



**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇÖZÜNÜR EPOKSİT HİDROLAZ GENİ (*EPHX2*) PROMOTOR
BÖLGE METİLASYON DÜZEYİ VE K55R POLİMORFİZM SIKLIĞI
İLE PREEKLAMPSİ HASTALIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
BELİRLENMESİ**

İSMAİL SARI

**DOKTORA TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

SİVAS-2015

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇÖZÜNÜR EPOKSİT HİDROLAZ GENİ (*EPHX2*) PROMOTOR
BÖLGE METİLASYON DÜZEYİ VE K55R POLİMORFİZM SIKLIĞI
İLE PREEKLAMPSİ HASTALIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
BELİRLENMESİ**

İSMAİL SARI

**DOKTORA TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

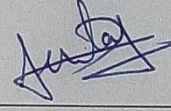
**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hatice PINARBAŞI**

SİVAS-2015

“Çözünür Epoksit Hidrolaz Geni (EPHX2) Promotor Bölge Metilasyon Düzeyi ve K55R Polimorfizm Sıklığı ile Preeklampsi Hastalığı Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi” adlı Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

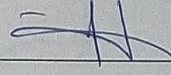
Başkan

Prof. Dr. Sevtap BAKIR



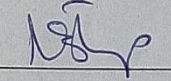
Üye (Danışman)

Prof. Dr. Hatice PINARBAŞI



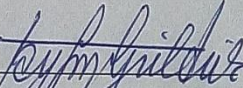
Üye

Prof. Dr. Nursevin ÖZTOP



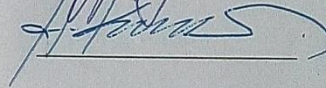
Üye

Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR



Üye

Yard. Doç. Dr. Hasan KILIÇGÜN



ONAY

Bu tez çalışması, ..02..04..2015. tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali ÇELİKSÖZ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi senatosunun 24.09.2008 tarih ve 007 sayılı kararına göre kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü tez yazım kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır. Bu tez çalışması, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No. T-571)

Çalışmalarım sırasında bana destek olan sevgili ailem ve tüm arkadaşlarıma...

ÖZET

ÇÖZÜNÜR EPOKSİT HİDROLAZ GENİ (*EPHX2*) PROMOTOR BÖLGE METİLASYON DÜZEYİ VE K55R POLİMORFİZM SIKLIĞI İLE PREEKLAMPSİ HASTALIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ

İsmail SARI

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hatice PINARBAŞI
2015, 74 Sayfa

Preeklampsi, 20. gebelik haftasından sonra yeni başlangıçlı hipertansiyon ve proteinüri veya son organ hasarı ile karakterize çok faktörlü bir hastalıktır. Maternal, fetal mortalite ve morbiditenin en önde gelen nedenlerinden biridir ve etiyolojisi henüz anlaşılmamıştır. Çözünür epoksit hidrolaz (çEH), epoksieikozatrienoik asitlerin (EET) daha az biyoaktif olan diollerine dönüşümü metabolizmasında yer alır. Bu çalışmada K55R polimorfizmi ve *EPHX2* promotor bölge metilasyon düzeyleri ile preeklampsi arasındaki ilişki 260 preeklampsi hastası ve 260 sağlıklı hamile kadının dahil olduğu 520 bireyde incelendi.

K55R polimorfizmi ve *EPHX2* promotor metilasyon düzeyleri sırasıyla “*Real time PCR*” ile çift boyalı hidroliz propları kullanılarak ve “*methylation-sensitive high resolution melting*” analizi ile belirlendi.

K55R polimorfizmi vakalarda (% 28.1) kontrollere (%17.3) göre anlamlı olarak daha yüksekti ve artan preeklampsi riski ile ilişkiliydi (OR: 1.86; % 95 CI: 1.09-2.63). *EPHX2* promotor bölge metilasyon düzeyleri vakalarda kontrollere göre anlamlı olarak daha düşüktü. *EPHX2* geni promotor metilasyon düzeyi % 25’ in altındakilerin sıklığı preeklampitik hastalarda % 81.2 ve kontrol grubunda % 73.8 iken, metilasyon düzeyi % 50’ nin üzerinde olanların vaka ve kontrol grubunda sıklığı sırası ile % 12.7 ve % 6.5 idi. *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyi % 25’ in altında olan gebe kadınlarda 2.83 kat artan preeklampsi riski gözlemlendi (OR: 2.83; % 95 CI: 1.15-6.91).

Sonuç olarak, *EPHX2* geni promotor bölge hipometilasyonu ve K55R polimorfizmi anlamlı olarak artan preeklampsi riski ile ilişkili bulunmuştur. çEH enzimi EET moleküllerinin hızlı yıkımı yoluyla bu moleküllerin vazodilatatör, anti-hipertansif ve anti-inflamatuar özelliklerinin azalmasına katkıda bulunarak preeklampsi patogenezinde rol oynayabilir.

Anahtar kelimeler: Çözünür Epoksit Hidrolaz, Genetik Polimorfizm, Epoksieikozatrienoik asit, Metilasyon.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE K55R POLYMORPHISM AND METHYLATION LEVELS OF THE SOLUBLE EPOXIDE HYDROLASE GENE (*EPHX2*) IN PREECLAMPSIA

İsmail SARI

PhD Thesis, Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Hatice PINARBAŞI

2015, 74 Pages

Preeclampsia is a multifactorial disease characterized by new onset of hypertension and either proteinuria or end-organ dysfunction after 20 weeks of gestation. It is a leading cause of maternal and fetal mortality and morbidity and its etiology is not yet understood. Soluble epoxide hydrolase (sEH) is involved in metabolism of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) to their less bioactive corresponding diols. In this study the association between K55R polymorphism and methylation levels of the *EPHX2* promoter region and preeclampsia was investigated in 520 individuals including 260 preeclamptic patients and 260 healthy pregnant women.

K55R polymorphism and methylation levels of the *EPHX2* gene promoter were determined by the real time PCR using double-dye hydrolysis probes and methylation-sensitive high-resolution melting analysis, respectively.

The presence of the K55R polymorphism was significantly higher in cases (28.1 %) than controls (17.3 %), and was associated with increased risk of preeclampsia (OR:1.86; 95% CI: 1.09-2.63). Methylation levels of the *EPHX2* promoter region in cases were significantly lower than controls. The frequency of *EPHX2* promoter methylation levels of <25 % was 81.2 % in preeclamptic patients and 73.8 % in controls whereas methylation levels of >50 % were 2.7 % and 6.5 % in cases and controls, respectively. 2.83 times increased preeclampsia risk was observed in pregnant women with *EPHX2* promoter methylation levels of <25 % (OR: 2.83; 95 % CI: 1.15-6.91).

In conclusion, hypomethylation of the promoter region of the *EPHX2* gene and K55R polymorphism were associated with significant increased risk of preeclampsia. sEH enzyme may play a role in the pathogenesis of preeclampsia by contributing to reduction of the vasodilator, anti-hypertensive and anti-inflammatory effects of EETs by rapid degradation of these molecules.

Key words: Soluble epoxide hydrolase, Genetic polymorphism, Epoxyeicosatrienoic acid, Methylation.

TEŞEKKÜR

Tez çalışması boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, iyi bir rehber olan, danışman hocam sayın Prof. Dr. Hatice PINARBAŞI' na destek, sabır ve anlayışından dolayı teşekkür ederim.

Asistanlığım ve doktora eğitimim süresince bilgi birikimlerinden yararlandığım ve üzerimde çokça emekleri olan Biyokimya Anabilim Dalı' nın tüm öğretim üyelerine ve tüm çalışanlarına, çalışma grubunun oluşturulması sırasında katkı sunan Yrd. Doç. Dr. Özlem BOZOKLU AKKAR ve Yrd. Doç. Dr. Çağlar YILDIZ' a yürek dolusu teşekkür ederim. Ayrıca, istatistiksel analizlerim sırasında bana yol gösteren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR' a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Tüm hayatım ve eğitimim boyunca benden hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve bana olan güvenlerini daima hissettiğim, canım annem Hatice SARI, babam Hakan SARI ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim. Lisans eğitimimden itibaren tüm zor ve iyi günlerde yanımda olan, bana her konuda koşulsuz destek veren ve yanında olmaktan her zaman kıvanç ve onur duyduğum sevgili eşim Özge SARI' ye ve ona sarıldığımda her türlü sıkıntıyı unuttuğum oğlum Çağan Ege SARI' ye tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Preeklampsi	3
2.1.1 Preeklampsi Risk Faktörleri	3
2.1.2 Preeklampsi Etiyolojisi ve Patogenezi	4
2.2 Epoksitler	6
2.2.1 Epoksit Metabolizması	7
2.2.2 Araşidonik Asit Metabolizması ve EET' lerin Oluşumu	9
2.2.3 EET' lerin Etkileri	10
2.2.3.1 EET' lerin Vasküler Tonus Üzerine Etkileri ve Etki Mekanizmaları.....	11
2.2.3.2 EET' lerin Migrasyon, Proliferasyon ve Anjiyogenez Üzerine Olan Etkileri ve Etki Mekanizmaları.....	14
2.2.3.3 EET' lerin Anti-apoptotik Etkileri	17
2.2.3.4 EET' lerin Anti-inflamatuar Etkileri	17
2.2.3.5 EET' lerin PPAR-aracılı Genlerin Ekspresyonuna Etkileri.....	17
2.2.4 EET Metabolizması.....	18
2.2.4.1 Zincir Uzaması, β - ve ω -Oksidasyon.....	18
2.2.4.2 EET' lerin Glutasyon-S-Transferaz Enzimi Tarafından Konjugasyonu.....	19
2.2.4.3 EET' lerin COX Enzimleri Tarafından Metabolize Edilmesi	19
2.2.4.4 EET' lerin Hücre Lipitlerinin Yapısına Katılması.....	19
2.2.5 çEH Enzimi, Üç boyutlu Yapısı ve Substratları.....	19
2.2.6 çEH Enziminin İnhibisyonu	21
2.2.7 çEH Geni ve Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	23
2.2.8 çEH Enziminin Polimorfizmleri.....	24
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	27
3.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler	28
3.3 Hasta ve Kontrol Grubu	28

3.3.1 Hastalar.....	28
3.3.2 Kontroller	29
3.4 Kan Örneklerinin Toplanması.....	29
3.5 Kandan Genomik DNA İzolasyonu	29
3.5.1 Tam Kandan Genomik DNA İzolasyon Protokolü (“Spin” Protokol).....	29
1. Kan Örneğinin Lizisi	30
3.6 DNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi	31
3.7 Genotipleme	31
3.7.1 Örneklerin Hazırlanışı	31
3.7.2 <i>EPHX2</i> K55R Polimorfizminin Belirlenmesi	31
3.8 <i>EPHX2</i> Geni Promotor Bölge Metilasyon Analizi	32
3.8.1 Bisülfid Dönüşüm İşlemi	32
3.8.1.1 Bisülfid Dönüşümünde Kullanılan Çözeltiler	33
3.8.1.2 Deneyin Yapılışı	33
3.8.2.1 Elde Edilen PCR Ürünlerinin Özgüllüğünün Belirlenmesi.....	36
3.8.2.1.1 Agaroz Jel Elektroforezi.....	36
3.9 Plazmada 11, 12-DHET Düzeyinin Belirlenmesi.....	37
3.9.1 Plazma Örneklerinden 11, 12 DHET’ nin İzolasyonu	38
3.9.2 Plazma 11, 12 DHET Düzeyinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi	39
3.9.3 “11,12-DHET” Düzeylerinin Hesaplanması	40
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	41
5. BULGULAR.....	42
5.1 Preeklampsi Hastaları ve Kontrollerin <i>EPHX2</i> Geni K55R Polimorfizm Sıklığı Yönünden İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	44
5.2 MS-HRM Analizi ve İstatistiksel Değerlendirilme	47
5.3 “11,12-DHET” Düzeyleri	50
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
7. KAYNAKLAR	61
8. ÖZGEÇMİŞ.....	73
EK-1.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Epoksit molekülünün genel yapısı.....	6
Şekil 2.2 Epoksit hidrolaz enzimlerinin katalizledikleri tepkime.....	7
Şekil 2.3 Balşıca mikrozomal epoksit hidrolaz substratları.....	8
Şekil 2.4 Araşidonik asit ve EET metabolizması.....	10
Şekil 2.5 Çeşitli organlarda EET yapısal izomerleri tarafından kullanılan vasküler hücre sinyal iletim mekanizmalarının bir özeti.....	13
Şekil 2.6 Anjiyogenez ile sonuçlanan EET moleküllerinin hücre içi sinyal yolları.....	15
Şekil 2.7 EET metabolizmasının ana yolları.....	18
Şekil 2.8 çEH dimerinin kristal yapısı.....	20
Şekil 2.9 A: çEH enziminin başlıca substratları B: çEH enziminin fosfataz aktivitesinin başlıca substratları.....	21
Şekil 2.10 Başlıca çEH inhibitörleri.....	22
Şekil 3.1 EPHX2 geni promotor bölgesinin bir kısmını içeren, orijinal nükleotid dizisi ve bisülfid dönüşümü sonucu elde edilen dizi.....	35
Şekil 3.2 11, 12-DHET standart eğrisi.....	40
Şekil 5.1 Çözünür epoksit hidrolaz geni (EPHX2) K55R genetik varyantının RT-PCR ile allelik ayırımı.....	45
Şekil 5.2 Çalışma grubunda yer alan bazı örneklerle ait çözünür epoksit hidrolaz geni (EPHX2) promotor bölge amplifikasyon eğrileri.....	47
Şekil 5.3 EPHX2 promotor bölge metilasyon düzeyinin “Methylation-Sensitive High Resolution Melting” (MS-HRM) yöntemi ile tayini.....	48
Şekil 5.4 EPHX2 geni promotor bölge metilasyon düzeylerini belirlemek amacıyla elde edilen bazı PCR ürünlerinin erime eğrisi analizi.....	49
Şekil 5.5 EPHX2 geni promotor bölge metilasyon düzeylerini belirlemek amacıyla elde edilen bazı PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 PCR ortamının hazırlanışı.....	32
Çizelge 3.2 DNA Amplifikasyon programı.....	32
Çizelge 3.3 Bisülfıt dönüşümü tepkime bileşenleri.....	33
Çizelge 3.4 Bisülfıt dönüşümü termal döngü programı.....	34
Çizelge 3.5 PCR ortamının hazırlanışı.....	35
Çizelge 3.6 Metilasyon standartları ve karışım oranları.....	36
Çizelge 3.7 Amplifikasyon ve HRM analiz programı.....	36
Çizelge 5.1 Hasta ve kontrollere ait demografik özellikler.....	42
Çizelge 5.2 Hasta ve kontrollerin yaş grupları dağılımı yönünden analizi.....	43
Çizelge 5.3 Hasta ve kontrollerin sigara alışkanlığı yönünden analizi	44
Çizelge 5.4 Hasta ve kontrollerin ailede preeklampsi hikayesi yönünden analizi.....	44
Çizelge 5.5 <i>EPHX2</i> geni K55R polimorfizmi yönünden allel ve genotip sıklığı.....	46
Çizelge 5.6 Hasta ve kontrollerin <i>EPHX2</i> geni promotor bölge metilasyon düzeyi yönünden analizi.....	50
Çizelge 5.7 Hasta ve kontrol grubu 11,12-DHET düzeyleri.....	50
Çizelge 5.8 Hasta ve kontrol grubunda 11,12 DHET düzeyinin <i>EPHX2</i> geni K55R polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi.....	51
Çizelge 5.9 Hasta ve kontrol grubunda 11,12-DHET düzeyinin <i>EPHX2</i> geni promotor bölge metilasyon düzeyi yönünden değerlendirilmesi.....	51

KISALTMALAR DİZİNİ

AA	Araşidonik Asit
Ang II	Anjiotensin II
ARIC	Atherosclerosis Risk In Communities
ATF-6	Aktive Edici Transkripsiyon Faktör-6
BK _{Ca}	Ca ²⁺ -Aktive Büyük-Geçişli Potasyum Kanalları
COX	Siklooksijenaz
CREBP	cAMP Response Element Binding Protein
CYP450	Sitokrom p450
çEH	Çözünür Epoksit Hidrolaz
DHET	Dihidroksieikozatrienoik Asit
EDHF	Endotel Kaynaklı Hiperpolarize Edici Faktör
EET	Epoksieikozatrienoik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EH	Epoksit Hidrolaz
ELISA	Enzyme-Linked Immünosorbent Assay
<i>EPHX2</i>	İnsan Çözünür Epoksit Hidrolaz Geni
FABP	Yağ Asidi Bağlayıcı Protein
HETE	Hidroksieikozatetraenoik Asit
H-FABP	Kalp Yağ Asidi Bağlayıcı Protein
IK _{Ca}	Kalsiyum-Aktive Orta-Geçişli K ⁺ Kanalı
IL-8	İnterlökin-8
JNK	c-Jun NH2-Terminal Kinaz
K _{Ca}	Ca ²⁺ -Aktive Potasyum Kanalları
LOX	Lipooksijenaz
MAPK	Mitojen-Aktive Eden Protein Kinaz
MDBP	Metile DNA'ya Bağlanma Proteini
MeCP	Metile CpG'ye Bağlanma Proteinleri
mEH	Mikrozomal Epoksit Hidrolaz
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa b
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PI3K	Fosfatidil İnozitol-3-Kinaz
PKA	Protein Kinaz A
PPAR	Peroksisom Proliferatör Aktive Edici Reseptör
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SK-1	Sifingozin Kinaz-1
SK _{Ca}	Kalsiyum-Aktive Küçük-Geçişli K ⁺ Kanalı
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
Src-STAT-3	Signal Transducer and Activator Transcription-3
t-AUCB	trans-4-(4-(3-adamantan-1-il-üreido)-sikloheksiloksil)-benzoik asit
TPAU	1 triflorometoksifenil-3-(1-asetilpiperidin-4-il) üre
TRPV4	Vallinoid Type 4 Transient Receptor Potential
TXA ₂	Tromboksan A ₂
UPRE	Unfolded Protein Response Element
UTR	Translasyona Uğramayan Bölge
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Preeklampsi, daha önce normotansif olan kadınlarda 20. gebelik haftasından sonra yeni başlangıçlı hipertansiyona proteinüri veya son organ hasarının eşlik ettiği çok faktörlü bir hastalıktır. Preeklampsi bir multisistem hastalık olup, maternal morbidite ve mortalitenin önemli nedenidir. Bu hastalığın insidansı toplumlara göre % 2-10 arasında değişmekle birlikte ülkemizde gebe ölümlerinin en önde gelen nedenidir [1-4].

Preeklampsi, patogenezi halen tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, şu ana kadar yapılan araştırmalar genel olarak hastalığın patofizyolojisi, önlenmesi ve tedavisine odaklanmıştır. Günümüzde, damar endotel hasarı ve vazospazmın preeklampsi patofizyolojisinde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Vazospazm sonucu kan akımına karşı direnç ve arter basıncında artış olur [3]. Hastalığın patogenezinde rol oynadığı ileri sürülen endotel hücreler; vazodilatatör maddelerin salınımı, damar bütünlüğünün sağlanması ve intravasküler koagülasyonun önlenmesi gibi çeşitli önemli fonksiyonlara sahiptir [5,6].

Birçok araştırma, damar sistemi içindeki araşidonik asit metabolitlerinin düzenleyici fonksiyonlara sahip olduğunu göstermiştir [7, 8]. Araşidonik asitler, kısmi olarak böbrek ve damar endotelinde sitokrom P450 epoksigenaz ile hidroksieikozatetraenoik asitlere ve epoksieikozatrienoik asitlere (EET) metabolize edilirler [9]. Bu eikozanoidler arasında EET' ler etkili bir vazodilatatördür ve vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli rolleri vardır [9-11]. EET' ler anti-inflamatuvar özelliklere, kan basıncının düşürülmesi gibi biyolojik fonksiyonlara da sahiptir [12, 13]. Ayrıca, trombosit agregasyonunu inhibe ederler ve fibrinoloizi artırır [14-16].

Endojen EET' lerin daha az biyoaktif dioller ve dihidroksieikozatrienoik asit (DHET)' lere yıkımı, *EPHX2* geni tarafından kodlanan çözünür epoksit hidrolaz (çEH) enzimi tarafından katalizlenir. Bu nedenle, endotelde çEH tarafından EET düzeyinin değiştirilmesi, damar fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir mekanizmadır [17-19]. çEH' in inhibisyonu EET düzeylerini stabilize eder ve böylece EET' lerin faydalı etkilerinde artış sağlar. Bu nedenle çEH, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yeni bir terapötik hedeftir [19]. Son yıllarda bazı çalışmalar çEH inhibitörlerinin hipertansiyon, ateroskleroz ve diğer kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır [20-22]. İnsan çEH aktivitesinde tek nükleotid polimorfizmlerinin neden olduğu bireysel farklılıklar belirlenmiştir. Bu nedenle birçok araştırma, *EPHX2* gen polimorfizmine, bunların çEH katalitik aktivitesi üzerindeki etkilerine ve bazı kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkisine odaklanmıştır [23, 24]. İnsan *EPHX2* geninde çok

sayıda değişken bölge tanımlanmıştır. Polimorfizmlerin birinde 287. pozisyonadaki arjininin glutamin ile yer değiştirdiği (Arg287Gln, R287Q) ve bu değişimin enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Elli beşinci pozisyonadaki lizinin arjinin ile yer değiştirdiği K55R (9780A>G; Lys55Arg; rs41507953) polimorfizminin ise *in-vivo* olarak daha yüksek çEH aktivitesine neden olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla çEH aktivitesinde artışa neden olan bu polimorfizmin daha düşük EET düzeylerine neden olabileceği bildirilmiştir [25, 26]. Lee ve ark. tarafından koroner arter hastalık riski ile K55R polimorfizmi arasında beyazlarda yüksek bir ilişki olduğu belirlenirken, Afrikalı-Amerika' lılarda böyle bir ilişki saptanmamıştır [26]. Bu bulguların tersine, çalışma grubunu merkezi Avrupalıların oluşturduğu bir araştırmada ise K55R polimorfizmi ile koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve başarılı bir perkütan koroner müdahaleden sonra restenoz riski arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir [27]. Birbirini desteklemeyen bu sonuçlar *EPHX2* genindeki polimorfizm ile kardiyovasküler risk ilişkisinin, analiz edilen populasyonun etnik kökenine sıkı bir şekilde bağlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır [28, 29]. Ayrıca, HepG2 hücre hattında yapılan bir çalışmada *EPHX2* geni promotor bölge hipermetilasyonu sonucu bu genin transkripsiyonunun, bir transkripsiyon faktörü olan SP-1 bağımlı mekanizma ile baskılandığı belirlenmiştir [30].

Sonuç olarak, EET' ler damar fonksiyonlarının düzenlenmesinde etkili moleküllerdir. Bu moleküllerin vazodilatatör özellikleri nedeni ile hipertansiyon, iskemik felç, koroner arter hastalığına karşı koruyucu etkilere sahip olduğu bilinmektedir [23, 24, 26]. çEH enzimi EET' leri yıkarak, bu moleküllerin damar sistemi üzerine olan koruyucu etkilerinin sonlanmasına neden olur. *EPHX2* geni K55R varyantını taşıyan bireylerde çEH enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu ve buna bağlı olarak EET düzeylerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bu varyantı taşıyan bireylerin hipertansiyon, iskemik felç, koroner arter hastalığına daha yatkın olabileceği ileri sürülmektedir [25]. Ayrıca, ratlarda gebelik sırasında EET sentezinin arttığı ve EET' lerin hamilelik sırasında kan basıncının kontrolüne katkı sağladığı belirlenmiştir [31]. Ek olarak, DNA metilasyonu genlerin transkripsiyonunu düzenleyen mekanizmalardan biridir. *EPHX2* geni promotor bölge hipometilasyonu çEH enzim düzeyini artırarak EET' lerin ortamdan uzaklaştırmasında etkili bir diğer mekanizma olabilir. Bu nedenle *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyi ve/veya K55R polimorfizmi EET düzeylerinde farklılıklara yol açarak preeklampsi hastalığının etiyolojisinde rol alabilir. Bu çalışmanın ana hedefi *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyi ve K55R varyantı ile preeklampsi hastalığı arasında bir ilişki olup olmadığının analiz edilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Preeklampsi

Preeklampsi, daha önce normotansif olan kadınlarda gebelikle birlikte 20. haftadan sonra gelişen hipertansiyona proteinüri veya son organ hasarının eşlik ettiği bir hastalıktır [4]. Trofoblastik hastalık ve çoğul gebelik durumunda 20. haftadan önce de ortaya çıkabilir. Preeklampside hipertansiyon, hastalığın erken ve kesin bulgusudur. Hipertansiyon, gebelik öncesi veya ilk trimesterdeki kan basıncına göre diastolik basıncın 25 mmHg' den fazla yükselmesi veya en az 6 saat ara ile iki defa yapılan ölçümlerde kan basıncının 140/90 mmHg ve üzeri olması durumudur [1, 2, 32]. Bu hastalarda glomerüler hasarın bir göstergesi olan proteinüri ise 4 saat veya daha fazla ara ile yapılan ölçümlerde, idrar numunesinde 0,1 g/L protein (dipstik testde 1+) veya 24 saatlik idrarda 300 mg ve daha fazla protein bulunması durumudur [3, 33, 34]. Proteinüri yokluğunda, gestasyonel hipertansiyon ile birlikte son organ hasarı, baş ağrısı, görme bulanıklığı, trombositopeni, karaciğer enzimlerinin serumda yükselmesi, fetal büyüme geriliği, bulantı ve kusma ile birlikte sağ üst kadranda veya epigastrik ağrı gibi bulguların eşlik etmesiyle preeklampsi tanısı konulabilmektedir [4, 34].

Preeklampsi klinik olarak hafif ve şiddetli olmak üzere ikiye ayrılır. Ciddi hipertansiyon, yüksek düzeyde proteinüri veya diğer bulgular (son organ hasarının belirtileri) mevcut olduğunda şiddetli preeklampsi olarak sınıflandırılır [3, 35]. Bu bulguların herhangi birinin yokluğunda, hafif preeklampsi olarak sınıflandırılabilir [36]. Preeklampsi endotel disfonksiyonu, vazospazm ve organ perfüzyonundeki sekonder azalma ile seyreden klinik bir durumdur [37]. Preeklampside hem anne hem de fetus etkilenir. Bu hastalık annede renal, hepatik, serebral ve koagülasyon sistemlerinde bozukluklara, fetusda büyüme geriliği, distres, ölüm ve erken doğuma neden olabilir [38]. Preeklampsi günümüzde hala maternal ve fetal morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir [39, 40]. Ülkemizde gebe ölümlerinin en önde gelen nedeni preeklampsidir [12]. Bu hastalık gebelerin % 2-7' sinde görülür ve nedeni tam olarak açıklanamamıştır. Sağlıklı nulliparlarda preeklampsi oranı % 2-7 olarak belirlenmiştir. Bu oran ikiz gebeliklerde % 14, daha önceden preeklampsi hikayesi olanlarda % 18, preeklampsi' li kadınların kız kardeşlerinde % 39 ve kızlarında % 22 düzeyindedir. [38, 41].

2.1.1 Preeklampsi Risk Faktörleri

Nulliparite, obstetrik problemler, obezite, gestasyonel veya pregestasyonel diabetes mellitus, renal hastalık, kronik hipertansiyon, ailesinde preeklampsi hikayesi, trombofili,

bağ doku ve vasküler hastalıklar, daha önceki gebeliğinde preeklampsi hikayesi, düşük sosyoekonomik düzey, Afrikalı-Amerikalı ırkı, yüksek beden kitle indeksi, 15 yaş altı ve 40 yaş üstündeki gebelikler, çok sayıda gebelik preeklampsi için belirtilen risk faktörleridir [33, 42, 43].

2.1.2 Preeklampsi Etiyolojisi ve Patogenezi

Preeklampsi patofizyolojisi ve etiyolojisi net olarak aydınlatılamamıştır. Şu ana kadar yapılan araştırmalar genel olarak hastalığın patofizyolojisi, önlenmesi ve tedavisine odaklanmıştır [3]. Günümüzde preeklampsinin maternal ve fetal/plasental kökenli, bir multisistem hastalık olduğu bilinmektedir [44]. Plasentanın yetersiz trofoblastik invazyonu, damar endotel hasarı ve vazospazmın preeklampsi patofizyolojisinde önemli role sahip olduğu düşünülmektedir [45]. Preeklampsi etiyolojisinde gittikçe önem kazanan iki görüş daha vardır. Bunlardan birisi preeklampsiyi immünolojik yönden, diğeri genetik açıdan değerlendiren yaklaşımlardır. Annesinde preeklampsi olan gebelerin kızlarında daha yüksek oranda preeklampsi görülmesi genetik görüşleri desteklemektedir [46]. Preeklampsi oluşumunda genetik faktörlerin etkili olduğu genel anlamda kabul görmekte birlikte genetik geçiş paterni tartışmalıdır. Preeklampsi ile ilişkili belirgin tek bir genetik mekanizma ortaya konamamıştır [47]. Tüm bu görüşlere ek olarak, oksidatif stresin hem plasenta hem de maternal sistemik dolaşım içinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve preeklampsi hastalığının patogenezinde artan oksidatif stresin de rolü olduğu bildirilmiştir [44].

Plasenta fetüsü uterusu bağlayarak, fetüs için gerekli besin, gaz değişiminin sağlanması ve fetüs atıklarının temizlenmesi bakımından hayati bir organdır. Gebelikte plasentanın, fetusun oksijen ve besin ihtiyacını karşılayabilmek için uterus kan akımı, büyük oranda artar. Bu artışın sağlanabilmesi için spiral arterlerin bazı fizyolojik değişimlere uğraması gerekmektedir. Örneğin, plasentada fetusun ihtiyaçlarını karşılamak üzere yoğun olarak yeni damar oluşumu gerçekleşmektedir. Bu damar oluşumunda ise trofoblastlar rol almaktadır. Trofoblastlar normal plasenta gelişiminde ekstravillöz maternal spiral arterlerin kas tabakasını ve elastik laminasını invaze ederler. Bunun sonucunda spiral arterlerin çapı 15-20 mikrondan 300-500 mikrona çıkmakta, böylelikle spiral arterler düşük dirençli, yüksek kapasiteli utero-plasental damarlar haline dönüşmektedir. Yani trofoblast invazyonu fetusun, maternal arteriyel dolaşıma direk bağlantısını ve sağlıklı plasantasyonu sağlar. Gebelik haftası ilerledikçe, plasentaya ulaşan kan hacmi maternal faktörlerin etkisinden çıkıp, lokal faktörlerin etkisine girer [48-51].

Preeklampside ise bu fizyolojik değişikliklerin tamamlanmamış olduğu, plasental ve spiral arterlerin bozulmuş ekstravillöz invazyona sahip olduğu belirtilmiştir [52]. Bu hastalarda trofoblastik invazyonun yetersiz olması sonucu spiral arterlerde gerekli dilatasyon oluşmaz. Bu nedenle intervillöz mesafeye maternal kan daha yüksek hız ve basınçla girer. Histopatolojik incelemelerde preeklampitik gebelerde intervillöz mesafede göllenme, fibrin birikimi ve trombüs oluştuğu belirlenmiştir [53]. Yetersiz trofoblastik invazyonun nedeni tam olarak bilinmemekle beraber immünolojik ya da genetik nedenlere bağlı olabileceği ileri sürülmektedir [54].

Son zamanlarda preeklampsi patogenezinde endotel hücre aktivasyonunun önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir. Endotel hücre aktivasyonunun preeklampsinin erken dönemlerinde geliştiği düşünölmektedir [55]. Preeklampitik gebelerde endotel hasarını başlatan nedenler tam olarak bilinmemesine rağmen, bu durumun trombositlerin ve nötrofillerin aktivasyonu ve koagülasyon sistemi ile ilişkili olabileceği iddia edilmektedir. Bu hastalığın gelişiminde asıl rol alan mekanizmanın artmış inflamatuvar yanıt sonucu meydana gelen endotel hücre hasarı olduğu ileri sürölmektedir. Artan inflamatuvar yanıtta ise başlıca trombosit ve nötrofil aktivasyonu, oksidatif stres ve sitokinler rol almaktadır [56]. Son yıllarda kabul gören “iki evre modeli”ne göre preeklampside plasentadan salıverilen faktör ya da faktörler sistemik dolaşıma geçip yaygın inflamasyona yol açmakta ve endoteli hasara uğratmaktadır. Hasara uğrayan endotel, normal gebelikte artan nitrik oksit (NO), endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF), prostasiklin gibi gevşetici maddeleri daha az sentezler ve vazokonstrüksiyon oluşur [55].

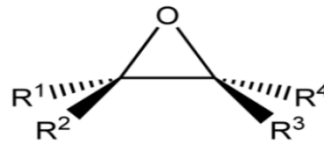
Hastalığın patogenezinde rol oynadığı ileri sürölen endotelial hücreler; vazodilatatör maddelerin sekresyonu, vasküler kompartman bütönlüğünün sağlanması ve intravasküler koagülasyonun önlenmesi gibi çeşitli önemli fonksiyonlara sahiptir [5, 6]. Birçok çalışmada normal gebelerde, endotelden salınan anti-agregan ve vazodilatatör prostaglandin I₂ (PGI₂, prostasiklin)’ nin arttığı, vazokonströktör ve agregan tromboksan A₂ (TXA₂)’ nin azaldığı gösterilmiştir [57]. Preeklampside ise endotelial disfonksiyon sonucu PGI₂ salınışı azalır. Subendotelial kollajenin açığa çıkması TXA₂ salınmasına ve platelet agregasyonuna neden olur. TXA₂ lehine bozulmuş PGI₂/TXA₂ dengesi vazokonstrüksiyon ve hipertansiyon gelişimine katkıda bulunur. Ayrıca, endotel hücrelerde L-arjininden NO sentaz aracılığı ile oluşturulan NO’ nun, vazodilatatör bir molekül olması nedeni ile gebeliğe bağlı hipertansif hastalıklarda rol oynadığı düşünölmektedir [5, 6].

Preeklampside nötrofil, monosit, makrofaj, doğal öldürücü hücreler (natural killer-NK hücreleri), CD4 ve CD8 T hücreleri gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin aktive olduğu belirlenmiştir [58]. Normal gebelikte periferik kan lökositleri artar, fakat bu artış preeklampside daha fazladır. Bu hastalarda inflamatuvar hücreler aktive olur ve vasküler hasar bölgesine göç ederler. Lökosit aktivasyonu ile birlikte proinflamatuvar moleküller, sitokinler ve adezyon molekülleri de aktive olur [59, 60]. Proinflamatuvar sitokin düzeyleri preeklamptik gebelerin plasenta ve sistemik dolaşımında yüksektir. Birçok araştırmada bu hastalarda interlökin-8 (IL-8), IL-12, IL-15, IL-18, interferon, transforme edici büyüme faktörü- β gibi diğer sitokinlerin de plasenta ve plazma düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır [61, 62]. Sitokin düzeylerindeki bu artışa yanıt olarak endotelin protrombotik ve proinflamatuvar aktivasyonu meydana gelmektedir [63]. Aktive endotel, adezyon moleküllerini, kemoatraktanları ekspres eder ve lökositlerin damar yatağını işgal etmesine neden olur [64]. Sitokinlerin nötrofil, monosit ve lenfositlerde hiperaktivasyona neden olarak endotel disfonksiyonuna ve sonuç olarak da preeklampsisi tablosunun oluşmasına neden olabilecekleri ileri sürülmektedir. Ayrıca normal gebeliklerde “*T helper-2*” nin aktivasyonu “*T helper-1*” den daha fazladır. Preeklamptik gebelerde ise durum tam tersidir. “*T helper-1*” hücrelerinin aktivasyonu sonucu salınan sitokinlerin preeklampsisi tablosunun ortaya çıkmasına neden olabileceği ileri sürülmektedir [58].

Son olarak, renin anjiyotensin aldosteron sistemi hem normal gebelikte hem de preeklampsisi patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Gebelikte böbrek dışında renin anjiyotensin aldosteron sistemini düzenleyen en önemli organ plasentadır [65]. Normal gebelikte östrojen anjiyotensinojen sentezini uyarır, bu da renin anjiyotensin aldosteron sisteminde aktivasyon artışına neden olurken, anjiyotensin II (ang II)’ ye verilen cevap azalır [66]. Sağlıklı gebelerde ang II’ ye karşı direnç oluşurken preeklamptik kadınlarda hassasiyetin arttığı belirlenmiştir [67].

2.2 Epoksitler

Epoksitler üç halkalı, siklik eterlerdir. Üç atomdan oluşan gergin halka yapısına sahiptirler (Bkz. şekil 2.1). Bu gergin halka yapısı da epoksitleri diğer eterlerden daha reaktif yapar [68].

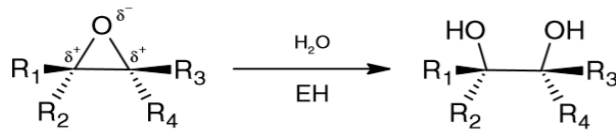


Şekil 2.1 Epoksit molekülünün genel yapısı [68].

Endüstride de kullanılan epoksitler, doğal ve yapay olarak vücuda alınabilecekleri gibi belli biyokimyasal tepkimeler sonucu *in-vivo* olarak da meydana gelebilirler [69]. Yani epoksitler endojen veya eksojen olarak oluşabilirler. Bu moleküller endojen olarak, hücre ve dokularda zenobiyotiklerin metabolizması sonucunda sitokrom P450 (CYP450) monooksijenaz sistemi yoluyla oluşabileceği gibi oksidatif metabolizma sırasında oluşan oksijen atomlarının farklı dizilimleri ile de meydana gelebilirler [70, 71]. Bu bileşiklerin birçoğu karsinojenik ve oldukça toksik etkilere sahiptir. Fakat farklı reaktivite ve molekül geometrilerine sahip olmalarından dolayı epoksitlerin tümü aynı oranda zararlı değildir [69]. Fizyolojik pH’ da bu moleküllerin birçoğu reaktif değildir ve canlı sistemler için tehlike arz etmezler. Fakat epoksitlere enzimatik olarak su moleküllerinin eklenmesi sonucu daha elektrofilik bileşikler meydana gelebilir. Bu nedenle vücuttan atılımları oldukça önemli hale gelir. Bu şekilde oluşan epoksit ara ürünlerinin bazıları sulu ortamlarda oldukça kararsız olmaları nedeni ile DNA, RNA ve proteinlere atak yaparak mutajenik, toksik ve karsinojenik etki yaratabilirler. Bu sebeple epoksit ara ürünlerinin seviyelerinin düzenlenmesi organizma için yaşamsal önem taşımaktadır [70, 71].

2.2.1 Epoksit Metabolizması

Epoksitler, epoksit hidrolaz (EH) enzimleri tarafından (EC 3.3.2.7-11) su katılması tepkimesiyle, ilgili diollerine dönüştürülürler (Bkz. şekil 2.2). Birkaç istisna dışında bu şekilde hidrolize uğrayan epoksitlerin sudaki çözünürlükleri artar ve genotoksik etkileri ortadan kalkar [23]. Bu olay sonucunda yalnızca eksojen epoksitlerin zararlı etkileri ortadan kalkmaz, düzenleyici rolleri olan lipid kaynaklı endojen epoksitler de ortamdan uzaklaştırılmış olur [72].

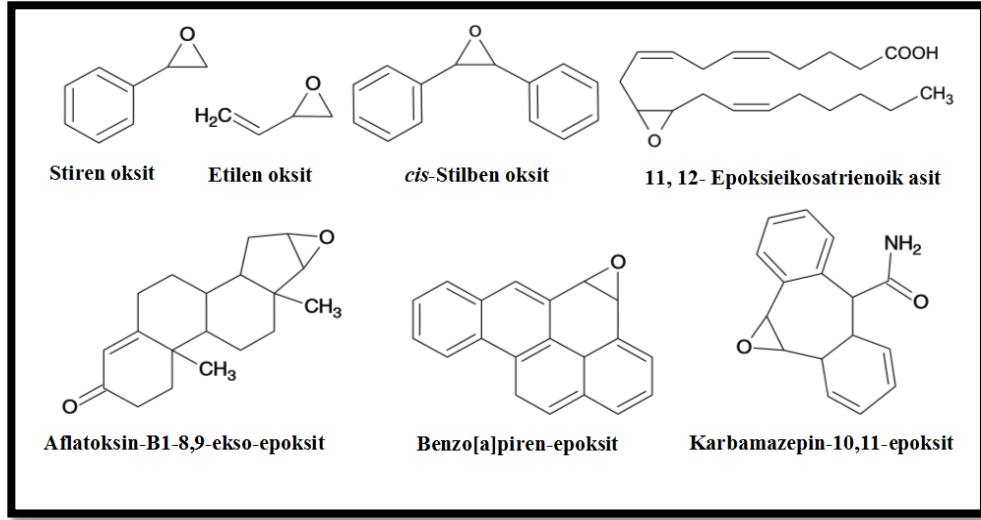


Şekil 2.2 Epoksit hidrolaz enzimlerinin katalizledikleri tepkime. EH: Epoksit hidrolaz [23].

EH’ ler memeli, bitki, böcek, fungus, bakteri gibi birçok organizmada geniş bir dağılım gösteren enzim grubudur. EH enzim ailesinin genel olarak karbon kaynaklarının yıkımı, detoksifikasyon ve sinyal moleküllerinin düzenlenmesi şeklinde başlıca üç fonksiyonu vardır [71].

Bu enzim ailesi çözünür epoksit hidrolaz (çEH), mikrozomal epoksit hidrolaz (mEH), lökotrien A4 hidrolaz, hepoksilin A3 hidrolaz ve kolesterol 5,6-oksit hidrolaz olmak üzere 5 alt tipe ayrılır [70].

Epoksitlerin metabolizması başlıca çEH ve mEH enzimleri aracılığı ile gerçekleşir. Bu enzimlerin her ikisi de zenobiyotik metabolizmasında rol alır. Fakat çEH daha çok endojen epoksitlerin metabolizmasında görev alır. Polisiklik aromatik hidrokarbon metabolitlerinin de dahil olduğu birçok reaktif epoksit, mEH enziminin substratıdır (Bkz. şekil 2.3) ve bu enzim tarafından etkin bir şekilde detoksifiye edilirler.



Şekil 2.3 Başlıca mikrozomal epoksit hidrolaz substratları [23].

İnsan çEH enzimi başlıca karaciğer olmak üzere birçok dokuda ekspres olur ve fosfataz aktivitesinden dolayı zenobiyotik metabolizmasından daha çok düzenleyici süreçlerde rol oynar. Yani çEH endojen, mEH ise eksojen epoksitlerin metabolize edilmesinde rol alan enzimlerdir [23]. Dolayısıyla çEH birçok endojen yağ asidi türevi epoksitleri metabolize eden ana enzimdir. Fakat mEH enzimleri de, çEH enziminden çok daha az etkin olsa da epoksistearik asit ve epoksieikozatrienoik asit (EET)' ler gibi yağ asiti türevi epoksitleri substrat olarak kullanabilirler [73].

Sonuç olarak çEH enzimi, araşidonik asit (AA) metabolizması sonucu oluşan endojen epoksitlerin biyokimyasal deaktivasyonunda rol alan başlıca EH enzimidir. Epoksitler reaktif özelliklere sahip moleküllerdir. Fakat CYP epoksigenaz aktivitesi ile epoksitlerden oluşan endojen EET' ler organizma için bazı düzenleyici etkiler gösterirler. çEH enzimi bu düzenleyici moleküllerin DHET' lere dönüşümünü katalize ederek bu etkilerin sonlanmasına sebep olur [23].

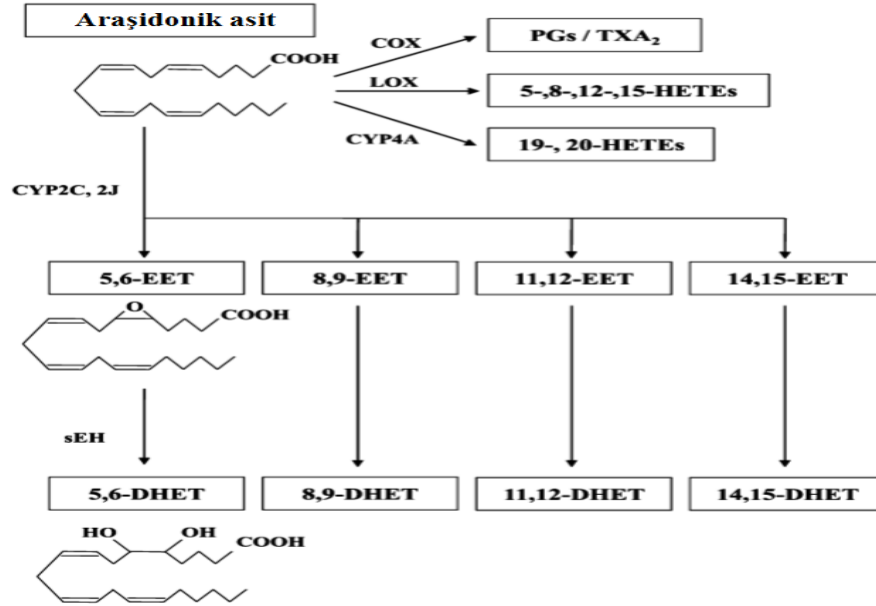
çEH ve mEH haricindeki EH ailesinin üyesi olan diğer üç enzim kısıtlı substrat seçiciliklerine sahiptirler ve zenobiyotik metabolizmasında rol almazlar.

Bu enzimlerden kolesterol-5,6-oksit hidrolazın başlıca memeli karaciğer dokusu olmak üzere birçok doku mikrozomlarında aktivitesi bulunur. Bu enzim kolesterol 5,6 α - oksit ve 5,6 β - oksit' in kolestan 3 β , 5 α , 6 β - triol' e hidrasyonunu katalizler. EH ailesinin bir diğer üyesi hepoksilin A3 hidrolaz AA metabolizmasına katılan sitozolik bir enzimdir. Lökotrien A4 hidrolaz ise kofaktör olarak Zn⁺² yi kullanan iki fonksiyonlu bir enzimdir. Hem hidrolaz hem de aminopeptidaz aktivitesi gösterir. AA metabolitlerinden biri olan lökotrienler bu enzimin substratıdır [70, 74].

2.2.2 Araşidonik Asit Metabolizması ve EET' lerin Oluşumu

AA (20: 4 $\Delta^{5, 8, 11, 14}$, $\omega - 6$) omurgalılar için çoklu doymamış esansiyel yağ asitidir. Memeli hücrelerinin dış ve iç membranlarındaki fosfolipitlerin (başlıca fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin ve fosfatidil inozitler) genellikle ikinci açıl grubu (*sn*-2) ile esterleşmiş olarak bulunurlar. AA' lar omurgalı hayvanların çeşitli dokularında, oldukça etkili, hormon benzeri işlevlere sahip olan eikozanoidlerin öncülü bileşiklerdir. AA' ların hücre membranlarından salınımı başlıca Ca⁺² iyonları ile birlikte fosfolipaz A₂ aracılığı ile düzenlenir. Aktive olan fosfolipaz A₂ hücre membranındaki fosfatidilkolinden arşidonik asiti hidroliz eder. Bazı hücreler tarafından AA salınımı için diğer bir yol olarak da reseptör aracılı fosfolipaz C yolu kullanılır. Fosfolipaz C' nin aktive olması sonucu membran yapısındaki inozitolfosfogliseridden fosforilinozitol grubu hidroliz edilir ve AA içeren bir diaçilgliserol oluşur. Daha sonra diaçilgliserol lipaz enzimi tarafından katalizlenen bir hidrolitik tepkime ile de AA serbestleşir [75, 76]. Membranlardan serbestleşen bu AA' lar, daha sonra siklooksijenaz (COX), lipooksijenaz (LOX) ve CYP450 monooksijenaz olmak üzere üç sınıf enzimin etkisiyle endojen biyoaktif eikozanoidlere dönüştürülürler. Araşidonik asitlerden; COX yolağı ile PG ve ilişkili eikozanoidler, LOX yolağı ile lökotrienler ve ilişkili bileşikler, CYP450 monooksijenaz yolağı ile de hidroksieikozatetraenoik (HETE) asitler ve epoksitler oluşur (Bkz. şekil 2.4). COX ve LOX yolakları yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Bu yolakların eikozanoid ürünlerinin inflamasyon, hücre proliferasyonu ve hücre içi sinyal iletimi gibi biyolojik süreçlerde önemli rollere sahip oldukları bilinmektedir. Buna rağmen CYP yolağı daha az çalışılmıştır. Fakat son zamanlarda bu alanda yapılan çalışmaların sayısı artmaktadır [77-79]. CYP yolağı ile EET ve HETE olmak üzere iki tip eikozanoid oluşur. HETE' ler CYP ω -oksidaz aktivitesi ile oluşurken, EET' ler başlıca CYP2C ve CYP2J sınıfına ait CYP epoksijenazların aktivitesi sonucu oluşur. CYP enzimleri endoplazmik retikulumda bulunur ve arşidonik asitteki 4 çift bağdan birine bir epoksit ekleyerek 5,6-EET, 8,9-EET,

11,12-EET ve 14,15-EET olmak üzere 4 adet EET izomeri oluşturur (Bkz. şekil 2.4) [78]. Endotel hücreleri CYP2C9 ve CYP2J2 eksprese eder ve bu, damar sistemi içindeki EET'lerin ana kaynağıdır. Küçük bir miktar 8,9-, 11,12-,14,15-EET plazma, karaciğer ve böbrekte bulunmaktadır [79, 80]. EET'ler vazodilatasyon ve vasküler tonusun düzenlenmesi gibi birçok biyolojik işleve sahip düzenleyici lipid molekülleridir. Bu biyolojik işlevlerden en çok damar basıncını azaltıcı etkileri araştırılmıştır [9-11, 77].



Şekil 2.4 Araşidonik asit ve EET metabolizması. Araşidonik asitler COX yolağı ile prostaglandinler (PG) ve tromboksanlara (TXA₂); LOX yolağı ile 5-, 8-, 12-, 15- hidroksieikozatetraenoik asit (5-, 8-, 12-, 15- HETE); CYP4A katalizi ile 19-, 20-HETE' lere; CYP2C ve CYP2J enzim sistemleri ile 4,5-eposkieikozatrienoik asit (4,5-EET), 8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET' lere dönüştürülebilirler. EET'ler çEH enzimi tarafından daha az aktif 5,6-dihidroksieikozatrienoik asit (5,6-DHET), 8,9-DHET, 11,12-DHET, 14,15- DHET' lere katalize edilirler [81].

2.2.3 EET'lerin Etkileri

EET'ler başlıca kardiyovasküler ve renal sistem üzerine otokrin ve parakrin etkileri olan moleküllerdir [82]. İlk olarak 1980'lerin başında EET'lerin vazodilatatör etkisi ortaya çıkarılmış ve bu moleküller daha ayrıntılı olarak çalışılmaya başlanmıştır [83]. Daha sonra, bu moleküllerin anti-inflamatuar anti-hipertansif [13, 12], anti-agregan ve fibrolizisi artırma gibi biyolojik fonksiyonlara da sahip oldukları belirlenmiştir [14-16]. EET'lerin ayrıca sinyal iletim yolları ve bazı transkripsiyonel mekanizmalara dahil oldukları ve buna hücre membranlarında bulunan özgün EET reseptörlerinin aracılık edebileceği ileri sürülmüştür [80, 84, 85]. Fakat günümüze kadar henüz bir EET reseptörü tanımlanmamıştır.

EET' lerin etkisini açıklamaya yönelik iki mekanizma öne sürülmektedir. Birincisinde; EET' lerin muhtemelen membranda bulunan reseptörlerine bağlandığı ve bunun sonucunda işlevsel yanıtı yola açan sinyal ileti yolları ile etkileştiği bildirilmektedir. İkinci mekanizmaya göre de EET' ler, CYP epoksijenaz tarafından araşidonik asitten oluşturularak veya EET içeren fosfolipitlerin hidrolizi ile hücre içine alınarak intraselüler ortamda bulunurlar. Bu intraselüler EET' lerin doğrudan hücre içi mekanizma ile iyon kanalları, sinyal ileti yollarının bileşenleri veya transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girdikleri belirtilmektedir [80].

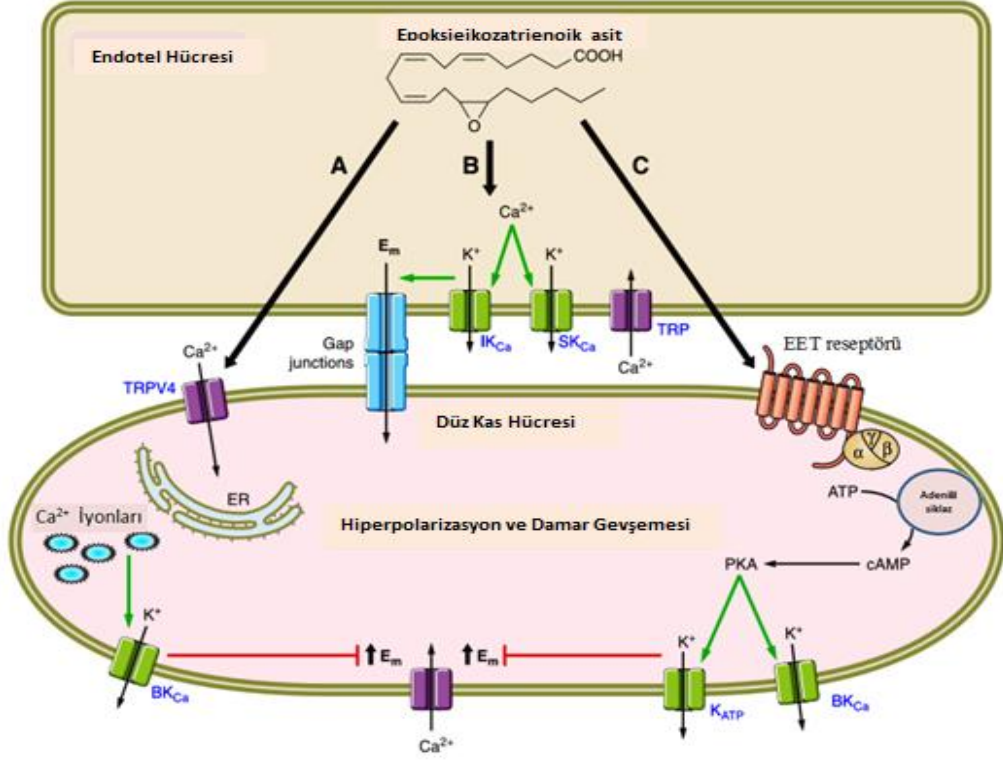
2.2.3.1 EET' lerin Vasküler Tonus Üzerine Etkileri ve Etki Mekanizmaları

Dolaşımdaki kan hücreleri EET düzeyinin önemli kaynağı ve düzenleyicisidir. EET' ler insanların da dahil olduğu birçok türde, eritrositlerde esterleşmiş olarak buldukları fosfolipitlerden izole edilmiştir [86, 87]. Eritrositlerden salınan EET' ler, vazodilatasyon, trombosit agregasyonunun inhibisyonu ve inflamatuvar cevabın baskılanmasında rol alan EET' lerin önemli bir kaynağını teşkil eder. Eritrositler ve dolaşımın diğer bir hücresi olan makrofajlar çEH aktivitesine de sahip hücrelerdir [88, 89]. Ayrıca, insan alveolar makrofajlarında ve monosit hücrelerinde CYP2J2 ekspresyonunun olduğu, fakat nötrofillerde bu genin eksprese olmadığı belirlenmiştir [90]. Bu veriler dolaşımdaki hücrelerin EET oluşturma ve yıkma kapasitesine sahip olduklarına ve bu yolla kardiyovasküler işlevleri etkilediklerine işaret etmektedir [79].

EET' lerin işlevleri ile ilgili en çok vazodilatatör etkileri araştırılmıştır [9-11, 77]. Daha önce yapılan çalışmalarda EET' lerin hem endotel hem de damar düz kas hücreleri üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir [91, 92]. EET düzeyindeki değişikliklerin kan basıncı artışına, endotel disfonksiyonuna ve son organ hasarına yol açarak hipertansiyonun patofizyolojisinde rol alabileceği belirtilmektedir [83]. Yapılan bir çalışmada gestasyonel hipertansiyonlu kadınlarda idrar DHET düzeyinin sağlıklı hamile kadınlara oranla anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum gebelikle indüklenen hipertansiyonlu kadınlarda EET yıkımının arttığı şeklinde yorumlanmıştır [93]. Minuz ve ark. tarafından renovasküler hipertansiyon hastalarında plazmada EET düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Ayrıca bu hastalarda, plazma EET/DHET oranının azaldığı da belirlenmiştir. EET deki bu azalışın CYP tarafından EET üretimindeki azalma ve EET' lerin çEH enzimi tarafından yıkılmalarındaki artışla ilişkilendirebileceği ileri sürülmüştür [94]. Koroner, renal ve serebral damarlarda yapılan çalışmalarda EET' lerin organ kan akımını veya damar çapını artırıcı yönde etki gösterdikleri saptanmıştır [95-98].

Ayrıca, EET' lerin asetilkolin ve bradikinin aracılı endotel bağımlı hiperpolarizasyona katkı sağlayarak da vazodilatasyona neden oldukları gösterilmiştir [97, 99]. Benzer şekilde endotel hücrelerinde CYP2J2 veya CYP2C8 ekspresyonunun artırılmasının asetilkolin aracılı renal mirkovasküler dilatasyonu artırdığı belirlenmiştir [100].

EET' lerin damarlardaki etkileri için birçok mekanizma öne sürülmektedir (Bkz. şekil 2.5). 14,15-EET' lerin koroner mikro damarlarda 10 pM gibi düşük bir derişimde bile gevşemeye yol açtıkları tespit edilmiştir [101]. Bu olayın hiperpolarizasyon aracılığı ile meydana geldiği belirlenmiş ve EET' lerin koroner dolaşımın da dahil olduğu birçok damar yatağında EDHF olarak işlev gördükleri ileri sürülmüştür [95, 97]. EET' lerin, EDHF etkisinin mikrodamarlarda baskın olduğu belirtilmiştir. Bu moleküllerin renal mikro dolaşımında kan akışını düzenleyerek damar gevşemesine yol açtıkları bildirilmiştir. Ayrıca, sodyumun geri emilimini inhibe ederek iyon taşınımının düzenlenmesine katkı sağladıkları ve bunun sonucunda kan basıncını düşürücü yönde etki sağladıkları tespit edilmiştir [95]. Bazı çalışmalarda EET' lerin endotel hücrelerinden difüze olarak düz kas hücrelerindeki "Ca²⁺-aktive büyük-geçişli potasyum (K⁺) kanallarını" (BK_{Ca}) etkinleştirdikleri ve bunun sonucunda hiperpolarizasyona yol açarak damar gevşemesine neden oldukları saptanmıştır [83, 102, 103]. Oluşan bu endotel hiperpolarizasyonunun ise "gap junction" lar aracılığı ile düz kas hücrelerine iletildiği belirlenmiştir. Ayrıca, endotel hiperpolarizasyonu sonucu endotelde bulunan "Ca²⁺-aktive potasyum kanallarından" (K_{Ca}) salınan K⁺ iyonlarının miyoendotel boşlukta birikerek düz kas hücrelerindeki potasyum ve Na⁺/K⁺-ATP_{az} kanallarını aktive ettiği de gözlenmiştir. Bunun sonucunda da potasyum iyonlarının hücre içinden dışına çıkararak düz kas hücre hiperpolarizasyonuna neden oldukları belirlenmiştir [104]. Ek olarak, EET' lerin endotelial "kalsiyum-aktive küçük-geçişli K⁺ kanallarını" (SK_{Ca}) ve "kalsiyum-aktive orta-geçişli K⁺ kanallarını" (IK_{Ca}) açarak veya gap junction' lar aracılığı ile endotel ve düz kas hücreleri arasındaki hiperpolarizasyonun iletimini sağladıkları ve bu yolla endotel hiperpolarizasyonunu düzenledikleri belirtilmiştir (Bkz. şekil 2.5 B) [78]. Ayrıca, endotel hücrelerinden salınan EET moleküllerinin membranda bulunan, tanımlanmamış bir reseptörü aktive ederek guanin nükleotid protein G_{αs} tarafından adenilat siklaz aktivasyonuna ve bunun sonucunda da cAMP üretiminde artışa yol açtığı belirlenmiştir [96, 105-107]. cAMP' nin protein kinaz A (PKA)' nın aktive olmasını sağladığı ve aktive PKA' nın da BK_{Ca} kanallarını etkinleştirerek hücreden K çıkışına ve hiperpolarizasyona neden olduğu gösterilmiştir (Bkz. şekil 2.5 C) [79, 108].



Şekil 2.5 Çeşitli organlarda EET yapısal izomerleri tarafından kullanılan vasküler hücre sinyal iletim mekanizmalarının bir özeti. **A:** Endotel hücreleri tarafından oluşturulan EET'ler düz kas hücrelerinde bulunan TRPV4 (vallinoid type 4 transient receptor potential) kanallarını aktive eder. TRPV4 kanalları aracılığı ile Ca^{2+} girişi endoplazmik retikulumdan (ER) Ca^{2+} iyonlarının salınımını tetikler. ER' den Ca^{2+} iyonlarının salınımı " Ca^{2+} -aktive büyük-geçişli potasyum (K^+) kanallarını" (BK_{Ca}) etkinleştirerek düz kas hücrelerinden K^+ çıkışına neden olur. Bu da membran hiperpolarizasyonuna yol açar. **B:** EET'ler endotel hücrelerindeki TRP (transient receptor potential) kanallarını aktive ederek bu hücelere Ca^{2+} girişine yol açarlar. Endotel hücrelerindeki Ca^{2+} artışı "kalsiyum-aktive küçük-geçişli K^+ kanallarını" (SK_{Ca}) ve "kalsiyum-aktive orta-geçişli K^+ kanallarını" (IK_{Ca}) etkinleştirir. Bu durum membran hiperpolarizasyonuna yol açar. Endotel membran hiperpolarizasyonu "gap junction" lar aracılığı ile damar düz kas hücrelerine iletilir. **C:** Endotel hücrelerinden salınan EET molekülleri membranda bulunan, tanımlanmamış bir reseptörü aktive ederek guanin nükleotid protein G_{α_s} tarafından adenilil siklaz aktivasyonuna ve bunun sonucunda da cAMP üretiminde artışa yol açar. Daha sonra cAMP tarafından protein kinaz A (PKA)'nın aktivasyonu meydana gelir. Aktive PKA da BK_{Ca} kanallarını aktive ederek hücrenden K^+ çıkışına ve hiperpolarizasyona neden olur [79].

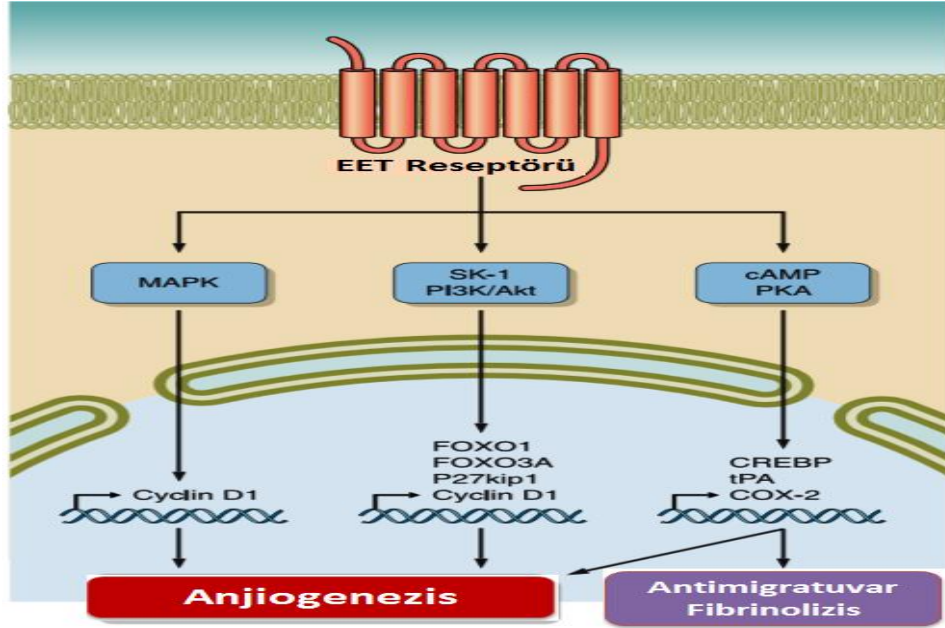
TRPV4 kanalları aracılığı ile düz kas hücrelerine Ca^{2+} girişinin, sarkoplazmik retikulumda bulunan ryanodin reseptörlerini aktive ederek Ca^{2+} iyonlarının salınımını tetiklediği saptanmıştır. ER' den Ca^{2+} iyonlarının salınımının ise BK_{Ca} kanallarını etkinleştirerek düz kas hücrelerinden K^+ çıkışına neden olduğu ve bunun sonucunda membran hiperpolarizasyonun meydana geldiği belirlenmiştir (Bkz. şekil 2.5 A) [109]. Bir diğer çalışmada ise TRPV4 geni eksik olan farelerin mezenterik arterlerinde 11,12-EET aracılı dilatasyonunun gerçekleşmediği gözlenmiştir [110].

Son olarak, EET' lerin trombositler üzerine etki ederek de damar homeostazını düzenlemede rol aldıkları ileri sürülmüştür [111, 112]. 8,9-EET ve 14,15-EET' nin trombositlerde tromboksan B2 oluşumunu inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca, AA tarafından indüklenen trombosit agregasyonunun tüm EET izomerleri aracılığı ile inhibe edildiği gösterilmiştir [112]. EET' lerin insan trombositlerinde NO sentaz yolağını etkinleştirdikleri [113] ve trombositlere trombin aracılı Ca^{2+} girişini inhibe ettikleri de ortaya konulmuştur [111].

2.2.3.2 EET' lerin Migrasyon, Proliferasyon ve Anjiyogenez Üzerine Olan Etkileri ve Etki Mekanizmaları

EET' ler migratuvar ve proliferatif etkisi olan moleküllerdir. Dolayısıyla, bu moleküller anjiyogenezde de rol alırlar [114-116]. Endotel hücrelerinde CYP2C ekspresyonundaki veya EET düzeyindeki artışın insan ve fare endotel hücre proliferasyonda artışa neden olduğu belirlenmiştir [116, 117]. EET' lerin dört yapısal izomerinin de endotel hücre proliferasyonunu artırdığı ve EET aracılı proliferasyondaki bu artışın fosfatidil inozitol-3-kinaz (PI3K)/Akt, mitojen- aktive eden protein kinaz (MAPK) ve cAMP/PKA gibi hücrel sinyal iletim yolları ile ilişkili olduğu farklı çalışmalarla ortaya konulmuştur [91, 117]. Epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörünün EET' ler tarafından aktive edilerek bu hücrel sinyal iletim yollarını etkinleştirdiği iddia edilmiştir [114]. 14,15-EET' lerin EGF reseptörü için bir ligand olan "heparin-bağlayıcı EGF-benzeri büyüme faktörünün" salınımına yol açtığı ortaya konulmuştur [118]. Bunun da src-kinaz tarafından başlatılan bir tirozin kinaz sinyal yolağının etkinleşmesine ve metaloproteinazların aktivasyonuna neden olduğu ileri sürülmüştür [118-120]. Ayrıca, birçok çalışmada EGF reseptör aktivasyonunun Akt' nin etkinleşmesine yol açtığı ve bunun sonucu olarak da siklin D1 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [114, 116]. İnsan umbilikal damar endotel hücrelerinde CYP2C9 ekspresyonundaki artışın p38 MAPK' ın ve c-Jun NH2-terminal kinazın (JNK) inaktive olmasına neden olduğu, bunun sonucunda da siklin D1 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir [114]. Ayrıca, bu hücrelerde yapılan bir çalışmada 11,12-EET' lerin PI3K/Akt aracılığı ile FOXO1 ve FOXO3a "*forkhead*" transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Fosforile olan FOXO1 ve FOXO3a' nın inaktive olduğu ve bunun sonucunda bu transkripsiyon faktörleri tarafından ekspresyonu uyarılan siklin D inhibitörü P27^{kip1}, in ekspresyonunun baskılandığı bildirilmiştir. Böylelikle 11,12-EET' lerin bu mekanizma üzerinden hücre proliferasyonunu teşvik ettiği öne sürülmüştür [116]. EET' lerin bir diğer yol olarak da, MAPK fosfataz 1 sinyal yolağı ile etkileşerek JNK aktivitesinde düşüşe neden oldukları

ve bunun sonucunda da siklin D1 düzeyinde artışa yol açtıkları saptanmıştır [121]. Bu nedenle EET' lerin endotel hücre proliferasyonunu indükleyici etkisinin oluşturulmasında, EGF reseptör transaktivasyonunun ve artan siklin D1 ekspresyonunun önemli sinyal mekanizmaları olduğu söylenebilir (Bkz. şekil 2.6) [79]. Ek olarak 14,15-EET' lerin, PGE₂ düzeylerini azaltarak da trombosit kökenli büyüme faktörü aracılığı ile indüklenen damar düz kas hücre proliferasyonunu artırdığı bildirmiştir [122].



Şekil 2.6 Anjiyogenez ile sonuçlanan EET moleküllerinin hücre içi sinyal yolları. EET yapısal izomerlerinin anjiyogenez teşvik etme mekanizmaları ile ilgili hücre içi sinyal yollarına genel bir bakış. Mitojen-aktif eden protein kinaz (MAPK) nükleer siklin D1 oluşumunu artırabilir. Sifingozin kinaz-1 (SK-1) ve fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolları transkripsiyon faktörlerini aktive edebilir ve hücre döngüsü düzenleyicilerinin oluşumunu etkinleştirebilir. Protein kinaz A (PKA) CREBP (cAMP/PKA response element binding protein) aracılığı ile anjiyogenez, hücre migrasyonu ve fibrinolyzi etkileyen COX-2 üretimini tetikleyebilir [79].

Feleminn ve ark. tarafından CYP2C9 ekspresyonundaki artışın veya 11,12-EET uygulanmasının cAMP düzeyini artırarak, bu moleküllerin CREBP ("cAMP Response Element Binding Protein")' e bağlanmasını uyardığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada PKA inhibisyonu sonucu CYP2C9' un COX-2 ekspresyonu üzerindeki uyarıcı etkisinin azaldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak bu araştırmacılar tarafından endotel hücrelerinde, EET' ler ve COX-2 arasında anjiyogeneze katkı sağlayan bir etkileşimin olduğu iddia edilmiştir [123]. Bu çalışmaya benzer şekilde CYP2C9 ekspresyonundaki artışın veya 11,12-EET uygulanmasının endotel hücrelerinde doku tipi plazminojen aktivatörün ekspresyonunun ve aktivitesinin artmasına yol açtığı saptanmıştır. Bu artışın ise G α_s ve PKA sinyal ileti yolağı aracılı olduğu belirtilmiştir [124].

EET' ler tarafından indüklenen proliferasyon ve migrasyona dahil olan başka yollar da bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada insan umbilikal damar endotel hücrelerine 11,12-EET uygulanmasının Sifingozin kinaz-1 (SK-1) aktivasyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Aktive olan SK-1' in de EGF reseptörünün transaktivasyonuna ve Akt kinaz aktivasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Bunun sonucunda EET' lerin SK-1 etkinleşmesine yol açarak hücre proliferasyonunda artışa neden olduğu ileri sürülmüştür. Bu çalışmada ayrıca SK-1 ekspresyonunun baskılanmasının, 11,12-EET' lerin hücre proliferasyonu ve migrasyonu artırıcı yöndeki etkilerinin azalmasına neden olduğu saptanmıştır [117].

EET' lerin ayrıca akciğer endotel hücrelerinde, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) aracılığı ile de proliferasyona katkı sağladıkları bildirilmiştir [125, 126]. VEGF' nin CYP2C44 ekspresyonunu ve EET oluşumunu artırdığı saptanmıştır. Ayrıca, CYP2C44 ekspresyonunun baskılanmasının VEGF aracılı proliferasyonu anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir. Bu durumun da ERK1/2 ve Akt kinazın fosforilasyonundaki azalma ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [115]. Ek olarak, 14,15-EET' lerin insan dermal mikrovasküler endotel hücrelerinde VEGF ekspresyonunu Src-STAT-3 ("*signal transducer and activator transcription-3*") sinyali vasıtasıyla artırdığı gösterilmiştir [127]. Bu veriler EET ve VEGF arasında, endotel hücre proliferasyonunu indükleyen, bir pozitif ileri besleme mekanizmasının bulunabileceğine işaret etmektedir.

Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda EET' ler düz kas hücrelerinde anjiyogenezde etkili bir şekilde rol alabilirler. Fakat ayrıntılı mekanizmaları ortaya koyabilmek için ileri çalışmalar gerekmektedir [79]. Ayrıca, EET' lerin anjiyogenik özelliklere sahip olmaları nedeni ile kanserli dokularda tümörögenizde de rol alabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, bu düşüncüyü destekler şekilde CYP2C44 epoksigenaz eksikliği olan farelerde tümör hacminin, kütlelerinin ve damar oluşumunun belirgin bir şekilde azaldığı saptanmıştır [128]. Diğer bir çalışmada PPAR aktivasyonunun endotel hücrelerinde CYP2C epoksigenaz ekspresyonunu azaltarak proliferasyonu, tümör anjiyogenezini ve büyümesini baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca, CYP epoksigenaz inhibitörlerinin rat beyin tümörlerinde kapiller oluşumu ve tümör boyutunu azaltıcı yönde etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu nedenle epoksigenaz inhibitörlerinin veya EET antagonistlerinin kanser tedavisinde anjiyogenezi azaltmak amacıyla kullanılabileceği ileri sürülmüştür [129].

2.2.3.3 EET' lerin Anti-apoptotik Etkileri

EET' lerin ve CYP epoksigenazların hücreler için anti-apoptotik etki yarattıkları da ileri sürülmektedir. Domuz renal hücre kültüründe yapılan bir çalışmada 14,15-EET' lerin PI3K/Akt sinyal yolağını etkinleştirerek bu hücreleri apoptoza karşı korudukları ortaya konulmuştur [130]. CYP-epoksigenazların ekspresyonunun artırılmasının TNF- α tarafından indüklenen endotel hücre apoptozunu baskıladığı saptanmıştır. Apoptozdaki bu azalmanın, EET' ler tarafından ERK defosforilasyonunun inhibisyonu ve PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [131]. Ayrıca, Simpkins ve ark. tarafından çEH inhibisyonu sonucu, anti-apoptotik Bcl-2 ailesinin bazı üyelerinin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir [132].

2.2.3.4 EET' lerin Anti-inflamatuar Etkileri

EET' lerin nükleer faktör kappa b (NF- κ B)' nin ekspresyonunu azaltarak ve/veya inhibisyonuna yol açarak anti-inflamatuar etki yarattıkları ortaya konulmuştur [12, 16]. Lipopolisakkarit uygulanmasını takiben çEH eksikliği veya inhibisyonu olan farelerde inflamasyonun azaldığı ve hayatta kalma oranının arttığı belirlenmiştir. Bu farelerde ayrıca, çEH inhibisyonunu takiben inflamatuvar COX metaboliti olan PGE2' nin plazma düzeyinin azaldığı gözlenmiştir [133].

2.2.3.5 EET' lerin PPAR-aracılı Genlerin Ekspresyonuna Etkileri

PPAR transkripsiyon faktörleri yağ asitleri ve türevleri tarafından aktive edilen nükleer reseptör süper ailesinin üyeleridirler [134]. PPAR' lar etkinleştirildiklerinde bir diğer nükleer reseptör olan retinoid X ile heterodimer oluştururlar. Daha sonra bu şekilde hedef genlerin promotor bölgelerindeki spesifik PPAR yanıt elemanlarına bağlanırlar ve bunun sonucunda bazı genlerin ekspresyonlarını baskılayarak veya artırarak düzenlerler [135].

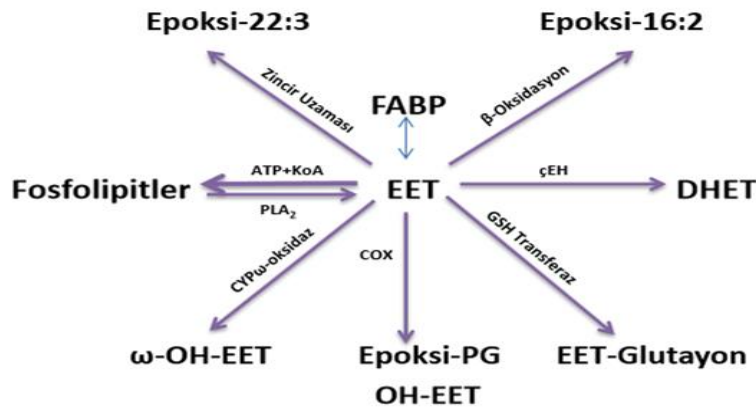
EET' lerin "kalp yağ asidi bağlayıcı proteine" nerdeyse araşidonik asitle aynı ilgiyle bağlanabildiği saptanmış [136] ve bunun üzerine bu moleküllerin, peroksizom proliferatör aktive edici reseptör (PPAR) gibi diğer yağ asidi bağlayıcı hücre içi proteinlere de bağlanabileceği ileri sürülmüştür [80]. Nitekim hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar EET moleküllerinin PPAR' ların ligand bağımlı bir domainine bağlandıklarını göstermiştir. EET' lerin bu yolla PPAR aracılı genlerin ekspresyonunu etkinleştirerek, PPAR aktivatörü olarak işlev gördükleri ileri sürülmüştür [137-139]. 8,9-, 11,12- ve 14,15-EET' lerin PPAR γ ' nın ligand bağımlı bir domainine bağlanarak aktive ettikleri tespit edilmiştir. Bunun sonucunda da NF- κ B aktivasyonunun ve hücreler arası adezyon molekülü-1 ekspresyonunun baskılandığı saptanmıştır. Ayrıca, çEH inhibisyonunun PPAR

aktivasyonu yoluyla endotel hücreleri üzerinde anti-inflamatuar etki yarattığı da gösterilmiştir [139]. EET' ler PPAR α ' nın zayıf bir aktivatörü olmalarına rağmen 11,12- ve 14,15-EET moleküllerinin CYP- ω oksidazların katalizi ile oluşan ω -hidroksilasyon ürünlerinin PPAR α ' nın güçlü birer aktivatörü oldukları belirlenmiştir [138].

2.2.4 EET Metabolizması

Biyokimyasal olarak kısa bir ömre sahip olan EET' ler çEH enzimi tarafından hızlı bir şekilde, genel olarak daha az biyoaktif olan ilgili diollerine (DHET' lere) parçalanırlar. [140]. EET seviyelerinin düzenlenmesinde en etkin yol çEH enzimi tarafından yıkımları olmasına rağmen EET' ler, hücre membran fosfolipitlerinin yapısına katılabilirler, β -oksidasyon, zincir uzaması ve hidroksilasyona da uğrayabilirler.

Ayrıca, AA metabolizmasındaki diğer enzimler tarafından metabolize edilebilirler (Bkz. şekil 2.7) [12].



Şekil 2.7 EET metabolizmasının ana yolları 1) ATP ve koenzim A' ya gereksinim duyulan bir açiltransferaz enzimi aracılığı ile fosfolipitlerin yapısına katılma, 2) PLA₂ katalizi ile bu EET' lerin fosfolipitlerden hidrolizi 3) çEH tarafından EET' lerin ilgili diollerine hidrasyonu. β -oksidasyon ve zincir uzaması ise EET miktarı fark edilir bir boyuta ulaştığında meydana gelir. 8,9-, 11,12- ve 14,15-EET' ler ω -oksidasyona da uğrayabilirler. 5,6-, 8,9-EET' ler COX tarafından biyoaktif ürünlere dönüştürülebilirler. GSH, glutatyon-S-transferaz; FABP, yağ asidi bağlayıcı protein; DHET, dihidroksieikozatrienoik asit; PG, prostaglandin; PLA₂, Fosfolipaz A₂; çEH , Çözünür epoksit hidrolaz; COX, Siklooksijenaz [80].

2.2.4.1 Zincir Uzaması, β - ve ω -Oksidasyon

Zincir uzaması ve β -oksidasyon, deneysel olarak doku çEH aktivitesinin baskılandığı veya inhibe edildiği durumlarda EET miktarındaki artışa paralel olarak meydana gelen metabolik yollarıdır. Zincir uzaması 11,12-EET ve 14,15- EET' den 22 karbonlu bir ürün oluşumu ile sonuçlanır [18, 101, 141]. EET' lerin β -oksidasyonu sonucu çoğunlukla 16 karbonlu ürünler oluşsa da 18 ve 14 karbonlu epoksi yağ asitleri de bu olay sonucu meydana gelebilir [142]. Mutant fibroblastlarla yapılan bir çalışma sonucu EET' lerin β -oksidasyonunun peroksizomlarda meydana geldiği saptanmıştır [143].

2.2.4.2 EET' lerin Glutasyon-S-Transferaz Enzimi Tarafından Konjugasyonu

EET' lerin glutasyon-S-transferaz enziminin katalizi ile EET glutasyon konjugatına dönüşebildiği belirlenmiştir. Fakat glutasyon-S-transferazın EET' lere düşük affinitesi nedeniyle bu metabolik yolağın biyolojik önemi tartışmalıdır [144, 145].

2.2.4.3 EET' lerin COX Enzimleri Tarafından Metabolize Edilmesi

EET' ler, COX enzimleri tarafından da metabolize edilebilirler. Fakat sadece 5,6-EET ve 8,9-EET COX enzimleri için substrattır. COX katalizi sonucu 5,6-EET' den PG analogu olan 5,6-epoksi-PGE₁ oluşurken, 8,9-EET' den 11,12-hidroksi-8,9-EET oluşur [146, 147].

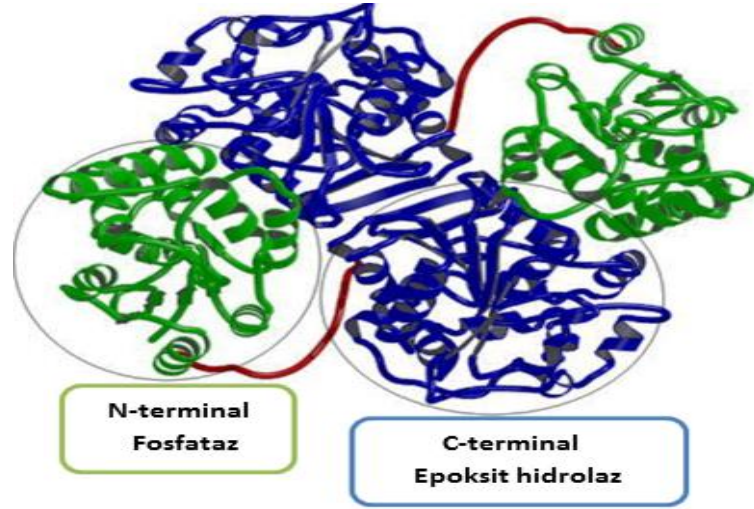
2.2.4.4 EET' lerin Hücre Lipitlerinin Yapısına Katılması

Rat plazmasındaki EET' lerin % 90' nından fazlası çoğunlukla düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) yapısında yer alan fosfolipitlerde bulunur [147, 148]. EET' ler membran fosfolipitlerinin yapısına da katılabilirler, fosfatidik asitin ikinci pozisyonundaki karbona (sn-2) bağlı olarak bulunabilirler [147, 149]. EET' lerin hücre membranındaki fosfolipitlerin yapısına katılması nedeni ile membranın yapısal özelliklerinin EET fonksiyonlarını düzenleyebileceği ileri sürülmektedir [78]. EET' lerin fosfolipitlerin yapısına katılışı koenzim A aracılı bir süreçtir ve büyük bir çoğunluğu fosfotidilkolinin yapısına katılır [147, 149]. Fosfolipitlerin yapısında bulunan EET' ler fosfolipaz A2 aktivitesi sonucu hidrolize olarak serbestleşirler [80]. EET' ler fosfolipitlerdeki total yağ açıl zincirlerinin % 0.01' ni oluştursa da bu moleküller, buldukları bölgedeki lipit mikro çevresini etkileyerek işlevsel değişikliklere yol açabilirler. EET' leri içeren membran fosfolipitlerine fosfolipaz C' nin etkimesi ile diaçilgliserol salınır. EET' ler bu diaçilgliserole bağlı olarak bulunabilirler. Diaçilgliserol lipazın katalizi ile de 2-epoksisatrienoilgliseroller oluşur [150].

2.2.5 çEH Enzimi, Üç boyutlu Yapısı ve Substratları

Omurgalılarda ilk olarak 1972 yılında tanımlanmış olan çEH enzimi “ α/β katlanmalı hidrolaz ailesinin” bir üyesidir [151]. Bu enzim büyük oranda hücrenin çözünür fraksiyonlarında lokalize olmasından dolayı çEH olarak adlandırılmıştır [152]. çEH enzimleri hücrede başlıca sitozolde bulunmakla beraber düşük oranda da olsa mikrozom, mitokondri ve peroksisomlarda da bulunabilirler [153]. çEH enzimi bağırsak, böbrek, beyin ve damarlarda yüksek, akciğer, dalak ve testiste ise daha düşük aktiviteye sahiptir [154].

çEH 62.5 kDa kütleli 2 monomerik üniteden oluşan bir homodimerdir ve bifonksiyonel bir enzimdir [155]. Bu monomerlerden her biri N-terminal (Bkz. şekil 2.8, yeşil) ve C- terminal (Bkz. şekil 2.8, mavi) olmak üzere iki farklı domain içermektedir. C-terminal domain, epoksitleri ilgili diollerine dönüştüren EH aktivitesine sahipken, N-terminal domain lipit fosfatları hidroliz eden etkili bir lipit fosfataz aktivitesi gösterir. Bu N-terminal lipit fosfataz aktivitesinin kolesterol seviyesini *in-vivo* ve *in-vitro* olarak düzenlediği gösterilmiştir [156, 157]. Ayrıca, N-terminal domainin EH aktivitesini stabilize ettiği ileri sürülmektedir [158].

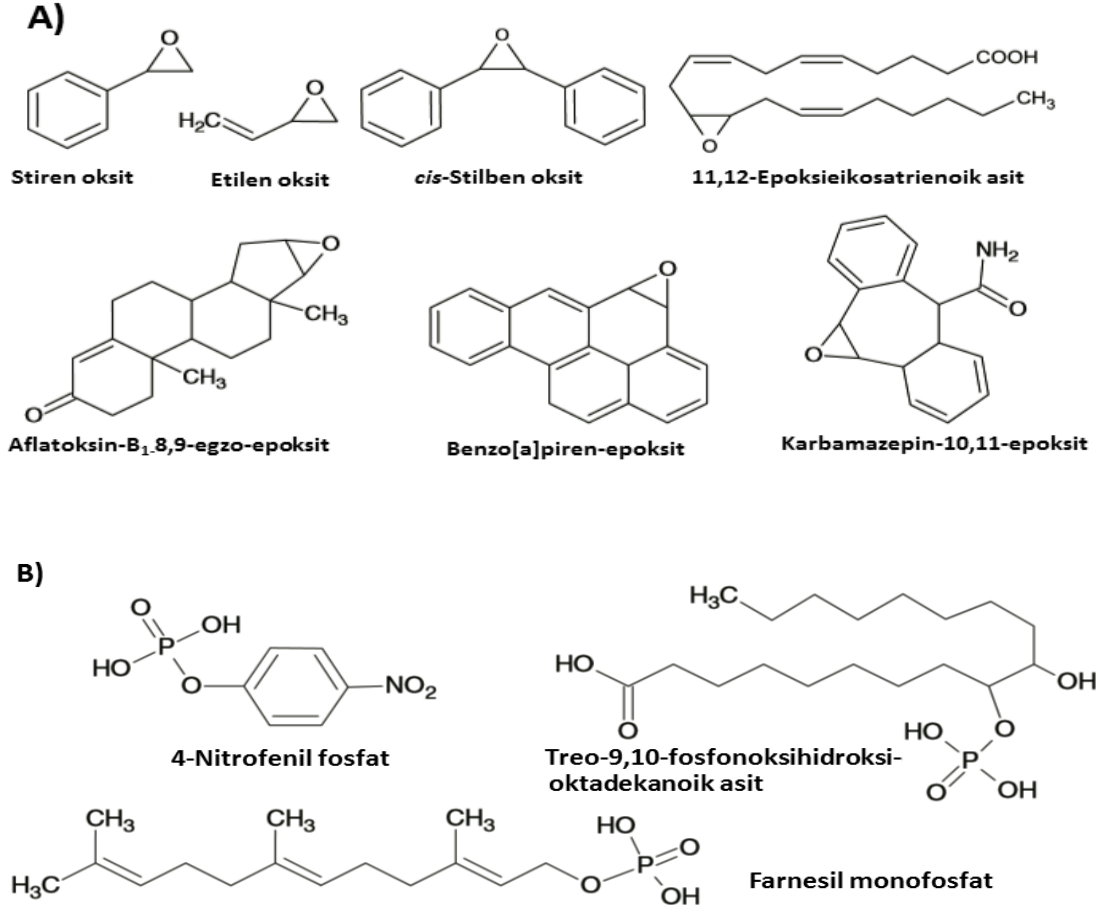


Şekil 2.8 çEH dimerinin kristal yapısı. İki globüler bölgeden oluşan çEH monomerleri üçüncül yapı olarak α/β katlanmasına sahiptirler. Bu monomerler prolince zengin kısa bir bölge aracılığı ile birbirlerine bağlanırlar. çEH dimerleri antiparaleldir. Bu bir monomerin N-terminal bölgesi ile diğer monomerin C-terminal bölgesinin bağlantıda olmasını sağlar [159].

Memeli çEH enzimi, epoksit moleküllerine su ekleyerek bu moleküllerin ilgili diollerine yıkımını katalizler. Bu enzimler endojen EET' leri ve diğer bazı lipit türevli epoksitleri daha az biyoaktif diollere hidroliz ederler. Bu nedenle çEH enzimi EET ve diğer bazı lipit araçlarının düzeyini etkileyerek damar tonusunun düzenlenmesi, nosisepsiyon, anjiyogenez ve inflamatuvar yanıt gibi süreçlerde rol alan bir enzimdir [17-19, 160].

Çözünür epoksit hidrolaz enziminin mEH' nin substratları arasında yer alan bazı epoksit moleküllerinin hidrolizini de katalizlemesi nedeni ile zenobiyotik metabolizmasında, mEH enziminin görevini tamamlayıcı bir rol de üstlendiği bilinmektedir. Bu nedenle son on yıla kadar yapılan çalışmalarda çEH enziminin daha çok hidrolaz aktivitesi ve biyotransformasyondaki rolü üzerine odaklanılmıştır [144].

Fakat çEH enziminin başlıca fizyolojik rolü yağ asiti türevi epoksitlerin ilgili diollerine dönüşümünü sağlamaktır (Bkz. şekil 2.9). Bundan dolayı son zamanlarda enzimin fosfataz aktivitesi ve endojen epoksit metabolizmasındaki rolü üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır [20-22].



Şekil 2.9 A: çEH enziminin başlıca substratları B: çEH enziminin fosfataz aktivitesinin başlıca substratları [20].

2.2.6 çEH Enziminin İnhibisyonu

EET' ler vazodilatatör, anti-inflamatuar ve analjezik özelliklere sahip moleküllerdir [79]. çEH enzimi EET' leri ve diğer epoksi yağ asitlerini hızlı bir şekilde daha az biyoaktif olan ilgili diollerine dönüştürerek, bu moleküllerin organizma için faydalı etkilerinin azalmasına yol açar [140]. çEH enziminin katalizlediği bu tepkime üzerinden hipertansiyon, kardiyak hipertrofi, ateroskleroz, iskemi/reperfüzyon, kanser ve ağrı gibi birçok klinik durumla ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [157, 161]. çEH enzim inhibisyonunun EET' lerin yıkımını azaltarak, bu moleküllerin organizma açısından

yararlı etkileri olan vazodilatatör, anti-inflamatuar ve analjezik özelliklerini artırabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle çEH kardiyovasküler hastalıklar ve diğer bazı hastalıkların tedavisi amacıyla terapötik hedef haline gelmiştir [162]. Hipertansiyonlu hayvan modellerinde çeşitli çEH inhibitörlerinin kan basıncını azaltıcı yönde etki gösterdikleri belirlenmiştir [21, 22]. Ayrıca, yapılan diğer çalışmalarda çEH inhibisyonunun sepsisle indüklenen inflamasyonu [133] ve inflamatuvar ağrıyı azalttığı saptanmıştır [163]. Bu etkilerin, enzimin inhibisyonu ile EET' lerin ve diğer lipit epoksitlerin oranının artması ve bazı proinflamatuvar diollerin düzeyinin azalması ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [133]. Bu nedenle de son yıllarda yapılan çalışmalarda, canlı sistemlerde çEH enzimini inhibe etmede başarılı olabilecek moleküller aranmaktadır [162]. Son zamanlarda geliştirilen sentetik TPAU [1 triflorometoksifenil-3-(1-asetilpiperidin-4-il) üre] ve t-AUCB [trans-4-(4-(3-adamantan-1-il-üreido)-sikloheksiloksil)-benzoik asit] gibi inhibitörlerin diğer çEH inhibitörlerine göre sudaki çözünürlükleri daha fazla ve *in-vivo* ortamdaki yarı ömürleri çok daha uzundur (Bkz. şekil 2.10) [83].

Yapılan birçok inhibitör çalışmasının sonucunda başarılı sonuçlar veren çEH inhibitörlerinin terapötik kullanıma uygunluklarının incelenmesi ve potansiyel yan etkilerinin belirlenmesi amacıyla faz-1 ve faz-2 çalışmaları devam etmektedir [81].

İnhibitörün Adı	İnhibitörün Yapısı
CDU	
AUDA	
AUDA-BE	
AEPU	
t-AUCB	
TUPS	
AR9276	

Şekil 2.10 Başlıca çEH inhibitörleri. CDU, 1-sikloheksil-3-dodesil üre; AUDA, 12-(3-adamantan-1-il-üreido)-dodekanoik asit; AUDA-BE, 12-(3-adamantan-1-il-üreido)-dodekanoik asit bütilester; AEPU, 1-adamantil-3(5-(2-(2- etoksietoksi)etoksi)pentil)üre; t-AUCB, (trans-4-(4-(3-adamantan-1-il-üreido)-sikloheksiloksil)-benzoik asit; TUPS, 1-(1-metansulfonyl-piperidin-4-il)-3-(4-triflorometoksi-fenil)-üre; AR9276, 1-(1-nikotinilpiperidin-4-il)-3-(4(triflotometoksi)fenil)üre [164].

2.2.7 çEH Geni ve Ekspresyonunun Düzenlenmesi

İnsan çözümler epoksite hidrolaz geni (*EPHX2*) kromozomun 8p21-p12 bölgesinde lokalize, 54 kilobaz büyüklüğünde, 18 intron ve 555 amino asiti kodlayan 19 ekzon içerir [25]. *EPHX2* promotoru TATA kutusu içermezken birçok SP-1 bölgesi içerir [165]. Ayrıca, *EPHX2* promotorunda yer alan "aktivatör protein 1 (AP-1)" bölgelerinin anjiyotensin aracılığı ile çEH enziminin ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir [166]. Yapılan diğer bir çalışmada böbrekteki çEH protein düzeyinin artmasının güçlü bir vazokonstriktör olan Ang II tarafından indüklenen hipertansiyonu artırdığı gösterilmiştir [11]. *EPHX2* promotoru "UPRE" ("unfolded protein response element") bölgeleri de içerir. Zhang ve ark. tarafından homosisteinin bu bölgeler üzerinden, aktive edici transkripsiyon faktörü-6 (ATF-6) aracılığı ile *EPHX2* ekspresyonunu artırdığı tespit edilmiştir. Bunun mekanizması da; ATF-6 bağlayıcı motifin *EPHX2* promotorunun metilasyon bölgesi sınırları içerisinde yer aldığı ve homosisteinin bu bölgenin demetilasyonunu artırarak ATF-6'nın bu bölgeye bağlanmasını sağladığı şeklinde açıklanmıştır. Ayrıca, bu araştırmacılar tarafından, çEH inhibitörlerinin, homosisteinin etkili olduğu kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği iddia edilmiştir [167].

Ayrıca, Zhang ve ark. tarafından HepG2 hücre hattında *EPHX2* geni promotoru hipermetilasyonunun bu genin transkripsiyonunu SP-1 bağımlı mekanizma ile baskıladığı belirlenmiştir [30].

DNA metilasyonu önemli epigenetik mekanizmalardan biridir. Epigenetik kavramı ise DNA dizi değişikliği olmadan mayotik ve/veya mitotik olarak kalıtılabilen gen ekspresyon değişiklikleri olarak tanımlanmıştır [168]. Metilasyon, memeli genomunda yalnızca CpG adacıklarında sitozin bazlarında meydana gelir [169]. Sitozin bazının 5. karbonuna metil grubu (-CH₃) eklenmesiyle, 5- metilsitozin oluşur [170]. İlave olan metil grubu baz çifti oluşumunu etkilemez ancak DNA'nın geniş oluşu içerisinde DNA-protein etkileşimini değişime uğratmaktadır. Memeli hücrelerinin genomik DNA'nın yaklaşık olarak % 3-5'inde metilasyon görülmektedir. Sitozin bazında gerçekleşen bu modifikasyon replikasyon sonrası meydana gelir ve bu tepkime S-adenosil-L-metiyonini metil vericisi olarak kullanan DNA metiltransferaz enzimi tarafından katalizlenir [171, 172]. Metilasyon miktarı herhangi bir lokusta hücreden hücreye, bir DNA ipliğinden diğerine, bir CpG adacığından diğerine dinamik olarak sürekli değişmektedir [173]. DNA metilasyonu, transkripsiyonu iki tip mekanizma ile baskılar;

1-Transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına direk müdahale; AP-2, c-myc/myn, cAMP-bağımlı aktivatör CREB, E2F, SP-1 ve NF-kB gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin DNA' yı tanıyıp bağlandığı bölgeler, CpG adacıkları içermektedir. Bu bölgelerde meydana gelen metilasyon nedeniyle transkripsiyon faktörleri bağlanamadığından transkripsiyon inhibe olur. Buna karşın, bazı transkripsiyon faktörleri, bağlanma bölgelerindeki metilasyona duyarlı değildirler ve birçok faktöründe bağlanma bölgesinde CpG dinükleotidleri bulunmamaktadır [174-176].

2-Özgül transkripsiyonel baskılama; Özgül transkripsiyonel baskılayıcının, metillenmiş DNA' ya doğrudan bağlanmasıyla meydana gelir. Metile CpG' leri tanıyan proteinler dizi özgüllüklerine göre;

(a) Dizi özgüllüğü olan metile DNA' ya bağlanma proteini (MDBP)

(b) Dizi özgüllüğü olmayan metile CpG' ye bağlanma proteinleri (MeCP) olmak üzere ikiye ayrılırlar [177].

Bu bilgiler ışığında, Zhang ve ark. tarafından yapılan çalışmada *EPHX2* geninin hipermetilasyonunun çEH ekspresyonunu azaltıcı yöndeki etkisi [30] yukarıda tarif edilen birinci mekanizma üzerinden açıklanabilir.

Yapılan çalışmalar çEH eziminin aktivitesinin ve ekspresyonunun diğer birçok faktör tarafından daha düzenlendiğini göstermiştir. Bunlardan, yüksek derişimdeki glukozun çEH ekspresyonunu baskıladığı belirlenirken [178], PPAR α agonsti ilaçlar [179] ve testosteronun [180] enzim aktivitesini anlamlı olarak artırdığı tespit edilmiştir.

2.2.8 çEH Enziminin Polimorfizmleri

EPHX2 geninde 31 tanesi intron, 13 tanesi de eksonlarda olmak üzere 44 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) belirlenmiştir. Protein kodlayıcı bölgede meydana gelen 13 SNP' den 7 tanesi herhangi bir aminoasit değişimine neden olmazken, diğer altısı (K55R, Cys154Tyr, Arg287Gln, Glu470Gly, Arg103Cys ve Val422Ala) aminoasit değişimi ile sonuçlanır. Bunlardan K55R (9780A>G; Lys55Arg; rs41507953) polimorfizminin çEH aktivitesinde artışa yol açtığı tespit edilirken [181], Arg287Gln (R287Q) polimorfizmi [25] ve Arg402–403 [182] insersiyonunun enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *EPHX2* genindeki çeşitli polimorfizmlerin enzimin epoksit hidrolaz ve lipit fosfataz aktivitesi üzerine olan etkileri Srivastava ve ark. tarafından incelenmiştir. Bu araştırmada K55R, Arg103Cys, Cys154Tyr, Arg287Gln varyantlarının daha düşük fosfataz aktivitesine sahip oldukları ayrıca, K55R ve Cys154Tyr varyantlarının daha yüksek hidrolaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır [183].

R287Q ve K55R polimorfizmlerinin çEH aktivitesinde değikliğe yol açarak, EET düzeylerini etkileyebileceği düşüncesinden hareketle özellikle bu SNP' lerin çeşitli kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyon üzerine etkisi birçok araştırmaya konu olmuştur.

Bir Çin popülasyonunda R287Q polimorfizminin çEH enziminin aktivitesini azaltarak hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenirken [184], Afrikalı-Amerikan'larda yapılan bir çalışmada R287Q polimorfizmi ve hipertansiyon arasında bir ilişki olmadığı saptanmıştır [185]. Gschwendtner ve ark. tarafından beyaz Avrupalılarda bu polimorfizmin artan iskemik felç riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [186]. Aksine, Danimarka popülasyonunda yapılan bir araştırmada ise R287Q polimorfizmi ile iskemik inme, miyokard enfarktüsü ve iskemik kalp hastalıkları arasında bir ilişki saptanmamıştır [187]. R287Q polimorfizminin çEH aktivitesinde azalmaya neden olarak artan EET düzeyleri sayesinde kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etki göstermesi beklenirken Afrikalı-Amerikalı, beyaz bireylerin ve Avrupa kökenli Amerikalı' ların dahil edildiği bazı çalışmalarda bu SNP' nin birçok hücre tipinde intraselüler kalsiyum akışını artırarak koroner arter kalsifikasyon riskini artırdığı bildirilmiştir [188-190]. Wei ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada ise R287Q polimorfizmi ile ilişkili koroner arter kalsifikasyon riskinin sigara içenlerde daha yüksek olduğu gösterilmiştir [28]. Bu çalışmalara ek olarak, R287Q polimorfizminin, bradikinine yanıt olarak siyahi Amerikalı' larda daha düşük damar direncine neden olduğu belirlenirken beyaz Amerikalılarda böyle bir ilişki tespit edilmemiştir [191]. Ayrıca, son zamanlarda gerçekleştirilen bir çalışmada R287Q varyantına sahip bireylerde kateter ablasyonundan sonra atriyal fibrilasyonun nüksetme riskinin anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir [192].

EPHX2 K55R polimorfizminin de koroner arter hastalığı, hipertansiyon, iskemik inme gibi klinik durumlarla ilişkisini inceleyen çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Bir ARIC ("*Atherosclerosis Risk In Communities*") çalışmasında Lee ve ark. tarafından *EPHX2* K55R polimorfizminin beyazlarda koroner arter hastalık riskini artırdığı gözlenirken, Afrikalı-Amerikalı'larda böyle bir risk saptanmamıştır. Bu çalışmada ayrıca, K55R varyant allelini taşıyan beyazlarda *in-vivo* olarak daha düşük plazma EET düzeyine işaret eden daha yüksek bir çEH aktivitesi tespit edilmiştir [26]. Lee ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada da K55R varyantına sahip beyaz Amerikalı bireylerin daha düşük kan akış hızına ve daha yüksek damar direncine sahip oldukları gözlenmiştir. Siyahi Amerikalı' larda ise böyle bir durum saptanmamıştır [191]. Öte yandan cinsiyet göz

önünde bulundurulmuş bir çalışmada ise K55R polimorfizmi yönünden homozigot olan erkeklerin daha yüksek hipertansiyon prevalansına sahip oldukları belirlenmiştir. Fakat kadınlarda böyle bir ilişki tespit edilmemiştir. Ayrıca K55R polimorfizmi yönünden homozigot olan erkeklerde iskemik inme riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir [193]. Merkezi Avrupa’ lılarda yapılan bir araştırmada ise K55R polimorfizmi ile koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve başarılı bir perkütan koroner müdahaleden sonra restenoz riski arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir [27]. Birbirini desteklemeyen bu sonuçlar *EPHX2* genindeki polimorfizm ile kardiyovasküler risk ilişkisinin, analiz edilen populasyonun etnik kökenine sıkı bir şekilde bağlı olduğu ileri sürülerek açıklanmıştır [28, 29].

çEH aktivitesinde değişikliğe neden olan polimorfizmlerin yanı sıra, *EPHX2* geninin kodlanmayan ve 5’, 3’ translasyona uğramayan (UTR) bölgelerindeki bazı polimorfizimlerin çeşitli hastalıklarla ilişkilerini inceleyen bazı çalışmalar da bulunmaktadır [186, 190, 194, 195]. Beyaz Avrupalı’ larda yapılan bir araştırmada *EPHX2* geninin intronik bölgesinde yer alan rs7357432 ve rs2291635 polimorfizmlerinin artan iskemik felç riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [186]. Bir diğer araştırmada ise yine intronik bölgede yer alan rs7837347 polimorfizminin Afrikalı-Amerikalı’ larda koroner arter plak gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [190].

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Realtime PCR (Qiagen, Rotar Gene Q 6000; Almanya)
- Thermal Cycler (Gen Amplifikasyon PCR sistem 9700 Applied Biosystems; ABD)
- Nanodrop spektrofotometresi (Maestro gen; Tayvan)
- ELISA okuyucusu (GF-M3000; Çin Halk Cumhuriyeti)
- ELISA mikro plak yıkayıcısı (GF-W3000; Çin)
- SpeedVac (Eppendorf; Almanya)
- Sabit başlıklı masa üstü santrifüj (Hettich Rotina 380R; Almanya)
- Otoklav (Nüve steamArt; Türkiye)
- Mikro santrifüj (Eppendorf 5415C; Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve MK 218; Türkiye)
- Isıtma bloğu (Stuart Scientific; Birleşik Krallık)
- Güvenlik kabini (Bilser class 2; Türkiye)
- pH metre (ADWA; Romanya)
- Hassas terazi (SARTORIUS; Almanya)
- Otomatik pipetler (P10, P20, P200, P1000, Gilson; ABD, Discovery Comfort; Polonya)
- Derin dondurucu (ARISTON; İtalya)
- Buzdolabı (Arçelik; Türkiye)
- Vorteks (WiseMix; Kore)
- Steril pipetler (5 ml, 10 ml)
- Steril polipropilen test tüpleri (15 ml, 50 ml)
- Steril mikrosantifüj tüpleri (1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml)
- Steril sitratlı tüpler (5 ml, BD Vacutainer; ABD)
- Çeşitli ebatlarda erlen, beher, cam pipet ve mezürler (Teknik cam, Türkiye)
- Otomatik pipet uçları (Sarı, mavi, beyaz, Gilson; ABD)
- Otoklav bandı (VP Medical Packaging)
- Strip Tüp (Qiagen 0,1ml, Almanya)
- Parafilm (BEMIS; ABD)
- Gözlük (sperian, Armamax; Birleşik Krallık)
- Eldiven (Broche; Türkiye)

3.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler

- Metanol (MERCK; Almanya)
- Etanol (MERCK; Almanya)
- Sodyum hidroksit (MERCK; Almanya)
- Potasyum hidroksit (MERCK; Almanya)
- Asetik asit (Riedel deHaen; Almanya)
- Formik asit (MERCK; Almanya)
- Etil asetat (SİGMA; Almanya)
- QıAmp DNA Blood Mini Kit (250) (Qiagen; Almanya)
- EpiTect unmethylated human control DNA (Qiagen; Almanya)
- EpiTect unmethylated human control DNA, Bisulfite converted (Qiagen; Almanya)
- EpiTect methylated human control DNA, Bisulfite converted (Qiagen; Almanya)
- EpiTect Bisülfite Kit (QIAGEN; Almanya)
- EpiTect HRM PCR Kit (QIAGEN; Almanya)
- SNP Kiti (PrimerDesign® Ltd; Birleşik Krallık)
- 11,12-DHET ELISA Assay kit (Eagle Biosciences, Inc; ABD)

3.3 Hasta ve Kontrol Grubu

3.3.1 Hastalar

Bu çalışmada hasta grubu, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine başvuran, preeklampsi tanısı konmuş ve öyküsünde primer karaciğer, böbrek, kardiyovasküler veya hipertansiyon hastalığı bulunmayan 260 kadından oluşturuldu. Preeklampsi teşhisi, daha önce normotansif olan kadınlarda 20. gebelik haftasından sonra sistolik kan basıncının 140 mmHg ve üzerinde olması veya diastolik kan basıncının 90 mmHg ve üzerinde olması ve buna proteinürinin eşlik etmesi (24 saatlik idrar örneklerinde 0.3 gram ve üzeri protein bulunması veya protein/kreatinin oranının 0.3 ve üzerinde bir değere sahip olması) veya son organ hasarı belirtilerinin (trombosit sayısının mikrolitrede 100000' den az olması, serum kreatinin düzeyinin 1.1 mg/dL' den fazla olması veya normal derişimine göre serum kreatinin düzeyinin iki katına çıkması, ALT ve AST düzeyinin serumda artması) eşlik etmesi ile konuldu [4]. Çalışma öncesi Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı' ndan 30.11.2010 tarih ve 2010-01/09 sayılı karar ile onay alındı (Ek- 1).

3.3.2 Kontroller

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine başvuran, preeklampsi hastası olmayan, kronik hipertansiyonu, diyabeti bulunmayan, gebelikte 20. haftayı doldurmuş 260 gebe ve gönüllü kadın çalışmamızın kontrol grubunu oluşturdu.

3.4 Kan Örneklerinin Toplanması

Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen bireyler bilgilendirilip, aydınlatılmış onam formu okutularak imzalandıktan sonra, her birinden 10 mL kan örneği steril, sitratlı tüplere alındı. Bu kan örneklerinin bir kısmından genomik DNA izole edildi. Geriye kalan kan örnekleri 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek plazmalar elde edildi ve 11, 12-DHET düzeylerinin belirlenmesi amacıyla güne kadar -20 °C' de muhafaza edildi.

3.5 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubuna ait bireylerden sitratlı tüplere alınan kan numunelerinden kandan DNA izolasyon kiti kullanılarak, kit üreticisinin talimatları doğrultusunda genomik DNA izole edildi.

Yöntemin temel prensibi: Genel olarak bu metot, yüksek kaotropik tuz derişiminde nükleik asitlerin silika membrana seçici adsorbiyonu esasına dayanır. Tampon çözeltiler yardımı ile diğer hücre proteinleri ve metabolitleri uzaklaştırılırken sadece nükleik asidin silika membrana bağlanması sağlanır.

Proteinaz K ve kaotropik iyonları içeren bir çözeltide, tam kan inkübe edilerek lizis gerçekleştirilir. Lizata etanolün eklenmesi ile DNA, spin kolonunun silika membranına bağlanır. Bu bağlanma süreci geri dönüşümlü ve nükleik asitlere spesifiktir. Yıkama basamakları etkin bir şekilde kontaminasyonları uzaklaştırır. Son olarak saf genomik DNA, düşük kuvvette iyonik koşullar altında elde edilir.

3.5.1 Tam Kandan Genomik DNA İzolasyon Protokolü ("Spin" Protokol)

İzolasyona Başlamadan Önce Yapılanlar:

- ✓ Kan örneklerinin oda sıcaklığına ulaşması sağlandı.
- ✓ Isıtcılı blok 56 °C' ye ayarlandı.
- ✓ Kit, ilk kez açıldığında çözeltiler, aşağıda tarif edildiği gibi hazırlandı.

QIAGEN Proteaz Stok Çözeltilisi: Liyofilize QIAGEN Proteaz' ın (proteinaz K) üzerine 5,5 mL proteaz çözücüsü eklenerek çözünmesi sağlandı.

Tampon AW1: 130 mL mutlak etanol eklendi ve karıştırıldı.

Tampon AW2: 160 mL mutlak etanol eklendi ve karıştırıldı.

Bu işlemlerden sonra aşağıdaki basamaklar sırası ile takip edildi.

1. Kan Örneğinin Lizisi

Yirmişer μL proteinaz K ve 200' er μL kan örnekleri 1,5 mL' lik steril mikrosantrifüj tüplerine pipetlendi. Daha sonra bu tüplerin her birine 200' er μL tampon AL pipetlendi. Ardından her tüp 10-20 saniye vortekslendi. Örnekler ısıtma bloğuna alınarak 56 °C' de 10 dakika inkübe edildi.

2. DNA' nın Slika Membrana Bağlanması İçin Koşulların Ayarlanması

Her örneğe 200 μL mutlak etanol eklendikten sonra vortekslendi ve daha sonra kısa süreli santrifüj edildi.

3. DNA' nın Slika Membrana Bağlanması

Her örnek için birer adet toplama tüpü açıldı ve her birinin üzerine birer adet spin kolon yerleştirildikten sonra numaralandırıldı. Lizis edilmiş her numune bu kolonlara sırası ile ve slikeya zarar vermeden dikkatlice aktarıldı. Kolonların kapağı kapatıldı ve 6000xg' de, 22 °C' de 1 dakika santrifüj (Eppendorf 5415C Mikrosantrifüj) edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpleri, içinde toplanan sıvı ile birlikte atıldı. Spin kolonlar yeni açılmış toplama tüplerine yerleştirildi.

4. Slika Membranın Yıkama

Birinci yıkama

Yeni toplama tüpüne yerleştirilmiş kolonlara, slikeya zarar vermeden, dikkatlice, 500 μL tampon AW-1 pipetlendi. Kolonların kapağı kapatılarak, tekrar 6000xg' de, 22 °C' de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra, toplama tüpleri yenisi ile değiştirildi.

İkinci yıkama

Spin kolonlara 500 μL tampon-AW2 pipetlendi ve kapakları kapatıldı. Daha sonra, 20000xg' de, 22 °C' de 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpleri tekrar yenisi ile değiştirildi.

5. Slika Membranın Kurutulması

Spin kolonlar 20000xg' de, 22 °C' de 1 dakika santrifüj edilerek kurutuldu, toplama tüpleri atıldı.

6. DNA' nın elüsyonu

Kolonlar bu kez 1,5 mL' lik steril mikrosantrifüj tüplere yerleştirildi ve kolonların slika membranı üzerine, kolona ve membrana temas etmeden tampon AE ilave edildi. Spin kolonların kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve daha sonra 6000xg' de, 22 °C' de 1 dakika santrifüj edilerek DNA elü edildi. Elde edilen DNA' ların kalite kontrolü yapılarak -20 C' de muhafaza edildi.

3.6 DNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi

DNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi için nanodrop spektrofotometresi kullanıldı (A_{260} ' da ölçülen 1= 50 µg/mL çift zincirli DNA). İzole edilen DNA örneklerinin A_{260}/A_{280} oranınının 1.8 civarında olmasına dikkat edildi.

3.7 Genotipleme

EPHX2 geninin K55R polimorfizmi yönünden genotiplendirilmesi SNPSİG kiti ile diziye özgü çift boyalı hidroliz propları ve primerler kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ("*real-time PCR*"; RT-PCR) cihazında allelik ayırım analizi yapılarak gerçekleştirildi. Bu yöntemde problardan biri yabancı tipe spesifik olup sarı kanalda (VIC kanalı) floresan ışımaya verecek şekilde, diğeri homozigot polimorfik tipe spesifik olup turuncu kanalda (ROX kanalı) floresan ışımaya verecek şekilde işaretlenir. Heterozigot örnekler ise her iki kanalda birden floresan ışımaya verir.

3.7.1 Örneklerin Hazırlanışı

Primer, prop karışımı: 55 µl "*nükleaz free*" su ilave edildi ve 10-15 sn. vortekslenerek çözünmesi sağlandı.

Yabancı tip pozitif kontrol ve homozigot polimorfik tip pozitif kontrol DNA' ları: Liyofilize DNA örneklerine 500 µl "*nükleaz free*" su ilave edilerek 250 ng/µL' lik stok kontrol DNA' ları elde edildi. Bu stok DNA' lar 2 ng/µL olacak şekilde "*nükleaz free*" su ile seyreltildi.

3.7.2 *EPHX2* K55R Polimorfizminin Belirlenmesi

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylere ait genomik DNA' ların her birinin allelik ayırımını yapmak amacıyla çizelge 3.1' de verilen miktardaki bileşenler pipetlenerek polimeraz zincir reaksiyon (PCR) karışımları hazırlandı. Her bir deney için hasta ve

kontrol grubuna ait DNA' larla birlikte negatif kontrol, "yabanıl tip pozitif kontrol" ve "homozigot polimorfik tip pozitif kontrol" DNA' ları için de PCR karışımları hazırlandı.

Çizelge 3.1 PCR ortamının hazırlanışı

PCR Bileşenleri	Hacim
Mastermix (dNTP, enzim, tampon ve tuz)	5µL
Primer/Prob karışımı	0.5µL
Su	2 µL
DNA (2ng/ µL)	2.5µL
Toplam Hacim	10µL

Hazırlanan PCR karışımları RT-PCR cihazına yerleştirildi ve çizelge 3.2' de verilen program uygulanarak ilgilenilen gen bölgesi amplifiye edildi.

Çizelge 3.2 DNA Amplifikasyon programı

	Basamak	Zaman	Sıcaklık
	qPCR Enzim Aktivasyonu	95 °C	8 dk
10 Döngü	Denatürasyon	95 °C	10 s
	Uzama	60 °C	60 s
35 Döngü	Denatürasyon	95 °C	10 s
	Uzama (Veri Toplama)	68 °C	60 s

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin K55R polimorfizmi yönünden genotiplendirilmesi RT-PCR cihazında allelik ayırım analizi kullanılarak yapıldı.

3.8 EPHX2 Geni Promotor Bölge Metilasyon Analizi

3.8.1 Bisülfid Dönüşüm İşlemi

Bisülfid dönüşüm işlemi bir DNA dizisinin metilasyon durumunu belirleme aşamasına geçmeden önce metile olan ve metile olmayan sitozinleri birbirinden ayırmak amacıyla uygulanan bir yöntemdir. Bu aşamada hedef DNA' nın sodyum bisülfid ile muamelesi

sonucu tüm metile olmayan sitozinler urasile dönüşürken metile sitozinler ise değişmeden kalmaktadır. Dönüşen urasil nükleotidleri PCR işlemi sırasında timine dönüştürülür [196].

Çalışmamızda DNA izolasyon aşaması sonrası elde edilen DNA' ların bisülfite dönüşüm işlemi için Epitect Bisulfite Kiti kullanıldı. Deneyin her aşamasında kit protokolüne uyuldu.

3.8.1.1 Bisülfite Dönüşümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama tamponu (“Buffer BW”, Tampon BW): Deneye başlamadan önce 30 ml mutlak etanol (% 96–100), tampon BW çözelti şişesine ilave edildi ve karıştırıldı.

Tampon BD (“Buffer BD”): 27 mL mutlak etanol tampon BD çözelti şişesine ilave edildi ve karıştırıldı.

Taşıyıcı RNA: DNA örneklerinin spin kolonun membranına bağlanma oranını artırmak amacıyla kullanıldı. “RNaz free” su kullanılarak 1 µg/µl taşıyıcı RNA çözeltisi oluşturuldu.

Taşıyıcı RNA + Tampon BL: 1 µg/µL taşıyıcı RNA' nın tamamı tampon BL çözelti şişesine ilave edilerek karıştırıldı.

Bisülfite karışımı: 800 µL “RNaz free” su bisülfite karışımının üzerine eklenerek 20-25 sn. vortekslendi. Bu karışım, tamamen çözünmesi için 60 °C’ de 3-5 dakika bekletildi. Daha sonra tekrar vortekslendi.

DNA koruyucu tampon: Bisülfite muamelesi sırasında yüksek sıcaklık ve düşük pH’ da DNA örneklerinin parçalanmasını önlemek amacıyla kullanıldı.

Elüsyon tamponu (“Buffer EB”): Spin kolonun membranına bağlanan DNA’ nın elüsyonu için kullanıldı.

3.8.1.2 Deneyin Yapılışı

1. Her DNA örneği için çizelge 3.3’ de verilen tepkime karışımları hazırlandı.

Çizelge 3.3 Bisülfite dönüşümü tepkime bileşenleri

Bileşen	Hacim (µL)
DNA	20 µL (total 300-900 ng)
Bisülfite karışımı	85 µL
DNA koruyucu tampon	35 µL
Toplam hacim	140 µL

2. Çizelge 3.4’ deki termal döngü programı uygulanarak bisülfite tepkimesi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.4 Bisülfıt dönüşümü termal döngü programı

İşlem	Süre	Sıcaklık
Denatürasyon	5 dk	95 °C
İnkübasyon	25 dk	60 °C
Denatürasyon	5 dk	95 °C
İnkübasyon	85 dk	60 °C
Denatürasyon	5 dk	95 °C
İnkübasyon	175 dk	60 °C

3. Tepkime sonrası karışımlar, 1.5 mL' lik mikrosantrifüj tüplerine alındı ve üzerlerine 560 µL taşıyıcı RNA + tampon BL ilave edilerek 30-40 sn. vortekslendi.
4. Bu karışımlar spin kolonlara aktarılarak mikrosantrifüjde 12000 rpm' de 4 °C' de 1 dk santrifüj (Hettich Rotina 380R) edildi. Santrifüjden sonra altta kalan artık BL atıldı ve spin kolonlar tekrar toplama tüplerine yerleştirildi.
5. Dördüncü basamak, yıkama tamponu kullanılarak tekrarlandı.
6. Kolonlara 500 µL tampon BD pipetlendi ve kapakları kapalı şekilde 15 dk 15-25 °C' de inkübasyona bırakıldı. 12000 rpm' de, 4 °C' de 1 dk santrifüj edilerek toplama tüplerindeki altta kalan sıvı atıldı ve kolonlar tekrar toplama tüplerine yerleştirildi.
7. Kolonlar 500 µL yıkama tamponu ile iki defa yıkandı ve yeni toplama tüplerine alınarak 12000 rpm' de, 4 °C' de 1 dakika tekrar santrifüj edildi. Toplama tüpleri atıldı, kolonlar 1.5 ml' lik steril mikrosantrifüj tüplerine alındı.
8. Bisülfıt dönüşümü gerçekleştirilmiş tek zincirli halde bulunan DNA' lar, 25 µL elüsyon tamponu kullanılarak, aynı koşullardaki santrifüj işlemi ile elüe edildi.

Elde edilen DNA' lar MS-HRM analizinde kullanıldı. DNA kalite ve miktarının belirlenmesi amacıyla nanodrop spektrofotometresinden yararlanıldı. DNA örneklerinin A_{260}/A_{280} oranının 1.8 civarında olmasına dikkat edildi. Ayrıca, bisülfıt dönüşümünün gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek üzere unmetile olduğu bilinen ve bisülfıt dönüşümü gerçekleştirilmemiş universal DNA (bisülfıt kontrol DNA), yapılan her bisülfıt modifikasyonu ile birlikte dönüşüm işlemine tabi tutuldu. Bu DNA örnekleri metilasyon standartları, hasta ve kontrol örnekleri ile birlikte aynı primerler kullanılarak amplifiye edildi.

3.8.2 EPHX2 Geni Promotor Bölge Metilasyon Düzeyinin Belirlenmesi

Hasta ve kontrol grubunda yer alan ve bisülfıt dönüşümü gerçekleştirilen DNA örneklerinde *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyi DNA' nın sıcaklıkla

denatürasyonunun floresan boya ölçümü ile takibi esasına dayanan “*methylation-sensitive high resolution melting*” (MS-HRM) yöntemiyle incelendi.

MS-HRM analizinde öncelikle, bisülfite ile tamamen dönüştürülen genomik DNA’lardaki *EPHX2* geni promotor bölgesine ait bir adet CpG adasının bir kısmını kapsayan bölge, bisülfite dizisine özgü primerler kullanılarak (Bkz. şekil 3.1) RT-PCR cihazında amplifiye edildi. Amplifikasyon işlemi için EpiTect HRM PCR kiti kullanıldı ve çizelge 3.5’ e uygun PCR karışımları hazırlandı.

Çizelge 3.5 PCR ortamının hazırlanışı

PCR bileşenleri	Hacim (µL)
2X Master Mix (dNTP, enzim, tampon, tuz ve Eva green)	12.5
10µM M F-Primer	1.9 (final derişim 0.75 µM)
10µM R-Primer	1,9 (final derişim 0.75 µM)
RNase-free su	7.7
DNA (10 ng)	1
Toplam hacim	25

Amplifikasyonda kullanılan primerler, *EPHX2* geni promotor bölgesine ait bir adet CpG adasının bir kısmını kapsayacak ve 72 bp uzunluğunda PCR ürünü elde edilecek şekilde dizayn edildi (Bkz. şekil 3.1).

A)	
2101	tcttcgacct tgacggggtg ctggcgctgc cagcgggtgtt cggcgtcctc ggccgcacgg
2161	aggaggcctt ggcgctgccc aggtaagggg gccagcgcgc gccgcccagc tgggtcgggg
2221	cctcaggagg cagaccgcgc tgggcttgca gccagcttt cagattgctc ctgtgcggga
B)	
2101	ttttcgattt tgacggggtg ttggcggtgt tagcgggtgtt cggcgttttc ggtcgtaagg
2161	aggaggtttt ggcgctgccc aggtaagggg gtttagcgtc gtcgctcgtag tgggtcgggg
2221	tttaggagg tagatcgcgt tgggtttgta gtttagtttt tagattgttt ttgtgtcggga

Şekil 3.1 *EPHX2* geni promotor bölgesinin bir kısmını içeren, orijinal nükleotid dizisi ve bisülfite dönüşümü sonucu elde edilen dizi; **A**: *EPHX2* geninin promotor bölgesinin bir kısmını kapsayan nükleotid dizisi (Nükleotid dizisi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresinden alınmıştır, GenBank: EU584434.1). **B**: A’ daki dizi bisülfite dönüşümüne tabi tutulduktan sonra elde edilen dizi. Kırmızı renk ile belirtilen t harfleri bisülfite dönüşümü sonucu urasile ve daha sonra PCR sırasında timin (t) bazına dönüşen sitozin (c) bazlarını göstermektedir.

■: İleri (Forward) Primer (1 adet CpG içermektedir); ■: Geri (Reverse) Primer (1 adet CpG içermektedir); c: CpG

MS-HRM analizinde metilasyon düzeyini belirlemeyi amaçladığımız PCR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri ile metilasyon oranı bilinen standart PCR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri karşılaştırıldı. Metilasyon oranı bilinen standart PCR ürünlerinin oluşturulmasında % 100 metile ve metile olmayan, daha önce bisülfite muamelesine tabi

tutulmuş universal DNA' lardan hazırlanan %100, %75, %50, %25, % 5 metile ve metile olmayan DNA standartları kalıp olarak kullanıldı (Bkz. çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Metilasyon standartları ve karışım oranları

	%100 metile Universal DNA (Hacim µL)	%100 metile olmayan universal DNA(Hacim µL)
% 100 metile standart	20	0
% 75 metile standart	15	5
% 50 metile standart	10	10
% 25 metile standart	5	15
% 5 metile standart	1	19
metile olmayan standart	0	20

Standartlar hazırlandıktan sonra vortekslenerek kısa süreli santrifüj edildi. Daha sonra her deney için bu altı standart ve bisülfid kontrol, hasta ve kontrol DNA' ları ile birlikte amplifiye edildi. Amplifikasyon ve HRM analizi için çizelge 3,7' de verilen program uygulandı.

Çizelge 3.7 Amplifikasyon ve HRM analiz programı

	Basamak	Zaman	Sıcaklık
	qPCR Enzim Aktivasyonu	95 °C	5 dk
45 Döngü	Denatürasyon	95 °C	10 s
	Bağlanma	55 °C	30 s
	Uzama (Floresan veriler bu aşamadayken yeşil kanaldan okuma yapılarak elde edilir)	72 °C	10 s
HRM analiz aşaması	Her 2s' de bir 0,1 °C sıcaklık artışıyla, 65 °C den 95 °C' ye çıkılır, HRM kanalından floresan veriler elde edilerek değerlendirilir.		

3.8.2.1 Elde Edilen PCR Ürünlerinin Özgüllüğünün Belirlenmesi

EPHX2 geni promotor bölge metilasyon düzeyinin belirlenmesi amacıyla elde edilen amplifikasyon ürünlerinin özgüllüğünün saptanması RT-PCR cihazında erime eğrisi analizi ile yapıldı ve agaroz jel elektroforezi kullanılarak da doğrulandı.

3.8.2.1.1 Agaroz Jel Elektroforezi

DNA' nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerindeki göçüne dayanır. Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapsına, jelde kullanılan maddenin derişimine, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir. Geliştirilmiş elektroforez teknikleri içinde nükleik asitler için en çok kullanılan agaroz jel elektroforezidir. Agaroz kırmızı bir alg türü olan *Agar agar*' dan izole edilen doğrusal bir

polisakkariddir. Agaroz suda çözünür ve soğutulduğu zaman, polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Agaroz jel elektroforezinde analizi yapılacak örneğe (DNA) uygun tampon kullanılarak işlem gerçekleştirilir. Hafif moleküller hızlı ilerlerken ağır olanlar daha yavaş ilerleyebilir. Ayrılan farklı DNA parçalarına ait bantları saptamakta floresan bir boya kullanılır ve UV ışıkta gözlem yapılır. Agaroz jel elektroforezinde DNA için kullanılan floresan boya olan edityum bromür elektroforez işleminin tamamlanmasından sonra çift iplikçikli DNA'nın baz çiftlerine bağlanır ve kırmızı floresan yayarak DNA profillerinin görüntülenmesini sağlar [197].

Çalışmamıda elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde molekül büyüklüklerine göre ayrıldı. Elektroforez 100 V' de 45 dk. % 2' lik agaroz jelde yapıldı. Elektroforez sonrasında DNA U.V. transilluminasyonu ile görünür hale geldi ve jel görüntüleme cihazında fotoğraflandı.

%2' lik Jelin Hazırlanması: 100 ml' lik % 2' lik jel hazırlamak üzere 2 gr agaroz ve 100 ml X1 'lik TAE çözeltisi bir erlene konularak mikro dalga fırında berraklaşınca kadar kaynatıldı. Bu jel el yakmayacak kadar soğutulduktan sonra üzerinde 15 µl (10 mg/ µl) kadar edityum bromür ilave edildi ve karıştırılarak jel tankına döküldü. Jel dökümü sırasında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi ve elektroforez işlemine tabi tutulacak DNA örneklerinin yüklenmesi için kuyucuklar oluşturmak amacıyla uygun tarak jele yerleştirdi. Jelin polimerleşmesi için yaklaşık 20-30 dakika oda ısısında bekletildi. Jel tamamen polimerleştikten sonra tarak kuyucuklara zarar vermeden dikkatli bir şekilde çıkartıldı.

PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi: 10 µl PCR ürününe 2 µl 6X yükleme boyası ilave edilerek jel kuyucuklarına, sırası ile yüklendi. PCR ürünlerinin büyüklüklerini karşılaştırmalı olarak belirlemek için 50 baz çiftlik DNA belirteci kullanıldı (Gene Ruler™ DNA Ladder). Jele yüklenen PCR ürünleri 100 voltta 45 dakika yürütüldü ve Transillüminatörün UV ışığı altında görüntülendi.

3.9 Plazmada 11, 12-DHET Düzeyinin Belirlenmesi

11, 12-DHET düzeyi 75 hasta ve 75 kontrole ait plazmada, human 11, 12-DHET, ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile belirlendi. Analizin her aşamasında kitin "plazma veya serumda 11,12-DHET ölçümü" talimatına uyuldu.

Prensip: 11,12 DHET ve 11, 12-DHET-HRP konjugatının, anti-11,12 DHET antikoru ile kaplanmış kuyucuklara bağlanmak için yarışmaları esasına dayanır. Her kuyucuğa sabit derişimde konjugat uygulandığından örneklerdeki 11,12-DHET derişimi HRP aktivitesi ile ters orantılıdır.

Kullanılan Çözeltiler

1. Saponifikasyonda kullanılan % 20' lik KOH çözeltisi: 1 hacim, 2M KOH, 4 hacim metanol içinde çözüldü. Böylelikle son derişimi 0,4 N olan KOH çözeltisi elde edildi.

2. Yıkama tamponu: 1X Yıkama tamponu elde edilecek şekilde seyreltildi

3. HRP konjugat: 1 ampül 11,12-DHET-HRP konjugata (12 µL) 12 mL 1X HRP tamponu ilave edildi. Bu çözelti aynı gün kullanıldı.

4. Standart sulandırıcı tampon: 1 X Standart sulandırıcı tamponu elde edilecek şekilde seyreltildi.

5. 11, 12-DHET standardı: 1µg/mL' lik standart elde etmek üzere liyofilize 11,12-DHET (2 µL) üzerine 1998 µL, 1 X Standart sulandırıcı tampon ilave edildi.

6. 2N Sülfürik asit çözeltisi

Not: 2, 3, 4 ve 5 numaralı çözeltiler ELISA deneyinin yapılacağı gün hazırlandı.

11, 12-DHET plazmada serbest halde bulunmadığından ELISA yöntemine geçmeden önce kit talimatı doğrultusunda plazma örneklerinden 11, 12 DHET izolasyonu aşağıda açıklandığı gibi gerçekleştirildi.

3.9.1 Plazma Örneklerinden 11, 12 DHET' nin İzolasyonu

1. Her örneğe ait 1,8 mL plazmanın pH' sı asetik asit ile 4' e ayarlandı ve vortekslendi.
2. Bu plazmalara 1,8 mL etil asetat ilave edildi ve 22°C' de 2000 rpm' de (~1000xg) 10 dakika santrifüj (Hettich Rotina 380R) edildi.
3. Santrifüj işlemi sonucunda her tüpte lipoproteinlerin yer aldığı organik faz veya etil asetat fazı (en üstte), proteinler bakımından zengin olan ara faz (ortada) ve sıvı faz (en altta) oluştu.
4. En üstteki organik fazlar yeni bir falkon tüpe pipet yardımı ile aktarıldı. En alttaki faz da yeni bir falkon tüpe pipetlendi ve ortadaki faz atıldı.
5. En alttaki faza sıızan organik fazları da alabilmek amacıyla 2-4. basamaklar tekrarlanarak 2 kez daha etil asetat ekstraksiyonu yapıldı. Bu şekilde her örneğe ait elde edilen organik fazlar tek bir tüpte toplandı ve ekstrakte sedimentler elde etmek amacıyla "SpeedVac" cihazında 1400 rpm' de 3-4 saat döndürülerek kurutuldu.

6. Yağ asitlerini gliserol omurgasından ayırmak için gerekli saponifikasyon işlemi için elde edilen kuru ekstraktlar 2mL, % 20' lik KOH' da çözünerek 1-2 dakika vortekslendi ve 50 °C' de 1 saat inkübe edildi.
7. Bu karışımlara 3 mL deiyonize su ilave edilerek seyreltildi. Daha sonra bu örneklerle bir miktar % 20 formik asit (yaklaşık 132 µL) ilave edilerek pH' nın 5.5 olması sağlandı.
8. Üzerine eşit hacimde etil asetat eklenerek vortekslendi ve 22 °C' de 2000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez daha tekrarlandı ve saponifiye edilmiş lipitleri içeren üst fazlar toplandı.
9. Bu üst fazlar daha sonra “*SpeedVac*” cihazında kurutularak örnek sedimentleri elde edildi. Bu sedimentler ELISA testi için -20 °C' de muhafaza edildi.

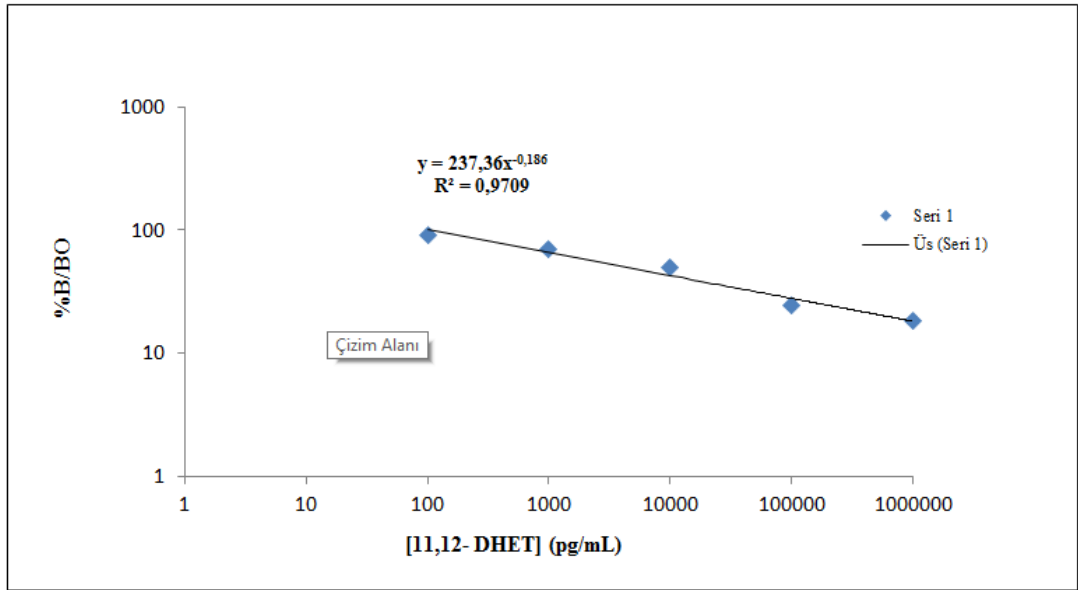
3.9.2 Plazma 11, 12 DHET Düzeyinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

1. Deneye başlamadan önce tüm numune ve reaktiflerin oda sıcaklığına ulaşması sağlandı.
2. ELISA işlemi için plazmadan izole edilen sedimentler önce 20 µL etanol içerisinde çözüldü ve üzerlerine 130 µL, 1X standart sulandırıcı tampon ilave edildi. Daha sonra bu 150 µL' lik numunelerden 80 µL alınarak üzerlerine 320 µL 1X standart sulandırıcı tampon eklendi. Böylelikle 1:4 oranında seyreltildiler. Örneklerin pH' sının 7.4 olmasına dikkat edildi.
3. Standart sulandırıcı tampon kullanılarak 1000000, 100000, 10000, 1000, 100 ve 10 pg/mL human-11,12 DHET standartları hazırlandı.
4. Standart kuyucuklarına her standarttan 100' er µL ilave edildi.
5. “*Blank*” kuyucuklarına (BL) 200 µL, maksimum bağlanma (BO) kuyucuklarına da 100 µL standart sulandırıcı tampon eklendi.
6. Numune kuyucuklarına her numuneden 100' er µL ilave edildi.
7. BL kuyucuğu dışındaki tüm kuyucuklara 100' er µL seyreltilmiş 11,12-DHET-HRP konjugatı eklendi.
8. ELISA plağı bu haliyle oda sıcaklığında iki saat inkübe edildi.
9. Plak 3 defa 400 µL seyreltilmiş yıkama tamponu ile ELISA mikro plak yıkayıcı cihazında yıkandı ve kurutuldu.
10. Tüm kuyucuklara 200 µL tetrametilbenzidin substratı ilave edildi ve oda sıcaklığında 15-30 dakika inkübe edildi.

11. Her kuyucuğa 50 µL, 2N sülfürik asit pipetlendi. Plak 450 nm’ de ELISA okuyucusunda okundu.

3.9.3 “11,12-DHET” Düzeylerinin Hesaplanması

1. BO, standart ve numunelere ait okunan absorbans değerlerinden “blank” in absorbans değeri çıkarıldı. Standart ve numunelere ait elde edilen bu absorbans değerleri tek tek BO’ nun absorbans değerine bölündü. Elde edilen bu sonuçlar 100 ile çarpılarak her standart ve numuneye ait % B/BO değeri elde edildi.
2. Her standardın 11, 12-DHET derişimini (1000000, 100000, 10000, 1000, 100 ve 10 pg/mL) X eksenine, %B/BO değerlerini Y eksenine yerleştirerek “log-log” grafiğı çizildi (Bkz. şekil 3.2).
3. Şekil 3.2’ de elde edilen bu grafikteki eğri denklemini ve her numunenin %B/BO değeri kullanılarak derişimleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar seyreltme kat sayısı ile çarpılarak hasta ve kontrol grubuna ait 11-12-DHET düzeyleri hesaplandı.



Şekil 3.2 11, 12-DHET standart eğrisi

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tüm verilerin istatistiksel analizi, “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS) programı (Versiyon 15) kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizlerde yanılma düzeyi 0.05 olarak alındı.

Anne yaşı, parite ve gravida sayısı, gebelik haftası ve diastolik kan basıncı ortalamalarının hasta ve kontrol grubu arasındaki farkı “Bağımsız Örneklerde t Testi” ile belirlendi. İki grubun sigara alışkanlığı, yaş grupları, ailede preeklampsi hikayesi, *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyleri, K55R polimorfizm sıklıkları arasındaki fark ise “*Khi kare*” (χ^2) analizi ile yapıldı. Hücre değerlerinin 5’ den küçük olması durumunda “*Fisher exact*” testi için *p* değeri verildi. 11, 12-DHET düzeylerinin hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması ve *EPHX2* geni K55R polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi “*Mann Whitney-U*” testi, *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyleri yönünden değerlendirilmesi ise “*Kruskal-Wallis*” testi ile analiz edildi. Preeklampsi hastalığı için olası risk tahminleri lojistik regresyon testi uygulanarak belirlendi. İlişkinin derecesi % 95 CI (“*Confidence Interval*”: Güvenlik aralığı)’ de OR (“*Odds Ratio*”: İhtimal oranı, relatif riskin tahmini) olarak verildi. Hasta ve kontrol gruplarının “*Hardy-Weinberg*” dağılımına uygunluk gösterip göstermediği “*online*” yazılım programı kullanılarak test edildi (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>).

5. BULGULAR

Bu çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde preeklampsi tanısı konmuş 260 kadın, hasta grubunu oluşturdu. Preeklampsi hastası olmayan, kronik hipertansiyonu ve diyabeti bulunmayan gebelikte 20. haftayı doldurmuş 260 gebe kadın ise çalışmamızın kontrol grubunu oluşturdu.

Çalışmamızda hasta ve kontrol kanlarından elde edilen DNA' larda *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyi ve K55R polimorfizm sıklığı belirlendi. Ayrıca 75 hasta ve 75 kontrol' e ait plazmalarda 11, 12-DHET düzeyi saptandı. Deneylerden ve sorgu formundan elde edilen veriler istatistiksel olarak incelendi.

Preeklampsi hastaları ve kontrollerin demografik özellikleri çizelge 5.1' de verildi. Yaş ortalamaları yönünden hasta (29 ± 7.03) ve kontrol (27.9 ± 5.63) grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Parite ve gravida ortalamaları hasta grubunda sırası ile 1.53 ± 1.59 ve 2.65 ± 1.77 , kontrol grubunda ise 1.24 ± 1.21 ve 2.41 ± 1.44 olarak belirlendi. Her iki parametre yönünden de iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$). Gebelik haftası ortalamaları yönünden ise hasta (34.5 ± 4.0) ve kontrol (31.05 ± 6.3) grubu arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü. Sistolik kan basıncı hasta grubunda 149.6 ± 11.9 , kontrol grubunda 110.50 ± 69.1 ve diastolik kan basıncı hasta grubunda 102.4 ± 11.2 , kontrol grubunda ise 69.1 ± 8.1 olarak saptandı. Yapılan istatistiksel analiz sonucu hem sistolik hem de diastolik kan basıncı ortalamalarının hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Çizelge 5.1 Hasta ve kontrollere ait demografik özellikler

	Hasta N=260	Kontrol N=260	t değeri	p değeri
Yaş ($\bar{X} \pm S$)	29±7.03	27.9±5.63	-1.93	0.0550
Gravida ($\bar{X} \pm S$)	2.65 ± 1.77	2.41±1.44	-1.01	0.3140
Parite ($\bar{X} \pm S$)	1.53±1.59	1.24±1.21	-1.35	0.1800
Sistolik Kan Basıncı (mmHg; $\bar{X} \pm S$)	149.6±11.9	110.5±69.1	-8.80	0.0001*
Diastolik kan basıncı (mmHg; $\bar{X} \pm S$)	102.4 ± 11.2	69.1 ± 8.1	-38.76	0.0001*
Gebelik Haftası ($\bar{X} \pm S$)	34.5±4.0	31.05±6.3	-7.39	0.0001*

* $p<0.05$: İstatistiksel olarak anlamlı; S: Standart Sapma; \bar{X} : Ortalama

Kontrol ve hasta grubunun yaş dağılımları, sigara içme alışkanlığı ve ailede preeklampsi hikayesi bakımından değerlendirilmesi sırası ile çizelge 5.2, 5.3 ve 5.4' de verildi. Hastaların % 30.1' inin 34 yaş ve üzeri, % 8.1' inin 16-19 ve % 61.8' inin 20-33 yaşları arasında olduğu belirlenirken, kontrollerin % 16.5' inin 34 yaş ve üzeri, % 6.5' inin 16-19 ve % 76.9' unun 20-33 yaşları arasında olduğu belirlendi. Yaş grupları dağılımları yönünden iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu analiz edildi ($\chi^2=14.98$; $p=0.001$). Ayrıca, yapılan analizlerde 34 yaş ve üzeri gebe kadınlarda preeklampsi görülme riskinin 2.26 kat arttığı (Ham OR: 2.26; %95 CI: 1.48-3.73) belirlenirken, 16-19 yaş grubunda olmanın ise preeklampsi hastalığı için anlamlı bir risk oluşturmadığı görüldü (Ham OR: 1.54; %95 CI: 0.78-3.02). Veriler lojistik regresyon modeli uygulanarak analiz edildiğinde, *EPHX2* promotor metilasyon düzeyi ve K55R polimorfizmi, ailede preeklampsi hikayesi faktörlerinin etkisi ortaya konularak hesaplanan risk oranının hemen hemen aynı olduğu gözlemlendi (Bkz. çizelge 5.2).

Çizelge 5.2 Hasta ve kontrollerin yaş grupları dağılımı yönünden analizi

Yaş Grupları	Ham			Düzeltilmiş		
	Hasta N=260	Kontrol N=260	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)	<i>p</i> değeri	OR**(95%CI)
16-19, n (%)	21 (8.1)	17 (6.5)	0.23	1.54 (0.78-3.02)	0.48	1.29 (0.62-2.66)
20-33, n (%)	160 (61.8)	200 (76.9)		Referans		Referans
≥ 34, n (%)	78 (30.1)	43 (16.5)	0.0001*	2.26 (1.48-3.73)	0,0001*	2.44 (1.56-3.81)

* $p<0.05$: İstatistiksel olarak anlamlı; OR: Risk Oranı (Odds ratio); CI: Güven Aralığı (confidence interval); OR**: Düzeltilmiş OR: Ailede preeklampsi hikayesi, *EPHX2* promotor metilasyon düzeyi ve K55R polimorfizmi yönünden düzeltildi.

Çizelge 5.3' de görüldüğü gibi sigara içme alışkanlığı yönünden hasta ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($\chi^2=1.43$; $p=0.488$). Ayrıca, sigara alışkanlığının preeklampsi hastalığı için bir risk oluşturmadığı tespit edildi (Ham OR: 0.75; %95 CI: 0.32-1.74). Ailede preeklampsi hikayesi, *EPHX2* promotor bölge metilasyon düzeyi, K55R polimorfizmi ve yaş gruplarının etkisi dikkate alındığında da sigara alışkanlığı durumunun hastalık için anlamlı bir risk oluşturmadığı görüldü (OR**: 1.23; % 95 CI: 0.56 – 2.68).

Çizelge 5.3 Hasta ve kontrollerin sigara alışkanlığı yönünden analizi

Sigara Alışkanlığı	Ham			Düzeltilmiş		
	Hasta N=260	Kontrol N=260	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)	<i>p</i> değeri	OR** (95%CI)
İçen	10 (3.8)	13 (5.0)	0.53	0.75 (0.32-1.74)	0.59	1.23 (0.56-2.68)
İçmeyen	253 (95.8)	247 (95.0)				

* $p < 0.05$: İstatistiksel olarak anlamlı; OR: Risk Oranı (Odds ratio); CI: Güven Aralığı (confidence interval); OR**: Düzeltilmiş OR: Ailede preeklampsi hikayesi, *EPHX2* promotor metilasyon düzeyi, K55R polimorfizmi ve yaş grupları yönünden düzeltildi.

Hasta grubundaki bireylerin birinci derece akrabalarında (anne, kız kardeş, teyze) preeklampsi görülme sıklığının (% 17.4) kontrol grubuna (% 4.2) göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu ($\chi^2=23.29$; $p=0.0001$) ve birinci derece akrabalarında preeklampsi hikayesi olan kadınlarda hastalık görülme riskinin 4.76 kat arttığı belirlendi (Ham OR: 4.76; % 95 CI: 2.40-9.43). Lojistik regresyon analizi ile *EPHX2* promotor metilasyon düzeyi, K55R polimorfizmi ve yaş grupları hesaba katıldığında ise bu riskin 4.76' dan 5.41' e yükseldiği analiz edildi (Bkz. çizelge 5.4; OR**: 5.41 % 95 CI: 2.64 – 11.11).

Çizelge 5.4 Hasta ve kontrollerin ailede preeklampsi hikayesi yönünden analizi

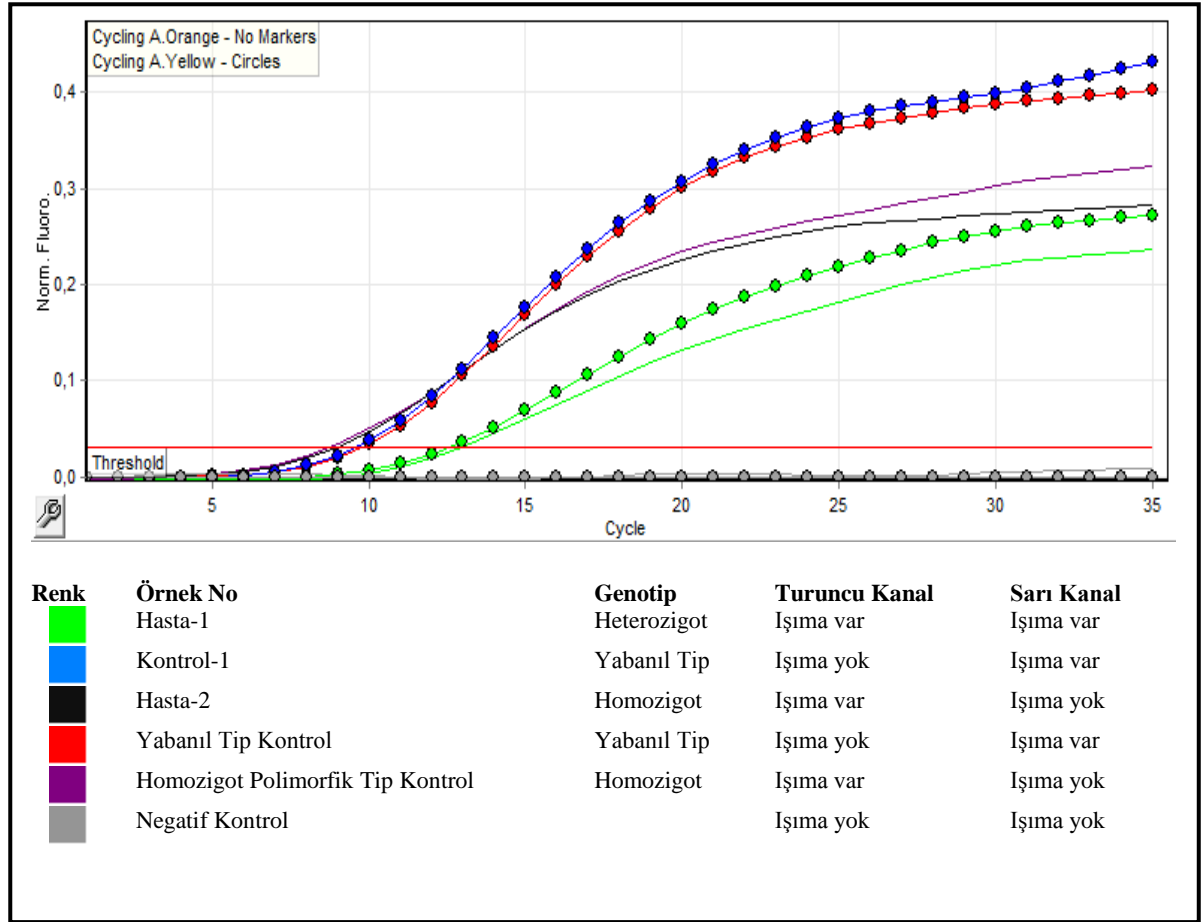
Ailede preeklampsi hikayesi	Ham			Düzeltilmiş		
	Hasta N=260	Kontrol N=260	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)	<i>p</i> değeri	OR** (95%CI)
Var	45 (17.4)	11 (4.2)	0.0001*	4.76 (2.40-9,43)	0.0001*	5.41 (2.64-11.11)
Yok	214 (82.6)	249 (95.8)				

* $p < 0.05$: İstatistiksel olarak anlamlı; OR: Risk Oranı (Odds ratio); CI: Güven Aralığı (confidence interval); OR**: Düzeltilmiş OR: *EPHX2* promotor metilasyon düzeyi, K55R polimorfizmi ve yaş grupları yönünden düzeltildi.

5.1 Preeklampsi Hastaları ve Kontrollerin *EPHX2* Geni K55R Polimorfizm Sıklığı Yönünden İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

EPHX2 geninin K55R polimorfizmi yönünden genotiplendirilmesi diziyeye özgü çift boyalı hidroliz propları ve primerler kullanılarak RT-PCR cihazında allelik ayırım analizi ile gerçekleştirildi. Sarı kanalda (VIC kanalı) floresan ışığa veren örnekler yabancı tip, turuncu kanalda (ROX kanalı) floresan ışığa veren örnekler homozigot polimorfik ve her iki kanalda birden floresan ışığa veren örnekler heterozigot olarak değerlendirildi.

Şekil 5.1’ de hasta ve kontrollerin *EPHX2* geni K55R polimorfizmi yönünden allelik ayırımına ait çalışma sonuçlarının bazıları örnek olarak sunulmuştur. Örneğin şekil 5.1’ de hasta 1’ e ait PCR ürünü (Yeşil renk) hem sarı kanalda (eğri üzerinde küçük daire şeklinde işaretli) hem de turuncu kanalda (işaretsiz eğri) floresan ışığa verdiği heterozigot olarak değerlendirildi. Kontrol-1’ e (mavi) ait PCR ürünü ise sadece sarı kanalda ışığa verdiği için yabancı tip olarak değerlendirildi.



Şekil 5.1 Çözünür epoksite hidrolaz geni (*EPHX2*) K55R genetik varyantının RT-PCR ile allelik ayırımı.

Çizelge 5.5’ de hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin *EPHX2* geni K55R polimorfizmi yönünden analizi verildi. Yabancı tip (AA), heterozigot (AG) ve homozigot polimorfik (GG) genotip sıklıkları hasta grubunda sırasıyla % 70.4 (n=183), % 28.1 (n=73) ve % 1.5 (n=4), kontrol grubunda ise % 80.8 (n=210), % 17.3 (n=45) ve % 1.9 (n=5) olarak belirlendi. “*Khi karø*” yöntemi ile yapılan analizde, hasta ve kontroller arasında K55R polimorfizmi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı ($\chi^2=7.79$; $p=0.006$). Yapılan analizlerde K55R polimorfizmi yönünden AG genotipine sahip gebe kadınlarda preeklampsi hastalığı görülme riskinin bu genotipi taşımayanlara göre 1.86 kat daha fazla olduğu belirlendi (OR:1.86; %95 CI: 1.09-2.63). Homozigot

polimorfik ve heterozigot polimorfik örnekler tek bir gruba alınıp değerlendirildiğinde (AG+GG) ise bu iki genotipi taşıyan gebe kadınlarda preeklampsi hastalığı görülme riskinin 1.76 kat arttığı tespit edildi (OR: 1.76; %95 CI: 1.17-2.65). Ailede preeklampsi hikayesi, *EPHX2* geni promotor metilasyon düzeyi ve yaş gruplarının etkisi de dikkate alındığında düzeltilmiş risk oranının AG genotipine sahip gebe kadınlar için 1.69 (OR**:**1.69**; %95 CI: 1.09-2.63), AG+GG genotipine sahip gebe kadınlar için ise 1.57 (OR**:**1.57**; %95 CI: 1.02-2.42) olduğu belirlendi. GG genotipinin ise preeklampsi hastalığı açısından anlamlı bir risk oluşturmadığı saptandı (OR: 0.92; %95 CI: 0.24-3.47). Ailede preeklampsi hikayesi, *EPHX2* promotor metilasyon düzeyi ve yaş gruplarının etkisi dikkate alındığında da GG genotipi ve preeklampsi hastalığı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi (OR**:**0.56**; %95 CI: 0.12-2.45).

Çizelge 5.5 *EPHX2* geni K55R polimorfizmi yönünden allel ve genotip sıklığı

Genotip				Ham	Düzeltilmiş	
	Hasta n=260 N (%)	Kontrol n=260 N (%)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR** (95% CI)
AA	183 (70.4)	210 (80.8)		Referans		Referans
AG	73 (28.1)	45 (17.3)	0.004*	1.86 (1.22-2.83)	0.01*	1.69 (1.09-2.63)
GG	4 (1.5)	5 (1.9)	0.99	0.92 (0.24-3.47)	0.44	0.56 (0.12-2.45)
AG+GG	77 (29.6)	50 (19.2)	0.008*	1.76 (1.17-2.65)	0.03*	1.57 (1.02-2.42)
Allel Frekansları						
A	439 (84.4)	465 (89.4)		Referans		
G	81(15.6)	55 (10.6)	0.02*	1.56 (1.08-2.25)*		

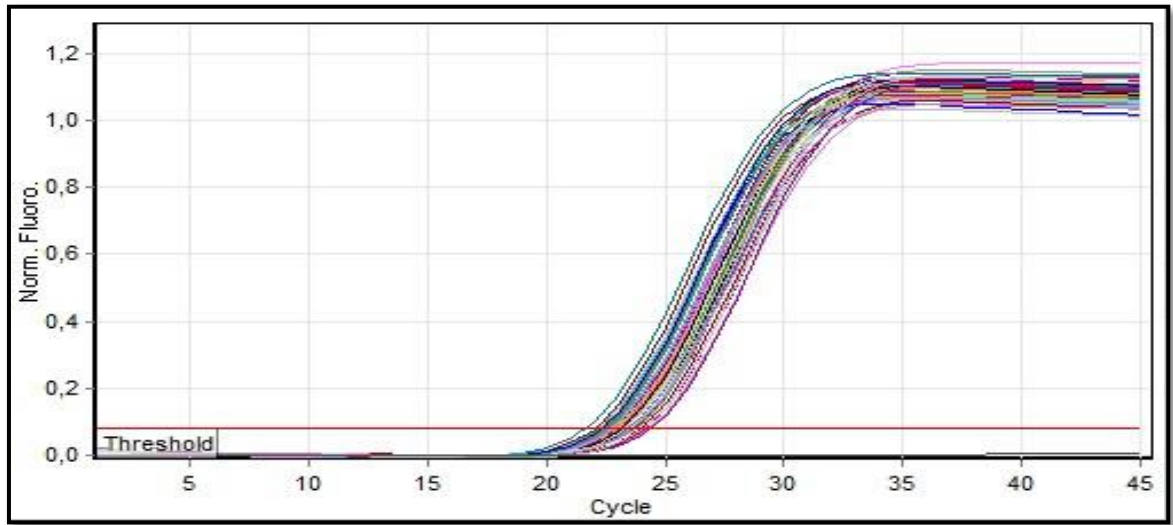
* $p < 0.05$: İstatistiksel olarak anlamlı; OR: Risk Oranı (Odds ratio); CI: Güven Aralığı (confidence interval); OR**:**1.69**: Ailede preeklampsi hikayesi, *EPHX2* promotor metilasyon düzeyi ve yaş grupları yönünden düzeltilildi.

Hasta ve kontrol grubundaki bireyler allel frekansları yönünden incelendiğinde A allel frekansı sırasıyla 0.84 ve 0.89, G allel frekansı ise 0.16 ve 0.11 olarak hesaplandı. Bu değerlerin hem hasta grubu ($\chi^2 = 1.19$, $p = 0.27$) hem de kontrol grubunda ($\chi^2 = 1.88$, $p = 0.17$). “Hardy-Weinberg eşitliğine” uygunluk gösterdiği belirlendi.

Yapılan istatistiksel analizde G alleleline sahip gebe kadınlarda bu alleli taşımayanlara kıyasla preeklampsi hastalığı görülme riskinin 1.56 kat daha fazla olduğu tespit edildi (OR: 1.56; %95 CI: 1.08-2.25).

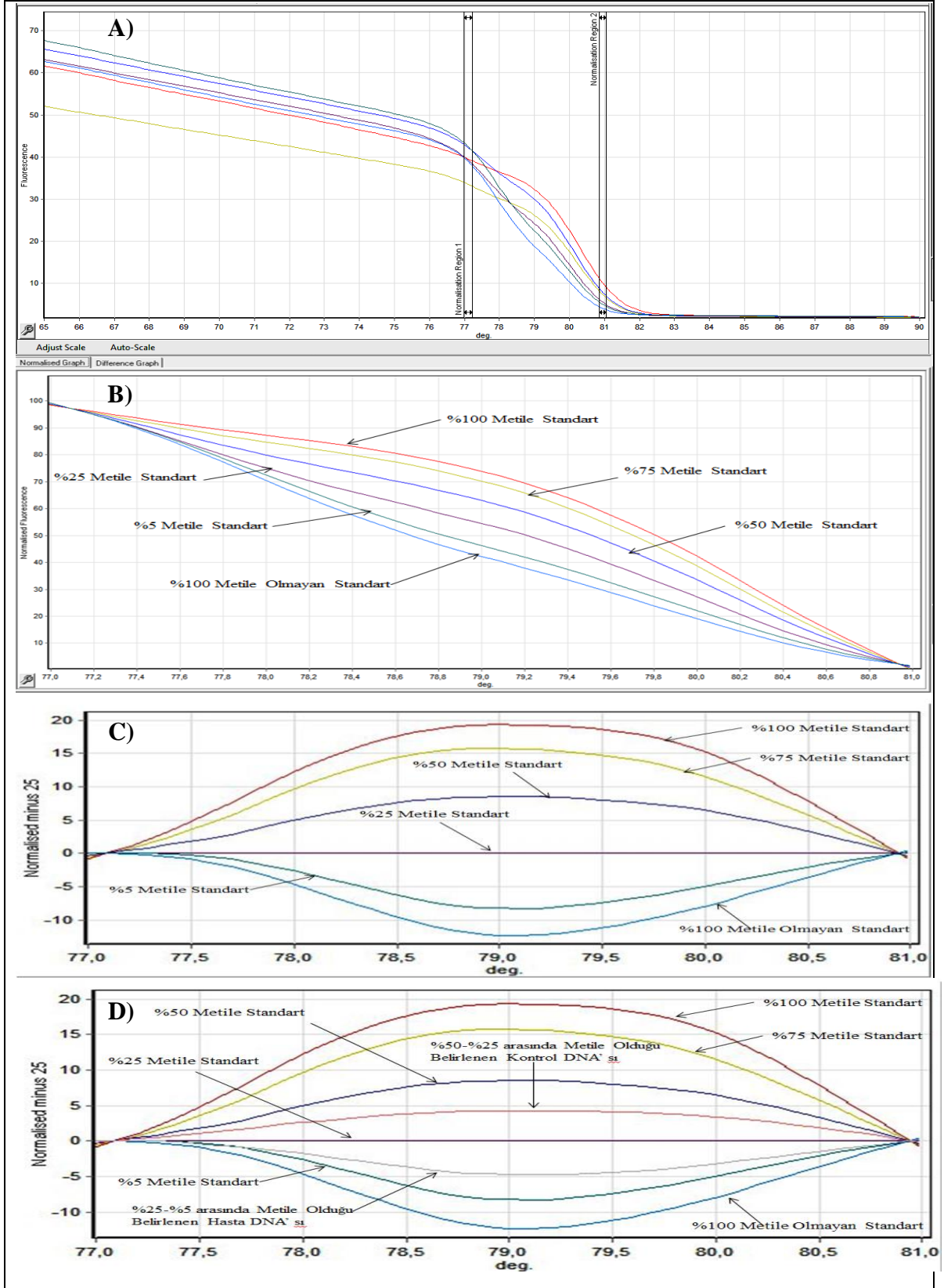
5.2 MS-HRM Analizi ve İstatistiksel Değerlendirilme

EPHX2 geni promotor bölge metilasyon düzeyi analizi MS-HRM yöntemi uygulanarak gerçekleştirildi. DNA örnekleri, metilasyon standartları ve bisülfite kontrol DNA' sını, bisülfite dizisine özgü primerler (Bkz. şekil 3.1) kullanılarak RT-PCR cihazında 72 bp PCR ürünü elde etmek üzere amplifiye edildi ve amplifikasyon eğrilerinin bir örneği şekil 5.2' de verildi.



Şekil 5.2 Çalışma grubunda yer alan bazı örneklere ait çözünür epoksite hidrolaz geni (*EPHX2*) promotor bölge amplifikasyon eğrileri.

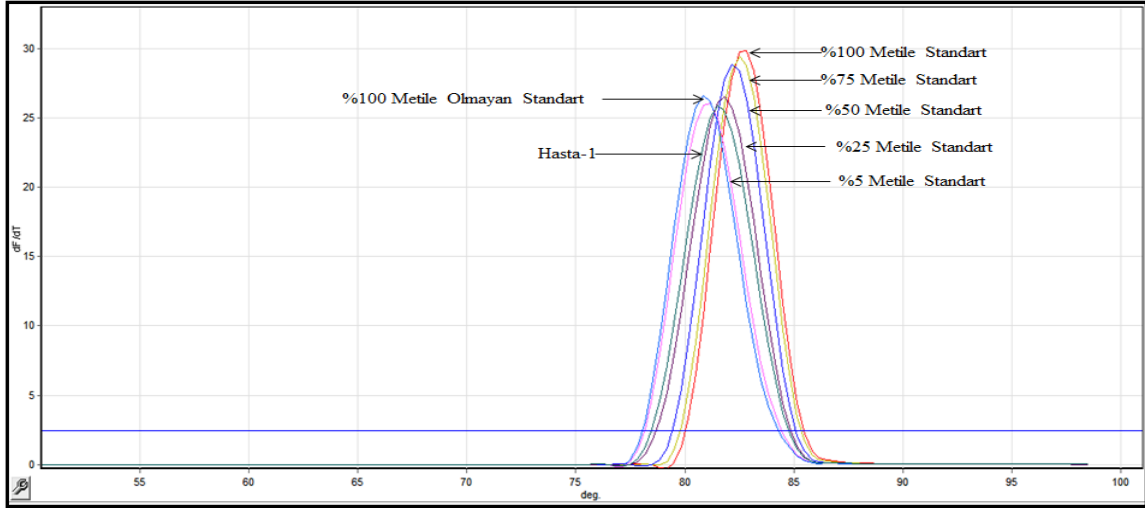
MS-HRM analizinde kullanılan “*EvaGreen*” boyası sadece çift zincirli DNA' ya bağlandığından, artan sıcaklıkla birlikte çift zincirli DNA' nın denaturasyonu sonucu floresan sinyal şiddetinde azalma meydana gelmektedir. Bu nedenle şekil 5.3-A' da da görüldüğü gibi sıcaklığa karşı floresan şiddeti giderek azalan bir eğri elde edildi. Metile olmayan sitozinleri bisülfite dönüşüm işlemi ile urasil nükleotidlerine çevrilmiş olan örneklerde erime sıcaklıkları düşük, metillenmiş sitozin nükleotidlerini içeren örneklerde ise erime sıcaklıkları yüksekti. Bu da metilasyon düzeylerinin belirlenmesini sağladı.



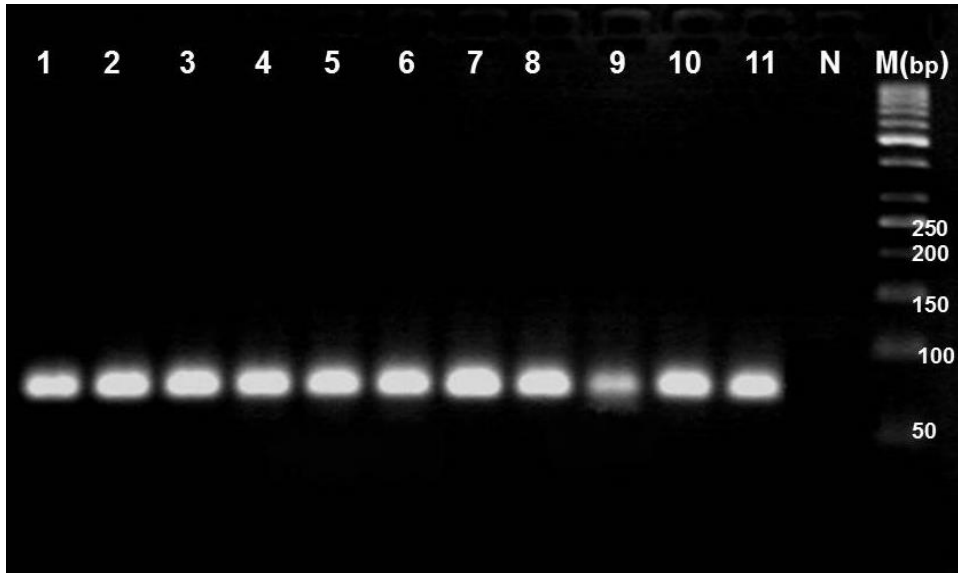
Şekil 5.3 *EPHX2* promotor bölge metilasyon düzeyinin “*Methylation-Sensitive High Resolution Melting*” (MS-HRM) yöntemi ile tayini **A)** Farklı oranlarda metile olduğu belirlenen metilasyon standartlarının HRM eğrisi **B)** Metilasyon standartlarının normalize erime eğrisi **C)** Metilasyon standartlarının % 25 metile kontrole göre normalize farklılık eğrisi **D)** Metilasyon standartlarına ait normalize farklılık eğrisi kullanılarak metilasyon düzeyi belirlenen hasta ve kontrole ait birer DNA örneğinin MS-HRM sonuçları.

Örnekler ile aynı PCR reaksiyonunda çalışılan %100, %75, %50, %25, %5 metile ve metile olmayan metilasyon standartlarının HRM eğrileri ile hasta ve kontrol grubu örneklerinin HRM eğrileri karşılaştırılarak *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyleri tespit edildi (Bkz. şekil 5.3-B-D).

HRM analizinde kullanılan PCR ürünlerinin özgüllüğü ise RT-PCR cihazında erime eğrisi analizi (Bkz. şekil 5.4) ve agaroz jel elektroforezinde (Bkz. şekil 5.5) görüntülenerek teyit edildi.



Şekil 5.4 *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeylerini belirlemek amacıyla elde edilen bazı PCR ürünlerinin erime eğrisi analizi.



Şekil 5.5 *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeylerini belirlemek amacıyla elde edilen bazı PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. **1:** %100 Metile standart; **2:** %75 Metile standart; **3:** %50 Metile standart; **4:** %25 Metile standart; **5:** %5 Metile standart; **6:** Metile olmayan standart; **7:**Hasta-1; **8:** Hasta-2; **9:** Hasta-3; **10:** Kontrol-1; **11:**Kontrol-2; **N:** Negatif kontrol; **M:** Marker (belirteç), Gene Ruler™ 50 bç'lik DNA Ladder.

Hasta ve kontrollerin, *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($\chi^2=6.76$; $p=0.04$; Bkz. çizelge 5.6).

Çizelge 5.6 Hasta ve kontrollerin *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyi yönünden analizi

Metilasyon Düzeyi	Hasta n=260 N (%)	Kontrol n=260 N (%)	Ham		Düzeltilmiş	
			<i>p</i> değeri	OR (%95 CI)	<i>p</i> değeri	OR** (%95 CI)
%51-%100	7 (2.7)	18 (6.5)		Referans		Referans
%50-%26	42 (16.2)	50 (19.2)	0.25	1.30 (0.83-2.06)	0.01*	3.92 (1.28-11.95)
<%25	211 (81.2)	192 (73.8)	0.02*	2.83 (1.15-6.91)*	0.002*	5.15 (1.80-14.77)

* $p<0.05$: İstatistiksel olarak anlamlı; OR: Risk Oranı (Odds ratio); CI: Güven Aralığı (confidence interval); OR**: Ailede preeklampsi hikayesi, *EPHX2* K55R polimorfizmi ve yaş grupları yönünden düzeltilildi.

EPHX2 geni promotor bölge metilasyon düzeyi % 25' in altında olan gebe kadınlarda preeklampsi hastalığı görülme riskinin 2.83 kat arttığı (OR: 2.83; %95 CI: 1.15-6.91) tespit edildi. Ailede preeklampsi hikayesi, *EPHX2* K55R polimorfizmi ve yaş grupları dikkate alınarak yapılan lojistik regresyon analizi sonucu bu risk oranının 2.83' den 5.15' e yükseldiği belirlendi (OR**: 5.15; % 95 CI: 1.80-14.77). Metilasyon düzeyinin % 50-% 26 arasında olma durumunun ise preeklampsi hastalığı açısından anlamlı bir risk oluşturmadığı gözlemlendi (OR: 1.30; %95 CI: 0.83-2.06). Fakat, ailede preeklampsi hikayesi, *EPHX2* K55R polimorfizmi ve yaş gruplarının etkisi dikkate alınarak yapılan lojistik regresyon sonucu risk oranının 1.30' dan 3.92' ye yükseldiği tespit edildi (OR**: 3.92; %95 CI: 1.28-11.95).

5.3 “11,12-DHET” Düzeyleri

Hasta grubunda 11, 12-DHET düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($U=1890$; $p<0.05$; Bkz. çizelge 5.7).

Çizelge 5.7 Hasta ve kontrol grubu 11,12-DHET düzeyleri

	Hasta Grubu Median (min-max); n=75	Kontrol Grubu Median (min-max); n=75	<i>p</i> değeri
11,12-DHET (nM)	190.2 (8.6-58031.3)	99.7 (14.4-2692.5)	0.001*

* $p<0.05$: İstatistiksel olarak anlamlı; 11, 12-DHET: 11,12-dihidroksieikozatrienoik asit.

K55R polimorfizmine sahip hasta ve kontrol 11, 12-DHET düzeyleri ile polimorfik olmayan hasta (U=551; p=0.904) ve kontrollerin (U=551.0; p=0.850) 11, 12-DHET düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (p>0.05; bkz. çizelge 5.8).

Çizelge 5.8 Hasta ve kontrol grubunda 11,12 DHET düzeyinin *EPHX2* geni K55R polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi

	Genotip		P Değeri
	AA, Median (min-max)	AG+GG, Median (min-max)	
HASTA, N=75 11,12-DHET (nM)	184.5 (35.3-58031.3) n=51	192.0 (8.6-26916.7) n=24	0.904
KONTROL N=75 11,12-DHET (nM)	93,4 (14,5-1294,4) n= 54	150.7 (14.4-2692.5) n=21	0.850

A: Adenin; G: Guanin; 11, 12-DHET: 11,12-dihidroksieikozatrienoik asit

Son olarak, hasta ve kontrol grubu 11,12-DHET düzeyleri *EPHX2* geni promotor metilasyon düzeyleri yönünden de değerlendirildi. Yapılan analizlerde 11, 12-DHET düzeylerinin *EPHX2* geni promotor metilasyon düzeyi bakımından hasta (KW=0.724; p=0.696) ve kontrol (KW=0.724; p=0.435) gruplarında farklı olmadığı belirlendi (p>0.05, bkz. çizelge 5.9).

Çizelge 5.9 Hasta ve kontrol grubunda 11,12-DHET düzeyinin *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyi yönünden değerlendirilmesi

	Metilasyon Düzeyleri			p Değeri
	%51-%100 Median (min-max)	%50-% 26 Median (min-max)	<%25 Median (min-max)	
HASTA, N=75 11,12-DHET (nM)	157.4 (69.4-5337.9) n=3	119.5 (9.7-10767.5) n=15	210.5 (8.6-58031.3) n=57	0.696
KONTROL, N=75 11,12-DHET (nM)	206.4 (34.7-935.9) n=7	73.4 (34.7-315.6) n=9	117.6 (14.4-2692.5) n=59	0.435

11, 12-DHET: 11,12-dihidroksieikozatrienoik asit.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Preeklampsi, gebeliğin genellikle 20. haftasından sonra gelişen ve hipertansiyona eşlik eden proteinüri veya son organ hasarı ile karakterize bir hastalıktır. Bazı vakalarda gebeliğin postpartum periyodunda da preeklampsi görülebilir [4, 198]. Bu hastalık annede akut renal yetmezlik, körlük, hepatik rüptür, serebral hemoraji, intraventriküler kanama, dissemine intravasküler koagülasyon, pulmoner ödem gibi klinik durumlara yol açabilir [199-201]. Ayrıca, preeklampsi intrauterin gelişme geriliği, prematür doğum gibi komplikasyonlara da sebep olabilir. Yani bu hastalık maternal ve fetal mortalite ile morbiditenin önemli bir nedeni olup, birçok sistemi de etkileyen gebeliğe özgü hipertansif bir sendromdur [202, 203]. Preeklampsi dünya çapında tüm hamileliklerin % 5-8' ini etkilemektedir. Gelişmekte olan ülkelerde bu oran % 15-18' lere kadar çıkar. Dünyada her yıl yaklaşık 75000 anne ve 500000 bebek preeklampsi komplikasyonlarından dolayı hayatını kaybetmektedir [204]. Dünya sağlık örgütü verilerine göre bu hastalık kanama, enfeksiyon ve düşüklerden sonra anne ölümlerinin dördüncü sıradaki nedenidir [205]. Ülkemizde ise gebe ölümlerinin en önde gelen nedenidir [2]. Bu hastalığın tedavisi sırasında getirdiği yüksek maliyeti önlemek ve hem anneyi hem de çocuğu bu hastalığın komplikasyonlarından korumak adına preeklampsi için kanda, idrarda “*noninvaziv*” biyobelirteçler aranmaktadır. Fakat son zamanlardaki çalışmalar daha çok preeklampsi tanısı için genetik belirteçlerin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Preeklampside yapılan bazı “*mikroarray*” çalışmaları, hızla taranan transkriptomlar sayesinde bazı genlerin ekspresyonlarındaki artış veya azalışlar üzerine odaklanmıştır [206]. Ayrıca, preeklampsi patofizyolojisi, önlenmesi ve tedavisi de birçok araştırmaya konu olmuştur. Hastalığın nedenini açıklamak için pek çok mekanizma ileri sürülmüş olmasına rağmen patofizyolojisi ve etiyojisi tam olarak ortaya konulamamıştır [3]. Bazı genetik çalışmalarda, preeklampsi gelişiminde genetik faktörlerin rolünün etkili olduğu bildirilmiş olsa da preeklampsi ile ilişkili belirgin tek bir genetik mekanizma ortaya konamamıştır [47, 207]. Bu nedenle preeklampsinin, multifaktöryel ve poligenik bir hastalık olduğu belirtilmektedir [208]. Birden fazla maternal ve fetal genin, çevresel faktörler ve bunlar arasındaki karmaşık ilişkilerin preeklampsiye eğilimin ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülebilir. Ayrıca, gebe kalmadan önce veya hamilelik sırasındaki epigenetik bozuklukların da preeklampsi hassasiyetini artırabileceği iddia edilmektedir [209]. Bu epigenetik değişikliklerin aynı zamanda plasenta morfolojisi ve gelişimini de etkileyebileceği belirtilmektedir [210].

Günümüzde endotel hasarının preeklampsisi patogeneğinde oldukça önemli bir yere sahip olduğu, preeklampitik gebelerde hasara uğrayan endotelin tam anlamıyla fonksiyonlarını yerine getiremediği bilinmektedir [5,6]. AA ve/veya enzimatik metabolitleri de, endotelde ve damar sisteminde düzenleyici işlevler sağlayan önemli lipid araçlardır. AA sitokrom P450 monoksijenaz ile okside edilerek natriüretik ve vazodilatör olan hidroksieikozatetraenoik asitlere ve EET' lere metabolize edilir [211, 212]. EET' ler anti-inflamatuar, vazodilatatör özelliklere sahiptirler ve kan basıncının düşürülmesinde etkin moleküllerdir [12, 13]. çEH enzimi EET' leri ve diğer epoksi yağ asitlerini hızlı bir şekilde daha az biyoaktif olan ilgili diollerine (DHET) dönüştürerek organizma için bu faydalı etkilerinin azalmasına yol açar [140]. EET düzeyi ve metabolizmasındaki değişikliklerin hipertansiyon, endotel disfonksiyonu, son organ hasarı, kardiyovasküler hastalıklar, iskemi gibi birçok klinik durumun patofizyolojisinde rol aldığı birçok çalışma ile ortaya konulmuştur [112, 116, 213]. Bu nedenle çEH enzimi kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyonun tedavisinde yeni bir terapötik hedef haline gelmiştir [162]. Kalp yetmezliği [164], iskemi [214], inflamasyon [181] ve hipertansiyona sahip hayvan modellerinde çeşitli çEH inhibitörlerinin kan basıncını azalttığı ve bu hastalıklara karşı faydalı etkiler oluşturduğu belirlenmiştir [21, 22]. Ayrıca, EET' lerin hamilelik sırasında kan basıncının düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir [25, 93]. Bu bilgiler ışığında, EET' lerin yıkımına neden olarak düzeylerinin azalmasına sebep olan çEH enziminin preeklampsisi hastalığı ile ilişkili olabileceği düşünülmüş ve çalışmamızda enzimin aktivitesindeki değişikliklerin preeklampsisi hastalığındaki olası rolü incelenmiştir.

Preeklampsisi etiyolojisi tam olarak açığa kavuşturulmamış olsa da hastalıkla ilgili birçok risk faktörü öne sürülmüştür. 15 yaşından küçük veya 40 yaşından büyük gebe olmak, parite ve sigara bunlardan bazılarıdır [42, 215]. Bizim çalışmamızda yaş, garvida, parite ortalamaları yönünden hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Fakat hasta ve kontrol grubu yaşları 16-19, 20-33 ve ≥ 34 olmak üzere üç sınıfa ayrılarak analiz edildiğinde gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$; Bkz. çizelge 5.1). Yapılan bir çalışmada 15 yaş altındaki gebelerde preeklampsisi gelişme riskinin 30-40' lı yaşlara oranla 2.8 kat artış gösterdiği saptanmıştır [36]. Bizim çalışmamızda ise hem hasta hem de kontrol grubunda 15 yaş altında herhangi birey bulunmamaktaydı ve en küçük yaş 16 idi. Dolayısıyla 15 yaş altında olmanın hastalık için risk oluşturup oluşturmadığı belirlenememiştir.

Bu nedenle araştırmamızda 16-19 yaş grubu için risk analizi yapılabildiği ve bunun sonucunda 16-19 yaş grubunda olmanın hastalık için anlamlı bir risk oluşturmadığı görülmüştür (Ham OR: 1.54; %95 CI: 0.78-3.02; Bkz. çizelge 5.2). 16-19 yaş grubundaki hasta sayısının az olması (21 hasta) istatistiksel analizimizin sonucunu etkilemiş olabilir. Diğer yandan, yapılan farklı araştırmalarda 40 yaş ve üzeri olan gebelerde preeklampsi riskinin neredeyse iki kat arttığı belirlenmiştir [216]. Ayrıca, Amerika ulusal verilerine göre preeklampsi riskinin 34 yaşın üzerine eklenen her yıl için % 30 oranında arttığı tespit edilmiştir [217]. Bu bulgularla uyumlu bir şekilde bizim çalışmamızda da 34 yaş ve üzerinde olan gebelerde preeklampsi görülme riskinin 2.26 kat arttığı (Ham OR: 2.26; % 95 CI: 1.48-3.73; Bkz. çizelge 5.2) belirlenmiştir.

Sigara alışkanlığının, preeklampsi için her ne kadar bir risk faktörü olduğu iddia edilse de [42, 43] yapılan bazı çalışmalarda sigara içme alışkanlığı ile bu hastalık arasında anlamlı bir ilişki olmadığı belirlenmiştir [218]. Bizim araştırmamızda sigara alışkanlığı yönünden hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Ayrıca, sigara alışkanlığının preeklampsi hastalığı için bir risk oluşturmadığı tespit edilmiştir (Ham OR: 0.75; %95 CI: 0.32-1.74; Bkz. çizelge 5.3). Oysa sigara içmenin insanlarda endotel bağımlı vazodilatasyonu önemli ölçüde azalttığı [219, 220], bunda kısmen nitrik oksit sentaz aktivitesini inhibe etmesinin payı olduğu bildirilmiştir [221]. Ayrıca, sigara dumanına maruz kalmanın EET hidrolizinde artışa işaret eden *EPHX2* geninin ekspresyonunu artırdığı ve bunun sonucunda da endotel işlevlerini değişikliğe uğratabileceği ileri sürülmüştür [222]. Bu çalışmalar göz önüne alındığında sigara içmenin preeklampsi riskini artırması beklenirken çalışmamızda böyle bir ilişki tespit edilmemiştir. Bunun nedeni hastalara gebeliği sırasında sigara içmenin sakıncalı olacağını belirten kişiler tarafından sigara içip içmediklerinin sorulması nedeni ile bireylerin doğru olmayan beyanları olabilir.

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada birinci derece akrabalarında preeklampsi hikayesi olan kadınlarda genel popülasyona göre preeklampsi görülme riskinin 3-5 kat daha fazla olduğu ortaya konulmuştur [223, 224]. Bu da hastalığın etiyolojisinde genetik faktörlerin etkili olabileceğini düşündürmektedir [225]. Bizim çalışmamızda da daha önceki araştırmalarla uyumlu bir şekilde birinci derece akrabalarında preeklampsi hikayesi olan kadınlarda preeklampsi hastalığı görülme riskinin 4.76 kat arttığı belirlenmiştir (Ham OR: 4.76; % 95 CI: 2.40-9.43; Bkz. çizelge 5.4).

Ek olarak, bu riske *EPHX2* promotor bölge metilasyon düzeyi, K55R polimorfizmi ve yaş gruplarının da etkisi dahil edildiğinde ailede preeklampsi hikayesi olanlarda hastalık görülme riskinin 4.76' dan 5.41' e yükseldiği saptanmıştır (OR** : 5.41 % 95 CI: 2.64 – 11.11; Bkz. çizelge 5.4).

Daha önce de belirtildiği gibi EET' ler vazodilatatör etkili olduklarından hipertansiyona karşı koruyucu moleküllerdir. Preeklampsi de hipertansiyon ile karakterize bir hastalık olduğundan EET düzeylerindeki bireysel farklılıkların bu hastalığa karşı bir yatkınlık oluşturabileceği düşünülebilir. Buradan hareketle EET düzeylerinde azalmaya neden olan çEH enziminin yüksek aktiviteye sahip varyantlarını içeren kadınlar preeklampsi hastalığına daha yatkın olabilir. İnsan çEH aktivitesinin bireyler arasında oldukça değişken olduğu belirlenmiştir. Bu farklılıklarda enzimin yapısal ve düzenleyici fonksiyonlarında değişikliklere yol açan polimorfizmlerin payının olduğu bildirilmiştir [26, 181, 183]. K55R polimorfizminin çEH aktivitesini artırarak EET' lerin hızlı bir şekilde biyolojik olarak inaktif olan diollerine yıkımına yol açtığı bilinmektedir [181, 183]. Bu çalışma, bir Türk popülasyonunda *EPHX2* geni K55R polimorfizminin sıklığının belirlendiği ilk araştırmadır. İncelediğimiz popülasyonun kontrol grubunda yer alan gebe kadınların % 19.2' sinin K55R polimorfizmini içerdiği belirlenmiştir (17.3 heterozigot ve % 1.9 homozigot polimorfik). K55R polimorfizm sıklıkları beyaz ırkta % 15-29, Afrikalı-Amarikalı' larda ise % 36-40 olarak saptanmıştır [26, 191, 192]. Bizim sonuçlarımız beyaz ırkta gözlenen sıklıklarla uyum göstermektedir. Ayrıca, bir İsveç popülasyonunda cinsiyet de göz önünde bulundurularak yapılan bir araştırmada kadınların % 17. 3' ünün (%16.45 AG ve % 0.82 GG) polimorfik genotipe sahip olduğu belirlenmiştir [193]. İsveç kadınlarında gözlenen bu genotip dağılımları da çalışmamızın kontrol grubu kadınlarının genotip sıklıkları ile oldukça benzerdir.

Çalışmamızda K55R polimorfizmi yönünden hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmış ($\chi^2=7.79$; $p=0.006$; bkz. çizelge 5.5) ve AG genotipine sahip gebe kadınlarda preeklampsi hastalığı görülme riskinin bu genotipi taşımayanlara göre 1.86 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (OR:1.86; % 95 CI: 1.09-2.63). GG genotipinin ise preeklampsi hastalığı açısından anlamlı bir risk oluşturmadığı saptanmıştır (OR: 0.92; % 95 CI: 0.24-3.47; Bkz. çizelge 5.5). Homozigot polimorfik ve heterozigot örnekler birlikte (AG+GG) değerlendirildiğinde preeklampsi riskinin 1.86 dan 1.76' ya düştüğü gözlenmiştir.

GG genotipi tüm populasyonlarda nadir bulunan bir genotip olup bizim çalışmamızda da hasta grubunda ve kontrol gruplarında sırası ile 4 ve 5 bireyin bu genotipe sahip olması nadir genotipin hastalık riski üzerindeki gerçek etkisinin ortaya konamamasına neden olmuş olabilir. Bu nedenle daha fazla sayıda birey içeren hasta- kontrol çalışmalarına ihtiyaç vardır. (OR:1.76; % 95 CI: 1.17-2.65). Ayrıca, G alleleline sahip gebe kadınlarda bu alleli taşımayanlara kıyasla preeklampsi hastalığı görülme riskinin 1.56 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (OR: 1.56; % 95 CI: 1.08-2.25; Bkz. çizelge 5.5). K55R polimorfizmi bu hastalarda çEH enzim aktivitesini artırarak EET düzeylerinin düşmesine ve bu moleküllerin vazodilatatör, anti-hipertansif ve anti-inflamatuar etkilerinin azalmasına neden olarak preeklampsi gelişimine katkıda bulunuyor olabilir. Vazodilatasyondaki bu azalışın da hastalarda kan basıncında artışa neden olarak preeklampside gelişen hipertansiyona neden olduğu düşünülebilir. Ayrıca, artan inflamatuvar cevap da preeklampsi patogenizinde önemli bir yere sahiptir. K55R polimorfizmine bağlı olarak artan çEH aktivitesi sonucu EET düzeylerindeki azalma bu hastalarda görülen artan inflamasyona da katkıda bulunuyor olabilir.

Bu çalışmanın preeklampsi ile *EPHX2* geni K55R polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk araştırma olması nedeni ile sonuçlarımızı diğer çalışmaların bulguları ile karşılaştıramadık. Fakat bu polimorfizmin kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon ve iskemik felç gibi birçok hastalıkla olan ilişkisini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Preeklampsi de bu hastalıklar gibi temelinde hipertansiyon, vazokonstrüksiyon, damar ve endotel işlevlerindeki bozukluklar yatan bir hastalık olduğundan bulgularımız bu çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılabilir. K55R polimorfizminin vasküler fonksiyonlar üzerindeki ilişkisini inceleyen bir çalışmada bu polimorfizmin beyaz Amerikalı bireylerde vazodilatasyonda azalma, düşük ön kol kan akımı ve damar direnci ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [191]. Ayrıca, K55R polimorfizminin beyaz Avrupalılarda hem koroner hastalık hem de iskemik inme için bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Homozigot olan erkeklerin anlamlı olarak daha yüksek sistolik kan basıncına ve daha yüksek hipertansiyon prevalansına sahip oldukları belirlenmiştir. Buna rağmen kadınlarda böyle bir ilişki analiz edilmemiştir [193]. Ayrıca, koroner arter hastalık riski ile K55R varyant alleli arasında yüksek bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte Afrikalı-Amerikalı' larda yukarıda sözü edilen hastalıklarla bu polimorfizm arasında bir risk ilişkisi gözlenmemiştir. Fakat beyaz Avrupalılarda *K55R* polimorfizmi ile iskemik felç [186], koroner arter hastalığı, hipertansiyon, restenoz ve artrial fibrillasyon arasında anlamlı bir ilişki

olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [27, 192]. *EPHX2* geni K55R polimorfizmi ile kardiyovasküler hastalık risk ilişkisinin, analiz edilen popülasyonun etnik kökenini, incelenen hastalığın tipi, gen-gen etkileşimi, popülasyondaki birey sayısı ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösteriyor olması, yapılan çalışmalarda bir birini desteklemeyen bu bulguların elde edilmesinin nedeni olabilir.

EPHX2 geni polimorfizmleri EET düzeyini değiştirebileceği gibi, ekspresyon düzeyleri de çEH enzim aktivitesinde farklılıklara yol açarak EET düzeylerini etkileyebilir. Hipertansif ratlarda *EPHX2* ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir [19, 226, 227]. Ayrıca, hipertansif hamile ratlarda, melatonin hormonunun *EPHX2* ekspresyonunu azaltarak hipertansiyona karşı koruyucu etki oluşturduğu bildirilmiştir [228]. Metilasyonun çeşitli genlerin ekspresyonunu etkileyen epigenetik mekanizmalardan biri olduğu [174-176] ve *EPHX2* geni promotor bölge metilasyonunun da bu genin ekspresyonunu düzenleyen faktörler arasında yer aldığı bilinmektedir [30]. Dolayısıyla, genin promotor bölge metilasyonu çEH ekspresyonunu değiştirerek EET metabolizması üzerinde etkili olabilir. Bu yolla değişen EET metabolizması da preeklampsi hastalığında etkili olabileceğinden ve *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyleri ile bu hastalık arasındaki ilişkiyi inceleyen herhangi bir çalışma bulunmadığından, araştırmamızda *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyleri de belirlendi. Metilasyon düzeylerinin belirlenmesinde hızlı ve hassas bir yöntem olan MS-HRM yöntemi kullanıldı. DNA metilasyon analizleri için southern blot, bisüfit DNA dizi analizi ve metilasyon spesifik PCR gibi yöntemler de günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat son zamanlarda geliştirilen MS-HRM yöntemi, dizi analizine gerek kalmaksızın bisüfit dönüşümü gerçekleştirilen DNA' larda sadece bir çift primer ve çift zincirli DNA' ya bağlanan floresan boyanın PCR sonrasında erime eğrisinin analiz edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle MS-HRM, diğer yöntemlere göre daha hızlı, ucuz ve kullanılabilir bir yöntemdir. Ayrıca % 1 civarındaki metilasyon düzeylerinin bile bu yöntemle belirlenebiliyor olması bu metodu southern blot, metilasyon spesifik PCR gibi geleneksel yöntemlere göre daha hassas bir yöntem haline getirmektedir [229-231]. Bu çalışmada, *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyleri yönünden hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu gözlenmiş, metilasyon düzeyi % 25' in altında olan gebe kadınlarda preeklampsi görülme riskinin 2.83 kat arttığı (OR: 2.83; %95 CI: 1.15-6.91) belirlenmiştir.

Ailede preeklampsi hikayesi, K55R polimorfizmi ve yaş gruplarının etkisi ile bu risk oranının 2.83' den 5.15' e yükseldiği tespit edilmiştir (OR**: 5.15; % 95 CI: 1.80-14.77). Bu sonuçlar, *EPHX2* geni hipometilasyonunun da K55R polimorfizmi gibi preeklampsi hastalığı için önemli bir risk faktörü olduğuna işaret etmektedir. *EPHX2* promotor bölge hipometilasyonu, çEH enzim ekspresyonunu artırarak EET' lerin hızlı bir şekilde yıkılmasına neden olabilir. Böylece bu moleküllerin anti-hipertansif, anti-inflamatuar, vazodilatör vb. etkilerini ortadan kaldırarak preeklampsi gelişimine katkıda bulunuyor olabilir. Çünkü endotel disfonksiyonu ve artan inflamatuvar yanıt preeklampsi patogenezinde oldukça önemli bir yere sahiptir [55, 56]. EET' lerin koroner dolaşımın da dahil olduğu birçok damar yatağında endotel bağımlı hiperpolarize edici faktör (EDHF) olarak işlev gördükleri [95, 97], kronik inflamasyona karşı anti-inflamatuar etkiye sahip oldukları bilinmektedir [12, 16]. Endotel hasarı oluşturulmuş kardiyometabolik hastalıklı hayvan modellerinde çEH inhibitörlerinin endotel disfonksiyonunu düzeltici yönde etki oluşturması da [232] EET' lerin endotel fonksiyonu üzerinden preeklampsi patogenezinde rol alabileceği düşüncesini desteklemektedir. Diğer yandan, *EPHX2* geni promotor hipometilasyonunun ve/veya K55R polimorfizminin neden olduğu EET düzeyindeki azalmanın preeklampsi hastalığı oluşumuna katkısı bu moleküllerin renin anjiyotensin aldosteron sistemi üzerindeki etkilerinden de kaynaklanabilir. Ang II' nin damar endotel hücrelerinde çEH ekspresyonunu artırdığı [166], ayrıca yüksek çEH ekspresyonunun ang II tarafından indüklenen hipertansiyona katkı sağladığı bilinmektedir [11]. Ek olarak, ang II ile indüklenen hipertansif ratlarda çEH inhibisyonunun kalp atım hızını ve kan basıncını azalttığı gösterilmiştir [22].

Bu çalışmada ayrıca, *EPHX2* metilasyon düzeylerinin ve K55R polimorfizminin EET düzeyleri üzerine olan etkisini incelemek amacıyla bu moleküllerin çEH tarafından yıkımı sonucunda oluşan metabolitlerden biri olan 11, 12-DHET düzeyleri de belirlenmiştir. Hasta grubunda 11, 12- DHET düzeylerinin kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır (p<0.05; Bkz. çizelge 5.7). Bu sonuç, K55R polimorfizminin artan enzim aktivitesine ve/veya *EPHX2* promotor hipometilasyonunun yüksek çEH enzim düzeyine neden olarak EET yıkımını artırması ile preeklampsi hastalarında bu moleküllerin daha hızlı bir şekilde DHET' lere yıkılabileceğine işaret etmektedir. EET düzeyindeki bu azalış da preeklampsi hastalarında hamilelik sırasında artan vazokonstrüksiyon ve bunun sonucunda gelişen hipertansiyona neden olabilir.

Ratlarda hamilelik sırasında böbrekte EET sentezinin artması ve bu moleküllerin sentezinin baskılanmasının kan basıncını 21 mmHg' ye kadar yükseltmesi [31] bu yorumu desteklemektedir. Literatürde, preeklampsi hastalarında 11,12-DHET düzeylerinin belirlendiği herhangi bir araştırma bulunmamasına rağmen, gestasyonel hipertansiyon [94], renovasküler hipertansiyon [95] ve vasküler kognitif bozukluğa sahip hastalarda [233] 11,12-DHET ve 14,15-DHET düzeylerinin daha fazla olması, bizim sonuçlarımız ile uyumludur. Temelinde damar işlevlerindeki bozuklukların ve hipertansiyonun etkili olduğu bu hastalıklarda DHET düzeylerindeki artış, preeklampside de EET yıkımındaki artışın etkili olabileceği yorumunu güçlendirmektedir. Bununla birlikte, 11,12-DHET düzeyleri K55R polimorfizmi ve *EPHX2* geni promotor bölge metilasyon düzeyi bakımından değerlendirildiğinde her ne kadar hipometile ve polimorfik bireylerde 11,12-DHET düzeyleri hipermetile ve polimorfizm içermeyenlere göre yüksek olsa da, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşmamıştır ($p>0.05$; Bkz. çizelge 5.8 ve 5.9). Bunun nedeni 11,12-DHET düzeylerinin hem hasta hem de kontrol grubunda 260 bireyin 75' inde çalışılmış olması olabilir.

Sonuç olarak, *EPHX2* geni hipometilasyonunun ve K55R polimorfizminin preeklampsi hastalığı için dikkate değer bir risk faktörü olduğu anlaşılmaktadır. *EPHX2* geni hipometilasyonunun gen ekspresyonunu artırması üzerinden dolaylı olarak, K55R polimorfizminin ise doğrudan çEH aktivitesini artırarak bu hastalarda dolaşımdaki EET düzeylerini azaltıcı yönde etki göstermiş olabileceklerini düşünmekteyiz. EET' lerin hızlı yıkımı da, bu moleküllerin vazodilatatör, anti-inflamatuar, anti-hipertansif özelliklerini ortadan kaldırabilir ve preeklampsi hastalarında vazokonstrüksiyon, kan basıncının yükselmesi, artan inflamasyon ve buna bağlı endotel hasarına neden olarak hastalığın patogeneğinde önemli role sahip olabilir. Bu çalışmaya 260 preeklampsi hastası ve 260 kontrol dahil edilmiştir. Daha fazla sayıda ve farklı popülasyonlarda yapılan araştırmalarla sonuçlarımızın desteklenmesi söz konusu olduğunda *EPHX2* geni hipometilasyon durumu ve K55R polimorfizmi de yaş, ailede preeklampsi hikayesi ve sigara gibi risk faktörlerine eklenebilir. Ayrıca, çEH inhibitörlerinin ilaç olarak kullanılması ile ilgili çalışmalar son zamanlarda yoğun bir şekilde devam etmektedir. Daha fazla sayıda bireyi içeren, farklı popülasyonlarda güçlü istatistiksel metotlar uygulanarak gerçekleştirilecek çalışmaların sonuçları ile desteklenmesi durumunda *EPHX2* geni K55R polimorfizmi ve/veya promotor hipometilasyonuna sahip gebe kadınlarda bu inhibitörlerin kullanımı olası preeklampsi gelişimine karşı önleyici olabilir.

Preeklampsi hastalığının gelişiminde rol alan risk faktörlerinin belirlenmesi ve hastalığa yatkınlık oluşturan genlerin açığa kavuşturulması açısından moleküler epidemiyolojik çalışmalar oldukça önemli bir yere sahiptir. Çünkü preeklampsi birden fazla maternal ve fetal genin, çevresel faktörler ve bunlar arasındaki karmaşık ilişkileri sonucu gelişen bir hastalıktır. Dolayısıyla preeklampsi hastalığına yatkınlık oluşturan genotiplerin ve gen-gen etkileşimlerinin belirlenmesi bu hastalıkla ilgili yapılacak moleküler epidemiyolojik çalışmaların önceliğini oluşturmaktadır. Bu araştırmalar, preeklampsi hastalığının gelişiminde rol alan aday genlerin belirlenmesi, bu genlerin etkili olduğu mekanizmalardaki işlev bozukluklarının giderilmesine yönelik çalışmaların yapılmasına ve hastalığın patogenezinin aydınlatılmasına katkı sağlayabilir. Ayrıca preeklampsi hastalığına karşı bireysel genetik yatkınlıkların belirlenmesi ile hastalığın daha erken tanınması, zamanında etkin ve koruyucu önlemlerin alınması, hastalığa karşı yeni ilaçların geliştirilmesi ve hastalar için en doğru ilaç ve doz seçiminin yapılması da mümkün olabilir. Fakat sözü geçen noktalara varılabilmesi için öncelikle geniş toplumsal çalışmalarla preeklampsi hastalığına yatkınlık oluşturan daha fazla sayıda genin belirlenmesi, gen çevre ve gen-gen etkileşimlerinin incelenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Dawey, DA., MacGillivray, I. (1988). The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*;158: 892-8.
2. Madazlı, R., Özgön, M., Aksu, M.F., Köse, Y. (1997). Maternal Mortality in Cerrahpaşa Medical Faculty Department of Obstetrics and Gynecology and Intensive Care Unit, The First World Congress on Maternal Mortality, Marrakesh, March 8-14, 145-148.
3. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). (2002). Practice Bulletin no. 33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol*, 99: 159.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists (2013). Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy, *Obstet Gynecol*; 122:1122.
5. Ylikorkala, O., Viinikka, L. (1992). The role of prostaglandins in obstetrical disorders. *Baillieres Clin Obstet Gyneacol*; 6: 809-27.
6. Meagher, EA., FitzGerald, GA. (1993). Disordered eicosanoid formation in pregnancy induced hypertension. *Circulation*; 88: 1324-33.
7. Roman, RJ., Maier, KG., Sun, CW., Harder, DR., Alonso-Galicia, M. (2000). Renal and cardiovascular actions of 20 hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 27: 855-865.
8. Sarkis, A., Lopez, B., Roman, RJ. (2004). Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 13: 205-214.
9. Campbell, WB., Gebremedhin, D., Pratt, PF., Harder, DR. (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*; 78: 415-423.
10. Imig, JD., Navar, LG., Roman, RJ., Reddy, KK., Falck, JR. (1996). Actions of epoxygenase metabolites on the preglomerular vasculature. *J Am Soc Nephrol*; 7: 2364-2370.
11. Imig, JD., Zhao, X., Capdevila, JH., Morisseau, C., Hammock, BD. (2002). Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in angiotensin II hypertension. *Hypertension*; 39: 690-694.
12. Node, K., Huo, Y., Ruan, X., Yang, B., Spiecker, M., Ley, K., Zeldin, DC., Liao, JK. (1999). Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase- derived eicosanoids. *Science*; 285: 1276-1279.
13. Campbell, WB. (2000). New role for epoxyeicosatrienoic acids as antiinflammatory mediators. *Trends Pharmacol Sci*; 21: 125-127.
14. Krotz, F., Riexinger, T., Buerkle, MA., Nithipatikom, K., Gloe, T., Sohn, HY., Campbell, WB., Pohl, U. (2004). Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 24: 595-600.
15. Larsen, BT., Gutterman, DD., Hatoum, OA. (2006). Emerging role of epoxyeicosatrienoic acids in coronary vascular function. *Eur J Clin Invest*; 36: 293-300.
16. Spiecker, M., Liao, JK. (2005). Vascular protective effects of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Arch Biochem Biophys*; 433: 413-420.
17. Spector, AA., Fang, X., Snyder, GD., Weintraub, NL. (2004). Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res*; 43: 55-90.
18. Yu, Z., Xu, F., Huse, LM., Morisseau, C., Draper, AJ., Newman, JW., Parker, C., Graham, L., Engler, MM., Hammock, BD., et al. (2000). Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res*; 87: 992-998.
19. Corenblum, MJ., Wise, VE., Georgi, K., Hammock, BD., Doris, PA., Fornage, M. (2008). Altered soluble epoxide hydrolase gene expression and function and vascular disease risk in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*; 51: 567-573.
20. Decker, M., Arand, M., Cronin, A. (2009). Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Arch Toxicol*; 83(4): 297-318.

21. Imig, J.D., Zhao, X., Zaharis, C.Z., Olearczyk, J.J., Pollock, D.M., Newman, J.W., Kim, I.H., Watanabe, T., Hammock, B.D. (2005) An orally active epoxide hydrolase inhibitor lowers blood pressure and provides renal protection in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*; 46: 975–981.
22. Jung, O., Brandes, R.P., Kim, I.H. (2005). Soluble epoxide hydrolase is a main effector of angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*; 45: 759–765.
23. Decker, M., Arand, M., Cronin, A. (2009). Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Arch Toxicol*; 83: 297–318.
24. Zordoky, B.N.M., El-Kadi, A.O.S. (2010). Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. *Pharmacology & Therapeutics*; 125: 446–463.
25. Pacifici, G.M., Temellini, A., Giuliani, L., Rane, A., Thomas, H., Oesch, F. (1988). Cytosolic epoxide hydrolase in humans: development and tissue distribution. *Archives of toxicology*; 62(4): 254-257.
26. Lee, C.R., North, K.E., Bray, M.S., Fornage, M., Seubert, J.M., Newman, J.W., et al. (2006). Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (epHX2) and risk of coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (aric) study. *Hum Mol Genet*; 15: 1640–1649.
27. Kullmann, S., Binner, P., Rackebrandt, K., Hüge, A., Haltern, G., Lankisch, M., et al. (2009). Variation in the human soluble epoxide hydrolase gene and risk of restenosis after percutaneous coronary intervention. *BMC Cardiovasc Disord*; 9: 48.
28. Wei, Q., Doris, P.A., Pollizotto, M.V., Boerwinkle, E., Jacobs, D.R. Jr., Siscovick, D.S., Fornage, M. (2007). Sequence variation in the soluble epoxide hydrolase gene and subclinical coronary atherosclerosis: interaction with cigarette smoking. *Atherosclerosis*; 190: 26-34.
29. Fornage, M., Lee C.R., Doris, P.A., Bray, M.S., Heiss, G., Zeldin, D.C., Boerwinkle, E. (2005). The soluble epoxide hydrolase gene harbors sequence variation associated with susceptibility to and protection from incident ischemic stroke. *Hum Mol Genet*; 14: 2829-2837.
30. Zhang D., Ai D., Tanaka H., Hammock B.D., Zhu Y. (2010). DNA methylation of the promoter of soluble epoxide hydrolase silences its expression by an SP-1-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*; 1799: 659-67.
31. Zhou, Y., Chang, H.H., Du, J., Wang, C.Y., Dong, Z., Wang, M.H. (2005). Renal epoxyeicosatrienoic acid synthesis during pregnancy. *AJP – Renal*; 288: 221-226.
32. Brown, C.M., Garovic, V.D. (2011). Mechanisms and management of hypertension in pregnant women. *Curr Hypertens Rep*; 13(5):338–46.
33. Report of the National High Blood Pressure Education Program. (2000). Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 183:1-22.
34. Levine, R.J., Ewell, M.G., Hauth, J.C., Curet, L.B., Catalano, P.M., Morris, C.D., et al. (2000). Should the definition of preeclampsia include a rise in diastolic blood pressure of ≥ 15 mm Hg to a level < 90 mm Hg in association with proteinuria? *Am J Obstet Gynecol*; 183(4):787-92.
35. National Institutes of Health (NIH). (2000). *Working group report on high blood pressure in pregnancy*. U.S.A. – Maryland – Bethesda.
36. August, P., Sibai, B.M., Lockwood, J.C., Barss, V.A. (2015). Preeclampsia: Clinical features and diagnosis, (<http://www.uptodate.com/contents/preeclampsia-clinical-features-and-diagnosis>).
37. Krugner-Higby, L., Luck, M., Hartley, D., Crispin, H.M., Lubach, G.R., Coe, C.L. (2009). High-risk pregnancy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a case of ectopic, abdominal pregnancy with birth of a live, term infant, and a case of gestational diabetes complicated by pre-eclampsia. *J Med Primatol*; 38(4):252-6.
38. Sibai, B., Dekker, G., Kupferminc, M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet*; 365(9461):785-799.
39. Sibai, B.M., Caritis, S., Hauth, J. (2003). National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. What we have learned about preeclampsia. *Semin Perinatol*; 27: 239.

40. Hutcheon, J.A., Lisonkova, S., Joseph, K.S. (2011). Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*; 25: 391.
41. Arngrimsson, R., Bjornsson, S., Geirsson, R.T., Bjornsson, H., Walkez, I.J., Snaedal, G. (1990). Genetic and familial predisposition to eclampsia and preeclampsia in a defined population. *Br J Obstet Gynecol*; 97: 762–769.
42. Duckitt, K., Harrington, D. (2005). Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*; 330: 565.
43. Duley, L. (2009). The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*; 33: 130-137.
44. Chappell, S., Morgan, L. (2006). Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia. *Clinical Science*; 110: 443-458.
45. Roberts, J.M., Hubel, C.A. (2009). The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta*; 30 (Suppl A): 32-37.
46. Chesley, L.C., Cooper, D.W. (1986). Genetics of hypertension in pregnancy: Possible single gene control of preeclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. *Br J Obstet Gynecol*; 93: 898-908.
47. Oudejans, C.B., van Dijk, M. (2008). Placental gene expression and pre-eclampsia. *Placenta*; 29(A): 78-82.
48. Hahn, S., Zhong, X.Y., Burk, M.R., Troeger, C., Kang, A., Holzgreve, W. (2001). Both maternal and fetal cell-free DNA in plasma fluctuate. *Ann NY Acad Sci*; 945: 141- 4.
49. Zhong, X.Y., Holzgreve, W., Hahn, S. (2001). Circulatory fetal and maternal DNA in pregnancies at risk and those affected by preeclampsia. *Ann NY Acad Sci*; 945: 138- 140.
50. Plaisier, M. (2011). Decidualisation and angiogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*; 25 (3): 259-271.
51. Wilson, M.L., Goodwin, T.M., Pan, V.L., Ingles, S.A. (2003). Molecular epidemiology of preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*; 58(1): 39-66.
52. Zhou, Y., Damsky, C.H., Fisher, S.J. (1997). Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in the syndrome? *Clin Invest*; 99: 2152-2164.
53. Jauniaux, E., Nicolaidis, K.H. (1996). Placental lakes, absent umbilical artery diastolic flow and poor fetal growth in early pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 7(2): 141-144.
54. Smarson, A.K., Sargent, I.L., Redman, C.W.G. (1996). Endotelial cell proliferation is suppressed by plazma but not serum from women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*;174: 787- 793.
55. Redman, C.W., Sargent I.L. (2005). Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*; 308(5728): 1592-4.
56. Rusterholz, C., Hahn, S., Holzgreve, W. (2007). Role of placentally produced inflammatory and regulatory cytokines in pregnancy ad the etiology of preeclampsia. *Semin immunopatol*; 29: 151-162.
57. Cunningham, F.G., Mac Donald, P.C., Gant, N.F., Leveno, K.J., Gilstrap, L.J., Hankins, G.D.V., Clark, S.L. (2001). Williams Obstetrics, the McGraw- Hill, 567-609p.
58. Saito, S., Shiozaki, A., Nakashima, A., Sakai, M., Sasaki, Y. (2007). The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med*; 28(2): 192-209.
59. Hamai, Y., Fujii, T., Yamashita, T., Nishina, H., Kazuma, S., Mikami, Y., et al. (1997). Evidence for an elevation in serum interleukin- 2 and tumor necrosis factor-alpha levels before the clinical manifestations os preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*; 38: 89-93.
60. Dilys, J.F., Frances, M.M., Elizabeth, A.B. (2004). Short and Long Term Changes in Plasma Inflammatory Markers Associted With Peeclampsia. *Hypertension*; 44: 708.
61. Agarwal, R., Loganath, A., Roy, A.C., Wong, Y.C., Ng, S.C. (2001). Expression profiles of interleukin-15 in early and late gestational human placenta and in pre-clamptic Placenta. *Mol um Reprod*; 7: 97-101.
62. Jonsson, Y., Ruber, M., Matthiesen, L. et al. (2006). Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J reprod Immunol*; 70: 706-714.

63. Mantovani, A. (1999). The role of cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Prog Clin Biol Res*; 349: 343- 53.
64. Molvarec, A., Szarka, A., Walentin, S., Beco, G. (2011). Serum leptin levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol*; 9: 124.
65. Hodari, A.A., Smeby, R., Bumpus, F.M. (1967). A renin-like substance in the human placenta. *Obstet Gynecol*; 29 (3): 313-7.
66. Friedman, S.A. (1988). Preeclampsia: A review of the role of prostaglandins. *Obstet Gynecol*; 71: 122-137.
67. Mütze, S., Rudnik-Schöneborn, S., Zerres, K., Rath, W. (2008). Genes and preeclampsia syndorme. *J Perinat Med*; 36: 38-58.
68. <http://en.wikipedia.org/wiki/Epoxide>> 03.01.2015.
69. Manson, M.M. (1980). Epoxides is there a human health problem? *British Journal of Industrial Medicine*; 37: 317-336.
70. Fretland, A.J., Omiecinski, C.J. (2000). Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chemico- Biological Interactions*; 129: 41- 59.
71. Arand, M., Cronin, A., Oesch, F., Mowbray, S.L., Jones T.A. (2003). The telltale structures of epoxide hydrolases. *Drug Metabolism Reviews*; 35 (4): 365- 383.
72. Norwood, S., Liao, J., Hammock, B.D., Yang, G. (2010). Epoxyeicosatrienoic acids and soluble epoxide hydrolase: potential therapeutic targets for inflammation and its induced carcinogenesis. *Am J Res*; 4: 447–457.
73. Snider, N.T, Kornilov, A.M., Kent, U.M., Hollenberg, P.F. (2007). Anandamide metabolism by human liver and kidney microsomal cytochrome P450 enzymes to form hydroxyeicosatetraenoic and epoxyeicosatrienoic acid ethanolamides. *J Pharmacol Exp Ther*; 321: 590–597.
74. Haeggstrom, J.Z. (2000). Structure, function and regulation of leukotriene A 4 hydrolase. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 161: 25- 31.
75. Yin, H., Zhou, Y., Zhu, M., Hou, S., Li, Z., Zhong, H., Lu, J., Meng, T., Wang, J., Xia, L., Xu, Y., Wu, Y. (2013). Role of mitochondria in programmed cell death mediated by arachidonic acid-derived eicosanoids. *Mitochondrion*; 13(3): 209-24.
76. http://en.wikipedia.org/wiki/Arachidonic_acid>06.01.2015.
77. Wang, Y.X., Ulu, A., Zhang, L.N., Hammock, B. (2010). Soluble Epoxide Hydrolase in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*; 12: 174–183.
78. Capdevila, J.H., Falck, J.R., Harris, R.C. (2000). Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res*; 41: 163–181.
79. Imig JD. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. (2012). *Physiol Rev*; 92: 101–130, .
80. Spector, A.A., Norris, A.W. (2007). Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol*; 292: 996–1012,.
81. Bellien, J., Pharm, D., Joannides, R. (2013). Epoxyeicosatrienoic Acid Pathway in Human Health and Diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*;61: 188–196.
82. Roman, R. (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*; 82: 131–185.
83. Bellien, J., Joannides, R., Richard, V., et al. (2011). Modulation of cytochrome- derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: a promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? *Pharmacol Ther*;131: 1–17.
84. Snyder, G.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., Spector, A.A. (2002). Evidence for a membrane site of action for 14, 15-EET on expression of aromatase in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*; 283(5): H1936-H1942.
85. Wong, P.Y, Lai, P.S., Falck, J.R. (2000). Mechanism and signal transduction of 14(R),15(S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in guinea pig monocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*; 62: 321–333.

86. Jiang, H., McGiff, J.C., Quilley, J., Sacerdoti, D., Reddy, L.M., Falck, J.R., Zhang, F., Lerea, K.M., Wong, P.Y. (2004). Identification of 5,6-trans-epoxyeicosatrienoic acid in the phospholipids of red blood cells. *J Biol Chem*; 279: 36412–36418.
87. Jiang, H., Zhu, A.G., Mamczur, M., Falck, J.R., Lerea, K.M., McGiff, J.C. (2007). Stimulation of rat erythrocyte P2X7 receptor induces the release of epoxyeicosatrienoic acids. *Br J Pharmacol*; 151: 1033–1040.
88. Jiang, H., Anderson, G.D., McGiff, J.C. (2010). Red blood cells (RBCs), epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and adenosine triphosphate (ATP). *Pharmacol Rep*; 62: 468–474.
89. Pratt, P.F., Rosolowsky, M., Campbell, W.B. (2002). Effects of epoxyeicosatrienoic acids on poly- morphonuclear leukocyte function. *Life Sci*; 70: 2521–2533.
90. Nakayama, K., Nitto, T., Inoue, T., Node, K. (2008). Expression of the cytochrome P450 epoxy- genase CYP2J2 in human monocytic leukocytes. *Life Sci*; 83: 339–345.
91. Fleming, I. (2007). DiscrEET regulators of homeostasis: epoxyeicosatrienoic acids, cytochrome P450 epoxygenases and vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci*; 28: 448–452.
92. Sudhakar, V., Shaw, S., Imig, J.D. (2010). Epoxyeicosatrienoic acid analogs and vascular function. *Curr Med Chem*; 17: 1181–1190.
93. Catella, F., Lawson, J.A., Fitzgerald, D.J., et al. (1990). Endogenous biosynthesis of arachidonic acid epoxides in humans: increased formation in pregnancy-induced hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87: 5893–5897.
94. Minuz, P., Jiang, H., Fava, C., et al. (2008). Altered release of cytochrome p450 metabolites of arachidonic acid in renovascular disease. *Hypertension*; 51: 1379–1385.
95. Campbell, W.B., Gebremedhin, D., Pratt, P.F., Harder, D.R. (1996). Identification of epoxyeico- satrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*; 78: 415– 423.
96. Dimitropoulou, C., West, L., Field, M.B., White, R.E., Reddy, L.M., Falck, J.R., Imig, J.D. (2007). Protein phosphatase 2A and Ca²-activated K⁺ channels contribute to 11,12- epoxyeico- satrienoic acid analog mediated mesenteric arterial relaxation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*; 83: 50–61.
97. Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D.R., Fleming, I., Busse, R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*; 401: 493–497.
98. Larsen, B.T., Miura, H., Hatoum, O.A., Campbell, W.B., Hammock, B.D., Zeldin, D.C., Falck, J.R., Gutterman, D.D. (2006). Epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids dilate human coronary arterioles via BK(Ca) channels: implications for soluble epoxide hydrolase inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 290: H491–H499.
99. Campbell, W.B., Fleming, I. (2010). Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent re- sponses. *Pflügers Arch*; 459: 881–895.
100. Lee, C.R., Imig, J.D., Edin, M.L., Foley, J., DeGraff, L.M., Bradbury, J.A., Graves, J.P., Lih, F.B., Clark, J., Myers, P., Perrow, A.L., Lepp, A.N., Kannon, M.A., Ronnekleiv, O.K., Alkayed, N.J., Falck, J.R., Tomer, K.B., Zeldin, D.C. (2010). Endothelial expression of human cytochrome P450 epoxyge- nases lowers blood pressure and attenuates hypertension-induced renal injury in mice. *FASEB J*; 24: 3770–3781.
101. Fang, X., Kaduce, T.L., Weintraub, N.L., Harmon, S., Teesch, L.M., Morisseau, C., Thompson, D.A., Hammock, B.D., Spector, A.A. (2001). Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *J Biol Chem*; 276: 14867–14874.
102. Edwards, G., Félétou, M., Weston, A.H. (2010). Endothelium-derived hyperpolaris- ing factors and associated pathways: a synopsis. *Pflügers Arch*; 459:863–879.
103. Archer, S.L., Gragasin, F.S., Wu, X., et al. (2003). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels. *Circulation*; 107: 769–776.
104. Campbell, W.B., Holmes, B.B., Falck, J.R., Capdevila, J.H., Gauthier, K.M. (2006). Regulation of potassium channels in coronary smooth muscle by adeno- viral expression of cytochrome P-450 epoxygenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 290: H64–H71.

105. Li, P.L., Chen, C.L., Bortell, R., Campbell, W.B. (1999). 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid stimulates endogenous mono-ADP-ribosylation in bovine coronary arterial smooth muscle. *Circ Res*; 85: 349–356.
106. Li, P.L., Zhang, D.X., Ge, Z.D., Campbell, W.B. (2002). Role of ADP-ribose in 11,12-EET-induced activation of K(Ca) channels in coronary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 282: H1229–H1236.
107. Imig, J.D., Dimitropoulou, C., Reddy, D.S., White, R.E., Falck, J.R. (2008). Afferent arteriolar dilation to 11,12-EET analogs involves PP2A activity and Ca²⁺-activated K channels. *Micro-circulation*; 15: 137–150.
108. Imig, J.D., Inscho, E.W., Deichmann, P.C., Reddy, K.M., Falck, J.R. (1999). Afferent arteriolar vasodilation to the sulfonimide analog of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid involves protein kinase A. *Hypertension*; 33: 408–413.
109. Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Nilius, B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*; 424: 434–438.
110. Earley, S., Pauyo, T., Drapp, R., Tavares, M.J., Liedtke, W., Brayden, J.E. (2009). TRPV4-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 297: H1096–H1102.
111. Krotz, F., Riexinger, T., Buerkle, M.A., Nithipatikom, K., Gloe, T., Sohn, H.Y., Campbell, W.B., Pohl, U. (2004). Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 24: 595–600.
112. Fitzpatrick, F.A., Ennis, M.D., Baze, M.E., Wynalda, M.A., McGee, J.E., Liggett, W.F. (1986). Inhibition of cyclooxygenase activity and platelet aggregation by epoxyeicosatrienoic acids. Influence of stereochemistry. *J Biol Chem*; 261: 15334–15338.
113. Zhang, L., Cui, Y., Geng, B., Zeng, X., Tang, C. (2008). 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid activates the L-arginine/nitric oxide pathway in human platelets. *Mol Cell Biochem*; 308: 51–56.
114. Michaelis, U.R., Fisslthaler, B., Medhora, M., Harder, D., Fleming, I., Busse, R. (2003). Cytochrome P450 2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce angiogenesis via cross-talk with the epidermal growth factor receptor (EGFR). *FASEB J*; 17: 770–772.
115. Yang, S., Wei, S., Pozzi, A., Capdevila, J.H. (2009). The arachidonic acid oxygenase is a component of the signaling mechanisms responsible for VEGF-stimulated angiogenesis. *Arch Biochem Biophys*; 489: 82–91.
116. Potente, M., Fisslthaler, B., Busse, R., Fleming, I. (2003). 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid-induced inhibition of FOXO factors promotes endothelial proliferation by down-regulating p27Kip1. *J Biol Chem*; 278: 29619–29625.
117. Yan, G., Chen, S., You, B., Sun, J. (2008). Activation of sphingosine kinase-1 mediates induction of endothelial cell proliferation and angiogenesis by epoxyeicosatrienoic acids. *Cardio-vasc Res*; 78: 308–314.
118. Chen, J.K., Capdevila, J., Harris, R.C. (2002). Heparin-binding EGF-like growth factor mediates the biological effects of P450 arachidonate oxygenase metabolites in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 6029–6034.
119. Chen, J.K., Falck, J.R., Reddy, K.M., Capdevila, J.H., Harris, R.C. (1998). Epoxyeicosatrienoic acids and their sulfonamide derivatives stimulate tyrosine phosphorylation and induce mitogenesis in renal epithelial cells. *J Biol Chem*; 273: 29254–29261.
120. Chen, J.K., Capdevila, J., Harris, R.C. (2000). Overexpression of C-terminal Src kinase blocks 14,15-epoxyeicosatrienoic acid-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *J Biol Chem*; 275: 13789–13792.
121. Potente, M., Michaelis, U.R., Fisslthaler, B., Busse, R., Fleming, I. (2002). Cytochrome P450 2C9-induced endothelial cell proliferation involves induction of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1, inhibition of the c-Jun N-terminal kinase, and up-regulation of cyclin D1. *J Biol Chem*; 277: 15671–15676.

122. Fang, X., Moore, S.A., Stoll, L.L., Rich, G., Kaduce, T.L., Weintraub, N.L., Spector, A.A. (1998). 14,15- Epoxyeicosatrienoic acid inhibits prostaglandin E2 production in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 275: H2113–H2121.
123. Fleming, I. (2007). Epoxyeicosatrienoic acids, cell signaling and angiogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*; 82: 60–67.
124. Node, K., Ruan, X.L., Dai, J., Yang, S.X., Graham, L., Zeldin, D.C., Liao, J.K. (2001). Activation of Galphas mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by ep- oxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem*; 276: 15983–15989.
125. Dhanasekaran, A., Al-Saghir, R., Lopez, B., Zhu, D., Gutterman, D.D., Jacobs, E.R., Medhora, M. (2006). Protective effects of epoxyeicosatrienoicacids on human endothelial cells from the pulmonary and coronary vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 291: H517–H531.
126. Medhora, M., Daniels, J., Munday, K., Fisslthaler, B., Busse, R., Jacobs, E.R., Harder, D.R. (2003). Epoxygenase-driven angiogenesis in human lung microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 284: H215–H224.
127. Cheranov, S.Y., Karpurapu, M., Wang, D., Zhang, B., Venema, R.C., Rao, G.N. (2008). An essential role for SRC-activated STAT-3 in 14,15-EET-induced VEGF expression and angiogenesis. *Blood*; 111: 5581–5591.
128. Pozzi, A., Popescu, V., Yang, S., Mei, S., Shi, M., Puolitaival, SM., Caprioli, R.M., Capdevila, J.H. (2010). The anti-tumorigenic properties of peroxisomal proliferator-activated receptor alpha are arachidonic acid epoxygenase-mediated. *J Biol Chem*; 285: 12840–12850.
129. Zagorac, D., Jakovcevic, D., Gebremedhin, D., Harder, D.R. (2008). Antiangiogenic effect of in- hibitors of cytochrome P450 on rats with glioblastoma multiforme. *J Cereb Blood Flow Metab*; 28: 1431–1439.
130. Chen, J.K., Capdevila, J., Harris, R.C. (2001). Cytochrome P450 epoxygenase metabolism of arachidonic acid inhibits apoptosis. *Mol Cell Biol*; 21: 6322–6331.
131. Yang, S., Lin, L., Chen, J.X., Lee, C.R., Seubert, J.M., Wang, Y., Wang, H., Chao, Z.R., Tao, D.D., Gong, J.P., Lu, Z.Y., Wang, D.W., Zeldin, D.C. (2007). Cytochrome P-450 epoxygenases protect endothelial cells from apoptosis induced by tumor necrosisfactor- alpha via MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 293: H142–H151.
132. Simpkins, A.N., Rudic, R.D., Schreihof, D.A., Roy, S., Manhiani, M., Tsai, H.J., Hammock, B.D., Imig, J.D. (2009). Soluble epoxide inhibition is protective against cerebral ischemia via vascular and neural protection. *Am J Pathol* 174: 2086–2095.
133. Schmelzer, K.R., Kubala, L., Newman, J.W., Kim, I.H., Eiserich, J.P., Hammock, BD. (2005). Soluble epoxide hydrolase is a therapeutic target for acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci*; 102: 9772–9777.
134. Feige, J.N., Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B., Wahli, W. (2006). From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res*; 45: 120–159.
135. Kota, B.P., Huang, T.H.W., Roufogalis, B.D. (2005). An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*; 51: 85-94.
136. Widstrom, R.L., Norris, A.W., Spector, A.A. (2001). Binding of cytochrome P450 monooxygenase and lipoxygenase pathway products by heart fatty acid- binding protein. *Biochemistry*; 40: 1070–1076.
137. Liu, Y., Zhang, Y., Schmelzer, K., Lee, T.S., Fang, X., Zhu, Y., Spector, A.A., Gill, S., Morisseau, C., Hammock. B.D., Shyy, J.Y.S. (2005). The anti-inflammatory effect of laminar flow: the role of PPARgamma, epoxyeicosatrienoic acids, and soluble epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci*; 102: 16747–16752.
138. Cowart, L.A., Wei, S., Hsu, M.H., Johnson, E.F., Krishna, M.U., Falck, J.R., Capdevila, J.H. (2002). The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem*; 277: 35105–35112.

139. Fang, X., Hu, S., Xu, B., Snyder, G.D., Harmon, S., Yao, J., Liu, Y., Sangras, B., Falck, J.R., Weintraub, N.L., Spector, A.A. (2006). 14,15-Dihydroxyeicosatrienoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 290: H55–H63.
140. Morisseau, C., Goodrow, M.H., Dowdy, D., et al. (1999). Potent urea and carbamate inhibitors of soluble epoxide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci*; 96: 8849–8854.
141. Fang, X., Weintraub, N.L., McCaw, R.B, Hu, S., Harmon, S.D., Rice, J.B., Hammock, B.D., Spector, A.A. (2004). Effect of soluble epoxide hydrolase inhibition on epoxyeicosatrienoic acid metabolism in human blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 287: H2412– H2420.
142. Fang, X., Weintraub, N.L., Oltman, C.L., Stoll, L.L., Kaduce, T.L., Harmon, S., Dellsperger, K.C., Morisseau, C., Hammock, B.D., Spector, A.A. (2002). Human coronary endothelial cells convert 14,15-EET to a biologically active chain-shortened epoxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 283: H2306– H2314.
143. Fang, X., Kaduce, T.L, Van Rollins, M., Weintraub, N.L., Spector, A.A. (2000). Conversion of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) to chain-shortened fatty acids by human skin fibroblasts. *J Lipid Res*; 41: 66–74.
144. Morisseau, C., Hammock, B.D. (2005). Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 45: 311–333.
145. Newman, J.W., Morisseau, C., Hammock, B.D. (2005). Epoxide hydrolases: their roles and inter- actions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res*; 44: 1–51.
146. Imig, J.D. (2000). Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol*; 279: F965–F981.
147. Spector, A.A., Fang, X., Snyder, G.D., Weintraub, N.L. (2004). Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res*; 43: 55–90.
148. Widstrom, R.L., Norris, A.W., Van Der Veer, J., Spector, A.A. (2003). Fatty acid-binding proteins inhibit hydration of epoxyeicosatrienoic acids by soluble epoxide hydrolase. *Biochemistry*; 42: 11762–11767.
149. Weintraub, N.L., Fang, X., Kaduce, T.L., VanRollins, M., Chatterjee, P., Spector, A.A. (1999). Epoxide hydrolases regulate epoxyeicosatrienoic acid incorporation into coronary endothelial phospholipids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 277: H2098–H2108.
150. Chen, J.K., Chen, J., Imig, J.D., Wei, S., Hachey, D.L., Guthi, J.S., Falck, J.R., Capdevila, J.H., Harris, R.C. (2008). Identification of novel endogenous cytochrome p450 arachidonate metabolites with high affinity for cannabinoid receptors. *J Biol Chem*; 283: 24514–24524.
151. Gill, S.S., Hammock, B.D., Yamamoto, I., Casida, J.E. (1972). Preliminary chromatographic studies on the metabolites and photodecomposition products of the juvenoid 1-(4'-ethylphenoxy-6, 7-epoxy)-3, 7-dimethyl-2-octene. *Insect juvenile hormones: chemistry and action*; 177-189.
152. Gill, S.S., Hammock, B.D. (1980). Distribution and properties of a mammalian soluble epoxide hydrolase. *Biochem Pharmacol*; 29: 389–395.
153. Morisseau, C., Hammock, B.D. (2008). Gerry Brooks and epoxide hydrolases: four decades to a pharmaceutical. *Pest Manag Sci*; 64: 594–609.
154. Zhao, T.T., Wasti, B., Xu, D.Y., Shen, L., Du, J.Q., Zhao, S.P. (2012). Soluble epoxide hydrolase and ischemic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*; 155(2): 181-7.
155. Newman, J.W., Morisseau, C., Harris, T.R., et al. (2003). The soluble epoxide hydrolase encoded by EPXH2 is a bifunctional enzyme with novel lipid phosphate phosphatase activity. *PNAS*; 100: 1558–1563.
156. Enayetallah, A.E., Luria, A., Luo, B., et al. (2008). Opposite regulation of cholesterol levels by the phosphatase and hydrolase domains of soluble epoxide hydrolase. *Biological Chemistry*; 283(52): 36592–36598.
157. Morisseau, C., Hammock, B.D. (2013). Impact of Soluble EpoxideHydrolase and Epoxyeicosanoids on Human Health. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 53: 37-58.

158. Tran, K.L. (2005). Lipid sulfates and sulfonates are allosteric competitive inhibitors of the N-terminal phosphatase activity of the mammalian soluble epoxide hydrolase. *Biochemistry*; 44: 12179–12187.
159. Gomez, G.A., Morisseau, C., Hammock, B.D., Christianson, D.W. (2004). Structure of human epoxide hydrolase reveals mechanistic inferences on bifunctional catalysis in epoxide and phosphate ester hydrolysis. *Biochemistry*; 43(16): 4716-23.
160. Harris, T.R., Hammock, B.D. (2013). Soluble epoxide hydrolase: gene structure, expression and deletion. *Gene*; 526(2): 61-74.
161. Imig, J.D., Hammock, B.D. (2009). Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardio-vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov*; 8: 794–805.
162. Shen, H.C., Hammock, B.D. (2012). Discovery of Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase: A Target with Multiple Potential Therapeutic Indications. *J Med Chem*; 55(5): 1789-808.
163. Inceoglu, B., Jinks, S.L, Schmelzer, K.R, et al. (2006). Inhibition of soluble epoxide hydrolase reduces LPS-induced thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in a rat model of inflammatory pain. *Life Sci*; 79: 2311–2319.
164. Qiu, H., Li, N., Liu, J.Y., Harris, T.R., Hammock, B.D., Chiamvimonvat, N. (2011). Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors and Heart Failure. *Cardiovascular Therapeutics*; 29: 99–111.
165. Tanaka, H., Kamita, S.G., Wolf, N.M., Harris, T.R, Wu, Z., Morisseau, C., Hammock, B.D. (2009). Transcriptional regulation of the human soluble epoxide hydrolase gene *EPHX2*. *Biochim Biophys Acta*; 1779(1): 17-27.
166. Ai, D., Fu, Y., Guo, D., Tanaka, H., Wang, N., Tang, C., Hammock, B.D., Shyy, JYJ., Zhu, Y. (2007). Angiotensin II up-regulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium *in vitro* and *in vivo*. *PNAS*; 104: 9018-9023.
167. Zhang, D., Xie, X., Chen, Y., Hammock, B.D., Kong, W., Zhu, Y. (2012). Homocysteine Upregulates Soluble Epoxide Hydrolase in Vascular Endothelium In Vitro and In Vivo. *Circulation Research*; 110: 808-817.
168. Egger, G., Liang, G., Aparicio AJones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*; 429: 457-63.
169. Strathdee, G., Brown, R. (2002). Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med*; 4: 1-17.
170. Jones, P.A., Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*; 293: 1068-70.
171. Baylın, S.B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*; 2: 4-11.
172. Momparler, R.L., Bovenzi, V. (2000). DNA Methylation and Cancer. *Journal of cellular physiology*; 183: 145–154.
173. Jones, P.A., Baylın, S.B. (2002). The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer. *Genetics*; 3: 415-428.
174. Jones, P.A., Laird, P.W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics*; 21: 163-167.
175. Klose, R.J., Ve Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*; 31: 89-97.
176. Bird, A.P., Wolffe, A.P. (1999). Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell*; 99: 451-454.
177. Lewis, J., Bird, A. (1991). DNA methylation and chromatin structure. *FEBS*; 285: 155-159.
178. Oguro, A., Fujita, N., Imaoka, S. (2009). Regulation of soluble epoxide hydrolase (sEH) in mice with diabetes: high glucose suppresses sEH expression. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*; 24(5): 438-445.
179. Oesch, F., Schladt, L., Hartmann, R., Timms, C., Wörner, W. (1986). Rat Cytosolic Epoxide Hydrolase. *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 197: 195-201.

180. Pinot, F., Grant, D.F., Spearow, J.L., Parker, A.G., Hammock, B.D. (1995). Differential regulation of soluble epoxide hydrolase by clofibrate and sexual hormones in the liver and kidneys of mice. *Biochem Pharm*; 50: 501–508.
181. Przybyla-Zawislak, B.D., Srivastava, P.K., Vázquez-Matías, J., Mohrenweiser, H.W., Maxwell, J.E., Hammock, B.D., Grant, D.F. (2003). Polymorphisms in human soluble epoxide hydrolase. *Molecular pharmacology*; 64(2), 482-490.
182. Sandberg, M., Hassett, C., Adman, E.T., Meijer, J., Omiecinski, C.J. (2000). Identification and functional characterization of human soluble epoxide hydrolase genetic polymorphisms. *J Biol Chem*; 275 (37): 28873–81.
183. Srivastava, P.K., Sharma, V.K., Kalonia, D.S., Grant, D.F. (2004). Polymorphisms in human soluble epoxide hydrolase: effects on enzyme activity, enzyme stability, and quaternary structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 427(2): 164–169.
184. Zhang, L., Ding, H., Yan, J., Hui, R., Wang, W., Kissling, G.E., Zeldin, D.C., Wang D.W. (2008). Genetic variation in cytochrome P450 2J2 and soluble epoxide hydrolase and risk of ischemic stroke in a Chinese population. *Pharmacogenet Genomics*; 18: 45–51.
185. Dreisbach, A.W., Japa, S., Sigel, A., Parenti, M.B., Hess, A.E., Srinouanprachanh, S.L., Rettie, A.E., Kim, H., Farin, F.M., Hamm, L.L., Lertora, J.J. (2005). The Prevalence of CYP2C8, 2C9, 2J2, and soluble epoxide hydrolase polymorphisms in African Americans with hypertension. *Am J Hypertens*; 18(10): 1276-81.
186. Gschwendtner, A., Ripke, S., Freilinger, T., Lichtner, P., Müller-Myhsok, B., Wichmann, H.E., Meitinger, T., Dichgans, M. (2008). Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) is associated with an increased risk of ischemic stroke in white Europeans. *Stroke*; 39(5): 1593-6.
187. Lee, J., Dahl, M., Grande, P., Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard, B.G. (2010). Genetically reduced soluble epoxide hydrolase activity and risk of stroke and other cardiovascular disease. *Stroke*; 41(1): 27-33.
188. Fornage, M., Boerwinkle, E., Doris, P.A., Jacobs, D., Liu, K., Wong, N.D. (2004). Polymorphism of the soluble epoxide hydrolase is associated with coronary artery calcification in African-American subjects: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Circulation*; 109(3): 335-9.
189. Hoebel, B.G., Steyrer, E., Graier, W.F. (1998). Origin and function of epoxyeicosatrienoic acids in vascular endothelial cells: more than just endothelium-derived hyperpolarizing factor? *Clin Exp Pharmacol Physiol.*; 25(10): 826-30.
190. Burdon, K.P., Lehtinen, A.B., Langefeld, C.D., Carr, J.J., Rich, S.S., Freedman, B.I., Herrington, D., Bowden, D.W. (2008). Genetic analysis of the soluble epoxide hydrolase gene, EPHX2, in subclinical cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study. *Diab Vasc Dis*; 5(2): 128-34.
191. Lee, C.R., Pretorius, M., Schuck, R.N., Burch, L.H., Bartlett, J., Williams, S.M., Zeldin, D.C., Brown, N.J. (2011). Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) is associated with forearm vasodilator responses in humans. *Hypertension*; 57(1): 116-22.
192. Wutzler, A., Kestler, C., Perrot, A., Loehr, L., Huemer, M., Parwani, A.S., Attanasio, P., Özcelik, C., Schunck, W.H, Gollasch, M., Haverkamp, W., Boldt, L.H. (2013). Variations in the human soluble epoxide hydrolase gene and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation. *Int H Cardiol*; 168(4): 3647-51.
193. Fava, C., Montagnana, M., Danese, E., Almgren, P., Hedblad, B., Engström, G., Berglund, G., Minuz, P., Melander, O. (2010). Homozygosity for the EPHX2 K55R polymorphism increases the long-term risk of ischemic stroke in men: a study in Swedes. *Pharmacogenet Genomics*; 20(2): 94-103.
194. Lee, S.H., Lee, J., Cha, R., Park, M.H., Ha, J.W., Kim, S., Kim, Y.S. (2008) Genetic variations in soluble epoxide hydrolase and graft function in kidney transplantation. *Transplant Proc* ; 40(5): 1353-6.
195. Qin, Y., Han, X., Peng, Y., Shen, R., Guo, X., Cao, L., Song, L., Sha, J., Xia, Y., Wang, X. (2012). Genetic variants in epoxide hydrolases modify the risk of oligozoospermia and asthenospermia in Han-Chinese population. *Gene*; 510(2): 171-4.

196. Wojdacz, T.K., Dobrovic, A. (2007). Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Research*; 35(6): e41.
197. Temizkan, G., Yilmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Topal Sarıkaya, A., Arda, N. (2008). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Elektroforetik Yöntemler. Temizkan, G., Arda, N. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 68-73.
198. Choudhury, M., Friedman, J.E. (2012). Epigenetics and microRNAs in Preeclampsia. *Clin Exp Hypertens*; 34(5): 334–341.
199. Meads, C.A., Cnossen, J.S., Meher, S., et al. (2008). Methods of prediction and prevention of preeclampsia: systematic reviews of accuracy and effectiveness literature with economic modelling. *Health Technol Assess*; 12: 1–270.
200. Atrash, H.K., Konin, L.M., Lawson, H.W., Franks, A.L., Smith, J.C. (1990). Maternal mortality in the United States, 1979-1986. *Obstet Gynecol*; 76: 1055-1060.
201. Keeling, J.W., McCaw-Binns, A.M., Ashley, D.E., Golding, J. (1991). Maternal mortality in Jamaica: health care provision and causes of death. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*; 35(1): 19-27.
202. Elhawary, T.M., El-Bendary, A.S., Demerdash, H. (2012). Maternal serum endoglin as an early marker of pre-eclampsia in high-risk patients. *International journal of women's health*; 4: 521.
203. Sharon, M., Franklin, H., Epstein, S., et al. (2010). Pre-eclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med*; 59: 61–78.
204. <http://www.preeclampsia.org/pdf/ar2006.pdf>>04.01.2015.
205. http://www.who.int/whr/2005/whr2005_en.pdf>04.01.2015.
206. Grill, S., Rusterholz, C., Zanetti-Dällenbach, R., Tercanli, S., Holzgreve, W., Hahn, S., Lapaire, O. (2009). Potential markers of preeclampsia-a review. *Reprod Biol Endocrinol*; 7(70): 10-1186.
207. Lindheimer, M.D., Taler, S., Cunningham, F.G. (2009). Hypertension disorders in pregnancy. *J Am Soc Hypertens*; 6: 484.
208. Cunningham, F.G., Leveno, K.J., Bloom, S.L., Hauth, J.C., Rouse, D.J., Spong, C.Y. (2010). Williams Obstetrics and Gynecology, Intrapartum assessment, Cunningham, F.G., Leveno, K.J., Bloom, S.L., Hauth, J.C., Rouse, D.J., Spong, C.Y, (ed). McGraw-Hill.
209. Choudhury, M., Friedman, J.E. (2011). Obesity: childhood obesity methylate now, pay later? *Nat Rev Endocrinol*; 7: 439–440.
210. Maccani, M.A., Marsit, C.J. (2009). Epigenetics in the placenta. *Am J Reprod Immunol*; 62: 78–89.
211. Fava, C., Ricci, M., Melander, O., Minuz, P. (2012). Hypertension, cardiovascular risk and polymorphisms in genes controlling the cytochrome P450 pathway of arachidonic acid: A sex-specific relation? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* ; 98(3-4): 75-85.
212. Zheng, X., Zinkevich, N.S., Gebremedhin, D., Gauthier, K.M., Nishijima, Y., Fang, J., Wilcox, D.A., Campbell, W.B., Gutterman, D.D., Zhang, D.X. (2013). Arachidonic Acid-Induced Dilatation in Human Coronary Arterioles: Convergence of Signaling Mechanisms on Endothelial TRPV4-Mediated Ca²⁺ Entry. *J Am Heart Assoc* ;2(3): 1-15.
213. Gilbert, J.S., Nijland, M.J., Knoblich, P. (2008). Placental ischemia and cardiovascular dysfunction in preeclampsia and beyond: making the connections. *Expert Rev Cardiovasc Ther*; 6: 1367-1377.
214. Koerner, I.P., Jaks, R., DeBarber, A.E., Koop, D., Mao, P., Grant, D.F., Alkayed, N.J. (2007). Polymorphisms in the human soluble epoxide hydrolase gene EPHX2 linked to neuronal survival after ischemic injury. *J Neurosci* ;27(17): 4642-9.
215. Ozan, Y.D., Ertuğrul, M., Okumuş, H. (2012). Preeklampsi Tanılama, Değerlendirme ve Hemşirelik Yönetimi. *Cumhuriyet Hemşirelik Dergisi*; 2: 59-65.
216. Bianco, A., Stone, J., Lynch, L., Lapinski, R., Berkowitz, G., Berkowitz, R.L. (1996). Pregnancy outcome at age 40 and older. *Obstet Gynecol*; 87: 917-22.
217. Saftlas, A.F., Olson, D.R., Franks, A.I., Atrash, H.K., Pokras, R. (1990). Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United states,1979-1986. *Am J Obstet Gynecol*;163: 460-5.

218. Klonoff-Cohen, H., Sharon E., David, S. Cigarette smoking and preeclampsia. (1993). *Obstetrics & Gynecology*; 81: 541-544.
219. Ambrose, J.A., Barua, R.S. (2004). The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J. Am. Coll. Cardiol*; 43: 1731–1737.
220. Celermajer, D.S., Sorensen, K.E., Georgakopoulos, D., Bull, C., Thomas, O., Robinson, J., Deanfield, J.E. (1993). Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*; 88: 2149–2155.
221. Barua, R.S., Ambrose, J.A., Eales-Reynolds, L.J., DeVoe, M.C., Zervas, J.G., Saha, D.C. (2001). Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation*; 104: 1905–1910.
222. Maresh, J.G., Xu, H., Jiang, N., Gairola, C.G., Shohet, R.V. (2005). Tobacco smoke dysregulates endothelial vasoregulatory transcripts in vivo. *Physiol Genomics* ; 21(3): 308-13.
223. Cincotta, R.B., Brennecke, S.P. (1998). Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. *Int J Gynaecol Obstet*; 60: 23-7.
224. Arngrimsson, R., Bjornsson, S., Geirsson, R.T., Bjornsson, H., Walker, J.J., Snaedal, G. (1990). Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population. *Br J Obstet Gynaecol*; 97: 762-69.
225. Salonen, R.H., Lichtenstein, P., Lipworth, L., Cnattingius, S. (2000). Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. *Am J Med Genet*; 91: 256-260.
226. Sellers, K.W., Sun, C., Diez-Freire, C., Waki, H., Morisseau, C., Falck, J.R., Hammock, B.D., Paton, J.F., Raizada, M.K. (2005). Novel mechanism of brain soluble epoxide hydrolase-mediated blood pressure regulation in the spontaneously hypertensive rat. *FASEB J*; 19(6): 626-8.
227. Keserü, B., Barbosa-Sicard, E., Schermuly, R.T., Tanaka, H., Hammock, B.D., Weissmann, N., Fisslthaler, B., Fleming, I. (2010). Hypoxia-induced pulmonary hypertension: comparison of soluble epoxide hydrolase deletion vs. inhibition. *Cardiovascular Research*; 85: 232–240.
228. Tain, Y.L., Leu, S., Wu, K.L., Lee, W.C., Chan, J.Y. (2014). Melatonin prevents maternal fructose intake-induced programmed hypertension in the offspring: roles of nitric oxide and arachidonic acid metabolites. *J. Pineal Res*; 57: 80–89.
229. Weiwei, L., Ming, G., Bing, S., Chuanzhong, Y., Ji L., Xinju, Z., Chunfang, L., Min, L., Yong, L., Yuan, L. (2010). Quantitative assessment of AKAP12 promoter methylation in colorectal cancer using methylation-sensitive high resolution melting: Correlation with Duke's stage. *Cancer Biology & Therapy*; 9: 862-871.
230. White, H.E., Hall, V.J., Cross, N.C. (2007). Methylation-sensitive high-resolution melting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Clinical chemistry*; 53(11): 1960-1962.
231. Balic, M., Pichler, M., Strutz, J., Heitzer, E., Ausch, C., Samonigg, H., Cote RJ., Dandachi, N. (2009). High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis. *The Journal of Molecular Diagnostics*; 11(2): 102-108.
232. Zhang, L.N., Vincelette, J., Chen, D., Gless, R.D., Anandan, S.K., Rubanyi, G.M., Webb, H.K., MacIntyre, D.E., Wang, Y.X. (2011). Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates endothelial dysfunction in animal models of diabetes, obesity and hypertension. *Eur J Pharmacol* ;654(1): 68-74.
233. Nelson, J.W, Young, J.M., Borkar, R.N., Woltjer, RL., Quinn, J.F., Silbert, L.C., Grafe, M.R., Alkayed, N.J. (2014). Role of soluble epoxide hydrolase in age-related vascular cognitive decline. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* ; 113: 30-37.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	İsmail SARI
Doğum Yeri ve Tarihi	Kangal, 28.12.1981
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce, Almanca
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, 58140-SİVAS
E-posta Adresi	smlsr@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise	Prof. Dr. N. Erşen Anadolu Öğretmen Lisesi, SİVAS, 2000.
Lisans + Tezsiz Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi/ Eğitim Fakültesi, OFMA Bölümü, Biyoloji Eğitimi AD. ANKARA, 2007
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya AD. 2010.
Doktora	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya AD. 2015.

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD.	Araştırma Görevlisi, 2007-
---	----------------------------

EK-1



T.C.

Cumhuriyet Üniversitesi

TIP FAKÜLTESİ

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

Sayı :

Konu :

Konu:
Sayı:10/10

30.11.2010

Karar No: 2010-01/09

Doç.Dr.Hatice PINARBAŞI'nın yürüttüğü olduğu "Soluble Epoksit Hidrolaz Enziminin Genetik Polimorfizmi ve Preeklampsi Hastalığı Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi" konulu Akademik Amaçlı Araştırmanın Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca uygun olduğuna;

Karar verilmiştir.

<i>Ünvanı/Adı Soyadı</i>	<i>Üye</i>	<i>Uzmanlık Dalı</i>	<i>İmzası</i>
Prof.Dr.Ece KAPTANOĞLU	Başkan	Fiziksel Tıp ve Reh.	
Yrd.Doç.Dr.Gülşay YILDIRIM	Başkan Yrd.	Deontoloji	katılmadı
Yrd.Doç.Dr.Köksal DEVECİ	Raportör	Tıbbi Biyokimya	
Prof.Dr.Dilara İÇAĞASIOĞLU	Üye	Çocuk Sağ.ve Hast.	
Prof.Dr.M.Kemal YILDIRIM	Üye	Farmakoloji	
Prof.Dr.Ayhan KOYUNCU	Üye	Genel Cerrahi	
Prof.Dr.Esin YILDIZ	Üye	Tıbbi Patoloji	katılmadı
Doç.Dr.M.Birhan YILMAZ	Üye	Kardiyoloji	
Doç.Dr.Kenan KAYGUSUZ	Üye	Anesteziyoloji ve Rean.	
Yrd.Doç.Dr.Ziynet ÇINAR	Üye	Biyoistatistik	katılmadı
Pınar İNAN	Üye	Hukuk Müşaviri	katılmadı