve b/b genotipleri ile EHT hastalığı arasında anlamlı bir ilişki kuramadık.

Çalışmamızla benzer şekilde Miyamoto ve ark (1998) eNOS geni intron 4a/b polimorfik bölgesinin genotip dağılımını bb ve ba+aa birleşik genotipli olarak hasta ve kontrol grubunda ayrı ayrı analizini yapmışlar ve önemli bir fark ($p=0.339$) bulamamışlardır.

Öte yandan Francisco ve ark (2003) EHT hasta ve kontrol grupları arasında eNOS geni İntron 4a/b polimorfizminin genotip dağılımını istatistiksel açıdan önemli (OR=1.67 95% CI 1.1-2.53) bulmuşlardır.

Yine Moe ve ark (2006) çalışmalarında eNOS geni intron 4 b/b genotipinin Singapur toplumunda esansiyel hipertansiyon için genetik bir yatkınlık faktörü olduğunu belirtmişlerdir.

Mustafina ve arkadaşları da (2001) Rusya (Volga-Ural) toplumunda Miyokard İnfarktüsü (MI) ve EHT'li hasta grubunda eNOS intron 4a/b (27 VNTR) polimorfizmini çalışmışlar; eNOS 4a/b genotipli Ruslarda EHT, Tatarlarda ise MI hastalığının geliştiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, EHT hastalarda ve kontrollerde eNOS geninin intron 4 a/b ve exon 7 Glu298Asp (G894T) polimorfik bölgelerinin genotip ve allel dağılımları ile NO düzeyleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulamadık.

Literatürde EHT hastalarında NO düzeyini ölçen fazla çalışmaya rastlamadık. Bunlardan Agnieszka ve ark (2009) Polonya toplumunda EHT hastaları ile sağlıklı kontrollere ait plazma NO düzeyleri arasında önemli bir fark bulamamışlardır.

Bir başka çalışmada ise Nejatizadeh ve ark (2008) Hindistan toplumunda EHT hasta grubunun NO düzeyinin kontrol grubundan düşük olduğunu (p=0,0001) bildirmişlerdir.

Literatürde esansiyel hipertansiyon hasta grubunun dışında daha çok hipertansiyon, MI ve KKH hastalarında NO düzeyini ölçen araştırmalar yapılmış ve birbirinden farklı sonuçlar bulmuşlardır. Örneğin, Moe ve arkadaşları (2006) hipertansif hastalarda NO düzeyinin kontrol grubundan düşük olduğunu (p=0.008) rapor etmişlerdir.

Benzer şekilde, Yoon ve ark (2000) eNOS geni intron 4a/b ve Glu298Asp (G894T) polimorfik bölgeleriyle NO seviyelerini hipertansiyonu olmayan KAH olanların NO seviyelerinin hipertansiyonu olan KAH olanların NO düzeyinden daha

düşük olduğunu ayrıca bu iki grubun NO seviyelerinin de kontrollere göre yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Moon ve arkadaşları da (2002) Kore toplumunda sigara içen ve içmeyen sağlıklı bireylerde eNOS geni exon 7 Glu298Asp (G894T) polimorfizmi ile plazma NO metabolitleri arasında bir ilişkinin olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Yoon ve ark (2000), koroner arter hastalarında plazma nitrik oksit düzeylerini kontrollere göre daha yüksek bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada hipertansiyonu olan koroner arter hastalarında NO düzeyinin hipertansiyonu olmayanlara kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Akarasereenont ve ark (2001), anjiyografi ile koroner lezyonu olan hastalarda NO düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Ferlito ve ark (1997), koroner arter hastalığı olan hastaların nitrit düzeylerini kontrollere kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulmuşlardır. Bu artışın özellikle akut koroner kalp hastalığı olan hastalarda daha da belirgin olduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar, hipertansif koroner arter hastalarının ortalama nitrit değerlerini hipertansiyonu olmayanlara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, KAH ve hiperkolesterolemik kişilerde nitrit seviyelerinin kontrollere göre önemli derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Hipertansiyon hastalığının %95'lik kısmını oluşturan esansiyel hipertansiyonu açıklayan önemli hipotezlerden biri de endotel disfonksiyonudur (Marin ve Martinez 1997, Kaplan 1998). Fakat ister primer isterse sekonder hipertansiyon olsun endotel fonksiyon bozukluğu sonucu NO eksikliği önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Hem insan hem de hayvanlarda gösterilen bu durum temel olarak asetilkolin gibi uyarılara bağlı olarak endotelden salgılanan gevşetici maddelerin salgılanmasında yetersizlik olarak belirir (DeArtinano ve Gonzalez 1999).

Görüldüğü gibi EHT hastalarında NO düzeyinin kontrollere göre düşük bulunması beklenirken çalışmamızda EHT hastalarında plazma NO düzeyi kontrollere göre yüksek bulunmuştur. Biz bu bulguyu izah edemedik. Fakat hastalarımızın bir

kısının tedavi almaları bu yüksekliğin nedeni olabilir. Çünkü çalışmamızda asıl hedef genetik polimorfizm olduğu için ve yeterli hasta bulunamaması nedeniyle biz çalışmamızda ilaç kullanan hastaları da dâhil etmek zorunda kaldık. Ayrıca, seçilen hastalarda hastalığın süresinin de önemli olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü uzun süren hipertansiyon durumunda NO düzeyi hastalığa bir adaptasyon sonucu yüksek çıkmış olabilir.

4.2. MTHFR Gen Polimorfizmi ile Homosistein Bulgularının Tartışılması

MTHFR genindeki mutasyonlar, enzimde inaktivasyon yaparak hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur. Bu mutasyonlardan en çok gözlenenler C677T ve A1298C polimorfizmleridir (Dikmen 2004). MTHFR C677T polimorfizmi sonucu oluşan nokta mutasyonu 5-metil tetrahidrofolat düzeyini azaltarak plazma homosistein düzeyinde artışa neden olur (Rosenblatt 2001, Stern ve ark 2000).

Çalışmamızda esansiyel hipertansiyonlu hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfik bölgelerinin genotip dağılımlarını istatistiksel açıdan anlamlı (sırasıyla, $p=0,003$ ve $p=0,031$) bulduk. Ayrıca MTHFR C677T polimorfik bölgesinin C ve T allelleri için istatistik yapıldığında T allelinin hastalık açısından risk oluşturabileceği görülmektedir ($p=0,000$; OR=0,482 %95; CI =0,326–0,713) (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5). MTHFR C677T polimorfik bölgesinin genotip dağılımında anlamlılığı TT (homozigot mutant) genotipi, MTHFR A1298C polimorfik bölgesinin genotip dağılımında ise CC (homozigot mutant) genotipi oluşturmaktadır.

Literatürde bu konuda yapılan çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Biz bunun toplumların genetik özelliklerinden kaynaklandığı kanaatindeyiz. Nitekim, çalışmamıza paralel olarak Heux ve ark (2004) Kafkas toplumunda esansiyel hipertansiyon hasta grubunda MTHFR C677T polimorfik bölgesinin (CT/TT) genotipini kontrollere göre anlamlı derecede farklı ($p=0,03$) bulmuşlardır.

Benzer şekilde, İlhan ve ark (2008), MTHFR C677T polimorfik bölgesini 78 EHT'li ve 100 kontrol bireyde araştırdıkları çalışmalarında TT genotipinin esansiyel

hipertansiyon ile ilişkili olduğunu dolayısıyla EHT için risk faktörü olabileceğini bildirmişlerdir.

Öte yandan, Hui ve ark (2007) Japon toplumunda esansiyel hipertansiyonlu hasta ile kontrol grubuna ait MTHFR C677T polimorfik bölgesi arasında önemli bir fark bulamamışlardır.

Benes ve ark (2001), Tip II DM, CAD ve esansiyel hipertansiyonlu hasta grubunda MTHFR C677T polimorfik bölgesini araştırdıkları çalışmalarında, Tip II DM kadın hastalarda genotip dağılımını kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı bulurken esansiyel hipertansiyonlu grupta herhangi bir fark bulamamışlardır.

Zhan ve ark (2000) MTHFR C677T polimorfik bölgesinin esansiyel hipertansiyon hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olmadığını bildirmişlerdir

Tylicki ve arkadaşları da (2005) MTHFR C677T ve A1298C polimorfik bölgelerini esansiyel hipertansiyonlu hastalarda her iki bölgenin genotip ve allel dağılımlarında kontrollere göre anlamlı bir fark bulmamışlardır.

Homosistein kardiyovasküler hastalıklarda bağımsız bir risk faktörü olup folik asit, B2, B6 ve B12 vitamini içeren besinleri tüketmeyen ve metiyonin kaynağı yüksek diyetle beslenen kişilerde arttığı ve plazma homosisteinin damarların endotel hücrelerinde hasar oluşturarak ateroskleroza neden olduğu bilinmektedir (Hannratty ve ark 2001).

Artmış plazma homosistein düzeylerinin özellikle hipertansiyon, yüksek serum kolesterol düzeyleri, sigara kullanımı, DM gibi diğer risk faktörlerinin varlığında ateroskleroz için bağımsız bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir (Lindgren ve ark 1995, Virginia ve ark 2002, Sögütçü ve Kaplan 2002, Temel ve Özerol 2002, Dermirkıran 2003).

Bu konuda Boushey ve ark (1995) yüksek homosistein düzeyinin ölümcül olsun ya da olmasın aterosklerotik hastalık riskini üç kat arttırdığını ayrıca genel

popülasyondaki KAH riskinin %10'unun hiperhomosisteinemiye bağı olabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda EHT grubunun homosistein düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulduk (p=0.001).

Benzer şekilde Ekmekçi ve ark (2010) tedavi edilmemiş esansiyel hipertansiyon hastalarda homosistein düzeylerinin kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır (p=0.02).

Yine çalışmamızda MTHFR geni C677T polimorfik bölgesi TT genotipine sahip hastaların homosistein seviyelerini CC ve CT genotipine sahip bireylere göre yüksek bulduk. Literatürde benzer iki çalışmada Fan ve ark (2010) ile Tylicki ve ark (2005) esansiyel hipertansiyonlu hastalarda plazma homosistein seviyeleri ile MTHFR C677T polimorfik bölgesinin arasındaki ilişkiye bakmışlar TT genotipine sahip bireylerin homosistein seviyelerini CC ve CT genotipine sahip bireylere göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (p=0.000).

Literatürde esansiyel hipertansiyonlu hastalarda MTHFR C677T ve A1298C polimorfik bölgelerinin birlikte çalışıldığı yayınlara birkaç tanesinin haricinde rastlamadık.

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubuna ait MTHFR geninin 677. ve 1298. nükleotitlerindeki birleştirilmiş genotip değişimleri ile homosistein düzeyleri çalışılmış, sırasıyla; CC+CC, CT+AA ve CT+AC birleşik genotiplerine sahip hastaların homosistein düzeyleri kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.11). Bu çizelgeye göre; literatürle paralel olarak MTHFR geninin C677T ve A1298C bölgelerindeki homozigot mutant forma sahip bireylerde homosistein düzeyleri yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmayan birleşik genotiplerin ise yeteri kadar birey olmamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Markan ve ark (2007) Hint toplumunda hipertansiyonlu hasta grubunda yaptıkları çalışmada, MTHFR 677CC ve MTHFR 1298AC genotipine sahip hastaların birleştirilmiş genotip sıklığının kontrollerden anlamlı derecede ($p=0,014$) yüksek olduğunu ve böylece birleştirilmiş genotipin hipertansiyon için bir risk ($OR=2,35$, $95\% CI:1,12-4,99$) olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada MTHFR 677CT / MTHFR 1298 CC genotipine sahip hastalar kontrollere göre önemli derecede yüksek ($p=0,04$) ve hipertansiyon açısından artmış risk ile ilişkilendirilmiştir ($OR=3,54$ $95\% CI:0,52-23,80$).

4.3. Ox-LDL Bulgularının Tartışılması

Endotel hücreleri, Ox-LDL'nin de yer aldığı LDL'nin modifiye formlarını tanıyan özelleşmiş bir reseptöre sahiptir. Ox-LDL'nin modifiye olmamış LDL'den daha hızlı bir şekilde makrofajlar tarafından alınması, köpük hücre oluşturarak aterosklerozun yağlı çizgilenme lezyonunun gelişmesine neden olmaktadır (Gillote ve ark 2000).

Ox-LDL, endotel hücrelerinde eNOS gen ekspresyonunu engelleyerek NO üretimini inaktive eder ve reseptör aracılı NO salınımını azaltarak süperoksit anyon üretimini artırır (Wang ve ark. 2000).

Nitrik oksitin bileşiklerin yapısını bozucu etkisi nedeniyle biyolojik moleküllerin direk yapısını bozan peroksinitritin oluşmasını tetikleyebileceği ve peroksinitritin de LDL'nin yapısını modifiye ederek aterosklerotik lezyonlarda anormal hücre oluşumuna götürdüğü ileri sürülmüştür (Gururajan ve ark 2010).

Çalışmamızda hasta grubunun Ox-LDL düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p=0,012$). Bu bulgu, Ox-LDL'nin EHT hastalığı için oynadığı rolü daha net göstermesi bakımından oldukça önemlidir.

Yine çalışmamızın hasta grubunda yüksek Ox-LDL düzeyleri ile birlikte, NO düzeyinin de artmış olması başka mekanizmaların da NO artışında etkili olduğunu göstermektedir. Aterosklerotik plaklarda aktive olmuş makrofajların, sitokin salınımını uyularak iNOS izoformunun salınımını uyardığını ve bu enzimatik uyarılma sonucu

eNOS tarafından sentezlenen NO miktarının yaklaşık 100 katı kadar arttığı kaydedilmiştir (Depre ve ark 1999).

Literatürde EHT hastalarında Ox-LDL düzeyini ölçen az sayıda çalışmaya rastladık. Bunlardan Maggi ve ark (1993) EHT hastalarında LDL'nin oksidasyona daha yatkın olduğunu bulmuşlardır. Bu bulgu bizim bulgumuzu destekler mahiyettedir.

Yine KKH ve MI gibi hastalıklarda Ox-LDL düzeyinin sağlıklı kontrollere göre önemli oranda arttığı gösterilmiştir.

Örneğin, Suzuki ve ark (2002), koroner arter hastalarında Ox-LDL ve LDL kolesterol düzeylerini kontrollere göre anlamlı derecede yüksek, HDL kolesterol düzeyleri ise daha düşük bulmuşlardır.

Ehara ve ark (2002), akut MI geçiren kişilerde plazma Ox-LDL seviyelerini sağlıklı kontrollere göre belirgin bir biçimde yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, Ox-LDL düzeyi yüksek olup akut MI'dan ölen hastaların otopsilerinde, aterosklerotik lezyonlarda immünohistokimyasal olarak makrofaj kökenli köpük hücrelerinin fazlaca bulunduğunu göstermişlerdir.

Toshima ve ark (2000), koroner kalp hastalarında plazma Ox-LDL düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Shimada ve ark (2004), kardiyak ölüm, nonfatal MI ve koroner arter bypass grefti gibi kardiyak olaylarda Ox-LDL düzeylerini yüksek bulmuşlardır.

Bütün bu bulgular, LDL oksidasyonunun KAH 'ın patogenezinde önemli rol oynadığını göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bölgemizde yaşayan EHT hastaları açısından MTHFR geni C677T polimorfik bölgesi TT genotipi (homozigot mutant) ve MTHFR geni A1298C polimorfik bölgesi CC genotipi (homozigot mutant) ilişkili iken eNOS geni intron 4 a/b VNTR ve exon 7 Glu298Asp polimorfik bölgeleri ile ilişkili değildir.

Literatürdeki ve mevcut çalışmamızdaki bu bilgiler ışığında esansiyel hipertansiyon gelişiminde MTHFR ve eNOS geninde bulunan polimorfizmlerin etkili olduğuna dair çalışmaların yanı sıra etkili olmadığını savunan çalışmalar da bulunmaktadır. Bu nedenle, literatürdeki MTHFR ve eNOS geninde bulunan polimorfizmlerin genotip ve allel dağılımı ile hastalık ve biyokimyasal değerler arasındaki çelişkili bulgular, bu genlerin her birinin tek başına fonksiyonel olmasından ziyade farklı genlerin ve çevresel faktörlerin de bu etkiye katılabileceği fikrini vermektedir. Bu nedenle, bu polimorfik bölgelerin fonksiyonel etkilerini ortaya koymak ve faydalı birer genetik markır olup olmayacağını anlaşılabilmesi için daha homojen ve fazla sayıda hasta gruplarında çalışılıp polimorfik bölgelerin fonksiyonlarını belirleme çalışmaları yapılması hastalıklara erken tanı koymakta yardımcı olacaktır.

Endotele etki eden diğer genlerle birlikte eNOS ve MTHFR genlerinde ekspresyon ve metilasyon çalışmalarının yapılarak bu genlerle ilişkili NO ve homosistein düzeylerinin incelenmesi, ayrıca Ox-LDL oluşumunu önlemek için antioksidan desteği ile homosistein düzeyinin artmasını önleyecek destek tedavilerin verilmesi hastalık mekanizmaları hakkında daha detaylı bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ / KONYA 2011

Süleyman NERGİZ

Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı

Esansiyel Hipertansiyonlu Hastalarda ve Sağlıklı Kontrollerde Endotelial Nitrik Oksit Sintaz (eNOS) ve Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Polimorfizmleri ve Bu Polimorfizmlerin Nitrik Oksit (NO), Okside LDL (Ox-LDL) ve Homosistein Düzeyleri ile Olan İlişkilerinin Araştırılması

Çalışmamızda esansiyel hipertansiyonlu hastalarla sağlıklı kontrollerde eNOS geni intron 4a/b VNTR ve Exon-7 Glu298Asp polimorfik bölgeleri ve MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfik bölgeleri ile NO, Ox-LDL ve homosistein düzeylerini araştırdık.

Çalışma 50-73 yaşları arasında toplam 129 esansiyel hipertansiyon hastası (67 kadın, 62 erkek) ile 41-64 yaşları arasında hiçbir şikâyeti ve bulgusu olmayan toplam 108 sağlıklı kişide (49 kadın, 59 erkek) gerçekleştirildi. Hasta grubuna hipertansiyon hastalığının haricinde hiçbir rahatsızlığı bulunmayan kişiler alındı. Vakalardan sabah aç karna kan örnekleri alındı. Ox-LDL ve NO düzeyleri, ELİZA metoduyla çalışan ticari kitler kullanılarak homosistein düzeyleri ise HPLC metoduyla ölçüldü. Vakaların tam kanlarından DNA izolasyonu yapılarak PCR-RFLP tekniği ile genetik analizlerini yapıldı.

EHT hastaları ile sağlıklı kontrollere ait eNOS geni intron 4a/b VNTR ve exon-7 G894T polimorfizmi arasında önemli bir fark bulunmazken, her iki gruba ait MTHFR geninin C677T ve A1298C polimorfizmlerinin EHT'da önemli risk oluşturabileceğini sonucuna varıldı.

Ayrıca, EHT hastalarında homosistein, NO ve Ox-LDL düzeyleri kontrollere kıyasla önemli oranda yüksek bulundu. Homosistein, NO ve Ox-LDL düzeyleri hastalarda sırası ile 22.39 ± 13.72 ($\mu\text{mol/L}$), 36.75 ± 13.28 (μM), 64.99 ± 71.42 (U/L) olarak; kontrollerde ise aynı parametreler sırası ile 13.77 ± 5.42 ($\mu\text{mol/L}$), 27.27 ± 12.31 (μM), 42.66 ± 26.27 (U/L) olarak bulundu. Bu bulgulardan EHT hastalarında yüksek homosistein ve Ox-LDL düzeylerinin önemli risk oluşturabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Esansiyel Hipertansiyon, eNOS, MTHFR, Polimorfizm

7. SUMMARY

Investigation Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene Polymorphism and Correlation of These Polymorphisms with Nitric Oxide (NO), Oxide LDL (Ox-LDL) and Homocysteine Levels in The Patients with Essential Hypertension and Healthy Controls

In this study, we have investigated intron 4a/b VNTR and exon 7 regions of G894T change of eNOS gene, C677T and A1298C polymorphic regions of MTHFR gene and NO, Ox-LDL and homocysteine levels of patients with essential hypertension and healthy controls.

The study was performed on totally 129 essential hypertension patients (67 females, 32 males) aged 50-73 years and 108 healthy controls (49 female and 59 male) aged 41-64 years.

The patient group has been selected from individuals with no disorder except essential hypertension. Fasting blood samples were taken from all subjects. Ox-LDL and NO levels were analyzed by commercially available ELISA kits homocystein levels were measured by HPLC method. Genetic analyses were performed by PCR-RFLP technique by using isolated DNA from blood samples.

No significant differences were found between eNOS gene intron 4a/b VNTR and exon 7 Glu298Asp (G894T) genotype frequencies of the groups.

However, significant differences were found between MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms of the groups. We concluded that polymorphisms of MTHFR gene C677T and A1298C may be significant risk factors in patients with EHT

In addition, homocysteine, NO and Ox-LDL levels of the patients were significantly higher than those of the controls. Homocysteine, NO and Ox-LDL levels of the patients were 22.39 ± 13.72 (mmol/L), 36.75 ± 13.28 (microM) and 64.99 ± 71.42 (U/L), whereas the same parameters of the controls were 13.77 ± 5.42 (mmol/L), 27.27 ± 12.31 (microM), and 42.66 ± 26.27 (U/L) respectively. We concluded that high homocysteine and Ox-LDL levels constitute a significant risk in patients with EHT.

Key Words: Essential Hypertension, eNOS, MTHFR, Polymorphism

8. KAYNAKLAR

1. Adunsky A, Weitzman A, Flessig Y, et al. The relation of plasma total homocysteine levels to prevalent cardiovascular disease in older patients with ischemic stroke. *Aging (Milano)* 2000; 12:48-52.
2. Akarasereenont P, Nuamchit T, Thaworn A, Leowattana W, Chotewuttakorn S, Khunawat P. Serum nitric oxide level in patients with coronary artery disease. *J Med Assoc Thai* 2001;84 Suppl 3:S730-9.
3. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayıncılık 1995;1-11,42-43,49-50,54-56,61,63-64.
4. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İ.H. Nitrik Oksit ve Nörofizyopatolojik Etkileri. *T. Klin Tıp Bilimleri.* 2000; 20: 107-11
5. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003;199(1):8-17.
6. Alfthan G, Pekkanen J, Jauhiainen M, et al. Relation of serum homocysteine and lipoprotein (a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis* 1994; 106:9-19.
7. Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JA, Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzalez I, Alvarez V, Coto E. Association between the NOS3 (2786 T/C) and the ACE (I/D) DNA Genotypes and Early Coronary Artery Disease. *J Biol Chem.* 2001; 5: 343-8.
8. Andreotti F, Burzotta F, Manzoli A, Robinson K, Homocysteine and risk of cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 2000; 9:13-21.
9. Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 247-54
10. Anggard E. Nitric oxide: Mediator, Murderer, and Medicine. *Lancet.*1994; 343: 1199-1206).
11. Bagley PJ, Jacob S. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Med Sci,* 1998;95:13217-20.
12. Baykal Y, Tüzün A, Kocabalkan F. Aterosklerozun Patogenezi *T Klin J Med Sci* 1998;18;360-8.
13. Bedarida G, Kirn D, Blaschke TF, Hoffman BB. Venodilation in Raynaud's disease. *Lancet*;342:1451-1454,1993. J;6:3051-64
14. Bellamy MF, McDowell IF. Putative mechanisms for vascular damage by homocysteine. *J Inherit Metab Dis* 1997;20:307-15
15. Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, et al. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation* 1998;98:1848-52
16. Benes P, Kanková K, Muzik J, Groch L, Benedik J, Elbl L, Izakovicová-Hollá L, Vasků A, Znojil V, Vácha J. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, type II diabetes mellitus, coronary artery disease, and essential hypertension in the Czech population. *Mol Genet Metab.* 2001 Jun;73(2):188-95.
17. Blann AD. Endothelial cell damage and homocysteine. *Atherosclerosis,* 1993;94: 89-91.
18. Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression, *Trends Cell Biol.,* 2001; 11(2):66-75.
19. Barbato JE and Tzeng E Nitric oxide and arterial disease, *J Vasc Surg.,*2004; 40(1):187-93.

20. Benjafeld AV, Morris BJ. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2000 Sep;13(9):994-8.
21. Bossenge E. Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. *Cardiovasc Drug Ther*. 1994; 8(4): 601-10.
22. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274: 1049-57.
23. Buonout D, Garrido A, Suazo M, et al. Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients. *Nutrition* 2000;16;107-10.
24. Cannon RO 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998; 44(8):1809-19.
25. Carr A, Frei B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium derived nitric oxide. *Free Radical Biology Medicine* 2000;28:1806-14.
26. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation*, 2004; 23;109(11):1359-65
27. Celermajer JC, Selhup J, Miller JW. The pathogenesis of homocystemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Coll Nutr* 1992; 55:131-8.
28. Celermajer DS, Sorensen K, Ryalls M, et al. Impaired endothelial function occurs in the Systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their Heterozygous parents. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:854.
29. Cesari M, Zanchetta M, Burlina A, Pedon L, Maiolino G, Sticchi D et al. Hyperhomocysteinemia Is Inversely Related With Left Ventricular Ejection Fraction and Predicts Cardiovascular Mortality in High-Risk Coronary Artery Disease Hypertensives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25:115-21.
30. Chambers JC, Mcgregor A, Jean-Marie J, Kooner JS. Acute hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction. *Lancet* 1998;351:39-47.
31. Chen C, Halkos ME; Surowiec SM, et al. Effects of homocysteine on smooth muscle cell proliferation in both cell culture and artery perfusion culture models. *J Surg Res* 2000; 88:26-33.
32. Chobanian Av ve ark. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection evaluation and treatment of high blood pressure (JNC VII). The JNC VII Report *JAMA* 2003;289:2560-72.
33. Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Biagini A, Clerico A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem*. 2003 Mar;49(3):389-95.
34. Cooke JP, Dzau V: Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease; *Annu Rev Med*, 1997;48: 489-50.
35. Corbett JA, McDaniel ML: Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med*; 1995;181:559-568.

36. Crabos M, Coste P, Paccalin M, Tariosse L, Daret D, Besse P, Bonoron-Adele S. Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(1):55- 65.
37. Cevikel MH, Ozgün H, Boylu S, Demirkiran AE, Sakarya S, Culhaci N. Nitric oxide regulates bacterial translocation in experimental acute edematous pancreatitis. *Pancreatology*. 2003;3(4):329-35.
38. Demuth K, Moatti N, Hanon O, et al . Opposite effects of plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation on carotid artery geometry in asymptomatic adults. *Thromb Vasc Biol*, 1998;18:1838-43.
39. Deng F, Hu Q, Tang B, He F, Guo S, Chen J, Li F, Wu X, Zhang J, Zhang H, Zhao J, Zhong H, He L, Li J, Zhang L, Wang S. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4, 27 bp repeat polymorphism and essential hypertension in the Kazakh Chinese population. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007 May;39(5):311-6.
40. Depre C, Havaux X, Renkin J, Vanoverschelde JL, Wijns W. Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res*. 1999 Feb;41(2):465-72.
41. De Artinano AA, Gonzalez VL. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. *Pharmacol Res*. 1999 Aug;40(2):113-24.
42. De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Mennen LI, Blom HJ. Homocysteine and coronary heart disease: the importance of a distinction between low and high risk subjects. *Int J Epidemiol*. 2002 Dec;31(6):1268-72; author reply 1271-2.
43. Dinavahi R, Falker B. Relationship of homocysteine with Cardiovascular Disease and Blood Pressure. *J Clin hypertens* 2004; 6(9):494-500.
44. Dunn J, Title LM, Bata I, Johnstone DE, Kirkland SA, O'neill BJ et al. Relation of a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase to plasma homocysteine and early onset coronary artery disease, *Clin Biochem*, 1998; 31:95-100.
45. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Matsuo T, Ogami M, et al. Pathophysiological role of oxidized low-density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases, *Journal of Diabetes and Its Complications*, 2002;16:60-64.
46. Eikelboom JW, Lonn E, Genest JrJ, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence, *Ann Intern Med*, 1999;131:363-75.
47. Ekmekçi H, Ekmekçi OB, Erdine S, Sönmez H, Ataev Y, Oztürk Z, Bütün II, Gürel C, Kucur M, Turfaner N, Ulutin T, Purisa S, Vural VA. Effects of serum homocysteine and adiponectin levels on platelet aggregation in untreated patients with essential hypertension. *J Thromb Thrombolysis*. 2009 Nov;28(4):418-24.
48. Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH. Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997;17:1947-53.
49. Fan FF, Huo Y, Wang X, Xu X, Wang BY, Xu XP, Li JP. Effect of enalapril on plasma homocysteine levels in patients with essential hypertension. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010;11(8):583-91.
50. Ferlito S, Gallina M. Nitrite plasma levels in acute and chronic coronary heart disease. *Minerva Cardioangiol* 1997;45(11):553-8.
51. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassman G. Molecular biology of 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol*, 2000;13(1):20-33.

52. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study, *Circulation*, 1998;98,204-10.
53. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in Methylenetetrahydrofolat Reductase. *Nat Genet*. 1995;10;111-3.
54. Geller DA and Billiar TR Molecular biology of nitric oxide synthases, *Cancer Metastasis Rev*, 1998;17(1):7-23.
55. Gerritsen ME. Genetic variations in vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase and their contributions to human disease, *Microcirculation*, 2005; 12(1):129-140.
56. Grisham MB. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 169: 70-5.
57. Gururajan P, Gurumurthy P, Victor D, Srinivasa Nageswara Rao G, Sai Babu R, Sarasa Bharati A, Cherian KM Plasma total nitric oxide and endothelial constitutive nitric oxide synthase (ecNOS) gene polymorphism: a study in a South Indian population. *Biochem Genet*. 2011;49(1-2):96-103.
58. Güneş HV. Moleküler Hücre Biyolojisi. Eskişehir, Kaan Kitabevi, 2003:70-5.
59. Güray A, Samancı N, Ovalı F, Dağoğlu T. Nitrik Oksit, Fizyolojisi ve Klinik Önemi. *T. Klin Tıp Bilimleri*. 1997; 17: 115-9
60. Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest*. 1993; 91: 2873-79.
61. Hankey GJ, Eikelboom JW, Khoo HoW, van Bockxmeer FM. Clinical usefulness of plasma homocysteine in vascular disease, *MJA*, 2004;181(6),314-8.
62. Hanratty CG, McAuley DF, McGurk C, et al. Homocysteine and endothelial vascular Function. *Lancet* 1998;351:1288-9.
63. Harrap SB 1994 Hypertension: genes versus environment *Lancet*. 1994 Jul 16;344(8916):169-71.
64. Heux S, Morin F, Lea RA, Ovcaric M, Tajouri L, Griffiths LR The methylenetetrahydrofolate reductase gene variant (C677T) as a risk factor for essential hypertension in Caucasians. *Hypertens Res*. 2004 Sep;27(9):663-7.
65. Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M: Structure of Low-Density Lipoprotein (LDL) Particles: Basis for Understanding Molecular Changes in Modified LDL. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1488: 189-200.
66. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A et. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298>Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK, *Circulation*, 1999; 5;100(14):1515-20.
67. Homberger G, Linnebank M, Winter C, et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. 2000; *Eur J Hum Genet*, 8:725-9.
68. Hui P, Nakayama T, Morita A, Sato N, Hishiki M, Saito K, Yoshikawa Y, Tamura M, Sato I, Takahashi T, Soma M, Izumi Y, Ozawa Y, Cheng Z. Common single nucleotide polymorphisms in Japanese patients with essential hypertension: aldehyde dehydrogenase 2 gene as a risk factor independent of alcohol consumption. *Hypertens Res*. 2007;30(7):585-92.

69. İlhan N, Küçüksu M, Kaman D, İlhan N, Ozbay Y. The 677 C/T MTHFR polymorphism is associated with essential hypertension, coronary artery disease, and higher homocysteine levels. *Arch Med Res.* 2008;39(1):125-30.
70. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease, *Clinical Chemistry*, 1998; 44.8(B), 1833–43.
71. Jemaa R, Ben Ali S, Kallel A, Feki M, Elasmı M, Taieb SH, Sanhaji H, Omar S, Kaabachi N. Association of a 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with hypertension in a Tunisian population. *Clin Biochem.* 2009 Jun;42(9):852-6.
72. Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM and Newby AC. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells, *Cardiovasc Res.*, 1999;15;43(3):580-94.
73. Jlalal I, Deveraj S Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective, *Clinical Chemistry*, 1996;42(4),498-506.
74. Johanning JM, Franklin PD, Man DC: Inhibition of inducible nitric oxide synthase limits nitric oxide production and experimental aneurysm expansion. *J Vasc Surg* 2001,33: 579–586.
75. Juan PC, Gianpiero LC, Leonelo EB, Liam S, Steve EH, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene Polymorphism and cardiavascular disease. *Am J Epidemiol*, 2006; 164: 921-35.
76. Kaplan NM. Systemic Hypertension: Mechanism and Diagnosis. Ed: Braunwald E In: *Heart Disease*. 6th Edition. W.B. Saunders Company 2001; 941-71.
77. Kaplan NM: *Clinical Hypertension*, Williams & Wilkins, 7th edition, Section 1998;9-12, pp. 41-49, 281-363.
78. Katusic ZS, Caplice NM, Nath KA. Nitric oxide synthase gene transfer as a tool to study biology of endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003; 23: 1990-4.
79. Kavey RE, Daniels SR, Lauer RM, Atkins DL, Hayman LL, Taubert K. American Heart Association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Circulation* 2003; 107: 1562-6.
80. Khawaja MR, Taj F, Ahmad U, Saleheen D, Jafar T, Frossard PM. Association of endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism with essential hypertension in an adult Pakistani Pathan population. *Int J Cardiol.* 2007 Mar 2;116(1):113-5.
81. Kim JU, Chang HK, Lee SS, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms in Behçet's Disease and Rheumatic Diseases with Vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62: 1083-7.
82. Kornitzer M, Dramaix M, De Backer G. Epidemiology of risk factors for hypertension: implications for prevention and therapy. *Drugs.* 1999 May;57(5):695-712.
83. Kuklinska AM, Mroczo B, Musial WJ, Usovicz-Szarynska M, Sawicki R, Borowska H, Knapp M, Szmikowski M Diagnostic biomarkers of essential arterial hypertension: the value of prostacyclin, nitric oxide, oxidized-LDL, and peroxide measurements. *Int Heart J.* 2009 May;50(3):341-51.
84. Kuch B, Bobak M, Fobker M, Junker R, Eckardstein A, Marmot M, Hense HW. Associations between homocysteine and coagulation factors-A cross-sectional study in two populations of central Europe. *Thromb Res.* 2001; 103: 265-273.
85. Lalovel JM 2001 Angiotensinogen in essential hypertension: from genetics to nephrology. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Mar;12(3):606-15.
86. Lambert J, van den BM, Steyn M, et al. Familial hyperhomocysteinemia and endotheliumdependent vasodilation and arterial dispensability of large arteries. *Cardiovasc Res* 1999;42:1468-74.

87. Langman LJ, Wong BYY, Boggis C, et al. The prevalence and linkage disequilibrium of three methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms varies in different ethnic groups presented at INABIS'98 www.mcmaster.ca/inabis98/cvdisease/langman0264/index.html.
88. Leeson CP, Hingorani AD, Mullen MJ, Jeerooburkhan N, Katternhorn M, Cole TJ, Muller DP, Lucas A, Humphries SE, Deanfield JE. Glu 298 Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism interacts with environmental and dietary factors to influence endothelial function. *Circ Res.* 2002; 90: 1153-8.
89. le Noble FA, Stassen FR, Hacking WJ, Struijker Boudier HA: Angiogenesis and hypertension. *J Hypertens* 1998;16:1563-72.
90. Lievers KJA, Boers GHJ, Verhoef V, et al. A second common variant in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine and cardiovascular disease risk. *Journal of Molecular Medicine* Received, 2001, 1468-74..
91. Lifton RP 1996 Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science.* 1996 May 3;272(5262):676-80.
92. Lin Zhang, Rui-Xing Yin, Wan-Ying Liu, Lin Miao, Dong-Feng Wu, Lynn Htet Htet Aung, Xi-Jiang Hu, Xiao-Li Cao, Jin-Zhen Wu, Shang-Ling Pan. Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and serum lipid levels in the Guangxi Bai Ku Yao and Han populations. *Zhang et al. Lipids in Health and Disease* 2010, 9:123.
93. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern. Med.* 1994; 120: 227-37.
94. Lucas L, Soriano FG and Szabó C Biology of nitric oxide signaling, *Crit Care Med.*, 2000; 28(4 Suppl):37-52.
95. Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R, Green D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med.* 2003;33(14):1013-35.
96. Marin J and Rodríguez-Martínez MA Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions, *Pharmacol Ther.*, 1997;75(2):111-34.
97. Markan S, Sachdeva M, Sehrawat BS, Kumari S, Jain S, Khullar M. MTHFR 677 CT/MTHFR 1298 CC genotypes are associated with increased risk of hypertension in Indians. *Mol Cell Biochem.* 2007 Aug;302(1-2):125-31.
98. Marsden PA, Heng HH, Scherer SB, Sterward RJ, Hall AB, Shi XM. Structure and Chromosomal Localization of the Human Constitutive Endothelial nitric Oxide Synthase Gene. *J. Biol. Chem.* 1993; 268.
99. Matyar S, Attila G, Acartürk E, Akpinar O, Inal T. eNOS gene intron 4 a/b VNTR polymorphism is a risk factor for coronary artery disease in Southern Turkey. *Clin Chim Acta.* 2005;354(1-2):153-8.
100. Mc Donald Dm, Alp NJ, Channon KM. Functional comparison of the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphic variants in human endothelial synthase. *Pharmacogenetics.* 2004; 14(12): 831-9.
101. Mertens A, Holvoet P Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis, *FASEB J,* 2001;15,2073-84.
102. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998;32(1):3-8.

103. Moe KT, Lim ST, Wong P, Chua T, DeSilva DA, Koh TH, Wong MC, Chin-Dusting J. Association analysis of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with primary hypertension in a Singapore population. *J Hum Hypertens*. 2006;20(12):956-63.
104. Moghadasian MH, McManus BM, Frohlich JJ. Homocyst (e) ine and coronaryartery disease. *Arch Intern Med* 1997; 157: 2299-2308
105. Moller J, Christensen L, Rasmussen K. An external quality assessment study on the analysis of methylmalonic acid and total homocysteine in plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57:613-9.
106. Moller J, Rasmussen K, Christensen L. External quality assessment of methylmalonic acid and total homocysteine. *Clin Chem* 1999;45:1536-42.
107. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*; 1991;43:109-142.
108. Mongeau JG ve ark 1986 The influence of genetics and household environment upon the variability of normal blood pressure: the Montreal Adoption Survey. *Clin Exp Hypertens A*. 1986;8(4-5):653-60
109. Mustafina OE, Shagisultanova EI, Nasibullin TR, Tuktarova IA, Bikmeeva AM, Poliudova ON, Khusnutdinova EK. [Endothelial nitric oxide synthase gene minisatellite polymorphism: study in populations of the Volga-Ural region and analysis of associations with myocardial infarct and essential hypertension]. *Genetika*. 2001;37(5):668-74.
110. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Foseb J*;61992;3051-3064.
111. Nejatizadeh A, Kumar R, Stobdan T, Goyal AK, Sikdar S, Gupta M, Javed S, Pasha MA Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes and circulating nitric oxide levels significantly associate with risk of essential hypertension. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jun 1;44(11):1912-8.
112. Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest*. 1993 Sep;92(3):1381-6.
113. Norman MK, Liberman E: Primary Hypertension Pathogenesis (in) *Clinical Hypertension*, Fifth Edition, Williams and Williams, New York, 1998, 41-88,
114. O'Donnell C, Liew E. Immunological aspects of nitric oxide. *The Biochemist*; 1994;16;19-22.
115. Periaswamy R, Gurusamy U, Shewade DG, Cherian A, Swaminathan RP, Dutta TK, Jayaraman B, Chandrasekaran A Gender specific association of endothelial nitric oxide synthase gen (Glu298Asp) polymorphism with essential hypertension in a south Indian population. *Clin Chim Acta*. 2008;395(1-2):134-6.
116. Pfeiffer CM, Huff DL, Smith SJ, Miller DT, Gunter EW. Comparison of plasma total homocysteine measurements in 14 laboratories: an international study. *Clin Chem* 1999;45:1261-8.
117. Pfanzagl B, Tribl F, Koller E, Möslinger T. Homocysteine strongly enhanced metal-catalyzed LDL oxidation in the presence of cystine and cysteine. *Atherosclerosis* 2003; 168: 39-48.
118. Powell JT, Higman DJ. Smoking, nitric oxide and the endothelium. *Br J Surg*. 1994; 81: 785-7.
119. Raymond D. Adams, Maurice Victor, Allan H. Ropper. *Principles of Neurology*, 6th ed. 1997, 979.
120. Ren JF, Pancholy SB, Iskandrian AS. Doppler echocardiographic evaluation of the spectrum of left ventricular diastolic dysfunction in essential hypertension. *Am Heart J*, 1994; 127: 906-13.

121. Rodríguez-Esparragón FJ, Rodríguez-Pérez JC, Macías-Reyes A, Alamo-Santana F. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2-Pro12Ala and endothelial nitric oxide synthase-4a/b gene polymorphisms are associated with essential hypertension. *J Hypertens.* 2003 Sep;21(9):1649-55.
122. Ross J Jr: Cardiovascular System: Heart failure, hypertrophy, and other abnormal cardiovascular states, in Best and Taylor's Physiological Basis of Medical Practice, Williams & Wilkins, 12th edition, pp. 1990:315-8.
123. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9
124. Orem C, Orem A, Uydu HA, Celik S, Erdal C, Kural BV. The effects of lipid-lowering therapy on low-density lipoprotein oxidation and plasma total antioxidant status. *Coron Artery Dis* 2002;13:65-71.
125. Özekin A, Değer O: LDL Oksidasyonu ve Etkileri. *İbni Sina Tıp Dergisi.* 2001;6:125-32.
126. Sans S, Kesteloot H, Kromhout D. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur Heart J* 1997; 18: 1231-48
127. Savvidou MD, Vallance PJ, Nicolaides KH, Hingori AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy. *Hypertension.* 2001; 38: 1289-93.
128. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, et al. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:1258-60.
129. Sell SM, Lagemwa PR. Development of a highly accurate, rapid PCR-RFLP genotyping assay for the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Genet. Test.* 1999;3:287-9.
130. Sessa WC. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100 Suppl 1:15-8.
131. Shaw PX, Hörkkö S, Tsimikas S, Chang Mi-K, Palinski W, Silverman GJ et al Human-Derived Anti-Oxidized LDL Autoantibody Blocks Uptake of Oxidized LDL by Macrophages and Localizes to Atherosclerotic Lesions In Vivo, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21,1333-9.
132. Shimada K, Mokuno H, Masunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Miyauchi K et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease, *Atherosclerosis.* 2004, 174:343-7.
133. Shpichinetsky V, Raz I, Friedlander Y, et al. The association between two common mutations C677T and A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk for diabetic nephropathy in type II diabetic patients. *J Nutr.* 2000;130: 2493-7.
134. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993;91:308-8.
135. Stefanovic-Racic MS, Stadler J, Evans CH. Nitric oxide and arthritis. *Arthritis Rheum.* 1993;36:1036-44.
136. Steinerova A, Racek J, Stozicky F, Zima T, Fialova L. Antibodies against oxidized LDL-theory and clinical use. *Physiol Res* 2001;50:131-41.
137. Still RA, McDowell IF. Clinical implications of plasma homocysteine measurement in cardiovascular disease, *J Clin Pathol.* 1998;51:183-8.
138. Suvara K Wattanapitayakul, Michael J. Mihm: Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends in Pharmacological Sciences* 2001;22:7.

139. Suzuki T, Kohno H, Hasegawa A, Toshima S, Amaki T, Kurabayashi M et al (2002) Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease, *Clinical Biochemistry*, 35:347-53
140. Süleymanlar G, Biberoglu K, Kutsal YG, Ünal S. Hipertansiyon tedavisinde Güncel yaklaşım. *Modern Tıp Seminerleri*: 6. Güneş itabevi Ltd.Şti. 2000;9.
141. T.Deeparani, M.Radhakrishna Pillai and T.Elavazhagan. Detection of MTHFR C677T and A1298C Gene Polymorphism in Congenital Heart Disease. *Middle-East Journal of Scientific Research* 4 (2) ,2009:127-32.
142. Tan JC, Zhu ZM, Zhu SJ, Yu CQ, Liu XL, Wang HY, Wang L. [Study on the relationship between nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and hypertension related risk factors in patients with essential hypertension in Chongqing city]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2004 Feb;25(2):158-61.
143. Tang L, Mamotte CD, Van Bockxmeer FM, Taylor RR. The effect of homocysteine on DNA synthesis in cultured human vascular smooth muscle. *Atherosclerosis* 1998;136:169-73.
144. Tang W, Yang Y, Wang B, Xiao C. Association between a G894T polymorphism of eNOS gene and essential hypertension in Hani and Yi minority groups of China. *Arch Med Res*. 2008 Feb;39(2):222-5.
145. Tawakol A, Omland T, Gerhard M, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 1997;95:1119-21.
146. Tesaura M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoform associated with differences in severity of cardiopulmonary disease: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 6: 2832-5.
147. Trabetti Elisabetta, Biscuola Michele, Cavallari Ugo, Malerba Giovanni, GirelliDomenico, Olivieri Oliviero, Martinelli Nicola, Corrocher Roberto and Pignatti PierFranco. On the association of the oxidised LDL receptor 1 (OLR1) gene in patients with acute myocardial infarction or coronary artery disease. *European Journal of Human Genetics* 2006; 14, 127-30.
148. Tripodi A, Chantarangkul V, Lombardi R, Lecchi A, Mannucci PM, Cattaneo M. Multicenter study of homocysteine measurement-performance characteristics of different methods, influence of standards on interlaboratory agreement of results. *Thromb Haemost* 2001;85:291-5.
149. Tsimikas S, Witztum JL. Shifting the diagnosis and treatment of atherosclerosis to children and young adults: a new paradigm for the 21st century. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 2122-4.
150. Türkoz Y, Özerol E. Nitrik Oksit'in Etkileri ve Patolojik Rollerini, *Journal of Turgut Özal Medical Center*.1997; 4(4): 453-461.
151. Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, Shimamura K, Kimura J, Michishita I, Suzuki T, Nagai R: Circulating Oxidized Low Density Lipoprotein Levels. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20: 2243-7.
152. Tylicki L, Födinger M, Puttinger H, Rutkowski P, Strozecki P, Tyszkowski S, Rutkowski B, Hörl WH. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in essential hypertension relation: with the development of hypertensive end-stage renal disease. *Am J Hypertens*. 2005;18(11):1442-8.
153. Ubbink JB, Vermaak WJH, Bennett JM, Becker PJ, van Staden DA and Bissbort S. The prevalence of homocystinemia and hypercholesterolemia in angiographically defined coronary heart disease. *Wochenschr*.1991; 69: 527.
154. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 473- 501.

155. Usmar VD, Radomski M. Free radicals in the vasculature: The good, the bad and the ugly. *Biochemist*; 1994;16:15-22.
156. Vanhoutte PM. Endothelium vasculaire et tonus vasomoteur. *Rev Med Liege* 1995;50:418-42.
157. Verhoef P., Stampfer MJ., Buring JE., Gaziano JM., Allen RH., Stabler SP., Reynolds RD., Kok FJ., Hennekens CH. and Willett WC. *Am. J. Epidemiol* 1996;143: 845-59.
158. Violi F, Micheletta F, Luliano L. Antioxidants and atherosclerosis, *Eur Heart J Supplements* 2002;4(B):17-21.
159. Young IS, McEneny J (2001) Lipoprotein oxidation and atherosclerosis, *Biochemical Society Transactions*, 29(2),358-62.
160. Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem*. 2000 Oct;46(10):1626-30
161. Wang HG, Wang JL, Chang P, Cao FL, Liu XC, Ma YB, Zhai GX, Gao HQ Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and essential hypertension in Han Chinese. *Genet Mol Res*. 2010 Sep 21;9(3):1896-907.
162. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*, 1996; 2: 41-5.
163. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Molecular genetic and metabolism* 2000;70:241-51.
164. Weinbrenner T, Cladellas M, Covas MI, Fito M, Tomas M, Senti M et al. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease, *Atherosclerosis*, 2003;168:99-106.
165. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Eng J Med* 1998; 338(15): 1042-50.
166. Woo KS, Saderson JE, Sun YY, et al. Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2000;101-16.
167. Yeksan M. Esansiyel hipertansiyon patogenezi. *Tipmed*, 2005; 9: 7-14.

9. ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Konya'da tamamladıktan sonra 1997 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Lisans, 2001 yılında da Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümünde Yüksek Lisans eğitimini tamamladı.