

T.C.

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**KAFA İÇİ ANEVİZMASI OLAN HASTALARDA
ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ ENZİMİ
GENİNİN POLİMORFİZMİ**

**Dr. Nurettin Bolat
UZMANLIK TEZİ**

**Danışman Öğretim Üyesi
Yard. Doç. Dr. Ünal Özüm**

**SİVAS
2006**

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir (CÜBAP Proje No: T-247)

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
• TEŞEKKÜR	ii
• ÖZET	iii
• İNGİLİZCE ÖZET	iv
• SİMGELER VE KISALTMALAR	v
• ŞEKİLLER VE TABLOLAR	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 BEYNİN DAMARLANMASI	3
2.2 BEYİN KAN AKIMI	3
2.3 KAFA İÇİ ANEVİRİZMA	4
2.3.1 Anevrizmanın histolojik yapısı	4
2.3.2 Etiyopatogenezi	6
2.3.3 Cinsiyet	7
2.3.4 Yaş	7
2.3.5 Anevrizmalarda klinik belirtiler	8
2.4 NİTRİK OKSİT	8
2.4.1 Tanım ve tarihçe	8
2.4.2 Nitrik oksit sentezi ve nitrik oksit sentaz enzimi	8
2.4.3 Nitrik oksitin etki mekanizması	10
2.4.4 Nitrik oksitin damar duvarına etkisi	11
2.4.5 Nitrik oksitin anevrizma patogeneziindeki rolü	13
2.4.6 Endotelial nitrik oksit sentaz geni ve polimorfik özellikleri	14
2.4.6.1 İnsan eNOS genindeki polimorfizmler	14
2.4.6.2 eNOS geninde intron bölgesindeki polimorfizmler	15
2.4.6.3 Promotor bölgesindeki polimorfizmler	15
2.4.6.4 Ekson 7 tek nükleotid polimorfizmi	17
2.5 POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ [POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)]	17
2.5.1 PCR'nin uygulama alanları	18

2.5.2	PCR'nin bileşenleri	18
2.5.2.1	Enzim	18
2.5.2.2	Deoksiribonükleotid trifosfatlar	19
2.5.2.3	PCR tampon içeriği	19
2.5.2.4	Hedef diziler	19
2.6	ELEKTROFOREZ	19
2.7	GENETİK POLİMORFİZM	20
2.7.1	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi	
	[Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)]	20
2.7.2	Basit Dizi Tekrarları polimorfizmler	
	[Simple Sequence Repeats (SSR)]	20
2.7.3	Değişken Sayıda Ardışık Dizi Polimorfizmleri	
	[Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)]	20
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1	HASTA VE KONTROL GRUPLARI	22
3.1.1	Hasta grubu	22
3.1.2	Kontrol grubu	22
3.2	DNA YALITILMASI	22
3.3	MOLEKÜLER ANALİZ	23
3.3.1	PCR uygulaması	23
3.3.2	Elektroforez işlemi	25
3.3.3	Genotiplendirme	25
3.3.4	Restriksiyon enzimlerinin uygulanması	25
3.3.5	eNOS geninde ekson 7'deki Glu298Asp RFLP	
	polimorfizminin analizi	26
3.3.6	eNOS geni intron 4'deki VNTR polimorfizminin analizi	27
3.4	İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME	28
4.	BULGULAR	29
4.1	Enos geni ekson 7 RFLP polimorfizminin allel ve genotipleri	29
4.2	Enos geninin intron 4 VNTR polimorfizminin allel ve genotipleri	32
5.	TARTIŞMA	34
6.	SONUÇLAR	37
7.	KAYNAKLAR	38

TEŞEKKÜR

Tıp eğitiminde bana emeği geçen tüm hocalarıma ve nöroşirurji alanında beni yetiştiren, ilgilerini eksik etmeyen, tezimi hazırlamamda deneyim ve bilgileriyle bana destek olan Prof. Dr. H. Zafer Kars ve Yard. Doç. Dr. Ünal Özüm'e teşekkür ederim. Doç. Dr. H. Murat Göksel, Doç. Dr. Mustafa Gürelik ve Yard. Doç. Dr. Özen Karadağ'a nöroşirurji eğitimime olan katkılarından dolayı teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, candan teşekkür ederim.

Araştırmanın genetik çalışma aşamasında, Tıbbi Genetik Anabilim Dalının imkânlarını kullanmamı sağlayan Doç. Dr. Öztürk Özdemir'e, CÜTFAM'daki çalışmalarımda bana yardımcı olan Bilim Uzmanı Eylem Gül'e, çalışmanın istatistik değerlendirmesindeki katkılarından dolayı Yard. Doç. Dr. Ziyet Çınar' a teşekkür ederim.

ÖZET

Nitrik oksit sentezi, 3 izoformu bulunan, nitrik oksit sentaz enzimi tarafından düzenlenmektedir. Bunlar, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve indüklenbilir ya da immünolojik nitrik oksit sentazdır (iNOS). Bunlardan endotelial nitrik oksit sentaz, arter duvarındaki düz kas tonusunu, dolayısı ile damar çapını belirlemektedir. İşlevsel etkinliği bilinen eNOS'un yapısal etkinliğinin de olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada kalp-damar hastalıklarına eşlik eden eNOS genindeki iki polimorfizmle bir yapısal damar patolojisi olan kafa içi anevrizma arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Bu çalışmaya kafa içi anevrizması olan toplam 53 hasta ve 52 sağlıklı birey alınmıştır. eNOS geni intron 4 bölgesi 27-VNTR ve ekson 7 bölgesi G894T (Glu298Asp) polimorfizmi analizi yapılmıştır.

eNOS geni G894T polimorfizmi için hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları yönünden anlamlı fark bulunurken, allel dağılımı yönünden anlamlı fark bulunamamıştır. 27-VNTR analizinde hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark elde edilememiştir.

Endotelial nitrik oksit sentaz genindeki mutasyon ve polimorfizmler, endotelial nitrik oksit sentaz enziminin işlev bozukluklarına neden olarak kafa içi anevrizma gelişimine yol açabilecektir. Bu mutasyon ve polimorfizmin belirlenmesi kafa içi anevrizma patojenezine ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler:

Nitrik oksit, eNOS, polimorfizm, ekson 7, intron 4, kafa içi anevrizma

SUMMARY

Nitric oxide synthesis is regulated by nitric oxide synthase which has three isoforms: endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and immunological or inducible nitric oxide synthase (iNOS). Basal cerebral vascular tone requires continuous release of nitric oxide by eNOS. It has been suggested that eNOS plays not only functional role, but also a structural role.

The association between two polymorphisms located in the eNOS gene, implicated in cardiovascular disease pathology and intracranial aneurysm which is a structural vascular pathology was investigated.

A total of 53 patient with intracranial aneurysm and 52 healthy subjects were included in the study. 27-VNTR polymorphism of intron 4 in eNOS gene and G894T (Glu298Asp) polymorphism of exon 7 in eNOS gene were analyzed.

A significant difference in genotype distribution but not allele frequency was observed for eNOS G894T (Glu298Asp). A significant difference in genotype distribution and allele frequency was not founded for 27-VNTR polymorphisms

Mutation and polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene may cause cerebral aneurysm by means of functional impairment of endothelial nitric oxide release. Determination of mutation and polymorphism at endothelial nitric oxide synthase gene is important in clarifying the pathogenesis of cerebral aneurysm.

Key words:

Nitric oxide, eNOS, polymorphism, exon 7, intron 4, intracranial aneurysm,

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP: Adenin difosfat

Ala: Alanin

Asp: Asparajin

ATP: Adenin trifosfat

Bç: Baz çifti

cGMP: Siklik guanilat 3'5' mono fosfat

Cys: Cytosin

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksiribonükleotid trifosfat

EDRF: endothelial derived releasing factor

eNOS: endotelyal nitrik oksit sentaz

Glu: Glutamin

Gly: Glycin

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

iNOS: immünolojik nitrik oksit sentaz

kb: Kilobase

L-NMMA: N- monometil-L-arjinin

L-NAME: N-nitro-L-arjinin metilester

L-NA: N-nitro-L-arjinin

L-NAA: N-amino-L-arjinin

L-NIO: N-iminoetil-L-ornitin

NADPH: Nicotineamid adenine dinucleotide phosphate

NMDA: N-metil D-aspartat

nNOS: nöronal nitrik oksit sentaz

NSBC: Nucleo spin blood column

PCR: Polymerase Chain Reaction

RE: Restriksiyon enzimi

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SAK: subaraknoid kanama

SSR: Simple Sequence Repeats

Thr: Thirozin

Thy: Thymin

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats

TABLolar ve ŞEKİLLER

	<u>SAYFA</u>
Tablo I: İnsan eNOS geni polimorfizmleri ve hastalıklarla ilişkileri.	16
Tablo II: eNOS geni ekson 7 polimorfizminin genotip frekansları.	31
Tablo III: eNOS geni ekson 7 allel frekansları.	32
Şekil 1: Normal beyin arterlerinin damar duvarı ile anevrizma duvarının Şematik g3r3n3m3.	5
Şekil 2: L-Arjinin'den NO sentez yolu.	9
Şekil 3: NO aracılığı ile beyin damarlarında vazodilatasyon yapan h3cre ve sistemlerin Şematik g3r3nt3s3.	12
Şekil 4: eNOS geni ve çalışılan polimorfizm b3lgeleri.	17
Şekil 5: eNOS ekson 7 RFLP polimorfizmi.	27
Şekil 6: eNOS intron 4 VNTR polimorfizmi.	28
Şekil 7: Hasta grubuna ait eNOS ekson 7, % 2'lik agaroz jel RFLP analizi g3r3nt3leri.	30
Şekil 8: Kontrol grubuna ait eNOS ekson 7, % 2'lik agaroz jel RFLP analizi g3r3nt3leri.	31
Şekil 9: Hasta grubuna ait, eNOS intron 4, %2'lik agaroz jel, VNTR analizi g3r3nt3leri.	32
Şekil 10: Kontrol grubuna ait, eNOS intron 4, %2'lik agaroz jel, VNTR analizi g3r3nt3leri	33

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kafa içi anevrizma patojenezinde, pek çok görüş arasında, genetik faktörlerin üzerine eklenen edinsel faktörlerin rol oynadığı varsayımı en çok kabul görendir (1). Sakküler anevrizmaların duvarları, normal damar duvarında bulunan elastik membran ve kas duvarından yoksundur (Şekil 1) (2). Bu şekli ile anevrizmalar, sonradan gelişen zayıf duvarından dolayı her zaman için kanama potansiyeline sahip patolojik oluşumlar olarak dikkati çekmektedir (1).

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-arjinin'in oksidasyonu ile sentez edilir. NO, düz kaslardaki nonadrenerjik ve nonkolinerjik sinirlerden salınan damar tonusunu düzenleyen önemli bir mediyatördür. NO'in enflamasyon esnasında dokuda biriken makrofajlar tarafından fazla miktarda salgılandığı bilinmektedir. NO sentezine aracı olan NOS enziminin nöronal (nNOS), endotelyal (eNOS) ve immunolojik (iNOS) olmak üzere üç izoformu vardır (3). eNOS nöronal yapılar, endotel hücreleri, endokard, myokard ve trombositlerde bulunur ve düzenli olarak NO sentez eder (4).

eNOS geni kromozom 7q35-36'da bulunur ve 21 kilobaz (kb)'lık 26 ekson içerir (5). Bu genlerde meydana gelebilecek bir polimorfizm, NOS enziminde işlev değişikliklerine yol açar ve devamında bir hastalık gelişebilir (6). DNA'daki eNOS geni polimorfizmleri ile damar hastalıkları arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılmış pek çok araştırma mevcuttur (6-11). Bugüne kadar koroner arter hastalığı, miyokard enfaktüsü, hipertansiyon, inme ve böbrek hastalıkları gibi pek çok damarsal bozukluk eNOS geni polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur (5, 11). Ayrıca, aşırı NO salınımına neden olarak damar yatağında hasara yol açtığı gösterilen iNOS genindeki polimorfizmin de anevrizma patojenezinde önemli olabileceği düşünülmektedir (12). Ancak araştırma sonuçları ırklar arasında değişkenlik gösterebileceğinden özgün genetik değişimlerin sadece belli ırklara özgü olduğu düşünülebilir.

Şu ana kadarki bilgilerimiz ışığında, NOS geni polimorfizmi ile kafa içi anevrizmalar arasındaki ilişki henüz tam açıklanabilmiş değildir. Biz bu çalışmada, kafa içi anevrizması olan hastalarda eNOS geninin daha önce

polimorfik olduğu gösterilmiş iki bölgesinde (intron 4 ve ekson 7) polimorfizm olup olmadığını kontrollü bir çalışma ile araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BEYNİN DAMARLANMASI:

Beynin arteriyel kanı kafa içine iki çift geniş damarla gelir. Bunlar, a. carotis communis'in dalları olan a. carotis interna ve a. Subclaviya'nın dalları olan a. vertebralislerdir. Vertebral arteriyel sistem, beyin sapı, serebellum, oksipital lob ve talamusun bir bölümünü beslerken, karotid arterler beynin kalan kısımlarını besler. Karotid arterler, anterior beyin arterleri arasındaki anterior kommünikan arter ile birbirleriyle, posterior kommünikan arter aracılığı ile de vertebral sistemle birleşerek Thomas Willis'in tanımladığı circulus arteriosus'u ya da Willis poligonunu oluştururlar (2, 13).

Beyin damarlarının histolojik yapısı, vücudun diğer bölgesindeki arterlerin histolojik yapısından farklıdır. Beyin arterlerinde tunika media tabakası düz kas liflerinden meydana gelmiştir ve düz kas lifleri arasında elastik tabaka çok azdır. Beyin damarlarında eksternal elastik lamina yoktur ve media tabakasında da oldukça sık defektlere rastlanır. Özellikle damarların çatallanma yerlerinde sirküler kaslar bulunmamaktadır. Adventisya ise oldukça gevşektir (14, 15).

2.2. BEYNİN KAN AKIMI:

Beyin vücut ağırlığının % 2'sini oluştururken istirahat halinde kardiyak outputun %15-20'sini alır. Gri maddede beyin kan akımı 30- 92 ml/100gr beyin/dk iken beyaz maddede bu değer 1/3'ü kadardır. Beyindeki arterio-venöz basınç değişimi diğer organlardan farklıdır. Beyin, kalvaryum ile katı bir biçimde çevrelenmiştir. Bu kutu bir kafa içi basınç oluşturur ve bu basınç atmosfer basıncından ve santral venöz basınçtan yüksektir. Beyin perfüzyon basıncı ise ortalama arteriyel basıncından, kafa içi basıncın çıkarılması ile elde edilir (16).

Kapillerden geçen kan miktarı önemli değişiklikler gösterir. Arteriyol duvarlarındaki sirküler kas tabakası kasılıp gevşeyerek arter lümen çapını değiştirir ve kan akımının düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca kapillerin arteriyolden ayrıldığı noktada bulunan prekapiller sfinkterler de kasılıp gevşeyerek kapillere geçen kan miktarını ayarlayabilir. (17).

2.3. KAFA İÇİ ANEVİRİZMA:

Kafa içi anevrizmaların yetişkin nüfusta görülme sıklığı yaklaşık %5'dir. Kanayan anevrizmaların her yıl için 100.000'de 10- 11 olduğu göz önüne alınırsa, kafa içi anevrizmaların çoğunun kanamamış ve asemptomatik olduğu düşünülür. Anevrizmaların yaklaşık %2'si çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır (18–20).

Anevrizmalar çoğunlukla damar bifurkasyonlarından çıkar. Anevrizma bir damarın gövdesinden çıkmaz. Aynı şekilde parankimal veya perforan damarlarda da anevrizma sık görülmez. Bir damar grubunun periferik dalında anevrizma görülmesi ise seyrekir (21).

2.3.1. Anevrizmanın histolojik yapısı:

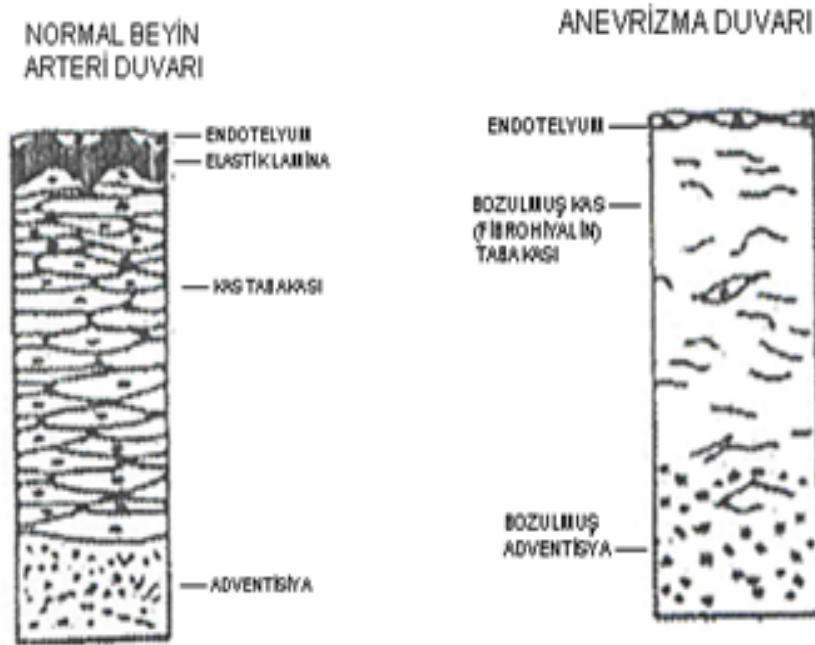
Arter duvar yapısı tunika intima, tunika media ve tunika eksterna (veya adventisia) olmak üzere, yapı bakımından birbirinden ayrımlı üç tabakadan oluşur. Bu tabakaların kalınlığı ve içindeki yapıların miktarı, bütün damarlarda aynı değildir ve genel dolaşım gereklerine ve çeşitli damarlar üzerine düşen görevlere göre değişir (22, 23).

Arter ya da venlerin anormal genişlemesine anevrizma adı verilir. Anevrizma kesesinde normal bir damar duvarında bulunan katlar bulunmaz. Işık mikroskopu ile yapılan incelemede kese içindeki intima, genelde normal damar intimasının devamı gibi görülür. Burada bazen, düz kas hücreleri ve aralarında köpük hücrelerinin de bulunduğu, subendotelyal proliferasyon alanları dikkati çeker. Boyun bölgesine uyan yerdeki kalınlaşmalar büyük anevrizmalarda küçüklerine göre daha karakteristiktir. Kese duvarında iç elastik lamina genelde yoktur veya küçük parçalara ayrılmıştır (Şekil 1). İç elastik lamina, kesenin başlama yerinde kalınlaşmış olarak görülebilir. Normal duvardaki media kas tabakası, anevrizmanın boynu hizasından itibaren ortadan kalkar. Bazı media alanlarında interstisiumda fibrozis vardır. Küçük anevrizmalarda media, kısa bir bölüm halinde de olsa duvar içinde kısmen devam edebilir. Adventisya taşıyıcı arterde olduğu gibi anevrizma duvarında da izlenir (21, 24–26).

Anevrizma duvarının kalınlığı, değişkenlik gösterebilir. Kalın duvarı olan büyük anevrizmalarda duvar, hemosiderin ve kolesterol içeren fibröz doku

katlarından oluşur. Kese duvarının incelendiği alanlarda ise, aralarında fibrohiyalin bir yapının yer aldığı endotelyum ve adventisyanın fibröz dokusu bulunur. Anevrizma duvarında vaza vazorum bulunmaz. Bu da anevrizma için tipik bir bulgudur (27).

Elektron mikroskopik incelemede, iç elastik laminanın boyundan itibaren hemen tamamen kaybolduğu ve kas tabakasının da skleroza uğradığı görülür. Endotelyum çok düzensiz olup balonlaşma, krater oluşması ve sitoplazmik köprüleşmeler gibi gerilmeye ait bulgular vardır. Fundusta iç elastik lamina parçaları dışında başka bir yapı dikkati çekmez. Anevrizma duvarındaki internal elastik lamina özelliğini tamamen yitirmiştir. Endotel tabakası normal görünümde olsa dahi, elastik laminanın desteğinden yoksun olması sebebi ile yer yer proliferasyon gösterebilir. Yine kas tabakası özelliğini yitirmiştir. Hücreler sklerotiktir ve vakuolizasyon gösterir. Ekstrasellüler alan lipid ve lipofussin granülleri içerir. Adventisya seyrek, dağınık hücrelerden oluşur (Şekil 1) (25, 27–29).



Şekil 1: Normal beyin arterlerinin damar duvarı ile anevrizma duvarının şematik görünümü.

Kanama için kritik büyüklük 5- 10 mm'dir (30). Anevrizmaların %10 kadarı uyku esnasında, %30 kadarı normal faaliyet esnasında, %50–60 kadarı da ıkmama sonucunda yırtılır (31). Kanamanın olduğu nokta duvarın en ince yeridir. Duvarda fibrin katları, nekroz ve inflamasyon görülür. Ayrıca yine burada zaman zaman gelişen mikrokanamalara ait bulgular da dikkati çekmektedir. Kесе lümeninde ise yer yer trombüs bulunur (24).

2.3.2. Etiyopatogenezi:

Anevrizmaların patogenezi üzerine pek çok çalışma yapılmış ve çeşitli görüşler ileri sürülmüştür. Anevrizmaların nereden kaynaklandığı, nasıl gelişip büyüdüğü ve hangi koşullar altında kanadığı bugün için açıklık kazanmış değildir. Oluş şekli için üzerinde birleşilen nokta ise, lezyonun gelişmesinde doğumsal bozukluklar üzerine eklenen hemodinamik ve dejeneratif faktörlerin beraberce etken olduğudur. Anevrizmalar, % 95–98 doğumsal, % 0,2–4 enfektif, % 1-2 aterosklerotik, % 0,1-0,4 travmatik kökenlidir (21).

Ailevi anevrizma öyküsü olanlarda anevrizma oranı normal nüfusun çok üzerindedir, bu durumdan sorumlu özgün genetik kusur henüz bilinmemektedir (32, 33).

Sakküler anevrizma ile birlikte en sık rastlanan tıbbi durum polikistik böbrek hastalığıdır. Bu hastalığa sahip kişilerde kafa içi anevrizma oranı %17-25'e kadar çıkmaktadır. Ayrıca Ehler-Danlos Sendromu, aort koarktasyonu, Marfan Sendromunda ve Kawasaki hastalığında da normal nüfustan daha sıktır (34, 35).

Patolojik çalışmalarda 3mm'den küçük anevrizmalarda endotel hücreleri ve fibröz doku, 4 mm'den büyük anevrizmalarda ise duvarda kollajen birikimi bulunmuştur. Anevrizma kubbesinde çok ince kısımlar olası yırtılma noktalarıdır ve yırtılma bölgelerinde yeni fibrin tabakası ve pıhtı bulunmuştur (36). Yırtılma için kritik boyuta ulaşmış anevrizmalarda fibrin ve lökositler daha yaygın bulunmuştur. Kanamış ve kanamamış anevrizmalarda endotel ve anevrizma duvarında önemli farklılıklar gösterilmiştir. Duvardaki makrofaj infiltrasyonunun anevrizmanın yapısal zayıflığında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (37).

Anevrizmalar beyin damarlarında, bedendeki herhangi bir yerden daha fazla gelişmektedir. Damarlardaki media bozukluğu ise, gerek anevrizması olan ve gerekse anevrizması olmayan hastaların hemen hepsinde aynı oranda bulunmaktadır. Ayrıca mezenter ve koroner damarları incelendiğinde, buralarda da benzeri bozuklukların olduğu, buna karşılık buralardan anevrizma gelişmesinin yok denecek kadar az olduğu dikkati çekmiştir. Mediada bir bozukluğun bulunuşu da, anevrizma oluşması için tek başına yeterli değildir. Anevrizmaların oluşmasında, elastik dokuda dejenerasyon yapan başka etkenlerin de rol oynadığı desteklenen bir görüştür (38).

Anevrizma oluşması için media ile birlikte, iç elastik laminada da bir bozukluğun bulunması gerektiği ve bunun da doğumsal olabileceği ileri sürülmektedir (39). İç elastik lamina koruyucu bir görev de üstlenmektedir. Beyin damarlarında yapısal olarak ince tunika medyanın yanında tek bir elastik kat bulunmaktadır. Bu bölgenin bozulmaya uğrayarak koruyucu niteliğini yitirmesinin, anevrizma oluşumu için önemli bir etken olduğu düşünülmektedir (14, 24).

Nicel çalışmalar, kafa içi damarlarda elastik maddelerin, diğer organlardaki damarlara göre daha az olduğunu, bunun da elastikiyeti azalttığını ortaya koymuştur. Elastikiyetin az oluşu nedeni ile damarlar, hemodinamik baskıdan daha fazla etkilenmekte ve anevrizma oluşması kolaylaşmaktadır (39).

2.3.3.Cinsiyet:

Kafa içi anevrizmalarda kadın/erkek oranı 1.4/1 bulunmuştur (24). Kadınlarda internal karotis anevrizmaları iki kat, a. meningiya mediya anevrizmaları bir buçuk kat daha sık görülürken, a. carotis interna anevrizmaları erkeklerde bir buçuk kat daha sık görülmektedir (34).

2.3.4. Yaş:

Genel olarak anevrizmalar 50-60'lı yaşlarda daha sık görülmektedir. Çocukluk çağında nadiren ortaya çıkmaktadır. Çok ileri yaş dışında, yaşın ilerlemesi ile sıklığı artmaktadır (40).

2.3.5. Anevrizmalarda klinik belirtiler:

Anevrizmalarda iki türlü klinik belirti görülür. Bunlardan birincisi subaraknoid kanama (SAK), ikincisi ise bölgesel bası sonucu gelişen fokal nörolojik bozukluklardır. Dev anevrizmalarda trombüs gelişimi ve bunların embolizasyonu sonucu geçici iskemik ataklar meydana gelebilir. Gerçekte fokal bozukluklar, kanamanın ortaya çıkmadığı hastalarda seyrek görülen belirtilerdir (41–44).

2.4. NİTRİK OKSİT (NO):

2.4.1. Tanımı ve tarihçesi:

NO, lipofilik, kimyasal olarak stabil, reseptör bağımsız, bilinen en düşük molekül ağırlıklı serbest radikal bir gazdır (45). 1980 yılında Furchgott ve Zawadzki endotelial kaynaklı gevşetici faktörü (EDRF) keşfetmişlerdir (46). Daha sonra Palmer ve ark. EDRF'nin kimyasal yapısının NO olduğunu ortaya koymuşlardır (47). 1987 yılında Hibbs ve arkadaşları NO'in arjinin aminoasidinden sentezlendiğini bulmuşlardır (48).

2.4.2. NO sentezi ve NOS:

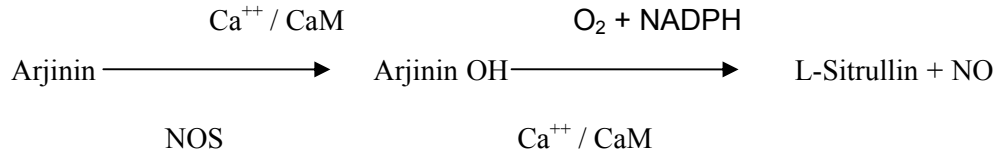
L-arjinin aminoasidinden NOS enzimi aracılığı ile sentezlenen NO, önemli bir endojen vazodilatatördür. NO sentezine aracı olan NOS enziminin, nNOS, iNOS, eNOS olmak üzere üç formu vardır (13, 45, 49).

NOS' lar, L-arjininin NO' e dönüşümünü iki basamakta katalizler:

I – Arjininden hidroksiarjinin oluşumu; bu basamakta kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), moleküler oksijen, kalsiyum, kalmodülün ve tetrahydrobiopterin kullanılır. Bu basamağı karbonmonoksit engeller.

II – Hidroksi arjininden NO ve sitrüllin oluşumu; bu basamak oksidasyon işlemidir. NADPH, moleküler oksijen, kalsiyum, kalmodilin ve tetrahydrobiopterin kullanılır. Karbonmonoksit ve arjinin analogları bu basamakta engeller yapar. Ayrıca üretilen NO, bu basamakta negatif geri besleme ile üretimi azaltarak kontrolü sağlar (şekil 2) (50).

eNOS ve nNOS devamlı aktif halde iken, iNOS devamlı aktif olarak ortamda bulunmaz. iNOS toksik ya da enfeksiyöz uyarı ile aktif hale gelir. iNOS kalsiyum bağımlı değildir. Fakat eNOS ve nNOS kalsiyum bağımlıdır. iNOS uyarı sonucunda devamlı ve yüksek oranda NO sentezleyebilir. Böylece iNOS'un sitotoksik özelliği ortaya çıkar. eNOS ve nNOS ise küçük hacimde ve aralıklı olarak NO sentezler. Bunlar NO'in işlevine uygun olarak yüksek kontrol altında çalışır (50, 51).



CaM: Calmodulin

Şekil 2: L-arjinin'den NO sentez yolu.

Astrositlerde nNOS aracılığı ile L-arjiniinden NO sentezlenir. Üretilen NO astrositlerin ayak uzantılarından diffüzyonla damar duvarına ulaşır.

Hipoksi, makrofajlarda iNOS transkripsiyonunu uyarır. Ayrıca birçok hücrede lipopolisakkarit ve sitokinler iNOS'u uyarır. eNOS için uyarıcılar protein 1, protein 2, nükleer faktör 1, akut faz reaktanları ve gerilme stresidir. nNOS enzimi için uyarıcılar protein 2, akut faz reaktanları, nükleer faktör 1, nükleer faktör kappa B ve glutamattır. Her üç tip NOS formu için enzim yıkım yolu ile kontrol mekanizması vardır. Bir diğer kontrol yolu ise L-arjinin ve kalmodülin miktarının kullanım sonucunda azalmasıdır. NOS enzimi L-arjininin tükenmesi durumunda üzerine aldığı iki elektronu NO sentezinde değil, süperoksid anyon sentezinde kullanır. NOS, hem NO hem de süperoksid anyonu birlikte sentezleyebilir (50, 52).

NO nöronlarda nörotransmitter taşıyan veziküller içinde bulunmaz. Postsinaptik reseptörleri yoktur. Nöronal etkisini diffüzyonla yer değiştirerek gösterir (53). nNOS nöron, astrosit ve mikroglia da bulunur. Serebellar fastigial nükleusta da NOS faaliyeti vardır (50). Postsinaptik alandaki N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin presinaptik alandan sinaptik aralığa salınan eksitatör aminoasit olan glutamat tarafından aktivasyonu sonucu nNOS, NO sentezler. NO

difüzyonla perivasküler sinir terminallerine ulaşır ve damar duvarında etkisini gösterir. Pterigopalatin ve sfenopalatin ganglionda nonkolinerjik ve nonadrenerjik (nitroksiderjik) sinir liflerinin olduğu düşünülür. Nitroksiderjik sinir lifleri geniş ve orta çaplı damarların adventisyasında bulunur. NOS etkinliği Willis poligonunun anterior bölümünde daha belirgindir. İn vitro endoteli çıkarılmış damarlarda pterigopalatin ve sfenopalatin ganglionların uyarılması ile vazodilatasyon geliştirilmiş, daha sonra NOS inhibitörleri kullanılarak oluşan vazodilatasyon geri çevrilmiştir (54). Bu sonuca göre her iki ganglionun etki mekanizması, NO bağımlı, endotel bağımsızdır (52). L-arjininden NO oluşumu, N- monometil-L-arjinin (L-NMMA), N-nitro-L-arjinin metilester (L-NAME), N-nitro-L-arjinin (L-NA), N-amino-L-arjinin (L-NAA), N-iminoetil-L-ornitin (L-NİO) gibi ajanlar tarafından yarışmalı olarak baskılanabilir. Bu olay L-arjinin verilerek tersine çevrilebilir (49).

2.4.3. NO'in etki mekanizması:

İnsanlarda NO bazal durumda damar endotelinden sürekli olarak salıverilir ve oluşturduğu vazodilatör etki ile damar direncinin düzenlenmesine katkıda bulunur (55). L-arjininden sentezlenen NO'in depolanma mekanizması henüz kesin olarak bilinmemektedir. NO dokularda ve oksijenlenmiş fizyolojik sıvılarda hızlı bir şekilde yıkılır. NO' in yıkım yarılanma süresi dokuya ve türe göre değişmek üzere 10–60 sn arasında bulunmuştur. Süperoksit dismutaz enziminin ortama katılması, NO'in inaktivasyonunu hızlandıran serbest oksijen radikallerini etkisizleştirir. NO yıkımı yavaşlar ve etkisi artar (56).

NO beyin arterlerinde substans P, vazopressin, ATP ve ADP gibi birçok vazodilatatörün etkilerine aracılık eder ve kısmen de endotelin, norepinefrin, 5-hidroksitriptamin gibi bazı vazokonstriktörlerin etkilerini önler (57). NO hiperkapni, asidoz, metabolizmada artış ve eksitatör aminoasitlerin varlığında vazodilatasyon yapar. Yapılan çalışmalarda hiperkapni sırasında ve düşük pH'ya bağlı oluşan vazodilatasyon NOS inhibitörleri kullanılarak engellenmiştir (13). L-arjinin/NO/cGMP yolu damar tonusunun kontrolünde çok önemli görünmekte ve son zamanlarda giderek daha fazla sayıda araştırmacı tarafından beyin kan akımı düzenlenmesinin ana belirleyicisi olarak kabul edilmektedir.

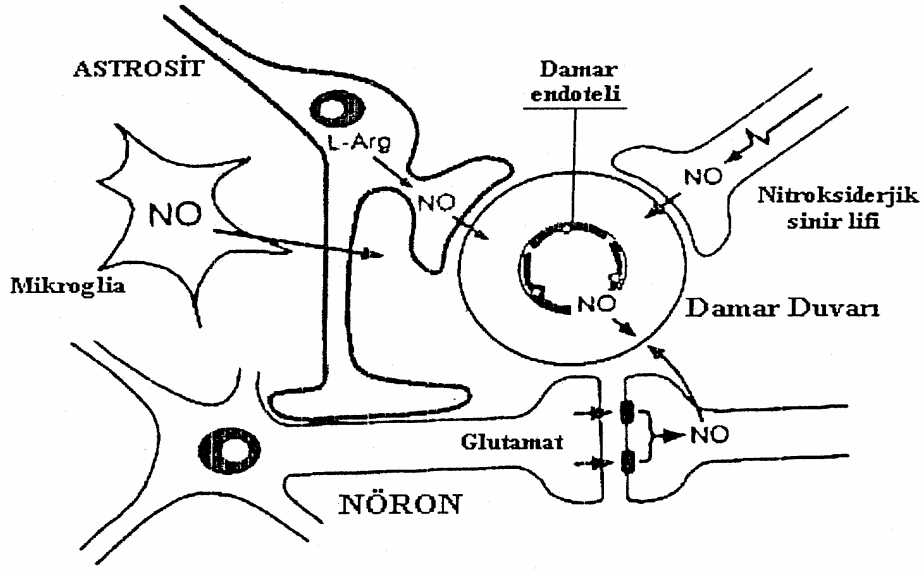
NO'nin iskemik beyin modellerindeki koruyucu etkileri; vazodilatasyon, trombosit agregasyonunun baskılanması, lökosit adezyonunun baskılanması, serbest oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek bu yapıların ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Toksik etkileri ise süperoksit anyonlarla peroksinitritleri oluşturarak sitotoksik etki, demir metabolizmasının bozulması, DNA sentezinin engellenmesi, elektron transportunun bozulmasıdır (51).

2.4.4. NO'nin damar duvarına etkisi:

Endotelial ve nonendotelial NO, endotelium kaynaklı kasıcı faktörler ile dengede olarak damar tonusunun belirlenmesinde ve dolayısı ile beyin kan damarlarının normal yapısının korunmasında etkin rol oynamaktadır. Birçok araştırmacı endoteliumu çıkararak ya da NOS enzim inhibitörlerini uygulayarak vazokonstriksiyon meydana getirmiştir (53, 50). Bu araştırmalardan NO'nin vazokonstriktör etkinin modülasyonu yolu ile damar tonusunu düzenlediği sonucu çıkmaktadır. Birçok araştırma sonunda NO'nin kuvvetli bir vazodilatatör olduğu bulunmuştur (52, 54).

Endotelium, nöronlar, astrositler ve perivasküler sinir uçlarından damar duvarı düz kas dokusuna ulaşan NO, damar duvarındaki gevşemeyi şu mekanizma ile sağlar: NO çözünebilir guanilat siklazın bir parçası olan heme içindeki demire bağlanıp, damar düz kasında siklik guanilat 3'5'-monofosfat (cGMP) üretimini uyarır. cGMP daha sonra protein kinazı uyarır. Bu ise miyozinin ince zincirini fosforile ederek damar düz kasında gevşemeye sebep olur (Şekil 3) (52).

Beyin damar tonusunun belirlenmesinde rolü olduğu düşünülen diğer vazoaaktif maddelerin birçoğunun etkisinin NO üzerinden olduğu, araştırmalar sonucu bulunmuştur. NOS inhibitörlerinin verilmesi, asetilkolin, bradikinin, substans P, nörokinin A ve B, nöropeptid K, trombin A23187, bradikinin, vasopressin, oksitosin, adenosin trifosfat, serotonin, prostasiklin ve histamin ile oluşan gevşemeyi geri çevirmiştir. Bradikinin ve prostasiklinin doğrudan gevşetici etkilerinin olduğu bilinmektedir (13).



Şekil 3: NO aracılığı ile beyin damarlarında vazodilatasyon yapan hücre ve sistemlerin şematik görüntüsü (52).

NOS inhibitörleri ile düşük pH'ya bağlı vazodilatasyonun azaltılması ekstrasellüler pH'nın, beyin arteriyol tonusundaki hiperkapniye bağlı değişimleri düzenlediğini ortaya koymaktadır (52). Vazodilatasyonu yapan NO endotelial, glial ya da nöronal kaynaklı olabilir. Beyin metabolizmasındaki artma sonucunda, beyin kan akımı artar. Bu ilişkide NO önemli bir rol oynar. Glutamat NMDA reseptörlerini uyarır. Uyarılan bu reseptörler nNOS' un, NO sentezlemesini sağlar. Sonuçta cGMP artar ve vazodilatasyon gelişir (13).

Beyin korteksinin kimyasal ya da mekanik olarak uyarılması sonucunda, nöronal depolarizasyon oluşur ve bütün kortekse yayılır. Böylece eksitator aminoasitler artar ve buna bağlı olarak metabolizma artar. Metabolizmanın artması ile vazodilatasyon gelişir. NOS inhibitörleri verilerek vazodilatasyon engellenir ancak nöronal depolarizasyon engellenemez (13).

Beyin arteriyollerinin topikal endotoksin ile muamelesi zamana bağlı vazodilatasyon oluşturur. Deneysel menenjitlerde beyin arteriyolleri genişlemiş ve beyin kan akımı artmıştır. Bu vazodilatasyon nonselektif NOS inhibitörü olan L-NAME verilerek geri döndürülmüştür. Buradaki vazodilatasyonda endotoksinle bağlı olarak iNOS enzimi etkinleşmektedir. Deksametazon iNOS' i inhibe ederek,

endotoksine bağılı vazodilatasyonu azaltırken, eNOS'a bağılı vazodilatasyonu etkilemez (13).

2.4.5. NO'in anevrizma patojenezindeki rolü:

NOS tarafından NO üretiminin, inflamasyon ve anevrizma patojenezinde önemli bir rol oynadığı düşünölmektedir (58). iNOS aracılığı ile olan NO üretimi birincil olarak inflamatuvar hücrelerde olur. İnflamasyonda NO'in aşırı üretimi ve ortaya çıkan toksik ürünler elastini parçalar ve ekstrasellöler matriksi bozar (59). Aksine eNOS'un düzenli sentezlediğı NO'in damar sisteminde gevşetici etkisiyle birlikte koruyucu etki yaptığı bilinmektedir (60, 61).

iNOS aracılığıyla NO üretimini seçici olarak baskılayan aminoguanid'in anevrizma büyümesini yavaşlattığı gösterilmiştir (58, 12). Ayrıca kontrol aort dokusuyla karşılaştırıldığında, insan abdominal aort anevrizmasında eNOS alel polimorfizmi açısından belirgin farklar gösterilmiştir (9). Kawasaki hastalığı; çocukluk çağında görölen, koroner arter anevrizmalarıyla seyreden damarsal inflamatuvar bir hastalıktır. Bu hastalık, artmış NO düzeyi ile uyumlu yüksek düzeyde idrar nitrit/nitrat ve iNOS kofaktörleriyle birliktelik gösterir. Kawasaki hastalığında NO metabolitlerinin artan değeri, hastalığın şiddeti, seyri ve abdominal aorta içindeki retrograt holodiastolik akım ile ilişki gösterir (62, 63). Bu çalışmalar, NO'e anevrizma oluşumunda yeni klinik roller yüklemiştir.

Yine bu konu ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, beyinde anevrizma gelişmesinde, aminoguanid kullanılarak yapılan NO baskılanması ile anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir (64). Bu bulgular NO'in anevrizma gelişimindeki rolünün altını çizmektedir, ancak bu ilişki açık değildir.

2.4.6. eNOS geni ve polimorfik özellikleri:

eNOS geni, kromozom 7q35-36'da haritalanmıştır. 21 kb uzunluğunda ve 26 ekson içermektedir (49, 65, 66). Bu gende meydana gelecek bir polimorfizm NOS'da, üretim aşamasında bir bozukluğa yol açar ve devamında bir hastalık süreci gelişir. NO damar sisteminde vazomotor işlev ve yapısal bütünlüğün

korunmasında anahtar bir moleküldür (66). Normal kan damarlarında bulunan ve esas olarak NOS'ın endotelial izoformu tarafından sentezlenen bu molekül, diğer moleküler sistemlerle önemli ilişkiler gösterir (20).

eNOS geninin, yakın bir zamanda işlevsel olarak polimorfik olduğu gösterilmiştir (Şekil 4) (6). Bir başka deyişle, bu gen artmış kalp damar hastalığına yatkınlığı artırabilecek genetik değişikliklere maruz kalmıştır (7, 63, 67). Bu gen için çeşitli polimorfizmler tanımlanmış ve bu polimorfizmlerin NOS sentezinde ve salınımında düzensizliğe, bunun sonucunda da kusurlu vazodilatasyona neden olarak damar duvarının zayıflaması ile anevrizma gelişimine zemin hazırladığı ileri sürülmüştür (68–70).

2.4.6.1. İnsan eNOS genindeki polimorfizmler:

1990'ların ortalarında bu genin özellikleri bulunduğundan beri bu genin pek çok özgün allelik polimorfizmleri tanımlanmıştır ve kardiyovasküler hastalıklarla muhtemel bağlantıları araştırılmıştır. Bu araştırmalar Tablo I'de gösterilmiştir. Kabaca üç çeşit polimorfizm tanımlanmıştır; intron bölgesindekiler, ekson bölgesindekiler ve promotor bölgesindekiler. Bugün eNOS polimorfizmlerini ve hastalıklarla muhtemel ilişkilerini tanımlayan kırktan fazla yayın vardır. Bu araştırmalar tipik olarak 'aday gen' yaklaşımı ile yapılmıştır. Şöyle ki; hasta genotipleri, hastalıkların insidansı ile ve yapılan testlerin istatistiksel olarak anlamlı sonuçları ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmalarda ana ilke; eNOS enzimidaki değişikliklerin (seviyesi, etkinliği, yerleşimi gibi), hastalığa olan yatkınlıktaki değişikliklerle ilişkilendirilebileceğidir. eNOS enzimidaki özgün polimorfizmler, eNOS enzim özelliklerini doğrudan etkiler ya da eNOS gen yapısında doğrudan etkiler yapabilecek başka keşfedilmemiş polimorfizmlerle dolaylı olarak ilişkilendirilir (6).

2.4.6.2. eNOS geninde intron bölgesindeki polimorfizmler:

eNOS geninde tanımlanmış polimorfizmlerin büyük çoğunluğu intronlar içindedir. İki tane tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır; intron 18'de "Ala 27 Cys" ve intron 23 "Gly 10 Tyr". Her ikisi de açıkça esansiyel hipertansiyonla ilişkilendirilmiştir (Tablo I) (6).

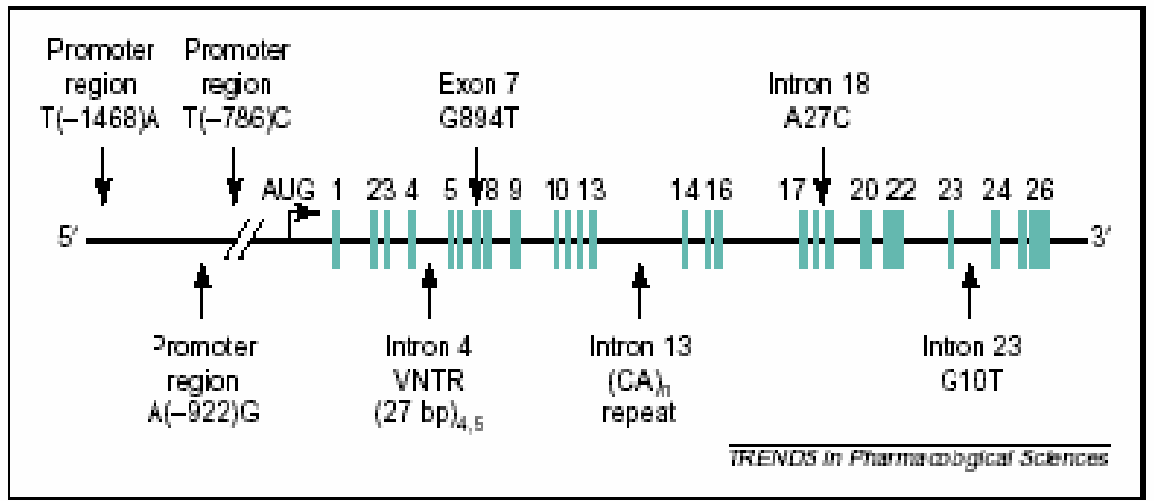
Ayrıca eNOS geninin intron 13 ve intron 4 bölgelerinde VNTR incelemesi sonucu iki ayrı polimorfizm bulunmuştur. Bazı çalışmalarda bunların damarsal hastalıklarla ilişkileri araştırılmıştır. Örneğin; intron 13'te 37 kopyadan fazla sitozin- adenozin tekrarına sahip beyaz ırkta koroner arter hastalığının riski yüksek tespit edilmiştir (71). İkinci bir VNTR polimorfizmi; intron 4'de, 5 (major alel) veya 4 (minör alel) kopyalı bir 27 baz çifti (bç) tekrarı olması ile tanımlanmıştır. Tablo 1'de görüldüğü gibi bu VNTR'ın kalp damar hastalıklarıyla ilişkisi belirsizdir. Tusukado ve arkadaşları sağlıklı bireylerde eNOS geni intron 4 polimorfizmi ile plazma NO düzeyi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmada minör alelli homozigot deneklerin plazma NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ayrıca, polimorfik alellerin sayısı ile plazma nitrat düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tesbit edilmiştir (72). Bu çalışma, NOS genindeki polimorfizmle NOS enzim faaliyetinin, istatistiksel olarak anlamlı işlevsel ilişkisini gösteren tek çalışmadır.

2.4.6.3. Promotor bölgesindeki polimorfizmler:

İkinci bir tip alellik polimorfizm de promotor bölgede keşfedilmiştir. Bu polimorfizm tipinin, transkripsiyonu ve dolayısı ile enzim seviyelerini doğrudan etkileyebilme potansiyeli vardır. Nakayama ve arkadaşları eNOS geninin 5' bölgesinde, bağlantılı üç tane mutasyon olduğunu kanıtlamışlardır. Bunlar; "Thr 786 Cys", "Ala 922 Gly" ve "Thr 1468 Ala" polimorfizmleridir. Bu polimorfizmlerin insidansı, koroner vazospazmlı Japonlar'da, kontrol deneklere oranla daha yüksek bulunmuş ve eNOS polimorfizmine sahip olmanın koroner vazospazm için bağımsız bir risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür (10).

2.4.6.4. Ekson 7 tek nükleotid polimorfizmi:

Üçüncü tip alellik polimorfizm de eNOS için ekson 7’de tanımlanmıştır. Bu polimorfizm proteinin primer yapısını değiştirir ve doğrudan enzimin bir veya daha fazla işlevsel özelliğini değiştirebilir. Bu tek nükleotid polimorfizmi pozisyon 894’te guanin’den timin’e, amino asidde ise pozisyon 298’de glutamik asidin aspartik aside değişimiyle uyumludur. Geniş çaplı yeni bir çalışmada, bu varyantın diğer eNOS polimorfizmlerine göre kalp damar hastalığı riskiyle daha fazla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (10).



Şekil 4. eNOS geni ve çalışılan polimorfizm bölgeleri (6).

2.5. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ (PCR):

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR), dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan bir DNA parçasını çoğaltmak için kullanılır. İki oligonükleotid, bir DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primerleri olarak kullanılır. Kalıp DNA önce iki oligonükleotidin ve dört deoksiribonükleotid trifosfatın (dNTP) varlığında ısıtılarak denatüre edilir. Tepkime karışımı, daha sonra kalıp dizilerine oligonükleotid primerlerinin yapışmasına olanak veren bir sıcaklığa dönüştürülür. Yapışmış primerler uygun bir sıcaklığa çıkartılarak DNA polimeraz ile uzatılır. Çöktürme, yapışma ve DNA sentezi döngüsü sonradan birçok kez tekrarlanır. İşlemin bir döngüsünün ürünleri

sonraki döngü için kalıp işlevi gördüğünden her bir başarılı döngü, temel olarak istenilen DNA ürününün miktarını ikiye katlar (73).

2.5.1. PCR uygulama alanları:

PCR uygulaması genetik bozuklukların tanısında, klinik örneklerdeki patojenik organizmaların nükleik asit dizilerinin belirlenmesinde, adli tıp örneklerinin genetik tanımlanmasında ve etkinleşmiş onkogenlerin mutasyonlarının analizinde yoğun uygulama alanı bulmuştur. Ek olarak, PCR aşağıda sıralananları da kapsayan moleküler kopyalama ve DNA analizindeki çeşitli uygulamalar için kullanılmaya başlanmıştır (74).

- Klonlanmış çift zincir DNA'nın özgül dizilerinin oluşturulması
- DNA'nın belirli parçaları için özgül dizilerin oluşturulması
- Dizi analizi için büyük miktar DNA'ların oluşturulması
- Mutasyon analizleri

2.5.2. PCR'in bileşenleri:

PCR'in kesin koşulları ve döngünün her bir basamağının zamanı, çoğaltılacak bölgenin uzunluğu ve primerlerin dizisi tarafından belirlenir. Bu nedenle en uygun koşullar aşağıda sıralanmış PCR bileşenlerinde yapılacak düzenlemeler ile sağlanır (74).

- Enzim (Taq DNA polimeraz)
- Deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP)
- Magnezyum derişimi
- PCR tampon içeriği
- Oligonükleotidler (primer)
- Hedef diziler
- Isılar ve döngü sayısı

2.5.2.1. Enzim:

DNA polimeraz enzimleri, kalıp zincire komplementer bir DNA zinciri meydana getirmek üzere, orijinal kalıp zincirdeki baz bilgisini kullanarak, dNTP'lerden uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. PCR'in en

elverişli olduğu koşullarda 0,5–5 ünite/100 µl arasında değişen enzim derişimlerinin denenmesi ve jel elektroforezi yardımıyla sonuçların değerlendirilmesi önerilmektedir. Enzim derişimi çok yüksek ise, özgül olmayan arka plan ürünler görülebilmektedir. Ayrıca, enzim derişimi çok düşük olduğunda da, istenilen ürünün miktarında azalma görülmektedir (74).

2.5.2.2. Deoksiribonükleotid trifosfatlar:

Deoksiribonükleotid trifosfatların (dNTP = dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 20- 200 µM arasındaki derişimi verim, özgülük ve doğruluk arasındaki en iyi denge ile sonuçlanmaktadır (74).

2.5.2.3. PCR tampon içeriği:

PCR için en çok önerilen tampon, 10 mM Tris-HCl ve 50 mM KCl içeren tampondur. KCl'nin 50 mM'a kadar olan derişimi primer yapışmasını kolaylaştırdığı için tepkime karışımına eklenebilmektedir (74).

2.5.2.4. Hedef diziler:

DNA polimerazın, polimerizasyon reaksiyonunu gerçekleştirebilmesi için ihtiyaç duyduğu yapılardan biri de kalıp DNA'dır. DNA polimeraz, kalıp DNA'ya bağlanarak hedef dizilerin iki ucunda yer alan bölgede polimerizasyon tepkimesini gerçekleştirir (74).

2.6. ELEKTROFOREZ:

Sulu bir çözeltili içinde çözünmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik akımının etkisi ile göç etmesi sürecine elektroforez (elektrikle göç) denir. Bu olay belirli bir yük dağılımı olan tampon içerisinde gerçekleştiğinden ve elektrik akımı kullanıldığından kısaca elektroforez adı verilmiştir (74).

2.7. GENETİK POLİMORFİZM:

İnsan genomunun bütün bölgeleri boyunca DNA yapısında zararsız kalıtsal polimorfizmler vardır. Yani bir bireyin genomu her 100–200 nükleotidde 1-2 baz değişimi içermekte fakat bu durum kişilerde önemli bir hastalığa yol açmamaktadır. Bireyler arasındaki nükleotid baz dizilerindeki bu değişiklik "polimorfizm" olarak adlandırılır. İnsan genomunda yer alan DNA polimorfizm örnekleri genel olarak 3 teknikle değerlendirilebilir (74):

1. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi incelemesi (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)
2. Basit dizi tekrarları incelemesi (Simple Sequence Repeats: SSR)
3. Değişken sayıda ardışık dizi tekrarları incelemesi (Variable Number of Tandem Repeats: VNTR)

2.7.1. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)

DNA sarmalı özgül restriksiyon enzimi (RE) ile kesildiği zaman farklı uzunlukta parçalar oluşur ve jel elektroforezinde gözlenir. Bu parçalar RFLP olarak adlandırılır. RFLP'ler birçok hastalıkta kalıtsal belirteç olarak kullanılır. Eğer belirlenemeyen bir proteine ilişkin bir genin kalıtımı incelenmek isteniyor ve bu gene bağlı olan RFLP'ler bulunuyorsa, ailede bu genin kalıtımını belirlemek için bu belirteçlerden yararlanır (74).

2.7.2. Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeats: SSR)

SSR belirleyicileri VNTR' lere benzer, çünkü değişken sayıda nükleotidler birbiri ardına tekrarlanmıştır. DNA molekülünde yer alan bu basit dizi tekrarları çok küçük diziler olduğundan yalnızca PCR analizi ile tanımlanabilir (74).

2.7.3. Değişken Sayıda Ardışık Dizi Polimorfizmleri (Variable Number of Tandem Repeats: VNTR)

VNTR lokuslarının en önemli özellikleri ardışık tekrar sayılarının ve tekrar birimlerindeki nükleotid dizilerinin değişim göstermesidir. Bu nedenle büyük

oranda alelik polimorfizm gösterirler. Bu polimorfizmlerin eşit olmayan çapraz geçişler veya replikasyon kayması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. VNTR lokuslarının analizleri ile ardışık tekrar kopyalarının sayısının çok değişken olduğu, birden yüzlerce keze kadar değişebileceği saptanmıştır. Bir lokusta çok sayıda farklı değişken dizilerin varlığı sonucu toplumda çok sayıda alel (hiperalelizm) oluşur ve çok sayıda birey heterozigot olur. VNTR lokuslarında heterozigotluk %100'lere kadar varmaktadır. VNTR lokusları yüksek polimorfik özellikleri nedeniyle önemli genetik belirleyiciler olarak kabul edilirler. Bu nedenle çeşitli alanlarda yaygın olarak uygulanmaktadırlar (74).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTA VE KONTROL GRUPLARI:

3.1.1. Hasta Grubu:

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalında subaraknoid kanama tanısı ile yatan ve beyin anjiyografisi ile kafa içinde anevrizma gösterilmiş 54 birey çalışmaya alınmıştır. Hastaların ortalama yaşı 45.67 ± 13.25 (38–72) olup, cinsiyet dağılımı 37 kadın (%68.51), 17 erkektir (%31.48).

3.1.2. Kontrol Grubu:

Bir beyin damar hastalığı olmayan, yaş ve cinsiyet yönünden hasta grubuna benzer sağlıklı 53 bireyden oluşmuştur. Kontrol grubu deneklerin ortalama yaşı 52.90 ± 13.65 (20–75) olup, cinsiyet dağılımı 38 kadın (%71.59), 15 erkektir (%28.30).

Çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay No: 2004-6/1)

3.2. DNA YALITILMASI:

Hasta ve kontrol bireylerinden alınan 5 ml kan, 1 ml EDTA (Sigma E- 5134, ABD) (%2) içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine konulmuştur. Daha sonra yalıtım aşamasına kadar -20°C 'de saklanmıştır.

DNA yalıtımı, DNA İzolasyon Kiti (Nukleo Spin Blood, Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Yöntemin esası, lökositlerde bulunan DNA dışındaki tüm yapıların bozularak parçalanması, kalan genomik DNA'nın, kit kullanılarak ayrıştırılmasıdır.

İşlemin yapılışı:

- 200 μL kan, 25 μL Proteinase K (Macherey-Nagel, Almanya) (6mg Proteinase K ve 260 μL BW Buffer) ve 200 μL B3 tamponu vorteks

(VELP) ile 10- 20 saniye karıştırıldıktan sonra 70°C'de 15 dakika bekletildi.

- Her örneğe 210 μL etanol katılarak vorteks cihazında 10 saniye karıştırıldı.
- Ürünler, Nucleo Spin Blood Column (NSBC)'a yüklenerek 11000 devir/dakikada 2 dakika santrifüj (Nüve NF 800, ABD) edilerek lizatın tam süzülmesi sağlandı.
- NSBC'a 500 μL BW katılarak 11000 devir/dakikada 1 dakika santrifüj edildi.
- NSBC'a 600 μL B5 eklenerek 11000 devir/dakikada 1 dakika santrifüj edildi.
- Kurutma: NSBC'yi yeni tüpe alarak 11000 devir/dakikada 1 dakika santrifüj ile kurutma işlemi yapıldı.
- 1,5 ml'lik Epanorf tüpe NSBC yerleştirildi. Üzerine önceden ısıtılmış BE tamponu 100 μL katılarak 1 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 11000 devir/dakikada 1 dakika santrifüj edildi.
- Bu işlemler sonunda elde edilen DNA çözeltileri 1 gün +4 °C'de saklandıktan sonra etiketlenerek -20°C'de saklandı.

3.3. MOLEKÜLER ANALİZ:

3.3.1. PCR Uygulaması:

PCR tek bir molekül DNA'yı bile çoğaltabileceğinden, tepkime karışımlarının DNA molekülleri ile bulaşmasının engellenmesi gerekmektedir. Bu bulaşma, daha önceki PCR tepkimesi, ekzojen DNA ya da diğer hücrel materyallere bağlı olabilir. Bu nedenle, kullanılan sarf malzemeleri ve eriyiklerin steril olmasına dikkat edildi. Ayrıca PCR tepkimesinde, ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNAaz ve RNAaz enzimlerinden arındırılmış steril 0.5 ml'lik PCR tüpleri, reaksiyonun gerçekleştirilmesi için Thermal Cycler cihazı (Techne Progene, Cambridge, UK) ve 0.5–10 μL 'lik ve 10–100 μL 'lik otomatik pipetler (Gilson, Fransa) kullanıldı. PCR işlemi için 2X PCR Master Mix Kiti (Fermantas, Kanada) kullanıldı.

eNOS geni ile ilgili olarak iki polimorfizmden birincisi olan intron 4'deki VNTR polimorfizmi için aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

Her örnek için hazırlanan karışımın içeriği şu şekildedir:

Damıtık Su	3,5 μL
PCR Master Mix (Fermentas, Kanada)	12,5 μL
Primer (Forward) (IONTEK, Türkiye) (5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTT-3')	1 μL
Primer (Reverse) (IONTEK, Türkiye) (5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3')	1 μL
DNA	2 μL

Thermal Cycler cihazında PCR koşulları aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

94°C	2 Dakika	1 döngü	(ilk denatürasyon)
94°C	30 Saniye	1 döngü	(ikinci denatürasyon)
50°C	30 Saniye	35 döngü	(bağlanma)
72°C	40 Saniye	1 döngü	(ilk sentez)
72°C	5 Dakika	1 döngü	(son sentez)

İşlem bittikten sonra, örnekler +4°C'de bir gün süre ile bekletilmiştir.

eNOS genine ait ekson 7 gen bölgesinin amplifikasyonu için de aynı cihaz ve aletler kullanıldı. Her örnek için içerikler aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Damıtık Su	3,5 μL
PCR Master Mix (Fermentas, Kanada))	12,5 μL
Primer (Forward) (IONTEC, Türkiye) (5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3')	1 μL
Primer (Reverse) (IONTEC, Türkiye) (5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3')	1 μL
DNA	2 μL

Thermal Cycler cihazında PCR koşulları aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

94°C	2 Dakika	1 döngü	(ilk denatürasyon)
94°C	30 Saniye	1 döngü	(ikinci denatürasyon)
55°C	30 Saniye	35 döngü	(bağlanma)
72°C	40 Saniye	1 döngü	(ilk sentez)
72°C	5 Dakika	1 döngü	(son sentez)

İşlem bittikten sonra, örnekler elektroforezde yürütölmek üzere +4°C’de saklanmıştır.

3.3.2. Elektroforez İşlemi:

PCR’da çoğaltılan gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak için agaroz jel elektroforez tekniğı kullanıldı. Hazırlanan jelde yürütölen DNA’ların uzunlukları, büyüklükleri belli [50–100 baz çifti (bç)] DNA parçaları içeren belirteç ile kıyaslanarak saptandı.

Daha önceden PCR işlemi yapılmış olan örneklerden 5 μL alınıp 2 μL Loading Dye (Fermentas, Kanada) katıldıktan sonra, PCR ürünleri ile Loading Dye’in birbirlerine karışmaları sağlandı. Daha sonra hazırlanan PCR ürünü ve Loading Dye karışımı bir otomatik pipet yardımıyla elektroforez tankına (Midicell EC–350, Almanya) yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla bırakıldı. Kullanılan jel 20 adet örnek ve bir adet belirteç (Fermentas, Kanada) alabilecek sayıda kuyucuğa sahiptir. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağından (EC 135–90) 80 Volt potansiyel gerilimi oluşturacak şekilde elektrik akımı geçmesi sağlanarak örnekler 45 dakika yürütöldü.

3.3.3. Genotiplendirme:

Tüm değerlendirmelerde 100 ve 50 bç’lik belirteç kullanıldı. Gözlenen bantların moleküler uzunlukları, belirteç ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi (± 10 bç). Örnekler, jel görüntöleme sistemine (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa) konulup 260 nm dalga boyunda UV ışık altında değerlendirildi.

3.3.4. Restriksiyon Enziminin Uygulanması:

Elde edilen PCR ürünleri (hasta ve kontrol grubuna ait) restriksiyon enzimi Ban-II'ye (Eco241, Fermentas, Kanada) maruz bırakıldı.

Kullanılan restriksiyon enziminin özgül tanıma bölgesi şu şekildedir:

Ban II: 5'...C↓G G C C G...3'

Her örnek içerikleri aşağıdaki şekilde hazırlandı:

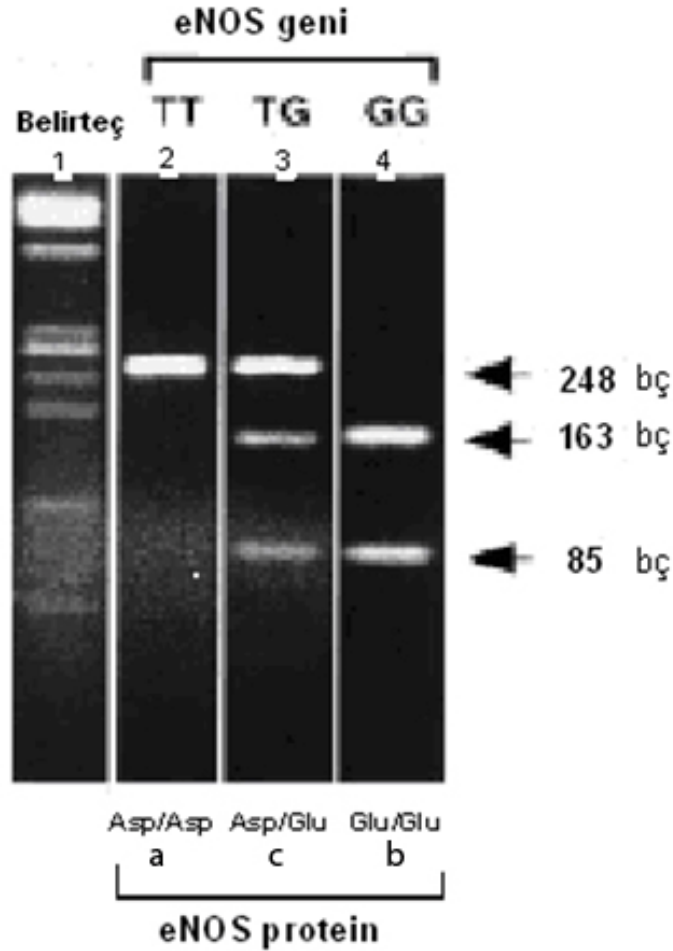
Damıtık su	3,5µL
Re buffer	2µL
Restriksiyon enzimi	1µL
PCR ürünü	5µL

Bu karışımlar 37° C'de 12 saat inkübe edildikten sonra kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde 80 Voltta 50 dakika yürütüldü. Jel görüntülerinin değerlendirilmesinde 100 ve 50 bç belirteç kullanıldı. Gözlenen bantların moleküler uzunlukları, belirteç ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi (±10 bç). Örnekler, jel görüntüleme sistemine konulup 260 nm dalga boyunda UV ışık altında değerlendirildi.

3.3.5. eNOS Geninde ekson 7'deki Glu298Asp RFLP Polimorfizminin Analizi:

eNOS geninin ekson 7'deki RFLP polimorfizmi için yapılan işlemler sonunda görüntüleme sisteminde belirteç ile kıyaslama yapıldığında örneklerin BanII restriksiyon enzimi için tanıma bölgesi içermeyenlerin 248 bç, bir tanıma bölgesi içerenlerin 163 + 85 bç ve tanıma bölgesi içeren ve içermeyen PCR ürünü bulunduranların 248 +163 +85 bç parçaları şeklinde ayrılmaktadır. Bunlar sırasıyla a, b ve c alelleridir. Örneklerle ait 248 bç hizasında tek bir bant olduğunda a genotipi [homozigot Asp/Asp (TT)], 163 bç ve 85 bç hizasında iki bant varsa b genotipi [homozigot Glu/Glu (GG)] ve 248, 163 ve 85 bç hizasında üç bant varsa c genotipi [heterozigot Asp/Glu (TG)] olarak genotiplendirme yapılmaktadır (Şekil 5) (75) .

Bizim çalışmamızda, yapılan çalışmalardan farklı olarak, 248, 80 ve 83 bç hizasında bant içeren üç örnek, daha önce tanımlanmamış tanıma bölgesi içeren örnekler olarak değerlendirildi. Bunlara d genotipi adı verildi.



Şekil 5: eNOS ekson 7 RFLP polimorfizmi (75).

3.3.6. eNOS Geni intron 4'deki VNTR Polimorfizminin Analizi:

eNOS geni intron 4'deki VNTR polimorfizmi için yapılan işlemler sonunda görüntüleme sisteminde belirteç ile kıyaslama yapıldığında örneklerin 420 bç veya 393 bç oldukları gözlenmektedir. Örneklerle ait 420 bç hizasında tek bir bant olduğunda homozigot 4b/b (b genotipi), 393 bç hizasında tek bir bant varsa homozigot 4a/a (a genotipi), her iki bant da varsa heterozigot 4a/b (c genotipi)

olarak genotiplendirme yapılmaktadır (Şekil 6) (72). 4 rakamı, 4. intron olduğunu belirtmektedir.



Şekil 6: eNOS intron 4 VNTR polimorfizmi (72).

3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME:

Çalışmamızın verileri SPSS (Versiyon 10.0) programına yüklendi. Verilerin değerlendirilmesinde, Khi- kare testi ve iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulanmıştır. İstatiksel olarak $p < 0.05$ sonucu anlamlı kabul edildi. Alel dağılımlarının değerlendirilmesi için odds oranına bakıldı.

4. BULGULAR

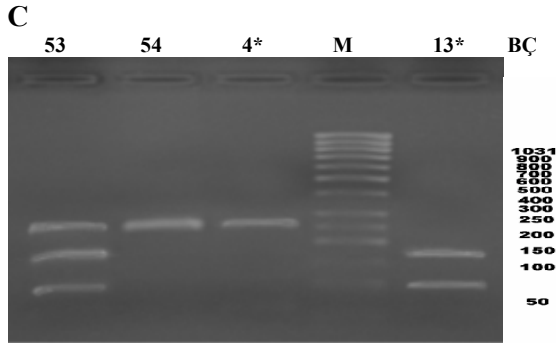
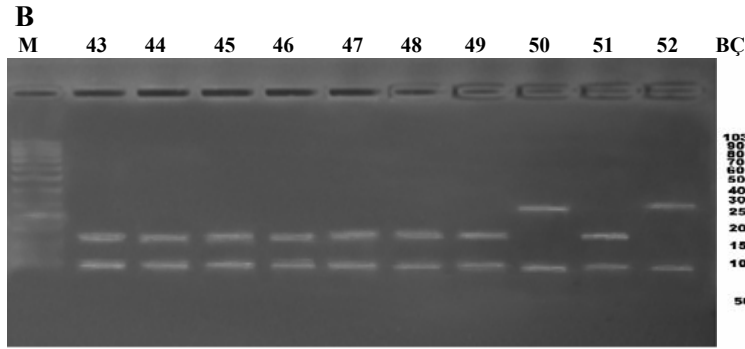
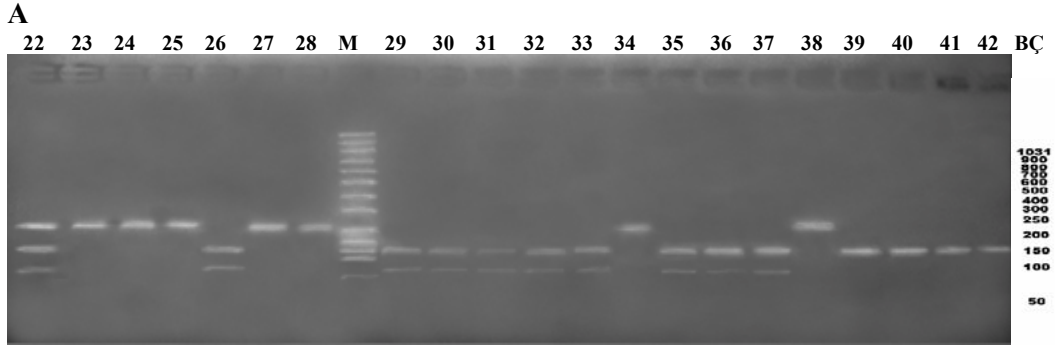
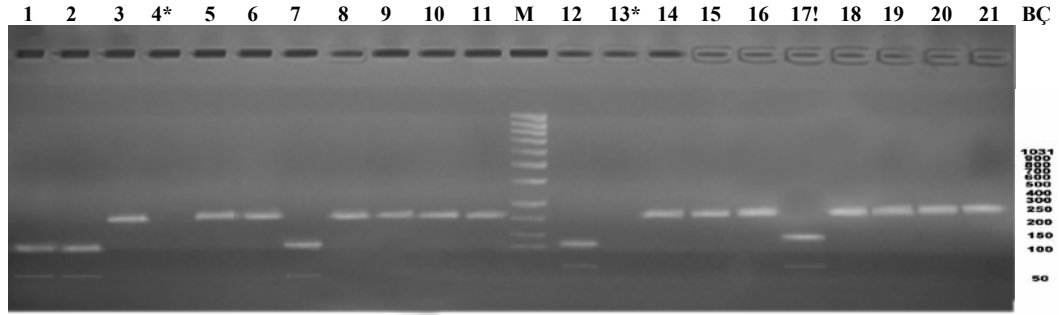
Hasta grubumuzda 54 hastanın ortalama yaşı 45.67 ± 13.25 (38–72), kontrol grubundaki 53 bireyin ise ortalama yaşı 52.90 ± 13.65 (20–75)'dir. Yaş yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel yönden önemsiz bulunmuştur ($t=0.72$; $p>0.05$).

Hasta grubundaki bireylerin 37 (%68.51)'si kadın, 17'si (%31.48) erkektir; kontrol grubundaki bireylerin 38'si (%71.59) kadın, 15'i (%28.30) erkektir. Cinsiyet yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($\chi^2=1.38$, $p>0.05$).

Her iki grupta da birer vaka bir gen tipi olarak değerlendirilememiş ve değerlendirme dışı bırakılmıştır.

4.1. eNOS Geni ekson 7 RFLP Polimorfizminin Alel ve Genotipleri:

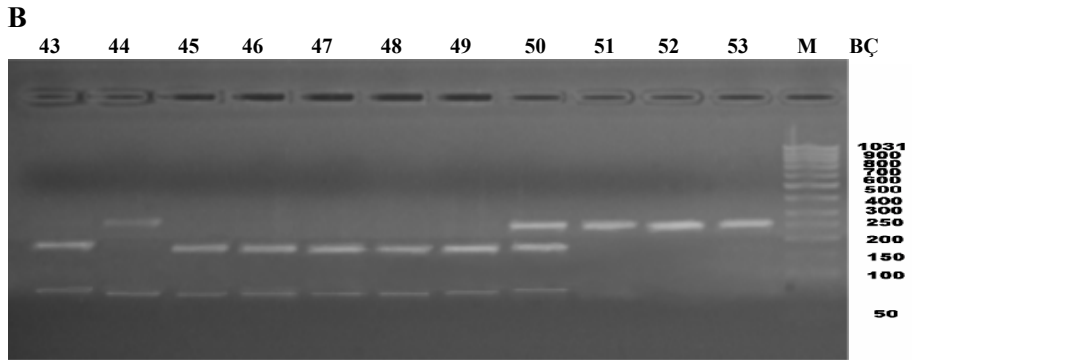
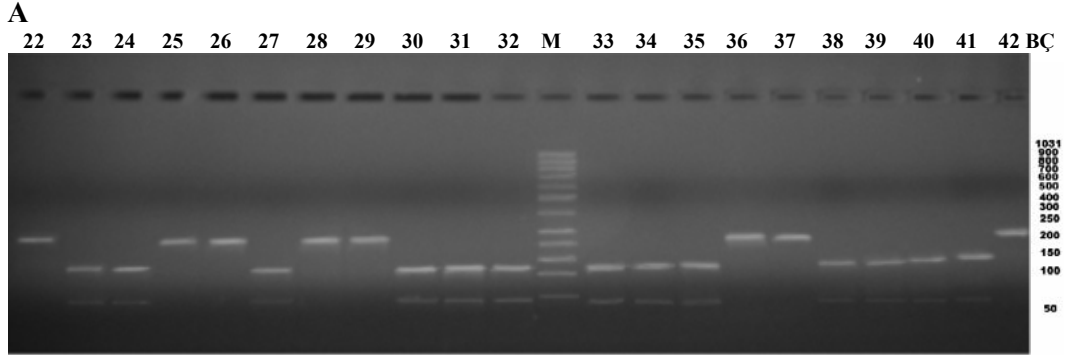
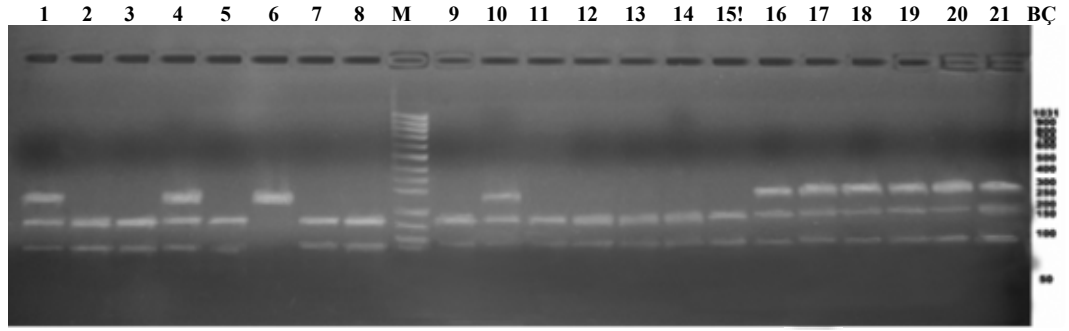
Hasta grubunun eNOS geni ekson 7 RFLP jel görüntüleri Şekil 7'de, kontrol grubunun eNOS ekson 7 RFLP jel görüntüleri Şekil 8'de verilmiştir. Hasta grubunda 53 kafa içi anevrizmalı bireyin eNOS ekson 7'deki RFLP polimorfizmi açısından 23 adet a genotipi (%43,4), 26 adet b genotipi (%49,1) ve 2 adet c genotipi (%3,8) saptandı. Elli iki bireyden oluşan kontrol grubunda ise 12 adet a genotipi (%23,1), 29 adet b genotipi (%55,8) ve 10 adet c genotipi (%19,2) tespit edildi. Hasta grubunda iki, kontrol grubunda bir adet olmak üzere toplam 3 adet, daha önce tanımlanmamış farklı kesim bölgeleri içeren RFLP jel görüntüleri elde edildi, bunlara d genotipi adı verildi (Tablo II).



D

Şekil 7: A. 1- 21, B. 22- 42, C 43- 52, D. 53, 54 numaralı numaralı hastaların ve 4 ile 13 numaralı hastaların tekrar edilen eNOS ekson7, %2'lik agaroz jel, BanII RFLP görüntüleri. **a genotipi** (homozigot Asp/Asp): 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 28, 34, 38, 54 numaralı sütunlar. **b genotipi** (homozigot Glu/Glu): 1, 2, 7, 12, 13, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51 numaralı sütunlar. **c genotipi** (heterozigot Asp/Glu): 22, 53 numaralı sütunlar. **d genotipi** (üç farklı tanıma bölgesi içeren sütunlar): 50 ve 52 numaralı sütunlar.

*4 ve 13 nolu hastaların yapılan ilk RFLP analizi sonuç vermemiş ve tekrar edilmiştir. 4 nolu hasta a genotipi (homozigot Asp/Asp) ve 13 nolu hasta b genotipi (homozigot Glu/Glu) olarak tespit edilmiştir. 17! numaralı hastaya ait RFLP analizi başarısız olmuş ve çalışma dışı bırakılmıştır.



Şekil 8: 1- 21, **B.** 22- 42, **C** 43- 53 numaralı kontrol grubundaki deneklerin eNOS ekson7, %2'lik agaroz jel, BanII RFLP görüntüleri. **a genotipi** (homozigot Asp/Asp): 6, 22, 25, 26, 28, 29, 36, 37, 42, 51, 52, 53 numaralı sütunlar. **b genotipi** (homozigot Glu/Glu): 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 23, 24, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 48, 49 numaralı sütunlar. **c genotipi** (heterozigot Asp/Glu): 1, 4, 10, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 50 numaralı sütunlar. **d genotipi** (üç farklı tanıma bölgesi içeren sütunlar): 44 numaralı sütunlar.

15! numaralı RFLP analizi başarısız olmuş ve çalışma dışı bırakılmıştır

Tablo II: eNOS geni ekson 7 polimorfizminin genotip frekansları.

Genotipler	a	b	c	d	Toplam
Hasta	23 (%43,4)	26 (%49,1)	2 (%3,8)	2 (%3,8)	53 (%100,0)
Kontrol	12 (%23,1)	29 (%55,8)	10 (%19,2)	1 (%1,9)	52 (%100,0)
Toplam	35 (%33,3)	55 (%52,4)	13 (%11,4)	3 (%2,9)	105 (%100,0)

Grupların genotip dağılımları Tablo II’de gösterilmiştir. Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında, a ve c genotipleri yönünden fark anlamlı ($p<0.05$), b ve d genotipi yönünden fark anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). Hasta ve kontrol grubunda en fazla b genotipi tesbit edilmiştir (hasta grubunda %49,1, kontrol grubunda %55,8). a genotipi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda anlamlı şekilde yüksek (%43.4), c genotipi ise hasta grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol grubunda anlamlı yüksek bulunmuştur (%19.2) ($p<0.05$).

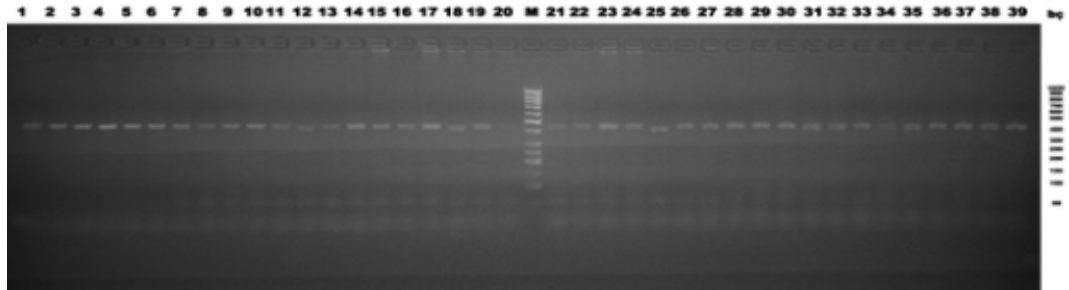
Tablo III: eNOS geni ekson 7 allel frekansları.

Alleler	G	T	Toplam
Hasta	54 (%53)	48 (%47)	102 (%100,0)
Kontrol	67 (%66)	35 (%34)	102 (%100,0)
Toplam	121(%59)	83 (%41)	204 (%100,0)

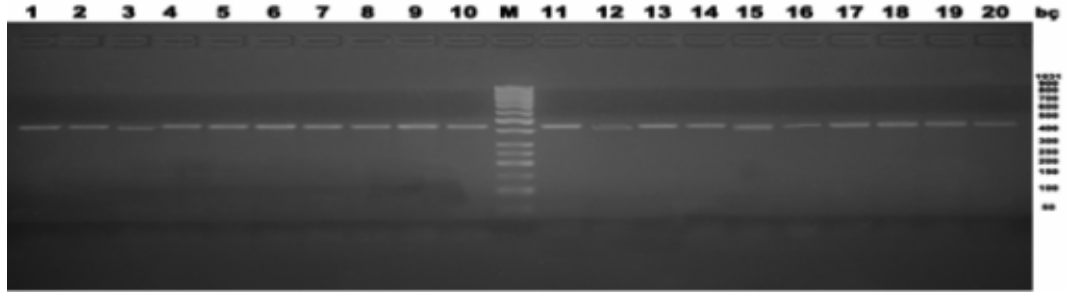
Gruplardaki alel dağılımı Tablo III’de gösterilmiştir. Gruplar alel dağılımı açısından karşılaştırıldıklarında G ve T alelleri yönünden fark anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). G ve T alelleri için odds oranı yine önemsiz bulunmuştur (odds=0.59, %95 CI (0.336–1.053)).

4.2. eNOS geninin intron 4 VNTR polimorfizminin alel ve genotipleri:

eNOS geninin VNTR polimorfizmi için görüntüleme sisteminde belirteç ile kıyaslama yapıldığında tüm örneklerin 420 bç hizasında olduğu görüldü ve tüm örnekler b genotipi (homozigot b/b) olarak genotiplendirme yapıldı ve kaydedildi (Şekil 9 ve Şekil 10).



Şekil 9: Hasta grubuna ait 39 deneğin, eNOS intron 4, %2’lik agaroz jel, VNTR polimorfizmi analizi görüntüleri: Tümü b genotipi.



Şekil 10: Kontrol grubuna ait 20 deneğin, eNOS intron 4, %2'lik agaroz jel, VNTR polimorfizmi analizi görüntüleri. Tümü b genotipi.

Hasta ve kontrol gruplarında yapılan VNTR polimorfizmi çalışmasında tüm denekler b genotipi olarak bulunmuş. Hasta ve kontrol grupları arasında bir fark bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA

eNOS enzimi tarafından sentezlenen NO'nun salınımindaki düzensizliğin damar duvarında yapısal bozukluklara yol açarak anevrizma gelişimine neden olabileceği ileri sürülmektedir. eNOS genine ait mutasyon ve polimorfizmin belirlenmesi, bu varsayımı açıklayıcı veriler sağlayabilir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, eNOS geni polimorfizmi, eNOS geninin işlevlerindeki bozukluk ile ilişkili bulunmuştur. eNOS genindeki bu tip işlevsel DNA değişikliklerinin, eNOS'un salınımlarında ve enzimatik faaliyetinde değişikliklere neden olduğu ileri sürülmüştür (72, 76). eNOS enzimindeki miktar ve işlevsel değişiklikler de NO salınımını etkileyebilecektir (72, 77). Johanning'in yaptığı çalışmada da NO baskılanması ile deneysel anevrizmaların gelişmesinin engellendiği gösterilmiştir (12).

Khurana'nın yaptığı kafa içi anevrizmaların yırtılması ile ilgili çalışmada eNOS T-786C tek nükleotid polimorfizminin, yırtılma riskini belirleyebilecek bir belirteç olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (68). Khurana ve ark. yaptığı diğer bir çalışmada eNOS geni T-786C, G894T ve 27-VNTR polimorfizmi ile anevrizma yırtılma arasındaki ilişkiyi daha geniş bir hasta grubunda araştırmış ve her üç polimorfizm içinde varyant allel varlığının ve ilişkili genotiplerinin anevrizmaları yırtılan hastalarda üç kat daha fazla görüldüğünü tespit etmişlerdir (78). Akagawa ve ark. anevrizma boyutu ile eNOS geni T-786C polimorfizmi arasında bir ilişki tespit edememişlerdir (79).

Çalışmamız kafa içi anevrizma varlığı ile eNOS geni polimorfizmi arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışmadır. Yapılan çalışmalarda polimorfik olabileceği gösterilmiş olan eNOS genine ait farklı gen bölgeleri ile çeşitli patolojiler arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu bölgelerden daha çok eNOS geni promotör bölgesi, ekson 7 bölgesi ve intron 4 bölgesi üzerinde durulmuştur (67). Özellikle damarsal hastalıklara yönelik araştırmalarda eNOS geni ekson 7 G894T (Glu298Asp) ve intron 4 27-VNTR polimorfizmi ayrıntılarıyla araştırılmıştır (67, 75, 78–83).

eNOS genine ait bu bölgelerde mevcut olabilecek polimorfizmlerle plazma NO düzeyi arasındaki ilişki araştırma konusu olmuştur. Tsudaka ve ark. intron 4 27-VNTR polimorfizmi ile plazma NO metabolitleri düzeyi arasındaki ilişkiyi sağlıklı erişkinlerde araştırmış ve a allel sahibi deneklerin plazma NO metabolitlerinin düzeyini b allel sahibi deneklerden anlamlı şekilde daha düşük bulmuşlardır (72). Veldman ve ark. sağlıklı bireylerde Glu298Asp (G894T) polimorfizmi ile bazal NO üretimi arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve Asp allel sahibi deneklerde bir eNOS inhibitörü olan N(G)-monometil-L-arginine (L-NMMA) infüzyonuna cevabın Glu/Glu genotipi olanlara göre anlamlı şekilde düşük olduğunu bulmuşlar ve Glu298Asp (G894T) polimorfizmi ile bazal NO üretimi arasında anlamlı ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir (82). Moon ve ark. ise ters olarak Glu298Asp (G894T) polimorfizmi ile plazma NO metabolitleri arasında bir ilişkinin olmadığını ileri sürmüşlerdir (77). Bu polimorfizmlerle plazma NO düzeyi arasındaki ilişki henüz açık bir şekilde ortaya konmadığı için bu polimorfizmler ile anevrizma varlığı arasında plazma NO düzeyi açısından nasıl bir ilişkinin bulunduğu hala karanlıktır.

Bu çalışmada, eNOS geninde sık karşılaşılan polimorfizmlerden olan, ekson 7'deki RFLP ve intron 4'deki VNTR polimorfizmleri ile kafa içi anevrizma gelişimi arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla hasta ve kontrol gruplarının bireylerinden elde edilen DNA'larda eNOS geninin polimorfizmlerine bakılarak her iki grup arasında allel ve genotip dağılımı açısından farklılık olup olmadığı incelenmiştir. Polimorfizm çalışmalarının geniş sayıda deneğin bulunduğu gruplarda yapılması sağlıklı sonuçların elde edilmesinde önemli bir koşuldur. Bununla beraber, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar birer ipucu oluşturacaktır. Hasta ve kontrol grubunda b (Glu/Glu) genotipi varlığının yüksek oranda elde edilmesine rağmen, kafa içi anevrizma varlığı açısından belirleyici gibi görünmemektedir. a (Asp/Asp) genotipi varlığı kafa içi anevrizmalar için yüksek risk faktörü olarak ortaya çıkarken, aksine c (Asp/Glu) genotipi varlığının ise kafa içi anevrizmalar için düşük riski işaret ettiği tesbit edilmiştir.

eNOS ekson 7 polimorfizminin işlevsel sonucu tam olarak bilinmemektedir. Fakat iNOS yolu ile aşırı NO salınımının damar endoteli ve düz kasında bozulmalara yol açarak anevrizma gelişmesini artırdığı bir çalışmada

gösterilmiştir (64). Yine aynı çalışmada, anevrizma gelişen damar duvarında iNOS'da artma, eNOS'da azalma tesbit edilmiştir (64). Ekson 7 polimorfizmi ile eNOS sentezindeki değişiklikler, NO sentezini değiştirmek yolu ile anevrizma gelişimine katkı sağlayabilir.

d genotipi olarak adlandırdığımız tip, daha önce yapılan çalışmalarda hiç karşılaşılmayan, farklı kesim bölgeleri içeren genetik bir polimorfizmdir. Bu varyant tiplerde yapılacak gen dizi analizleri, eNOS ekson 7'de yeni polimorfizmlerin bulunmasına ve genin yapısının aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

Deneyle sonucunda, hasta grubunda eNOS geni intron 4 VNTR polimorfizmi frekansı kafa içi anevrizma hastalarında ve kontrol grubunda anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bu polimorfizm açısından hasta grubunun tüm örnekler b genotipi (homozigot b/b) genotipine sahiptir. Kontrol grubundaki bireylerde de farklı genotipe rastlanmamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda da bu polimorfizmin damarsal hastalıklarla anlamlı birlikteliği gösterilememiştir (5).

Artmış kafa içi anevrizma riskinden sorumlu genlerin bulunması, hastalıkların erken tanısına ve bireysel tedavilere olanak sağlayacaktır. eNOS'un genetik polimorfizmlerinin tedavideki etkilerini görmek daha uzun yıllar alacaktır. Ancak, endotele özgül ilaç tedavi yöntemlerinin daha yakın bir zamanda başlaması daha olasıdır. Şimdiye kadarki genetik çalışmaların çoğu karmaşık ve çok yönlü hastalıklara odaklanmıştır ve birçoğunda genetik etkiler tanımlanmıştır. eNOS genetik polimorfizmlerinin, endotelde etkili diğer genlerle (iNOS geni gibi) birlikte daha fazla araştırılması, hastalık süreçlerini ve mekanizmalarını daha iyi anlamamızı sağlayacaktır. Ayrıca, NOS genetik polimorfizmlerinin, değişmiş enzim veya hücre faaliyetini nasıl etkilediğinin aydınlatılması da faydalı olacaktır. Eğer enzim faaliyeti düşükse, belki de diyetle ek arjinin alımı gibi basit tedaviler faydalı olacaktır. Genetik ve gen tedavisi konusundaki çalışmalar ilerledikçe, seçici gen tedavileri kafa içi anevrizma gibi özgül durumlarda dahi kullanılabilir duruma gelecektir.

6. SONUÇLAR

1. eNOS geni ekson 7 bölgesinde a alel varlığı anevrizma gelişimi için düşük risk, c alel varlığı yüksek risk oluşturabilir.
2. İntron 4 polimorfizm araştırmasında anevrizma varlığı ile bir ilişki tespit edilememiştir.
3. Daha önce tanımlanmamış ekson 7 Ban II tanıma bölgesi tespit edilmiştir. Bu yeni bir polimorfizm tipi olabilir. Gen dizi analizi gereklidir.
4. Genetik mutasyon ya da polimorfizmlerin tespiti anevrizma gelişiminin açıklanmasına ışık tutacaktır.
5. Riskli grupların tespiti anevrizmaların erken tanısı ve tedavisine olanak sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Menghini VV, Brown RD, Sicks JD, O'Fallon WM, Wieberg DO: Clinical manifestations and rates among patients with saccular intracranial aneurysms. *Neurosurgery* 49: 251–258, 2001.
2. Erkoçak A: Dolaşım ve kan damarları sistemi. Özel Histoloji. İzmir 1984.
3. Pluta RM, Oldfield EH, Boock RJ: Reversal and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 87: 746–751, 1997.
4. McGrit MJ, Lynch RJ, Para A, Sheng H, Pearlstein RD, Laskowitz DT, Pelligrione DA, Warner DS: Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 33: 2950–2956, 2002.
5. Kim JU, Chang HK, Lee SS, Kim JW, Kim KT, Lee SW, Chung WT: Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behçet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis* 62: 1083–1087. 2003.
6. Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA: Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 22: 361–368 2001.
7. Hingorani AD: Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis. *Atherosclerosis* 154: 521–521, 2000.
8. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M: Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32: 3–8, 1998.
9. Kotani K, Shimomura T, Murakami F, Ikawa S, Kanaoka Y, Ohgi S, Adachi K, Nanba E: Allele frequency of human endothelial nitric oxide

- synthase gene polymorphism in abdominal aortic aneurysm. *Intern Med*. 39: 537- 539, 2000.
10. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T: T-786-C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99: 2864-2870, 1999.
 11. Gonzales-Gay MA, Llorca J, Sanchez E, Lopez-Nevot A, Amoli MM, Garcia-Porura C, Ollier WER, Martin J: Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology* 43: 1182-1185, 2004.
 12. Johanning JM, Franklin PD, Man DC: Inhibition of inducible nitric oxide synthase limits nitric oxide production and experimental aneurysm expansion. *J Vasc Surg* 33: 579-586, 2001.
 13. Brian JE, Faraci FM, Heistad DD: Recent insights of the regulation of cerebral circulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23: 449-457, 1996.
 14. Juvela S, Porras M, Poussa K: Natural history of unruptured intracranial aneurysm probability of and risk factors for aneurysm rupture. *J Neurosurg* 93: 379-387, 2000.
 15. Sengupta RP, McAllister VL: *Subarachnoid Hemorrhage*. Springer-Verlag, Berlin: 1986.
 16. Selman WR, Lust WD, Ratcheson RA: *Cerebral blood flow*. Wilkins RH, Rengachary SS (ed): *Neurosurgery*, McGraw Hill Companies, ABD: 1996, s. 1997-2006 içinde.
 17. Haznederoğlu İC, Özcebe Oİ, Özdemir O, Çelik I, DüNDAR SV, Kirazlı S: Impaired haemostatic kinetics and endothelial function in Behçet's disease. *J Intern Med* 240: 181-187, 1996.
 18. Dumont A, Lanzino G, Kassell NF: Unruptured aneurysms. *J Neurosurg* 96: 52-56, 2002.
 19. Juvela S: Unruptured aneurysms. *J Neurosurg* 96: 58-60, 2002.

20. Khurana VG, Beser M: The pathophysiological basis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Clin Neurosci* 4: 122–131, 1997.
21. Osborn AG: Intracranial aneurysms. *Diagnostic Neuroradiology*. Mosby, Toronto: 1994, s. 248- 283 içinde.
22. Odar V: Damar duvarlarının yapısı. *Anatomi Ders Kitabı*. Hacettepe Taş Kiyapçılık, Ankara: 1986.
23. Snell RS: *Clinical Neuroanatomy for Medical Students*. Lippincott. ABD: 2000.
24. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL: *Blood vessels. Pathologic basis of disease*. W. B. Saunders Company, Philadelphia: 1992.
25. Rosai J: *Cerebrovascular disorders. Surgical Pathology*. Mosby. Toronto: 2004, s. 2471- 2473 içinde.
26. Cambell GJ, Roach MR: A physical model for the formation of evaginations: A prospective precursor to the creation of saccular aneurysms. *Stroke* 15: 642–652, 1984.
27. Stehbens WE: Histopathology of cerebral aneurysma. *Arch Neurol* 8: 272–285, 1963.
28. Scanarini M, Mingirino S, Zuccarello M, Trincia G: Scanning electron microscopy (SEM) of biopsy specimens of ruptured intracranial saccular aneurysms. *Acta Neuropathol* 44: 131–134, 1978.
29. Stehbens WE: Ultrastructure of aneurysms. *Arch Neurol* 32: 798–807, 1975.
30. Krings T, Reingers MH, Foltys H, Cosgrove G R, Thron A: Multimodality neuroimaging: research and clinical applications. *Neurol Clin Neurophysiol* 2001: 2–11, 2001.
31. Locksley HB: Report on the cooperative study of intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 25: 219–239, 1966.

32. Kojima M, Nagasava S, Lee YE, Takeichi Y, Tusuda E, Mabuchi N: Asymptomatic familial cerebral aneurysms. *Neurosurgery* 43: 776–781, 1998.
33. Nakagava T, Hashi K, Kurokawa Y, Yamamura A: Family history of subarachnoid hemorrhage and the incidence of asymptomatic, unruptured cerebral aneurysms. *J Neurosurg* 91: 391–395, 1999.
34. Akdemir H: Kranial vasküler hastalıklar. Aksoy K (ed). *Temel Nöroşirürji. Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları*, Ankara: 2005, s. 441–447 içinde.
35. Dhillon R, Clarcson P, Donald AE, Powel AJ, Nash M, Novelli V: Endothelial dysfunction late after Kawasaki disease. *Circulation* 102: 1470–1472, 2000.
36. Suziki J, Ohara H: Clinicopathological study of cerebral aneurysms. Origin, rupture, repair, and growth. *J Neurosurg* 48: 505- 514, 1978.
37. Kataoka K, Taneda M, Asai T, Kinoshita A, Ito M, Kuroda R: Structural fragility and inflammatory response of ruptured cerebral aneurysms. A comparative study between ruptured and unruptured cerebral aneurysms. *Stroke* 30: 1396–1401, 1999.
38. Hassler O: Media defects in human arteries. *Angiology* 14: 368–371, 1963.
39. Moritake K, Handa H, Okumara: Quantitative analysis of microstructural components of human cerebral arteries. *Neurol Res* 3: 67–82, 1981.
40. Weir BKA, Findlay JM, Mielke BW: Pathology of aneurysms and vascular abnormality affecting the central nervous system. Crockard A, Hayward R, Hoff JT (ed), *Neurosurgery The Scientific Basis of Clinical Practice*. Blackwell Scientific Publication, Boston: 1992, s. 615–632 içinde.
41. Hacıyakupoğlu S: Subaraknoid kanama tedavisi. Altınörs N (ed). *Temel Nöroşirürji. Palme*, Ankara: 1997, s. 1- 32 içinde.

42. Leblanc R: The minor leak preceding subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 66: 35–39, 1987.
43. Broderick JP, Brott TG, Tomsick T: Intracerebral hemorrhage more than twice as common as subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 78: 88–91, 1993.
44. Butler WE, Barker FG, Cromwel RM: Patients with polycystic kidney disease would benefit from routine magnetic resonance angiographic screening for intracerebral aneurysms: a decision analysis. *Neurosurgery* 38: 506–516, 1996.
45. Brendt DS, Synder SH: Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8: 3–11, 1992.
46. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373–386, 1980.
47. Palmer RM J, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesized nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 644–666, 1988.
48. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z: Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and amino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473–476, 1987.
49. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109–142, 1991.
50. Iadecola C: Nitric oxide participates in the cerebrovasodilatation elicited from cerebellar fastigial nucleus. *Am J Physiol* 263: 1156–1161, 1992.
51. Iadecola C: Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 20: 132–139, 1997.
52. Faraci FM, Brian JE: Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* 25: 692–703, 1994.
53. Faraci FM: Endothelium-derived vasoactive factors and regulation of the cerebral circulation. *Neurosurgery* 33: 648–659, 1993.

54. Pluta RM, Thompson G, Dawson TM, Synder SH, Boock RJ, Oldfield EH: Loss of nitric oxide synthase immunoreactivity in cerebral vasospasm. *J Neurosurg* 84: 648–654, 1996.
55. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL: Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein endothelial nitric oxide synthase double knockout mice. *Circulation* 104: 448–454, 2002.
56. Kiechle FL, Malinsky T: Nitric oxide; Biochemistry, pathophysiology and detection. *Am J Clin Path* 100: 567- 575, 1993.
57. Miranda FJ, Alabadi JA, Torregrosa G, Salom JB, Jover T, Barbera MD, Alborch E: Modulator role of endothelial and nonendothelial nitric oxide in 5-hydroxytryptamine induced contraction in cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 39: 998–1004, 1996.
58. Johanning JM, Armstrong PJ, Franklin DP: Nitric oxide in experimental aneurysm formation: early events and consequences of nitric oxide inhibition. *Ann Vasc Surg* 16: 65- 72, 2002.
59. Paik DC, Ramey WG, Dillon J: The nitrite/elastin reaction: implications for in vivo degenerative effects. *Connect Tissue Res* 36: 241–251, 1997.
60. Khurana VG, Smith LA, Barker ST, Eguchi D, O’Brain T, Katusic ZS: Protective vasomotor effects of in vivo recombinant endothelial nitric oxide synthases gene expression in a canine model of cerebral vasospasm. *Stroke* 33: 782–789, 2002.
61. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF: Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 97: 2494–2498, 1998.
62. Lizuka T, Oishi K, Sasaki M, Hatanaka Y, Minatogawa Y, Uemura S, Koike M: Nitric oxide and aneurysm formation in Kawasaki disease. *Acta Paediatr* 1986: 470–473, 1997.

63. Khajoev V, Kariyazono H, Ohno T, Ihara KM, Kushara K, Hara T: Inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthases gene polymorphisms in Kawasaki disease. *Pediatr Int* 45: 130–134, 2003.
64. Fukuda S, Hashimoto N, Naritomi H: Prevention of rat cerebral aneurysm formation by inhibition of nitric oxide synthase. *Circulation* 101: 2532–2538, 2000.
65. Tajouri L, Martin V, Ovcacic M: Investigation of inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) polymorphism in a multiple sclerosis population. *Brain Res Bull* 64: 9–13, 2004.
66. Marsden PA, Heng HH, Scherer SB, Sterward RJ, Hall AB, Shi XM: Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268, 17478–17488, 1993.
67. Wang XL, Wang J: Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 70: 241–251, 2000.
68. Khurana VG, Sohni YR, Mangrum WI: Endothelial nitric oxide synthase T-786C Single nucleotide polymorphism. A Putative genetic marker differentiating small versus large ruptured intracranial aneurysms. *Stroke* 34: 2255–2559, 2003.
69. Katusic ZS, Milde JH, Cosentino F, Mitrovic BS: Subarachnoid hemorrhage and endothelial L-arginine pathway in small brain stem arteries in dogs. *Stroke* 24: 392–399, 1993.
70. Verma A, Hirsch D, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH: Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 259: 381–384, 1993.
71. Stangl K, Cascorbi I, Laule M, Klein T, Stangl V, Rost S, Wernecke KD, Felix SB: High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 10: 133–140, 2000.
72. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A: Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO

- metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 190–193, 1998.
73. Akar N: *Klinik Moleküler Patolojiye Giriş*. A.Ü. Tıp Fakültesi Bilimsel Yayınlar Serisi, Ankara: 2000.
74. Friedman JM, Dill FJ, Hayden MR: *Medical Genetics*. Harwal Puplicing, ABD: 1976.
75. Shimasaki Y, Yasue H, Yashimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W: Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 31: 1506–1510, 1998.
76. Tesaura M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J: Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci. ABD*: 97: 2832–2835, 2000.
77. Moon J, Suin Y, Kim E, Shin C, Jo SA, Jo I: Lack of evidence for contribution of Glu298Asp (G894T) polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Thrombosis Res* 107: 129–134, 2002.
78. Khurana VG, Meissner I, Sohni YR, Bamlet WR, McClelland RI, Cunningham JM, Mayer FB: The presence of tandem endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms identifying brain aneurysms more prone to rupture. *J Neurosurg* 102: 526–532, 2005.
79. Akagawa H, Kasuya H, Onda H, Yoneyama T, Sasahara A, Kim CJ, Lee JC, Yang TK, Hori T, Inoue I: Influence of endothelial nitric oxide synthase T-786C single nucleotide polymorphism on aneurysm size. *J Neurosurg* 102: 68–71, 2005.
80. Berdeli A, Sekuri C, Cam FS, Ercan E, Sağcan A, Tengiz İ, Eser E, Akın M: Association between eNOS (Glu298Asp) and RAS genes polymorphisms and premature coronary artery disease in a Turkish population. *Clin Chim Acta* 351: 87–94, 2005.

81. Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Bolli P, Sestini H, Falciani M, Azas L, Pratesi G: eNOS G894T polymorphism as a mild predisposing factor for abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 42: 415–419, 2005.
82. Veldman BA, Spiering W, Doevendans PA, Vervoort G, Kroon AA, de Leeuw PW, Smits P: The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. *J Hypertens* 20: 2023–2027, 2002.