

**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**AORT ANEVİZMALI HASTALARDA  
ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMİ  
GENİNİN POLİMORFİZMİ**

**Dr. Fahri Hayri Atlı**

**UZMANLIK TEZİ**

**SİVAS**

**2006**

**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**AORT ANEVİZMALI HASTALARDA  
ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMİ  
GENİNİN POLİMORFİZMİ**

**Dr. Fahri Hayri Atlı**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman Öğretim Üyesi  
Yrd. Doç. Dr. Şinasi Manduz**

**SİVAS**

**2006**

Bu alışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Başkanlığı tarafından desteklenmiştir (CÜBAP Proje No: T-266)

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun 12/03/2002 tarih ve 2002/1 sayılı kararı ve Cumhuriyet Üniversitesi rektörlüğü'nün 28/03/2002 tarih ve 463 sayılı yazısı ile uygun görülen “ Tez yazım kılavuzu'na” göre hazırlanmıştır.

## TEŞEKKÜR

Tıp eğitiminde bana emeği geçen tüm hocalarıma; kalp ve damar cerrahisi alanında beni yetiştiren, ilgilerini eksik etmeyen, tezimi hazırlamamda deneyim ve bilgileriyle bana destek olan Prof. Dr. Kasım Doğan ve Yard. Doç. Dr. Şinasi Manduz'a teşekkür ederim. Yard. Doç. Dr.Öcal Berkan ve Yard.Doç.Dr.Nurkay Katrancıoğlu'na kalp ve damar cerrahisi 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 çalışmalarında bana yardımcı olan Bilim Uzmanı Eylem Gül'e, çalışmanın istatistik değerlendirmesindeki katkılarından dolayı Yard. Doç. Dr. Hafize Sezer' e 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 indüklenebilir 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 ve damar hastalıklarına eşlik eden eNOS genindeki iki polimorfizmle aort anevrizmaları arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Bu çalışmaya aort anevrizması olan toplam 50 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 ve 27-VNTR analizi için 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 aort anevrizma gelişimine yol açabileceği düşünülmektedir. Bu mutasyon ve polimorfizmin belirlenmesi aort anevrizması patojenezine ışık tutacaktır.

### **Anahtar kelimeler:**

Nitrik oksit, eNOS, polimorfizm, ekson 7, intron 4, aort anevrizması

## SUMMARY

Nitric oxide synthesis is regulated by nitric oxide synthase which has 3 isoforms. These are endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and inducible or immunologic nitric oxide synthase (iNOS). Endothelial nitric oxide synthase modulates smooth muscle tonus which in the arterial wall means modulates vessel diameter. There is a suggestion that eNOS has structural effects also.

Relationship in two polymorphisms of eNOS gene which is companion with vascular diseases and aortic aneurysms was explored in this study.

There was no difference between study and control groups in G894T polymorphism of eNOS gene and 27- VNTR analyses

There is a suggestion that polymorphisms and mutations of endothelial nitric oxide gene can lead to aortic aneurysms. Diagnosing of these mutations and polymorphisms can be a prediction for aortic aneurysms.

### **Key words:**

Nitric oxide, eNOS, polymorphism, exon 7, intron 4, aortic aneurysms.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
SUMMARY .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
GİRİŞ .....	1
AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİLER.....	4
1- AORT ANATOMİSİ.....	4
2- AORT DUVARININ HİSTOLOJİSİ .....	5
3- AORT DUVARININ BESLENMESİ .....	6
4- ANEVİRİZMA TANIMI.....	6
5- AORT ANEVİRİZMALARI .....	7
6- NİTRİK OKSİT .....	13
7- POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ.....	23
8- ELEKTROFOREZ.....	25
9- GENETİK POLİMORFİZM.....	25
GEREÇ VE YÖNTEM .....	27
1- DNA YALITILMASI .....	28
2- MOLEKÜLER ANALİZ.....	29
3- İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	35
4. BULGULAR.....	36
5. TARTIŞMA .....	433
SONUÇLAR.....	48
KAYNAKLAR .....	49



## GİRİŞ

Anevrizma, aortanın herhangi bir segmentinde, hastanın yaşı ve vücut yüzeyine göre olması gereken normal çapın üzerinde anormal ve geri dönüşümsüz bir genişleme göstermesi halidir. Normal çapın transvers ölçümde iki katın üzerine çıkması durumunda aortun o bölgesi anevrizmatik olarak adlandırılır (1).

Anevrizmaları kabaca füziform ve sakküler olarak sınıflandırmak mümkündür. Aort anevrizmaları medial degenerasyon, diseksiyon, bağ dokusu hastalığı, künt travma, aortit, mikotik enfeksiyon ve konjenital anomaliler gibi nedenlerle oluşabilirler (1). Aort anevrizmalarının patogenezi karmaşık olup pek çok görüş arasında genetik faktörlerin üzerine eklenen edinsel faktörlerin rol oynadığı varsayımı kabul görmektedir . Aort anevrizmalı hastaların birinci derece akrabaları %10-15 oranında aynı hastalığa yakalanmaktadır (2).

Aort anevrizmalı hastalarda aortada elastin içeriği araştırılmış ve anevrizmalı hastalarda elastin miktarının önemli derecede azalmış olduğu ve anevrizmalı hastaların aort duvarında elastin sentezini sağlayan genetik yapıda bozukluklar bulunduğu gösterilmiştir (3, 4).

Tüm anevrizmaların %75'i asemptomatik olmasına rağmen anevrizmada çap artışı, çevre dokulara bası ya da erozyon semptomları, enfeksiyon, inflamasyon, distal embolizasyon ve rüptür riskleri nedeniyle anevrizmaların erken teşhis ve takibi önemlidir (5).

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-Arjinin'in oksidasyonu ile sentez edilir. NOS'ın 3 izoformu tanımlanmıştır. Bunlardan iki tanesi, nöronal NOS (nNOS) ve endotelyal NOS (eNOS), bir diğeri ise indüklenebilir NOS (iNOS)'dur. NO, tesbit edilmiş diğeri fonksiyonunun yanında, majör olarak vasküler tonusu düzenler. Fizyolojik durumlarda NO doku hasarına yol açmaz, çünkü düzenli olarak oksihemoglobin tarafından ortamdaki temizlenir. Tam aksine, enfeksiyöz ya da enflamatuar durumlarda endotoksinler ve inflamatuvar sitokinler tarafından indüklenen iNOS ise çok yüksek miktarlarda NO salınımına neden olur ve artan NO, yüksek miktarlarda

serbest radikaller oluşturarak, konağın dokularında hasara yol açmasının yanı sıra hastalığın gidişatını da değiştirir (6).

Endotelden düzenli olarak salınan NO, düzenli bir vazodilatasyon sağlayarak vasküler yatakta koruyucu etki gösterdiği iddia edilmektedir (7). Düzensiz salınan NO damar duvarında zayıflıklara ve hasara neden olarak anevrizma gelişimine yol açtığı da düşünülmektedir (7). Patolojik durumlarda aşırı NO salınımına neden olan iNOS 'ın da bu şekilde anevrizma oluşumuna katkı yaptığı çalışmalarda iddia edilmiştir ( 6, 7, 8). NO sentezinin düzensizliği, ekstrasellüler matriksin önemli bir yapı taşı olan elastin proteininin miktarını değiştirmek sureti ile damar duvarının zayıflamasına neden olmaktadır (6).

eNOS geni kromozom 7q35-36'da lokalize ve 21 kilobazlık (kb) 26 exon içerir (6). Bu gende meydana gelebilecek bir varyasyon NOS enziminde fonksiyon değişikliklerine yol açar ve devamında bir hastalık süreci gelişebilir (9). DNA daki eNOS geni varyasyonları ile vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılmış pek çok araştırma mevcuttur. Bugüne kadar koroner arter hastalığı, miyokard enfaktüsü, hipertansiyon, stroke ve renal hastalıklar gibi pek çok vasküler bozukluk eNOS geni polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur (6). Ancak araştırma sonuçları ırklar arasında değişkenlik gösterdiğinden spesifik genetik varyantların sadece belli ırklara özgü olduğu düşünülebilir.

## AMAÇ

Şu ana kadarki bilgilerimiz ışığında, eNOS geni polimorfizmi ile aort anevrizmaları arasındaki ilişki henüz tam açıklanabilmiş değildir. Bu nedenle Türk toplumunda aort anevrizması olan hastalarda eNOS enzimine ait genlerdeki polimorfizmin olup olmadığını göstermek amacıyla, daha önce polimorfik olduğu gösterilen gen bölgesine ait 2 farklı polimorfizmi araştıran, retrospektif ve prospektif kontrollü bir çalışmayı planladık.

## GENEL BİLGİLER

### 1- AORT ANATOMİSİ

Oksijenlenmiş kanı tüm vücuda dağıtan aorta, sol ventrikül tabanından çıkarak sistemik dolaşımın ana arteryel ağacını oluşturur. Aort sol ventrikülden çıktıktan sonra yukarıya yönelir, sola ve sol akciğerin kökünün üzerinden dorsale doğru bir ark yapar. Aort daha sonra toraksın içinde aşağıya inmeye başlar ve kolumna vertebralisin solunda kalır. Abdominal boşluğa diyaframdaki hiatus aortikusunu geçerek girer. Anatomik olarak aort; çıkan aorta, inen aort (torasik ve abdominal)olarak incelenebilir (10).

#### *Çıkan aorta*

Çıkan aorta üçüncü sol kartilaj seviyesinde sol ventrikül tabanından çıkar. Oblik olarak yukarı ve sağa yönelerek, ikinci sağ kartilaj seviyesine ulaşır (10). Aortanın bu parçası tamamiyle perikard ile sarılıdır. Buradan itibaren arkus aorta olarak devam eder. Ön tarafında timik doku kalıntıları ve sternum, arkada sağ pulmoner arter ve sağ ana bronş ile sağ yan ve arkada vena cava superior ile sol tarafında pulmoner arter ile komşudur (11). Aort kökünden iki adet dal çıkar: Sol ana koroner arter ve sağ koroner arter.

#### *Arkus aorta*

Çıkan aortanın devamıdır ve superior mediastende yer alır. İkinci sağ sternokostal eklemün üst kenarı hizasında başlar, arkada dördüncü ve beşinci vertebralar arasındaki intervertebral disk hizasından sonra inen aorta olarak devam eder (10). İnnominate arterin başlangıç kısmından başlar ve sol subclaviyan arterin distalinde son bulur (11). Arka ve sağ tarafında trakea, özafagus ve torasik duktus bulunur (11). Ön tarafında solda sol akciğer ve sol frenik, sol vagal, sol vagusun ve sempatik trunkusun kardiyak dalları bulunur. Arkus konkavitesi içerisinde pulmoner arter bifurkasyonu, sol ana bronş ve sol rekürren sinir yer almaktadır (11). Arkus aortanın dalları brakiosefalik arter (innominate arter),sol ana karotis arteri, sol subclavian arterdir (10).

### *İnen torasik aorta*

Posterior mediastende yer alır. Dördüncü torakal vertebra korpusunun sol alt kenar hizasından başlayarak, vertebral kolonun sol ön yanında aşağıya doğru uzanır. Aşağıya doğru indikçe mediale doğru yönelir ve vertebral kolonun ön yüzüne geçer. Onikinci torakal vertebranın alt sınırı seviyesindeki diyaframın aort açıklığından (hiatus aorticus) geçerek abdomene girer. Buradan sonra abdominal aorta adını alır (10). Ön tarafta sol akciğer ile distal kısımda her iki akciğer ile arkada son yedi torasik vertebra ile hemiazigos venleri ile komşuluk yapar (11). İnen aortanın torakal bölümü göğüs duvarına giden parietal ve toraks boşluğundaki organlara giden visseral dallar verir. Posterior interkostal arterler, subkostal arterler, bronkial arterler, özofageal ve perikardial arterler inen aortanın torasik bölümünün dallarıdır (10).

### *Abdominal aorta*

Diyaframdaki hiatus aorticustan geçerek (T12) abdomene giren aorta buradan itibaren abdominal aort adını alır. Peritonun arkasında ve lumbal vertebra korpuslarının ön yüzlerinde seyrederek aşağı doğru uzanır. Dördüncü lumbal vertebra seviyesinde medyan sakral arter dalını ve iliak arter adı verilen iki geniş dalını veriği iliak bifurkasyona kadar devam eder. Abdominal aortanın dalları inferior frenik arter, çölyak trunkus, orta suprarenal arter, superior mezenterik arter, renal arterler, testiküler veya ovarian arterler, inferior mezenterik arter, lumbal arterler ve ana iliak arterlerdir (10).

## **2- AORT DUVARININ HİSTOLOJİSİ**

Normal aort dokusu beş farklı tabakadan oluşmaktadır. En içteki tabaka olan tunika intima endotel hücreleri içermektedir ve az miktarda temel madde ile bağ dokusundan oluşan bazal membranın üzerinde yerleşmiştir. Tunika intima ve tunika medya arasındaki sınır elastik liflerden oluşan intimal elastik lamina ile ayrılmaktadır. Aort duvarına şeklini veren tunika medya konsantrik olarak yerleşmiş elastik dokudan oluşmuştur. Tunika medya ile en dış tabaka olan tunika adventisya arasında external elastik lamina yer alır. Güçlü bir tabaka olan tunika adventisya kollajen ve elastik lifler içermektedir. Aort duvarında

bulunan kollajen damarın gerilme kuvvetinden sorumluyken elastin ise gerilen damarın geriye dönüşünden sorumludur. Fibrillin ekstrasellüler matriksin mikrofibriller yapısını oluşturan bir diğer yapısal proteindir (11).

### **3- AORT DUVARININ BESLENMESİ**

Büyük arter ve venlerin duvarları vasa vasorum adı verilen küçük damarlarla beslenir. Bu damarların yaygınlığı iki unsura bağlıdır; duvarın yapısı ve kan basıncına bağlı olarak duvardaki sıkışma miktarı. Tunika medya tabakasının lümenine yakın kısımları lümeninde dolaşan kandan beslenirken dış kısımları ve tunika adventisya kendi içindeki arteriyollerle beslenir (12).

### **4- ANEVİRİZMA TANIMI**

Aort veya herhangi bir arter segmentinin normal yapısını kaybetmesi sonucu meydana gelen damar genişlemesine anevrizma denir. Anevrizmalar gerçek anevrizmalar, dissekan anevrizmalar ve yalancı anevrizmalar olmak üzere üçe ayrılırlar (13). Anevrizma kesesinin duvarı, arter duvarının tüm tabakalarını içine alıyorsa (intima, medya, adventisya) gerçek anevrizma denir (13). Fusiform ve sakküler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Fusiform anevrizmalarda damar duvarının küçük bir segmentinin içi şeklinde genişlemesi mevcuttur. Sakküler anevrizmalarda anevrizmanın bir ağzı vardır ve dışarıya doğru uzayan bir cep görünümündedir. Arterin medya tabakasının incelerek genişlemesiyle oluşur (13).

Dissekan anevrizmalarda ise aort içindeki kanın intimadaki bir yırtıktan medya tabakası içerisine doğru girip basınçlı kan ile medya tabakasının ayrılarak intimayla adventisya arasına kan dolmasıyla oluşurlar (1). Yalancı anevrizmalarda ise herhangi bir travma nedeniyle damar duvarının yırtılarak, yırtılan damardan çıkan kanın çevre dokular, fibroz doku ve trombüs ile sınırlanması ve böylece bir anevrizma kesesi oluşmasına denir (13).

## **5- AORT ANEVRIZMALARI**

### **A- Aort Anevrizmalarının Sınıflandırılması**

Çıkan aort anevrizmaları sinotubuler bölge ile innominant arter çıkışı arasında, arkus aort anevrizmaları innominant arter çıkışının proksimalı ile sol subklaviyan arter çıkışının distali arasında, inen torokal aort anevrizmaları sol subklaviyan arter çıkışının distali ile diyaframdaki aortik hiatus arasında, abdominal aort anevrizmaları ise aortik hiatustan iliak bifurkasyona uzanan bölgede yerleşirler. Abdominal aort anevrizmaları suprarenal ve infrarenal olmak üzere ikiye ayrılırlar. Suprarenal segment çölyak arter ile renal arterler arası, infrarenal segment ise renal arterlerle iliak bifürkasyon arasındır (1).

İnen torokal ve abdominal aortayı farklı oranlarda tutan anevrizmalara torakoabdominal aort anevrizmaları denir ve Crawford tarafından alt guruplara ayrılmışlardır.

Tip 1 sol subklaviyan arterin altından başlayıp çölyak yada superior mezenterik arter hizasına yada renal arterlerin çıkışına kadar, Tip 2 sol subklaviyan arter altından başlayıp iliak bifurkasyona kadar, Tip 3 orta inen aortada yaklaşık altıncı interkostal aralık hizasından başlayıp iliak bifurkasyona kadar, Tip 4 supraçölyak abdominal aortada yaklaşık onikinci torokal vertebra hizasından başlayıp iliak bifurkasyona kadar devam eden anevrizmalardır (14).

### **B- Aort Anevrizmalarının Histolojisi**

Patologlar arasında aortik histoloji genelde dört farklı gözleme dayandırılmaktadır (3). Bunlar elastik liflerin kaybı (medial dejeneratif hastalık), düz kas hücrelerinin kaybı (medial nekroz), aterosklerozun varlığı (genellikle medial dejeneratif hastalığın üzerine sekonder olarak yerleşmiştir) ve kronik yangısal hücrelerin varlığını (inflamatuvar hastalık) içermektedir.

Medial dejeneratif hastalık olan olgularda aort segmentinin mikroskopik incelenmesinde elastik liflerde parçalanma ve kayıp izlenir. Bu durum özellikle yaşlı, kronik hipertansiyonlu, Marfan sendromlu hastalarda görülür ve asıl

nedeni bilinmemektedir. Bu yüzden böyle hastalar medial dejeneratif hastalığın var olduğu kişiler olarak adlandırılmaktadır.

Marfan sendromlu hastalarda olduğu gibi medial dejenerasyonun ileri evrelerinde düz kas hücreleri aort duvarından kaybolur ve bu durum medial nekroz olarak nitelendirilmektedir. Aortik diseksiyonlarda medial nekrozun olaydan önce var olduğu ya da daha sonra olaya eklendiği konusu halen tartışmalıdır (3). Bununla birlikte diseksiyonlu hastalarda yapılan gözlemler disseke olan aort segmentleri dışındaki segmentlerinde kolaylıkla disseke olabildiğini göstermektedir ve bu durum diseksiyona katılmamış aort segmentlerinde medial nekrozun varlığını ortaya koymaktadır. Kronik diseksiyonlarda intimal yırtık bölgesi ve yalancı lümen zaman içinde endotel hücreleri ile kaplanmaktadır.

Ateroskleroz herhangi bir tip medial hastalıkla birlikte olabilir ve daha çok kronik anevrizmalı yaşlı hastalarda görülmektedir. Bu hastalarda yapılan gözlemler, incelenen aort segmentinin bulunduğu bölge aort kapağından ne kadar uzaksa aterosklerozun bulunma olasılığının o kadar yüksek olduğunu göstermektedir (3).

Aort duvarında mikroskopik olarak kronik yangısal hücrelerin, özellikle lenfositler, histositler ve plazma hücrelerinin intimal fibroz, medial dejenerasyon ve adventisyal fibrozis-le birlikte bulunması aortiti yani inflamatuvar hastalığı düşündürmektedir. Bu bulgular aort-tanın makroskopik olarak kalın, beyaz ya da sedef şeklindeki görünümüyle birlikte değerlendirilmelidir. Diğer bir noktada inflamatuvar hastalık görülen segmente yakın bir aort segmentinin daha önce operasyon geçirip geçirmediği ve enfekte olup olmadığıdır. Sifilitik aorta klasik olarak aortitisin tüm karakteristik bulgularını içerir. Özellikle vazo vazorumların çevrelediği adventisyada plazma hücreleri ve lenfositler bulunur. Ayrıca vazo vazorumların endarteritisi ve perivasküler enflamasyon oldukça tipiktir. İnflamatuvar bir etiyoloji olduğu düşünülen hastalarda sıklıkla intimal hiperplazi izlenir. Aortanın kronik tüberküloz infiltrasyonunda diğerlerinden ayırt edilmesi zor bir aortitise yol açabilir. Aorta tüberküloz basili tarafından invaze edildiğinde asid-fast basilinin ve Lang-hans



dev hücrelerinin görülmesi mümkündür. Bir diğer bulguda bu hastalarda eritrosit sedimentasyon hızının yükselmesidir. Endemik yayılımın olduğu bölgelerde bu tip bir inflamatuvar anevrizma desendan torasik ve abdominal aortada görülebilir ve yayılım vertebra ya da akciğer gibi komşu dokulardan olabilir. Bununla birlikte genellikle çoğu olguda yayılım kan yoluyla (15).

### **C- İnsidans ve Risk Faktörleri**

Intratorasik yerleşimli olan anevrizmalarda en sık inen aort tutulumu mevcuttur. İnen aortayı sırası ile çıkan aorta ve arkus aorta tutulumu izler (11). Yeni intratorasik aort anevrizması gelişime sıklığı 5.9/100000 kişi-yıl olarak hesaplanmıştır (16). Hastalığın presentasyonu sırasındaki medyan yaş, erkeklerde 65, kadınlarda ise 77 olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalar ışığında intratorasik aort anevrizmalarında erkek/kadın oranları 1.1:1-1.7:1 olarak saptanmıştır (16, 17).

Intratorasik aort anevrizmalarının gelişmesi açısından önemli risk faktörleri arasında hipertansiyon, konjenital bikuspit veya uniküspit aort kapağı ve marfan sendromu sayılabilir (16, 17). Bu hastalarda ortak bir bulguda jeneralize aterosklerozdur. Sigara içme hikayesi, anevrizma gelişme riskini artırmaktadır (18).

Abdominal aort anevrizmalarında ise insidans 21-36/100000 kişi-yıl olarak bildirilmekle birlikte 50 yaş üzerinde bu insidansın %3'e çıktığı bildirilmektedir (19). Abdominal aort anevrizması genellikle yaşlı beyaz erkeklerin hastalığıdır. Beyaz ırkta 3.5 kez daha sıklıkla görülmektedir. Erkek/kadın oranı 4:1 olarak saptanmıştır (20). Abdominal aort anevrizmalarında risk faktörleri arasında ileri yaş, beyaz ırk, erkek cinsiyet, sigara içimi, pozitif aile öyküsü, hipertansiyon, koroner arter hastalığı, hiperkolesterolemi ve periferik vasküler okluziv hastalık sayılabilir (21).

### **D- Aort Anevrizmalarında Etyoloji**

Aort anevrizmalarının gelişiminde rol alan çeşitli etyolojik faktörler söz konusudur. Her etyolojik faktörün öne çıktığı yaş grupları farklılık gösterebilir. Aortik anevrizmaya yol açan hastalıklar şu şekilde sıralanabilir (11).

- 1- Annulo-aortik ektazi
- 2- Kistik medial nekroz
  - a) Primer
  - b) Marfan sendromu
  - c) Ehler-Danlos Sendromu
  - d) Psödoksantoma elastikum
  - e) Menkes Sendromu
- 3- Biküspid aort darlığı
- 4- Ateroskleroz
- 5- Kronik diseksiyon
- 6- Degeneratif
- 7- Enfeksiyöz aortit
  - a) Sifiliz
  - b) Tüberküloz
  - c) Mikotik
- 8- Vaskülitler
  - a) Takayasu arteriti
  - b) Behçet hastalığı
  - c) Ankilozan spondilit
  - d) Romatoid artrit
- 9-Travmatik

Çıkan aort anevrizmalarında en sık görülen etyolojik faktör %70 ile kistik medyal degenerasyondur (11). Kistik medyal degenerasyon terimi değişik derecelerdeki elastik liflerde fragmentasyon, düz kas hücre kaybını ifade eder.

Normalde çıkan aorta yüksek kompliansı olan bir arterdir ve elastik bir rezarvuvar olarak fonksiyon görür. Sistolde enerjiyi depolarken diastolde bu enerji akımın sürekliliği için kullanılır. Çıkan aortun kompliansı inen aorta göre daha fazladır ve daha fazla elastik lif içerir. Bu anatomik farklılık anevrizmaların etyolojisinde yansır (22). Diğer etyolojik faktörler ise ateroskleroz, kronik diseksiyon, marfan sendromu ve bikuspit aort kapağıdır.

Arkus aort anevrizmalarının büyük bir kısmı çıkan aort anevrizmalarının proksimal arkusunda içine alması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Arkus aortanın anevrizmal lezyonları genellikle medyal degenerasyon ve aort diseksiyonları sonucu gelişmektedir. Aterosklerozda olaya sıklıkla eşlik eder (23).

İnen torasik aort anevrizmalarının nedenlerinin başında medyal degenerasyon (miksamatöz degenerasyon, senil aorta) gelmektedir. Her ne kadar aterosklerotik aort anevrizmaları bilinen risk faktörleri sonucu oluşsada inen aort anevrizmaları yaşla ilişkili olarak elastin ve kollajen metabolizmasındaki defektlere bağlı olarak meydana gelen degenerasyon sonucunda oluşur (24).

Torakoabdominal aort anevrizmalarında en önemli etyolojik faktör medyal degenerasyondur; ancak intimayı ilgilendiren aterosklerozunda çoğunlukla olaya eklendiği kabul edilmektedir. Diğer etyolojik faktörler ise aort diseksiyonu, marfan sendromu, ehler-danlos sendromu, mikotik ve takayasu arteritidir (25).

Abdominal aort anevrizmalarında ise en önemli etyolojik faktörün ateroskleroz olduğu bilinmekle beraber son zamanlarda multifaktöriyel nedenlerin de etyolojide rol oynadığı görülmektedir (26).

### **E- Aort Anevrizmalarında Klinik**

Tüm anevrizmalarının %75'i asemptomatiktir ve rutin muayenede, göğüs radyografisinde, başka nedenle yapılan ultrasonografide yada herhangi bir nedenle yapılan tanısal girişimler sırasında saptanmaktadır.

Semptomatik hastalarda çıkan yada arkus aortayı tutan anevrizmalarda kalp yetmezliği, rüptür, kardiyak tamponad, sağ kalp yetmezliği, superior vena kava sendromu, aritmi, üfürüm, ateş, geçici nörolojik olaylar, inme, atipik göğüs

ağrısı, sırt ağrısı, nefes darlığı, yutma güçlüğü, ses kısıklığı, aspirasyon, hemoptizi, çarpıntı sayılabilir.

İnen torakal aort anevrizması olan hastalar ise göğüs ve sırtta ağrı, parapleji, paraparezi ve böbrek yetmezliği bulgu ve semptomları ile hastaneye başvurabilirler.

Abdominal aort anevrizmalarındaki bulgular ve semptomlar arasında karında hassasiyet ve kitle, belde ve kasıkta ağrı, bulantı, kusma, kilo kaybı, hematemez, melena, sarılık, böbrek yetmezliği, bacaklarda ağrı, batin distansiyonu ve vena kava inferior tıkanıklığı sayılabilir (1).

#### **F- Aort Anevrizmalarının Komplikasyonları**

Aort anevrizmaları anatomik yapısı ve komşulukları nedeni ile ciddi komplikasyonlara yol açabilirler. Aortun kendisine ait gelişebilecek komplikasyonların başında aortanın rüptürü gelmektedir. Anevrizmalı hastalar genellikle rüptür ve diseksiyon gibi komplikasyonlar nedeniyle kaybedilmektedir. Komplikasyonlar şu şekilde sınıflandırılabilir (11).

1- Aortaya ait: Rüptür, diseksiyon, trombüs

2- Anatomik komşuluklarına ait

a) Bası komplikasyonları

1- Solunum yollarına (dispne, stridor, öksürük)

2- Özafagusa (disfaji)

3- Vena kava superiora (vena kava superior sendromu)

4- Vena kava inferiora (ödem, asit, splenomegali)

b) Rüptür komplikasyonları

1- Perikardial tamponad

2- Plevral effüzyon

c) Eroziv komplikasyonlar

1- Gastrointestinal sisteme ait (hematemez, aortoenterik fistül)

2- Vasküler sisteme ait (vena kava superior veya inferior)

3- Solunum sistemine ait (bronşiyoller)

### **G- Anevrizmada Cerrahi Endikasyonlar**

Semptomatik hastalarda cerrahi konusunda herhangi bir tartışma yoktur. Burada önemli olan konu asemptomatik hastalarda cerrahinin zamanlamadır. Asemptomatik torakal aort anevrizmalı hastalarda anevrizma çapı, normal aortanın 2 katını geçtiğinde veya 5 cm'nin üzerinde olduğunda cerrahi önerilmektedir. Bu durum özellikle çapı 5 cm'nin üzerinde torakal aort anevrizması olan asemptomatik hastalarda cerrahi mortalitenin düşük olmasına dayanmaktadır. Bunun yanında 5 cm'den daha küçük çaplı torakal aort anevrizmalı hastalarda rüptür olasılığı yaklaşık %12'dir. Marfan sendromlu asemptomatik olgularda ise çapı 4.5 cm'lik anevrizmalar bile olsa yüksek rüptür riski nedeniyle cerrahi önerilmektedir.

Asemptomatik abdominal aort anevrizması olan hastalar için günümüzde, eğer yandaş belirgin bir hastalığı yoksa, aort çapı normal çapın 2 katını geçtiğinde veya anevrizma çapı 5 cm'nin üzerine çıktığında cerrahi önerilmektedir.

Sonuç olarak sağlıklı ve genç, ancak anevrizmalı bir olguda yandaş semptomlar varsa, anevrizma çapında artma izleniyorsa, çevre dokulara bası ya da erozyon semptomları, enfeksiyon, inflamasyon, distal embolizasyon varsa ve anevrizma sakküler bir yapı gösteriyorsa, çapı normal aort çapının 2 kat üzerine çıkmış veya 4 cm'yi geçmiş anevrizmalarda cerrahi önerilmektedir (1).

## **6- NİTRİK OKSİT**

### **A-Tanımı ve Tarihçesi**

Nitrik oksid (NO) lipofilik, kimyasal olarak stabil, reseptör bağımsız, bilinen en düşük molekül ağırlıklı serbest radikal bir gazdır (27). 1980 yılında Furchgott ve Zawadzki endotelial kaynaklı gevşetici faktörü (EDRF) keşfetmişlerdir (28). Daha sonra Palmer ve arkadaşları EDRF' nin kimyasal yapısının NO olduğunu ortaya koymuşlardır (29). 1987 yılında Hibbs ve

arkadaşları nitrik oksidin arginin aminoasidinden sentezlendiğini bulmuşlardır (30).

### **B- Nitrik Oksit Sentezi ve Nitrik Oksit Sentaz**

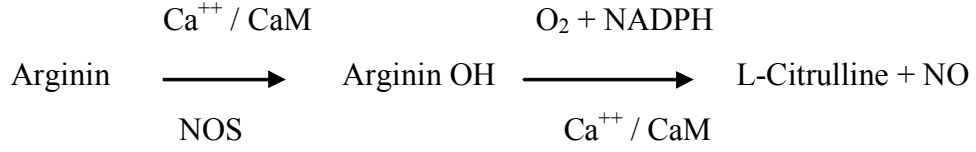
L-arginin aminoasidinden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile sentezlenen nitrik oksit, önemli bir endojen vazodilatatördür. NO sentezine aracı olan NOS enziminin, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), immunolojik nitrik oksit sentaz (iNOS), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) olmak üzere üç formu vardır (6, 27).

NOS'lar L-arginin nitrik oksit dönüşümünü iki basamakta katalizler (Şekil 1).

I – Argininden hidroksiarginin oluşumu; bu basamakta kofaktör olarak NADPH, moleküler oksijen, kalsiyum, kalmodilin ve tetrahidrobiopterin kullanılır. Bu basamağı karbonmonoksit bloke eder.

II – Hidroksi argininden nitrik oksit ve sitrüllin oluşumu; bu basamak oksidasyon işlemidir. NADPH, moleküler oksijen, kalsiyum, kalmodilin ve tetrahidrobiopterin kullanılır. Karbonmonoksit ve arginin analogları bu basamakta blokaj yapar. Ayrıca üretilen NO, NOS' un hem prostatik grubuna bağlanarak, bu basamakta negatif feed back ile üretimi azaltarak kontrolü sağlar (31).

Endotelial NOS ve nöronal NOS devamlı aktif halde iken, iNOS devamlı aktif olarak ortamda bulunmaz. İmmunolojik NOS toksik yada enfeksiyöz uyarı ile aktif hale gelir. İmmunolojik NOS kalsiyum bağımlı değildir. Fakat eNOS ve nNOS kalsiyum bağımlıdır. İmmunolojik NOS 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 moleküler messenger fonksiyonuna uygun olarak yüksek kontrol altında çalışır (32).



CaM: Calmodulin

### Şekil 1: L-Arginin'den Nitrik Oksid sentez yolu

Hipoksi makrofajlarda iNOS transkripsiyonunu uyarır. Ayrıca bir çok hücrede lipopolisakkarit ve sitokinler iNOS' u uyarır. eNOS için aralıklı 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 (32). Bir diğer kontrol yolu ise L-arginin ve kalmodülin miktarının kullanım sonucunda azalmasıdır. NOS enzimi L-argininin tükenmesi durumunda üzerine aldığı iki elektronu nitrik oksid sentezinde değil, süperoksit anion sentezinde kullanır. NOS, hem NO hem de süperoksit anyonu birlikte sentezleyebilir (32).

L-argininden NO oluşumu, N-monometil-L-arginin (L-NMMA), N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), N-nitro-L-arginin (L-NNA), N-amino-L-arginin (L-NAA) ve N-iminoetil-L-ornitin (L-NIO) gibi ajanlar tarafından kompetitif olarak inhibe edilebilir. Bu olay L-arginin verilerek tersine çevrilebilir. iNOS'un selektif inhibitörü ise aminoguanidindir (33).

### C- Nitrik Oksit'in Etki Mekanizması

Vasküler endotel damar duvarındaki kontraktileti, sekretuar fonksiyonları, mitojenik aktiviteyi ve damar lümenindeki hemostatik mekanizmayı kontrol eden dinamik bir endokrin organdır. Sorunsuz bir vasküler yapı için, vücudun en büyük endokrin organı olarak işlev gören endotelin damar duvarı ile dolaşım arasındaki hassas dengeleri koruma görevini uygun bir şekilde yerine getirmesi gerekmektedir.

NO lipofilik bir maddedir. Bu nedenle vasküler endotelden düz kas hücrelerine kolaylıkla difüze olarak, guanilat siklaz enziminin hem grubuna bağlanır. Bu enzimi aktif hale getirip, düz kas hücrelerinde siklik guanozin mono fosfat (cGMP) düzeyini yükseltir. Bu da protein kinaz G'yi aktive eder. Protein kinaz G ile oluşan düz kas gevşemesi başlıca şu mekanizmaları içerir (34).

Ca<sup>+2</sup>'un hücre içi depolardan salıverilmesinin inhibisyonu

Voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının inhibisyonu

Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> değiş-tokuşunun aktivasyonu

Fosfolipaz C'nin ve IP3 oluşumunun inhibisyonu

Ca<sup>+2</sup>'a bağımlı K<sup>+</sup> kanallarının aktivasyonu

cGMP miktarının artması, vasküler düz kas hücrelerinde gevşemeye, trombosit adezyon ve agregasyonunda inhibisyona sebep olur (32). Endotelden salınan major antitrombosit maddeler NO ve prostoglandin I2 (PGI2)'dir. NO ve PGI2 sinerjistik olarak cAMP düzeyini arttırarak trombosit agregasyonunu inhibe ederler. NO ve PGI2 sentez ve salınımının artması trombüs büyümesini inhibe eder. Sağlıklı bireylerde NOS inhibisyonu kanama zamanını uzatmıştır (35).

L-arjinin analogları (L-NMA, L-NNA, L-NAME, L-NIO) ve diğer NOS inhibitörleri, enzimi değişik oranlarda inhibe etmektedir. Yapılan inhibisyon denemelerinde endotel kaynaklı NOS'in inhibe edilmesi ile vazokonstriksiyon ve sonuçta hipertansiyon ortaya çıkmaktadır (33).

Bu inhibitörlerin insan ve hayvanlara verilmesi, NO sentezini durdurarak veya azaltarak NO'ın gerekli olduğu bütün fonksiyonları tersine çevirmektedir. Bu durumda insan ve hayvanlarda endotel kaynaklı vazodilatasyon mekanizması inhibe olduğu için hipertansiyon meydana gelmektedir. NO sadece sistemik dolaşımın regülasyonunu sağlamakla kalmaz ayrıca kalp, karaciğer, beyin gibi organlarda lokal dolaşımı da regüle etmektedir



(36). Nonkolinerjik ve nonadrenerjik terminallerden salınan NO, vazodilatatör etkiyle kan basıncı ve akışını düzenlenmektedir (37).

Düşük konsantrasyondaki NO, O<sub>2</sub>'e nazaran hemoglobine 3000 kat bir affiniteyle bağlanır. Hemoglobin oksijen formunda ise NO'yi kısa sürede nitrata (NO<sub>3</sub>) oksitleyerek etkisizleştirir. Özellikle dolaşımdaki oksihemoglobin NO için kuvvetli bir inhibitördür. NO, nitrite de (NO<sub>2</sub>) okside olabilir ancak nitrit tekrar oksitlenerek kısa sürede nitrata dönüşüm gösterir (34). Bu metabolitler böbrek yoluyla 5-8 saatte atılırlar. NO, diğer serbest radikaller gibi çok kısa yarılanma süresine sahip olup 2-30 saniye içinde daha stabil bir yapı olan nitrata oksitlenir (38, 39).

Bu vazodilatasyon mekanizması, dahili bir nitrovazodilatasyon sisteminin varlığını göstermektedir. Çünkü nitrogliserin ve Na-nitroprusid gibi nitrobileşikler uzun yıllar kliniklerde hipertansiyonun tedavisinde kullanılmıştır. Vücuda verilen bu maddeler sonuçta NO'ye dönüşerek etkilerini göstermektedirler (40).

Venlerin arterlere göre genellikle daha düşük miktarlarda NO salıverdikleri bulunmuştur. Bu da yapılan deneysel çalışmalarda, arter endotelinin NO sentez ve salıverme kapasitesinin venlere nazaran daha yüksek olması ile açıklanmıştır (40).

#### **D-Nitrik oksit ve anevrizma oluşumu:**

NOS tarafından NO üretimi, inflamasyon ve anevrizma patojenezinde önemli bir rol oynamaktadır (41). iNOS yoluyla olan NO üretimi birincil olarak inflamatuvar hücreler tarafından yapılır ve bu da elastini parçalayan ve ekstrsellüler matriksi bozan yüksek NO düzeylerinin ve toksik ürünlerin oluşmasına neden olur (42). Aksine eNOS yoluyla oluşan NO'nun, vasküler sistemde vazodilatatör etkisiyle koruyucu etki yaptığı bilinmektedir.

iNOS tarafından gerçekleştirilen NO üretiminin seçici bir inhibitörü olan aminoguanidinin (AG) anevrizma genişlemesini sınırladığı gösterilmiştir (41). Ayrıca abdominal aort anevrizmalı hastalarda eNOS geninin allel

polimorfizmlerinde ve vasküler NO üretiminin düşük olduğu bireylerde abdominal aort anevrizmasına yatkın olabileceği saptanmıştır (43).

Yapılan başka bir çalışmada ise serebral anevrizma formasyonunda, AG kullanılarak yapılan NO inhibisyonu ile anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir ve yüksek kan basıncıyla da ilişkili bulunmuştur (44).

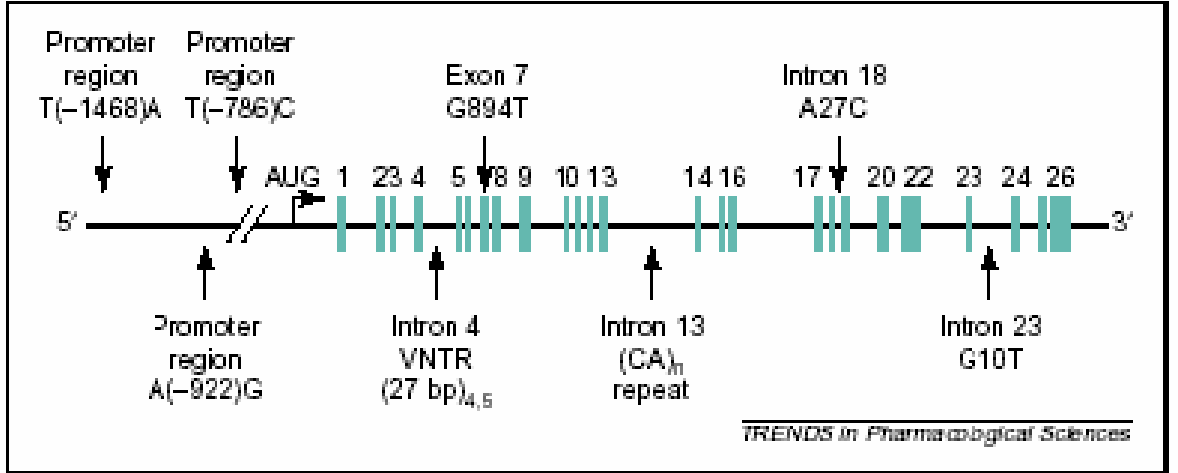
Kawasaki Hastalığı; çocukluk çağında görülen, koroner arter anevrizmalarıyla karakterize vasküler inflamatuvar hastalıktır. Bu hastalık, artmış NO düzeyi ile uyumlu artmış üriner nitrit/nitrat ve iNOS kofaktörleriyle birliktelik gösterir. Kawasaki hastalığında NO metabolitlerinin artan değeri, hastalığın şiddeti, seyri ve abdominal aorta içindeki retrograt holodiastolik akım ile korelasyon gösterir (44).

Bu bulgular NO'in anevrizma oluşumundaki rolünün önemini göstermektedir.

### **E- eNOS Geni ve Polimorfik Özellikleri**

eNOS geni kromozom 7q35-36'da lokalizedir ve 21 kb'lık 26 exon içerir (7). Bu gende meydana gelebilecek bir varyasyon NOS enziminde fonksiyon değişikliklerine yol açar ve devamında bir hastalık süreci gelişebilir (8). DNA'daki eNOS geni varyasyonları ile vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılmış pek çok araştırma mevcuttur. Bugüne kadar koroner arter hastalığı, miyokard enfarktüsü, hipertansiyon, stroke ve renal hastalıklar gibi pek çok vasküler bozukluk eNOS geni polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur (7). Ancak araştırma sonuçları ırklar arasında değişkenlik gösterdiğinden spesifik genetik varyantların sadece belli ırklara özgü olduğu düşünülebilir.

eNOS geninin, yakın bir zamanda fonksiyonel olarak polimorfik olduğu gösterilmiştir (Şekil 2) (9). Bu gen için çeşitli polimorfizmler tanımlanmış ve bu polimorfizmlerin NOS sentezinde ve salınımında düzensizliğe, bunun sonucunda da defektif vazodilatasyona neden olarak damar duvarının zayıflaması ile anevrizma gelişimine zemin hazırlamaktadır (7).



**Şekil 2:** eNOS geni ve çalışılan polimorfizm bölgeleri (9)

### 1- İnsan eNOS Genindeki Varyasyonlar

1990 ların ortalarında bu genin özellikleri bulunduğu için bu genin pek çok spesifik allelik varyasyonları tanımlanmıştır. Çeşitli kardiyovasküler hastalıklarla muhtemel bağlantıları araştırılmıştır. Bu araştırmalar Tablo 1’de gösterilmiştir (9). Kabaca üç çeşit varyasyon tanımlanmıştır; intron bölgesindekiler, ekson bölgesindekiler ve promotor bölgesindekiler. Bugün eNOS polimorfizimlerini ve hastalıklarla potansiyel ilişkilerine tanımlayan kırktan fazla yayın vardır (9). Bu araştırmalar tipik olarak ‘aday gen’ yaklaşımı ile yapılmışlardır. Şöyle ki; hasta genotipleri, hastalıkların insidansı ile ve yapılan testlerin istatistiksel olarak anlamlı sonuçları ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmalarda ana prensip; eNOS enzimidaki değişikliklerin (seviyesi, aktivitesi, lokalizasyonu gibi), kardiyovasküler hastalığa olan yatkınlıktaki değişikliklerle ilişkilendirilebileceğidir. eNOS enzimidaki spesifik allelik varyasyonlar, eNOS enzim özelliklerini direkt olarak etkiler ya da eNOS gen yapısında doğrudan etkiler yapabilecek başka keşfedilmemiş varyasyonlarla indirekt olarak ilişkilendirilir (9).

## 2- eNOS Geninde İtron Bölgesindeki Varyasyonlar

eNOS geninde tanımlanmış varyasyonların büyük çoğunluğu intronlar içindedir. İki tane tek nükleotid varyasyonu tanımlanmıştır; intron 18'de ‘‘Ala 27 Cys’’ ve intron 23 ‘‘Gly 10 Tyr’’ (9). Her ikisi de açıkça esansiel hipertansiyonla ilişkilendirilmiştir (Tablo 1) (45).

Ayrıca eNOS geninin intron 13 ve intron 4 bölgelerinde iki ayrı VNTR polimorfizmi bulunmuştur. Bazı çalışmalarda bunların vasküler hastalıklarla ilişkileri bulunmuştur. Örneğin; intron 13'te 37 kopyadan fazla CA (sitozin-adenozin) tekrarına sahip Kafkasyalılar'da koroner arter hastalığının riski artmıştır (46). İkinci bir VNTR polimorfizmi; intron 4'de, 5 (major alel) veya 4 (minör alel) kopyalı bir 27 bç tekrarı olması ile tanımlanmıştır. Tablo 1'dede görüldüğü gibi bu VNTR'ın kardiovasküler hastalıklarla 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. Bu çalışma, NOS genindeki polimorfizmle NOS enzim aktivitesinin, istatistiksel olarak anlamlı işlevsel ilişkisini gösteren tek çalışmadır (47).

## 3- Promotor Bölgesindeki Polimorfizimler

İkinci bir tip alellik varyasyonura promotor bölgede keşfedilmiştir. Bu variant tipinin, transkripsiyonu ve dolayısı ile enzim seviyelerini direkt olarak etkileme potansiyeli vardır. Nokayama ve arkadaşları eNOS geninin 5' flanking bölgesinde, bağlantılı 3 tane mutasyon olduğunu kanıtlamışlardır (48). Bunlar; ‘‘Thr 786 Cys’’, ‘‘Ala 922 Gly’’, ‘‘ Thr 1468 Ala’’ varyasyonlarıdır. Bu polimorfizimlerin insidansı, koroner vazospazmlı Japonlar'da, kontrollere oranla daha yüksek bulundu. eNOS varyasyonuna sahip olmanın koroner vazospazm için bağımsız bir risk faktörü olduğu ileri sürüldü (48).

#### **4- Ekson 7 Tek Nükleotid Polimorfizmi**

Üçüncü tip alellik varyasyon da eNOS için ekson 7’de tanımlanmıştır. Bu varyant proteinin pirimer yapısını değiştirir ve direkt olarak enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel özelliğini değiştirme potansiyeli vardır. Bu tek nükleotid polimorfizmi; pozisyon 894’te guanin’den timin’e, amino asid pozisyon 298’de glutamik asidin aspartik aside değişimiyle uyumludur. Geniş çaplı yeni bir çalışmada, bu varyantın diğer eNOS varyasyonlarına göre kardiyovasküler hastalık riskiyle nisbeten daha fazla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (48).

**Tablo 1:** İnsan eNOS geni polimorfizmleri ve hastalıklarla ilişkileri (9).

Polimorfizm	Yerleşim	Hastalık	Topluluk	Sonuç
İntron bölgesinde tek nükleotid polimorfizmi				
Ala27Cys	İntron 18	Hipertansiyon	Beyaz ırk	Anlamsız
			Japon	Anlamsız
Gly10Thy	İntron 23	Hipertansiyon	Japon	Anlamsız
İntron bölgesinde VNTR polimorfizmi				
VNTR (CA)n	İntron 13, 23	Diyabetik retinopati	Beyaz ırk	Anlamsız
	İntron 13	Migren	Beyaz ırk	Anlamsız
		Hipertansiyon	Beyaz ırk	Anlamsız
VNTR (27 bç)*	İntron 4	Plazma NO düzeyi	Beyaz ırk	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
		Hipertansiyon	Japon	Anlamlı
			Japon	Anlamsız
			Beyaz ırk	Anlamsız
		Koroner arter hastalığı	Beyaz ırk	Anlamlı
			Beyaz ırk	Anlamsız
			Japon	Anlamsız
		Miyokard enfarktüsü	Afro-americalı	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
		Primer glomerulonefrit	Beyaz ırk	Anlamsız
		Kronik böbrek yetmezliği	Japon	Anlamlı
		Diyalizle ilgili HT	Japon	Anlamlı
		İskemik SVH	Japon	Anlamsız
			Türk	Anlamlı
			Afro-americalı	Anlamlı
		Venöz tromboembolizm	americalı	Anlamlı
		Derin ven trombozu	Türk	Anlamsız
5' Promotor bölge varyasyonları				
Thr-786Cys	786 bç	Koroner arter hastalığı	Japon	Anlamlı
			Beyaz ırk	Anlamsız
Eksondaki varyasyonlar				
Gly894Thr	Ekson7(Glu298Asp)	Koroner arter hastalığı	Beyaz ırk	Anlamlı
			Beyaz ırk	Anlamsız
			Japon	Anlamlı
			Japon	Anlamlı
		Hipertansiyon	Beyaz ırk	Anlamsız
			Japon	Anlamlı
		Miyokard enfarktüsü	Beyaz ırk	Anlamsız
			Beyaz ırk	Anlamlı
		Pre eklampsi	Beyaz ırk	Anlamlı
		İskemik SVH	Türk	Anlamsız

\*bç: Baz çifti

## **7- POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ**

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. Denatürasyon, annealing (yapışma) ve DNA sentezi döngüsü sonradan birçok kez tekrarlanır. Amplifikasyonun bir döngüsünün ürünleri sonraki döngü için kalıp işlevi gördüğünden her bir başarılı döngü, temel olarak istenilen DNA ürününün miktarını ikiye katlar (49).

### **A- PCR Amplifikasyonunun Uygulama Alanları**

PCR amplifikasyonu 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 amplifikasyonları aşağıda sıralananları da kapsayan moleküler klonlama ve DNA analizindeki çeşitli uygulamalar için kullanılmaya başlanmıştır (50).

Prob olarak kullanım için, klonlanmış çift zincir DNA'nın özgül dizilerinin oluşturulması.

DNA'nın belirli parçalarının seçici amplifikasyon ile klonlanmış genler için proba özgül dizilerin oluşturulması.

Küçük miktar mrna'dan cdna kütüphanelerinin oluşturulması.

Dizi analizi için büyük miktar DNA'ların oluşturulması.

Mutasyon analizleri.

## **B- Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri**

Polimeraz zincir reaksiyonunun kesin koşulları ve döngünün her bir basamağının zamanı, çoğaltılacak bölgenin uzunluğu ve primerlerin dizisi tarafından belirlenir; etkisizleşmesi ve hazırlanmış kalıbın tam olmayan uzaması gibi durumlar oluşturur. Bu nedenle en uygun koşullar aşağıda sıralanmış PCR bileşenlerinde yapılacak düzenlemeler ile sağlanır (49).

Enzim (taq dna polimeraz)

Deoksiribonükleotid trifosfatlar (dntp)

Magnezyum derişimi

PCR tampon içeriği

Oligonükleotidler (primer)

Hedef diziler

Isılar ve döngü sayısı

### **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'ın 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 (50).

### **2- Deoksiribonükleotid Trifosfatlar**

Deoksiribonükleotid trifosfatların (dNTPs = dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 20-200 µM arasındaki derişimi verim, özgülük ve doğruluk arasındaki en iyi denge ile sonuçlanmaktadır (51).



### **3- PCR Tampon İçeriği**

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

### **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 reaksiyonunu gerçekleştirir (50).

### **8- ELEKTROFOREZ**

Sulu bir çözelti içinde çözünmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik akımının etkisi ile g etmesi sürecine elektroforez (elektrikle g) denir. Bu olay belirli bir yük dağılımı olan tampon içerisinde gerçekleştiğinden ve elektrik akımı kullanıldığından kısaca elektroforez adı verilmiştir (49).

### **9- GENETİK POLİMORFİZM**

İnsan genomunun bütün bölgeleri boyunca DNA yapısında zararsız kalıtsal varyasyonlar vardır. Yani bir bireyin genomu her 100-200 nükleotid de 1-2 baz değişimi içermekte fakat bu durum kişilerde önemli bir hastalığa yol amamaktadır. Bireyler arasındaki nükleotid baz dizilerindeki bu değişiklik "polimorfizm" olarak adlandırılır. İnsan genomunda yer alan DNA polimorfizm örnekleri genel olarak 3 grupta değerlendirilebilir (51):

#### **A- Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)**

DNA sarmalı zgl Restriksiyon Enzimi (RE) ile kesildiği zaman farklı uzunlukta fragmentler oluşur ve jel elektroforezinde gözlenir. Bu fragmentler RFLP olarak adlandırılır. RFLP'ler birçok hastalıkta kalıtsal marker olarak kullanılır. Eğer belirlenemeyen bir proteine ilişkin bir genin kalıtımını incelenmek

isteniyor ve bu gene bağlı olan RFLP'ler bulunuyorsa, ailede bu genin kalıtımını belirlemek için bu markerlerden yararlanılır (50).

### **B- Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeats:SSR)**

SSR belirleyicileri VNTR(Variable Number of Tandem Repeats)' 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 (49).

### **C- 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 varyasyon gösterirler. Bu varyasyonların eşit olmayan çapraz geçişler veya replikasyon kayması ile ortaya çıktığı düşünölmektedir. 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 (49).

VNTR'ın başlıca uygulama alanları:

Gen haritalanması

Kimliklendirme

Paternite testleri

Adli tıp

Prenatal tanı

Çeşitli hastalıklar ile ilgili odakların belirlenmesi.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 2005- 2006 yılları arasında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi (CÜTFAM) ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Anabilim Dallarının işbirliği ile yapılmıştır.

Çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulu tarafından onaylanmıştır. (Onay No: 2004-8/6 )

Çalışmada, klinik ve kontrastlı torakoabdominal bilgisayarlı tomografi ile aort anevrizması tanısı konulan 50 hasta ve 52 sağlıklı bireylerden alınan kanlar 1 ml EDTA içeren tüplerde biriktirildi. Aort anevrizmalı hastalar çalışma ve sağlıklı bireyler kontrol grupları olarak ayrıldılar.

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalında aort anevrizması nedeniyle opere edilmiş hastalar ile kliniğimize aort anevrizması ön tanısı ile başvuran hastalara çekilen torakoabdominal bilgisayarlı tomografi ile aortun herhangi bir segmentinde normal çapın transvers ölçümde iki katına çıkması durumunda hastalar çalışma grubuna dahil edildiler. Çalışmamız bu şekliyle retrospektif ve prospektif bir çalışmadır. Çalışmamızda cinsiyet ayrımı yapılmamıştır.

Kontrol grubu ise çekilen torokoabdominal bilgisayarlı tomografi ile aort anevrizması saptanmayan, yaş ve cinsiyet yönünden hasta grubuna benzer sağlıklı bireylerden oluşturulmuştur.

Çalışma ve kontrol gruplarına ait genomik DNA'lar Nucleo Spin Blood DNA izolasyon kiti (Nucleo Spin) kullanılarak elde edildi. Kromozom 7q 35-36 bölgesinde lokalize, eNOS genine ait, exon7 ve intron 4 bölgeleri, uygun primerler kullanılarak, PCR yöntemiyle çoğaltılıp elektroforezde yürütülerek kontrol edildi. Daha sonra, restrüksiyon enzimleri uygulanarak polimorfik olup olmadıklarına bakıldı. Çalışma ve kontrol gruplarından elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi.

## 1- DNA YALITILMASI

Çalışma ve kontrol gruplarındaki bireylerden alınan 5 ml kan, 1 ml EDTA (Sigma E- 5134, ABD) (%2) içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. Daha sonra yalıtım aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

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

İşlemin yapılışı:

\* 200  $\mu$ L kan, 25  $\mu$ L Proteinase K (Macherey-Nagel, Almanya) (6mg Proteinase K ve 260 $\mu$ L BW Buffer ) ve 200 $\mu$ L B3 tamponu vorteks (VELP) ile 10- 20 saniye karıştırıldıktan sonra 70°C'de 15 dakika bekletildi.

\* Her örneğe 210  $\mu$ L 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  $\mu$ L BW katılarak 11000 devir/dakikada 1 dakika santrifüj edildi.

\* NSBC'a 600  $\mu$ L 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 Eppendorf tüpe NSBC yerleştirildi. Üzerine önceden ısıtılmış BE tamponu 100 $\mu$ L 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.

## 2- MOLEKÜLER ANALİZ

### A- 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  $\mu\text{L}$ 'lik ve 10–100  $\mu\text{L}$ '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 $\mu\text{L}$
PCR Master Mix (Fermantas, Kanada)	12,5 $\mu\text{L}$
Primer (Forward) (IONTEK, Türkiye) (5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTT-3')	1 $\mu\text{L}$
Primer (Reverse) (IONTEK, Türkiye) (5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3')	1 $\mu\text{L}$
DNA	2 $\mu\text{L}$

Thermal Cyler 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)	1 µL
(5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3')	
Primer (Reverse) (IONTEC, Türkiye)	1 µL
(5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3')	
DNA	2 µL

Thermal Cyler 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.

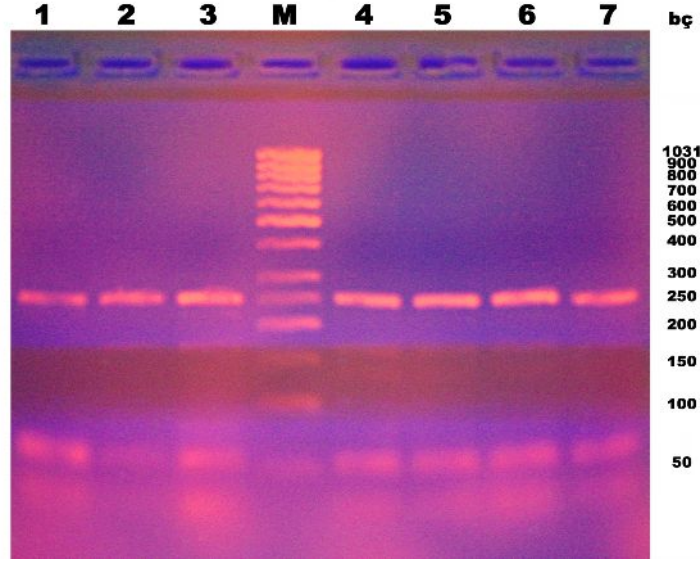
## **B- Elektroforez İşlemi**

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

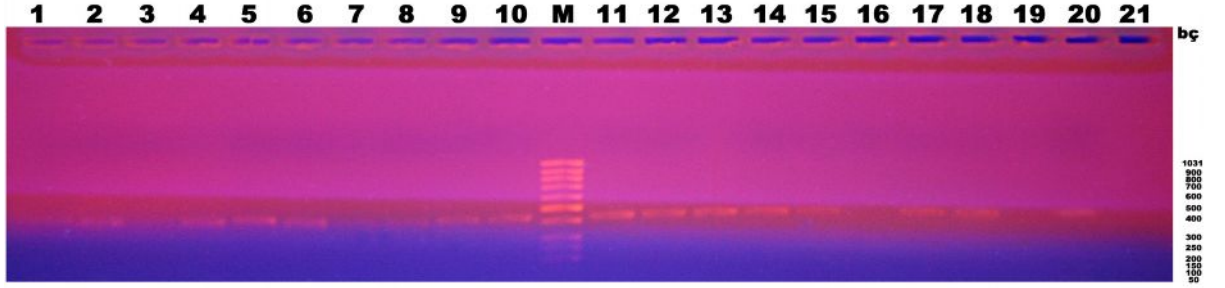
Daha önceden PCR işlemi yapılmış olan örneklerden 5  $\mu$ L alınıp 2  $\mu$ L Loading Dye (Fermentas, Kanada) katıldıktan sonra, PCR ürünleri ile Loading Dye'in birbirlerine karışmaları sağlandı. Daha sonra hazırlanan PCR ürünü ve Loading Dye karışımı bir otomatik pipet yardımıyla elektroforez tankına (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 yürütüldü.

## **C- Genotiplendirme**

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



Şekil 3: Exon 7 ait PCR örneği



Şekil 4: İtron 4 ait PCR örneği

#### D- 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'



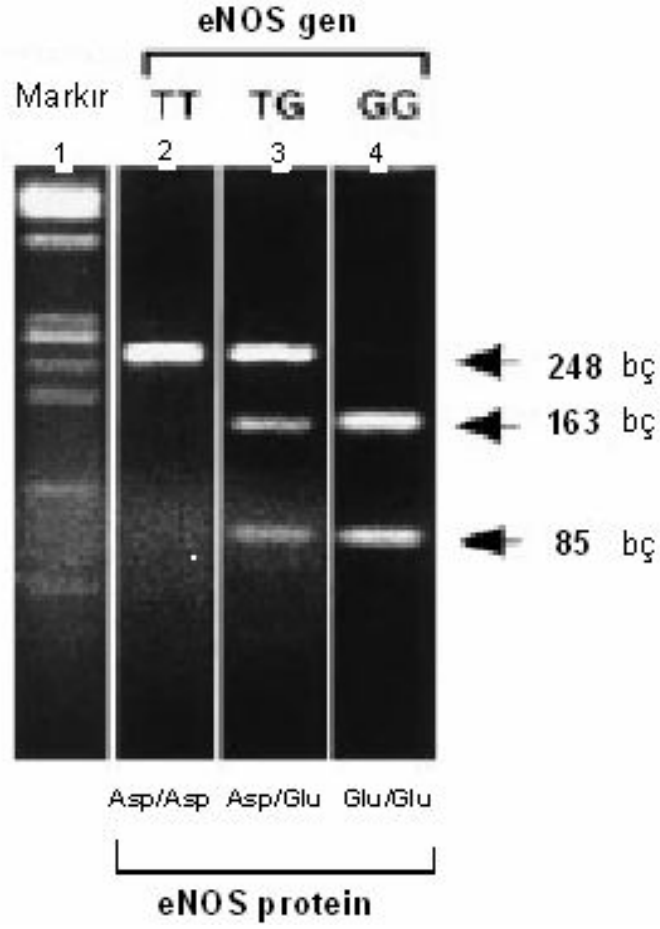
Her örnek içerikleri aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Damıtık su	3,5 $\mu$ L
Re buffer	2 $\mu$ L
Restriksiyon enzimi	1 $\mu$ L
PCR ürünü	5 $\mu$ L

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 ( $\pm 10$  bç). Örnekler jel görüntüleme sistemine konulup 260 nm dalga boyunda UV ışık altında değerlendirildi.

#### **E- eNOS Geninde Ekson 7’deki Glu298Asp RFLP Polimorfizminin Analizi**

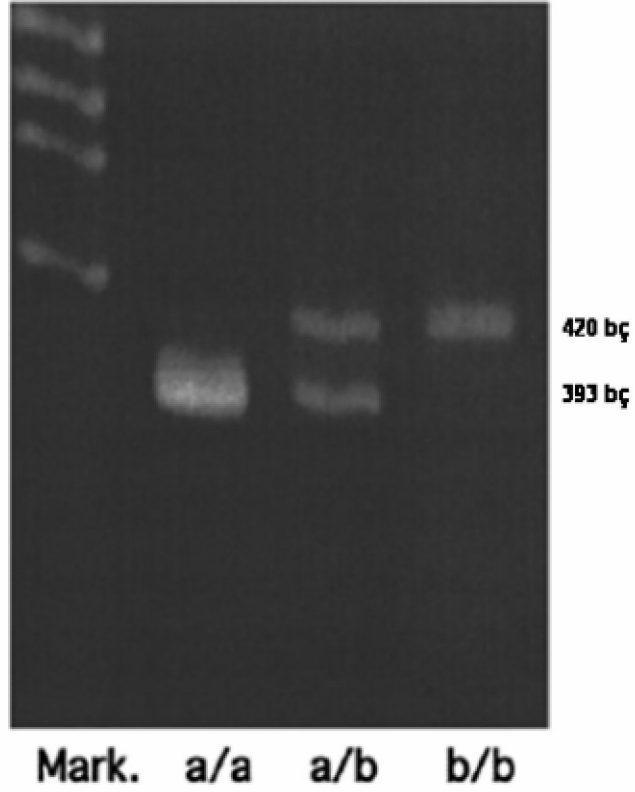
eNOS geninin ekson 7’deki RFLP polimorfizmi için yapılan işlemler sonunda görüntüleme sisteminde marker ile kıyaslama yapıldığında örneklerin BanII restrüksiyon enzimi için tanıma bölgesi içermeyenlerin 248 bç, bir tanıma bölgesi içerenlerin 163 + 85 bç ve tanıma bölgesi içeren ve içermeyen PCR ürünü bulunduranların 248 +163 +85 bç fragmanları şeklinde ayrılmaktadır. Bunlar sırasıyla a, b ve c alelleridir. Örneklerle ait 248 bç hizasında tek bir bant olduğunda a aleli (homozigot Asp/Asp ), 163 bç ve 85 bç hizasında iki bant varsa b aleli ( homozigot Glu/Glu ) ve 248, 163 ve 85 bç hizasında üç bant varsa c aleli (heterezigot Asp/Glu ) olarak genotiplendirme yapılmaktadır (Şekil 5 ).



**Şekil 5:** eNOS ekson 7 RFLP polimorfizmi (6).

#### **F- eNOS Geni İtron 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. Örneklere ait 420 bç hizasında tek bir bant olduğunda homozigot 4b/b (b aleli), 393 bç hizasında tek bir bant varsa homozigot 4a/a (a aleli), her iki bant da varsa heterezibot 4a/b (c aleli) olarak genotiplendirme yapılmaktadır (Şekil 6 ). 4 rakamı, 4. intron olduğunu belirtmektedir.



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

### **3- İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Çalışmamızın verileri SPSS (Ver: 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.

#### 4. BULGULAR

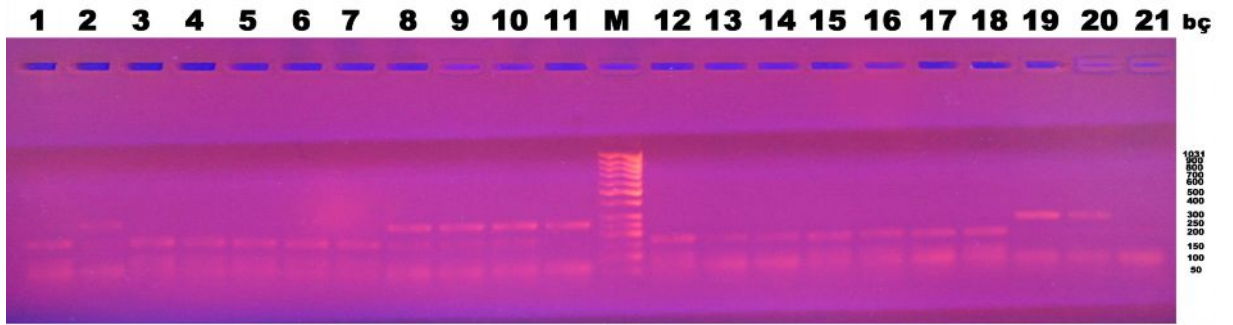
Çalışma grubumuzda 50 hastanın yaş ortalaması  $66.34 \pm 12.28$  (32-86), kontrol grubundaki 52 bireyin ise yaş ortalaması  $65.27 \pm 12.48$  (35-82)'di. Yaş yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel yönden önemsiz bulunmuştur ( $t=0.664$ ;  $p>0.05$ ).

Çalışma grubundaki bireylerin 32'si (%68) erkek, 16'sı (%32) kadındır; kontrol grubundaki bireylerin 38'i (%73.1) erkek, 14'ü (%26.9) kadındır. Cinsiyet yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $p>0.05$ ).

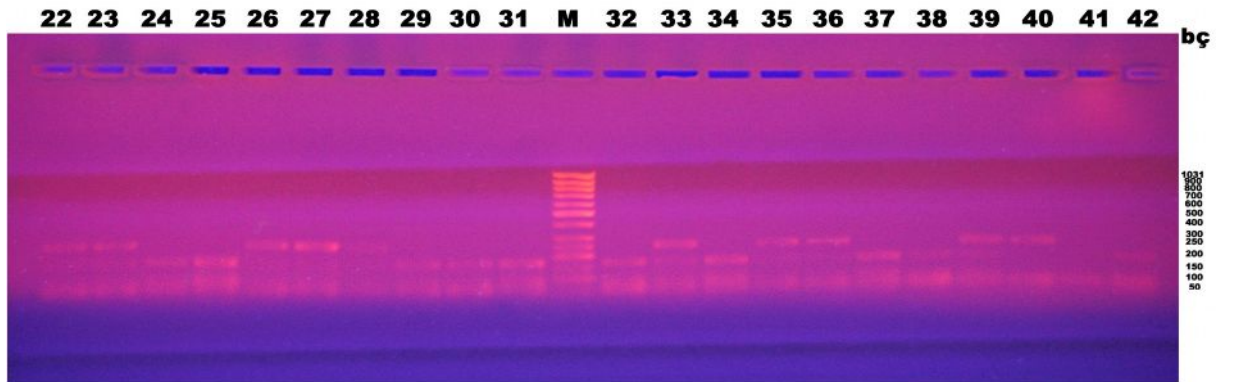
Çalışma grubunda 29 hastada çıkan, 19 hastada abdominal, 2 hastada torakal aort anevrizması mevcuttu.

##### 1- eNOS Geni Ekson 7 RFLP Polimorfizminin Alel ve Genotipleri

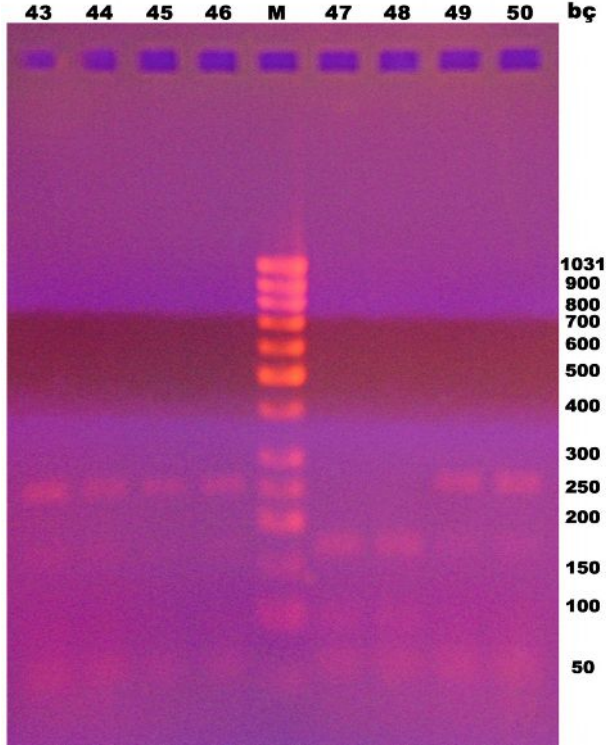
Hasta grubunun eNOS geni ekson 7 RFLP jel görüntüleri şekil 7'de kontrol grubunun eNOS ekson / RFLP jel görüntüleri şekil 8'de verilmiştir. Çalışma grubunda 50 aort anevrizmalı bireyin eNOS ekson 7'deki RFLP polimorfizmi açısından 28 adet b aleli (%57.1), 15 adet c aleli (%30.6), 6 adet a aleli (%11.2) saptandı. Çalışma grubunda 1 adet daha önce tanımlanmamış farklı kesim bölgeleri içeren RFLP jel görüntüleri elde edildi, farklı bir alel olduğu düşünüldü ve çalışma dışı bırakıldı. 52 bireyden oluşan kontrol grubunda ise 30 adet b aleli (%57,7), 12 adet a aleli (%23,1) ve 10 adet c aleli (%19,2) tespit edildi.



A

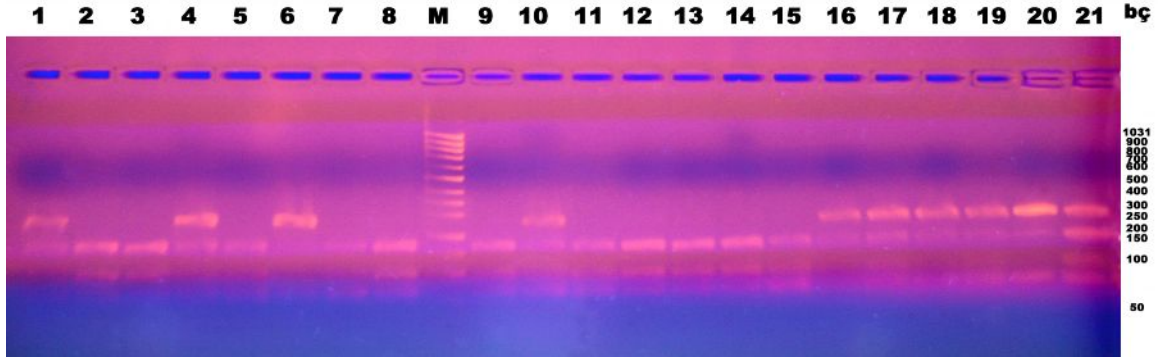


B

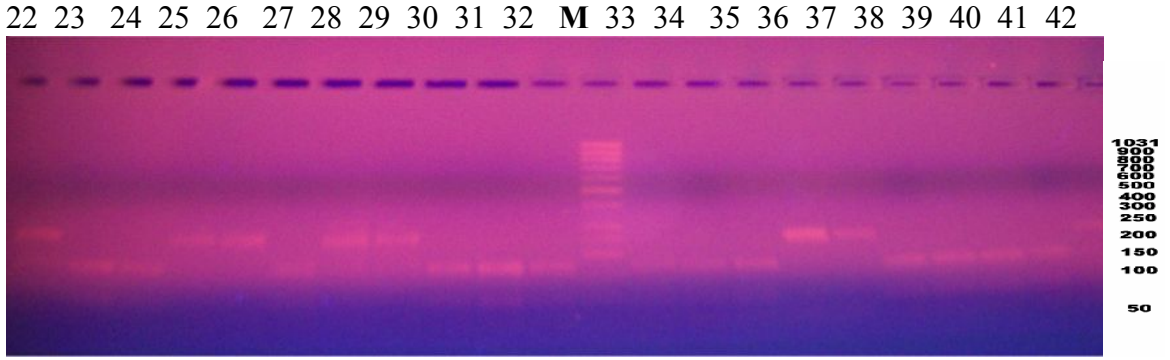


C

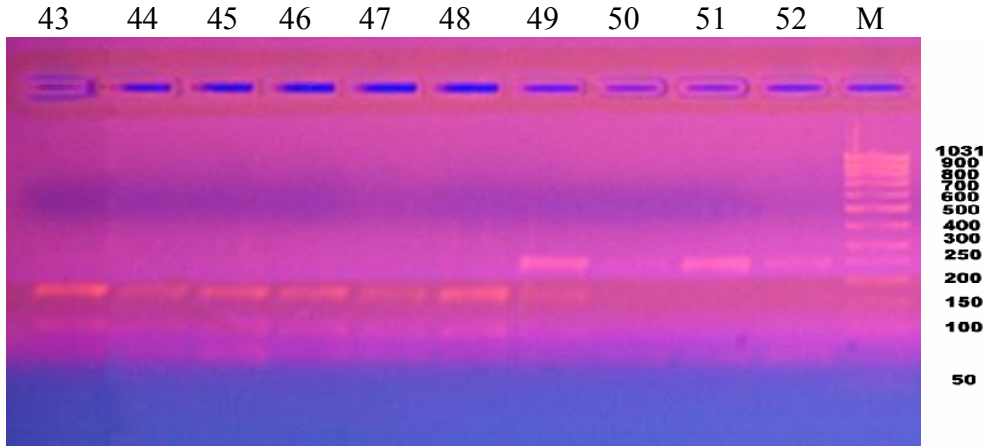
**Şekil 7 : A) 1-21, B) 22-42, C) 43-50** numaralı çalışma grubunun eNOS ekson7, %2'lik agaroz jel, BanII RFLP görüntüleri: **a aleli** (homozigot Asp/Asp): 2, 11, 19, 40, 47, 48 numaralı sütunlar. **b aleli** (homozigot Glu/Glu):1, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 34, 37, 38, 42, 43, 44, 45, 46 numaralı sütunlar. **c aleli** (heterozigotAsp/Glu): 8, 9, 10, 20, 22, 23, 26, 27, 28, 33, 35, 36, 39, 49, 50 numaralı sütunlar. 41 numaralı RFLP analizi çalışma dışı bırakıldı.



**A**



**B**



**C**

**Şekil 8 : A) 1- 21, B) 22- 42, C) 43- 52 numaralı kontrol grubundaki bireylerin eNOS ekson7, %2'lik agaroz jel, BanII RFLP görüntüleri: a aleli (homozigot Asp/Asp): 6, 22, 25, 26, 28, 29, 36, 37, 42, 50, 51,52 numaralı sütunlar. b aleli (homozigot Glu/Glu): 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14,15, 23, 24, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 43,44, 45, 46, 47, 48, numaralı sütunlar. c aleli (heterozigot Asp/Glu): 1, 4, 10, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 49 numaralı sütunlar.**

**Tablo 2:** eNOS geni ekson 7 polimorfizminin genotip frekansları.

Genotipler Gruplar	a		b		c		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Çalışma	6	12.2	28	57.1	15	30.6	49	100.0
Kontrol	12	23.1	30	57.7	10	19.2	52	100.0

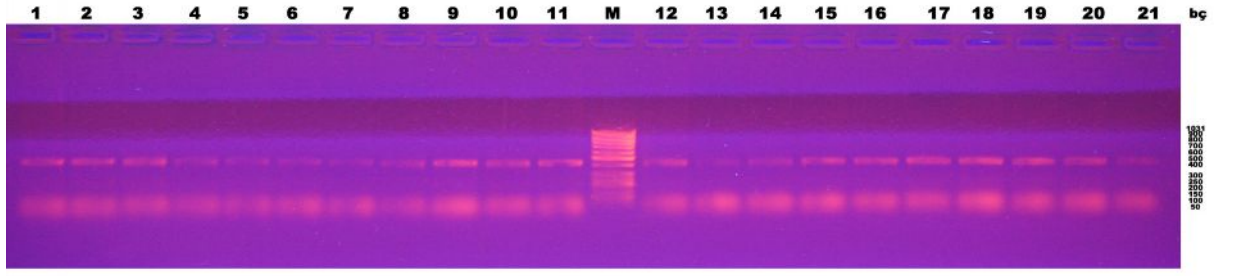
$$(\chi^2=2.982, p>0.05)$$

Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında; a, b ve c alelleri yönünden fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.005$ ). Hasta ve kontrol grubunda en fazla b aleli tesbit edilmiştir (hasta grubunda %57.1, kontrol grubunda %57,7).

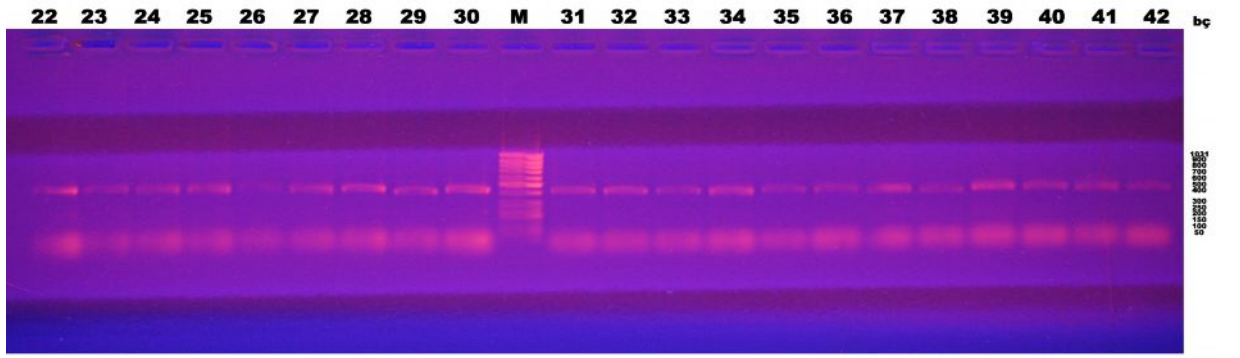
## **2- eNOS Geninin İtron 4 VNTR Polimorfizminin Alel ve Genotipleri**

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

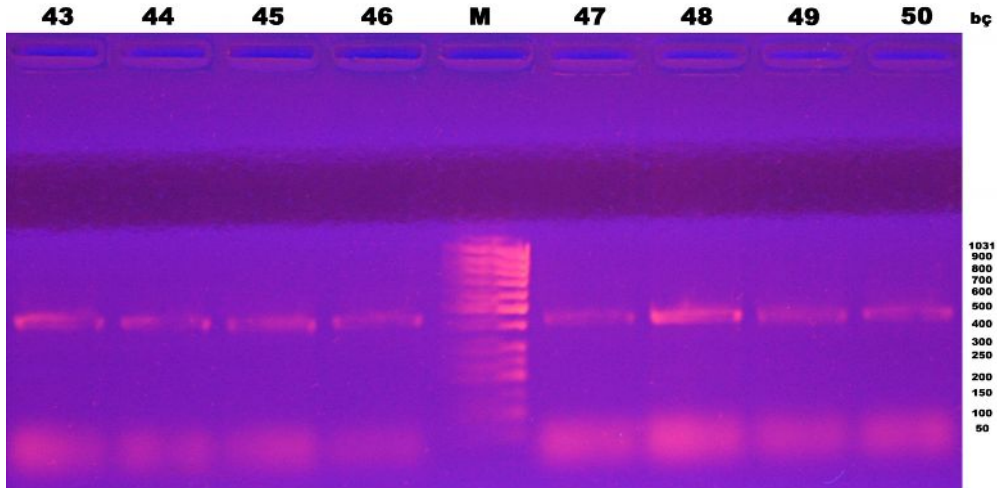




A

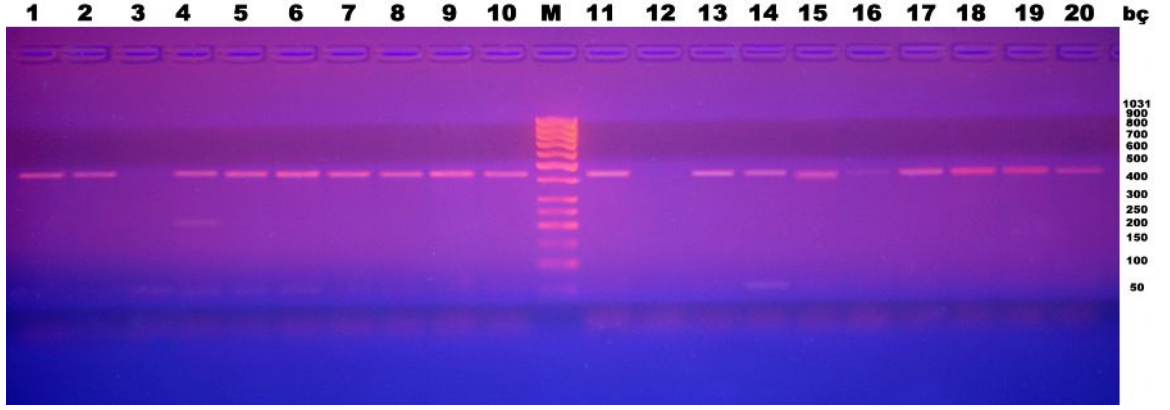


B



C

**Şekil 9:** Çalışma gurubuna ait 50 bireyin, eNOS intron 4, %2'lik agaroz jel, VNTR polimorfizmi analizi görüntüleri: Tümü b aleli



**Şekil 10:** Kontrol gurubuna ait 20 bireyin, eNOS intron 4, %2'lik agaroz jel, VNTR polimorfizmi analizi görüntüleri. Tümü b aleli.

Hasta ve kontrol gruplarında yapılan VNTR polimorfizmi çalışmasında tüm denekler b aleli olarak bulunmuş. Çalışma ve kontrol grupları arasında bir fark bulunmamıştır.

## 5. TARTIŞMA

Endotel damar yapısının korunmasında en önemli homeostatik düzenleyicidir. Endotel sağlıkta ve hastalıkta kalp ve damar işlevlerinin devamlılığını sağlayan önemli bir organdır. Endotelin en önemli görevleri vazodilatasyonun sağlanması, düz kas hücre büyümesinin ve inflamatuvar yanıtın baskılanmasıdır. Bu görevler büyük ölçüde en önemli endotelial vazodilatatör olan nitrik oksit tarafından sağlanmaktadır (36).

Endotelden düzenli olarak salınan ve eNOS enzimi tarafından sentezlenen nitrik oksitin, düzenli bir vazodilatasyon sağlayarak vasküler yatakta koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir (7).

Düzensiz salınan nitrik oksit damar duvarında zayıflıklara ve hasara neden olarak anevrizma gelişimine yol açtığı da düşünülmektedir (7). NO sentezinin düzensizliği, ekstrasellüler matriksin önemli bir yapı taşı olan elastin proteininin miktarını değiştirmek sureti ile damar duvarının zayıflamasına neden olmaktadır (6).

Nitrik oksitin anevrizmal hastalıklarda belirgin bir rol oynadığını gösteren kanıtlar giderek artmaktadır (52). İnsan aort anevrizmalarında nitrik oksitin major metaboliti olan nitrik düzeyleri normal aortlara göre yedi kat artmıştır ve nitrit bu konsantrasyonlarda invitro olarak elastini parçalayacak derecededir (42).

Jason M. Johanning'in yaptığı çalışmada, ratlarda deneysel olarak oluşturulan anevrizmaların nitrik oksit inhibitörleri olarak bilinen L-NAME ve aminoguanidin verilerek anevrizma gelişmesinin engellendiği gösterilmiştir (52). Bu çalışma, nitrik oksitin anevrizma gelişiminde erken safhada bir faktör olarak rol oynadığı ve anevrizma oluşumunda yeni bir bakış açısı sağlamaktadır (52).

Kawasaki hastalığı; çocuklukta görülen ve koroner arterlerde anevrizma oluşumuyla karakterize vasküler ve inflamatuvar bir hastalıktır (44). Bu hastalık, artmış nitrik oksit düzeyiyle uyumlu artmış üriner nitrit birlikteliği gösterir (44). Kawasaki hastalığında nitrik oksit metabolitlerinin artan değeri,

hastalığın şiddeti, seyri ve abdominal aort içindeki retrograd holodiyastolik akım ile korelasyon gösterir (53).

Bu çalışmada, eNOS geninde sık karşılaşılan polimorfizmlerden olan, ekson 7'deki RFLP ve intron 4'deki VNTR polimorfizmleri ile aort anevrizması gelişimi arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla çalışma ve kontrol gruplarının bireylerinden elde edilen DNA'larda eNOS geninin polimorfizmlerine bakılarak her iki grup arasında alel 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 türk toplumunda aort anevrizmalı hastalarda eNOS gen polimorfizmi açısından ip uçları oluşturacağını düşünmekteyiz. Daha önce Cinzia Fatini ve arkadaşlarının yaptığı ve literatürde bizim çalışmamıza benzeyen tek çalışmada sadece abdominal aort anevrizmalı hastalar çalışmaya dahil edilmiştir (54). Bizim çalışmamızda ise farklı olarak abdominal aort anevrizmalarının dışında aortun diğer segmentlerinde de anevrizması olan hastalar çalışmaya dahil edilerek bu grupta ekson 7'deki RFLP ve intron 4'deki VNTR polimorfizmlerini araştırılmıştır. Çalışmamız bu şekliyle yapılan ilk çalışmalardan biridir.

eNOS geninin ekson, intron ve promotor bölgelerinde pek çok polimorfizm tanımlanmıştır. Fakat bu bulgular yapılan ülkelere göre farklılıklar göstermiştir (6, 9). Bugüne kadar eNOS geni polimorfizimleri ile ilgili en çok çalışma ekson 7'deki Glu298Asp (G894T) polimorfizmi ve intron 4'deki VNTR polimorfizmidir. Bunların her ikisi de koroner arter hastalığı, koroner spazm, hipertansiyon ve bazı vaskülitler gibi pek çok damarsal patolojilerin gelişiminde katkıda bulunduğu gösterilmiştir (6, 9, 46, 48, 54).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bizim çalışmamızda kullandığımız iki polimorfizm (ekson 7'deki Glu298Asp (G894T) ve intron 4'deki VNTR polimorfizmi) eNOS geninin fonksiyonlarındaki bozukluk ile ilişkili bulunmuştur (47, 55). Öyleki: eNOS genindeki bu tip fonksiyonel DNA varyantları, eNOS ekspresyonunda ve enzimatik aktivitede değişikliklere neden olabilir. Diğer taraftan endotelyuma bağlı akım aracılı vazodilatasyon

endotelial NO tarafından yapılır ve vasküler hastalıklarda bozulmuştur (6, 56). Bu nedenle gen polimorfizmine bağlı olarak değişen eNOS ekspresyonu endotelial NO salınımını etkilemektedir. Bu da vasküler hastalıklardaki endotelial disfonksiyonun asıl nedeni gibi görülmektedir. Bundan başka; bazal nitrik oksit azalmış üretimi, endotelial disfonksiyon, tromboz ve aterosklerotik bozukluklara yol açıyor olabilir (57, 58).

Yaptığımız çalışmada eNOS geni intron 4 VNTR polimorfizmi frekansı aort anevrizmalı çalışma grubu ve kontrol grubunda anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bu polimorfizm açısından hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda tüm örnekler b genotipi (homozigot b/b) genotipine sahiptir. Yapılan bazı çalışmalarda da bu polimorfizmin damarsal hastalıklarla anlamlı bir birlikteliği gösterilememiştir (6, 54).

Çalışmamızda araştırdığımız diğer bir polimorfizm eNOS geni ekson 7'deki Glu298Asp (G894T) polimorfizmiydi. Çalışma ve kontrol gruplarından elde edilen sonuçlar birbiriyle karşılaştırıldığında a (Asp/Asp), b (Glu/Glu) ve c (Asp/Glu) genotipleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir. Çalışma ve kontrol gruplarında en fazla b (Glu/Glu) genotipi saptanmıştır.

Cinzia Fatini ve arkadaşlarının abdominal aort anevrizmalı hastalarda yaptığı çalışmada, anevrizmalı hastalarda ve kontrol grubunda eNOS Glu298Asp (G894T) polimorfizmini araştırmıştır. Yaptığı çalışma sonucunda geleneksel risk faktörleri dışında eNOS Glu298Asp (G894T) polimorfizminin abdominal aort anevrizmasına yatkınlık oluşturan bir faktör olduğunu bildirmiştir (54). eNOS Glu298Asp (G894T) polimorfizmini eNOS fonksiyonunu bozarak yeterli nitrik oksit üretilmemesinden sorumludur (54, 57, 58, 59). Bizim çalışmamızda ise eNOS Glu298Asp (G894T) polimorfizmi açısından çalışma ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Cinzia Fatini ve arkadaşlarının aynı çalışmada araştırdığı diğer bir polimorfizm olan intron 4 VNTR polimorfizminde hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (54). Bizim çalışmamızda da Cinzia

Fatini ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak intron 4 VNTR polimorfizmi açısından çalışma ve kontrol grupları arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir.

eNOS'u kodlayan gen aort anevrizmaları için aday bir gen olarak ileri sürülmüştür ve bu genin polimorfik varyantları enzimin salınımı ve fonksiyonel aktivitesini etkilemektedir. Veldman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada eNOS geninin exon 7 bölgesinde Glu298Asp (G894T) polimorfizmi azalmış bazal nitrik oksit üretimiyle ilişkili bulunmuştur (59).

Tsudaka ve arkadaşları intron 4 VNTR polimorfizmi ile plazma NO metabolitleri düzeyi arasındaki ilişkiyi sağlıklı erişkinlerde araştırmış ve a genotip sahibi deneklerin plazma NO metabolitlerinin düzeyini b genotip sahibi deneklerden anlamlı şekilde daha düşük bulmuşlardır (47). Moon ve arkadaşları ise Glu298Asp (G894T) polimorfizmi ile plazma NO metabolitleri arasında bir ilişkinin olmadığını ileri sürmüşlerdir (60).

eNOS ekson 7 polimorfizminin işlevsel sonucu tam olarak bilinmemektedir. Ekson 7 polimorfizmi ile eNOS sentezindeki değişiklikler, NO sentezini değiştirmek yolu ile anevrizma gelişimine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Çünkü sıçan modellerinde edinilen deneysel veriler göstermiştir ki eNOS yokluğunda damarsal remodeling bozulmakta ve damar duvar kalınlığı artmaktadır (61).

Khurana ve arkadaşlarının kafa içi anevrizmaların yırtılması ile ilgili yaptığı çalışmada eNOS T-786C tek nükleotid polimorfizminin, anevrizmaların yırtılma riskini belirleyebilecek bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (62). Akagawa ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise kafa içi anevrizma boyutu ile eNOS geni T-786C polimorfizmi arasında bir ilişki tespit edememişlerdir (63).

Yaptığımız çalışmada türk toplumundaki aort anevrizmalı hastalarda eNOS geninde intron 4 VNTR ve ekson 7 Glu298Asp (G894T) polimorfizmi kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı çıkmamıştır. Ancak bu birliktelik ırklar arasında farklılık gösterebileceğinden bizim çalışmamıza benzer çalışmalar başka ırklarlarda yapılmalıdır (6, 9).

eNOS geni polimorfizmi ile aort anevrizmaları arasındaki ilişki henüz tam açıklanabilmiş değildir. Fakat yapılan çalışmalar eNOS geninin genetik varyasyonlarının kardiyovasküler hastalıklara yatkınlığı önemli derecede arttırdığı bilinmektedir. Bununla birlikte eNOS genini inceleyen daha geniş kapsamlı genetik çalışmalara ihtiyaç vardır. Aort anevrizmasından sorumlu genlerin bulunması, hastalıkların erken tanısına olanak sağlayacaktır. Endotele etki eden diğer genlerinde eNOS geni ile birlikte incelenmesi hastalık mekanizmaları hakkında daha detaylı bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır.

## SONUÇLAR

1- eNOS geni ekson 7'deki Glu298Asp RFLP polimorfizmi ile aort anevrizma varlığı arasında ilişki tespit edilememiştir.

2- eNOS geni intron 4 VNTR polimorfizmi ile aort anevrizma varlığı arasında ilişki tespit edilememiştir.

3- Geniş populasyonla yapılan çalışmalarla birlikte, eNOS'un diğer bölgelerini yada henüz aydınlatılmamış bölgelerini de inceleyen daha geniş kapsamlı genetik çalışmalara ihtiyaç vardır.

4- Aort anevrizmasında genetik polimorfizmlerin tespiti, riskli grupların erken tanı ve tedavisine olanak sağlayacaktır.



## KAYNAKLAR

- 1- Aort Cerrahisi Dr. Suat Büket, Dr. Tahir Yağdı Bölüm 10 sayfa 259-261
- 2- Reilly JM: Abdominal aortic aneurysm: Incidence, etiology and pathogenesis. In Callow AD, Ernst CB, editors: Vascular surgery: Theory and practice, ed1. Stamford, Conn.1995. Appleton and Lange
- 3- Svensson LG, Crawford ES: Aortic dissection and aortic aneurysm surgery: clinical observations, experimental investigations and statistical analyses. Part II Curr Probl Surg 1992; 29: 915-1057.
- 4- Baxter BT, McGee GS, Shively VP, et al: Elastin content, cross-links and mRNA in normal and aneurysmal human aorta. J Vasc Surg 1992, 16:192-200
- 5- Treiman RL, Hartinian SL, Cossman DV, et al: Late results of small untreated abdominal aortic aneurysms. Ann Vasc Surg 1991; 5: 359-362.
- 6- J U Kim, H K Chang, S S Lee, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behçet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. Ann Rheum Dis 62: 1083-1087.
- 7- Vini G, Khurana MD, PhD; Youvraj R, Sohni PhD; Wells I. Mangrum: Endothelial nitric oxide synthase T-786C Single nucleotide polymorphism. A Putative genetic marker differentiating small versus large ruptured intracranial aneurysms. Stroke November 2003; 2555-2559
- 8- Tajouri L, Martin V, Ovcarić M, et al. Investigation of inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) polymorphism in a multiple sclerosis population. Brain Res Bull 64: 9- 13, 2004.
- 9- Suvara K Wattanapitayakul, Michael J. Mihm: Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. Trends in Pharmacological Sciences Vol.22 No 7 July 2001
- 10- Akar A R, Eryılmaz S, Elalmış A Ö. Aort anatomisi. Eren N T. Aort Cerrahisi. Çağdaş Medikal Kitapevi. Ankara 2003, 25-43

- 11- Kırallı K, Göksedef D, Kayalar N. İntratorasik Aort Anevrizmalarında Cerrahi Tedavi. Duran E. Kalp ve Damar Cerrahisi. Çapa Tıp Kitapevi. İstanbul 2004, 1587-1601
- 12- Can A. Aort Duvarının Mikroskopik Yapısı ve Gelişimi. Eren N T. Aort Cerrahisi. Çağdaş Medikal Kitapevi. Ankara 2003, 47-55
- 13- Solak H. Anevrizmalar. Damar Hastalıkları ve Cerrahisi. Selçuk Üniversitesi yaşatma ve geliştirme vakfı yayınları 1997, 29-30
- 14- Büket S, Engin Ç. Torakoabdominal Aort Anevrizmaları. Duran E. Kalp ve Damar Cerrahisi. Çapa Tıp Kitapevi. İstanbul 2004, 1633-41
- 15- Svensson LG, Cravford ES: Aortic dissection and aortic aneurysm surgery: clinical observations, experimental investigations and statistical analyses. Part III Curr Probl Surg 1993;30:172
- 16- Bickerstaff LK, Pairolero PC, Hollier LH, Melton LJ, Van Peenen HJ, Cheery KJ, Joyce JW, Lie JT: Thoracic aortic aneurysms: a population-based study. Surgery 1982;92:1103-8
- 17- Presler V, McNamara JJ: Thoracic aortic aneurysm: natural history and treatment. J Thorac Cardiovasc Surg 1980;79: 489-98
- 18- Dapunt OE, Gala JD, Sadeghi AM, Lansman SL, Mezrow CK, deAsla RA, Quintana C, Wallenstein S, Ergin AM, Griep RB: The naturel history of throctic aortic aneurysm. J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 107:1323-32
- 19- Svensson LG, Crawford ES. Degenerati ve Aortic Aneurysms. Cardiovascular and Vascular Disease of the Aorta 1997;3:29-41
- 20- Taylor LM, Porter LM. Basic data related to clinical decision-making in abdominal aortic aneurysm. Ann Vasc Surg 1980; 1:502-504
- 21- Alcorn HG, Wolfson SK Jr, Sutton-Tyrrell K, et all. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in the cardiovascular health study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16:963

- 22- Andreotti L, Bussotti A, Cammelli D, di Giovine F, Sterrantino G, Varcasia G, Arcangeli P: Aortic connective tissue in atherosclerotic aorta-a biochemical study. *Angiology* 1986; 37:735-43
- 23- Akar R A. Arkus Aorta Anevrizmaları. Eren N T. Aort Cerrahisi. Çağdaş Medikal Kitapevi. Ankara 2003, 227-9
- 24- Crawford ES, Crawford JL, Safi HJ, et al. Thoracoabdominal aortic aneurysms: Preoperative and intraoperative factors determining immediate and long-term results of operations in 605 patients. *J Vasc Surg* 1986; 3:389-404
- 25- Eren N T. Torakoabdominal Aort Anevrizmaları. Eren N T. Aort Cerrahisi. Çağdaş Medikal Kitapevi. Ankara 2003, 248-51
- 26- Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC: Suggested standarts for reporting on arterial aneurysms. *J Vasc Surg* 1991;13:452-458
- 27- Broderick JP, Brott TG, Tomsick T: Intracerebral Hemorrhage More than twice as common as subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 78: 88–191, 1993.
- 28- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-6
- 29- Palmer R M J, Ashton D S, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesized nitric oxide from L-arginine. *Nature*.1988; 333: 644-6.
- 30- Iadecola C: Nitric Oxide Participates in the Cerebrovasodilatation Elicited From Cerebellar Fastigial Nucleus. *Am J Physiol Nov*: 263: 1156-61, 1992.
- 31- Jesung Moon, Suin Yoon, Eunkyung Kim, et al. Lack of evidence for contribution of Glu298Asp (G894T) polimorphism of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Thrombosis Research* 107: 129-134, 2002.

32- Jan M. Friedman, Fred J Dill, Michael R. Hayden, Barbara C. McGillivray. Genetik. The National Medical Series for Independent Study. Türkçe çeviri, editör Ferda Özkınay, Cihangir Özkınay. Saray Tıp Kitabevleri, 1995, Bornova İzmir.

33- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide. Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.*1991 43: 109-42.

34- Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F, Hofmann F. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase. *I.J Exp Med* 1999;189:1255-64

35- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987; 92:639-46

36- Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis (USA)* 1995; 38 (2): 87-104

37- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994;120:227-237

38- Star RA. Nitric oxide. *Am J Med Sci (USA)*.1993;306(5):348-58

39- Tayeh MA, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate: Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem.*1989;264:19654-8

40- Ignarro LJ. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension (USA)*.1990;16(5):477-83

41- Jason M, Johanning MD, Peter J, Armstrong MD, David P, Franklin MD: Nitric oxide in experimental aneurysm formation: Early events and consequences of nitric oxide inhibition. *Ann Vasc Surg* 2002;16:65-72

42- Paik DC, Ramey WG, Dillon J: The nitrite/elastin reaction: implications for in vivo degenerative effects. *Connect Tissue Res* 36:241-251,1997.

43- 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. 39:537-9, 2000.

44- Lizuka T, Oishi K, Sasaki M, et al. Nitric oxide and aneurysm formation in Kawasaki disease. Acta Paediatr 1986:470-473, 1997.

45- 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.

46- 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.

47- 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.

48- 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.

49- Akar N: Klinik Moleküler Patolojiye Giriş. Birinci baskı, Ankara, A.Ü. Tıp Fakültesi Bilimsel Yayınlar Serisi, 2000, 95-135.

50- Başaran N: tıbbi genetik ders kitabı. 7. Baskı, Ankara, Güneş ve Nobel tıp kitabevleri, 1999, 120-131.

51- Friedman JM, Dill FJ, Hayden MR: Medical Genetics. Harwal PUBLISHING, ABD: 1976.

52- Johanning JM, Franklin DP, Man DC, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase limits nitric oxide production and experimental aneurysm expansion. *J Vasc Surg* 2001; 33:579-586

53- Mori K, Hayabuchi Y, Kuroda Y, et al. Retrograde holodiastolic flow in the abdominal aort detected by pulsed doppler echocardiography in patients with Kawasaki's disease. *Eur J Pediatr* 2000;159:509-514

54- Cinzia Fatini, MD,PhD, Francesco Sofi, MD, Elena Sticchi, BS, Paola Bolli, BS, Ilaria Setsini, BS, Michela Falciani, MD, Leonidas Azas, MD, Giovanni Pratesi, MD. eNOS G894T polymorphism as a mild predisposing factor for abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2005; 42: 415-9

55- 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 cardiopummonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2832-2835, 2000.

56- Dhillon R, Clarkson P, Donald AE, Powe AJ, Nash M, Novelli V: Endothelial dysfunction late after Kawasaki disease. *Circulation* 102:1470-1472, 2000.

57- Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease *Mol Genet Metab* 70:241-251, 2000.

58- 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.

59- Veldman BA, Spiering W, Doevendas PA, Vervoort G, Kron AA, deLeeuw PW, et al. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. *J Hypertens* 2002;20:2023-7

60- 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.

61- Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodelling. *J Clin Invest* 1998;101:731-6

62- 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.

63- 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.