

**KORONER ARTER HASTALIĞI İLE PARAOKSONAZ (PON) 2 VE 3
GENLERİNDEKİ POLİMORFİZMLER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Bio. Deniz ERTEKİN

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim YönetmeliĐi Uyarınca
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. F. Sırrı ÇAM

Mayıs 2006

YÜKSEKÖĞRETİM KURULU DÖKÜMANTASYON MERKEZİ
TEZ VERİ FORMU

Tez No: Konu No: Üniv. No:

Yazar Adı/ Soyadı: Deniz ERTEKİN

T.C. Kimlik No: 17137446014

E-Posta Adresi: deniz_ertekin@yahoo.com

Tezin Türkçe Adı: Koroner Arter Hastalığı ile Paraoksonaz (PON) 2 ve 3 Genlerindeki Polimorfizmler Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Tezin Yabancı Dildeki Adı: Relationship of Polymorphisms of Paraoxonase 2 and 3 Genes and Coronary Heart Disease.

Tezin Yapıldığı Üniversite: **Celal Bayar Üniversitesi**

Tezin Yapıldığı Enstitü: **Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

Tezin Türü: **Yüksek Lisans** Tezin Dili : **Türkçe**

Tezin Sayfa Sayısı : 57

Tezin Referans Sayısı:

Tez Danışmanının

Ünvanı: **Yrd. Doç.** Adı: **F. Sırrı** Soyadı: **ÇAM**

Türkçe Anahtar Kelimeler:

1. Ateroskleroz
2. Paraoksanaz 2,3
3. Gen
4. Polimorfizm

İngilizce Anahtar Kelimeler:

1. Atherosclerosis
2. Paraoxonase 2,3
3. Gene
4. Polymorphism

Tarih: 31/05/2006

İmza

Deniz ERTEKİN

TUTANAK

Biyolog Deniz ERTEKİN'nin Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı 'Koroner Arter Hastalığı ile Paraoksonaz (PON) 2 ve 3 Genlerindeki Polimorfizmler Arasındaki İlişkinin Araştırılması' başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

31/0

5/2006

Yrd. Doç. Dr. F. Sırrı ÇAM
(Tez Danışmanı)

Yrd. Doç Dr. Nuray ALTINTAŞ

Yrd. Doç Dr. Nuran EKERBİÇER

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ...
..... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
Yayın Dökümantasyon Dairesi Başkanlığı
Tez Merkezi

TEZLERİN ÇOĞALTILMASI VE YAYIMI İÇİN İZİN BELGESİ

Tez Yazarının

Soyadı: ERTEKİN

Adı: Deniz

Uyruğu: T.C.

T.C. Kimlik No: 17137446014

Üniversite: Celal Bayar Üniversitesi

Enstitü: Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mezuniyet Tarihi:

Tezin Başlığı: Koroner Arter Hastalığı ile Paraoksonaz (PON) 2 ve 3 Genlerindeki Polimorfizmler Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Tezin Desteklendiği Proje:

- a) Enstitümüz bünyesinde hazırlanmış olan yukarıda başlığı, yazar adı ve proje numarası belirtilen tezin ilgilenenlerin incelemesine sunmak üzere Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezi tarafından arşivlenmesi, kağıt, mikroform veya elektronik formatta, internet dahil olmak üzere her türlü ortamda tamamen veya kısmen çoğaltılması ödünç verilmesi ve yayım için tezle ilgili fikri mülkiyet hakları kurumumuzda saklı kalmak üzere hiçbir ücret ve erteleme talep etmeksizin Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezine izin verilmiştir.
- b) Enstitümüz bünyesinde hazırlanmış olan yukarıda başlığı, yazar adı ve proje numarası belirtilen tezin Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezine tarafından çoğaltılması veya yayımının tarihine kadar ertelenmesini talep ederiz. Bu tarihten sonra (A) maddesindeki koşulların geçerli olacağını kabul ve beyan ederiz. (Erteleme süresi en az iki yıldır.)

Enstitü Müdürü/Dekan/Başhekim

İmza

Tarih

c) ÖZET

Amaç: Paraoksonaz (PON) gen ailesi, PON1, PON2 ve PON3 olarak adlandırılan üç üyeyi içerir ve bu genler insan kromozomunun 7q21-q22 bölgesinde lokalize olmuşlardır. Bazı çalışmalar, bu genler üzerindeki polimorfizmlerin koroner arter hastalığı (KAH) ile ilişkili olabileceğini belirtirler. Biz, PON 2 S311C ve PON 3 G971A polimorfizmlerinin KAH üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

Metod: PON üzerinde meydana gelen bu iki amino asit değişimini, 159 hasta ve 113 kontrol de inceledik. Genotipler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve Dde I ve Hinf I enzimleri kullanılarak restriksiyon haritalaması yöntemi ile araştırıldı.

Sonuçlar: Hastalarda izlenen varyasyonlar, S311C mutasyonu için 0.145 frekansında, G971A mutasyonu için 0.007 frekansında bulundu. PON 2 S311C ve PON 3 G971A polimorfizmleri ve KAH arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Sigara kullanımı, hipertansiyon, diabetes mellitus, aile öyküsü, vücut-kütle indeksi, LDL'nin plazma seviyesi ve total kolesterol koroner arter hastalığı için önemli risk faktörleri olarak gözlemlendi.

Tartışma: Bu çalışmada, PON 2 S311C ve PON 3 G971A polimorfizmlerinin bizim toplumumuzda KAH'lığına duyarlılık için önemli bir risk faktörü olmadıklarını bulduk. Paraoksonaz 2 ve 3'ün bu varyasyonlarının etkileri daha fazla incelenmelidir.

ABSTRACT

Objectives: Paraoxonase (PON) gene family includes at least three members termed PON1, PON2 and PON3, and it is mapped on human chromosome 7q21–q22. Some studies suggested that these genes polymorphisms might be associated with coronary artery disease (CAD). We aimed to investigate the effects of PON 2 S311C and PON 3 G971A polymorphism on CAD.

Methods: We have examined these two amino acidic changes in 159 patients and 113 controls. Genotypes were determined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction mapping with Dde I and Hinf I enzymes.

Results: The missense variations in the DNA of the patients had frequencies of 0,145 for the S311C mutation, and 0,007 for the G971A mutation. No significant difference was observed between PON 2 S311C and PON 3 G971A polymorphism, and CAD. Smoking, hypertension, diabetes mellitus, family history, body mass index, plasma levels of LDL and total cholesterol were significantly important risk factors for coronary artery disease (CAD).

Conclusions: In this study, we found that PON 2 S311C and PON 3 G971A polymorphism are not a major risk factor in susceptibility to CAD in the our population. The effect of these variants of paraoxonase 2 and 3 remains to be further evaluated.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen, bana her türlü imkanı sağlayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. F. Sırrı ÇAM'a,

İyi niyetini ve deneyimlerini benimle paylaşan sevgili hocam ve Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D. başkanı Yrd. Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ'a,

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı Hastalıkları A.D. Moleküler Tıp Araştırma laboratuvarı çalışanlarına ve Prof. Dr. Afif BERDELİ'ye,

Yüksek lisansım boyunca, sevgilerini ve desteklerini hep yanımda hissettiğim Uzm. Bio. Serap CİLAKER, Dr. Can KÖSE, Yrd. Doç. Dr. Ceyda HAYRETDAG, Dr. Aslı TEKER, Dr. Elçin AKDUMAN ve Dr. Elgin TÜRKÖZ ve diğer asistan arkadaşlarıma,

Birlikte çalışmaktan her zaman büyük keyif aldığım arkadaşım Uzm. Bio. Pınar TAŞKIRAN ve tüm Mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına,

*Bana verdiği tüm destek, sevgi ve anlayış için Ege Onuralp KANDEMİR'e
Tüm yaşamım boyunca daima bana destek olan canım annem ve babam Emine ve Mustafa ERTEKİN'e ve biricik kardeşim Duygu ERTEKİN'e*

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deniz ERTEKİN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Ateroskleroz.....	2
2.1.1. Patolojik Anatomi.....	3
2.1.2. Patogenez.....	4
2.1.3. Aterosklerozda Risk Faktörleri.....	5
2.1.3.1. Yaş.....	5
2.1.3.2. Cinsiyet.....	5
2.1.3.3. Hiperlipidemi.....	5
2.1.3.4. Diyet.....	6
2.1.3.5. Hipertansiyon.....	6
2.1.3.6. Diyabet.....	7
2.1.3.7. Sigara.....	8
2.1.3.8. Genetik.....	8
2.1.3.8.1. Genetik Markerlar ve KAH.....	9
2.1.3.9. Minör Risk Faktörleri.....	12
2.2. Lipidler.....	12
2.2.1. Lipidlerin Sınıflandırılması.....	12
2.2.2. Lipoproteinlerin Yapı ve Organizasyonu.....	13
2.2.3. Lipidlerin Oksidasyondaki Rolü.....	14
2.2.4. Lipoprotein ve Ateroskleroz Riski.....	15
2.2.5. LDL ve LDL Oksidasyonu.....	16

2.2.6. HDL ve HDL Anti-Aterojenitesi.....	16
2.3. İnsan Serum Paraoksonazları (PON).....	16
2.3.1. Paraoksonazın Yapı ve Etki Mekanizması.....	17
2.3.2. Paraoksonaz Enzimi.....	17
2.3.3. Paraoksonaz Gen Ailesi.....	18
2.3.3.1. Paraoksonaz 1.....	19
2.3.3.2. Paraoksonaz 2.....	19
2.3.3.3. Paraoksonaz 3.....	20
2.4. PON ve KAH Riski Arasındaki İlişki.....	21

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER..... 23

3.1. Örneklerin Seçimi ve Kan Alımı.....	23
3.2. Araç ve Gereçler.....	24
3.2.1. Kullanılan Kimyasallar.....	24
3.2.1.1. Kimyasallar.....	24
3.3. KAH'lığında PON2 Genindeki Cys-Ser 311 ve PON3 Genindeki 971 G-A Polimorfizmlerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması.....	24
3.3.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	24
3.3.2. Uygulanan Protokol.....	25
3.3.3. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Saptanması.....	26
3.3.4. PCR Amplifikasyonu.....	27
3.3.4.1. Amplifikasyonda Kullanılacak Primerlerin Seçimi.....	27
3.3.4.2. Uygulanan PCR Amplifikasyonu.....	27
3.3.5. PCR Ürünlerinin Elektroforezde Değerlendirilmesi... 28	
3.3.6. RE Kesimi ile Polimorfizmlerin Saptanması.....	29
3.3.7. İstatistiksel Yöntem.....	30

4. BULGULAR.....	31
4.1. Klinik Bulgular.....	31
4.1.1. PCR Amplifikasyon Ürünlerinin Elde Edilmesi.....	32
4.1.2. RE Kesimi ile Mutasyon Taranması.....	32
4.1.3. PON2 ve PON3 Genotip Analizi.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
6. KAYNAKLAR.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1 RE Kesim ürünleri.....	32

TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	KAH'ını Etkileyen Genler.....	11
Tablo 2.	Kullanılan Primerler.....	27
Tablo 3.	50 µl içerisinde gerçekleştirilen PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları.....	28
Tablo 4.	Kullanılan PCR Sıcaklık Profili.....	28
Tablo 5.	Hasta ve Kontrollerin demografik özellikleri ve risk faktörlerinin dağılımı.....	31
Tablo 6.	Polimorfizmler ve RE kesimi.....	32
Tablo 7.	Kardiyovasküler risk faktörleri.....	34
Tablo 8.	PON2 ve PON3 genotip dağılımı.....	34

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklamalar
ACE	Angiotensin Dönüştürücü Enzim
AGT	Angiotensinojen
ApoA	Apolipoprotein A
ApoB	Apolipoprotein B
Apo C	Apolipoprotein C
ApoD	Apolipoprotein D
ApoE	Apolipoprotein E
CETP	Kolesteril Ester Transferaz Proteini
Cys	Sistein
ddH₂O	Çift distile su
DM	Diabetes mellitus
HDL	Yüksek Dansiteli lipoprotein
HL	Hepatik lipaz
IDL	Orta dansiteli lipoprotein
KAH	Koroner arter hastalığı
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LPL	Lipoprotein lipaz
M	Molar
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
MI	Miyokard infarktüsü
nm	Nanometre
ng	Nanogram
OD	Optik dansite
PC	Fosfotidilkolin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	Pikomol
PON	Paraoksonaz
rpm	Dakika devir sayısı

1. Giriş

Arteriyel duvarların iç tabakasının yağ depozitleri ve fibroz dokuyla

kalınlaşmasıdır. En sık yerleştiği arterler; koroner ve serebral arterlerdir.

Aterosklerozun prevalans ve insidansını birçok risk faktörü etkiler. Bu risk faktörlerinden biri de genetik faktörlerdir. Multifaktöriyel genetik faktörler, lipid ve karbonhidrat metabolizmaları üzerinde, hipertansiyon, koroner arter dallarının oluşumunda etkili olduğu gibi tek gen bozuklukları da otozomal dominant hiperlipoproteinemiler ve prematüre iskemik kalp hastalığına yol açabilir. Aterosklerozu etkileyen bir çok gen mutasyonu tespit edilmiştir.

Paraoksonaz, karaciğerde sentezlenen, plazmadaki HDL'ler ile ilişkili olan A-esterazlar sınıfına ait bir üyedir. Lipid peroksidasyon ürünlerinin birikmesini azaltır ve LDL'deki okside olmuş lipidleri hidrolize eder. Paraoksonaz gen ailesinin PON1, 2 ve 3 olmak üzere üç üyesi bulunur. Bu genler üzerinde meydana gelen polimorfizmlerin koroner arter hastalığı üzerine etkisi olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu etkinin coğrafyalara göre değişiklik göstermesi ve PON2 ve PON3 genleri üzerindeki polimorfizmlerin ülkemizde çalışmalarının yapılmamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda paraoksonaz 2 ve 3 genlerindeki polimorfizmlerin koroner arter hastalığı üzerine etkilerini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz, koroner arterlerin lümen yüzeylerinde meydana gelen bozukluktan kaynaklanan ve geniş yaygınlık gösteren bir koroner arter hastalığıdır (1). Aterom plaklarının oluşturduğu büyük ve orta çaplı arterlerin intima ve mediasına yerleşen anatomik bir bozukluktur (2). Arteriyel duvarların en iç tabakası, yağ depozitleri ve fibroz dokuyla kalınlaşmıştır. En sık yerleştiği arterler koroner ve serebral arterler olup, miyokard infarktüsü ve serebral infarktüs (stroke) gibi komplikasyonlara neden olabilir.

Koroner Arter Hastalığı (KAH) 'na neden olduğu düşünülen birçok risk faktörü belirlenmiş olsa da hastalığın sebebi tam olarak bilinmemektedir. Koroner arter hastalığının gelişmesi için bu risk faktörleri mutlaka gerekli değildir ve risk faktörleri bulunmayan kişilerde de hastalık gelişebilir (3).

Aterosklerozun patogeneğinde birbirine karşıt iki teori ortaya atılmaktadır; Bunlardan ilki, kolesterolden zengin aterosklerotik lezyonun, arter duvarının dolaşan kandan gelen moleküllerle infiltrasyona uğramasından doğduğunu söyler. İkincisi ise, arteriyel lezyonun primer olduğunu söyler. Böylece bağ dokusu ve elastik doku yapısı ve kendi elementlerini oluşturan hücreler bozulmuştur. Lipid infiltrasyonu sekonder olarak oluşur (2).

Muskuler arterlerin duvarı üç tabakadan meydana gelmiştir;

1. intima (en içte olup kanla en sık ilişkiye giren tabakadır)
2. media (orta tabakadır)
3. adventisya (en dış tabakadır)

İntima, damar lümeninde dolaşan kan bileşenleri için bir bariyer görevi gören ve endotel hücrelerinden oluşmuş ince bir tabakadır. Endotel hücreleri, muskuler medianın üstünde bulunan bir bağ dokusu tabakasına (internal elastik lamina) dayanır. *Media*, damarın en kalın tabakasıdır. *İntima* ve *adventisya*dan internal ve external lamina ile ayrılır. Bu laminaların elastik lifleri arasında

pencereler bulunur. Buralardan hücreler ve diğer maddeler geçebilir. Media esas olarak kollajen, elastin ve proteoglikanlardan oluşan bir yapı içinde, düz kas hücrelerinden meydana gelir. Medianın esas fonksiyonu, damar duvarlarında kasılma ve gevşeme meydana getirerek, kan akımını düzenlemektir. *Adventisya*, artere kan gönderen kan damarları, sinirler ve lenfatikler ile birlikte, fibroblastlar ve kollojenden ibarettir (3).

Aterosklerozun öncü lezyonları, yağ izleri ve fibröz plaktır. Yağ izleri, aterosklerozun en erken görülen bulgusudur. İleri derecede yağ izleri, arterin en iç tabakası üstünde sarı renkli bölgeler olarak görülür. Bunlar 1 mm'den küçük çaplı nokta şekillerinden 1-2 mm genişliğinde ve 1 cm uzunluğunda lezyonlara kadar değişir. Yağ izleri mikroskopik olarak incelendiğinde, köpük görümlü intraselüler lipidlerle dolu geniş hücrelerin (foam cells) subendotelial bölgeye toplanması ile karakterizedir. Köpük hücrelerinin bir kısmı düz kas kökenli olsa da esas olarak lipidlerle yüklü makrofajlardır.

Fibröz plak, aterosklerozun en önemli patolojik lezyonudur ve hastalıkta görülen klinik bulguların da kaynağıdır. Fibröz plaklar soluk, gri ve kabarıklık lezyonlardır. Bir çok kişi aterosklerozu arterlerin sertleşmesi ile eşdeğer kabul etse de lezyonlar fiziksel olarak sert ya da yumuşak olabilirler. Zamanla arter lümeni içine doğru büyüyerek kan akımını azaltabilirler (3).

2.1.1. Patolojik Anatomi

Aterosklerozun başlangıcı, arter duvarının endotel tabakasında yağ lezyonlarının birikmesiyle olur (1). Histolojik olarak, birbirini takip eden dönemlerde, ayrı karakterleri olan lezyonlar ortaya çıkar. Kronolojik sıra ile lezyonun ilk görülen şekli mukoid kalınlaşmadır. Mikroskopik olarak endotel ve subendotelial tabakanın ödemi oluşur. Vasküler geçirgenliğin lokal olarak artmasıyla ortaya çıktığı kabul edilir (4).

Daha sonraki dönemde bu bölgeye lipidler oturur ve 'yağlı iz' lezyonu meydana gelir. İntimada sarı ya da gri-sarı yüzeysel lekeler şeklinde görülür. Bu iki tip lezyon geri dönüşlüdür. Gerileyip tamamen kaybolabilirler (4).

Patolojik olay devam ederse subendotelial dokuya lipid infiltrasyonu olur ve hücre reaksiyonunu uyandırır. Lezyonda fibröz doku artar, 'fibröz plak' meydana gelir. Daha sonra, lezyon ortasındaki yağlı doku yumuşar ve 'aterom plağı' ortaya çıkar. Lipid, hem intraselüler (köpük hücreleri) hem de ekstraselüler olarak birikmektedir. Bu lezyona kalsiyum oturduğu, ülserasyon, kanama ve trombusun eklendiği durum ise 'komplike lezyon' olarak kabul edilmektedir (4).

2.1.2. Patogenez

Ateroskleroz multipl etiyolojik ve patogenetik faktörlerin bir arada rol oynaması ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu hastalığın patogenezinde üç grup faktör söz konusudur:

1. Kan biyokimyası ile ilgili humoral faktörler
2. Arter duvarı ile ilgili doku histolojisi ve metabolizması faktörleri
3. Hemodinamik kuvvetlerle ilgili faktörler.

Bu faktörlerin bir kısmı endojen karakterlidir ve kalıtıma bağlıdır. Diğer bir kısmı ise çevreyle ilgili ekzojen faktörlerdir ve bütün bu faktörler birbirlerini etkileyip potansiyalize ederek sonunda ateroskleroza tüm karakterleriyle ortaya çıkarırlar (4).

Normal ve bütünlüğünü koruyan arter endotelinden büyük moleküller arter duvarına geçemez. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar endotel hücrelerinin intima yüzeyinde aralıksız olarak sıralandığını ve bazı yerlerde endotel hücreleri arasında köprüler şeklinde bağlantıların bulunduğunu göstermiştir. Hemodinamik faktörlere bağlı çeşitli kuvvetler kateşolaminler, histamin, serotonin ve bradikininler gibi bazı maddeler bu köprülerin gevşemesine ve endotel yüzeyinde porların açılmasına neden olmaktadır. İşte, başlangıç lezyonların meydana gelebilmesi için, endotelin bu şekilde bir zarara uğraması ve bütünlüğünü lokal olarak yitirmesi gereklidir. İntimada bu şekilde lezyona uğramış endotel bölgelerinde kandan infiltrasyonla seröz bir birikim meydana gelir ve mukoid rejenerasyon ortaya çıkar. Bu, 'mukoid kalınlaşma' lezyonudur. Bu lezyon gerileyerek kaybolabilir ya da tahrişler endotel geçirgenliğinin daha da

artmasına yol açarak ve fibröz reaksiyonu doğurarak lezyonun ilerlemesine neden olabilir (4).

2.1.3. Aterosklerozda Risk Faktörleri

Aterosklerozun prevalans ve insidansını, hipertansiyon, hiperlipidemi, kalıtım yoluyla aterosklerozun bulunduğu bildiren aile öyküsü, diyabet ve sigara içmek gibi risk faktörleri önemli bir şekilde artırır. Risk faktörlerinin bir kaçının bir arada bulunması, aterosklerozun ortaya çıkma oranını ileri derecede artırmaktadır. Risk faktörlerinin sayısına göre, hastalığın görünme oranında belirli bir ilişki bulunduğu saptanmıştır. Yüksek arter basıncı olan kişilerde, olmayanlara göre koroner kalp hastalığının 3 kat fazla oranda ortaya çıktığı gösterilmiştir (2).

2.1.3.1. Yaş

Aterosklerozun gelişmesi ve koroner kalp hastalığının klinik olarak ortaya çıkması, zamana bağlı olduğundan, yaş ile ateroskleroz arasında ilişki olduğu düşünülmüştür. Fakat bugün ateroskleroz yaşlılığın doğal bir sonucu olarak görülmemektedir (2).

2.1.3.2. Cinsiyet

Genel olarak erkeklerin kadınlardan daha çok koroner aterosklerotik kalp hastalığına tutulduğu bilinmektedir. Bu farklılık menopozdan sonra çok çabuk azalmaktadır. Bu da kadınlarda, östrojenin ateroskleroza karşı koruyucu etkisi olduğunu düşündürür (2).

2.1.3.3. Hiperlipidemi

Hiperlipidemi, plazmadaki miktar ve konsantrasyonunun artması nedeni ile, intimada depolanan lipidin çoğalması, aterogenesisin başta gelen nedeni olarak düşünülmektedir. Kolesterolün yüksek olduğu hallerde, koroner hastalığın

gidişindeki özelliklerin belirlenmesi, lipid bozukluğunun bu hastalıktaki önemini vurgulamıştır (5).

Kandaki serum lipid düzeyleri ve aterosklerotik kalp hastalığına tutulma oranı arasında belirli bir uyum gözlenmektedir. Özellikle serum lipitleri arasında, kolesterol, trigliserit ve betalipoproteinlerin, plazmadaki yüksekliği ile koroner arterde görülen daralmanın ciddiyeti ve yaygınlığı arasında olumlu bir orantı vardır. Yapılan çalışmalarda, LDL kolesterol düşüşünün koroner aterosklerosis ilerlemesini engellediği ve bazı durumlarda gerileme izlendiği açıkça gösterilmiştir. Ayrıca, Münster Kalp Çalışmasında, şaşırtıcı şekilde yüksek trigliserit ve düşük LDL kombinasyonunda, kişilerde KAH riskinin arttığı saptanmıştır (5). Epidemiyolojik araştırmalar, serum kolesterol seviyeleri yüksek olan Amerika ve Finlandiya gibi ülkelerdeki halkın, koroner kalp hastalıklarından ölüm oranının, serum kolesterol düzeyleri düşük olan Japonya ve Afrika gibi ülkelerinin halklarından çok daha yüksek olduğunu göstermektedir (2).

2.1.3.4. Diyet

Kolesterol, doymuş yağlar ve şekerden zengin bir diyetin majör bir koroner risk faktörü olduğu bilinmektedir. Bu tür diyetin, kanda kolesterol ve lipit seviyelerini artırdığı saptanmış bulunmaktadır (2). Ayrıca, şişmanlık da kan basıncı, serum kolesterol seviyesi ve kan şekerini arttırdığı için KAH için risk faktörüdür. Şişmanlığın oluşturduğu bu riskleri kontrol altına almak için beden kitle indeksinin 20-25kg/m² arasında tutulması gerekmektedir. BKİ >25kg/m² olanlarda KAH riski artmaktadır. Kilo kaybı kan basıncının, kolesterol ve trigliserid düzeylerinin düşmesini ve HDL-kolesterol düzeyinin yükselmesini sağlar (6).

2.1.3.5. Hipertansiyon

Yüksek kan basıncının, koroner aterosklerozun gelişmesinde, birinci derecede öncelik alan bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Kan basıncı yüksek olan kişilerde, koroner aterosklerotik kalp hastalığı prevalansının ve bundan ölüm

oranının, normal kan basıncı olan kişilere göre çok yüksek olduğu görülmüştür. Normal kan basıncı sistolik 130, diyastolik 85 mmHg altı kabul edilmektedir.

Kan basıncının artması, plazmadaki lipitlerin intima hücrelerine filtrasyonunu artırmakta ve özellikle bu durum, plazma lipitlerinin yüksek olduğu hallerde, daha belirgin şekillerde görülmektedir. Hipertansiyon, hiperlipidemi gibi intimayı zedelemek suretiyle, medyadaki düz kas hücrelerinin proliferasyona uğramasına neden olur. Ayrıca basınç artışından dolayı, damarda ortaya çıkan tansiyon ve çeperde görülen çatlama fenomeni de önemli faktörlerdir. Hipertansiyon tedavisinin kalp yetersizliği gibi saf hipertansiyon komplikasyonları üzerine olumlu etkileri bilinmektedir. Aterosklerotik komplikasyonlar üzerin de azaltıcı etki yaptığı saptanmıştır (2).

2.1.3.6. Diyabet

Diyabetin, kan basıncı yükselmemiş, hiperlipidemisi olmayanlarda, tek başına önemli bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Diyabet, tüm dokularda mikroanjiyopati oluşturmaktadır. Küçük ve büyük koroner arterlerde, patolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Diyabetli kişilerde daha erken yaşlarda ve daha sık olarak, patolojik ateroskleroza rastlanmaktadır. Diyabetli kişilerde koroner hastalığının diyabetli olmayanlara göre 2-3 kat fazla olduğu bilinmektedir (2). Ayrıca, kadınlardaki etkisi erkeklere oranla daha fazladır. Kadınlarda oluşturduğu akut koroner atağa ilişkin risk artışı yaklaşık üç kat iken, erkeklerde yalnızca %50 dolayındadır (7). Angina pectoris, miyokard infarktüsü gibi koroner aterosklerotik kalp hastalığının, erken diyabetli şahıslarda genç yaşlarda görülmesi nadir değildir. Ancak, karbonhidrat metabolizması bozuk kişilerde sıklıkla görülen şişmanlık, hipertansiyon ve hiperlipidemiyi tam olarak ayırarak tek başına diyabetin risk faktörü olarak alınması güçtür. Diyabetin kontrolünün, ileri dönemde ortaya çıkan koroner ateroskleroza önlediği gösterilememiştir (2).

2.1.3.7. Sigara

Sigaranın atetojen etkisinin mekanizması açıklanamamış olmakla birlikte, epidemiyolojik araştırmalar, bunun doğruluğunu tam olarak belirlemiş ve sigara içmenin ateroskleroz için kesin bir risk faktörü olduğunu ortaya çıkarmıştır. Koroner aterosklerotik kalp hastalığının ortaya çıkması ya da bu hastalıktan ölüm sigara içenlerde, içmeyenlere oranla 2-6 kat daha fazladır. Riskin artış derecesi içilen sigara miktarıyla doğru orantılıdır. Sigaranın kesilmesi riskin ortadan kalkmasını sağlaması bakımından memnuniyet vericidir. Sigara içenlerde, aterojen faktörün, karbon monoksit ve nikotin olduğu bildirilmiştir. Nikotin, sigara içilir içilmez, hemen, plazmada norepinefrin ve epinefrin gibi katekolaminlerin miktarını yükseltmekte, aynı zamanda nabız sayısını ve kan basıncını da artırarak kalbin oksijen harcamasını çoğaltmaktadır. Sempatik uyarının artması, elektrofizyolojik olarak ventrikül fibrilasyon eşiğini alçaltmaktadır. Ayrıca koroner spazmı da ortaya çıkarmaktadır (2).

2.1.3.8. Genetik

Bilinen çevresel faktörlere ek olarak, genetik etkenler de KAH riskinde önemli role sahiptir. KAH, bir çok genetik ve çevresel faktörlerin fenotipi üzerine etkili olduğu, çok faktörlü bir hastalıktır (8). Bazı belirli aile gruplarında, erken koroner aterosklerotik kalp hastalığına bir eğilim olduğu bilinmektedir. Yüksek hastalık riski taşıyan şahısların seçilmesinde, ailevi hastalık hikayesi olanlar ön planda dikkate alınmalıdır (2).

Genetik faktörlerin ateroskleroz ve iskemik kalp hastalığı oluşumundaki etkileri Epstein ve Mc Kusick tarafından araştırılmıştır. Multifaktöriyel genetik faktörlerin lipid ve karbonhidrat metabolizmaları üzerinde, hipertansiyon, koroner arter dallarının ve kişilerin karakter yapılarının oluşumunda önemli katkıları vardır. Bu hastalıkların gelişmesinde genetik faktörlerin de, hormonal etkiler ve çevresel faktörler kadar önemli yerleri vardır (2).

Toplum taramalarında kan kolesterol düzeyleri ve kan basıncının mültifaktöriyel bir kalıtım gösterdiği saptanmıştır. Bunun yanında tek gen

bozukluklarına da rastlanır. Örneğin, otozomal dominant hiperlipoproteonemiler, prematüre iskemik kalp hastalığının oluşumuna yol açar (2).

2.1.3.8.1. Genetik Markerlar ve KAH

Bilinen genetik markerlarla kompleks insan hastalıkları arasındaki ilişki, bu hastalıklardaki karmaşık genetik faktörleri ortaya koymak amacıyla kapsamlı olarak çalışılmaya başlanmıştır. KAH'ın genetik faktörlerinin çalışılmasında 'aday gen yaklaşımı' metodu kullanılmıştır. Bu metotta KAH gelişimi için risk faktörü olan ve kişiler arası farklılığa neden olan genler tespit edilir. KAH'ı etkileyen aday genler, protein ürünleri, aşağıda sıralanan yerlerden birinde etkili olan, herhangi bir gen olabilir; a- lipoprotein yapısı veya lipoprotein metabolizmasında, b- trombogenesis, trombolizis ya da fibrinoliziste, c- koroner arterdeki kan akışının düzenlenmesinde, d- kan basıncının ayarlanmasında, e- aterosklerotik lezyonlarda ya da aterosklerotik lezyonların büyümesinin düzenlenmesinde, f- koroner arterlerin erken gelişiminde. Sonuç olarak KAH'a uyumlu önemli sayıda gen incelenmiştir. (9). Birçok popülasyonda apolipoprotein E (ApoE)'nin E4 alleli, total kolesterol ve LDL kolesterolün plazma konsantrasyonunun yükseltilmesinde etkilidir. Benzer şekilde, Angiotensin-converting enzimin (ACE) D allelinin homozigot olması durumunda KAH ile ilişki saptanmıştır. Angiotensinojen (AGT)'nin T235 alleli ise bazı beyazlarda ve Japonlarda hipertansiyonla bağlantılı bulunmuştur (10).

Koroner arter hastalığının gelişmesinde, endoteliyal hücre biyolojisi, damar duvarı matriksi biyolojisi, koagülasyon ve lipoprotein metabolizması gibi birçok fizyolojik sistem rol oynamaktadır. Bu sistemlerin her biri için etkili olan bir çok gen ve gen ürünü tespit edilmiştir. Örneğin, lipoprotein metabolizmasının bir geni, apolipoproteinleri, lipoprotein reseptörlerini ve lipoprotein metabolizması enzimlerini kodlar ve bu gen üzerinde meydana gelecek bir mutasyon lipoprotein metabolizmasında bozukluk ortaya çıkartır. Bu ve bunun gibi KAH üzerine etkili sistemlerdeki genlerde meydana gelen mutasyonlar, dolaylı olarak KAH riskini etkiler. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda ateroskleroza etkileyen bir çok gen mutasyonu tespit edilmiştir.

HDL kolesterolünün plazma seviyesini düzenlemesinden dolayı kolesterol ester transferaz proteininin (CETP) ateroskleroza karşı koruyucu etkisi vardır. TaqIB polimorfizminin B2 allelinin CETP’i baskılayıp koroner arter hastalığı riskini artırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir (11). Benzer şekilde, apoA1 ve hepatic lipaz (LIPC) gen fonksiyonlarının HDL seviyeleri üzerine genetik etkileri bulunmaktadır. Bu genlerde oluşacak bir mutasyon plazma HDL seviyelerini etkiler (12). Song ve arkadaşlarının Apolipoprotein E (apoE) genotiplerinin koroner arter hastalığı üzerine yaptığı etkileri araştırdıkları çalışmada, apoE epsilon4 allelinin KAH üzerine önemli şekilde etkili olduğu bulunmuştur (13). Klerk ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise MTHFR 677 C-T polimorfizmi ile KAH riski, önemli şekilde ilişkili bulunmuştur (14). ACE D alleli KAH için yüksek risk oluşturur. Angiotensinojen 235T ve 174M varyantları ise hipertansiyon riskini artırıp KAH için anlamlı şekilde etki gösterirler (15). Berg K. yaptığı derlemede, APOB, APOAI, LPA, LDLR, APOE ve CETP lokuslarının KAH üzerine koruyucu ya da risk oluşturucu etkileri olduğunu bildirmiştir (16). Kim JQ ve arkadaşları da benzer bir derleme ile Kore toplumunda KAH üzerine etkili genleri iki sınıfta değerlendirmişlerdir; 1) lipoprotein metabolizmasını etkileyen genler; apolipoprotein AI-CIII-AIV, apolipoprotein B, apolipoprotein E-CI-CII, apolipoprotein(a), LDL reseptörleri, lipoprotein lipaz, kolesterol ester transfer protein, ve 2) trombotikleri ve diğer faktörleri etkileyen genler; fibrinojen, faktör VII, plazminojen aktivatör inhibitör 1, homosistein, stromelisin, paraoksonaz ve anjiotensin converting enzim (17). Tablo 1’de koroner arter hastalığı üzerine etkili çeşitli gen polimorfizimleri gösterilmiştir.

Tablo 1. KAH'ını etkileyen genler (18)

Gen	Sembol	Polimorfizm	Lokus
Angiotensin II receptor type 1	<i>AGTR1</i>	-535C → T	3q21-q25
Angiotensinogen	<i>AGT</i>	-6G → A	1q42-q43
Apolipoprotein C-III	<i>APOC3</i>	-482C → T	11q23
Apolipoprotein C-III	<i>APOC3</i>	1100C → T	11q23
Apolipoprotein E	<i>APOE</i>	-219G → T	19q13.2
Apolipoprotein E	<i>APOE</i>	3932T → C → (Cys112Arg)	19q13.2
Apolipoprotein E	<i>APOE</i>	4070C → T (Arg158Cys)	19q13.2
ATP-binding cassette transporter 1	<i>TAP1</i>	1051G → A (Arg219Lys)	6p21.3
CC chemokine receptor 2	<i>CCR2</i>	190G → A (Val64Ile)	3p21
CD14	<i>CD14</i>	-260C → T	5q31.1
Coagulation factor V	<i>F5</i>	1691G → A (Arg506Gln)	1q23
Coagulation factor VII	<i>F7</i>	11496G → A (Arg353Glu)	13q34
Coagulation factor XIII A	<i>F13A1</i>	163G → T (Val34Leu)	6p25-p24
Connexin 37	<i>GJA4</i>	1019C → T (Pro319Ser)	1p35.1
Endothelial nitric oxide synthase	<i>NOS3</i>	-786T → C	7q36
Endothelin-1	<i>EDN1</i>	5665G → T (Lys198Asn)	6p24-p23
E-selectin	<i>SELE</i>	561A → C (Ser128Arg)	1q23-q25
Fatty acid-binding protein 2	<i>FABP2</i>	2445G → A (Ala54Thr)	4q28-q31
G protein _3 subunit	<i>GNB3</i>	825C → T (splice variant)	12p13
Glycoprotein IIIa	<i>ITGB3</i>	1565T → C (Leu33Pro)	17q21.32
Glycoprotein Ia	<i>ITGA2</i>	1648A → G (Lys505Glu)	5q23-q31
Glycoprotein	<i>GP1BB</i>	_ 1018C → T (Thr145Met)	1b22q11.2
Insulin receptor substrate-1	<i>IRS1</i>	3494G → A (Gly972Arg)	2q36
Interleukin-6	<i>IL6</i>	-634C → G	7p21
Interleukin-10	<i>IL10</i>	-819T → C	1q31-q32
Interleukin-10	<i>IL10</i>	-592A → C	1q31-q32
Methylenetetrahydrofolate reductase	<i>MTHFR</i>	677C → T (Ala222Val)	1p36.3
NADH/NADPH oxidase p22 phox	<i>p22-PHOX</i>	242C → T (His72Tyr)	16q24
Paraoxonase 1	<i>PON1</i>	584G → A (Gln192Arg)	7q21.3
Paraoxonase 2	<i>PON2</i>	311Cys → Ser	7q21.3
Plasminogen-activator inhibitor 1	<i>PAI1</i>	-668/4G → 5G	7q21.3-q22
Platelet-activating factor acetylhydrolase	<i>PLA2G7</i>	994G → T (Val279Phe)	6p21.2-p12
Stromelysin-1	<i>MMP3</i>	-1171/5A → 6A	11q23
Thrombomodulin	<i>THBD</i>	2136C → T (Ala455Val)	20p11.2
Thrombopoietin	<i>THPO</i>	5713A → G	3q26.3-q27
Thrombospondin	<i>THBS4</i>	4 1186G → C (Ala387Pro)	5q13
Transforming growth factor-1	<i>TGFB1</i>	869T → C (Leu10Pro)	19q13.1
Tumor necrosis factor- ₁	<i>TNFA</i>	-63C → A	6p21.3
Tumor necrosis factor- ₂	<i>TNFA</i>	-850C → T	6p21.3
Tumor necrosis factor- ₃	<i>TNFA</i>	-238G → A	6p21.3

2.1.3.9. Minör Risk Faktörleri

Şişmanlık, hareketsiz yaşantı, kişisel faktörler ve karakter, psikososyal yaşantı ve diğer çevre faktörlerinin de aterosklerotik hastalıkların ilerlemesine, hızlanmasına neden olan faktörler olarak alınması gerekli bulunmuştur. Bu faktörlerin hastalığın gelişmesinde etkili riski artırıcı olduğunu gösteren bulgular vardır. Yalnız, çoğunlukla bu faktörlerin diğer majör faktörlerle beraber bulunduğu da dikkat çekicidir. Ayrıca ülkeler arasındaki coğrafik farklılıklar, ırk ve sosyoekonomik yaşantı ve beslenme ayrılıkları gibi faktörlerin de ateroskleroz üzerine etkili olabileceği kanısına varılmıştır (2).

2.2. Lipitler

Lipitler, yağ asitleri ile ester halinde bulunan ya da esterleşebilen, apolar gruplardan yapılmış, molekül yapıları farklı organik bileşiklerdir. Eter, kloroform, benzen ve aseton gibi apolar organik çözeltilerde çözünürler (19). Yüksek yağ asitlerini, bunların oluşturduğu doğal bileşikleri kapsarlar (20). Temel olarak, C ve H' den oluşmuşlardır. Az sayıda S, O, N ve P içerirler. Ayrıca bazılarının bileşiminde karboksil grubu, gliserol ve karbonhidratlar da bulunmaktadır (19).

En önemli özellikleri suda çözünmemeleri olan lipitler, birçok organizmada enerjinin ana depo şeklidirler. Fosfolipid ve steroidler, hücre membranı kitlesinin yaklaşık yarısını oluştururlar. Ayrıca, enzim kofaktör elektron taşıyıcı, ışık absorblayan pigmentler, hücreler için hidrofobik bariyer, emülsiyon oluşturucu ajanlar, hormonlar ve intrasellüler mesajcılar olarak da görev yaparlar (19).

2.2.1. Lipitlerin Sınıflandırılması

Bloor' un sınıflandırmasına göre lipitler aşağıdaki şekilde üçe ayrılırlar:

a. Basit Lipitler: yağ asitlerinin çeşitli alkollerle yapmış olduğu esterlerdir.

Kendi aralarında ikiye ayrılırlar.

1. Yağ Asitleri ve Nötral Yağlar (Trigliseritler)
2. Mumlar

b. Bileşik Lipidler: Bir alkol ve bir yağ asidine ek olarak başka gruplar (azot, karbonhidrat, sülfat ya da protein) taşıyan esterlerdir. Kendi aralarında üçe ayrılırlar.

1. Fosfolipidler
2. Glikolipidler
3. Lipoproteinler

c. Türev Lipidler: Diğer lipidlerden hidroliz yoluyla türeyen lipidlerdir. Kendi aralarında ikiye ayrılırlar.

1. İzopren Türevi Lipidler
2. Yağ Asidi Türevi Lipidler (19, 20).

2.2.2. Lipoproteinlerin Yapı ve Organizasyonu

Doğal plazma lipitleri olan trigliseritler ve kolesterol esterler, suda çözünmezler ve amfipatik (hem hidrofobik hem de hidrofilik) molekül özelliğindedirler. Lipoproteinler, plazmadaki çeşitli lipit ve proteinlerden oluşan makromoleküllerdir. Lipoproteinlerin, hidrofobik trigliserit ve kolesterol esterlerden oluşan bir çekirdeği bulunur ve bu çekirdek tek tabakalı bir fosfolipit, serbest kolesterol ya da protein tarafından çevrelenmiştir. Apoproteinler olarak adlandırılan proteinler, lipit taşınmasında önemli düzenleyici görevleri vardır. (21). Kolesterol gibi lipidlerin, plazmadaki yüksek konsantrasyonları kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde önemli risk faktörüdür. Lipid molekülleri, kanda belirli alanlara lipoproteinler aracılığı ile taşınırlar (8). Lipoproteinler, hem lipitleri çözünür tutarak plazmada taşırken, hem de kendilerinin lipit içeriklerini dokulara verebilirler (19). Lipoproteinler, büyüklükleri, densiteleri, lipit ve protein içerikleri ve düzenlenmelerine bakılarak dört ana grupta toplanırlar. Bunlar;

1. Şilomikronlar
2. Çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL)
3. Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL)
4. Yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL)
5. Ara yoğunluklu lipoproteinler (IDL)'dir (19, 21, 22, 23).

Şilomikronlar: Başlıca trigliseritlerden, daha az oranlarda da fosfolipit, serbest kolesterol, kolesterol esterlerinden ve proteinden oluşan en büyük lipoproteinlerdir (24).

VLDL: Şilomikronlara benzemekle beraber, yapısında %85-90 lipit ve %10-15 protein bulundurmasıyla onlardan ayrılırlar (24).

LDL: Plazmadaki majör kolesterol taşıyıcı partiküldür. LDL, büyük ölçüde plazmadaki VLDL'den meydana gelir (19, 24). LDL'nin %75'i lipit ve %25'i proteindir (25).

HDL: Hem karaciğer hem de ince barsakta sentezlenen HDL, %50 lipit ve %50 proteinden oluşmuştur (24, 25).

IDL: Ara yoğunluklu lipoprotein VLDL katabolizmasından türeyen ve plazmada düşük konsantrasyonlarda bulunan geçici bir partiküldür.

2.2.3. Lipidlerin oksidasyondaki rolü

KAH, gelişmiş ülkelerdeki ölüm oranının önemli bir nedenidir. KAH'ın risk faktörleri arasında çok sayıda gen rol oynar. Son yıllarda, çalışmalar lipid metabolizmasında rol oynayan genlerdeki ortak polimorfizmlerin, plazma lipoprotein seviyeleriyle ilişkisini belirlemeye odaklanmıştır. Yakın zamanlarda lipid metabolizmasına katılmayan ancak aterosklerotik lezyonların gelişmesinde rol oynayan paraoksanase (PON) gibi ek genler tanımlanmıştır. PON'un ateroskleroz ile ilişkisinin, HDL'nin antiaterojenik özelliklerindeki rolünden dolayı olduğu düşünülmektedir. LDL oksidasyonunun HDL ile ilişkili olarak korunmasında, LDL oksidasyonunun ürettiği toksin metabolitlerin aktivitesini ortadan kaldıran PON gibi HDL ile ilişkili enzimlerin hareketi aracılık yapar. (26, 27).

İn vitro çalışmalar PON'un, biyolojik olarak aktif olan LDL'yi hidrolize ederek, lipid peroksit oluşumunu önemli ölçüde azalttığını ve yağ birikiminin oluşmasını önlenmesinde koruyucu rol oynadığını belirtmektedir. HDL'yi ısıyla işleyerek PON'un inaktifleşmesinde, HDL'nin LDL oksidasyonunu önleme yeteneğini azalttığı araştırmalarda gösterilmektedir. PON1 aktivitesi; hiperkolesterolemi, insüline bağlı olmayan diyabetler, vasküler hastalıkları olan ve miyokardiyal enfeksiyondan kurtulanlar gibi ateroskleroz riski yüksek

olanlarda azalmıştır (26, 27). İmmünolojik teknikler, PON1'in ateroskleroz gelişimi esnasında insanlarda arteriyal duvarda biriktiğini ortaya koymuştur. İn vitro olarak insan HDL'sinde veya tamamen seruma saflaştırılmış PON1 eklenmesi konsantrasyona bağlı bir şekilde Cu^{+2} ile indüklenen lipoprotein oksidasyonunu önemli derecede engeller. Lipoproteinlerden fosfolipidlerin oksidasyonu; hidroperoksidazlar, izoprostenazlar ve core aldehytlerini de içeren enzimatik hidrolize neden olan (28), fosfatidilkolin (PC) türevlerinin spektrumuna neden olurlar (29). PON metabolitleri LDL fosfolipidlerinin Sn-2 pozisyonunda bulunan arachidonic asit türevlerini okside eder (30).

2.2.4. Lipoprotein ve Ateroskleroz Riski

Yükselen LDL, beta-VLDL ve lipoprotein a seviyeleri, aterosklerosisin nedeni olan yağlı lezyonların oluşmasına yol açar. Bunun yanında HDL'nin KAH riskini azaltan, anti-aterojenik bir lipoprotein olduğu düşünülmektedir. (8). Lipid seviyelerinin yüksek plazma konsantrasyonlarına ek olarak, LDL oksidasyonu ateroskleroz riskinde diğer bir anlamlı yardımcıdır. Goldstein ve Brown (1997), LDL'nin bu kimyasal değişiminin foam hücre yapılanmasındaki anahtar rolünü göstermişlerdir. Bu olay, temizleyici (scavenger) reseptörünün aracılık ettiği bir işlemdir (31). Bu özel reseptör, klasik LDL reseptörlerinden farklıdır. Hücrel kolesterol yığılımının artması için tersine düzenleyici değildir. Bunun yanı sıra, ağır hücrel kolesterol yığılımı, lipid yüklü foam hücrelerinde sonuçlanabilir.

Son yıllarda, HDL'nin aterojenez riskinden iki yolla koruyabildiği açıklığa kavuşmuştur. İlk olarak, HDL, kolesterolün periferik hücrelerden dışarı tersine taşınmasında rol oynar ki bu da, hücrel kolesterolün birikimini engeller. İkinci olarak, HDL potansiyel olarak, LDL'nin oksidatif değişimine karşı koruyucudur, böylelikle aterojenez için de koruyucudur (32). HDL'nin bu oksidasyon koruma yolu, HDL'de bulunan birkaç hidrolitik enzime bağlı olabilir (33).

2.2.5. LDL ve LDL Oksidasyonu

Lipoprotein metabolizmasında, LDL, VLDL'nin lipoprotein lipaz (LPL) ve hepatik lipaz (HL) ile lipolizisinden oluşmaktadır. LDL, çekirdeğinde yüksek yağunlukta kolesterol ester ve yüzeyinde apoB ve /veya apoE içerir. LDL partiküllerinin yaklaşık %70'i, 'karaciğer reseptör-bağımlı yolu' ile taşınır, geri kalanıysa 'reseptör-bağımsız yolu' ile taşınır. LDL reseptör-bağımsız yolu çok iyi bilinmemektedir. Bunun yanında reseptör-bağımlı mekanizma geniş bir şekilde çalışılmıştır. Bu yolda LDL reseptörünün (apoB/E reseptörü) önemli rol oynadığı düşünülmektedir. LDL reseptörünün N terminal bölgesi, LDL partiküllerindeki apoB veya E'yi bağlayarak, LDL'nin sirkülasyona katılmasını sağlayan, ligant bağlayıcı alan içerir. Plazma LDL kolesterol seviyesi ve aterosklerosis riski, foam hücrelerinin düzenlenmesi ile ilişkilidir (34, 35). LDL partiküllerinin arteriyal endotelial bariyere göçü ve intimaya girmesiyle plazmadaki LDL seviyesi artar (36).

2.2.6. HDL ve HDL'nin Anti-Aterojenitesi

Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), anti-aterojen olan tek lipoproteindir. HDL'nin KAH riski ile ters ilişkili olduğuna dair güçlü deliller vardır. Klinik ve epidemiyolojik çalışmalar göstermişlerdir ki, HDL konsantrasyonundaki %1'lik bir artış KAH riskini %3 oranında azaltır. KAH'a karşı koruyucu etki esas olarak, HDL'nin tersine kolesterol taşıması ve LDL oksidasyonunu engellemesidir. HDL, kolesterolün fazlasını, periferel hücrelerden katabolizma için karaciğere geri taşınmasına yardımcı olur. Bu da, plazma kolesterol seviyesinin düşürülmesine yardımcı olur ve foam hücre düzenlenmesine karşı koruma sağlar. Bu özelliklerine ek olarak HDL, LDL oksidasyonunu engelleme yeteneğine sahiptir ki böylece ateroskleroz gelişimi azalmış olur (37).

2.3. İnsan Serum Paraoksonazları (PON)

İnsan serum paraoksonazları (PON), karaciğerde sentezlenen ve plazmadaki HDL'ler ile ilişkili olan, A-esterazlar sınıfına ait bir üyedir. Daha önceki

çalışmalar PON'un, P450 sistemindeki paration, chlorpyrifos ve diazinon gibi organofosfat insektisidlerin detoksifikasyonunu içerdiğini göstermiştir (38).

2.3.1. Paraoksonaz'ın Yapısı ve Etki Mekanizması

Paraoksonaz, paraoksonun P=O bağıını polarize ederek fosforun nükleofilik saldırıya yatkınlığını sağlar. Böylece dietil fosfatın aktif alandan ayrılmasını kolaylaştırır. E52 ve D53 amino asitlerinin kalsiyumu (Ca²⁺) bağladığı, histidin ve triptofan başta olmak üzere en az 20 amino asit ile disülfid bağının arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi için temel olduğu ortaya konmuştur. Enzim aktivitesi sülfidril bileşikleri ile inhibe olur ve bu inhibasyon sisten ile geri döner. Enzim aktivitesini ölçmek için serum ya da EDTA'sız plazma gereklidir (39).

İnsan serum paraoksonazları, HDL'nin içerdiği apo A-I ile yakın ilişkili, lipid peroksidasyon ürünlerinin birikmesini azaltan, diğer bir deyişle LDL'deki okside olmuş lipidleri hidrolize eden, antioksidan etkili, enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlı bir esterazdır. Paraoksonaz, enzim aktivitesinin Ca⁺²'a bağımlı olma özelliğiyle diğer A esteraz tipi enzimlerden farklılık gösterir. Kalsiyumun direk olarak katalitik reaksiyonda yer aldığı ya da aktif alanın uygun konformasyonunu sağlayarak korunmasında rol oynadığı düşünülmüştür (39).

2.3.2. Paraoksonaz Enzimi

Paraoksonaz, Aldrige sınıflama sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolaz enzimidir. Önceki organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışılmış, son yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile KAH riskinden korunabileceği düşünülerek güncellik kazanmıştır.

Paraoksonaz, ilk olarak 1953 yılında Aldridge W. N. (Aldridge W.N. ve ark., 1953) tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidrolize ederken A-esteraz olarak tespit edilmiştir. İnsan serumunda ilk defa 1961'de Uriel tarafından elektroforez sonrası HDL immünopresipitatlarında saptanmıştır (Uriel ve ark., 1961). 1973 yılında, bir grup araştırmacı, ilk olarak insan serum

paraoksonazını genetik olarak saptamışlardır (Geldmacher-Von Mallinckordt ve ark., 1973). Mackness ve ark., paraoksonaz aktivitesinin çoğunlukla apo AI içeren partiküllerde HDL ile birlikte bulunduğunu ortaya çıkarmışlar ve enzimin kanda HDL yapısında taşındığını göstermişlerdir. Aynı grup 1988'de yaptıkları çalışmalarla, PON'un HDL üzerinde apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında da LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır (40). Mackness ve ark. (1988), farklı populasyonlarda polimorfizm analizleri yaparak, allelik formları belirlemiş ve populasyon çalışmaları enzim aktivitesi ile HDL, apo A-I ve apo A-II arasında istatistiksel ilişki göstermiştir. İmmünoaffinite kromotografi çalışmaları insan serum paraoksonazının gerçekte apo A-I ve klusterin (apolipoprotein J) içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON'un total HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermişlerdir (41). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyon arasındaki ilişkisi araştırılmış ve enzimin amino asit dizisi belirlenmiştir (39).

Yapılan çeşitli çalışmalar, paraoksonaz genleri üzerindeki polimorfizmlerin birçok hastalık üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Jiajun shi ve arkadaşlarının, PON2 Cys311Ser polimorfizmi üzerine yaptıkları çalışmada bu polimorfizmin Alzheimer hastalığı riskini önemli derecede artırdığını bulunmuştur (42).

2.3.3. Paraoksonaz Gen Ailesi

PON gen ailesi, 7q21.3-22.1 kromozomunda bulunan PON1, PON2 ve PON3 üyelerini içerir (43, 44). PON genleri oldukça benzerdir, 9 ekson, 8 intron ve TATA-less promoter içerirler. İnsanlarda, PON1, PON2 ve PON3, amino asit seviyelerinde yaklaşık %60 benzerlik ve nükleotit seviyelerinde ise %70 benzerlik içindedir (45). PON1'de 106. kodonda lizin bulunurken, PON2 ve PON3'te lizin bulunmamaktadır. PON gen ailesinin insan fizyolojisi ve patolojisi üzerindeki rolü çok az anlaşılabilmiştir. PON'ların sinir sistemini, sirkülasyondan giriş yapan organofosfatların nerotoksikliğine karşı muhtemel bir koruyucu etkisi vardır, çünkü bu organofosfatları hidrolize eder. Fakat bu muhtemelen, onların

fizyolojik rolü değildir. Biyokimyasal ve genetik deneyler sonucunda tüm paraoksonazların aterosklerozis üzerinde etkisi olduğu kanıtlanmıştır (46).

PON gen grubunda, toplam dokuz polimorfizm gösterilmiştir ve bunlardan dördü kodlama bölgesindedir. PON1/kodon 192 polimorfizmi ile KAH arasındaki ilişki üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır ve birçoğunda, PON1/kodon 192 polimorfizmi KAH ile ilişkili bulunmuştur (47, 48, 49). Aynı şekilde, PON2/kodon 311 Serine (C-G/Ser-cys) polimorfizmi de tek başına ya da PON1/kodon 192 polimorfizmi ile birlikte KAH ile ilişkili bulunmuştur (50). Yıllarca PON1 ile yapılan çalışmalarda insan serum kapasitesi, ksenobiotikleri hidrolize etmesi ve aterosklerozis arasındaki ilişki araştırılmıştır. PON2 ve PON3 hakkında yapılan çalışmaların azlığı nedeniyle PON1 kadar iyi anlaşılamamışlardır.

2.3.3.1. Paraoksonaz 1

PON1, HDL alt kesirleri içeren apo-J ve apo A-I ile aynı yere yerleşmiş olup PON1'in ters kolesterol naklinde rol oynayabileceği olasılığını ortaya çıkarmıştır. In vitro çalışmalar, PON1'in LDL oksidasyonu esnasında lipid peroksit oluşumunu azaltabileceğini ve dolayısıyla HDL'nin ateroskleroza karşı korunmasında rol oynayabileceğini belirtmektedir. Ayrıca serum PON1 aktivitesinin MI veya kalıtsal hiperkolesterolemi hastalarında, fish eye hastalığı ve Tangier hastalığı dahil analfalipoproteinemiazlarda ve diyabet hastalarında daha düşük olduğu bulunmuştur (51). PON1 aktivitesini anlamlı olarak etkileyen ve protein içindeki amino asit değişikliklerinin meydana getirdiği iki polimorfik yapı vardır (43, 52). İlk polimorfizm 55. kodondaki Leusin (L) Metionine (M) değişmesidir (M/L55). İkinci polimorfizm, 192. kodonda meydana gelen Glutamin yerine (Q) yerine Argininin (R) geldiği değişimdir (R/Q192) (43, 52, 53).

2.3.3.2. Paraoksonaz 2

PON2, beyin, karaciğer, böbrek ve testis gibi çok sayıda dokuda eksprese edilir ve çeşitli mRNA formları mevcuttur. PON2, PON1'e benzer şekilde

antioksidant özelliklere sahiptir (45). Ng ve ark..'un bulgularına göre paraoksonaz 2, hücrel antioksidanttır ve bir kısmı okside olmuş LDL'nin oksidasyonunu geciktirir. PON2'yi çokça eksprese eden hücrelerde oldukça az miktarda okside LDL ve intraselüler oksidatif stres gözlenir (54). PON2, biri A/G 148 ve C/S 311 olmak üzere iki polimorfizm gösterir. Pozisyon 148'deki polimorfizm, total serum konsantrasyonu, glycaemic kontrol ve tip2 diyabetli kişilerde nefropatinin varlığı ile ilişkilidir. C/S 311 polimorfizmi de tip2 diyabetli hastalarda glycaemic kontrol ile ilişkilendirilmiştir. PON2 polimorfizmleri, plazma lipoprotein seviyeleri ve kalp hastalığı riski ile oldukça yakından ilişkili bulunmuş (55), fakat aynı ilişki Avrupalılarda ve Çinlilerde gösterilememiştir (54).

2.3.3.3. Paraoksonaz 3

PON3'ün ürünü HDL üzerine yerleşmiş glikoproteindir. PON3 ekspresyonunun asıl bölgesi karaciğerdir fakat PON3 mRNA'sı, dikkate değer bir oranda böbrekte de tespit edilmektedir (45). Bu bulgular, PON3'ün böbrek lipoprotein metabolizmasında rol oynuyor olabileceğini göstermektedir. PON2 spesifik peptid antikoru HDL ile ilişkili yaklaşık 40-kDa'luk bir protein olarak tespit edilmiştir ve LDL ile bir bağlantısı gösterilmemiştir (55). PON3, yapısı ve in vivo aktivitesi için önemli bir özelliği olarak, PON1 ile tespit edilmiş üç sistein artığını paylaşır. Cys283'de bulunan serbest sülfidril artığı ve PON1'in diğer iki sisteininde bulunan intramoleküler disülfid bağları (55). PON1 gibi PON3 enzimi de antioksidant özellik göstermektedir ve son zamanlarda yeni bir enzimatik aktivite ortaya çıkarılmıştır. PON3 laktonaz aktivitesi Draganov ve ark.. tarafından tavşanlarda tanımlanmıştır ve Reddy ve ark.. insanlar için hipotez etmiştir. Bu bilgiler, PON3'ün hidrolize potansiyelli toksik endogenoz laktonazlar ile vasküler hasara karşı koruyucu olduğunu işaret ederler(45). Draganov ve ark.. PON3 proteinini tavşan serumundan pürifiye ve karakterize etmiş olmasına karşın (55), PON3, henüz insan dokularından pürifiye ve karakterize edilmiş değildir, doğal substratları bilinmemektedir (45).

2.4. PON ve KAH Riski Arasındaki İlişki

LDL oksidasyonunun ve bunun sonucu olarak arteriyal duvarda foam hücresi yüklü yağlı bölgelerin gelişmesinin, aterosklerotik işlemlerin başlamasına yol açtığı düşünülmektedir (56). *In vitro* çalışmalar, HDL-PON birlikteliğinin LDL oksidasyonunu engellediğini (57) ve hafif oksidize olmuş LDL'deki aktif lipidleri yok edebileceğini göstermiştir (58). Ateroskleroz işlemini başlatan da bu olabilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, HDL'nin üzerinde bulunan Ca^{+2} 'a bağlı enzim olan paraoksonazın, okside olmuş lipidlerin metabolizmasında ve aterosklerozdan korunmada önemli fizyolojik rolü olduğu yönündedir. PON ile ateroskleroz arasındaki ilişki HDL'nin antiaterojenik özelliklerinden ileri geliyor gibi görülür. LDL oksidasyonundan korumasında ve LDL oksidasyonu ile oluşan toksik metabolitlerin aktivitesinin azaltılmasında, HDL ile ilişkili olan PON'un HDL üzerine katalizör etkisinin olabileceği düşünülmektedir. *In vitro* çalışmaların gösterdiğine göre, PON biyolojik olarak aktif olan LDL'yi hidrolizleyip lipid peroksit oluşumunu anlamlı olarak azaltarak yağ çizgisinin oluşmaması içinde önemli rolü üstlenir. (39).

PON ile apo A-I arasındaki yakın ilişki, bu iki proteinin doğrudan bağlandığını düşündürür. Yapılan sekans analizleri, dolaşımda bulunan PON formunun N-terminal hidrofobik sinyal sekansına sahip olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, PON'un hidrofobik N-terminal sekansının HDL ile etkileşimini kolaylaştırdığı fikrini ortaya koymuştur (59).

In vitro olarak histidin ve glutamin rezidülerinin pozisyon 20 ve 21'de alanin ile yer değiştirmesi PON ekspresyonuna neden olur. Eksprese edilen PON'un lipoproteinlerle etkileşmesi için N-terminal hidrofobik sinyal sekansının gerekli olup olmadığı araştırılmış ve PON ile HDL birleşmesi için yapıda N-terminal hidrofobik sinyal peptidin gerekli olduğu saptanmıştır. Apolipoprotein noksanlığında N-terminal hidrofobik peptid doğrudan fosfolipidlere bağlandığından, PON'un HDL üzerindeki fosfolipidlere bağlanarak dolaşımda bulunduğu gözlenmiştir (60).

Aterosklerotik apoprotein E eksikliği oluşturulan fareler üzerinde yapılan çalışmada, serum PON aktivitesi ve serum lipidlerinin oksidatif düzeyi arasında

negatif korelasyon tespit edilmiştir. Apo E eksik olan farelerde hızlı ateroskleroz oluşumu ve oksidatif stres artışı belirgin olarak gözlenmiştir (61).

Önceki çalışmalarda, PON2/Ser311 ve PON2/Cys311 allellerinin KAH riski ile ilişkili olarak bulunmuştur (48). Benzer şekilde geçmiş çalışmalar, PON3'ün de benzer biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (62, 63). PON2 geninin ürününün, hücre aracılı LDL oksidasyonunun önlenmesinde görev yapan bir protein olduğu anlaşılmıştır (64). PON3 geninin promoter bölgesindeki -133C>A polimorfizmi son çalışmalarla gösterilmiştir.

PON2 ve PON3'ün KAH ile ilişkisini incelemek üzere bir çok çalışma yapılmıştır. Chen ve arkadaşları, PON2 kodon 311'in angiografik koroner arter hastalığı ile ilişkisini inceleyen bir çalışma yapmışlar ve sonucunda PON2 kodon 311 polimorfizm frekansının hasta grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı şekilde yüksek olduğunu bulmuşlardır (%15.22, %4.61; P=018) (65). Bunun üzerine PON gen ailesinin KAH üzerine etkili olacağını söylemişlerdir. C. Motti ve ark., paraoksonaz gen ailesi polimorfizmleri üzerinde yaptıkları çalışmadaki bulgularına dayanarak, PON2 S→C 311 polimorfizminin koroner arter hastalığı üzerinde, yalnız başına ya da PON1 192 polimorfizmi ile birlikte etkili olduğunu söylemişlerdir (66). Wang ve ark., Çin Han popülasyonunda, koroner arter hastalığı ve PON gen ailesi polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi incelediği çalışmada, PON1'in 3 polimorfizminde (Q192R, R160G ve -162G/A) olduğu gibi PON2 S311C polimorfizminin de KAH ile anlamlı biçimde bağlantılı bulmuşlardır. Bu çalışmada da PON2 311C alleli, hastalarda kontrol grubuna oranla oldukça yüksek frekansta gözlenmiştir (67). Aynı şekilde Robertson ve ark.. da yaptıkları çalışmada PON2 S311C polimorfizmini KAH ile bağlantılı bulmuşlar fakat PON3 için herhangi bir polimorfizmin KAH ile etkileşimine rastlamamışlardır (68). Bu bulgular, Sanghera ve ark.. ve Mackness ve ark..'un da yaptıkları çalışmalarla uyumludur (48, 54).

Bunların yanında, Mansur ve arkadaşlarının KAH'lı 130 kadın hasta üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda, PON2 S311C polimorfizmi ve KAH arasında herhangi bir ilişki gösterilememiştir (69). Benzer biçimde, Wheeler ve ark.. ve Qi Chen ve ark.. çalışmalarında bu polimorfizm ve KAH arasında anlamlı bir bağlantı bulmamışlardır (70).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Örneklerin Seçimi ve Kan Alımı

Çalışma, prematür KAH tanısı alan 159 hasta ile, KAH öyküsü olmayan 113 sağlıklı birey (kontrol grubu) arasında yapıldı. Çalışmaya katılan bütün bireylerin yazılı onayları alındı.

Hastalığın tanısında kullanılan kriterler;

a. Anjiyografide majör bir koroner arterde ya da dallarının birinde en az %50 darlık,

b. Tanı sırasındaki yaş, erkeklerde ≤ 55 , kadınlarda ise ≤ 65 .

Koroner anjiyografi Judkin metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Miyokard infarktüsü tanısı, Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine uygun olarak, semptomlar, kardiyak enzimlerin yüksekliği ve elektrokardiyografik değişikliklere göre kondu.

Bütün hastalar, diabetes mellitus (DM), hipertansiyon, hiperkolestrolemi ve sigara gibi koroner risk faktörleri açısından değerlendirildi. Trigliserit, total kolesterol, HDL ve LDL kolesterol değerleri klasik biyokimyasal metodlarla elde edildi. Arteriyal hipertansiyon kriteri olarak, birden çok ölçümde sistolik basınç ≥ 140 mmHg ve/veya diastolik basınç ≥ 90 mmHg bulunması alındı. Diabet öyküsü olanlar ya da bazal glukoz değeri ≥ 120 mg/dl olanlar diabetes mellitus olarak değerlendirildi. Sigara içimi ≥ 5 /gün olanlar, sigara içen grubuna dahil edildi. Vücut kitle indeksi ≥ 25 kg/m² olanlar, kilolu olarak değerlendirildi. Hasta ve kontrollerle yapılan görüşmeler sonucu KAH aile öyküleri saptandı.

Onayları alınan hastaların venöz kanları K2EDTA'lı tüplere toplandı ve DNA izolasyonları yapıncaya kadar -20°C 'de saklandı. Tüm moleküler analizler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D. Moleküler Tıp Araştırma laboratuarında yapıldı.

3.2. Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Kimyasallar

3.2.1.1. Kimyasallar

Çalışmanın her aşamasında moleküler grade kalitesinde kimyasallar ve tip-1 kalitesinde ddH₂O (çift distile su) (18 megaohm/cm) kullanıldı.

- Agaroz (Sigma, A 9539)
- Borik Asit (Sigma, B 6768)
- Bromfenol mavisi (Sigma, 5525)
- dNTP karışımı (Boehringer Mannheim, 1277049)
- Hinf I Restriksiyon enzimi
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasit, disodyum) (Sigma E 5134)
- Etanol (Reidel de Haen, 24103)
- Etidium Bromid (Sigma, E 7637)
- N-Lauroil Sarkozin (Sigma, L 9150)
- MgCl₂ (Merck, 5832)
- Moleküler Ağırlık Marker'ı (Hae III, Fermentas)
- Dde I Restriksiyon Enzimi
- Nucleospin DNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel, Cat No:740 951.250)
- PCR tampon seti (Boehringer Mannheim, 1699121)
- Sukroz (Sigma, S 0389)
- Taq DNA Polimeraz (Boehringer Mannheim, 1146165)

3.3. KAH'lıgında PON2 Genindeki Cys-Ser 311 ve PON3 Genindeki 971 G-A Polimorfizmlerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

3.3.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Hastalardan EDTA'lı tüpe alınan 1ml periferik kandan 200µl alınarak genomik DNA elde edilmiştir. Bu amaçla tuzsuz DNA ekstraksiyon yöntemi

kullanılmıştır. Bu yöntem için Nucleospin DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemleri kit prospektüsüne göre yapılmıştır.

3.3.2. Uygulanan Protokol

DNA Ekstraksiyonu (NucleoSpin):

1. 1,5ml mikrosantrifüj tüplerine 200µl kan ve 25µl *proteinase K* eklenir.
 2. 200µl *lysis buffer B3* herbir karışımın üzerine eklendikten sonra 10-20 saniye kadar vortekslenir.
 3. 70°C'de 10 dakika beklenir.
 4. Her bir örneğin üzerine %96-98'lik *etanolden* 210µl konulup vortekslenir.
 5. Örneklerin her biri *NucleoSpin Blood Column*'lara aktarılır.
 6. 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
 7. *NucleoSpin Blood column*'lar yeni tüplere aktarılır ve her birine 500µl *BW* eklenir.
 8. 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
 9. *NucleoSpin Blood column*'lar yeni tüplere aktarılır ve üzerlerine 600µl *B5* eklenir.
 10. 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
 11. *NucleoSpin Blood column*'lar yeni tüplere aktarılır ve üzerlerine solüsyon koymadan boş, 14 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
 12. *NucleoSpin Blood column*'lar 1,5ml'lik mikro santrifüj tüplerinin içine konur. Üzerine önceden 70°C'de bekletilmiş olan *elution buffer (BE)* 'dan 100µl eklenir. Oda ısısında yaklaşık 3 dakika beklenir.
 13. 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
 14. *NucleoSpin Blood column*'lar atılır. Mikro santrifüj tüplerinin dibinde biriken miktarla PCR çalışılır.
- Tüplerin ağızları kapatıldı ve parafilmlelenerek -20°C'ye kaldırıldı.

3.3.3. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Saptanması

Örneklerin DNA konsantrasyonu tayini için, önce izole edilen DNA örneğinden 25 µl alındı ve 425 µl TE ile seyreltildi. İyiye karıştırılarak homojenize edilen DNA örneğinin optik dansitesi, spektrofotometrede 260 ve 280 nm'de TE'ye karşı okundu. 50µg/ml çift iplikli DNA içeren çözeltinin spektrofotometrede 260 nm'de 1.0 optik dansite (OD) değerinde bir okuma verdiği kabul edilmektedir. Spektrofotometrede okunan OD değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

Örnekteki DNA miktarı (µg/ml): $(OD_{260}) \times 50 \mu\text{g/ml}$ (1.0 OD'ye karşılık gelen çift iplikli standart DNA miktarı) $\times 17$ (seyreltme faktörü).

DNA miktarının yanında OD 260/280 oranları değerlendirildi. Değerlendirilen hasta örneklerinin hepsinde bu oranın 1.75-2.0 arasında değiştiği gözlemlendi. Bu oran, DNA kalitesinin moleküler çalışmalar için uygun olduğu anlamına gelmektedir.

Elde edilen DNA'nın bütünlüğü agaroz jel elektroforezi sisteminde örneklerin yürütülmesi ile test edildi. Elde edilen 2µl (100ng) DNA molekülü %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Moleküler biyolojide kullanılan agarozdan 1 gr. Tartılarak 100µl 10xTBE tamponunda magnetik karıştırıcıda boncuklar kullanılarak karıştırıldı. Bu karışım mikrodalgada eritildi. Magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak 60°C'ye kadar soğutuldu. Üzerine 10µg/ml konsantrasyonlu Etidyum Bromür solüsyonundan 10µl ilave edilip karıştırıldı. Bu agaroz solüsyonu önceden hazırlanmış elektroforez tankının taraklar yerleştirilmiş, kamerasına döküldü ve sertleşinceye kadar beklendi. Üzerine 1xTBE tamponu eklendikten sonra taraklar çıkartıldı. 2µl DNA ve 2µl Orange G karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez 100mV, 80mA koşullarında kullanılarak 30-40 dakika arasında uygulandı. Jeldeki DNA ultraviyolede, baz çift sayısı bilinen standart olarak kullanılan DNA markerı (Hae III, Fermentas) ile karşılıklı olarak görüntülendi. Kontrol edilen bu DNA'dan tüm genotipleme reaksiyonları yapıldı.

3.3.4. PCR Amplifikasyonu :

3.3.4.1. Amplifikasyonda Kullanılacak Primerlerin Seçimi:

Kullanılacak primerler, yapılan literatür taraması sonucuna göre belirlendi (Tablo 2). Liyofilize halde gelen primerler 10 pmol / µl konsantrasyonda olacak şekilde ddH₂O ile çözüldü.

3.3.4.2. Uygulanan PCR Protokolü:

PCR reaksiyonunda yer alan bütün bileşenler (PCR tamponu, dNTP, Primerler, Taq DNA Polimeraz) ve PCR siklus sıcaklık profilleri tek tek kontrol edilerek standardizasyonları yapıldı. Sonuçta PCR reaksiyonunda kullanılan karışım aşağıdaki miktar ve konsantrasyonlarda hazırlandı (Tablo 3).

Tablo 2. Kullanılan Primerler.

<p>PON 2 Cys-Ser (311): (Fragman büyüklüğü : 262 bp)</p> <p>FORWARD: 5'-ACA TGC ATG TAC GGT GGT CTT ATA- 3';</p> <p>REVERSE : 5'-AGC AAT TCA TAG ATT AAT TGT TA-3'</p> <p>PON 3 971 G- A: (Fragman büyüklüğü : 238 bp)</p> <p>FORWARD: TCC TAG AAT GTT TGG GAA GG</p> <p>REVERSE: CTA GAA CTC ACA GTA CAG AGT</p>

Tablo 3. 50 µl hacim içerisinde gerçekleştirilen PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları.

Kullanılan Madde	Cys-Ser (311)	971 G- A
ddH ₂ O	Tamamlayacak kadar	Tamamlayacak kadar
10xPCR tamponu	5 µl	5 µl
dNTP karışımı	200µM	200µM
Primer	0,3 µM	0,3 µM
Taq DNA Pol.	1,25 ünite	1,25 ünite
Kalıp	2.0 µl	2.0 µl

Thermal Cycler’da tabloda gösterilen PCR sıcaklık profili (Tablo 4) kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 4 Kullanılan PCR Sıcaklık Profili

94°C	4 dakika	30 Çevrim
94°C	1 dakika	
50°C	1,5 dakika	
72°C	2 dakika	
72°C	10 dakika	

3.3.5. PCR Ürünlerinin Elektroferezde Değerlendirilmesi:

Elektroferezde Kullanılan Solüsyonlar:

- Etidyum Bromid Stok Solüsyonu : (Moleküler analiz için 20 mg / ml konsantrasyonda)

200 mg etidyum bromid çeker ocak içerisinde tartılarak 10 ml ddH₂O’da çözüldü.

- 10 x TBE (Agaroz Jel Elektroferezi için) :

108 gr Trizma baz (0.04 M)

55 gr Borik Asit

40 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0)

ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

- 0.5 M EDTA

186.1gr disodyum EDTA (2 sulu) ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı. PH'ı 10 M NaOH ile 8.0 ayarlandı. (Not:EDTA pH :8.0'da çözülür.)

Elde edilen 2 µ l (100ng) DNA molekülü %1'lik Agaroz jelde elektroforeze tabii tutuldu. Moleküler Biyolojide kullanılan Agarozdan 1gr. tartılarak 100 µl 10XTBE tamponunda magnetic karıştırıcıda boncuklar kullanılarak karıştırıldı. Bu karışım mikrodalga fırınında eritildi. Magnetic karıştırıcı üzerinde karıştırılarak 60 °C kadar soğutuldu. Üzerine 10 µg/ml konsantrasyonlu Etidyum Bromür solüsyonundan 10 µl ilave edilip karıştırıldı. Önceden hazırlanmış elektroforez tankına taraklar yerleştirildi ve bu agaroz solüsyonu kamerasına döküldü, sertleşinceye kadar bekletildi. Üzerine 1XTBE tamponu eklendikten sonra taraklar çıkarıldı. 2µl DNA ve 2 µl Orange G karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez 100mV, 80 mA koşullarında kullanılarak 30-40 dakika arasında uygulandı.

Jeldeki DNA ultraviyolede, baz çift sayısı bilinen standart olarak kullanılan DNA markerı (Hae III,Fermentas) ile karşılıklı olarak görüntülendi. Kontrol edilen bu DNA'dan tüm genotipleme reaksiyonları yapıldı.

3.3.6. RE Kesimi ile Polimorfizmlerin Saptanması:

PCR ürünü saptanmış örneklerde RE kesimi yapıldı. Cys-Ser (311) polimorfizmi için Dde I kısıtlayıcı enzimi (RE) kullanıldı. Bu kesim 10 µl. PCR örneğine uygulandı. 1 µl. enzim kullanıldı. 37°C'de 5 saat TM programında kesim yapıldı. %3'lük nusieve jelde ;

SS → 120 bp + 75 bp + 65 bp

SC → 140 bp + 120 bp + 75 bp + 65 bp

CC → 140 bp + 120 bp

olarak okuma yapıldı.

971 G- A polimorfizmi için Hinf I RE kullanıldı. Bu kesim 17 µl. PCR örneğine uygulandı. 1 µl.enzim kullanıldı. 37°C'de 3 saat TM programında kesim yapıldı. %3'lük nusieve jelde ;

GG → 238 bp

GA → 238 bp + 143 bp + 95 bp

AA → 143 bp + 95 bp

olarak okuma yapıldı.

RE kesim yöntemi uygulanan PCR ürünleri, 2.5 µl. Orange G ve 5 µl.enzim kesimi alınarak jele yükleme yapıldı. UV'de belirlenen baz çiftleri değerlendirildi.

3.3.7. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel incelemeler SPSS 10.0 sürümü kullanılarak gerçekleştirildi. Değişkenler, ortalama ± SD olarak ifade edildi. P değeri ≤ 0.05 olanlar anlamlı olarak değerlendirildi. Univaryans analizler, χ^2 testi, odds ratio (OR) ve Mann Whitney U testi ullanılarak hesaplandı. Genotip dağılımı için Hardy-Weinberg eşitliği ki-kare testi ile belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular:

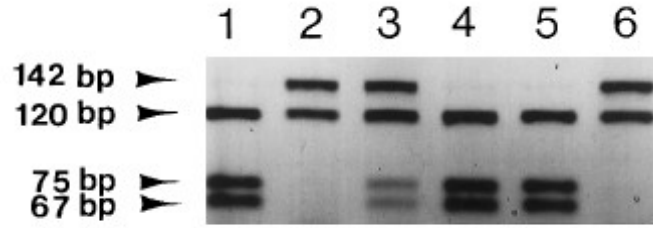
Çalışma grubu 159 prematür KAH ve 113 kontrol grubundan oluşmaktadır. Hastaların ve kontrollerin klinik özellikleri Tablo 5’de gösterilmiştir. Hasta (%76.7) ve kontrol grubunun (%83.2) büyük çoğunluğu erkeklerden oluşmaktadır. Hastalarda, DM (%34.5), KAH aile öyküsü (%34.6), hipertansiyon (%33.3) ve sigara içme alışkanlığı (%60.4) kontrollerden daha fazlaydı.

Tablo 5. Hasta ve kontrollerin demografik özellikleri ve risk faktörlerinin dağılımı.

	Hasta (n=159)	Kontrol (n=113)
Yaş (yıl)	47.3±8.1	43.4±5.4
Erkek/kadın	(%76.7/ %23.3)	(%83.2/%16. 8)
VKİ (kg/m ²)	25.9±2.6	24.3±2.4
Diabetes mellitus	39 (%34.5)	4 (%3.5)
KAH aile öyküsü	55 (%34.6)	11 (%9.7)
Hipertansiyon	53 (%33.3)	12 (%10.6)
Sigara içme alışkanlığı (≥5/gün)	96 (%60.4)	34 (%30.1)
Total kolesterol (mg/dl)	201.8±35.2	169.6±21.4
HDL kolesterol (mg/dl)	43.2±5.3	46.7±4.1
LDL kolesterol (mg/dl)	129.7±22.4	119.5±24.3
Trigliserid (mg/dl)	177.9±68.8	158.6±44.7

4.1.1. PCR Amplifikasyon Ürünlerinin Elde Edilmesi:

PCR reaksiyonları sonrasında PON 2 genindeki Cys-Ser (311): polimorfizmi için 262 bp'lık PON 3 genindeki G971A polimorfizmi için 238 bp'lık amplifikasyon ürünleri elde edildi.



1,4,5 – SS genotipleri

2,6 - CC genotipleri

3 - SC genotipi

4.1.2. Re Kesimi İle Mutasyon Taranması:

Tablo 6: Polimorfizmler ve RE Kesimi.

Gen	pozisyon	a.a. değişikliği	RE Bölgesi Değişikliği	bp değişikliği	Parça Büyüklüğü	Tanı Parçası (bp)
PON 2	311	Cys→ Ser	Dde I Bölgesi Oluşur.	G ² →C	262 bp	142, 75, 65
PON 3	324	Gly→ Asp	Hinf I Bölgesi Oluşur.	G ² →A	238 bp	243, 95

PON2-S311C polimorfizmi için incelenen 262 bp'lık amplifikasyon ürünlerini Dde I RE ile muameleye tabi tuttuğumuzda, S aleli açısından homozigot olan bireylerde 120, 75 ve 65 bp büyüklüğünde üç bant; C aleli

açısından homozigot olan bireylerde 142 ve 120 bp'lık iki bant; SC heterozigot bireylerde ise 142, 120, 75 ve 65 bp büyüklüğünde dört bant elde edildi (Şekil 1).

PON3-G324D polimorfizmi için incelenen 238 bp'lık amplifikasyon ürünlerin Hinf I RE ile muameleye tabi tuttuğumuzda, G aleli açısından homozigot olan bireylerde 238 bp büyüklüğünde tek bir bant; D aleli açısından homozigot olan bireylerde 243 ve 95 bp'lık iki bant; GD heterozigot bireylerde ise 238, 243 ve 95 bp büyüklüğünde üç bant elde edildi (Şekil 1).

4.1.3. PON2 ve PON3 Genotip Analizi:

Elde edilen sonuçlara göre aile öyküsü, hipertansiyon, diabetes mellitus, sigara, aşırı kilo, total kolesterol ve LDL kolesterol KAH riskini arttıran faktörlerdir ($p<0.05$) (Tablo 7).

Hasta ve kontrollere ait PON2-S311C ve PON3-G324D genotipleri ve frekansları tablo 8'de gösterilmektedir. Buna göre, hastalarda PON2-S311C bölgesinde S homozigotların oranı % 73.0, C homozigotların oranı % 1.9, SC heterozigotların ise % 25.1 iken; PON3-G324D bölgesinde G homozigotların oranı % 98.7, D homozigotların oranı % 0 ve GD heterozigotlar % 1.3 olarak saptandı. PON2-S311C ($X^2= 2.735$, $p= 0.255$) ve PON3-G324D ($X^2= 1.432$, $p= 0.231$) genotipleri ve frekansları ile KAH arasında yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir ilişkinin olmadığı saptanmıştır.

Tablo 7. Kardiyovasküler risk faktörleri ve KAH

	χ^2 test	p
Aile öyküsü	22,209	0.001
Hipertansiyon	18,739	0.001
Diabetes Mellitus	13,816	0.001
Sigara	24,287	0.001
BMI (kg/m ²)	15.154	0.041
Total kolesterol	12.117	0.021
LDL kolesterol	8.219	0.012
HDL kolesterol	19.015	0.086

Tablo 8. PON 2 ve PON 3 genotip dağılımı.

	Hasta (n=159)	Kontrol (n=113)	χ^2 test
PON2-S311C			
SS	116 (% 73.0)	96 (% 84.9)	X ² = 0.735 p= 0.255
SC	40 (% 25.1)	17 (% 15.1)	
CC	3 (% 1.9)	0 (% 0)	
S/C frekansı	0,855/0,145	0,924/0,076	
PON3-G324D			
GG	157 (% 98.7)	113 (% 100)	X ² = 1.432 p= 0.231
GD	2 (% 1.3)	0 (% 0)	
DD	0 (% 0)	0 (% 0)	
G/D frekansı	0,993/0,007	1,0/0,0	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gelişmiş ülkelerde bütün ölümlerin en az yarısı kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle olmaktadır. Bunlarında $\frac{3}{4}$ 'ü aterosklerotik koroner arter hastalığına bağlıdır. Kırk yaş ve sonrası ölüm nedenlerinin başında KAH bulunmaktadır (3). Epidemiyolojik çalışmalar sonucunda KAH üzerinde etkili birçok risk faktörü olduğu saptanmıştır. Bu risk faktörlerinden biri olan düşük HDL seviyesi en önemli faktör olarak öne çıkmaktadır (70). HDL'deki %1'lik bir azalma, KAH riskini %2-3 oranında artırır (71). KAH'ın risk faktörleri arasında çevresel faktörlerin yanında çok sayıda gen rol oynar. Son yıllarda yapılan çalışmalar, lipid metabolizmasında rol oynayan genlerdeki ortak polimorfizmlerin, plazma lipoprotein seviyeleriyle ilişkisini belirlemeye odaklanmıştır. Yakın zamanlarda lipid metabolizmasına katılmayan ancak aterosklerotik lezyonların gelişmesinde rol oynayan paraoksonaz (PON) gibi ek genler tanımlanmıştır. PON'un ateroskleroz ile ilişkisinin, HDL'nin antiaterojenik özelliklerindeki rolünden dolayı olduğu düşünülmektedir. (25, 26). Kompleks ve heterojen bir yapı gösteren HDL dolaşımdaki birçok molekülle etkileşim halindedir. HDL'nin en iyi bilinen anti-aterojenik özelliği ters kolesterol yolundaki lipid taşıyıcı rolüdür. Diğer anti-aterojenik etkisini LDL'nin oksidatif modifikasyonu inhibe ederek gösterir. LDL'nin oksidatif modifikasyonu, damar duvarlarında kolesterol ve oksisterol birikiminin eşlik ettiği erken ateroskleroz evresinde ve lezyonların gelişiminde çok önemli bir anahtar faktör olup, okside lipidlerin ateroskleroz ile ilişkisi bir çok çalışma ile gösterilmiştir (72, 73, 74, 75).

İnsan serum paraoksonazları, HDL'nin içerdiği apo A-I ile yakın ilişkili, lipid peroksidasyon ürünlerinin birikmesini azaltan, diğer bir deyişle LDL'deki okside olmuş lipidleri hidrolize eden, antioksidan etkili, enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlı bir esterazdır. (39). LDL-kolesterol ve oksidatif türevlerinin endotelyuma zarar vermekte, HDL ise LDL'nin oksidatif değişimini önlemektedir. HDL ile ilgili antioksidan aktivitesinin, enzimlerinde özellikle paraoksonazda bulunduğu inanılmaktadır. PON1'in lipid peroksidlerinin birikmesini engelleyerek LDL'yi oksidatif değişime karşı koruduğu bilinmektedir (76, 77, 78). Mackness ve ark., paraoksonaz aktivitesinin çoğunlukla apo AI

içeren partiküllerde HDL ile birlikte bulunduğunu ortaya çıkarmışlar ve enzimin kanda HDL yapısında taşındığını göstermişlerdir. Aynı grup 1988'de yaptıkları çalışmalarla, PON'un HDL üzerinde apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında da LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır (35). Shih ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise, serum PON1'den yoksun farelerin oksidatif stres ve ateroskleroza karşı hassas oldukları incelenmiştir. Ayrıca bazı inhibitörlerin kullanılmasının da PON1'in HDL oksidasyonunu önlemede rolü olduğu gösterilmiştir. LDL oksidasyonunu önleyen mekanizmalar antiaterojenik olduğundan HDL'ye bağlı PON1 lipid peroksitlere karşı bir engel oluşturur. Yapılan bir çok çalışmada HDL'nin LDL oksidasyonunu inhibe ederek KAH riskine karşı koruma sağladığı ileri sürülmüştür (79).

Serum paraoksonaz enzimi HDL'ye bağlı bir enzim olarak HDL'nin antioksidatif özelliğinden sorumludur. PON, HDL'de apolipoprotein (apo) A-I and apoJ'ye bağlı olarak bulunan, 43-kDa büyüklüğünde, kalsiyum-bağımlı 354 amino asitten oluşan bir enzimdir (80, 81). PON1 normal arter duvarında da bulunmakta ve aterosklerotik süreçte konsantrasyonları giderek artmaktadır. Aviram ve ark.larının yaptığı bir çalışmada PON1'in, koroner arter ya da karotisten alınan aterosklerotik lezyonlarda okside olmuş lipidleri azaltma kapasitesine sahip oldukları gösterilmiştir (82). Yapılan çeşitli çalışmalar, paraoksanaz genleri üzerindeki polimorfizmlerin birçok hastalık üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Serum PON1 aktivitesinin KAH hastalarında, MI veya kalıtsal hiperkolesterolemi hastalarında, analfalipoproteinemiazlarda ve diyabet hastalarında daha düşük olduğu bulunmuştur (51). PON2 ile yapılan çalışmalarda, pozisyon 148'deki A→G polimorfizminin total serum konsantrasyonu, glisemik kontrol ve tip2 diyabetli kişilerde nefropatinin varlığı ile ilişkili bulunmuştur. C/S 311 polimorfizmi de tip2 diyabetli hastalarda glisemik kontrol ile ilişkilendirilmiştir. PON2 polimorfizmlerinin, plazma lipoprotein seviyeleri ve kalp hastalığı riski ile oldukça yakından ilişkili olduğu (55) ve Alzheimer hastalığı riskini önemli derecede artırdığı bulunmuştur (42). Campo ve ark.'ları İtalya'da 1143 kişi üzerinde yaptıkları çalışmada PON3 üzerinde oluşan 5 polimorfizm tespit etmişlerdir.

Chen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada PON2, kodon 311 polimorfizm frekansının hasta grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur (%15.22, %4.61; P=018) (65). C. Motti ve arkadaşları, paraoksonaz gen ailesi polimorfizmleri üzerinde yaptıkları çalışmadaki bulgularına dayanarak, PON2 S→C 311 polimorfizminin koroner arter hastalığı üzerinde, yalnız başına ya da PON1 192 polimorfizmi ile birlikte etkili olduğunu söylemişlerdir (66). Wang ve arkadaşlarının Çin Han populasyonunda, koroner arter hastalığı ve PON gen ailesi polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi incelediği çalışmada ise, PON2 S311C polimorfizmi ile KAH arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı bulunmuştur. (67). Benzer olarak Robertson ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada PON2 S311C polimorfizmi ile KAH arasında bir bağlantı gösterilmiş fakat PON3 için herhangi bir polimorfizmin KAH ile etkileşimine rastlanamamıştır (68). Bu bulgular, Sanghera ve arkadaşları ile Mackness ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarla uyumludur (53).

Bunların yanında, Mansur ve arkadaşlarının KAH'lı 130 kadın hasta üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda, PON2 S311C polimorfizmi ve KAH arasında herhangi bir ilişki gösterilememiştir (69). Benzer biçimde, Wheeler et al. ve Qi Chen et al. çalışmalarında bu polimorfizm ve KAH arasında anlamlı bir bağlantı bulmamışlardır (70).

Sonuç olarak bu çalışmada, PON2-S311C ve PON3-G324D polimorfizmleri ile KAH arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı saptanmıştır. PON2-S311C ve PON3-G324D polimorfizmleri toplumumuzda ilk kez bu çalışma ile incelenmiş olup KAH ile bu polimorfizmler arasında bir ilişkinin varlığı ileri araştırmaların konusu olmalıdır. Yine, bu çalışmada saptanan PON3-G324D polimorfizminde D alel frekansının % 1.3 gibi bir düzeyde saptanmasının ileri incelemeler ile araştırılması, toplumumuzda bu konudaki bilgi birikimine büyük destek sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. William W, Parmley MD: Nonlipoprotein risk factors for coronary heart disease: evaluation and manangement. Am J Med 1997;102:7-14.
2. Sonel A., Kardiyoloji, Türk Tarih Kurumu Basımevi, Ankara,1979.
3. Gök H. (Ed) Klinik Kardiyoloji: Selçuk Ünv. Tıp Fak. Kardiyoloji A.B.D., Nobel Tıp Kitabevi: İstanbul, (2002).
4. Kalp ve Damar Hastalıkları, Atlan Onat, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. İç Hastalıkları
5. P. Cullen, H. Funke, H. Schulte, G. Assmann. Lipoprotein and cardiovascular risk-from genetics to CHD prevention, European Heart Journal 1998;19: C5-C11
6. Mc Ewan S. R. et al, Measurement and Manegment of Cardiovascular Risk Factors- Is Screening Worthwhile? Scot Med J., 1983; 38: 173-177.
7. Patoloji, Ömer Uluoğlu, Güneş Kitabevi, Ankara (1990).
8. Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK: Molecular biology of aerosclerosis. International Journal of Cardiology 1997;62:23-29.
9. Mahley RW: Aterogenezin Hücresel ve moleküler biyolojisi, kolesterol taşınması ve lipoprotein metabolizması (çev: Gökdemir O, Palaoğlu KE) Merck Sharp ve Dohme İlaçları A.Ş. İstanbul, 1993.
10. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW,,: Multible genetic determinations of variant of plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995a;15.861-871.
11. Nagano M, Yamashita S, Hirano K, Takano M, Maruyama T, Ishihara M, Sagehashi Y, Kujiraoka T, Tanaka K, Hattori H, Sakai N, Nakajima N, Egashira T, Matsuzawa Y. Molecular mechanisms of cholesteryl ester transfer protein deficiency in Japanese. J Atheroscler Thromb. 2004; 11(3): 110-21
12. Sankaranarayanan K, Chakraborty R, Boerwinkle EA. Ionizing radiation and genetic risks. VI. Chronic multifactorial diseases: a review of epidemiological and genetical aspects of coronary heart disease, essential hypertension and diabetes mellitus. Mutat Res. 1999 Jan;436(1):21-57.

13. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 2004 Jul 20;141(2):137-47.
14. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schoutrn EG, MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA.* 2002 Oct 23-30;288(16):2023-31.
15. Pirola CJ. Molecular genetics of essential hypertension. Susceptibility and resistance genes. *Medicina (B Aires).* 2000;60(1):59-66.
16. Berg K. Molecular biology in the diagnosis of cardiovascular diseases. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1998 Jun 10;118(15):2370-4.
17. Kim JQ, Song J, Park YB, Hong SH. Molecular bases of coronary heart disease in Koreans. *J Korean Med Sci.* 1998 Feb;13(1):1-15.
18. Horibe H, Yamada Y, Ichihara S, Watarai M, Yanase M, Takemoto K, Shimizu S, Izawa H, Takatsu F, Yokota M: Genetic risk for restenosis after coronary balloon angioplasty. *Atherosclerosis* 2004;174:181–187
19. Temel ve Klinik Biyokimya, Uz. Dr. Çiğdem Kolonel, Nobel Tıp Kitabevleri.
20. Medical Biochemistry, N. V. Bhavagan.
21. Lipoprotein Physiology, Henry N. Ginsberg, MD. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 1998;27:3.
22. Harper'in Biyokimyaya Bakışı D. W. Martin Jr., P. A. Mayes, V. W. Rodwell, Lange Tıpsal Yayınlar.
23. Jonathan R, Swanson BS, Thomas A, Pearson MD: Screening family members at high risk for coronary disease. *Am J Prev Med* 2001;20:1.
24. Hegele-JmolMed- Robert A. Hegele, T. Kue Young, Philip W. Connelly. Are Canadian Inuit At increased genetic risk for coronary heart disease? *Hiperlipidemi El Kitabı*, G. R. Thompson (London) (MSD).
25. Chapman MJ, Guerin M, Bruckert E. Atherogenic Dense Low-Density Lipoproteins Pathophysiology and New Therapeutic Approaches. *European Heart Journal*, 1998 19; (Supplement A), A24-A30.
26. Oram JF: Receptor Mediated Transport of Cholesterol Between Cultured Cells and High Density Lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986;423:57-60.

27. Hegele RA: Paraoxonase Genes and Disease. *Ann Med* 1999;31:217-224.
28. Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre TM, La Du BN, Fogelman M, Berliner JA: Effect of platelet activating factor- acetylhydrolase on the production and activity of mildly oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;95:774-782.
29. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, Kukkis A, Connelly PW: Multiple substrates for paraoxonase-1 during oxidation of phosphatidylethanolamine by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:391-396.
30. Aviram M, Rosenblat M, Bilskaier CL, Newton RS, Primo-Paro SL, La Du BN: Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998b;101:1581-1590.
31. Ginsberg HN: Lipoprotein Physiology. *Endo. Meta Clin North America* 1998;27:503-519.
32. Tall AR: An overview of reverse cholesterol transport. *European Heart Journal* 1998;19:31-35.
33. Mackness MI, Durrington PN: HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995;115:243-253.
34. Cullen P, Funke H, Schulte H, Assmann G: Lipoproteins and cardiovascular risk-from genetics to CHD prevention. *European Heart Journal* 1998;19:5-11.
35. Austin MA, Breslov JL, Hennekens CH et al: Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988;260:1917-1921.
36. Fruchart JC, Ailhaud G, Bard JM: Heterogeneity of high density lipoprotein particles. *Circulations* 1993;87:22-27.
37. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs Jr. DR, Bangdiwala S, Tyroler HA: High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four protective American studies. *Circulation* 1989;79:8-15.

38. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE: The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996;14:334-336.
39. Erden İ: St Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (Stemi) Hastalarda İnsan Paraoksanaz geni Met-Leu/55 Polimorfizmi. İstanbul/2004.
40. Austin MA, Breslov JL, Hennekens CH et al: Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988;260:1917-1921.
41. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly P and Hegelle RA: Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:69-76.
42. Shi J, Zhang S, Tang M, Liu X, Li T, Han H, Wang Y, Guo Y, Zao J, Li H, Ma C: Possible association between Cys311Ser polymorphism of paraoxanase 2 gene and late-onset Alzheimer's disease in Chinese. *Molecular Brain Research* 2004;120: 201-204
43. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE: The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73-76.
44. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN: The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996;33:498-507
45. Campo S, Sardo AM, Campo GM, Avenoso A, Castaldo M, D'Ascola A, Guinta E, Calatroni A, Saitta A: Identification of paraoxonase 3 gene (PON3) missense mutations in a population of southern Italy. *Mutation Research* 2004;546:75-80.
46. Aviram M, Rasenblat M: Paraoxonase 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage FOAM cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 0891-5849.
47. Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, Cohen N, Morabia A, Passa P, Froguel P: Gin-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995;346:869-872.

48. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI: DNA polymorphism in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998a;62:36-44.
49. Zama T, et al: A 192Arg variant of human paraoxonase gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3565-3569.
50. Sanghera DK, et al: The codon polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associated with the risk for coronary heart disease in Asian Indians and Chinese. *Atherosclerosis* 1998b;136:217-223.
51. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI: Genetic polymorphism of paraoxonase and risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997;17:1067-1073.
52. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN: Molecular Basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet.* 1993;52:598-608.
53. Furlong CE, Costa LG, Hassett C, Richter RJ, Sundstorm JA, Adler DA, Disteché CM, Omiencinski CJ, Chapline C, Cebbjw, Humbert R: Human and rabbit paraoxonases: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification. *Chem Biol Interact* 1993;87:35-48.
54. Mackness B, Durrington PN, Mackness M: The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:357-362.
55. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM: Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids.
56. Bargota RS, Akhtar M, Biggadike K, Gania D, Allemanna RK: Structure–Activity Relationship on Human Serum Paraoxonase (PON1) Using Substrate Analogues and Inhibitors *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003;13:1623–162.

57. Willnow HJ: Lipoprotein and reseptor interactions in vivo. *Curr Opin Lipidol.* 1995;6:97-103.
58. Aviram M: Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stres and cardiovascular disease. *Free Radical Bİology & Medicine* 2004;7863:3.
59. Tobina MD, Braundb PS, Burtona PR, Thompson JR, Steeds R, Channer K, Cheng S, Lindpaintner K, Nilesh J: Genotypes and haplotypes predisposing to myocardial infarction: a multilocus case-control study *European Heart Journal* (2004) 25, 459–467.
60. Humbert, R. , D.A. Adler , C.M. Disteché , C. Hassett , C.J. Omiecinski and C.E. Furlong () The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genet* 1993; 3: 73-76
61. Blatter M-C, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of high density lipoprotein subspecies defined by a lipoproteinassociated protein, k-45. *Eur J Biochem.* 1993;211:871-879
62. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Nutr* 2000;71:1062-1076.
63. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billeck SS, La Du BN: Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000;275:1335-1342.
64. Pan JP, Lai ST, Chaing SC, Chou SC, Chaing AN: The risk of coronary artery disease in population of Taiwan is associated with Cys-Ser 311 polymorphism of human paraoxonase (PON) 2 gene. *Zonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 2002;65(9):415-421.
65. Ng CJ, Shih DM, Susan YH, Villa N, Navab M, Reddy ST: The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Biology& Medicine* 2005;38:153-163.

66. Chen Q, Reis SE, Kammerer CM, McNamara DM, Holubkov R, Sharaf BL, Sopko G, Pauly DF, Merz CN, Kamboh MI: Association between severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the national heart, lung and blood institute-sponsored women's ischemia syndrome evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet* 2002;26:72(1).
67. Motti C, Dessi M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB, Bernardini S, Fucci G, Federici G, Cortese C: A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis* 2001;158:35-40.
68. Wang X, Fan Z, Huang J, Su S, Yu Q, Zhao J, Hui R, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Gu D: Extensive association analysis between polymorphism of PON gene cluster with coronary heart disease in Chinese Han population.
69. Robertson KS, Hawe E, Miller GJ, Talmud PJ, Humphries: Human paraoxonase gene cluster polymorphisms as predictors of coronary heart disease risk in the prospective Northwick Park Heart Study II. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003;1639:203-212.
70. A.P. Mansur, SA Oliveria, SD Avakian, LAM. Cesar, JAF. Ramires, JM. Annichino-Bizzacchi: Paraoxonase 2 ala148gly mutation protects postmenopausal women from coronary artery disease,
71. G. Wheeler, Bernard D. Keavney, Hugh Watkins, Rory Collins, John Danesh: Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *The Lancet* 2004;28:363.
72. Navab M et al. The vinyl and vinylic oxidation in the development of the fatty streak: a review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:831-842.
73. Aviram M: Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today* 1999; 5: 381-386.
74. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, et al. Coronary atherosclerosis: a multifactorial disease *Circulation*. 1993;87(suppl 3):II-3-II-16.

75. Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest.* 1989;84:1086–1095.
76. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W and Durrington PN: Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998; 423: 57-60.
77. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Erogul J, Hsu C, Dunlop C and La Du B: Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase / paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998a;18: 1617-1624.
78. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, et al. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993;104:129–135.
79. Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis.* 1995;115:243–253.
80. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F and Pometta D: Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 1993; 211: 871-879.
81. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony AK. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry.* 1994;33:832-839.
82. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Hoffman A,: human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000; 101: 2510-2517.