



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

**BİR TÜRK POPÜLASYONUNDA SOLUBLE EPOKSİT HİDROLAZ GENİ (*EPHX2*)  
G860A POLİMORFİZM SIKLIĞININ BELİRLENMESİ**

**Sait ERDÖNMEZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**SİVAS  
2012**

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

**BİR TÜRK POPÜLASYONUNDA SOLUBLE EPOKSİT HİDROLAZ  
GENİ (*EPHX2*) G860A POLİMORFİZM SIKLIĞININ BELİRLENMESİ**

**Sait ERDÖNMEZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

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

**SİVAS  
2012**

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kuralına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Başkan

Prof. Dr. Naci DEĞERLİ

Üye (Danışman)

Prof. Dr. Hatice PINARBAŞI

Üye

Doç. Dr. Yavuz SİLİĞ

#### ONAY

Bu tez çalışması, 01/02/2012 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ali Altuğ BIÇAKCI  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24/09/2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

## ÖZET

### BİR TÜRK POPÜLASYONUNDA SOLUBLE EPOKSİT HİDROLAZ GENİ (*EPHX2*) G860A POLİMORFİZM SIKLIĞININ BELİRLENMESİ

Sait ERDÖNMEZ

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Hatice PINARBAŞI

2012, 50 sayfa

Çözünür epoksit hidrolaz (sEH) enzimi sitokrom P450 epoksigenazlar tarafından oluşturulan endojen yağ asidi epoksitlerin yıkım reaksiyonlarını katalizler. Epoksieikosatrienoik asitler (EET) gibi bu yağ asidi epoksitlerinin vazodilatatör, anti-inflamatuar, anti-platelet, anti-hipertansif, anti-apoptotik, anti-trombotik ve natriüretik özellikleri olduğu gösterilmiştir. sEH enzimini kodlayan genin (*EPHX2*) 8. eksonunda, 287. kodonda arjinin amino asidinin glutamin ile yer değiştirmesi ile sonuçlanan (R287Q) genel bir tek nükleotid polimorfizmi (G860A) belirlenmiştir. sEH proteinindeki R287Q polimorfizmi enzim aktivitesinde %25-%58 azalmaya neden olur. Bu çalışmada 300 bireyden oluşan bir Türk popülasyonunda *EPHX2* G860A polimorfizm sıklığı PZR-RFLP metodu ile belirlenmiştir. Gözlenen sıklıklar yabanıl tip (GG), heterozigot (GA) ve homozigot (AA) polimorfik genotipler için sırasıyla %78.6, %20.4, %1 dir. Genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg dengesinde olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Çözünür epoksit hidrolaz (sEH), polimorfizm, *EPHX2*

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF SOLUBLE EPOXIDE HYDROLASE GENE (*EPHX2*) G860A POLYMORPHISM FREQUENCY IN A TURKISH POPULATION

Sait ERDÖNMEZ

Master of Science Thesis, Department of Biochemistry  
Supervisor: Prof. Dr. Hatice PINARBAŞI

2012, 50 pages

Soluble epoxide hydrolase (sEH) catalyses the degradation of endogenous fatty acid epoxides generated by CYP450 epoxygenases. These fatty acid epoxides such as epoxyeicosatrienoic acids (EETs) have been shown to possess vasodilator, anti-inflammatory, anti-platelet, anti-hypertensive, anti-apoptotic, anti-thrombotic and natriuretic effects. A common single nucleotide polymorphism (G860A) in exon 8 of the gene encoding the sEH (*EPHX2*) which results in amino acid substitution from arginine to glutamine at codon 287 (R287Q) has been identified. The R287Q polymorphism results in sEH protein with 25%-58% reduced enzyme activity. In the present study, the distribution of G860A polymorphism of *EPHX2* in a Turkish population including 300 unrelated individuals was examined using a PCR-RFLP method. The observed frequencies were 78.6, 20.4 and 1 % for wild type (GG), heterozygous (GA) and homozygous (AA) polymorphic genotypes respectively. The genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium.

**Keywords:** Soluble epoxide hydrolase (sEH), polymorphism, *EPHX2*

## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen ve bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Hatice PINARBAŞI'na, katkı ve desteğinden dolayı bölüm başkanımız Prof. Dr. Sevtap BAKIR'a, eğitimimde emeği geğen hocalarım Doç. Dr. Yavuz SİLİğ'e ve Yrd. Doç.Dr. V. Kenan ÇELİK'e, istatistiksel analiz konusunda her zaman yardımcı olan Prof. Dr. Hafize SEZER'e teőekkürlerimi sunarım. Yardımlarından dolayı Arő. Gör. İsmail SARI ve Murat ERTEMUR'a, maddi ve manevi olarak benden desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teőekkürler.

## İÇİNDEKİLER

### SAYFA NO

<b>ÖZET</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	ix
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	x
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	2
2.1. Epoksitler.....	2
2.1.1. Epoksit metabolizması ve epoksit hidrolazlar.....	3
2.1.2. EET'lerin biyolojik etkileri ve etki mekanizması.....	7
2.2. Çözünür Epoksit Hidrolazların enziminin özellikleri ve biyolojik rolü.....	10
2.2.1.Çözünür Epoksit Hidrolaz enziminin substratları.....	12
2.2.2. Çözünür Epoksit Hidrolaz enziminin inhibitörleri.....	13
2.2.3. Çözünür Epoksit Hidrolaz enziminin polimorfizmleri.....	15
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	19



3.1. Kullanılan cihazlar ve malzemeler.....	19
3.2. Kimyasal maddeler.....	20
3.3. Genel çözelti ve tamponlar.....	21
3.4. Çalışma grubu.....	22
3.5. Kan örneklerinin toplanması.....	22
3.6. Genomik DNA izolasyonu.....	22
3.7. DNA kalitesi ve miktarının belirlenmesi.....	23
3.8. Genotipleme.....	24
3.8.1. <i>EPHX2</i> gen polimorfizminin belirlenmesi.....	24
3.9. Agoroz jel elektroforezi .....	24
<b>4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....</b>	<b>26</b>
<b>5. BULGULAR.....</b>	<b>27</b>
<b>6. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>38</b>
<b>7.KAYNAKLAR.....</b>	<b>44</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>49</b>

## **EKLER**

EK-1 Sorgu Formu

EK-2 Yerel Etik Kurul Kararı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA NO

Şekil 2.1. Epoksit hidrolaz molekülünün genel yapısı.....	2
Şekil 2.2. Başlıca mEH substratları .....	3
Şekil 2.3. Epoksit hidrolaz, epoksit yapısına su ekleyerek diol oluşumunu sağlayan tepkimeyi katalizler.....	4
Şekil 2.4. Araşidonik asit metabolizması.....	5
Şekil 2.5. EET'lerin yapısal izomerleri.....	6
Şekil 2.6. EET'lerin kardiyovasküler iyon kanalı ile ilişkisi.....	9
Şekil 2.7. sEH enziminin üç boyutlu yapısı.....	10
Şekil 2.8. Epoksit molekülünün sEH enziminin katalizlediği tepkime ile diole çevrilmesi.....	11
Şekil 2.9. Başlıca sEH substratları.....	12
Şekil 2.10. Başlıca sEH inhibitörleri.....	15
Şekil 2.11. Fare sEH enziminin kristal yapısı.....	16
Şekil 5.1. G860A tek nükleotid polimorfizmini içeren <i>EPHX2</i> nükleotid dizisi.....	29
Şekil 5.2. G860A polimorfizminin belirlenmesi.....	30
Şekil 5.3. sEH genotiplerinin PZR-RFLP paternleri.....	31

## TABLolar DİZİNİ

### SAYFA NO

<b>Tablo 2.1.</b> Farklı popülasyonlarda sEH enzimi Arg287Glu polimorfizmi ile KVH'lar arasındaki ilişki.....	18
<b>Tablo 3.1</b> PZR reaksiyon bileşenleri.....	24
<b>Tablo 3.2</b> 197 bç DNA'yı amplifiye eden PZR programı .....	25
<b>Tablo 5.1</b> Çalışma grubunu oluşturan bireylerin karakteristik özellikleri.....	27
<b>Tablo 5.2</b> Çalışma grubunda yer alan bireylerin ailede KVH ve diyabet hikayesi yönünden değerlendirilmesi.....	28
<b>Tablo 5.3</b> Çalışma grubunu oluşturan bireylerde sEH genotip dağılımı.....	32
<b>Tablo 5.4</b> <i>EPHX2</i> G860A polimorfizminin Hardy-Weinberg Dengesi yönünden incelenmesi.....	32
<b>Tablo 5.5</b> Çalışma grubunda yer alan bireylerin genotip sıklığının cinsiyete göre dağılımı.....	33
<b>Tablo 5.6</b> Çalışma grubunda yer alan bireylerin plazma lipit düzeylerinin cinsiyet yönünden değerlendirilmesi.....	34
<b>Tablo 5.7</b> Çalışma grubunda yer alan bireylerin plazma lipit değerlerinin <i>EPHX2</i> geni G860A polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi.....	34
<b>Tablo 5.8</b> Çalışma grubunda yer alan erkek bireylerde lipit düzeylerinin <i>EPHX2</i> geni G860A polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi.....	35
<b>Tablo 5.9</b> Çalışma grubunda yer alan kadın bireylerde lipit düzeylerinin <i>EPHX2</i> geni G860A polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi.....	35
<b>Tablo 5.10</b> <i>EPHX2</i> geni G860A polimorfizm sıklıklarının kardiyovasküler hastalık yönünden değerlendirilmesi.....	36
<b>Tablo 5.11</b> <i>EPHX2</i> geni G860A polimorfizm sıklıklarının diyabet yönünden değerlendirilmesi.....	37
<b>Tablo 6.1</b> Farklı popülasyonlarda <i>EPHX2</i> G860A polimorfizm sıklıkları.....	40

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ADP</b>	Adenozin difosfat
<b>AEPÜ</b>	1-adamantil-3(5-(2-(2-etoksietoksi)etoksi)pentil)üre
<b>AUDA</b>	12 – (3-adamantan-1-il üreido)-dodekanoik asit
<b>ChEH</b>	Kolesterol epoksit hidrolaz
<b>COX</b>	Siklooksijenaz
<b>CYP450</b>	Sitokrom P450
<b>DHET</b>	Dihidroksieikosatrieionik asit
<b>EDHF</b>	Endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktör
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetra asetik asit
<b>EET</b>	Epoksieikosatrieionik asit
<b>HETE</b>	Hidroksieikosatrieionik asit
<b>HT</b>	Hipertansiyon
<b>KVH</b>	Kardiyovasküler hastalık
<b>LOX</b>	Lipoksijenaz
<b>LTA4 hidrolaz</b>	Lökotrien A4 hidrolaz
<b>mEH</b>	Mikrozomal epoksit hidrolaz
<b>PGE2</b>	Prostaglandin E2
<b>PGJ2</b>	Prostaglandin J2
<b>PPAR- <math>\gamma</math></b>	Peroksizom proliferatör aktive reseptör- <i>gama</i>
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RFLP</b>	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
<b>SDS</b>	Sodyum dodesilsülfat
<b>sEH</b>	Çözünür epoksit hidrolaz
<b>TAE</b>	Tris/ asetat/EDTA
<b>t-AUCB</b>	Trans-4-(4-(3-adamantan-1-il-üreido)-sikloheksiloksil)- benzoik asit
<b>TE</b>	Tris/ EDTA
<b>TG</b>	Trigliserid
<b>TK</b>	Total kolesterol

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

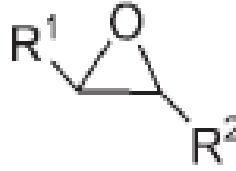
Epoksitler kimyasal olarak reaktif ve sulu ortamda stabil olmayan moleküllerdir. Lipofilik ve son derece elektrofilik özellikte olmaları nedeniyle epoksitlerin vücuttan atılımları önemlidir [1]. Epoksit metabolizması eksojen ve endojen epoksitlerin metabolizması olarak iki şekilde gerçekleşir. Endojen epoksitler araşidonik asit metabolizması sonucu oluşur. Epoksieikosatrienoik asitler (EET) de endojen epoksittir ve çözünür epoksit hidrolaz (sEH) enzimi tarafından dihidroksieikosatrienoik asitlere (DHET) çevrilirler. EET'lerin vazodilatatör, anti-inflamatuar, anti-platelet, anti-hipertansif, anti-apoptotik, anti-trombotik ve natriüretik etkileri vardır. EET'lerin bu etkileri sEH enzimi ile DHET'lere çevrilerek ortadan kaldırılır. DHET'lerin ise herhangi bir biyolojik rolü belirlenmemiştir [2]. sEH enziminin hipertansiyon (HT) ve kardiyovasküler hastalık (KVH) oluşumunda etkili olduğu düşünülmekte hatta sözü edilen hastalıkların tedavisinde terapötik bir hedef olarak görülmektedir [3]. Son yıllarda sEH enziminin farmakolojik olarak inhibisyonu ile HT ve KVH tedavisine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. HT ve KVH'ların çoğu genetik faktörler ve çevresel faktörler arasındaki ilişkiler sonucu ortaya çıkmaktadır. İnsan genom haritasının çıkarılması için girişimlere başlandıktan sonra geniş kitleleri etkileyen hastalıklar ve bu hastalıklarla genetik faktörlerin ilişkisi de araştırmalarda ön planda yer almaya başlamıştır. Genlerin hastalıklarla olan ilişkisini bilmek ilaç geliştirme araştırmaları açısından önemlidir. İnsanlarda meydana gelen tek nükleotid değişimleri, immün cevabın ve ilaç etkinliğinin kişiden kişiye değişmesinin gerçek nedeni olarak gösterilmektedir. Dolayısı ile sEH enzimini kodlayan *EPHX2* geninde aktivite azaltıcı veya arttırıcı etkiye sahip polimorfizmlerin toplumumuzdaki sıklığının belirlenmesi önemlidir.

Çalışmamızda, Türk toplumunda sEH enzimini kodlayan *EPHX2* geninde aktivite azaltıcı etkiye sahip G860A polimorfizm sıklığının belirlenmesi amaçlandı. Çalışmamız Türk popülasyonunda yapılan ilk çalışmadır ve sonuçlarının aynı gendeki diğer polimorfizmler ve KVH arasındaki ilişkilerin araştırılacağı çalışmalar için temel oluşturacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Epoksitler

Epoksitler halkalı eterlerin en küçüğü olan üç halkalı eterlerdir. Epoksitler üç atomlu halkalı yapı olduklarından halka yapısı oldukça gergindir. Bu da kolayca halka parçalanma reaksiyonu ile başka ürünlere dönüşmesini sağlar ayrıca nükleofil eklenmesini de kolaylaştırır (Şekil 2.1) [4].



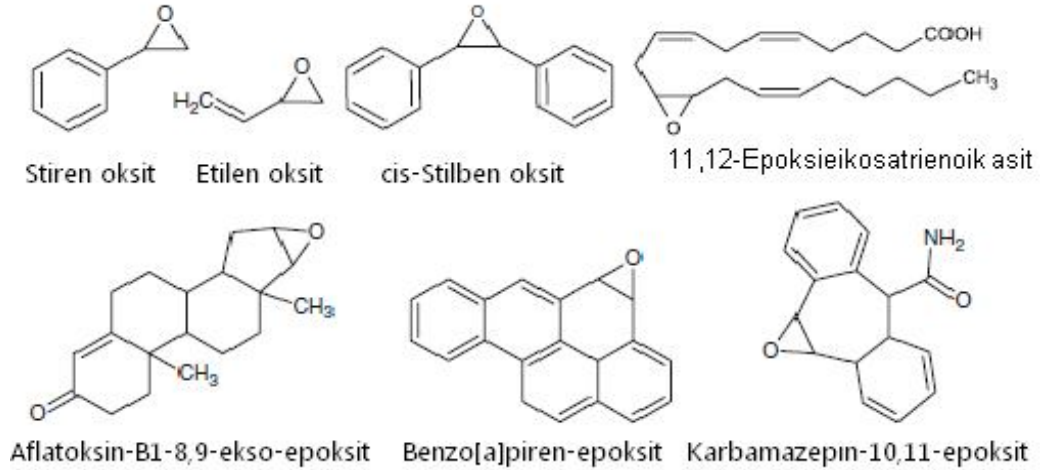
Şekil 2.1. Epoksit molekülünün genel yapısı

Epoksit içeren bileşikler günlük hayatta kullanılan birçok maddenin içeriğinde bulunurlar. Doğal veya yapay kaynaklı olabilen epoksit içeren bileşikler vücuda alındığında bir takım biyokimyasal tepkimelerle suda çözünürlüğü yüksek moleküllere çevrilirler [5,6]. Epoksitler hücre ve dokularda epoksit içeren bileşiklerin biyodönüşümü esnasında veya endojen olarak oksidatif metabolizma sırasında açığa çıkan oksijen atomlarının farklı dizilimleri ile oluşurlar. Epoksitler endojen veya eksojen kaynaklıdır. Kimyasal olarak reaktif ve sulu ortamda stabil olmayan moleküllerdir. Fizyolojik pH'da birçok epoksit yüksek aktivite göstermez ve hücre için akut bir tehlike değildir ancak suyun katalitik olarak eklenmesi ile, epoksitlerin lipofilik ve son derece elektrofilik özellikte olmaları nedeniyle, vücuttan atılmaları önemlidir. Epoksitler reaktivitelerinden dolayı nükleik asitlerin yapısını meydana getiren bazların amino gruplarına ya da azot atomlarına bağlanma eğilimindedirler. Yani epoksitlerin biyodönüşümü hemen gerçekleşmez ise DNA ve proteinlere hücum ederek mutajenik, toksik ve karsinojenik etki oluşturabilirler [1].

## 2. 1. 1. Epoksit metabolizması ve epoksit hidrolazlar

Epoksit metabolizması eksojen ve endojen epoksitlerin metabolizması olarak iki şekilde gerçekleşir.

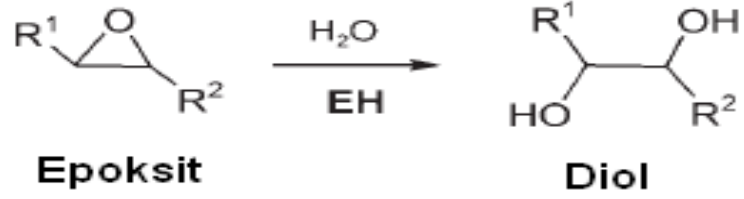
Eksojen epoksit metabolizması; Daha çok mikrozomal epoksit hidrolaz (mEH, E.C.3.3.2.3.) aktivitesi ile gerçekleşir. mEH karaciğerde yoğun olarak bulunmaktadır. Akciğer, böbrek, bağırsak, beyin, kalp gibi farklı organlarda da mevcuttur. mEH enzimi endoplazmik retikulumda lokalizedir. mEH faz I tepkimeleri sonucu oluşan epoksit ara ürünlerinin detoksifikasyonunda ve biyoaktivasyonunda görev alır. mEH'm katıldığı biyoaktivasyon tepkimeleri sonucu oluşan reaktif ürünler faz II konjugasyon tepkimelerinde görev alan enzimler için substrattır. mEH hem faz I hem de faz II tepkimelerinde görev aldığından biyotransformasyon enzimi denir. mEH substratları genellikle zenobiyotik metabolizması sonucu oluşan polisiklik aromatik hidrokarbonlardır (Şekil 2.2.) [2].



Şekil 2.2. Başlıca mEH substratları.

Endojen epoksit metabolizması: sEH (EC 3.3.2.10) aktivitesi ile gerçekleşir. sEH enzimi karaciğerde yoğun miktarda bulunmakla beraber omurgalılarda hemen hemen her organda farklı miktarlarda bulunmaktadır. Enzim, araşidonik asit metabolizması sonucu oluşan endojen epoksitlerin biyokimyasal deaktivasyonundan sorumludur. Araşidonik asit metabolizması sonucu oluşan endojen epoksitler özellikle stirenler ve trans özellikli moleküller sEH enzimi için iyi birer substrattırlar. Epoksitler lipofilik, elektrofilik özellik gösterirler ancak CYP epoksigenaz aktivitesi ile oluşan EET'lerin düzenleyici etkileri vardır. EET'ler sEH aktivitesi ile DHET'lere çevrilerek ortadan kaldırılır [2]. sEH endojen epoksitleri yüksek  $V_{max}$  ve düşük  $K_m$  ile hidroliz eder [7]

Epoksitler, epoksit hidrolaz enzimleri tarafından ilgili diollere dönüştürülürler (Şekil 2.3.). Hidratasyon işlemi sadece eksojen epoksitlerin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması için değil ayrıca düzenleyici etkileri olan lipit kaynaklı endojen epoksitlerin ortamdan uzaklaştırılması ile sonuçlanır [8].



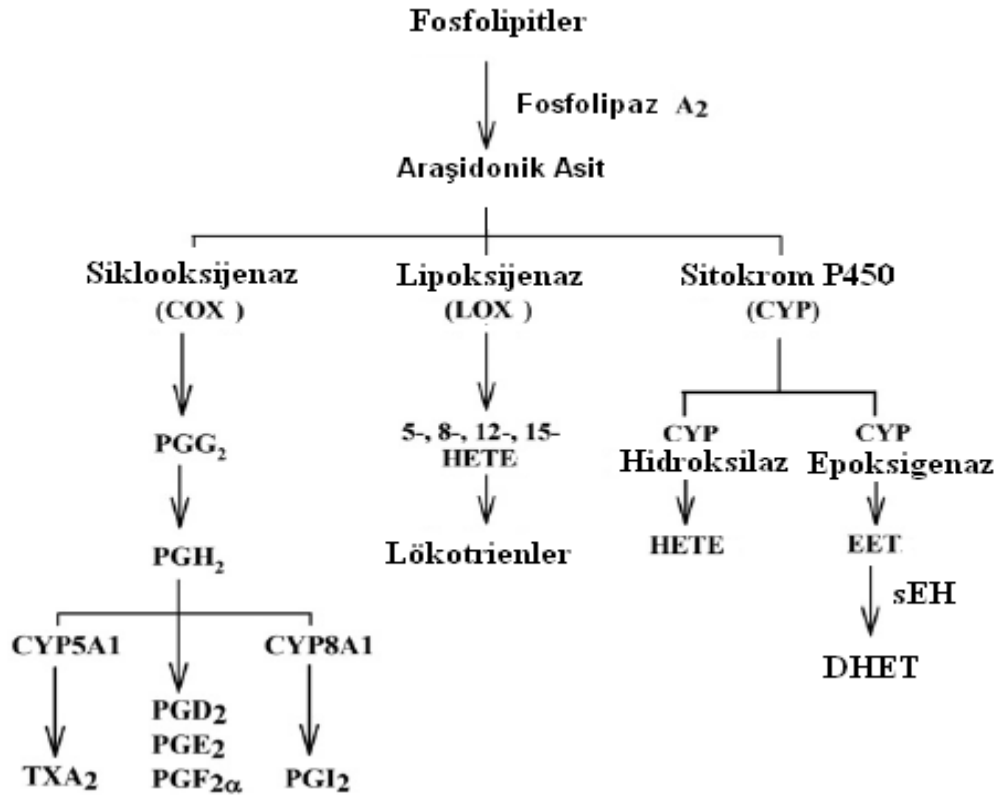
Şekil 2.3. Epoksit hidrolaz, epoksit yapısına su ekleyerek diol oluşumunu sağlayan tepkimeyi katalizler. EH: Epoksit hidrolaz.

Epoksit hidrolazlar elektrofilik özellikleri nedeniyle hücreler için zararlı etkileri olan epoksitleri aktivitesi azaltılmış diollere çevirir ve bu özelliğinden dolayı detoksifikasyon enzimleri içinde tanımlanırlar [2]. Memeli, bitki, böcek, fungus, bakteri gibi çeşitli organizmalarda bulunurlar. Biyolojik rolleri buldukları organizmaya göre farklılık gösterir. Memelilerde mEH, sEH, kolesterol epoksit hidrolaz (ChEH), hepoksilin epoksit hidrolaz ve lökotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) hidrolaz olmak üzere çeşitli epoksit hidrolaz enzimleri bulunmaktadır. Bütün bu enzimlerin üç ana görevi vardır. Bunlar; detoksifikasyon, yıkım ve sinyal moleküllerin düzenlenmesidir. Epoksit hidrolazlar hücresel lokalizasyon ve substrat özgüllüğü ile birbirlerinden ayrılırlar. ChEH'in görevi tam olarak aydınlatılmamış olsa da lipit peroksidasyonunda görev aldığı



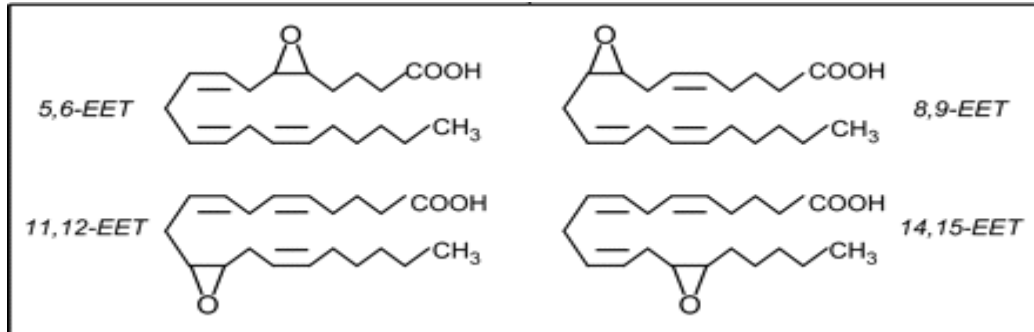
düşünülmektedir. Hepoksilin epoksit hidrolazlar ise hepoksilinleri metabolize ederek onları trioksilinlere çevirir. LTA<sub>4</sub> hidrolaz epoksit hidrolaz ve amino peptitaz aktivitesi gösteren bifonksiyonel bir çinko metalproteazdır [9].

Endojen epoksitler araşidonik asit metabolizması sonucu oluşurlar. Araşidonik asitler siklooksijenaz (COX), lipoksijenaz (LOX) ve sitokrom P450 (CYP450) tarafından metabolize edilirler (Şekil 2.4.) [10].



Şekil 2.4. Araşidonik asit metabolizması. HETE: Hidroksieikosatrienoik asit, EET: Epoksieikosatrienoik asit, sEH: Çözünür epoksit hidrolaz, DHET: dihidroksieikosatrienoik asit. PGG<sub>2</sub>: ProstaglandinG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>: ProstaglandinH<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>: ProstaglandinD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>: ProstaglandinE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>: ProstaglandinF<sub>2α</sub>, TXA<sub>2</sub> : TromboksanA<sub>2</sub> .

Araşidonic asitler siklooksijenaz yolu ile yıkıldığında ağrı, enflamasyon ve ateşe yol açan prostaglandinler oluşur. Araşidonic asitler lipoksijenaz yolu ile metabolize edildiğinde enflamasyon, vazokonstriksiyon ve ayrıca ödem ile ilişkili olduğu bilinen lökotrienler meydana gelir. CYP450 enzim sistemi ile metabolize edilen araşidonic asitlerden meydana gelen EET'lerin ise ağrı, kan basıncı ve enflamasyonu azaltıcı etkileri vardır [8]. EET'lerin sahip olduğu bu etkiler, sEH aktivitesi ile DHET'lere çevrilerek ortadan kaldırılır. Araşidonic asit metabolizmasında CYP450 enzim sisteminin rolü 1980'de tanımlanmıştır. Hidroksilaz ve epoksijenaz olmak üzere iki enzimatik yoldan meydana gelmektedir. Hidroksilaz enzimleri araşidonic asitlerden oluşan hidroksieikosatrienoik asit (HETE)'leri (16-,17-,18-,19- ve 20-HETE)'lere çevirir. 20-HETE'ler damarlarda ve böbrekte bulunan ana metabolitlerdendir ve damar tonusunun düzenlenmesinde etkili olduğu bildirilmektedir [11]. 20-HETE'lerin böbrek ve beyin mikrosirkülasyonunda damar daraltıcı etki oluşturduğu ve miyojenik tonusun ayarlanmasında görev aldığı açıklanmıştır [12]. Epoksijenaz yolağı sonucu CYP450 enzim aktivitesi ile EET'nin dört yapısal izomeri (5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET; 14,15-EET) oluşur (Şekil 2.5). EET'ler iskemik hasar oluşumunu engelleyen ve anti-inflamatuvar özellikleri olan endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörlerinin (EDHF) regülasyonunu düzenler [11]. sEH enzim aktivitesi araşidonic asitlerden CYP450 aktivitesi sonucu oluşan EET'leri ilgili DHET'lere dönüştürmesi nedeni ile canlı için oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu dönüşüm endojen epoksitlerin deaktivasyonunu sağlar. DHET'ler bu metabolizmanın ürünüdür ve bilinen biyolojik aktiviteleri yoktur [8,13].

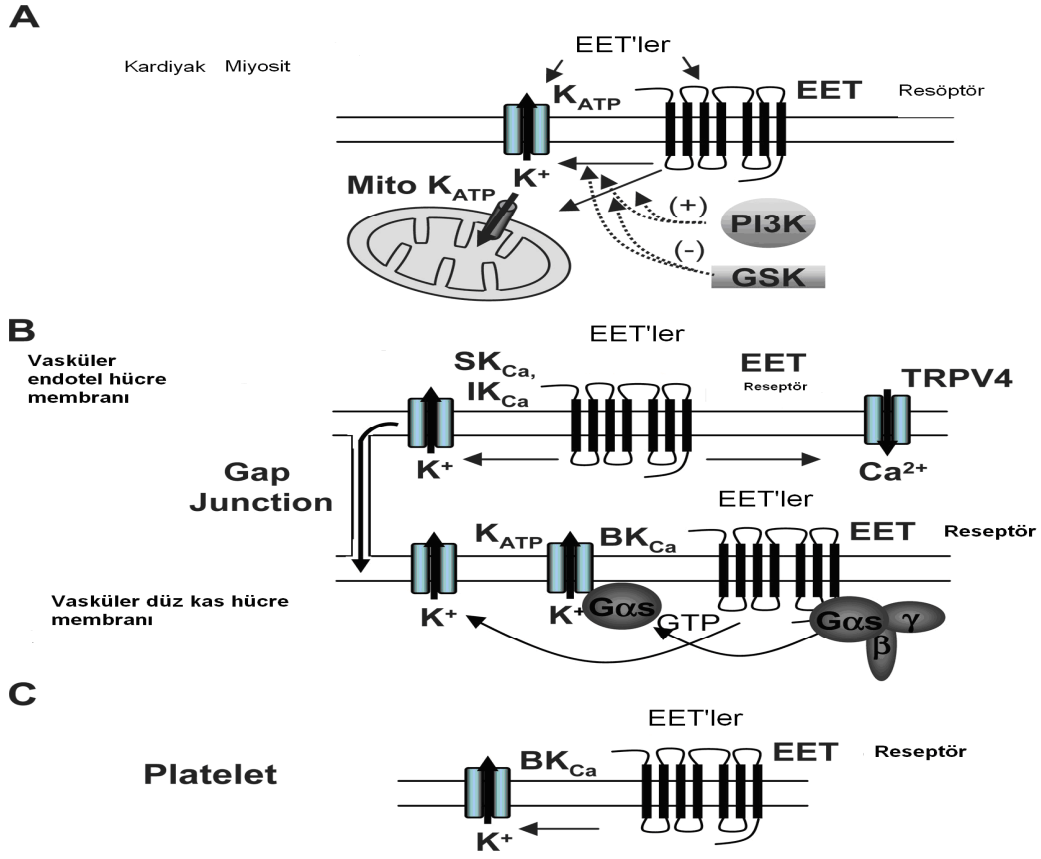


Şekil 2.5. EET'lerin yapısal izomerleri.

### 2.1.2. EET'lerin biyolojik etkileri ve etki mekanizması

EET'lerin biyolojik etkilerinin ilk tanımlanmasından sonra EET'lere olan ilgi 1996 yılında EET'lerin EDHF ile ilişkilerinin ortaya çıkması ile artarak devam etmektedir. EET'lerin anjiogenez, apoptoz, fibrinoliz, mitogenez, hormon salgılanması, bronkodilatasyon etkileri de dahil olmak üzere bir dizi fizyolojik fonksiyonlarının olduğu bildirilmektedir [8]. EET'lerin vazodilatatör, anti-inflamatuar, anti-platelet, anti-hipertansif, anti-apoptotik, anti-trombotik ve natriüretik etkileri de vardır. EET'ler hem otokrin hem de parakrin etki gösterirler. Başta karaciğer, böbrek ve kalp olmak üzere çeşitli organlarda bulunurlar. Tüm EET'lerin hücre fosfolipitleri ile ilişkisi koenzim A aracılığı ile gerçekleşmektedir. EET'lerin sentezlenmesi için CYP450 epoksigenaz içeren bir hücre aktivasyonuna ihtiyaç duyulduğu tahmin edilmektedir [14]. Fosfolipitlerden araşidonik asitlerin serbestleşmesi sağlanır ve CYP450 epoksigenaz aktivitesi ile EET sentezlenir. İkinci bir olası mekanizma ise EET'lerin zaten fosfolipitlerin yapısında olduğu ve hücreler aktive olduğunda fosfolipaz aracılığı ile serbest kaldıkları yönündedir [15]. EET'ler oluştuktan sonra otokrin ve parakrin etkilerinin iki mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir. İlki EET'lerin iyon kanalları veya DNA ifadesini etkileyen bir hücre içi kaskadını etkinleştiren membran reseptörüne bağlanarak gerçekleştirdiğidir [16]. EET'lerin her ne kadar reseptörleri tanımlanmış olmasa da G-proteini aracılığı sinyale iletim yollarını aktive edebileceği bildirilmiştir [17]. Bazı çalışmalar EET'lerin etkilerini tirozin kinaz ve mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolağı ile oluşturduğunu belirtmektedir [18]. İkincisi ise EET'lerin doğrudan sinyale iletimi yolları, transkripsiyon faktörleri veya iyon kanalları ile etkileşim içinde olduğu yönündedir [8]. Bazı çalışmalar EET'lerin hücre içi etki mekanizmasında hücre zarı yapısında bulunan peroksizom proliferatör aktive reseptör (PPAR)'lerin etkili olabileceğini belirtmiştir. Epoksigenaz yolunun PPAR'ler için güçlü ligandlar üretebileceği ifade edilmiştir [19]. Henüz EET'ler için bir reseptör tanımlanmamıştır. Reseptörlerin tanımlanması hücre içi etki mekanizmalarının açıklanmasına katkıda bulunacaktır [13].

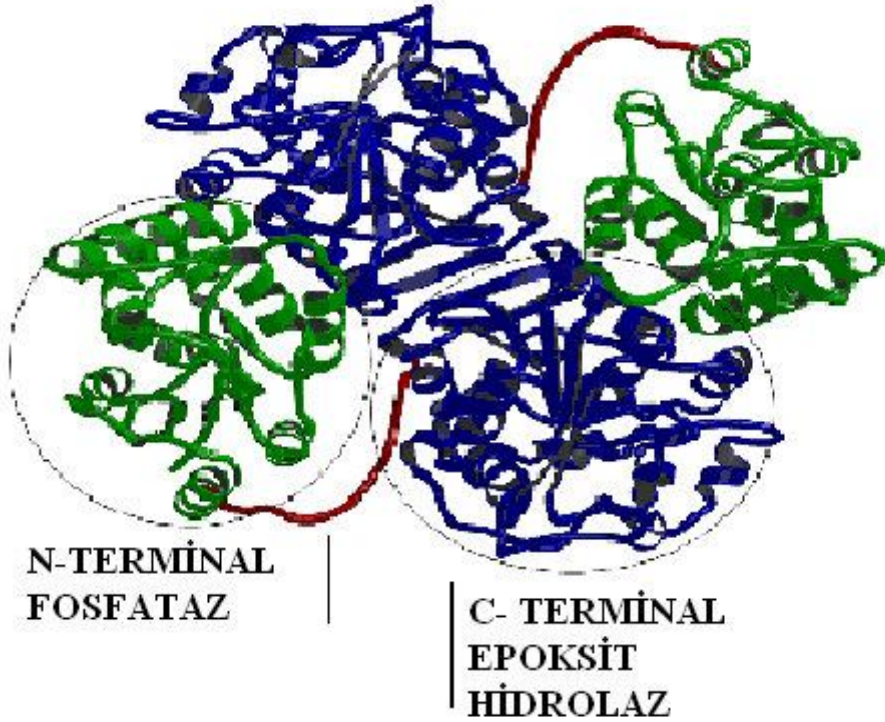
EET'lerin vazodilatasyon etkisinin kalp, beyin, böbrek, iskelet kası ve bağırsak gibi organlarda gözlemlendiği bildirilmektedir. EET'lerin tüm yapısal izomerlerinin vazodilatasyon etkisi vardır ancak 11,12-EET ve 14,15-EET'ler bu etkiyi daha fazla gösterirler [16]. Endotel kaynaklı bu iki yapısal izomer düz kas hücrelerindeki kalsiyum ile aktive  $K^+$  ( $K_{Ca}$ ) iyon kanallarını aktive eden  $K^+$  iyonlarının vasküler düz kas hücrelerinden salınımını gerçekleştirir. Böylece membran hiperpolarizasyonunu sağlayarak kan damarlarını genişletmiş olur (Şekil 2.6.) [17]. 11,12-EET' nin ADP-riboz üretimini ve  $GS\alpha$ 'nın ADP ribozilasyonunu stimüle ettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur [20,21]. EET'lerin  $K_{Ca}$  iyon kanallarını aktive ederek kan damarlarını genişletme etkisi sEH enzimi inhibisyonu ile EET'lerin DHET'lere dönüşümü engellenerek artırılabilir [22]. Enflamasyon ve inflamatuvar hastalıklar organ hasarı ve KVH'ların oluşmasına sebep olurlar. Bu bağlamda inflamasyon ve epoksijenaz yolağı arasındaki etkileşimlerin KVH'lar üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir [23]. EET'lerin inflamasyonu azalttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır ancak anti-inflamatuvar etkilerinin hücre içi sinyal mekanizmasının tam olarak belirlenmesi için daha fazla çalışmaya gerek vardır [24]. EET'lerin vasküler tonusun düzenlenmesinde etkili olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Yapılan bir çalışmada EET'lerin büyük baş hayvanların küçük arterlerinde parakrin etki göstererek kan akış hızını ayarladığı bildirilmiştir [25]. Arteryel kan basıncı kanın damar duvarına yaptığı basınç olup normalin üstünde olması HT'ye neden olur [26]. EET'lerin farmakolojik olarak kontrol edilmesi HT'un da kontrol edilmesi anlamına gelebilir. EET'lerin regülasyonu HT'na karşı canlıya koruyucu etki sağlayabilir. Bu durum önemlidir çünkü HT renal hastalıklar ve KVH için bağımsız bir risk faktörüdür [3, 27]. HT endotel fonksiyonlarında ve endotelin damar koruyucu, antikoagülan özelliklerinde bozulmaya sebep olur aynı zamanda lipoproteinlere karşı endotel permeabilitesini de artırır. Oluşan bu değişikliklere hiperlipidemi eşlik ettiğinde aterosklerotik plak gelişimi ve ateroskleroz lezyonları meydana gelebilir. Ateroskleroz lezyonlarının oluşumu damarların en iç tabakasında yani intimada lipoprotein içeriğinin artması ile başlamaktadır. Aterosklerotik lezyonun oluşumu yangıya sebep olan köpük hücre oluşumuyla devam eder [28].



Şekil 2.6. EET'nin kardiyovasküler iyon kanalı ile ilişkisinin şematik gösterimi. (A) Kardiyak miyositte, EET'ler sarkolemmal ya da mitokondriyal  $K_{ATP}$  kanallarını aktive eder. (B) Vaskülerde, EET'ler endotelial küçük- ( $SK_{Ca}$ )'yı ya da orta ürün ( $IK_{Ca}$ )–geçişli ile kalsiyum-aktiviteli kanalları hiperpolarizasyon oluşturmak üzere aktive eder. Vasküler düz kas ile miyoendotel arasındaki geçişler gap junction ile gerçekleşir. EET'ler ayrıca TRPV4 (vanilloid transient receptor potential channel) kanallarını aktive ederek içeriye  $Ca^{2+}$  girişini sağlar. Vasküler düz kasda EET'ler kalsiyum – aktive ( $BK_{Ca}$ ) kanallarını G-proteini aracılı olarak aktive eder. (C) Plateletlerde, EET'ler  $BK_{Ca}$  kanallarını aktive eder.

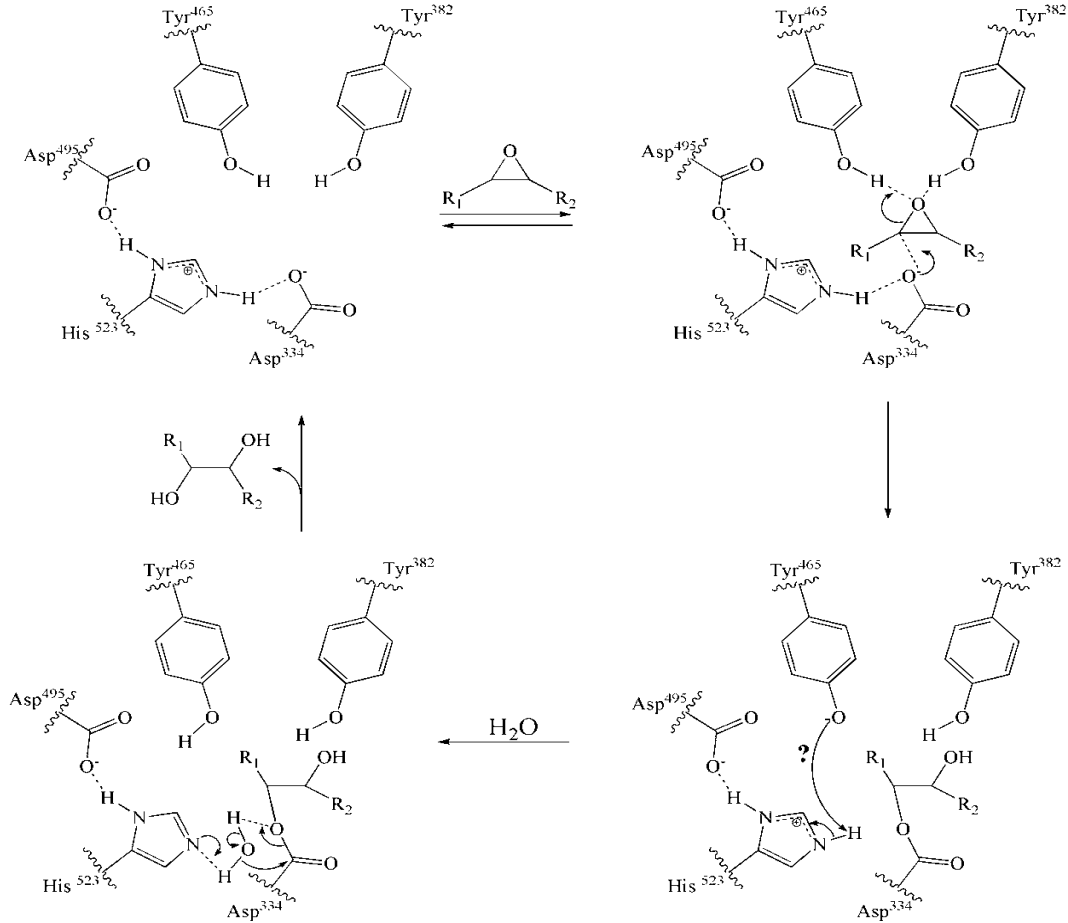
## 2.2. Çözünür Epoksit Hidrolaz enziminin özellikleri ve biyolojik rolü

sEH ilk olarak 1972 yılında tanımlanmıştır. sEH enzimi karaciğerde yoğun olmakla beraber omurgalılarda hemen hemen her organda farklı miktarlarda bulunmaktadır. Enzim, epoksitlerin biyokimyasal deaktivasyonundan sorumludur. Memelilerde homodimer yapıda olan sEH enzimi 60-kDa'luk iki monomerden oluşmaktadır. Monomerler birbirlerine proline zengin peptit bağı ile bağlıdır (Şekil 2.7., kırmızı renkte). Her monomer bir N-terminal (Şekil 2.7., yeşil renkte) ve C-terminal (Şekil 2.7., mavi renkte) içermektedir. N-terminal lipit fosfataz aktivitesi göstermektedir ancak biyolojik rolü henüz tam olarak bilinmemektedir. Yağ asidi, alkol, dioller ve terpenlerin bir kısmı bu N-terminal bölge için substrattırlar. C-terminal domain ise klasik bir  $\alpha/\beta$  hidrolaz kıvrımından oluşur ve epoksit hidrolaz aktivitesine sahiptir [29].



Şekil 2. 7. Çözünür epoksit hidrolaz enziminin üç boyutlu yapısı [30].

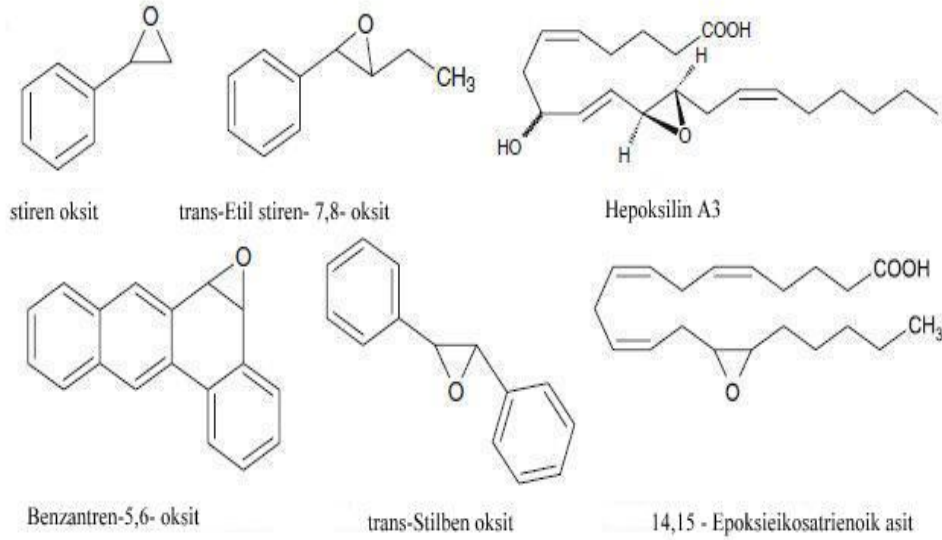
sEH enziminin ana fonksiyonu endojen epoksit olan EET'leri biyolojik önemi olmayan DHET'lere dönüştürmektir. EET'lerin DHET'lere çevrilmesi iki basamakta gerçekleşir. sEH enziminin aktif bölgesi nükleofilik His<sup>523</sup>-Asp<sup>334</sup>-Asp<sup>495</sup> üçlü yapısı ile oluşur. Bu nedenle kovalent bir ara ürün oluşumunu içeren iki aşamalı bir mekanizmaya sahiptir. İlk aşamada epoksit enzimin aktif bölgesine hızla bağlanır. Böylece iki trozin kalıntısı moleküle hidrojen bağı ile bağlanarak polarize olur. Aynı anda nükleofilik aspartat kalıntısı da epoksit ile bağ yapar. Oluşan etkileşimde His<sup>523</sup> iki aspartat kalıntısı arasında köprü durumuna gelir. Daha sonra sEH enzimi aspartat kalıntısı arasındaki ester bağı kırarak diol oluşumunu sağlayacak bir alkol oluşturur. Histidin yer değiştirerek su molekülünün etkileşime girmesini sağlar ve ürün olarak enzimin kendisi ve diol meydana gelir (Şekil 2.8.) [31].



Şekil 2.8. Epoksit molekülünün sEH enziminin katalizlediği tepkime ile diole çevrilmesi.

### 2.2.1. Çözünür Epoksit Hidrolaz enziminin substratları

Araşidonik asit metabolizması sonucu oluşan endojen epoksitler özellikle de stirenler ve trans özellikli moleküller sEH'lar için iyi birer substrattırlar (Şekil 2.9) [5]. sEH substratları kimyasal olarak reaktif moleküllerdir ve reaktif özelliklerinden dolayı nükleik asitlerin yapısını meydana getiren bazların amino gruplarına ya da azot atomlarına bağlanma eğilimindedirler [4]. sEH, substratlarının yapısına su molekülü ekleyerek suda çözünürlüklerini artırır ve vücuttan atılımını kolaylaştırır. sEH, substratlarını yüksek  $V_{max}$  ve düşük  $K_m$  ile hidroliz eder ve onları diollere çevirir [4].



Şekil 2.9. Başlıca sEH substratları.

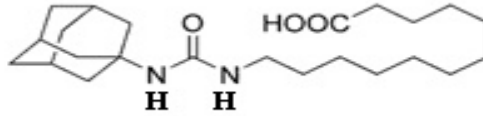


### 2.2.2. Çözünür Epoksit Hidrolaz enziminin inhibitörleri

Son yıllarda sEH enziminin farmakolojik olarak inhibisyonu ile hipertansiyon tedavisine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. sEH enziminin inhibitörleri kardiyovasküler hastalık oluşturulan hayvanlarda denenmiş ve pozitif sonuçlar elde edilmiştir. sEH enzimi için ilk bulunan inhibitörler epoksit içeren bileşiklerdir. Bu bileşiklerin birçoğu enzim için alternatif substratlardır. İlk bulunan bu inhibitörlerin *in vitro* ortamda düşük turnover'li kısa süreli inhibisyon oluşturdukları saptanmıştır. Fakat *in vivo* ortamda enzimi inhibe etmekte yetersiz kaldıkları belirlenmiştir. Daha sonra üre, amid ve karbamatların enzimi *in vivo* ortamda da belirgin bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Kristal yapı çalışmaları üre içeren inhibitörlerde ürenin fonksiyonunu sEH enziminin aktif bölge kalıntıları ile moleküller arasında hidrojen bağları ve tuz köprüleri oluşturmak olduğunu belirtmektedir [32].

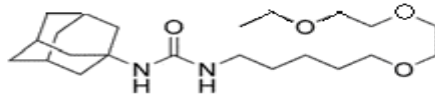
sEH inhibitörlerinin *in vivo* kullanımını kolaylaştırmak amacıyla 1,3-disubstitütf üre türevlerinin yapısal modifikasyonlarını içeren çalışmalar son yıllarda yoğunluk kazanmıştır. 12-(3-adamantan-1-il üreido)-dodekanoik asit (AUDA; Şekil 2.10, A) gibi ilk dizayn edilen bileşikler, bunların esterleri ve tuzları sEH enzimini inhibe etmek amacıyla kullanılmıştır [33,34]. Fakat bu moleküllerin zayıf metabolik stabilitesi, oldukça yüksek erime noktası ve sudaki çözünürlüklerinin sınırlı olması farmakolojik olarak kullanılmalarını zorlaştırmıştır. Daha sonraki çalışmalar suda çözünürlüğü fazla olan ve erime noktası daha düşük olan 1-adamantil-3(5-(2-(2-etoksietoksi)etoksi)pentil)üre'ler (AEPÜ; Şekil 2.10,B) üzerine yoğunlaşmıştır [35,36]. Hücre membranından serbestçe geçebilen bu moleküllerin *in vivo* ortamda da enzimi inhibe etmede etkili oldukları belirlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda (trans-4-(4-(3-adamantan-1-il-üreido)-sikloheksiloksil)-benzoik asit (t-AUCB, Şekil 2.10,C) bileşiğinin oral kullanıma uygunluk, suda çözünürlük ve metabolik direnç yönünden diğer öncül inhibitörlere nazaran daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle t-AUCB inhibitörünün sEH enzimini inhibe etmede diğer inhibitörlere göre en uygun farmakolojik inhibitör olduğu düşünülmektedir [36–38].

AUDA



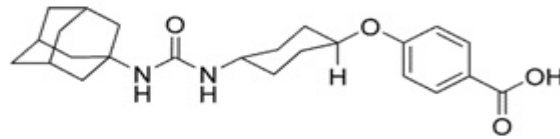
A) 12-(3-adamantan-1-il-üreido)-dodekanoik asit.

AEPU



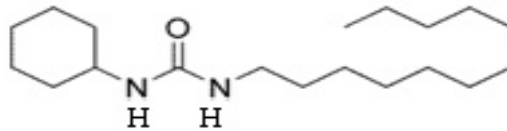
B) 1-adamantil-3(5-(2-(2-etoksietoksi)etoksi)pentil)üre.

t-AUCB



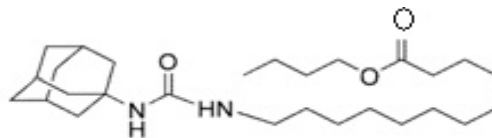
C) (trans-4-(4-(3-adamantan-1-il-üreido)-sikloheksiloksil)-benzoik asit.

CDU



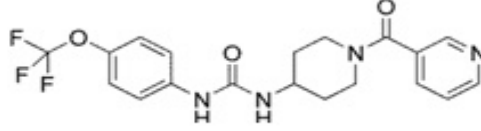
D) 1-sikloheksil-3-dodesil üre.

AUDA-BE



E) 12-(3-adamantan-1-il-üreido)-dodekanoik asit bütilester.

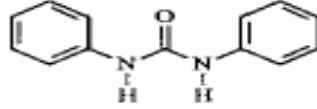
AR9276



F) 1-(1-nikotinilpiperdin-4-il)-3-(4(trifotometoksi)fenil)üre.



G) Disikloheksilkarbodiamid



H) Fenilalkanoksit

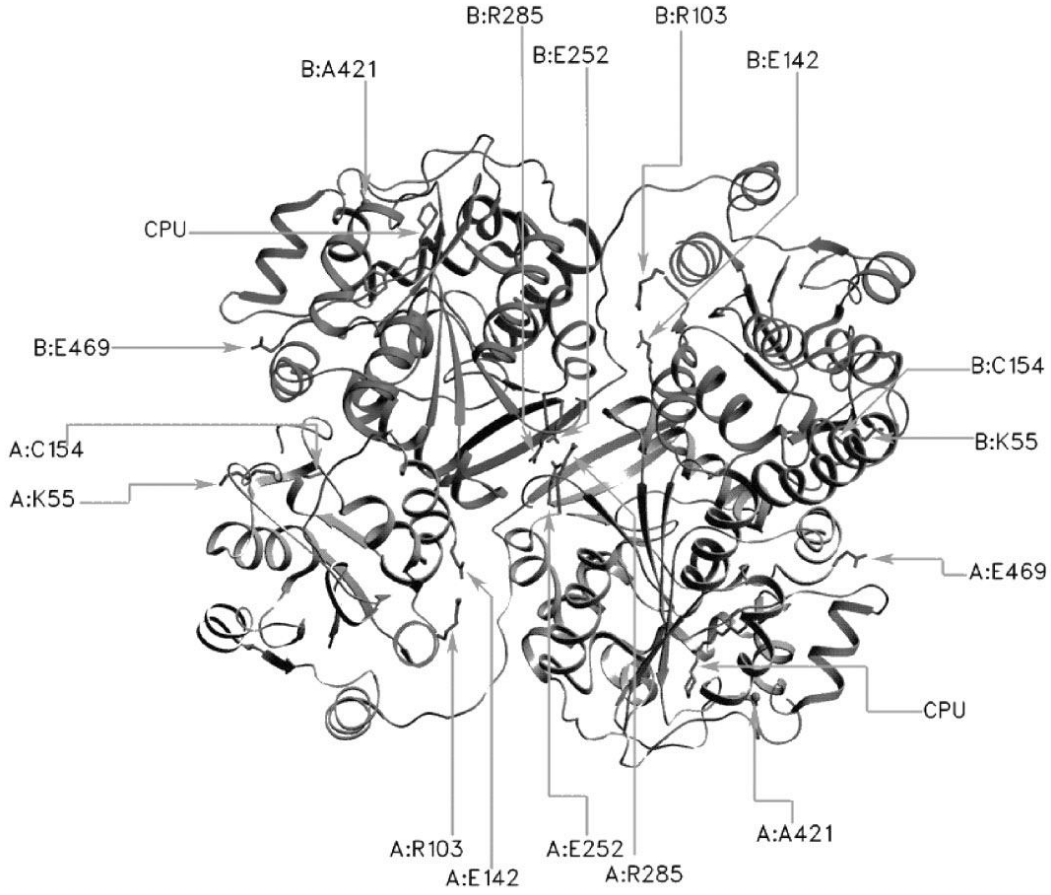
Şekil 2.10. Başlıca sEH inhibitörleri [32–38].

EET'lerin biyolojik etkileri sEH enzimi aracılığı ile ortadan kaldırılarak, biyolojik etkisi olmadığı bilinen DHET'lere dönüştürülmektedir [6]. Bu nedenle sEH aktivitesindeki azalmanın organizmaya HT ve KVH karşı koruyucu özellik sağlayabileceği düşünülmektedir [15]. sEH enziminin farmakolojik olarak inhibisyonu ile EET'lerin metabolizmasının yavaşlatılması ve bu moleküllerin ortamda daha uzun süre kalmalarının sağlanması amaçlanmaktadır.

### 2.2.2. Çözünür Epoksit Hidrolaz enziminin polimorfizmleri

sEH enzimini kodlayan gen (*EPHX2*) kromozomun 8p21-p12 bölgesinde lokalizedir. 54 kilo baz büyüklüğünde olup, 18 intron ve 555 amino asidi kodlayan 19 ekson içerir [28]. *EPHX2* geni 44 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) içermektedir. Bunların 31 tanesi intronlarda 13 tanesi eksonlarda meydana gelmiştir. Eksonik bölgede meydana gelen 13 SNP'nin altı tanesi (Lys55Arg, Cys154Tyr, Arg287Gln, Glu470Gly,

Arg103Cys ve Val422Ala) amino asit değişimine neden olurken diğer yedi tanesi sessiz SNP' dir (Şekil 2.11.) Lys55Arg, Cys154Tyr ve Glu470Gly polimorfizmleri sEH aktivitesini artırıcı, Arg287Gln ve Arg103Cys polimorfizmleri aktiviteyi azaltıcı etki oluşturmaktadır [39].



Şekil 2.11. Fare sEH enziminin kristal yapısı üzerinde insan sEH enzimidaki polimorfik bölgelerin gösterimi. Proteinin alt birimleri A, ve B ile gösterilmektedir. N-sikloheksilmetil-N (3-fenil) propil üre inhibitörünün bağlandığı aktif bölge (CPU). İnsan sEH enziminde meydana gelen altı polimorfik kalıntının yerleri A ve B alt ünitelerinde K55, R103, C154, R285 (insan R287), A421 (insan R422), ve E469 (insan E470) olarak gösterilmektedir. E142 ve E252 polimorfik kalıntılarının tuz köprülerinin oluşumunda etkili olduğu tahmin edilmektedir. Bu figürasyonu oluşturabilmek için fare karaciğerinde sEH enzimi CPU ile inhibe edilmiştir [39].

*EPHX2* geninde 55. pozisyonundaki lizinin arjinin ile yer değiştirdiği Lys55Arg (K55R) polimorfizminin enzim aktivitesini artırdığı bildirilmiştir [39]. Yapılan bir çalışmada *EPHX2* genin ekson 2'deki K55R varyantının koroner kalp hastaları arasında kontrole göre anlamlı olarak daha yaygın olduğu gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada koroner arter hastalığı riski ile K55R varyant alleli arasındaki ilişkinin sigara içenler arasında yüksek olduğu tespit edilmiştir [40]. Bu bulguların tersine, beyazlarda yapılan bir çalışmada K55R polimorfizmi ile koroner arter hastalığı ve hipertansiyon riski arasında anlamlı bir ilişki belirlenememiştir [41].

sEH enzim aktivitesini azaltan Arg287Gln polimorfizminin farklı popülasyonlardaki sıklığının HT ve KVH'larla ilişkisini ortaya koyan çalışmalar vardır. Örneğin, Arg287Gln polimorfizmine sahip Afrika kökenli Amerikalılarda kroner arter kalsifikasyonu oluşma riskinin yüksek olduğu belirtilmiştir [42]. Yapılan bir başka araştırmada Çinli bireylerde Arg287Gln polimorfizminin sEH enziminin aktivitesini azaltarak hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir [43]. Gschwendtner'e göre Arg287Gln polimorfizmine sahip Beyaz Avrupalılarda kalp krizi riski daha yüksek yüksektir [44]. Burdon ve ark.'larının yaptığı çalışmada Arg287Gln polimorfizminin Afrikalı Amerikalılarda kroner arter plağı oluşumunda risk artırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir [45]. Wei 2007 yılında yayımlanan makalesinde Arg287Gln polimorfizminin sigara içenlerde kroner arter kalsifikasyon riskini artırdığını göstermiştir [46]. Afrikalı Amerikalılar zerinde Dreisbach ve ark.'larının yaptığı çalışma ise Arg287Gln polimorfizminin hipertansiyon ile bir ilişkisinin olmadığını belirtmiştir [47]. Tablo 2.1.'den de görüldüğü üzere sEH enzimini kodlayan *EPHX2* geninde meydana gelen Arg287Glu polimorfizminin KVH'lar üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar çelişkili sonuçlar ortaya koymaktadır. Arg287Glu polimorfizmi bazı popülasyonlarda koruyucu etki gösterirken bazılarında ise risk artırıcı etki göstermiştir. Bu sonuçlar *EPHX2* genindeki Arg287Gln polimorfizm ile kardiyovasküler hastalık risk ilişkisinin, analiz edilen popülasyonun etnik kökenine sıkı bir şekilde bağlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır [46]. Ailesel hiperkolesterolemili hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, Arg287Glu polimorfizmi gözlenen bireylerin yabani genotipe sahip bireylere göre daha yüksek plazma kolesterol ve trigliserid düzeylerine sahip olduğu saptanmıştır [48]. Ayrıca Lou diyabetik ratlarda yaptığı çalışmada sEH enzimi inhibisyonunun hiperglisemiye önlediğini bildirmiştir [49].

**Tablo 2.1: Farklı popülasyonlarda sEH enzimi Arg287Glu polimorfizmi ile KVH'lar arasındaki ilişki [8].**

Polimorfizm	Hastalık	Etnik köken	Bağlantı	Kaynak
	KVH	Kafkasyalılar	İlişkili değil	[40]
	Kroner arter kalsifikasyonu	Afrikalı Amerikalılar ve Latin Amerikalı olmayan Beyaz Amerikalılar	Risk artırıcı	[42]
Arg287Glu	Kalp Krizi	Çinliler	Sigara içmeyenlerde risk azaltıcı	[43]
	Kalp Krizi	Beyaz Avrupalılar	Risk arttırıcı	[44]
	Kroner arter plağı	Afrikalı Amerikalılar	Risk artırıcı	[45]
	Kroner arter kalsifikasyonu	Sigara içenlerde	Risk artırıcı	[46]
	Hipertansiyon	Afrikalı Amerikalılar	İlişkili değil	[47]

### 3.GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan cihazlar ve malzemeler

- Steril pipetler (5 ml, 10 ml)
- Steril polipropilen test tüpleri (15 ml, 50 ml)
- Steril mikrosantrifüj tüpleri (1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml)
- Steril Na-sitratlı tüpler (5 ml, BD, vacutainer)
- Steril jelli biyokimya tüpü (10 ml, Hema & tube)
- Steril enjektör (10 ml, Hayat)
- Çeşitli ebatlarda erlen, beher, cam pipet ve mezürler (Teknik cam)
- Mikro santrifüj (Eppendorf 5415C)
- Sabit başlıklı masa üstü santrifüj (Hettich EBA 3S)
- Otomatik pipetler (P10, P20, P200, P1000, Gilson)
- Otomatik pipet uçları (Sarı, mavi, beyaz, Rainin)
- pH metre (Jenco 672 Digital)
- Vorteks (Nuvemix NVM)
- Su banyosu (Memmert WB-10)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve MK 218)
- Hassas terazi (Sartorius BL120S)
- Isıtma bloğu (Stuart Scientific)
- Mikrodalga fırın (Arçelik MD500)
- Derin dondurucu (Ariston)
- Otoklav (Sanyo MLS)
- Otoklav bandı
- Spektrofotometre (Spectro UV-VIS Double Beam PC Scanning)
- Termal cycler (Techne)
- Jel görüntüleme cihazı ve yazıcısı (Vilber Lourmat Photodocumentation and Video Graphic -Printer UP-895CE)
- Printer kağıdı (Sony Type V (High Glossy) UPP-110 HG Glossy Printing Paper 110 mm x 18m)
- UV transilluminatör (UVP TM-40)

### 3.2. Kimyasal maddeler

- Primerler (Alpha DNA)
- Restriksiyon endonükleaz *Hpa* II (*Msp* I) (Fermentas, 10 U / $\mu$ l)
- *Taq* DNA polimeraz ( Vivantis, 5 U/ $\mu$ l)
- dNTP karşımı (Vivantis, 2 mM)
- Agaroz (Vivantis)
- Low melting agaroz (Vivantis)
- MgCl<sub>2</sub> solüsyonu (Fermentas, 25 mM)
- Proteinaz K (Fermentas, 15 mg/ml)
- DNA Marker PUC 19 /*Msp* I (Vivantis,0,2 mg/ml )
- Tris –base (Vivantis )
- Asetik asit (Riedel-de Haen)
- Sukroz (Merck)
- Triton x 100 (Sigma)
- Magnezyum Klorür, 6 sulu (Carlo Erba)
- Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA, Multicell)
- Sodyum Klorür (Merck)
- %96'lık saf etil alkol (Carlo Erba)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS, Merck)
- Etidyum bromid, 1mg/ml (Applichem)



### **3.3. Genel çözeltiler ve tamponlar**

#### **Lizis Tamponu (pH 7,5) (Otoklavlanır)**

- 10 mM Tris-base
- 320 mM süktroz
- %1 Triton x100
- 4 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O

#### **TE Tamponu (pH 7,5) (Otoklavlanır)**

- 10 mM Tris-base
- 1 mM EDTA

#### **TEN Tamponu (pH 8,0) (Otoklavlanır)**

- 10 mM Tris
- 2 mM EDTA
- 400 mM NaCl

#### **TAE x 5 Tamponu (pH 8,0)**

- 40 mM Tris-base
- Asetik asit (5,71ml)
- 1 mM EDTA

#### **Doymuş NaCl çözeltisi**

#### **%10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)**

#### **Jel yükleme tamponu (Loading dye 6X, Vivantis)**

#### **%70'lik etil alkol**

### 3.4. Çalışma grubu

Çalışmamızda, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne başvuran 300 birey çalışma grubunu oluşturdu. Çalışmaya dahil edilen bireylerin Ek 1, 'de verilen soru formunu doldurmaları talep edildi.

### 3.5. Kan örneklerinin toplanması

Çalışmaya katılan bireylerden 5 ml venöz kan örneği DNA izolasyonu için Na-sitratlı tüplere ve 5 ml venöz kan örneği de serum elde etmek üzere jelli biyokimya tüpüne alındı. Elde edilen DNA ve serumlar – 20 °C'de korundu.

### 3.6. Genomik DNA izolasyonu

Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışma grubuna ait kan örneklerinden Salting-out (yüksek tuz konsantrasyonu ile çöktürme) yöntemiyle genomik DNA izole edildi [50]. İzolasyon şu şekilde yapıldı:

- 1 ml sitratlı kan 15 ml'lik propilen tüpe alındı.
- Kan örneğinin üzerine üç kat hacimde (3 ml) lizis tamponu konuldu ve yavaşça karıştırıldı.
- Sabit başlıklı masa üstü santrifüjünde 2200 rpm de 15 dakika santrifüj edildi (Hettich Eba 3 S). Dökelti atıldı.
- Lizis tamponu ile yıkama işlemi iki kez tekrarlandı.
- Dökelti atıldı. Çökelti üzerine 600 µl TEN tamponu konuldu ve kısa bir süre vortekslendi. Sonra 40 µl %10'luk SDS ve 7 µl (15mg/ml) proteinaz K ilave edildi ve elle vurularak karıştırıldı.
- Karışım 1.5 ml'lik ependorf tüpüne alındı ve 3.5 saat 55 °C'de ısıtma bloğunda inkübe edildi.
- Daha sonra örneklerin üzerine 200 µl doymuş tuz çözeltisi ilave edildi ve karıştırıldı.
- 2600 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı (Eppendorf Centrifuge 5415 C).

- Dökelti yeni bir 1.5 ml'lik ependorf tüpüne alındı ve 3300 rpm'de 30 dk santrifüj edildi.
- Dökelti 15 ml'lik propilen tüpe alındı, üzerine iki kat hacimde etil alkol ilave edilerek DNA çöktürüldü.
- Çöktürülen DNA pipet ucu ile 200 µl %70'lik alkol içine alındı.
- 10 dk santrifüj edildikten sonra alkol pipetle çekilerek uzaklaştırıldı. Kalan alkolün uzaklaşması için tüp ağzı açık olarak oda sıcaklığında bir süre bekletildi.
- DNA örneği üzerine 40 µl TE tamponu eklendi ve tüpün ağzı kapatıldı. DNA örneği TE tamponunda çözünmesi için bir gece oda sıcaklığında bırakıldı.
- DNA örnekleri -20 °C'de korundu.

### 3.6.1. DNA kalitesi ve miktarının belirlenmesi

İzole edilen DNA örneklerinin PZR reaksiyonunda kullanılabilir kalitede olup olmadığı (degradasyon vb), %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak görüntülenmesi ile kontrol edildi. İzole edilen DNA örnekleri 1/50 oranında sulandırılarak 260 nm'de ve 280 nm'deki absorbanlarından yararlanarak DNA kalitesi belirlendi.  $A_{260}/A_{280}$  oranı 1.5 in altındaki DNA örnekleri için yeniden DNA izolasyonu yoluna gidildi.

$A_{260}$  da ölçülen 1 değeri 50 µg/ml çift zincirli DNA ya karşılık geldiğinden, DNA derişimi aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{sulandırma faktörü}$$

### 3.7. Genotipleme

sEH enzimini kodlayan gende (*EPHX2*) polimorfizm olup olmadığı, Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi kullanılarak belirlendi.

#### 3.7.1. *EPHX2* G860A polimorfizminin belirlenmesi

**Tablo 3.1: PZR reaksiyon bileşenleri**

<b>Bileşen</b>	<b>Stok konsantrasyonu</b>	<b>Eklenen Hacim</b>
Steril Apirojenik H <sub>2</sub> O	-	34 µl
Amplifikasyon Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10 X	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM	4 µl
dNTP	10 mM	1 µl
Forward primer	6,8 pmol	2 µl
Revers primer	6,9 pmol	2 µl
DNA	-	1 µl
Taq DNA Polimeraz	2.5 U/µL	1 µl
<b>TOPLAM:</b>		<b>50 µl</b>

**Tablo 3.2: 197 bç DNA'yı amplifiye eden PZR programı**

<b>Başlangıç Denatürasyonu</b>	95 °C	5 dakika	
<b>Denatürasyon</b>	94 °C	30 saniye	} <b>35 Döngü</b>
<b>Annealing</b>	58 °C	30 saniye	
<b>Uzama</b>	72 °C	30 saniye	
<b>Son uzama</b>	72 °C	5 dakika	

12 µl PZR ürünü (197 bç) *Hpa* II (*Msp* I) (10 U /µl) restriksiyon endonükleaz ile 37°C'de bir gece restriksiyona tabi tutuldu. Restriksiyon ürünü %2.5'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutulduktan sonra jel görüntüleme cihazında fotoğraflandı

### **3.8. Agaroz jel elektroforezi**

İzole edilen DNA örnekleri, PZR ürünleri ve RFLP sonucu oluşan DNA fragmentleri agaroz jelde molekül büyüklüklerine göre ayrıldı. Jeller Tris-Asetat, EDTA (TAE) tamponu içinde (%1–2.5). Jelin hazırlanması aşamasında etidyum bromid 7 µl (10 mg/ml) eklendi. Jel üzerindeki kuyucuklara yükleme sırasında DNA örneği üzerine 1/6 hacim yükleme tamponu eklendi. Elektroforez 100 V da 45 dakika yapıldı. Jeller jel görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflandı.

#### 4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada Bir Türk popülasyonunda sEH enzimini kodlayan gendeki (*EPHX2*) G860A polimorfizm sıklığı belirlendi. Genotip dağılımları Hardy-Weinberg dengesi yönünden değerlendirildi. G860A polimorfizmi ile KVH, diyabet ilişkisi Khi kare ( $\chi^2$ ) testi kullanılarak değerlendirildi. Bireylerin plazma lipit düzeylerinin cinsiyetle ilişkisi ve plazma lipit düzeyleri genotip ilişkisi bağımsız gruplarda iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi (*student-t test*) kullanılarak yapıldı. Verilerin istatistiksel analizinde Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) programı (Versiyon 14) kullanıldı.

## 5.BULGULAR

Bu çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran 300 kişi çalışma grubunu oluşturmaktadır. Çalışma grubunu oluşturan tüm kişilerle yüz yüze görüşülerek, kendilerine yöneltilen Ek-1 deki soruları cevaplamaları istendi. Bu sorulara verdikleri yanıtlar ve deneysel veriler kullanılarak çözünür epoksit hidrolaz (sEH,*EPHX2*) enziminin genetik polimorfizm sıklığı ve plazma lipit düzeyleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak analiz edildi. Çalışma grubunu oluşturan bireylerin cinsiyet, yaş, KVH, diyabet v.b. özellikleri Tablo 5.1'de verilmiştir. Çalışma grubunun 144 (%48)'ü erkek, 156 (%52)'sı kadın bireyden oluşmaktadır. Erkeklerin yaş ortalaması  $44.31 \pm 17.48$ , kadınların yaş ortalaması ise  $41.47 \pm 16.15$  olarak belirlendi. Vücut kütle indeksi ise  $26.64 \pm 5.05$ 'di. Çalışma grubunun 87 (%29)'ünde KVH varken, 213 (%71.0)'ünde KVH görülmemektedir. Çalışma grubundaki 43 (%14.3) birey diyabet iken 257 (%85.7) kişi diyabet olmadığını bildirdi.

**Tablo 5.1: Çalışma grubunu oluşturan bireylerin karakteristik özellikleri**

	<b>n (%)</b>
<b>Birey Sayısı</b>	300
<b>Cinsiyet</b>	
Erkek	144 (48.0)
Kadın	156 (52.0)
<b>Yaş</b>	<b>Ortalama <math>\pm</math> SD</b>
Erkek	$44.31 \pm 17.48$
Kadın	$41.47 \pm 16.15$
<b>Sigara Durumu</b>	
İçenler	74 (100)
Erkek	49 (66.2)
Kadın	25 (33.8)
<b>Kardiyovasküler Hastalık (Bireyin beyanına göre)</b>	
Var	87 (29.0)
Yok	213 (71.0)
<b>Diyabet (Bireyin beyanına göre)</b>	
Var	43 (14.3)
Yok	257 (85.7)
<b>Vücut Kütle İndeksi</b>	<b>Ortalama <math>\pm</math> SD</b>
	$26.64 \pm 5.05$

Çalışma grubu ailede KVH ve diyabet yönünden incelendiğinde bireylerin 129 (%43)'unun 1. derece akrabalarında KVH izlenirken 171 (%57)'inde izlenmemektedir. Ailesinde diyabet hastası olanların sayısı 71 (%23.7), olmayanların sayısı ise 229 (%76.3)'dur.

**Tablo 5.2: Çalışma grubunda yer alan bireylerin ailede KVH ve diyabet hikayesi yönünden değerlendirilmesi**

<b>KVH</b>	<b>n (%)</b>
Var	129 (43.0)
Yok	171 (57.0)
<b>Diyabet</b>	
Var	71 (23.7)
Yok	229 (76.3)
<b>Toplam</b>	<b>300 (100)</b>

### 5.1 *EPHX2* geni G860A polimorfizminin belirlenmesi


Çalışma grubunu oluşturan 300 bireyin çözümlenür epoksit hidrolaz enzimini kodlayan gende G860A (R287Q) polimorfizmi içerip içermedikleri PZR-RFLP yöntemi ile belirlendi. *EPHX2* geninin amplifiye edilen bölgesi (197 bç) *MspI* restriksiyon endonükleaz enzimi için spesifik bir tanıma bölgesi içerdiğinden *MspI* enzimi ile kesim sonrası 54 ve 143 bç büyüklüğünde iki fragment oluşturmaktadır (Şekil 5.1 ve Şekil 5.2). *EPHX2* geninde 860. pozisyonda G/A tek nükleotit değişimi ise *MspI* enziminin tanıma bölgesinin kaybolmasına neden olduğundan kesim gerçekleşmemekte ve tek bant gözlenmektedir (Şekil 5.2). *MspI* RFLP sonrası 54 ve 143 bç'lik bantları içeren örnekler yabanıl tip, 54,143,197 bç'lik bantları içeren örnekler heterozigot ve 197 bç'lik tek bant içeren bireyler homozigot polimorfik olarak değerlendirildi (Şekil 5.3).

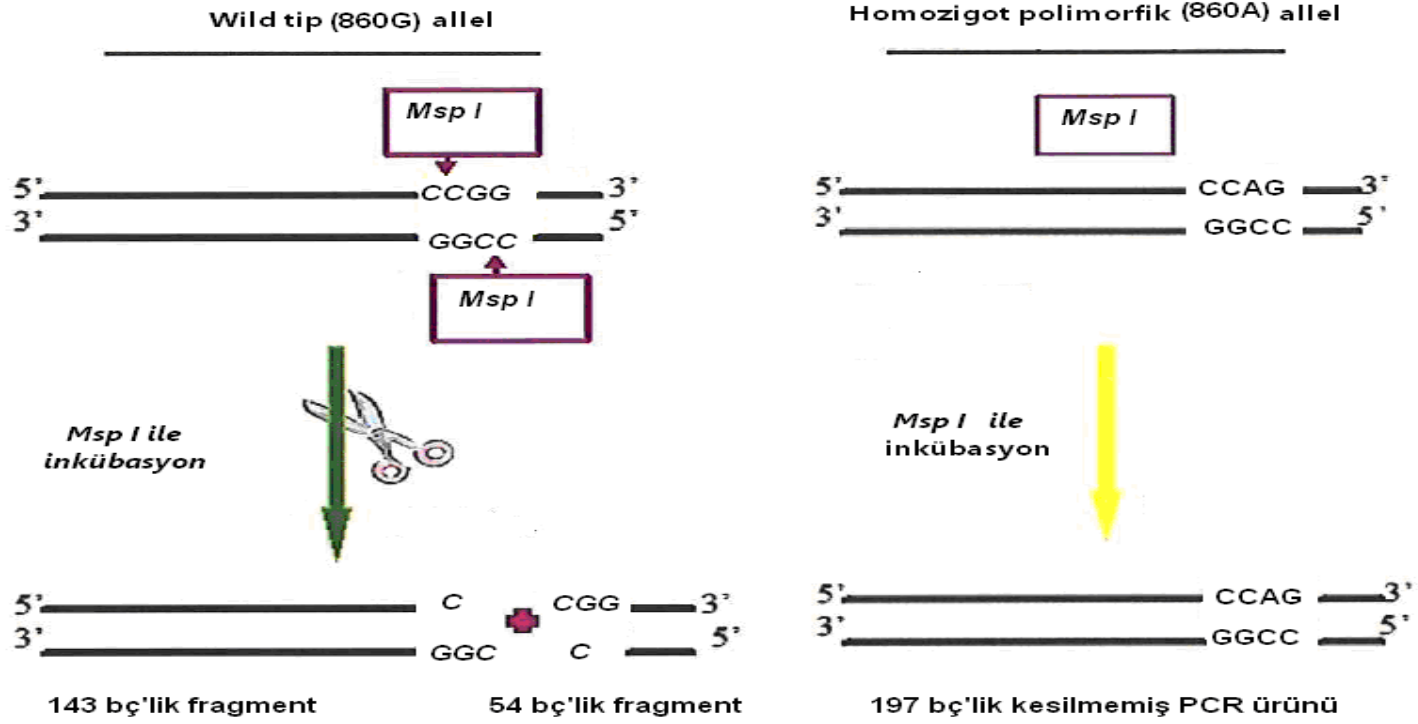


30001 cgtgccccac caccgtccac agcagccctg tataaatggg cttatttcag ctccatggca  
30061 aagttaccgg gtagtgccct gtggctcttg gtttgatcca ttacagga gaaggggatg  
30121 gagggaagca aagagggagt atccgcctag gactgatggg accatgctgg agtgtgcctg  
30181 ttgttttct agatccctgc tctggcccag gcaggttacc gggctctagc tatggacatg  
30241 aaaggctatg gagagtcate tgctcctccc ggtgggtgtg ctgtcttgca gctgtcttat  
30301 gctggctctg cttctacct gcctgagcgc tccacgcctc ggtgctttcc ctgggtcccag

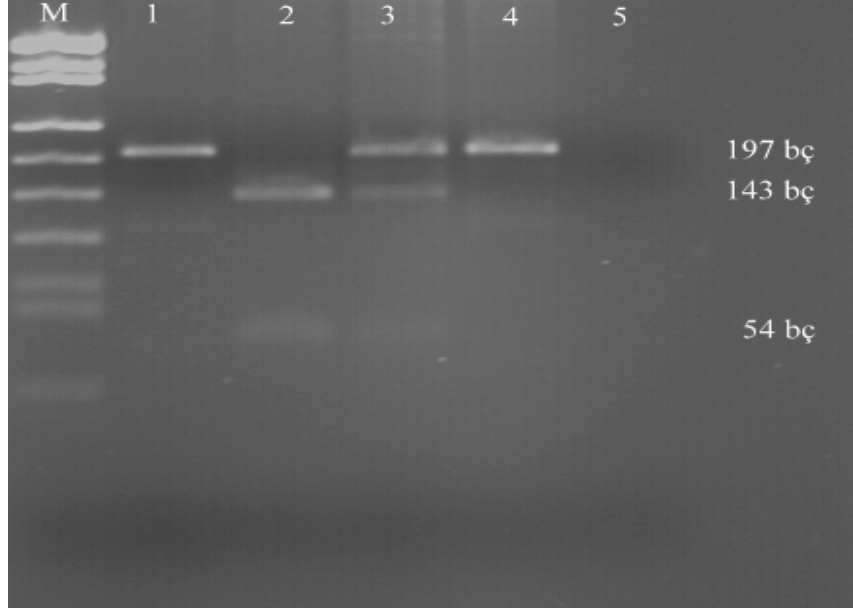
Şekil 5.1: G860A tek nükleotit polimorfizmini içeren *EPHX2* nükleotid dizisi. (Nükleotid dizisi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresinden alınmıştır.)

 : Forward ve revers primerler  : Tek nükleotit değişimi

 : *Msp* I restriksiyon enziminin tanıma bölgesi



Şekil 5.2: G860A polimorfizminin belirlenmesinin şematik gösterimi.



Şekil 5.3: sEH genotiplerinin PZR- RFLP paternleri

M: pUC 19/ *Msp*I DNA Ladder (501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34 bç)

1: 197 bç ( PZR ürünü)

2: 54, 143 bç (Yabanıl tip )

3: 54, 143, 197 bç (Heterozigot )

4: 197 bç (Homozigot polimorfik)

5: Negatif kontrol

Tablo 5.3’de çalışma grubunu oluşturan bireylerin *EPHX2* geni G860A polimorfizmi yönünden analizi görülmektedir. Polimorfizm yönünden yabancıl tip (GG), heterozigot (GA) ve homozigot polimorfik (AA) genotip sıklıkları sırasıyla %78.6 (n=236), %20.4 (n=62) ve %1 (n=2) olarak belirlendi. Çalışılan popülasyonunun *EPHX2* G860A genotip sıklıkları yönünden Hardy-Weinberg dengesinde olduğu gözlemlendi. ( $\chi^2=0.92$ ,  $p=0.33$ ). Bireylerin *EPHX2* geni G860A polimorfizminin Hardy-Weinberg dengesi yönünden incelenmesi ise Tablo 5.4’te verilmiştir.

**Tablo 5.3: Çalışma grubunu oluşturan bireylerde sEH genotip dağılımı**

Genotip	n	(%)
GG	236	78.6
GA	62	20.4
AA	2	1.00
<b>Toplam</b>	<b>300</b>	<b>100</b>

**Tablo 5.4: *EPHX2* G860A polimorfizminin Hardy-Weinberg Dengesi yönünden incelenmesi**

Genotip	Gözlenen (%)	Beklenen (%)
GG	236 (78.6)	237.63 (79.21)
GA	62 (20.4)	58.74 (19.58)
AA	2 (1.00)	3.63 (1.21)
<b>Toplam</b>	<b>300 (100)</b>	<b>300 (100)</b>

Hardy-Weinberg Dengesi için;  $\chi^2=0.92$ .  $p=0.330$

Tablo 5.5’de genotip sıklığının cinsiyete göre dağılımı verilmiştir. 144 erkek bireyin 109 nun GG, 35 nin GA+AA genotipe, 156 kadından 127 sinin GG, 29 unun GA+AA genotipe sahip olduğu belirlendi. Erkekler ve kadınlar arasında genotip dağılımları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $\chi^2=1.458, p=0.227$ ).

**Tablo 5.5: Çalışma grubunda yer alan bireylerin genotip sıklığının cinsiyete göre dağılımı**

Cinsiyet	n	Genotip	
		GG (%)	GA+AA(%)
Erkek	144	109(75.6)	35(24.4)
Kadın	156	127(81.4)	29(18.6)
<b>Toplam</b>	<b>300</b>	<b>236</b>	<b>64</b>

$\chi^2=1.458, p=0.227$

## 5.2 Çalışma grubunda yer alan bireylerin plazma lipit düzeylerinin cinsiyet ve genotip dağılımları

Tablo 5.6’da çalışma grubunda yer alan bireylerin plazma lipit düzeylerinin cinsiyet yönünden değerlendirilmesi görülmektedir. Erkek ve kadın bireyler için ortalama lipit düzeyleri sırası ile TG: 167.470±107.600, TG: 149.890±78.620 mg/dl, HDL: 31.300±8.460, HDL: 37.440±12.210 mg/dl, LDL: 71.550±27.100, LDL: 72.190±34.480 mg/dl, TK:170.040±40.740, TK:175.100±48.035 mg/dl olarak belirlenmiştir. Çalışma grubu 300 kişiden oluşmasına rağmen hesaplamaların doğruluğu açısından uç değerlere sahip bireyler (8 kişi) istatistiksel değerlendirmeye alınmadı. Tabloya göre 292 bireyin plazma lipit düzeyleri cinsiyet yönünden karşılaştırıldığında erkeklerde TG düzeyi kadınlara göre, kadınlarda ise LDL ve TK düzeyleri erkeklere göre daha yüksek olmasına rağmen iki cins arasında TG, LDL ve TK düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (TG  $p=0.110$ , LDL  $p=0.860$ , TK  $p=0.330$ ). Ancak kadınlarda HDL düzeyi erkeklere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde yüksek bulundu ( $p=0.001$ ).

**Tablo 5.6: Çalışma grubunda yer alan bireylerin plazma lipit düzeylerinin cinsiyet yönünden değerlendirilmesi**

Plazma Lipitleri	Cinsiyet		<i>p</i>
	Erkek n =154 (X ± SD; mg/dl)	Kadın n =138 (X ± SD;mg/dl)	
TG	167.470±107.600	149.890±78.620	0.110
HDL	31.300±8.460	37.440±12.210	0.001*
LDL	71.550±27.100	72.190±34.480	0.860
TK	170.040 ±40.740	175.100±48.035	0.335

\**p*<0.050

Tablo 5.7 çalışma grubunda yer alan bireylerin plazma lipit düzeylerinin *EPHX2* geni G860A polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi sonuçlarını içermektedir. Yabanıl (GG) genotipe ve polimorfik (GA+AA) genotipe sahip bireylerin plazma lipit düzeyleri sırası ile TG: 156.350±93.250, TG: 164.900±95.720 mg/dl, HDL: 34.910±10.500, HDL: 33.180±12.740 mg/dl, LDL: 72.540±32.330, LDL: 69.500±26.580 mg/dl ve TK: 173.560±45.380, TK: 169.580±42.460 mg/dl olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre plazma lipit düzeyleri ile genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (TG *p*=0.522, HDL *p*=0.272, LDL *p*=0.494, TK *p*= 0.533).

**Tablo 5.7: Çalışma grubunda yer alan bireylerin plazma lipit değerlerinin *EPHX2* geni G860A polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi.**

Plazma Lipitleri	Genotip		Sonuç*	
	GG (X ± SD; mg/dl)	GA + AA (X ± SD; mg/dl)	<i>t</i>	<i>p</i>
TG	156.350±93.250	164.900±95.720	0.641	0.522
HDL	34.910±10.500	33.180±12.740	1.101	0.272
LDL	72.540±32.330	69.500±26.580	0.685	0.494
TK	173.560±45.380	169.580±42.460	0.625	0.533

\*Student-t test

Çalışılan popülasyonda erkek ve kadın bireylerin lipit değerleri genotip ilişkileri sırası ile tablo 5.8. ve tablo 5.9.'da görülmektedir. Erkeklerde ve kadınlarda lipit düzeyleri ile *EPHX2* geni G860A polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı. Erkeklerde TG  $p=0.522$ , HDL  $p=0.482$ , LDL  $p=0.665$ , TK  $p=0.505$ , kadınlarda TG  $p=0.860$ , HDL  $p=0.765$ , LDL  $p=0.136$ , TK  $p=0.516$  olarak hesaplandı.

**Tablo 5.8: Çalışma grubunda yer alan erkek bireylerde lipit düzeylerinin *EPHX2* geni G860A polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi**

Plazma Lipitleri	Genotip		Sonuç*	
	GG	GA + AA	t	p
	(X ± SD; mg/dl)	(X ± SD; mg/dl)		
TG	186.600±145.070	169.485±110.395	0.643	0.522
HDL	31.606±8.446	30.454±8.302	0.705	0.482
LDL	71.382±27.169	73.682±27.631	0.434	0.665
TK	174.394±46.266	168.571±39.863	0.669	0.505

\*Student-t test

**Tablo 5.9: Çalışma grubunda yer alan kadın bireylerde lipit düzeylerinin *EPHX2* geni G860A polimorfizmi yönünden değerlendirilmesi**

Plazma Lipitleri	Genotip		Sonuç*	
	GG	GA + AA	t	p
	(X ± SD; mg/dl)	(X ± SD; mg/dl)		
TG	151.818±91.068	155.034±77.000	0.176	0.860
HDL	37.533±15.997	36.779±15.997	0.300	0.765
LDL	73.931±36.009	63.365±24.743	1.499	0.136
TK	176.252±48.417	169.827±45.737	0.651	0.516

\*Student-t test

### 5.3 EPHX2 geni G860A polimorfizminin KVH ve diyabet ile ilişkisi

Tablo 5.10. kardiyovasküler hastalığı olan bireylerin *EPHX2* geni G860A polimorfizmi yönünden değerlendirilme sonuçlarını içermektedir. Çalışılan popülasyonda yabancı genotipe sahip 236 bireyden 62 (%26.3)'si kardiyovasküler hastalığa sahipken 174 (%73.7)'ü değildi. Diğer yandan polimorfik genotipe (GA+AA) sahip 64 kişinin 25 (%39.1)'i kardiyovasküler hastalığa sahipken 39 (%60.9)'u değildi. Kardiyovasküler hastalık yönünden yabancı (GG) genotip ve polimorfik (GA+AA) genotipi olan bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ( $\chi^2=4.00$ ,  $p= 0.045$ ). KVH olan bireylerin %26.3 ü yabancı genotipe sahipken %39.1 i polimorfik genotipi içermekteydi. Dolayısıyla polimorfik genotipli bireylerde KVH görülme sıklığı yabancı genotiplere göre anlamlı bir biçimde yüksek bulundu.

**Tablo 5.10: *EPHX2* geni G860A polimorfizm sıklıklarının kardiyovasküler hastalık yönünden değerlendirilmesi**

Genotip	KVH		Toplam
	Var	Yok	
GG (%)	62 (%26.3)	174 (%73.7)	236 (%100.0)
GA+AA (%)	25 (%39.1)	39 (%60.9)	64 (%100.0)
Toplam (%)	87 (%29.0)	213 (%71.0)	300 (%100.0)

$\chi^2=4.00$ ,  $p= 0.045$

Tablo 5.11'e göre, yabancı (GG) genotipe sahip 236 bireyden 27 (%11.4)'si diyabet iken 209 (%88.6) kişi diyabet değildir. Polimorfik genotipe sahip 64 kişiden 16 (%25.0)'sında diyabet görülürken 48 (%75) bireyde diyabet görülmemektedir. Diyabet yönünden polimorfik (GA+AA) ve yabancı tipe (GG) sahip bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir ( $\chi^2=7.539$ ,  $p=0.006$ ). Bu sonuçlara göre polimorfik genotipe (GA+AA) sahip bireylerde diyabet görülme sıklığı yabancı genotipe (GG) sahip bireylere göre anlamlı olarak daha yüksektir (%11.4 GG, %25.0 GG+AA).



**Tablo 5.11: *EPHX2* geni G860A polimorfizm sıklıklarının diyabet yönünden değerlendirilmesi**

<b>Genotip</b>	<b>Diyabet</b>		<b>Toplam</b>
	<b>Var</b>	<b>Yok</b>	
<b>GG (%)</b>	27 (%11.4)	209 (%88.6)	236 (%100.0)
<b>GA+AA (%)</b>	6 (%25.0)	48 (%75.0)	64 (%100.0)
<b>Toplam (%)</b>	43 (%14.3)	257 (%85.7)	300 (%100.0)

$\chi^2=7.539, p= 0.006$

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

HT ve KVH'lar birçok popülasyonda ölüm nedenleri içinde ilk sıradadır. Hastalığın kişiye ve topluma verdiği ekonomik yıkım çok büyüktür. Ülkeler sağlık harcamaları için çok büyük miktarda para ayırmaktadırlar. Ayrılan paranın doğru yönetilmesi, amaca uygun kullanılması ve toplumların bilinçlendirilmesi çok önemlidir. Gelişen teknoloji sayesinde toplumların genetik özelliklerinin belirlenmesi, bize bazı hastalıklara karşı erken önlem alma şansı vermektedir. EET'leri metabolize ederek onların vazodilatatör, anti-inflamatuar, anti-platelet, anti-hipertansif, anti-apoptotik, anti-trombotik ve natriüretik etkilerinin ortadan kalkmasına neden olan sEH enziminin genetik varyantlarının kardiyovasküler hastalıklardaki rolü son birkaç yıldır üzerinde çalışılan bir konudur ve farklı toplumlardaki çalışmalara ihtiyaç vardır. İlaç geliştirme araştırmaları açısından, genlerin hastalıklarla olan ilişkisini bilmek önemlidir. İnsanlarda meydana gelen tek nükleotid değişimleri immün cevabın ve ilaç etkinliğinin kişiden kişiye değişmesinin gerçek nedeni olarak gösterilmektedir. Son yıllarda sEH enziminin farmakolojik olarak inhibisyonu ile HT ve KVH tedavisine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

1 Eylül 2011'de Birleşmiş Milletler (UN), ülke başkanlarının yer aldığı Bulaşıcı Olmayan Hastalıklar Üst Düzey Toplantısının raporuna göre bulaşıcı olmayan hastalıklar içerisinde KVH, kanser, kronik solunum yolu hastalıkları ve diyabet dünyada bir numaralı ölüm nedeni olup, diğer hastalıklara kıyasla, her yıl daha fazla sayıda insanın ölümünden sorumludur. HT ve KVH'lar ise bu ölüm nedenleri arasında %48'lik oranla ilk sırada yer almaktadır [51]. Ülkemizde ise HT ve KVH'lardan kaynaklı ölümlerin görülme sıklığı yaklaşık %35–38 'dir [52].

HT sıklığının farklı ülkelerdeki oranlarına bakıldığında ABD'de 35–64 yaş arası (%28), Kanada'da %27, İsveç'te %38, İtalya'da %38, İngiltere'de %42, İspanya'da %47 ve Almanya'da %55'dir [53]. Ülkemizde 2009 yılı itibariyle 30 yaş üzeri erişkin nüfusta HT görülme sıklığı kadınlarda %46.3, erkeklerde ise %37.7 olduğu tespit edilmiştir. HT sıklığı ülkemizde yaklaşık %40'dır [54]. ABD'de yapılan ulusal halk sağlığı çalışmasına göre beyazlarda kalp hastalığı %12, koroner kalp hastalığı %6.6, hipertansiyon %21, olarak tespit edilmiştir. Asya kökenli bireylerde ise kalp hastalığı %6.7, koroner kalp hastalığı %3.8, hipertansiyon %19.4, olarak daha düşük düzeydedir [55]. Ülkemizde ise kalp hastalığı erkeklerde %13.9, kadınlarda %12.1 olarak tespit edilmiştir. Koroner kalp hastalığı %6 'dır

[54]. Çalışmamızda KVH görülme sıklığı %29 olarak bulundu. Bu oran literatürde belirtilen KVH görülme sıklıklarına göre oldukça yüksektir. Çalışmamızda HT un KVH grubu içinde değerlendirilmesi ve hasta bilgilerinin bireylerin beyanları ile oluşturulması KVH görülme sıklığının yüksek çıkmasının sebepleri arasında sayılabilir.

Bu çalışmada HT ve KVH görülme oranının oldukça yüksek olduğu Türk popülasyonunda bu hastalıklarla ilişkili olabileceği son yıllarda yoğun bir biçimde araştırılan sEH enzimini kodlayan gendeki G860A polimorfizm sıklığı belirlendi. Çalışmamızda yabanıl tip (GG), heterozigot (GA) ve homozigot polimorfik (AA) genotip oranları sırasıyla %78.6 (n=236), %20.4 (n=62) ve %1 (n=2) olarak belirlendi ( $\chi^2=0.92$ ,  $p=0.33$ ). *EPHX2* G860A genotip sıklıkları Hardy-Weinberg dengesindeydi. Sonuçlar daha önce farklı popülasyonlarda yapılmış olan çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldı (Tablo 6.1.). Heterozigot ve homozigot polimorfik genotip sıklığı sırası ile Danimarka popülasyonunda %18.7, %1 [56], Afrika Kökenli-Amerikalılarda %16.3, %0.4 Beyazlarda %18.6, %0.7 [42] ve İsveçlilerde %18.9 ve %1.2'dir [57]. Çin popülasyonunda ise heterozigot genotip sıklığı %32 homozigot polimorfik genotip sıklığı %5.7'dir [43]. Craig R. Lee ve ark. nin yaptığı çalışmada heterozigot ve homozigot polimorfik genotip sıklığı toplamı Kafkas popülasyonunda %19.4, Afrika Kökenli-Amerikalılarda %17.1'dir [40]. Burdon ve ark.nin Afrika kökenli Amerikalılar üzerinde yaptığı çalışmada homozigot polimorfik ve heterozigot genotip sıklıkları sırası ile %1.8, ve %17.4'dür [45]. Tabloda da görüldüğü gibi verilerimiz Danimarka, Afrika kökenli Amerikalı, Kafkas, Beyazlar ve İsveç popülasyonları ile uyum gösterirken Çin popülasyonu üzerinde yapılan çalışma ile hem heterozigot hem de homozigot polimorfik genotip sıklığı bakımından farklılık arz etmektedir. Türk toplumunun *EPHX2* geni G860A sıklığı Avrupa, Kafkas ve beyaz ırka mensup toplumlara benzer olmasına rağmen Çin popülasyonu ile karşılaştırıldığında oran daha düşüktür.

**Tablo 6.1: Farklı popülasyonlarda *EPHX2* G860A polimorfizm sıklıkları**

<b>Popülasyon</b>	<b>Toplam</b>	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>	<b>Kaynak</b>
<b>Danimarka</b>	29339	23528 (%80)	548 (%18.7)	322 (%1)	[56]
<b>Çin</b>	350	218 (%62.2)	112 (%32)	20 (%5.7)	[43]
<b>Afrikalı Amerikalı</b>	1201	1000 (%83.3)	196 (%16.3)	5 (%0.4)	[42]
<b>Avrupalı Beyazlar</b>	1506	1215 (%80.7)	280 (%18.6)	11 (%0.7)	[42]
<b>Afrikalı Amerikalı</b>	349	282 (%80.8)	61 (%17.4)	6 (%1.8)	[45]
<b>İsveç</b>	5827	4656 (%79.9)	1102 (%18.9)	69 (%1.2)	[57]
<b>Kafkas</b>	614	496 (%80.6)	118 (%19.4)		[40]
<b>Afrikalı Amerikalı</b>	307	258 (%82.9)	49 (%17.1)		[40]
<b>Türk</b>	300	236 (%78.6)	62 (%20.4)	2 (%1)	Bu çalışma

sEH enzimini kodlayan gendeki G860A polimorfizmi ile KVH'lar, hipertansiyon, koroner arter kalsifikasyonu, kalp krizi, diyabet ve plazma lipit düzeyleri arasındaki ilişkileri inceleyen çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda sözü edilen hastalıklara yatkınlık bakımından çelişkili sonuçlar ortaya konmuştur. Zhang ve ark. Çin popülasyonu üzerinde yaptığı çalışmada G860A polimorfizminin sigara içmeyenlerde kalp krizi riskini azaltıcı etki gösterdiğini açıklamışlardır. Ayrıca G860A polimorfizminin hücre kültüründe iskemi sonrası nöronal yaşam süresini arttırdığı [58] ve sEH inhibisyonunun deneysel kalp krizi modellerinde kalp kası hasarının büyüklüğünü azalttığı bildirilmiştir [59]. Bu sonuçlar enzim aktivitesindeki azalmanın EET'lerin degradasyon hızının yavaşlamasına, dolayısıyla vazodilatatör, anti-inflamatuar, anti-platelet ve anti-hipertansif özellikleri olan bu moleküllerin dolaşımında daha uzun süre kalarak KVH'lara karşı koruyucu etki oluşturabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Biz de bu çalışmada 300 bireyden oluşan popülasyonumuzu KVH olanlar ve olmayanlar diye iki gruba ayırıp polimorfizm yönünden iki grubu karşılaştırdığımızda KVH olanlarda G860A polimorfizmi oranının anlamlı bir biçimde yüksek olduğunu gördük. Bu sonuç yukarıda sözü edilen çalışmaların sonucu ile çelişirken, siyah popülasyonda 860A alelinin koroner arter kalsifikasyonu riskini artırdığını bildiren, CARDIA (Coroner Artery Risk Development in Young Adults) çalışması [42] ile aynı polimorfizmin Avrupalılarda kalp krizi riskini artırdığını bildiren Gschwendtner ve ark. nın sonuçları ile paralellik göstermektedir [44]. Her ne kadar sEH aktivitesindeki azalmanın EET düzeylerini artırarak kalp hastalıklarına karşı koruyucu etki oluşturması beklense de bu olayın mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. EET'ler ve onlara karşılık gelen diol izomerlerinin farklı fizyolojik etkileri olabilir. Ayrıca bu epoksit ara ürünlerinin metabolizmasında çoklu ve birbirini etkileyen çok farklı yolların devreye girebileceği bilinmektedir. Örneğin Fang ve ark. [60] sEH ın inhibisyonunun EET metabolizmasını ürünleri biyolojik olarak aktif alternatif bir  $\beta$ -oksidasyon yolağına yönlendirdiğini bildirmişlerdir. Nasıl olduğu bilinmeyen bu yollardan birinin veya onların ürettiği bir maddenin damarlarda kalsiyum birikimine neden olabileceği ve bunun araştırılması gerektiği üzerinde durulmaktadır. Çünkü EET'lerin düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve miyositleri içeren bazı hücrelere intraselüler kalsiyum akışını arttırdığı bilinmektedir. Bunlara ek olarak Wei ve ark. Afrikalı Amerikalılarda yaptıkları haplotip analizinde G860A polimorfizminin koroner arter kalsifikasyonu için 1.7 kat daha fazla risk oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Yukarıda da belirttiğimiz gibi bizim sonuçlarımız tüm bu çalışmalar ile uyumlu olsa da bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar bireylerin KVH olma durumlarının kendi verdikleri bilgiler doğrultusunda değerlendirilmesi sonucunda elde edilen verilere dayanmaktadır. Yani bizim sonuçlarımız bireylerdeki KVH'ı teyit eden klinik raporlara dayanmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışmadaki KVH-genotip ilişkisini inceleyen istatistiksel analiz yalnızca eldeki verilerin bir ön değerlendirilmesi olarak düşünülmüştür.

Sato ve ark. nın ailesel hiperkolesterolemi hastaları üzerinde yaptığı çalışmada *EPHX2* geni G860A polimorfizmine ve LDL reseptör mutasyonuna sahip kişilerde total kolesterol ve trigliserid değerlerinin bu polimorfizme sahip olamayanlara göre yüksek olduğu bildirilmiştir [48]. Bu durum ailesel hiperkolesterolemi hastalığında fenotipi etkileyen yeni bir gen-gen interaksyonu olarak açıklanmıştır. Bizim çalışmamızda ise plazma lipit düzeyleri ile G860A polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Çalıştığımız popülasyonda ailesel hiperkolesterolemi veya LDLR mutasyonları ile ilgili verilerimizin olmaması nedeniyle popülasyon bu açıdan incelenemedi. Diğer yandan Enayetallah ve ark. nın fareler üzerinde yaptığı çalışmada sEH knock-out erkek farelerde plazma total kolesterol düzeylerinin yabanıl tip olanlara göre anlamlı olarak düşük olduğu bildirilmiştir [61]. Bu etkinin yalnızca erkek fareler üzerinde oluşmasını ise normalde sEH enzimi aktivitesinin ve ekspresyonunun erkeklerde daha fazla olmasına bağlamışlardır. Bizde çalışma popülasyonumuzu erkek ve kadın olarak iki ayrı gruba ayırdık ve her iki grupta ayrı ayrı G860A polimorfizmi ile lipit düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceledik ancak iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamadık. Sonucumuzun literatüre göre farklılık arz etmesinde çalışılan popülasyonun erkek ve kadın olarak iki gruba ayrılması ve böylece gruplardaki birey sayısının azalması dolayısıyla istatistiksel gücün zayıflatması bir neden olarak görülebilir. Aynı çalışmada enzimin bir inhibitör aracılığı ile (TUPS) sadece hidrolaz aktivitesinin inhibe edilmesi durumunda yabanıl tip farelerde sEH knock-out farelere göre yüksek kolesterol düzeyinin saptandığı da vurgulanmıştır. Aynı etki hücre kültüründe HepG2 hücrelerinde de gözlenmiştir. Bu durum çözümler epoksit hidrolaz enziminin fosfataz ve hidrolaz domainlerinin kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde birlikte etkili olduklarını göstermektedir [61]. sEH enziminde meydana gelen G860A polimorfizminin hidrolaz aktivitesinde azaltıcı, fosfataz aktivitesinde ise artırıcı etki gösterdiği bildirilmiştir [39]. Fosfataz aktivitesinin artması da HMG-CoA ekspresyonunun ve kolesterol sentezinin artmasına sebep olmaktadır. Yani çalışmada G860A polimorfizminin hidrolaz aktivitesini

azaltıcı etkisi ile KVH'lara karşı koruyucu özellik gösterebileceği, fosfataz aktivitesini artırıcı etkisiyle de kolesterol sentezini artırarak KVH'lara karşı yatkınlık sağlayabileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda plazma lipit düzeyleri ile G860A polimorfizmi arasında bir ilişki görülmedi. Bu uyumsuzluğun nedeni Enayetallah ve ark.nın çalışmasının hücre kültüründen elde edilen sonuçlara dayanması olabilir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar bireylerin KVH olma durumlarını kendi verdikleri bilgiler doğrultusunda değerlendirilmesi sonucunda elde edilen verilere dayanmaktadır. Oysa herhangi bir hastalığın risk tahmininin yapıldığı çalışmalarda hastalığın klinik raporlarla doğrulanmış olması gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı yalnızca bir popülasyondaki polimorfizm sıklığının belirlenmesi olduğundan ve çalışma popülasyonu rastgele oluşturulduğundan sEH enzimi G860A polimorfizmi ile HT, KVH, diyabet ve diğer hastalıklarla ilişkilerinin inceleneceği iyi planlanmış, her grupta istatistiksel analize uygun birey sayısını içeren hasta-kontrol çalışmaları gerekmektedir. Çalışmamız popülasyonun tamamını yansıtabilecek kadar geniş değilse de Türk popülasyonunda yapılan ilk çalışmadır. Buradan elde edilecek sonuçların bu alanda yapılacak diğer çalışmaların sonuçları ile birlikte değerlendirilerek Türk popülasyonunda *EPHX2* G860A polimorfizm sıklığının belirlenmesi ve bunun HT, KVH, diyabet gibi hastalıklarla ilişkisinin saptanmasına temel oluşturabileceğine inanıyoruz.

## 7. KAYNAKLAR

1. Manson M. M. (1980). Epoxides is there a human health problem? *British Journal of Industrial Medicine*. 37:317-336
2. Decker M., Arand, M., Cronin A. (2009). Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Arch Toxicol*. 83:297–318
3. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. (2003). The JNC 7 Report. *The Journal of the American Medical Association*. 289: 2560-2572.
4. Hart C. (1998). *Organik Kimya*, Palme yayınevi (Çeviri: UYAR, T.) Ankara, 9.baskı 245s.
5. Jerina D.M. (1974). Biological formation and disposition of arene oxides. *Lloydia*. 37:212–18
6. Oliw E.H. (1994). Oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450 monooxygenases. *Prog. Lipid Res*. 33:329–54
7. Zeldin D.C., Wei S., Falck J.R., Hammock B.D., Snapper J.R. (1995). Metabolism of epoxyeicosatrienoic acids by cytosolic epoxide hydrolase: substrate structural determinants of asymmetric catalysis. *Arch. Biochem. Biophys*. 316:443–51
8. 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
9. Newman J. W., Morisseau C., Hammock B. D. (2005). Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*. 44:1–51
10. 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. *ScienceDirect*. 06:201–18
11. Roman R.J. (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*. 82:131–85.
12. Campbell W.B., Gebremedhin D., Pratt P.F. (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*. 78:415–23.
13. Capdevila J., Marnett L.J., Chacos N., Prough R. A, Estabrook R. W. (1982). Cytochrome P-450-dependent oxygenation of arachidonic acid hydroxyicosatetraenoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79:767–70.



14. Sharma M., McCarthy E. T., Reddy D. S., Patel P. K., Savin V. J., Medhora M., and Falck J. R. (2009). 8,9-Epoxyeicosatrienoic Acid Protects the Glomerular Filtration Barrier. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89: 43–51.
15. Weintraub N.L, Fang X., Kaduce L., VanRollins M., Chatterjee P and Spector A.A. (1999). Epoxide hydrolases regulate epoxyeicosatrienoic acid incorporation into coronary endothelial phospholipids. *American Journal of Physiology.* 277: H2098-2108.
16. Li P.L. and Campbell W.B. (1997). Epoxyeicosatrienoic acids activate K<sup>+</sup> channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide Binding protein. *Circulation Research.* 80: 877-884.
17. Imig D. and Hammock B. D. (2009). Soluble Epoxide Hydrolase as a Therapeutic Target for Cardiovascular Diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 10: 794–805.
18. Chen J.K, Capdevila J. and Harris R.C. (2000). Overexpression of C-terminal Src kinase blocks 14, 15-epoxyeicosatrienoic acid-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Journal of Biological Chemistry.* 275: 13789-13792.
19. Wray J. and Bishop-Bailey D. (2007). Epoxygenases and PPARs in vascular biology *Experimental Physiology. Physiology in Press.*
20. Li P.L, Chen C.L, Bortell R. (1999). 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid stimulates endogenous mono-ADP-ribosylation in bovine coronary arterial smooth muscle *Circ Res.* 85:349–356.
21. Li P.L., Zhang D.X., Ge Z-D. (2002). Role of ADP-ribose in 11,12-EET-induced activation of K<sub>Ca</sub> channels in coronary arterial smooth muscle cells *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282:1229–1236.
22. Larsen B.T. (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.* 290:491–499.
23. Node K. (1999). Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science.* 285:1276–9.
24. Falck J.R. (2003). 11,12-epoxyeicosatrienoic acid (11,12-EET): structural determinants for inhibition of TNF-alpha-induced VCAM-1 expression. *Bioorg Med Chem Lett.* 13:4011–4014.
25. Pratt P.F., Li P., Hillard C.J. (2001). Endothelium-independent, ouabainsensitive relaxation of bovine coronary arteries by EETs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H1113–H1121.
26. Zipes D. P., Libby P., Kaplan N.M. (2001). *Heart Disease A Textbook of Cardiovascular Medicine 6th Edition Eugene Braunwald.* Chapter 28. Page 941-72.

27. Roberts W.C. (1995). Preventing and arresting coronary atherosclerosis. *Am Heart J.* 130:580-600.
28. Kathryn M.G, Wenqi Y., Garrett J.G., William B.C. (2007). Roles of Epoxyeicosatrienoic Acids in Vascular Regulation and Cardiac Preconditioning *Cardiovasc Pharmacol.* 50: 601-8.
29. Chiamvimonvat N., Ho C.M., Tsai H., Hammock, B. D. (2007). The Soluble Epoxide Hydrolase as a Pharmaceutical Target for Hypertension *Cardiovasc Pharmacol.* 50:225-37.
30. Cronin A., Mowbray S., Durk H., Homburg S., Fleming I., Fisslthaler B., Oesch F., and Arand M. (2003). The N-terminal domain of mammalian soluble epoxide hydrolase is a phosphatase. *PNAS.*100 :1552–1557.
31. Kathrin H., Himo H. and F. (2006). Theoretical Study of the Full Reaction Mechanism of Human Soluble Epoxide Hydrolase. *Chem. Eur. J.* 12:6898 – 6909.
32. Morisseau C. and Hammock B.D. (2004). Epoxide Hydrolases: Mechanisms, Inhibitor Designs, and Biological Roles. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 45: 311-333.
33. Morisseau C., Du G., Newman J. and Hammock B.D. (1998). Mechanism of Mammalian Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition by Chalcone Oxide Derivatives *Arch Biochem Biophys.* 356: 214–228.
34. Magdalau J. and Hammock B. D. (1988) 1,2-Epoxyalkanes: Substrates and Inhibitors of Microsomal and Cytosolic Epoxide Hydrolases in Mouse Liver. *Biochemical Pharmacology.* 2717– 2722.
35. Morisseau C., Goodrow M.H., Dowyd D., Zheng J., Greene J. F., Sanborn J. R. and Hammock B.D. (1999). Potent urea and carbamate inhibitors of soluble epoxide hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 8849–8854
36. Kim I., Morisseau C., Watanabe T. and Hammock B.D. (2004). Design, Synthesis, and Biological Activity of 1,3-Disubstituted Ureas as Potent Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase of Increased Water Solubility. *J Med Chem.* 47: 2110-2122.
37. Kim I., Heirtzler F.R., Morisseau C., Nishi K, Tsai H. and Hammock B.D. (2005). Optimization of Amide-Based Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase with Improved Water Solubility. *J Med Chem.* 48:3621-3629
38. Ning Li H. Q., Liu J. Haris T. R., Hammock B. D., Chiamvimonvat N. (2011) Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors and Heart Failure Review *Cardiovascular Therapeutics Cardiovascular Therapeutics* 29: 99–111
39. Beata D., Zawislak P., Srivastava P.K., Zquez-Matias J.V., Mohrenweiser H.W., Maxwell J. E., Hammock B.D., Bradbury J.A., Enayetallah A.E., Zeldin D.C., and Grant D.F. (2003). Polymorphisms in Human Soluble Epoxide Hydrolase. *Mol Pharmacol.* 64:482–490,

40. Lee, CR., North, KE., Bray, MS., Fornage, M., Seubert, JM., Newman, JW. (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.
41. Kullmann, S., Binner, P., Rackebrandt, K., Hüge, A., Haltern, G., Lankisch, M. (2009). Variation in the human soluble epoxide hydrolase gene and risk of restenosis after percutaneous coronary intervention. *BMC Cardiovasc Disord.* 9: 48.
42. Fornage M., Boerwinkle E., Doris P. A., Jacobs D, Nathan K.L., Wong D. Artery (2004). Calcification in African-American Subjects: The Coronary Artery Risk Polymorphism of the Soluble Epoxide Hydrolase Is Associated With Coronary Development In Young Adults (CARDIA) Study *Circulation.* 109:335–339
43. Zhang L., Ding H., Yan J., Hui R., Wang W., Kissling G.E., Zeldin D.C., and 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.
44. Gschwendtner A., Ripke S., Freilinger T., Lichtner P., Müller M., Wichmann 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.* 39:1593-1596
45. Burdon K. P., Lehtinen A. B., Langefeld C.D., Carr J. J., Rich S.S., Freedman B. I. (2008). Genetic analysis of the soluble epoxide hydrolase gene, *EPHX2*, in subclinical cardiovascular disease in the diabetes heart study. *Diab Vasc Dis Res* 5:128–134.
46. Wei Q., Doris P. A., Pollizotto M.V., Boerwinkle E., Jacobs D.R., Siscovick D. S. (2007). Sequence variation in the soluble epoxide hydrolase gene and subclinical coronary atherosclerosis: interaction with cigarette smoking. *Atherosclerosis* 190 : 26–34.
47. Dreisbach A.W., Japa S., Sigel A., Parenti M.B., Hess A.E., Srinouanprachanh S. L. (2005). The prevalence of CYP2C8, 2C9, 2J2, and soluble epoxide hydrolase polymorphisms in African Americans with hypertension. *Am J Hypertens.* 18:1276–1281.
48. Sato K., Emi M., Ezura Y., Fujita Y., Takada D., Ishigami T., Umemura S., Xin Y., Wu L., Larrinaga-Shum S., Stephenson S. H., Hunt S.C., Hopkins P. N. (2004). Soluble epoxide hydrolase variant (Glu287Arg) modifies plasma total cholesterol and triglyceride phenotype in familial hypercholesterolemia: intrafamilial association study in an eight-generation hyperlipidemic kindred. *J Hum Genet.* 49:29–34
49. Luo P., Chang H., Zhou Y., Zhang S., Hwang S. H., Morisseau C., Wang C., Inscho E.W., Hammock B. D. and Wang M. (2010). Inhibition or Deletion of Soluble Epoxide Hydrolase Prevents Hyperglycemia, Promotes Insulin Secretion, and Reduces Islet Apoptosis. *JPET* 334:430–438,

50. Miller S.A.; Dykes D.D; Polesky H.F.A.(1988). Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16,1215.
51. Data Global status report on noncommunicable diseases.(2010). WHO Library Cataloguing-in-Publication.
52. Akgun S., Rao C., Yardim N., Basara B. B., Aydın O., Mollahaliloglu S., Lopez A. D. (2007). Estimating mortality and causes of death in Turkey: methods, results and policy implications. *European Journal of Public Health.* 17: 593–599
53. Wolf-Maier K., Cooper R.S., Kramer H., Banegas J.R., Giampaoli S., Joffres M.R., Poulter N., Primatesta P., Stegmayr B., Thamm M. (2004). Hypertension Treatment and Control in Five European Countries, Canada and the United States. *Hypertension.* 43: 10-17
54. Onat A. (2009). Toplumumuzda Kan Basıncı ve hipertansiyon. TEKHARF çalışması.
55. Pleis J.R., Lethbridge-Cejku M. (2006) Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey. *Vital Health Stat.* 232, 1–153.
56. Lee J., Dahl M., Grande P., Tybjarg-Hansen A. and Nordestgaard B.G. (2009). Genetically reduced soluble epoxide hydrolase activity and risk of stroke and other cardiovascular disease. *Stroke.* 41: 27-33
57. Fava C., Montagnana M., Danese E., Almgren P., Hedblad B., Berglund G. E. G., Minuz P., and Melander O. (2009). Homozygosity for the *EPHX2* K55R polymorphism increases the long-term risk of ischemic stroke in men: a study in Swedes. *Pharmacogenetics and Genomics.* 20: 94–103
58. Koerner IP, Jacks R, DeBarber AE, Koop D, Mao P, Grant DF, Alkayed NJ. Polymorphisms in the human soluble epoxide hydrolase gene *EPHX2* linked to neuronal survival after ischemic injury. *J Neurosci.* 2007;27: 4642–4649.
59. Dorrance A.M., Rupp N., Pollock D.M., Newman J.W., Hammock B.D., Imig J.D. (2005). An epoxide hydrolase inhibitor, 12-(3-adamantan-1-ylureido) dodecanoic acid (AUDA), reduces ischemic cerebral infarct size in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 46:842– 848.
60. Fang X., Kaduce T.L., Weintraub N.L. (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.
61. EnayetAllah A. E., Luria A., Luo B., Tsai H., Sura P. , Hammock B. D. and Grant D.F. (2008). Opposite Regulation of Cholesterol Levels by the Phosphatase and Hydrolase Domains of Soluble Epoxide Hydrolase. *The Journal Of Biological Chemistry.* 283: 36592–36598.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Sait ERDÖNMEZ
Doğum Yeri ve Tarihi	Divriği, 12.01.1985
Medeni Hali	Bekâr
Yabancı Dil	İngilizce
Mesleği	Biyolog
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Bilimler Biyokimya Anabilim Dalı, 58140-SİVAS
E-posta Adresi	saiterdonmez@yahoo.com

### Eğitim Durumu

Lise	Bahçelievler Dede Korkut Anadolu Lisesi, 1996
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2004
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2009
İş Tecrübesi	Özel Sivas Tıp Merkezi 2009- Halen

EK-1 Çalışma grubunu oluşturan bireylerin sorgu formu

<b>TARİH:</b>				<b>No:</b>
<b>AD SOYAD:</b>				
<b>YAŞ:</b>				
<b>CİNSİYET</b>	<b>E</b>	<b>K</b>		
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
<b>DOĞUM YERİ:</b>				
<b>BOY:</b>				
<b>KİLO:</b>				
	<b>VAR</b>	<b>YOK</b>	<b>VARSA YAKINLIK DERECESİ</b>	
<b>AİLESEL KVH:</b> (HİPERTANSİYON, KALP HASTALIĞI)				
<b>ŞEKER HASTALIĞI</b>				
<b>KANSER</b>				
<b>SÜREKLİ KULLANDIĞI İLAÇ:</b>	<b>VAR</b>	<b>YOK</b>		
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
<b>VARSA NEDENİ :</b>				
	<b>KULLANMIYOR KULLANIYOR NE KADAR ZAMANDIR / NE SIKLIKLA</b>			
<b>SİGARA :</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	/	
<b>ALKOL:</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	/	
	<b>KAÇ YILDIR</b>			
<b>MESLEĞİ:</b>				
<b>TEL :</b>				



T.C.

**Cumhuriyet Üniversitesi**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Kurulu**

Konu:

Sayı: 2010/27

21.04.2010

**Karar No: 2010-01/24**

Doç.Dr.Hatice PINARBAŞI'nın yürüttüğü olduğu "Türk Popülasyonunda Soluble Epoksit Hidrolaz (SEH,EPHX2) Enziminin Genetik Polimorfizminin Belirlenmesi" konulu Yüksek Lisans Tezinin Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Kurulunca uygun olduğuna;

**Karar verilmiştir.**

<i>Ünvanı/Adı Soyadı</i>	<i>Üye</i>	<i>Uzmanlık Dalı</i>	<i>İmzası</i>
Prof.Dr.M.Kemal YILDIRIM	Başkan	Farmakoloji	
Prof.Dr.Dilara İÇAĞASIOĞLU	Üye	Çocuk Sağ.ve Hast.	Katılmadı
Prof.Dr.Ayhan KOYUNCU	Üye	Genel Cerrahi	Katılmadı
Doç.Dr.Sefa GÜLTÜRK	Üye	Fizyoloji	Katılmadı
Doç.Dr.Yavuz SİLİĞ	Üye	Biyokimya	
Yrd.Doç.Dr.Gülşay YILDIRIM	Üye	Deontoloji	
Yrd.Doç.Dr.Ziynet ÇINAR	Üye	Biyoistatistik	