



T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KORONER KALP HASTALARINDA NIEMANN-PICK
TYPEC1 (NPC1) GEN POLİMORFİZMİ ANALİZİ**

Hazırlayan

Sibel DEMİR ÖZTÜRK

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Serbülenç Yiğit

TOKAT – 2013



T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KORONER KALP HASTALARINDA NIEMANN-PICK
TYPEC1 (NPC1) GEN POLİMORFİZMİ ANALİZİ**

Hazırlayan

Sibel DEMİR ÖZTÜRK

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Serbürent Yiğit

TOKAT – 2013

**KORONER KALP HASTALARINDA NIEMANN-PICK
TYPEC1 (NPC1) GEN POLİMORFİZMİ ANALİZİ**

Tezin Kabul Ediliş Tarihi: 27/ 12 / 2013

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU

Üye : Doç.Dr. Ataç ÇELİK

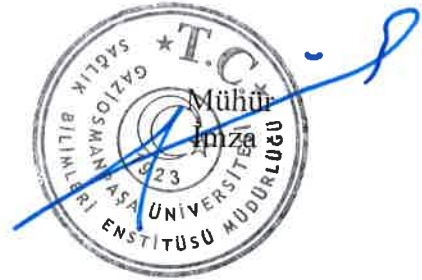
Üye : Yrd. Doç. Dr. Serbülent YİĞİT

İmzası



Bu tez, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulunun 14/01/2011 tarih ve 01/02 sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü: Dç. Dr. Hacı Ömer ATEŞ



T.C.

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(27/12/2013)

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı ve Soyadı

Sibel DEMİR ÖZTÜRK

İmzası



ÖNSÖZ

Eğitimim boyunca ilgi ve desteğini gördüğüm, tezimin hazırlık ve çalışma aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, değerli Danışman Hocam **Yrd. Doç. Dr. Serbülent YİĞİT**,e

Yüksek lisans eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkılardan dolayı Anabilim Dalı Hocalarımız, **Doç. Dr. H. Ömer ATEŞ**, **Yrd. Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU** ve **Yrd. Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ'a** saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde yer alan hasta gruplarının toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Kardiyoloji Anabilim Dalından, Sayın **Doç. Dr. Ataç ÇELİK'e**,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana gösterdiği yardımdan dolayı **Arş. Gör. Nihan BOZKURT'a**,

Yüksek lisans eğitimim süresince aynı çalışma ortamını paylaştığım ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum **arkadaşlarıma**,

Hayatımın her aşamasında bana desteğini esirgemeyen ve hep yanımda olan eşi olmaktan gurur duyduğum **Erkan ÖZTÜRK'e**,

Yanında bana bütün sıkıntılarımı unutturan biricik oğlum **Mert ÖZTÜRK'e**,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

ÖZET

KORONER KALP HASTALARINDA NIEMANN-PICK TYPE C1 (NPC1) GEN POLİMORFİZMİ ANALİZİ

Koroner kalp hastalığı dünyada morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir. Koroner kalp hastalığı damar duvarının içinde hücresel anormallikler, geniş bir moleküler diziye yol açan risk faktörlerinin birikimi ve genetik yatkınlığa bağlı olarak gelişmektedir. Niemann-Pick Type C1 (NPC1) geninin koroner kalp hastalığının patogeneğinde rolü olabileceğine dair kanıtlar mevcuttur. Bu çalışmada, Niemann-Pick Type C1 (NPC1) geninin +644 A→G polimorfizmi ve Koroner kalp hastalığı arasında bir ilişki olup olmadığının ortaya konulması amaçlandı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi yöntemi kullanılarak 100 Koroner kalp hastası ve 100 Koroner kalp hastası olmayan sağlıklı kontrolde NPC1'in genotipleri ve allel varyantların sıklığı araştırıldı. Veri sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi, NPC1 geninin +644 A→G polimorfizmi ile koroner kalp hastaları arasında allel ve genotip frekans dağılımında anlamlı bir bağlantı olduğunu gösterdi (p= 0.0002, OR: 1.96, %95 CI: 2.14 (1.42-3.24)). Çalışma sonuçlarımız Türk toplumunda NPC1 geninin +644 A→G polimorfizminin koronere yatkınlıkta rol alan pek çok genetik faktörden biri olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelime: NPC1 geni, Genetik yatkınlık, Koroner Kalp Hastalığı, Polimorfizm

ABSTRACT

ANALYSIS OF NIEMANN-PICK TYPE C1 (NPC1) GENE

POLYMORPHISMS IN CORONARY HEART DISEASE

Coronary heart disease is one of the leading causes of morbidity and mortality in world. Coronary heart disease develops dependent of genetic predisposition and the accumulation of risk factors that lead to a wide array of molecular and cellular abnormalities within the vessel wall. There is evidence suggesting that Niemann-pick Type C1 (NPC1) proteinin may be involved in the pathogenicity of Coronary heart disease. In this study, we aimed to investigate that if there is any relation between +644A→G polymorphism of gene and Niemann-pick Type C1 (NPC1) Coronary heart disease. We studied the frequency of the NPC1 genotypes and allelic variants in 100 patients with Coronary heart disease and 100 healthy non- Coronary heart disease controls using a Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphisms method. Statistical evaluation of the data results showed a significant Association for allelic and genotypic frequency distribution between the NPC1 +644 A→G polymorphism and Coronary heart disease ($p= 0.0002$, OR: 1.96, %95 CI: 2.14 (1.42-3.24)). Our study results suggest that NPC1 gene +644 A→G polimorphism may be one of the many genetic factors for coronary susceptibility in Turkish population.

Key Words: NPC1 gene, Genetic predisposition, Coronary heart disease, Polymorphism

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL İSTESİ.....	viii
KISALTIMA VE SİMGE LİSTESİ.....	ix
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Normal Koroner Arter</i>	3
2.2. <i>Koroner Arter Hastalığı (Ateroskleroz)</i>	4
2.2.1. <i>Ateroskleroz Tarihçesi</i>	4
2.2.2. <i>Aterosklerozun Tanımı</i>	5
2.2.3. <i>Ateroskleroz Epidemiyolojisi</i>	5
2.2.4. <i>Aterogenez Hipotezleri</i>	6
2.2.5. <i>Ateroskleroz Patogenezi</i>	8
2.2.6. <i>Aterogenezde Hücresel Olaylar</i>	9
2.2.7. <i>Ateroskleroz Risk Faktörleri</i>	10
2.3. <i>Kolesterol</i>	17
2.3.1. <i>Kolesterol ve Lipid Bağlayıcı Proteinler</i>	20
2.4. <i>Ateroskleroz Genetiği</i>	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. <i>Çalışma Grubu</i>	30
3.2. <i>Çalışmada Kullanılan Araç Ve Gereçler</i>	32
3.2.1. <i>Aletler ve Cihazlar</i>	32
3.2.2. <i>Kimyasal Maddeler</i>	33
3.2.3. <i>Çözeltiler</i>	34
3.3. <i>Yöntem</i>	35
3.3.1. <i>Genomik DNA İzolasyonu</i>	35

3.3.2. DNA'nın Kalitatif Tayini	36
3.3.3. DNA'nın Kantitatif Tayini.....	36
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pzr) Teknigi	37
3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Rflp) Analizi:.....	37
3.6. Elektroforez Tekniği	38
3.7. Npc1 Gen Polimorfizminin Analizi	39
3.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun (PZR) Analizi	39
3.7.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi:	41
3.8. İstatistiksel Yöntemler.....	42
4. BULGULAR	43
4.2. Dna'nın Kantitatif Tayini	45
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pzr) Analizleri.....	46
4.4. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Rflp) Analizleri.....	47
4.5. İstatistiksel Analiz Bulguları	48
5. TARTIŞMA VESONUÇ.....	49
6. KAYNAKLAR.....	57
7. ÖZGEÇMİŞ	69

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: 2013 Hipertansiyon klavuzunda yer alan koroner kalp hastalığı risk faktörleri	11
Tablo 2.2: Koroner arter hastalığı ile ilgili olduğu düşünülen bazı genler ve polimorfizmler	29
Tablo 3.1: Hastaların ve Kontrol Grubundaki Kişilerin Araştırmaya Dâhil Edilme ve Edilmeme Kriterleri	31
Tablo 3.2: NPC1 geni +644 A→G Polimorfizminin analizinde kullanılan Primerler	39
Tablo 3.3: NPC1 geni +644 A→G bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan PZR karışım	40
Tablo 3.4: NPC1 geni +644 A→G bölgesindeki polimorfizmin Belirlenmesinde kullanılan PZR programı	41
Tablo 3.5: NPC1 geni +644 A→G bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan enzim kesimi koşulları	42
Tablo 4.1: Çalışmaya alınan koroner kalp hastalarının ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımı	43
Tablo 4.2: Hasta ve Kontrollerin klinik karakteristik özellikleri	44
Tablo 4.3: Hasta ve Kontrol grubunun serum lipid düzeyleri açısından değerlendirilmesi Serum Lipid Seviyeleri (mg/dl)	44
Tablo 4.4: NPC1 gen polimorfizmi ile koroner arter hastalarında gözlenen klinik karakteristik özellikler	45
Tablo 4.5: NPC1 geninin (+644 A→G) polimorfizminin istatistiksel analizi	48
Tablo 4.6: NPC1 gen polimorfizmleri ve ilişkilendirilen hastalıklar	52

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1:** LDL'nin endositozu 19
- Şekil 2.2:** NPC1'in yapısı ve membrandaki konumu 21
- Şekil 2.3:** Kromozom 18'in polimorfik noktaları 22
- Şekil 4.1:** NPC1 geninin +644 A→G polimorfizmi içeren 412 bç'lik PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünümü 46
- Şekil 4.2:** NPC1 geninin +644 A→G polimorfizminin incelendiği NcoI restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiş PZR ürünlerinin % 2'lik (1,4 gr agaroz ve 0,6 gr nusieve) jel görünümü 47

KISALTMA VE SİMGE LİSTESİ

ACE	:	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ATG	:	Anjiyotensinojen
Apo-A1	:	Apolipoprotein-(a)
ABCA1	:	ATP Bağlayan Kaset Taşıyıcı
ATP	:	Adenozin Tri Fosfat
Bç	:	Baz Çifti
°C	:	Santigrat Derece
DM	:	Diyabetes Mellitus
Dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
ET	:	Endotelin
EDTA	:	Etilendiamintetra Asetik Asit
EtBr	:	Ethidium Bromid
FH	:	Hiperkolesterolemi
FCHL	:	Ailesel Kombine Hiperlipidemi
GWAS	:	Genom Çapı İlişkilendirme Çalışmalar
gr	:	Gram
ICAM-1	:	İnterselüler Adezyon Molekülü-1
HCl	:	Hidroklorik Asit
HDL	:	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HDL-K	:	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol
HMG-CoA	:	3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA reduktaz
HT	:	Hipertansiyon
IDL	:	Ara(orta) Yoğunluklu Lipoprotein
KAH	:	Koroner Arter Hastalığı
Kb	:	Kilo Baz
KDH	:	Kalp Damar Hastalıkları
KKH	:	Koroner Kalp Hastalığı
KVH	:	Kardiyovasküler Hastalık

LCAT	: Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LDL-R	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü
LP	: Lipoprotein
Lp(a)	: Lipoprotein(a)
MEF2A	: Miyosit Artırıcı Faktör 2A
Mg⁺²	: Magnezyum İyonu
Mg	: Mikrogram
ml	: Mikrolitre
MgCl₂	: Magnezyum Klörür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MCP 1	: Monosit Kemotaktik Protein
Mİ	: Miyokard İnfarktüsü
NaOH	: Sodyum Hidroksit
ng	: Nanogram
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentataz Enzim
NPC1	: Niemann-Pick Type C1
NPC2	: Niemann-Pick Type C2
NPC1L1	: Niemann Pick C1 Like-
PAH	: Polisiklik Arilhidrokarbonlar
PCSK9	: Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9
PDGF	: Platalet Kaynaklı Büyüme Hormonu
Pmol	: Pikomol
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RE	: Restriksiyon Endonüklea
RNA	: Ribonükleik Asit
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
Sn	: Saniye
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single-Nucleotid Polymorphism)

SREB	: Sterol Dzenleme Elemanına Bağlanan Protein
SCAP	: Sterol Ayırıcı Aktive Edici Protein
STR	: Kısa Ardışık Tekrarlar (Short Tandem Repeat)
TCDD	: Tetraklorodibenzop
TEKHARF	: Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri
TG	: Trigliserid
TK	: Total Kolesterol
TKD	: Türk Kardiyoloji Derneği
TBE	: Tris-Borat-Edta
T2D	: Tip 2 Diabet
USF1	: Transkripsiyonel Faktör Gen
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü -1
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
VLDL-K	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterolü
VNTR	: Değişken Sayıda Ardışık Tekrarlar (variable Number Of Tandem Repeat)
VSMC	: Vasküler Düz Kas Hücreleri
V	: Volt
3'UTR	: 3' Untranslated Region

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Koroner Arter Hastalığı (KAH), temelinde genellikle çocukluk çağında başlayan ilerleyici süreç “ateroskleroz” yer almaktadır (Koylan ve ark. 2000). Yirmi yıl kadar önce aterosklerozun, ilerleyici lezyonlarda lipid ve nekrotik artıkların birikimi nedeni ile dejeneratif ve progresif bir süreç olduğu düşünülmekte iken, son yıllarda, etkilenen arterin intimasında düz kas hücre birikimi olan multifaktöriyel bir süreç olduğu ortaya konmuştur.

KAH, gelişmiş ülkelerde en sık gözlenen mortalite ve morbidite sebebidir (Lloyd-Jones ve ark. 2010). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, 2005 yılında 17,5 milyon insanın kalp ve damar hastalıkları sebebiyle öldüğü ve bu rakamın küresel ölümlerin %30’unu teşkil ettiği tahmin edilmektedir. Eğer uygun önlemler alınmazsa 2015 yılına kadar her yıl yaklaşık 20 milyon insan daha kalp ve damar hastalıklarından, özellikle de kalp krizleri ve inmelerden hayatını kaybedecektir.

Amerika Birleşik Devletleri ve gelişmiş toplumlarda standart kardiyovasküler risk faktörleri (obezite, hipertansiyon, sigara, egzersiz yoksunluğu) yaygın olarak gözlenmektedir. Hedeflendiği üzere toplumun daha ideal bir kardiyovasküler sağlığa kavuşması için öncelikle giderek yaygınlaşan standart risk faktörleriyle mücadele gerekmektedir. Bu bağlamda önümüzdeki on yılda kardiyovasküler risk belirleyici olarak çoklu tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP) kullanarak kişinin koroner arter hastalığına yatkınlığını değerlendiren genetik risk skorum sisteminin de geçerliliği sorgulanmaktadır. Bunun sebepleri yatkınlık genleri bulunan kişilerde ileride hastalığı geliştirme riskinin ancak 1.1-1.7 kat artması (Casas ve ark. 2006), analiz edilen genlerin başka metabolik yollarda da rol alması sonucu birden fazla hastalığa neden olabilmesi, hastalığa yatkınlık genlerinin birbirleriyle ve çevresel faktörlerle etkileşiminin analiz edilmesindeki zorluk sebebiyle ortaya çıkan çok geniş ölçekli bir verinin varlığıdır.

Koroner arter hastalığında çevresel risk faktörleri, aile hikayesi ve genetik faktörler hastalığın oluşumuna her kişi için değişen ağırlıkta katkı sağlarlar (Nordlie ve ark. 2005). Hastalığa sebep olması muhtemel gen-gen, gen-protein ilişkileri ve bu ilişkileri çevresel faktörlerle bir örüntü halinde inceleyen çalışmalar yapılmaktadır (Ağırbaşı ve ark. 2011). Bu konuyla ilgili şu ana kadar birçok aday gen bildirilmiştir. Koroner kalp hastalıklarında yapılan genetik çalışmaların esas amacı, iyi bilinen klasik klinik ve biyokimyasal risk faktörleri ile birlikte ortak bir risk ortaya çıkartmaktır. Koroner kalp hastalıkları riskinde fonksiyonel gen polimorfizmlerinin oynadığı rolü saptamak, sadece koroner kalp hastalarında değil aynı zamanda hastalık ortaya çıkmadan anahtar metabolik yolların ve fizyolojinin anlaşılmasında da önemli bir rol almaktadır. Mendel kurallarına göre geçiş gösteren bu genlerin kromozomal lokalizasyonu ve koroner kalp hastalığı ile sonuçlanan mutasyonları tanımlanmıştır. Bunlardan bir tanesi de Niemann pick type gen (NPC1) ve bu genin ürünü olan NPC1 proteindir.

NPC1 geni 1.278 aminoasitlik proteini kodlayan, 47 kb büyüklüğünde 25 ekson içeren bir gendir (Carstea ve ark.1994). NPC1 proteini ise kolesterolün çıkışını kolaylaştırmaktadır. NPC1 geninde oluşan bir mutasyon sterol düzenleyici proteinin bozulmasına yol açar. Sonuçta organların kolesterol muhtevası ve plazma lipitleri artar. Genetik heterojenite son zamanlarda ortaya konulmuştur. Majör genin haritası 18q11-q12 bölgesinde bulunmaktadır (Carstea ve ark.1994).

Çalışmamızda, Türk toplumunda, koroner arter hastalığı ile ilişkisi olduğu düşünülen NPC1 genine ait 644 pozisyonundaki bir adet tek nükleotid polimorfizminin PCR- RFLP (Polimerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi kullanarak koroner arter hastalığı tanısı almış hastalarda araştırılması planlandı. Bu sayede koroner arter hastalığının NPC1 polimorfizm ya da mutasyonunun bölgemizdeki Koroner Kalp hastalarında ve sağlıklı kontrollerdeki oranını bulup polimorfizm mi mutasyon mu olduğunu tartışmak ya da polimorfizm ise hastalığa etkisi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Normal Koroner Arter

Arterler histolojik yapılarına göre elastik arterler, müsküler arterler ve arterioller olmak üzere üç gruba ayrılır. Koroner arterler müsküler arter yapısındadır. Müsküler arterler tüm arterlerde olduğu gibi, içten dıŐa intima, media ve adventisya olmak üzere üç tabakadan oluşan bir duvar yapısına sahiptir (zcan, 1997).

1. İntima: En iteki tabaka olup, bazal laminaya bitiŐik olan endotel hücrelerinden oluŐmuŐ tek sıralı bir yapı olarak tanımlansa da erişkin insan intiması gerçekte çok daha kompleks heterojen bir yapıya sahiptir. Arteriyel intimanın endotelial hücreleri kan ile çok önemli bir temas yüzeyi oluşturur. Arteriyel endotelial hücreler, arteriyel hastalıkların patogenezi sırasında ters giden olayları düzenleme ve vasküler homeostazı sağlamada çok önemli bir role sahiptir. Örneğin;

- YapıŐkan ve trombojenik olmayan yüzeyi sağlar,
- Yarı geçirgen bariyer görevi yapar,
- Vasküler tonusu sağlayan kimyasal maddelerin, büyüme faktörlerini ve sitokinlerin sentezi ve salınımını düzenler,
- Membran yapısını muhafaza eder,
- Lipoproteinlerin arteriyel duvar içine geçiŐini düzenler.

YaŐla birlikte insan arterleri, arteriyel düz kas hücreleri ve interstisyel kollajenin fibriler formlarını içeren daha karmaşık intima geliŐtirirler. Düz kas hücreleri arteriyel intimanın öğelerinden olan ekstrasellüler matriksi üretir (zcan, 1997).

Endotelial hücre heterojenitesi geliŐim boyunca kazanılan hem çevresel uyarılar hem de epigenetik özelliklere bağlıdır (Nobel, 2006).

2. Media: İnternal elastik lamina ile eksternal elastik lamina arasında kalan tabakadır. Bu laminalar değişik madde ve hücrelerin her iki yönde geçiŐine imkan

sağlayan büyüklükte çok sayıda açıklığa sahip elastik lif tabakalarından oluşurlar. Damar duvarının en kalın tabakasını oluşturan medianın esas fonksiyonu;

- Kan basıncını ve akımını vasokontstriksiyon veya vasodilatasyon yoluyla düzenler,
- Büyüme faktörleri ve sitokinleri sentezler,
- Ekstrasellüler matriks proteinleri olan kollajen, elastin ve proteoglikanları sentezler.

Müsküler arterlerin mediasında birbirine tutunmuş düz kas hücrelerinin oluşturduğu spiral tarzda tabakalar yer alır. Elastik arterler ise çok sayıda düz kas hücre lamellerine sahiptir (İliçin ve ark.2003).

3. Adventisya: Duvarın en dışında kalan tabakadır. Adventisya kollajen ve elastik lif demetleri ile fibroblastlar ve bir miktar düz kas hücresi ihtiva eden yoğun kollajen yapıya sahiptir. Vasküler bir dokudur, çok sayıda sinir lifi de içerir. Ayrıca media tabakasının 2/3'ünü besleyen küçük kan damarları olan vasa vasorumları da içermektedir (Özcan, 1997).

2.2. Koroner Arter Hastalığı (Ateroskleroz)

2.2.1. Ateroskleroz Tarihçesi

19. yy ortalarından itibaren bilim adamlarının çalışmaları ve hipotezleri bizim bugünkü bilgilerimize ulaşmamızda önemli rol oynamıştır. 1845 yılında patalog olan Vogel ateromda kolesterolü tespit etmiştir (Gaw ve ark. 2000). 1858 yılında bir Alman patolog olan Virchow, aterosklerotik lezyonların, proliferatif bir sürecin sonucu olduğunu savunmuş, bir başka Alman patolog olan Rokitansky ise lezyonların, arteriyel duvara yapışan trombüsün organizasyonunun neticesi olduğunu belirtmiştir. 19.yy sonlarında Osler, ateromatöz plağın, dejeneratif sürecin kaçınılmaz bir sonucu olduğunu belirtmiştir. 1913 yılında Anitschkow ve Chalatow aterosklerotik plaklarda kolesterol kristallerini saptayarak kolesterolün ateroskleroza tetikleyebileceği iddiası ile deney tavşanlarını besleyerek, insandakine benzeyen aterosklerotik lezyonlar oluşturmuştur. Birkaç yıl sonra Starokodonsky ve Sobolew, aortanın maruz kaldığı mekanik zedelenmelerin, ateroskleroza benzer intimal lezyonlara yol açtığını gösterdiler. 1950'lerde Florey, intimal zedelenme ve oluşan endotel hasarının intimal lipid ve

makrofaj birikimine yol açtığını göstermiştir (Crawford ve ark. 2001). 1976 yılında Ross, aterosklerozun inflamatuvar bir süreç olduğunu ilk defa dile getirmiş ve bununla beraber, arteriyel zedelenmenin, arter duvarına yapışmış trombosit ve diğer hücrelerden, PDGF (platelet kaynaklı büyüme faktörü) salınımına yol açtığını, bunun da ateroskleroza yol açacak düz kas hücre proliferasyonunu başlattığını göstermiştir. İlk kez 1989’da Steinberg ve arkadaşları tarafından aterosklerozisin “oksidatif modifikasyon hipotezi” ortaya atılmıştır (Stocker ve ark. 2004). Günümüzde, oksidatif stresin koroner ateroskleroz patogenezinde ve onun komplikasyonlarında önemli bir role sahip olduğu kanıtlanmıştır.

2.2.2. Aterosklerozun Tanımı

Dejeneratif, ilerleyici ve multifaktöriyel bir hastalık olan ateroskleroz çeşitli organlara kan akımının bozulmasına yol açan bir hastalık sürecidir. Orta büyüklükte ve daha büyük arterlerin kalınlaşması ve sertleşmesi sonucu damar lümeninin aterosklerotik plaklarla daralması “ateroskleroz” olarak tanımlanmaktadır. Ateroskleroz terimi Yunanca “athero” (bulamaç) ve “sclerosis” (sertleşme) den köken alır (Koylan, 2009). Kalbin kendisini besleyen koroner arterlerin, beslediği bölgelere herhangi bir nedenle, yeterli kan taşıyamaması sonucu miyokarda oluşan iskemi ve nekrozun derecesine göre gelişen hastalıklar ve bu hastalıkların komplikasyonlarının tümü koroner kalp hastalıkları (KKH) başlığı altında incelenmektedir.

2.2.3. Ateroskleroz Epidemiyolojisi

Kardiyovasküler hastalıklar genel popülasyonda yaygın olarak görülür ve özellikle 60 yaş üstü erişkinleri etkilemektedir. Gelişmekte olan ülkelerde önde gelen ölüm nedenidir. Son iki yüzyıl boyunca bu nedenle ABD’de 1 milyon kişi hayatını kaybetmiştir (Cooper ve ark. 2000). Yaşam süresi uzadıkça kardiyovasküler hastalıklar, koroner kalp hastalıkları ve strok nedeniyle ölüm oranı artmaktadır. Toplumda, bu zamansız ölümlerin çoğu, değiştirilebilir, önlenebilir risk faktörlerine bağlı gelişen hızlanmış ateroskleroza bağlıdır.

Ülkemizde de ateroskleroz ve ilişkili hastalıklar yaygınlık açısından diğer ülkeler ile benzerdir. Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri

(TEKHARF) çalışmasında; erişkin nüfusta KAH'nın % 3.8, hastalığın klinik açıdan bulgu verdiği 60-69 yaşlarında ise %14'ün üzeri sıklıkta görüldüğü saptanmıştır (Öngen ve ark. 2004). Yine konu ile ilgili Türk Kardiyoloji Derneği (TKD)'nin yayınladığı verilere göre ülkemizde ateroskleroz tüm ölümlerin %43'ünü oluşturmaktadır

2.2.4.Aterogenez Hipotezleri

Aterosklerozun ilgi uyandıran önemi, nedeninin keşfedilmesi için, muazzam çabalar sarf edilmesine neden olmuş ve patogenezi için pek çok hipotez öne sürülmüştür.

Hasara Cevap Hipotezi :

Aterosklerozun zedelenmeye yanıt hipotezi bugün için geniş veri birikimiyle desteklenen en uygun yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Bu hipoteze göre, başta aterojenik lipidler olmak üzere çeşitli risk faktörlerinin etkisiyle intimal hasar başlar. Aterosklerotik lezyonun ilk temeli endotelin bozulmasıyla atılır. Metabolik, mekanik, toksik, immünolojik olaylar ile enfeksiyonlar endotel disfonksiyonuna neden olurlar. Sigara, hipertansiyon, diyabet, hiperkolesterolemi, okside LDL (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein kolesterol) gibi bilinen risk faktörlerinin hepsi endotelde işlevsel bozukluğa yol açabilir. Endotel disfonksiyonu, tek hücre sırasından oluşan bu tabakanın, kan ile damar duvarı arasında bariyer olma özelliğini, seçici geçirgenliğini ve antitrombotik özelliğini bozar. Bunun sonucunda endotel hücreesindeki bazı genlerin uyarılmasıyla pek çok büyüme ve adezyon molekülünün sentezi artar. Endotelin lipid okside etme hızının, inflamatuvar yanıt şiddetinin genetik olarak belirlendiği sanılmaktadır. Bütün bu büyüme faktörlerinin de etkisiyle, monositler ve T lenfositler endotele yapışarak subendotelyal bölgeye doğru göç ederler. Subendotelyal bölgeye gelen monositler makrofaja dönüşerek içinde lipid depolayan köpük hücrelerini oluştururlar. Endotel hasarı endotel fonksiyonunu değiştirirken, önemli hücrel etkileşimlere neden olmakta ve aterosklerotik lezyon gelişimine yol açmaktadır. Bununla beraber düz kas hücreleri kontraktil özelliğini yitirerek sentez yapıcı özelliklerini kazanırlar ve elastin, kollajen, proteoglikanlar sentezlerler (Özcan, 1997).

Monoklonal Hipotez :

Endotel zedelenmesinin, damar duvarının zedelenmeye yanıtında tetiği çeken mekanizma olduğuna ilişkin varsayım çekici ise de karşıt bir öneriye göre birincil olay düz kas çoğalmasdır. Bu hipoteze göre aterosklerotik lezyon içindeki bütün hücrelerin kaynağı tek bir kas hücresidir. Virüsler, kimyasal ajanlar ve diğer mitojenlerin etkisi ile gelişen hücre transformasyonundan oluşan benign neoplaziler aterosklerotik lezyonu oluşturmaktadır (İliçin ve ark. 2003).

Lipid Hipotezi :

Kronik hiperkolesterolemi endotel hücre membranında kolesterol moleküllerinin sayısını artırarak endotel hasarına neden olabilir. Endotelyal plazma membranında kolesterol / fosfolipid oranı yükseldiği zaman membran viskozitesi artar. Daha visküz ve daha rijit olan endotelial yüzey, akım değişikliklerinin neden olduğu strese karşı koyamaz. Bu da endotel hücrelerinin birbirinden ayrılmasına, retraksiyonlarına neden olur. Hiperkolesterolemi ayrıca monosit endotel adezyonunda da değişikliğe yol açabilir (İliçin ve ark. 2003). Monositler, kan dolaşımından hasara uğrayan endotelin olduğu bölgelerde toplanır. LDL'yi alıp makrofaj morfolojisini alacağı subintimal bölgeye endoteli geçerek girerler. Modifiye olmamış LDL, makrofajlar tarafından ya çok yavaş alınır, ya da alınmazlar. Köpük hücre oluşumunu aktive etmeden önce, bazı modifikasyonlara uğramalıdır. Yakın zamanda ilgiyi çeken modifikasyon, oksidasyondur (Bülent, 2001). Endotel hücreleri ve onlara yapışmış monositlerden oluşan mikroçevredeki LDL'nin, bu aktive hücrelerce oluşturulmuş serbest radikallere maruz kaldığı varsayılmaktadır (Kumar, 2000). Serbest oksijen radikallerinin LDL'nin dış kısmındaki fosfolipidlere etki etmesiyle lipid peroksidasyon ürünleri oluşur. Bunlar reseptör bağlama özelliklerini değiştirecek şekilde LDL'nin apoB'siyle reaksiyona girer ve onları bozar. Bu oksidatif olarak modifiye olmuş LDL scavenger reseptörü (çöpçü reseptör) denilen bir reseptör sınıfı aracılığıyla makrofajlar tarafından alınır (Bülent, 2001). Çöpçü reseptör, doğal LDL reseptörü gibi regüle olmaz ve düzensiz alımın devam etmesiyle hücre lipidle dolu hale gelir ve köpük hücreleri oluşur (Valentin ve ark. 2002).

2.2.5.Ateroskleroz Patogenezi

Çevresel ve genetik faktörlerin etkisi ile oluşan aterosklerozun gelişiminde, üç evre vardır ve gelişen üç plak tipi aterosklerozun değişik safhalarını yansıtır:

1. Yağlı Çizgi Gelişimi: Bütün risk faktörlerinin ana etkilerini vasküler endotel üzerine yaptıkları sanılmaktadır. En erken aterosklerotik lezyon olan yağlı çizgiler, köpük hücrelerinden zengin olup makroskopik olarak damar yüzeyinden kabarık çizgilerdir. Ancak lümeninde obstrüksiyon oluşturmazlar. Bu görüntü endotel altında birikmiş olan, içleri yağ damlacıkları ile dolu köpük (foam) hücrelerden kaynaklanır. On yaşındaki çocuklarda bile görülebilir. Kandaki LDL-kolesterol düzeyinin azaltılması ile geriler ve yerinde nedbe dokusu kalır. Lezyona giren LDL artarsa lezyon ileri evrelere geçer (Tokgözoğlu, 2002).

2. Fibroz (Stabil) Plak: Zaman içinde risk faktörlerinin devam etmesi ile subendotelyal depolanma giderek artar. Makroskopik olarak beyaz renklidir, lümeneye doğru büyür ve lümeni daraltır. Bu lezyonda en dışta endotel hücreleri, altında düz kas hücreleri, makrofajlar ve T lenfositler bulunur. Bu evrede mediadan intimaya çekilen düz kas hücreleri bir fibröz başlık oluşturmak üzere dizilirler. Fibröz başlığın temel işlevi lümendeki kan ile lezyonun merkezindeki aterojenik lipid çekirdeğini birbirinden ayırmaktır. Arter lümeninin kısmen tıkanmasına ve klinik olarak semptomların gelişmesine yol açar. Ama asıl klinik olaylar, bu aterosklerotik plağın rüptüre olmasıyla ilgilidir (Öngen, 2004;Tokgözoğlu, 2002).

3. Komplike Lezyon (Zedelenebilir Plak): Aterosklerotik plak dıştan mekanik stres ve risk faktörlerinin devam etmesi ile yıpranırken, bir taraftan da içten yıpranır. Devam eden inflamatuvar süreç nedeni ile plak içindeki makrofajlar metalloproteinazlar salarak plağın fibröz çatısını yıpratır. Fibröz yapıda yapım ile yıkım dengededir. Plağın lipid çekirdeği içeriği % 40'ı aştığında zedelenebilir plaktan bahsedilir. Plağın fissüre veya rüptüre olması ile klinik kardiyovasküler olaylar ortaya çıkar. Plağın üstündeki endotel ayrılınca, subendotelyal doku kan ile temasa geçer. Subendotelyal doku, faktör VII ve lipoprotein (a)'dan zengin olup trombojenik özelliktedir. Bu şekilde trombüs gelişir. Oluşan trombüs damar duvarını tam veya kısmi olarak tıkayarak akut kardiyovasküler olaylara neden olur (Öngen, 2004;Tokgözoğlu, 2002).

2.2.6.Aterogenezde Hücresel Olaylar

Endotel Hücreleri:

Endotel hücreleri antikoagulan ve antiinflamatuvar özellikleri ile damar sağlığının devam ettirilmesinde santral rol oynar. Bu özelliklerin çoğu nitrik oksit (NO) molekülü aracılığı ile olur. NO, endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) kontrolünde sentezlenir ve çok sayıda anti-aterosklerotik özelliklere sahiptir. NO, endotel hücrelerinde güçlü platelet agregasyon inhibitörü olarak davranır. NO, intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM- 1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), P-selektin ve monosit kemoatardan protein-1 (MCP-1) gibi inflamasyonda rol alan maddeleri kodlayan genlerin ekspresyonunu kaldırarak intimaya inflamatuvar hücre girişini azaltabilir. NO'nun intimaya lipid girişine azaltabileceğine dair bazı kanıtlar vardır. Aterosklerozun en erken saptanan belirtisi farmakolojik veya hemodinamik uyarıya cevaben NO salınımının azalmasıdır (Topol, 2008).

Damar Düz Kas Hücreleri:

Sağlıklı erişkin arterlerinde damar düz kas hücreleri çoğunlukla damar tonusunu düzenledikleri medyada bulunur. Bu nedenle medyadaki düz kas lifleri büyük oranda miyozin, α -aktin ve tropomiyozin gibi kontraktıl proteinler içerir. Bu kontraktıl fenotipin devamlı ekspresyonu düz kas hücre membranlarında integrinler aracılığı ile etki yapan medyadaki ekstraselüler proteinler ile devam ettirilir. Bununla beraber aterosklerozda hücreler aktive makrofajlar ve endotel hücreleri tarafından üretilen sitokinler ile etkilenir. Bu etki altında düz kas hücreleri intimaya göç eder ve kontraktıl proteinlerde azalma, sentetik organellerde belirgin artma oluşur (Özcan, 1997).

Makrofajlar:

Kanda dolaşan monositlerden köken alırlar. Endotel altında depolandıklarında köpük hücrelerini oluştururlar. Bir araya gelen çok sayıda köpük hücreleri makroskopik olarak yağlı çizgi görünümünü verir. Yağlı çizgilenmenin esas hücreleridir.

Aterosklerotik plaktaki makrofajlarda serbest ve esterefiye kolesterol içerikleri fazladır. Pek çok büyüme faktörü salarlar. Büyüme faktörlerinin yanı sıra pek çok

büyümei inhibe eden faktörleri de salarlar. Bu durumda makrofajlar bir yandan lezyonun oluşumunu başlatırken, bir yandan da büyümesine katkıda bulunmaktadır (Özcan, 1997).

Trombositler:

Her aterosklerotik lezyonda bulunmaları şart değildir. Ama aterosklerozun önemli bir sonucu olan trombüs oluşumunda rol alarak akut klinik olayları başlatırlar. Protein sentezi yapamazlar. Granüllerinde koagülasyonda rol oynayan pek çok faktörün yanı sıra büyüme faktörü ve mitojenleri depolarlar. Trombosit aktive olduğunda bu büyüme faktörleri salınarak aterosklerotik lezyonun ilerlemesini hızlandırır (Özcan, 1997).

2.2.7. Ateroskleroz Risk Faktörleri

Ateroskleroz genler ve çevre arasındaki çok sayıda ve karmaşık etkileşim sonucu oluşur. Genetik faktörler nadiren tek başına semptomatik ateroskleroza neden olurlar. Bireyin proaterojen faktörlere cevabını ve damar duvarının aterojen uyarıya yatkınlığını sıklıkla genetik yapı belirler. Ancak çevresel faktörler hastalığın ilerleme hızını belirgin şekilde etkileyerek koroner arter hastalığın gelişip gelişmeyeceğini belirler.

İnsanlardaki risk faktörlerinin araştırılmasına ilişkin sistematik çalışmalar, yaklaşık olarak yüzyılın ortalarında başlamıştır. Prospektif, halk tabanlı “Framingham Kalp Çalışmaları”, hiperkolesterolemi, hipertansiyon ve diğer faktörlerin kardiyovasküler riskle ilişkili olduğunu destekleyen önemli kanıtlar sağlamıştır. Aşağıda Tablo 2.1’ de 2013 Hipertansiyon klavuzunda yayınlanan koroner kalp hastalığı risk faktörleri yer almaktadır.

Tablo 2.1: 2013 Hipertansiyon klavuzunda yer alan koroner kalp hastalığı risk faktörleri

1. Yaş (erkeklerde ≥ 55 , kadınlarda ≥ 65 veya erken menopoz)
2. Aile öyküsü (birinci derece akrabalarından erkekte 55, kadında 65 yaşından önce koroner arter hastalığı bulunması)
3. Sigara içiyor olmak
4. Hipertansiyon (kan basıncı $\geq 140/90$ mmHg)
5. Hiperkolesterolemi (total kolesterol ≥ 190 mg/dl, LDL-kolesterol ≥ 115 mg/dl, TG ≥ 150 mg/dl)
6. Düşük HDL-kolesterol değeri (erkeklerde < 40 mg/dl, kadınlarda < 46 mg/dl)
7. Diabetes mellitus (açlık glikoz seviyesi 102-125mg/dl)
8. Abdominal Obezite(VKİ ≥ 30 kg/m², Bel çevresi erkeklerde ≥ 102 cm, kadınlarda ≥ 88 cm)

2.2.7.1. Yaş ve Cinsiyet

Erkeklerde 55 yaş, kadınlarda 65 yaş üzeri koroner kalp hastalığı için güçlü bir risk faktörüdür. Kadınlarda kalp ve damar hastalıkları (KDH) erkeklere oranla on yıl daha geç ortaya çıkmakta, buna bağlı olarak miyokard enfarktüsü (ME) ve ani ölüm gibi ciddi komplikasyonlar da erkeklere göre daha geç görülmektedir (Engberding ve ark. 2008). Son yıllarda yapılan istatistiklerde genç kadınlarda da KDH'a bağlı morbidite ve mortalitede artış olduğu ve her yaştaki kadınlar için en önemli ölüm nedeni olmaya başladığı görülmektedir (Engberding ve ark. 2008 ; Ford ve ark. 2007).

Frammingham Çalışmasına göre KDH nedeniyle ölen kadınların % 63'ünde olay öncesinde bir semptom bulunmamaktadır (Engberding ve ark. 2008). Ayrıca ani

kardiyak ölüm sonucu ölen kadınlarda olay öncesinde yapısal kalp hastalığı öyküsü olması, erkeklere oranla çok daha azdır (Chugh ve ark. 2009). Framingham gibi mevcut risk belirleme yöntemleri daha çok erkekler için geçerli olup kadınlarda riski olduğundan daha az göstermektedir (Shaw ve ark. 2009). Diğer bir risk belirleme sistemi olan Reynolds risk skoru ise kadınlar için geliştirilmiştir. Reynolds sistemi; Framingham'a göre orta riskli kabul edilen kadınların %40'ından fazlasında risk grubunun artırılmasına yol açmıştır (Shaw ve ark. 2009). Hem Framingham hem de Reynolds skorlama sistemlerinin en önemli eksikliklerinden birisi de sadece 10 yıllık kardiyovasküler (KV) riski belirlemeleridir. Oysa kişilerin 10 yıl sonraki risklerini değil, yaşam boyu olan KV risklerini belirlemek çok daha önemlidir. Bu bağlamda önümüzdeki on yılda kardiyovasküler risk belirleyici olarak SNP kullanarak kişinin koroner arter hastalığına yatkınlığını değerlendiren genetik risk skorlama sistemlerinin de geçerliliği sorgulanmaktadır.

2.2.7.2. Aile Öyküsü

Koroner arter hastalığının, genetik incelemeleri diğer kardiyovasküler hastalıkların gerisinde kalmıştır. Koroner genetik alanındaki sınırlanmanın asıl nedeni; pek çok genetik faktör, çevresel faktör ve bu faktörler arasındaki etkileşimlerin neden olabildiğine inanılan koroner arter hastalığının kompleks bir hastalık olmasıdır. Bu faktörler arasında aile hikayesi KAH için en önemli bağımsız risk faktörlerinden biridir (Colditz ve ark. 1986; Schildkraut ve ark. 1989). Aynı zamanda ikiz çalışmaları genetik faktörlerin KAH'ın gelişimine katkıda bulunduğunu göstermiştir (Marenberg ve ark. 1994).

Justin ve arkadaşları yaklaşık 50 bin erkeğin dahil olduğu bir çalışmada koroner arter ve aile hikayesi arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Anjina, miyokardial infarktüs ve 50 yaştan önce bir bypass ameliyatı koroner arter hastalığının prematüre aile hikayesi olarak tanımlanmaktadır. Prematüre aile hikayesi olan bir kişinin koroner arter hastalığının bir aile hikayesi olmayan birisiyle karşılaştırıldığında koroner arter hastalığından ölümü % 50' den fazla bir riskle ilişkili olduğu gözlenmiştir (Justin ve ark. 2012).

Aile çalışmaları, genetik çalışmalar ve kan basıncının izlendiği çalışmalarda, yüksek riskli ailelerin çocuklarında da KAH gelişme riskinin yüksek olduğu ispat edilmiştir.

2.2.7.3. Sigara İçiciliği

Her iki cinsiyet grubunda, gençlerde ve yaşlılarda ve tüm ırk gruplarında içilen sigara miktarı ile koroner kalp hastalığı arasında güçlü bir ilişki gösterilmiştir.

Sigara içme alışkanlığı, ülkemizde erkeklerde azalma, kadınlarımızda ise artma eğilimindedir. Kadınlarımızda koroner kalp hastalığı mortalitesinin Avrupa ülkeleri arasında en yüksek seviyede olduğu göz önüne alındığında, kadınlarımızda sigara içme eğilimindeki bu artışın ciddiyeti daha da önem kazanmaktadır (Onat ve ark. 2001).

Sigara içme kardiyovasküler hastalıklar için tanımlanmış bir risk faktörüdür ve aterosklerozisin patogenezini etkilemiştir. Özellikle sigara içenlerde bulunan 2,3,7,8-tetroklorodibenzop (TCDD) ve polisiklik arilhidrokarbonlar (PAH) aterosklerotik plaklarda yağ hücrelerindeki makrofajların taşınmasını teşvik ettiği kanıtlanmıştır. TCDD 'ye maruz kalan makrofajlarda hem mRNA hem de protein seviyelerinde NPC1 ifadesi azalmıştır (Weiwei ve ark. 2010).

Kardiyovasküler sistem üzerinde tütün içmenin etkileri çokludur ve her biri diğerini etkilemektedir. Bu etkiler platelet aktivasyonu, endotel disfonksiyonu, inflamasyon, lipid düzeyleri ve metabolizmasındaki değişimleri içerir. Bu etkiler sıklıkla aktif veya pasif sigara kullanımıyla hızla dakikalar içerisinde görülür. Aktif ve pasif sigara içme bazı mekanizmalar vasıtasıyla kardiyovasküler sistemi etkiler. Genelde pasif sigara içmenin biyolojik etkileri aktif sigara içmenin etkileri aynı seviyededir. Bu etkiler sinerjistikdir ve diğer bilinen kardiyovasküler risk faktörleri ile etkileşir.

Sigara içmeyi bırakma kalp hastalığına morbilite ve mortaliteyi azaltmada etkin bir girişimdir. Shoji ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sigara kullanımı ve sigaranın bırakılması durumunda inflamator ve metabolik durumu değiştirip değiştirmeyeceği buna ek olarak sağlıklı bir insanda subklinal aterosklerozisi etkileyip etkilemeyeceği araştırılmıştır. Sonuç olarak subklinal aterosklerozun ilerlemesi devam

eden sigara kullanımı ve LDL-C ile ilişkili bulunmuştur (Shoji ve ark. 2012). Geçmişte sigara kullananlarda ise kısmen inflamator aktivasyonunu geri dönüşümü ve erkeklerde subklinal aterosklerozun ilerlemesinin engellendiğinin bulunması ileri sürülen bir diğer önemli faktördür (Circ, 2012).

2.2.7.4. Hipertansiyon

Hipertansiyon kalp, beyin ve böbrek hastalıkları için çok yaygın fakat tedavi edilebilir bir risk faktörüdür. Mevcut bulgular kan basıncının düzenlenmesinde genetik etkinin yaklaşık %30-50'sine katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur (Marteau ve ark. 2005). Ancak hipertansiyon muhtemelen bir takım yakınlık genlerinden kalıtımından kaynaklanan ve çevresel faktörlere dahil olan multifaktöriyel bir bozukluktur. Olası aday genler renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi bileşenleri, addukin, β -adrenoreseptör, G protein altbirimleri ve G protein reseptör kinazdır.

Anjiyotensin karaciğer tarafından üretilen ve α -globulinde bulunan anjiyotensinojen (ATG) denen öncü bir molekülden oluşur. ATG' deki M235T, T174M ve promotor bölgedeki bir mutasyon gibi moleküler varyasyonlar hipertansiyonla pozitif bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir (Li ve ark. 2004).

Endotel hücrelerinde hücre zarına bağlı olarak bulunan anjiyotensin dönüştüren enzim (ACE), anjiyotensin AI'in aniyotensin AII'ye dönüşümünü ve bradikininin parçalanmasını sağlayarak dolaşımdaki homeostazda önemli rol oynar (Jalil ve ark. 2002). ACE geni insanda 17. kromozomun uzun kolunun 23. bölgesinde (17q23) lokalizedir. Anjiyotensin II kardiyovasküler sistemde kan basıncı ve hacmini kontrol eden önemli bir efektördür. Anjiyotensin II hücre yüzey reseptörlerinin iki farklı tipi olan tipI ve tipII ile etkileşir. Tip I reseptörleri anjiyotensin II nin kardiyovasküler etkilerine ılımlı görünmektedir.

2.2.7.5. Hiperkolesterolemi

Epidemiyolojik çalışmalarla, kardiyovasküler hastalıklar ile plazma kolesterol düzeyi arasındaki direkt ilişki açık olarak gösterilmiştir. Yapılan büyük çalışmalar, total kolesterol, LDL, çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) plazma seviyelerindeki artışın ateroskleroz ile ilişkili olduğunu ve eğer bu artmış seviyeler düşürülürse aterosklerozun

azaltıldığını göstermiştir. LDL kolesterol yüksekliği endotel hasarı ve damar duvarındaki inflamatuvar yanıtta artışla yakından ilişkilidir. LDL arteriyel endotele infiltre olarak intima tabakasına geçmektedir. Burada oksidatif modifikasyona uğrayarak makrofaj göçüne ve kolesterol birikimine yol açmaktadır. Okside LDL' yi fagositoz ile alan makrofajlar köpük hücrelerine dönüşerek sürecin devamına katkıda bulunmaktadır. Küçük yoğun LDL partiküller en aterojenik gruptur. Trigliseridden (TG) zengin lipoproteinler de intima tabakasına geçmekte, inflamatuvar süreci artırmakta ve düz kas hücre proliferasyonunun ve ekstrasellüler matriks birikimine yol açmaktadır (Özcan, 1997).

Son bir genom boyu ilişkilendirme (GWAS) meta analiz çalışması serum lipid seviyeleri ile ilişkili 95 bölge tanımlamıştır (Teslovich ve ark. 2010). Genetik polimorfizmler, değişen fonksiyon ya da bu genlerin ifadesi, MI ile ilişkili bulunmuştur. Örneğin ailesel hiperkolesterolemi LDL reseptör genindeki mutasyondan kaynaklanmaktadır ve sonuçta LDL seviyesi yükselerek, MI riskini artırmaktadır (Austin ve ark. 2004).

Esterleşmemiş kolesterol pek çok hücre sitoplazmasında yetersizdir. Bu yüzden NPC hücreleri incelenir. Çünkü bu hücreler kolesterolün büyük miktarlarını taşır. Özellikle de geç endozomal ve lizozomal membranlardan kolesterolün çıkışını kolaylaştırır (Coxey ve ark.1993; Bi ve ark. 2010).

2.2.7.6. Düşük HDL-Kolesterol Değeri

HDL (Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein) kolesterolün düşük plazma seviyeleri koroner hastalığının gittikçe artan bir riskle ilişkilidir. HDL bir anti-aterojenik lipoproteindir ve endotelial ateroproktetik etkilere sahiptir. Büyük ölçüde deneysel incelemelere dayanılarak HDL'nin birkaç potansiyel anti-aterojenik özellikleri (HDL ya da endotelial inflamator etkiler ve anti oksidan etkiler tarafından endotelial nitrik oksit üretiminin doğrudan uyarımı gibi) ele alınmıştır (Besler ve ark. 2012).

Deneysel incelemeler, makrofaj kolesterol çıkışının teşviki ve HDL'nin direkt endotelial protektif etkileri (endotelial nitrik oksit ürününün uyarımı ve onarımı, anti-inflamator ve anti-trombotik özellikleri) ele almıştır.

Ancak farelerde yapılan gen hedefli çalışmalarda artan HDL kolesterol plazma seviyelerinin aterosklerozisi ya sınırladığı ya da hızlandırdığı gösterilmiştir. Bununla beraber HDL 'nin vasküler etkilerinin heterojen olduğu gözlenebilir. Ancak bu durum KAH ve diabetli hastalarda değişebilir (Besler ve ark. 2012).

Kardiyovasküler hastalıkların prevalansını inceleyen birkaç çalışma HDL metabolizmasının apolipoprotein A-I (apoA-I) mutasyonları, ATP bağlayan kaset taşıyıcı A-1(ABCA1) ya da lesitin kolesterol açil transferaz (LCAT) eksikliği gibi monogenik bozukluklarla ilişkili olduğunu göstermiştir (Besler ve ark. 2012).

2.2.7.7. Diabetes Mellitus (DM)

Diabet, kronik hiperglisemi ile karakterize edilen kompleks ve heterojen bir hastalıktır. Diabetin kardiyovasküler hastalık riskini artırdığı iyi bilinmektedir. Özellikle tip 2 diabet (T2D) ve koroner arter arasında güçlü bir ilişki olduğunu ispatlayan çalışmalar mevcuttur. Aynı zamanda her iki hastalıkta patofizyolojilerinde ölçülebilir bir genetik bileşene sahiptir. Gerçekte T2D hastalarda yaklaşık olarak ölümlerin % 65'i koroner arter hastalığı ya da inmeyle ilişkilidir (Morrish ve ark. 2001). Diabet ve ateroskleroz arasındaki ilişki ispatlanmasına rağmen, bu iki hastalığı bağlayan temel mekanizma tam olarak anlaşılmamıştır (Milicevic ve ark. 2008). Geçmiş yıllarda GWAS, T2D ile kardiyovasküler özellik ilişkisini doğrulayan yaygın tek nükleotid polimorfizmlerinin sayısı çarpıcı bir şekilde artmıştır (Mohlke ve ark. 2008). Yapılan çalışmalar, NPC1 mutasyonlarının ya da polimorfizmlerinin karaciğer lipid hemostasinin değişimine neden olduğunu ve nihayetinde insülin direnci ve kilo alımına yol açtığını göstermiştir.

2.2.7.8. Abdominal Obezite

Obezite, gelişmiş ülkeler de dahil tüm dünyada ciddi bir kamu sağlığı sorunudur (Xi ve ark. 2012 ; Liang ve ark. 2012). Özellikle çocukluk obezitesi; hipertansiyon, dislipidemi, metabolik sendrom ve T2D gibi pek çok kardiyovasküler risk faktörüyle ilişkilidir (Freedman ve ark. 2009). Obezitenin altta yatan nedenleri karmaşıktır ve özellikle aşırı kalori alımı, hareketsiz bir yaşam biçimi ve genetik yatkınlık bu nedenlerin temelini oluşturmaktadır. Son bir genom çap ilişkili çalışma kaydı, NPC1

geninin çocukluk ve yetişkin obezitesiyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Meyre ve ark. 2009). NPC1 geninin insan beyaz adipoz dokuda büyük ölçüde ifade edilmiştir (Kulyte ve ark. 2011). Ancak insan genom çap ilişkili çalışmalar, NPC1 gen varyantlarının kilo almayı nasıl teşvik ettiğini ele almamıştır. Farelerde yapılan son bir çalışma, NPC1 geninin öncelikli olarak enerji ve metabolik homeostasida bilinmeyen bir role sahip olduğunu göstermiştir (Jelinek ve ark. 2010; Jelinek ve ark.2011).

2.3. Kolesterol

Kolesterol, hayvan hücrelerinin plazma membranının temel bileşiği olup, burada hücreler ve çevre arasında koruma fonksiyonunu devam ettirmektedir. Kolesterol içeren membranlar daha geniş sıcaklık aralığında akışkanlıklarını korurlar. Kolesterol membranın akışkanlığını düzenlemekte, Na⁺,K⁺-ATPaz'ın maksimum düzeyde aktivite göstermesini ve düşük Na⁺ iyonu geçirimsizliğini sağlamaktadır. Aynı zamanda tüm steroid hormon ve safra asitlerinin üretiminin öncü molekülüdür.

Hücre içerisindeki kompartmanların membranlarındaki kolesterolün dağılımı büyük oranda farklılık göstermektedir. Kolesterolün konsantrasyonu sentezlendiği yer olan endoplazmik retikulumda çok düşük olmakla beraber Golgi aygıtından trans-golgi ağına ve plazma membranına doğru gidildikçe kolesterolün düzeyi artmaktadır (Schulze ve ark. 2009).

Kolesterol biyosentezi, mevcut kolesterol seviyesine bağlıdır, ancak bunu sağlayan homeostatik mekanizma henüz bilinmemektedir. Besin yoluyla gelen kolesterol miktarındaki artış, dahili üretimin azalmasına yol açar, besinden gelen miktarın azalması da karşıt sonucu doğurur. En önemli düzenleme mekanizması, hücre içinde endoplazmik retikulumdaki kolesterol miktarının SREBP1 ve 2 (İngilizce Sterol Regulatory Element Binding Protein, sterol düzenleme elemanına bağlanan protein 1 ve 2) tarafından algılanması ile gerçekleşir. Hücre içi kolesterol arttığı durumlarda, SREBP1 proteini diğer iki proteine bağlanır: SCAP (SCAP- sterol cleavage activating Protein) ve Insig 1. Kolesterol seviyesi azaldığı zaman Insig1, SREBP-SCAP kompleksinden ayrışır, bu kompleks Golgi aygıtına geçer ve orada S1P ve S2P (İngilizce Site 1 Protease ve Site 2 Protease) tarafından kesilir (bu iki proteaz enzimleri kolesterol seviyesi düştüğü zaman SCAP tarafından aktive olurlar). Kısalıp bir

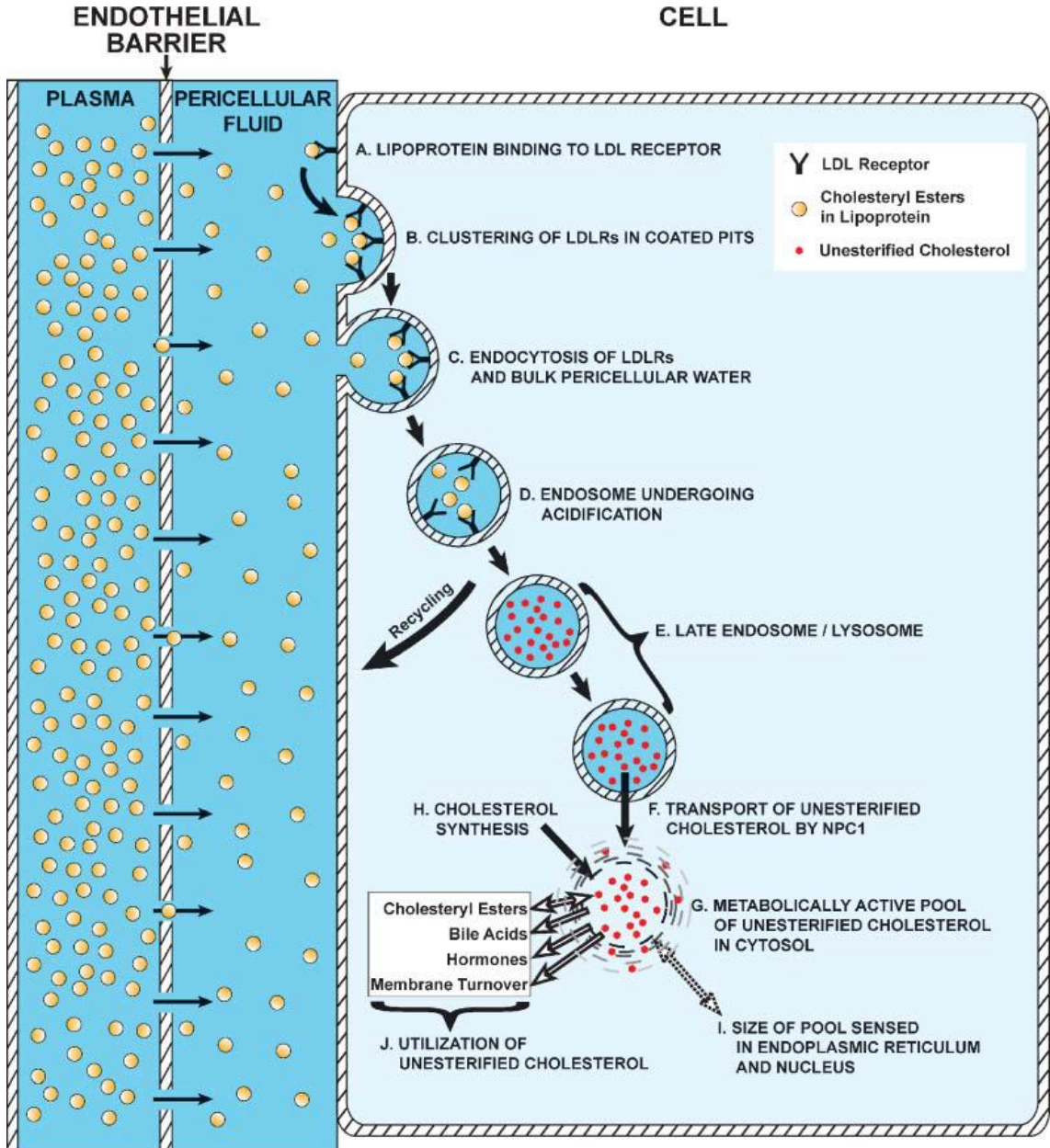
transkripsiyon faktörüne dönüşen SREBP hücre çekirdeğine girer ve orada bir takım genlerin önünde yer alan SRE'ye (Sterol Regulatory Element) bağlanarak bu genlerin transkripsiyonunu artırır. Bu genler arasında 3-hidroksi-3-metil-glutaril CoA redüktaz (HMG-CoA redüktaz) ve LDL reseptörü genleri vardır. HMG-CoA redüktaz hücre içi kolesterol üretiminin artmasına neden olur, LDL reseptörü ise kanda dolaşan LDL'in hücrelere bağlanıp taşımakta olduğu kolesterolü hücrelere vermesini sağlar (Mabrouk ve ark. 1994; Engström ve ark. 2004).

İnsanların ve diğer omurgalıların kan dolaşımında kolesterol lipoprotein parçacıkları halinde taşınır. Memeli hücreleri tarafından kolesterolün alımı, reseptör aracılıklı endosiozun moleküler düzeyde anlaşılmasında anahtar model olmuştur. Kolesterol, kan dolaşımında lipoprotein patikülleri şeklinde taşınma yollarından biri düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) reseptöre bağlı endositozudur (Cooper ve ark. 2006).

LDL kolesterol ve trigliseritlerin oluşturduğu hidrofobik bir çekirdek etrafında tek tabakalı fosfolipid tabakası ve apoB-100 içerir (Wang ve ark. 2005). Bu LDL partikülleri birçok hücre için önemli bir kolesterol kaynağıdır. LDL'nin reseptöre bağlı endositozda LDL partiküllerini tanıyan LDL reseptörleri, zarı geçen tek bir segmente sahip (-) yüklü glikoprotein molekülleridir (Onat ve ark. 2002). Kandaki LDL seviyesini hücrelerin yüzeyinde bulunan LDL reseptörleri belirler. Bu reseptörler, plazma zarındaki kltrin kaplı çukurlar denilen özel bölgelerde toplanırlar. LDL reseptörleri LDL partiküllerinin fosfolipid dış tabakasında gömülü olan apoB proteinine bağlanırlar ve böylece reseptörler hücrelerarası sıvıdan LDL parçacıklarını bağlarlar.

Reseptörlere bağlanan LDL partikülleri bu çukurcukların üzerinde gruplaşmış olarak görülürler. Diğer ligand reseptör sistemlerinde olduğu gibi LDL partiküllerinin de yüzey reseptörlerine bağlanıp, reseptör içeren vezikülün hücre içine alınış evresinde enerjiye ihtiyaç duyulur. Vezikülün hücre içine girişi, partikülün reseptöre bağlanmasından 2-5 dakika sonra meydana gelir. Hücreye girdikten sonra bu kılıflı veziküller önce kltrin kılıflarını kaybederler. Kılıflarını kaybetmiş, düzgün yüzeyli bu veziküllere endozom adı verilir. Kılıflarını kaybetmiş olan veziküller erken endozomlarla kaynaşırlar ve erken endozomların sahip olduğu düşük pH, LDL'nin reseptöründen ayrılmasını sağlar. Yeni oluşan bu iri vezikülün içindeki LDL

partikülünden ayrılmış olan reseptörler, bir tomurcuk oluşturarak vezikülden atılır ve hücre zarına geri dönerler (Cooper ve ark. 2006; Schulze ve ark. 2009; Lodish ve ark. 2011). Aşağıda Şekil 2.1’de LDL’nin endositozu gösterilmiştir (Liu ve ark. 2007).



Şekil 2.1. LDL'nin endositozu (Liu ve ark. 2007)

Hücre lizozomlarındaki hidrolitik enzimlerle apoB aminoasitlere ayrılır ve sitozole verilir. Geç endozomlarda ve lizozomlarda LDL partikülünde yer alan ester kolesterolün lizozomal kolesterol esteraz gibi asit lipazlar tarafından hidrolizi sonucu serbest kolesterol oluşmaktadır. Oluşan serbest kolesterol, LDL reseptör sentezini azaltarak hücre içerisine fazla kolesterol alınmasını, HMG-CoA redüktaz ekspresyon aktivitesini artırarak serbest kolesterolün ester şeklinde hücre içerisinde kalmasını düzenlemektedir (Onat ve ark. 2002; Lodish ve ark. 2011). Lizozomlarda yıkılamayan LDL kaynaklı olan kolesterolün tam olarak açıklanamamış bir mekanizma ile plazma membranına veya tekrar esterleşme işleminin gerçekleştirildiği endoplazmik retikulume taşındığı bildirilmektedir. Bu mekanizmada NPC1/NPC2 taşıma sisteminin rol oynadığı bildirilmektedir (Schulze ve ark. 2009).

2.3.1. Kolesterol ve Lipid Bağlayıcı Proteinler

Kolesterolün yıkımı ve taşınması için golgiden bağımsız veziküler taşınma, zara gömülü proteinlerin aracılık ettiği zarların birbirine doğrudan teması ile taşınma ya da küçük, çözünebilir lipit taşıyıcı proteinlerin aracılık ettiği taşınma olmak üzere 3 farklı mekanizma önerilmektedir (Lodish ve ark. 2011). Membranaktif proteinler lipid moleküllerine bağlanabilir, lipidleri proteinlere veya hedef mambranlara taşıyabilir ve lipid tabakalarını seçilimli olarak yıkabilirler. Bunlar bağlanma özellikleri, hücrede buldukları bölge (sitoplazma, sitoplazma dışı ve hücre içi özellikleri), fonksiyonları açısından farklılık gösterirler. ABCA1, NPC1, NPC2 gibi kolesterol bağlayıcı proteinler lipid bağlayıcı proteinlerdendir.

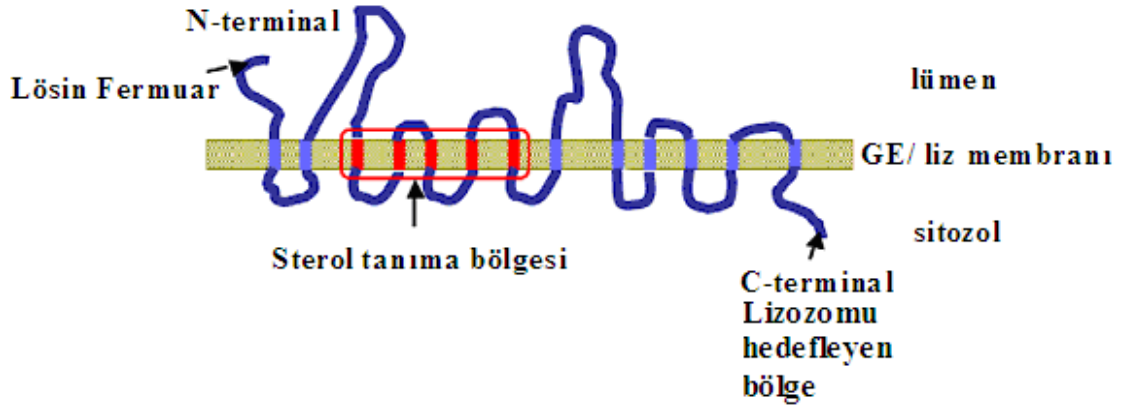
ATP-Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı Protein (ABCA1)

ABCA1, yapı bakımından birbirinin benzeri olan iki bölümde toplam 2261 amino asitten oluşan bir integral membran proteindir. Her bir bölüm ATP'yi enerji kaynağı olarak kullanan 1 nükleotid bağlanma bölgesi ve 6 tane transmembran heliksi içerir. Membranların veya lipoproteinlerin endozomal/lizozomal yıkımı sonucu kolesterol açığa çıkmaktadır. Bu açığa çıkan kolesterol daha sonra endoplazmik retikulumlarda bulunan asetil CoA kolesterol açıltransferazlar (ACAT) tarafından esterleştirilirler. ABCA1'nin esterleşmiş olan bu kolesterolün hücre dışına taşınmasında

görev aldığı düşünülmektedir (Oram, 2002). Yapılan birçok çalışma tüm aterojenik lipoproteinlerin etkili ACAT aktivatörü olduğunu ispatlamıştır.

Niemann-Pick C1 Proteini (NPC1)

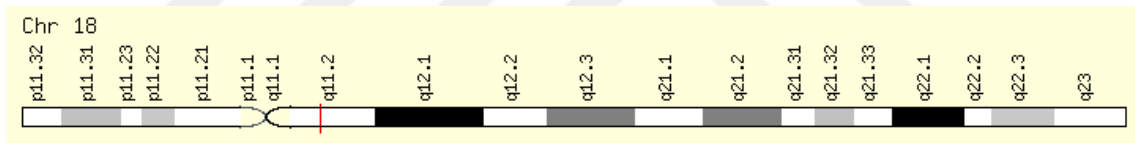
NPC1 geni 1278 aminoasit kodlayan, 47 kb büyüklüğünde 25 ekson içeren bir gendir (Carstea ve ark.1994). Membranı bir baştan bir başa kat eden öncelikli olarak 13 transmembran bölge, geç endozomların membranlarında bulunan üç büyük hidrofilik lop ve bir de küçük sitoplazmik kuyruk içeren, büyük transmembran glikoproteindir (Subramanian ve Balch, 2008; Ioannou, 2005). Bu 13 bölgeden 5'i sterol tanıma bölgesini oluşturur. NPC1'in içerdiği sterol tanıma bölgesinin sterol metabolizmasında görev alan SCAP (Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein (SREBP)) ayırıcı-aktif edici protein) ve 3-hidroksi-3-metil-glutaril CoA redüktaz (HMG-CoA redüktaz)'ın sterol tanıma bölgesi ile yapı bakımından benzer olduğu belirlenmiştir (Vance ve ark., 2005). Şekil 2.2'de NPC1'in yapısı ve membrandaki konumu gösterilmiştir.



Şekil 2.2: NPC1'in yapısı (Vance, 2006)

Membran lipid kolesterolü endositik membran yoluyla endozomlara ulaşabilir. Kolesterol ve kolesterol esterleri reseptör aracılı endositoz yoluyla farklı hücre tiplerine LDL ya da HDL olarak girebilir. Lipoproteinler geç endozomlara dağıtılmaktadır ve burada kolesterol esterler hidroliz edilmektedir. Serbest kalan kolesterol NPC2 tarafından bağlanmakta ve endozomal sistemden çıkması için NPC1'in kolesterol bağlayan bir yerine transfer edilmektedir (Cheruku ve ark. 2006; Babalola ve ark. 2007 ;Infante ve ark. 2008).

NPC1 protein geç endozomlarda bulunan bir membran proteini olup hücrelerarası kolesterol trafiğini düzenler. NPC1 geninde oluşan bir mutasyon sterol düzenleyici proteinin bozulmasına yol açar. Sonuçta organların kolesterol muhtevası ve plazma lipitleri artar. Genetik heterojenite son zamanlarda ortaya konulmuştur. Majör genin haritası 18q11-q12 bölgesinde bulunmaktadır (Carstea ve ark.1994). Şekil 2.3'de kromozom 18'in polimorfik noktaları gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Kromozom 18.

Koroner kalp hastalığı, genetik yatkınlığa bağlı ve damar duvarı içinde hücrel anomalilerle bir dizi molekülün yol açtığı risk faktörlerin birikimiyle gelişir. Yağ hücrelerinin ya da aterosklerotik plakların oluşumu koroner kalp hastalıklarına yol açan ayırt edici bir kanıt olduğu belirlenmiştir. Aterosklerotik lezyonlarda yağ hücreleri, makrofajlardan ve vasküler düz kas hücrelerinden (VSMC) kaynaklanır (Guyton ve ark. 1996). Endositik yoldan gelen serbest kolesterolün dağıtımını plazma membranı ve endoplazmik retikulumun geç endozomal Niemann-Pick tip C1 protein (NPC1) kordineli hareketlerini gerektirir. ABCA1'de meydana gelen mutasyon, NPC1 proteinin inaktivasyonu ile geç endozom ve lizozomlarda lipid birikimiyle sonuçlanmaktadır (Wang ve ark 2007).

NPC1'in biyolojik fonksiyonuna bakıldığında, NPC1'in plazma membranı gibi hedef membranlarla ve endoplazmik retikulumla birleşme yeteneğine sahip olan kolesterolce zengin veziküllerin oluşumunu sağlamak için geç endozomlarda yer alan kolesterolü topladığı ve lizozomlardan dışarı taşıdığı düşünülmektedir (Sayre ve Liscum, 2007; Ioannou, 2000). Davies ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar NPC1'in permeaz aktivitesine sahip bir transmembran akış pompası olduğunu ortaya koymuştur (Davies ve ark., 2000).

Bugüne kadar farklı toplumlarda NPC1 geni ve koroner arasında bağlantı çalışmaları yapılmıştır. Weiwei ve arkadaşları Çin'de yaşayan bir toplumda (873 koroner hastası ve 864 sağlıklı birey) NPC1 geninin +644 A→G polimorfizminin genotip ve allelik sıklık dağılımlarını incelemiştir. +644 A→G polimorfizminin genotip ve allel sıklığı bakımından koroner ile bağlantılı olduğu gösterilmektedir. Bu çalışma +644A>G, NPC1'in yaygın bir varyantı olduğunu ve koroner arter hastalarında azalan bir riskle ilişkili olduğunu göstermektedir. Sigara içenlerde NPC1 GG taşıyanlar, AA ve AG taşıyanlarla karşılaştırıldığında koroner kalp hastalığının azalan bir riskine sahiptir (Weiwei ve ark. 2010). +644 A→G, NPC1 proteininde bulunan 215. kodonda histidin aminoasitinin arjinin aminoasitine dönüşümüyle yanlış anlamlı bir mutasyona neden olmaktadır.

Niemann-Pick C2 Proteini (NPC2)

NPC2, NPC2 geni tarafından kodlanan çözünebilir lizozomal bir glikoproteindir. Çalışmalar bu küçük çözünebilir proteinin lizozom lümeninde bulunduğunu kanıtlamıştır. İlk olarak insan epididimisinde önemli bir protein olduğu tanımlanmıştır. Ayrıca işlevinin belirsiz olduğu ekstrasellüler sıvılarda da bulunmuştur (Dixit ve ark. 2007). Dixit ve arkadaşlarının yaptıkları in vitro çalışmalarda NPC2'nin sadece kolesterole değil bunun yanında öteki sterollere de bağlanabildiğini ve kolesterolü fosfolipid membranlara taşıyabildiğini ortaya koymuştur. Mutant farelerin genetik ve fenotipik incelemeleri aynı yolun farklı aşamalarına katılan NPC1/NPC2'nin ya bir ya da her ikisinin eksikliğini ortaya koymuştur. NPC2'nin kolesterolü lümen içerisinde yer alan membranlardan veya agregatlardan NPC1'e doğrudan ya da lizozomal membranların sayesinde transfer ettiği ve NPC1'in kolesterolü endozomal/lizozomal sistemden dışarıya taşıdığı düşünülmektedir (Dixit ve ark. 2007).

2.4. Ateroskleroz Genetiği

Sadece birleşik devletlerde her yıl 300 binden fazla insan kardiyak bir sebepten ani bir şekilde ölmektedir. KAH, ani kardiyak ölümün en önemli sebebini temsil etmektedir (Zipes ve ark. 1998).

KAH gibi kompleks insan hastalıklarıyla ilişkilendirilen genleri; hastalığa neden olan genler, yatkınlık genleri ve hastalık bağlantılı genler olarak üç büyük kategoride sınıflandırabiliriz.

Hastalığa neden olan genler; mutasyon olduğunda hastalığın patogenezinde doğrudan sorumlu olan genlerdir. Bu durumda mutasyonlar açıkça belirlenebilir ya da hastalığın asıl nedeni olarak tahmin edilir. İlk hastalığa neden olan gen (miyosit artırıcı faktör 2A) MEF2A'nın tanımlanması KAH ve MI'nın patogenezinde yeni bir sinyal yolunu ortaya çıkarmıştır ve hastalığın erken bir tetikleyicisi olarak endotelyumun gelişmesini ya da anormal fonksiyonunu kapsamaktadır. Plazma lipid konsantrasyonları, özellikle LDL'nin koroner hastalığına katkıda bulunduğu uzun zaman önce belirlenmiştir. Bir takım monogenik ya da mendeliyen lipid bozuklukları bireylerde ve ailelerde karakterize edilmiştir. Lipoprotein metabolizmasının önemli düzenleyicileri olarak ortaya çıkan genlerde nadir varyasyonlarla bağlantılıdır. Bu genlerden bir tanesi de NPC1'dir. Pek çok hücrenin sitoplazmasında esterleşmemiş kolesterol sınırlıdır. Niemann pick C hücreleri kolesterolün büyük çoğunluğunu taşır ve geç endozom/lizozom (LE/L)'lerden çıkışını sağlar (Coxey ve ark. 1993; Bi ve ark.2010). NPC1 bilinmeyen bir mekanizmayla LE/L'nin sınırlı membranlarından gelen kolesterolün çıkışını kolaylaştıran kolesterol bağlayan bir membran proteindir (Infante ve ark. 2008; Kwon ve ark.2009; Prinz,2010; Vance ve ark. 2011).

Niemann Pick tip C hastalığı (NP-C), ilk olarak 1914 yılında Albert Niemann tarafından çocuklarda sinir hücrelerinin (nöron) bozunmasına neden olan bir hastalık olarak belirlenmiştir. Progresif mental ve motor retardasyonu olan 18 aylık bir kız çocukta tanımlanmış, Pick ise hastalığın karışan diğer antitelerden ayırıldığını sağlamıştır (Swaiman ve ark.1999). Crocker ve Farber 1958 yılında heterojen bulgular

gösteren bu hastalığı dört sınıfa ayırmışlardır (Pentchev ve ark. 1995). Niemann-Pick Tip A ve B'de sfingomyelinaz eksikliği gösterilirken, Niemann-Pick Tip C ve Tip D'de ise sfingomyelinaz değerleri normal veya normale yakın sınırlardadır. NP-C bebekleri, çocukları ve 50 yaşa kadar ve hatta üstündeki yetişkinleri etkileyebilen aşırı nadir bir hastalıktır. Mevcut tahminlere göre NP-C tüm dünyada yaklaşık aynı oranda olmak üzere her 150,000 canlı doğumda bir görülmektedir.

NP-C hastalığında, hücre içi yağların (lipidler) normal hareketliliği kısıtlanmaktadır. Tüm hücrelerin yapı ve fonksiyonlarında çok önemli roller oynayan bu yağlar (özellikle kolesterol ve glikosfingolipidler), geri dönüştürülmek ya da yeniden kullanılmak yerine beyin, karaciğer ve dalak gibi vücudun çeşitli yerlerinde birikmektedir (Ory, 2000). Beyincikteki purkinje hücrelerinin kaybı ve şişkinleşmiş aksonlar NPC'nin karakteristik histolojik bir belirtisidir (Vance, 2006). Erken çocuklukta geç endozom ve lizomlarda biyokimyasal olarak esterleşmemiş kolesterolün birikimiyle karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır (Vanier, 2010).

NP-C, otozomal resesif bir hastalıktır. Bir kromozomunda mutasyona uğramış bir gen ve diğerinde normal bir gene sahip bir kişi NP-C hastası olmayacak ancak NP-C taşıyıcısı olacaktır. Bu nedenle, kendileri çok sağlıklı olsalar da hastalığı çocuklarına geçirebilirler. Mutasyona uğramış genin, biri anneden ve diğeri de babadan alınmış iki kopyası, bir çocuğun kalıtsal olarak NP-C hastası olabilmesi anlamına gelmektedir. NPC1 olarak adlandırılan genetik loküsün 18. Kromozomda yerleştiği ve NPC olgularının %95'inden sorumlu olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Carstea ve ark.1997). % 5'inde ise NPC2 proteinini kodlayan gende (14q24.3) mutasyon olduğu gösterilmiştir (Demir ve ark., 2005). NPC1 mutasyonel profili son derece heterojen olmasına rağmen, NPC1 allellerin neredeyse % 70'i NPC1 geninin kodlanan bölgesi boyunca yayılan nokta mutasyonlardan kaynaklanır. Kodon yer değiştirmeleri sonucunda proteinin doğru katlanması etkilenebilir (Runz ve ark. 2008). NPC1 proteini, endozomal sistemden kolesterolün taşınması için temel olan transmembran bir proteindir (Carstea ve ark.1997; Park ve ark. 2003).

Hastalığın henüz kesin bir tedavisi olmamakla birlikte çeşitli tedavi yöntemleri denenmektedir. Hastalığın tedavisinin gelecekte genetik defektin düzeltilmesi ile sonuçlanacak gen terapisi ile sağlanacağı umut edilmektedir (Ünay ve ark., 2003).

NP-C hastalığında olduğu gibi Ailesel hiperkolesterolemi ve Tangier hastalığında da hastalığa neden olan genler tanımlanmıştır. Bu hastalıkların her ikisi de KAH ve prematüre aterosklerozisin riskini artırır. LDL reseptör gen (LDLR)'deki mutasyonlardan dolayı ailesel hiperkolesterolemi (FH) prototipik örnektir. Hastalık asıl olarak otozomal dominant hiperkolesterolemi ve premature koroner arter hastalıklı bireylerde karakterize edilmiştir (Goldstein ve ark. 2009). Homozigot FH' lı bireyler çocuklukta ya da erken yetişkinlikte LDL-C'nin aşırı yüksek seviyeleri ve gelişen semptomatik koroner hastalığa sahiptir. Ailesel hiperkolesterolemi, LDL reseptör geni mutasyonundan kaynaklanan otozomal dominant geçişli bir hastalıktır (Goldstein ve ark. 2009). Otozomal dominant hiperkolesterolemili diğer ailelerde yapılan bağlantı çalışmaları APOB ve (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9) PCSK9 gibi genlerde nedensel mutasyonları açığa çıkarmıştır. Birkaç mendeliyen randomizasyon çalışması, LDL-C ve koroner hastalık arasındaki nedensel ilişkiyi doğrulamıştır. PCSK9 geninde meydana gelen nonsense mutasyonlar plazma LDL konsantrasyonunu önemli şekilde azaltır. Afrika Amerikan toplumunda koroner kalp hastalığının azalan insidansı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (Cohen ve ark. 2005; Cohen ve ark. 2006). Benzer şekilde Avrupa amerikalılarda PCSK9 genindeki yaygın bir missense mutasyon, LDL-C'nin daha düşük seviyeleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Cohen ve ark. 2006 ; Kathiresan ve ark. 2008). Daha fazla sistematik GWAS çalışmasında, 11 bölgede bulunan SNP'ler LDL-C seviyeleriyle ilişkilidir ve aynı zamanda koroner arterlerle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Willer ve ark. 2008).

Tangier hastalığı, rediculoendotelyal sistemde kolesterol esterlerinin depolanması ve plazmadan gelen HDL kolesterolün yokluğuyla karakterize edilen nadir bir hastalıktır. Tangier hastalığını oluşturan gen ABCA1 olarak tanımlanmıştır (Bodzioch ve ark. 2009; Brooks-Wilson ve ark. 1999).

Ailelerde hastalığın ailesel kümelenmesi tanımlanmıştır. İkizler, bu kümelenmenin nedenini araştırmak için çok özel bir kaynağı temsil eder. Monozigotik ikizler, aynı çevre ve yaşı paylaşır neredeyse onların tüm genleri aynıdır. Dizigotik ikizler ise parçalanmış genlerin ortalama % 50'sini paylaşır. Onlar aynı zamanda gen ve çevre etkileşimlerinin önemini araştırmak için mükemmel bir kaynaktır. Yapılan ikiz araştırmalarında göreceli tehlike tahminleri, monozigotik ikizlerde dizigotik ikizlerin

yaklaşık iki katıdır. Yaklaşık 174.000 ikizi içeren geniş bir toplum temelli ikiz çalışması, lipid ilişkili yollardaki genetik varyantları ve KAH riski analiz etmiştir. Sonuçlarda ABCA1'in bir varyantının KAH riskiyle zayıf ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Sonuçlar çelişebilir fakat son mendeliyen randomizasyon çalışmaları plazma HDL kolesterol seviyelerinin KAH için nedensel bir faktör olmadığını göstermiştir (Voight ve ark. 2012; Haase ve ark. 2012).

Yatkınlık genleri ise hastalığın gelişme riskini artırır ya da azaltır. Diğer genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle hastalığa neden olabilir ya da olmayabilir. Bireyler için yatkınlık genleri hastalığın gelişmesinde ve prognozisinde daha az tahmini değere sahiptir. Koroner arter hastalığında yatkınlık genleri tanımlamak için sıklıkla kullanılan metot aday gen hasta-kontrol ilişkili çalışmalar olmuştur. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) bir grup hasta ve kontrollerin gen ve genotipinde belirlenmiştir. SNP allel ya da genotiplerin frekansları daha sonra analiz edilmiştir. Eğer hastalığın meydana gelişi hastalarda önemli şekilde farklıysa kontrollerden allel ya da genotip hastalıkla ilişkilidir.

KAH, yatkınlık genlerini tanımlamak için sayısız durum kontrol çalışmaları yürütülmüştür (Shen ve ark. 2004 ; Wang ve ark. 2000). Ailesel kombine hiperlipidemi (FCHL), KAH' lı hastaların yaklaşık % 20'sini temsil eder ve serum total kolesterolün ya da trigliseridin yükselen seviyesiyle karakterize edilir. Fin popülasyonunda FCHL yatkın bölge kromozom 1q21-23'de haritalanmıştır (Pajukanta ve ark 1998). Transkripsiyonel faktör gen (USF1), bir transkripsiyonel faktörü kodlar ve ABCA1, apolipoproteinler CIII, AII, E'yi de içeren glikoz ve lipid metabolizmasına dahil olan genleri düzenler (Pajukanta ve ark. 2004).

Hastalık bağlantılı genler, hastalığın moleküler biyolojisi, mikro dizisi ya da proteomik analizlerle bağlantılı olan genlerdir. Bazı hastalık bağlantılı genler hastalık biyomarkerları olarak hizmet edebilir. Koroner arter hastalığı ile bağlantılı olan genlerin ifadesini tanımlamak için yeni genomik ve proteomik yaklaşımlar başlatılmıştır.

KAH ile ilgili olan ilk genetik risk varyantı 2007'de 9p21 bölgesinde tanımlanmıştır. Bağımsız ve eş zamanlı bir şekilde yapılan araştırmalar KAH'ı artıran bir risk ile ilişkili olabileceğini belirlemiştir (McPherson ve ark. 2007 ; Helgadottir ve ark. 2007). Kısa bir sürede tüm dünyada birkaç grup tarafından 9p21' in KAH için bir

risk varyantı olduğu teyit edilmiştir ve KAH için 11 diğer genetik risk varyantı haritalamayla takip edilmiştir (Dandona ve ark.2010). Dahası bölgedeki SNP'ler koroner hastalıkla ilişkili fakat herhangi bir geleneksel kardiovasküler risk faktörleriyle ilişkili değildir.

Önümüzdeki on yıl içinde geniş ailelerle yapılan bağlantı analizlerinde koroner arter hastalığına neden olan yeni genlerin tanımlanmasına tanıklık edileceği öngörülmektedir. Yüzlerce küçük çekirdek ailelerle yapılan genom-çap ilişkili çalışmalar ve bağlantı analizleri aterosklerozda yeni yatkın genlerin tanımlanmasına katkıda bulunacaktır.

Koroner arter hastalığı ile bağlantılı olduğu düşünölen bazı polimorfizmler Tablo 2.2 'de verilmektedir.

Tablo 2.2. Koroner arter hastalığı kolesterol metabolizması ile ilgili olduğu düşünülen bazı genler ve polimorfizmleri

Polimorfizm	
Apolipoprotein B (ApoB) gen mutasyonları	Kathiresan ve ark. 2008
PCSK9 geni	Cohen, 2005; Cohen ve ark. 2006,
LDL reseptör gen mutasyonları	Austin ve ark. 2004. Goldstein ve ark. 2009
Nieaman pick C1 NPC1 geni	Meyre ve ark. 2009, Kulyte ve ark. 2011 Jelinek ve ark. 2011, Weiwei ve ark. 2010
Nieaman pick C1-like 1 (NPC1L1) geni	Eliana ve ark. 2010
Nieaman pick C2-like NPC2 geni	Vanier ve Millat, 2004
apoA-I, LCAT	Besler ve ark. 2012
ABCAI ABCG1 gen mutasyonları	Wang ve ark 2007, Bodzioch ve ark. 2009, Besler ve ark. 2012
Transkripsiyonel faktör gen (USF1)	Pajukanta ve ark. 2004
SREBP	Vance ve ark. 2005, Elizabeth ve ark. 2005
HMGCoA redüktaz geni	Brown,1999 ; Gil,1985

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kardiyoloji Anabilim Dalında Temmuz 2011 - Nisan 2012 tarihleri arasında göğüs ağrısı yakınması ile başvuran ve koroner anjiyografi yapılması planlanan hastalar alındı. Koroner Arter Hastalığı (KAH) tanısı konan 100 hasta (77 erkek, 23 kadın) ve kontrol grubu olarak sağlıklı 100 birey (64 erkek, 36 kadın) çalışma grubunu oluşturmuştur. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerden çalışmamıza dahil edildiklerine dair izinleri alındı. Koroner arter hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin çalışmaya dahil edilip edilmeme kriterleri Tablo 3.1.'de verilmiştir. Bu çalışma için, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonun'dan 01.09.2011 tarihinde 11-BADK-087 kayıt numarası ile onay alınmış ve Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından **2011/01-38** proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışmanın tamamı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda yapıldı.

Tablo 3.1. Hastaların ve kontrol grubundaki kişilerin araştırmaya dâhil edilme ve edilmeme kriterleri

Dahil Edilme Kriterleri	Araştırmanın hasta grubu için dahil etme ölçütleri; 1. Koroner tanısı konmuş hastalar, 2.Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamış olması, 3. 18 yaşından büyük olması,
	Araştırmanın kontrol grubu için dahil etme ölçütleri; 1. Koroner tanısı almamış olmak, 2.Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamış olması, 3. 18 yaşından büyük olması,
Dahil Edilmeme Kriterleri	Araştırmanın hasta grubu için dahil etmeme ölçütleri; 1. Koroner tanısı almamış olmak, 2.Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamamış olması, 3. 18 yaşından küçük olması,
	Araştırmanın kontrol grubu için dahil etmeme ölçütleri; 1.Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamamış olması 2. 18 yaşından küçük koroner tanısı almış olmak

3.2. Çalışmada Kullanılan Araç Ve Gereçler

3.2.1. Aletler ve Cihazlar

1. PZR Cihazı (Termal Cykler) (Techne, TC 4000, TC 412)
2. Elektroforez Tankı (Clever Scientific, MSCHOİCE)
3. Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo Scientific, EC 300 x L)
4. Jel Görüntüleme Sistemi (QUANTUM-ST4, 1000/20M- 09200806)
5. Bilgisayar (Exper, İntelcore2)
6. Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica,F20520162)
7. Mikrodalga Fırın (Arçelik İntellowave, MD 554)
8. Hassas Terazı (Kern, ABJ 220-4M)
9. Mikrosantrifüj (Mikro120, Hettich Zentrifugen D- 78 532n)
10. Vorteks (Velp Scientifica; F20220176)
11. Mikropipet Seti (Thermo Scientific)
12. Etüv (Memmert, Beschickung-Loading 100- 800)
13. Otoklav (HMC Hirayama, HV-25L)
14. Buzdolabı (Vestel,BZP-L3302W)
15. pH metre (İHANNA, 507702)

3.2.2. Kimyasal Maddeler

1. Proteinaz K (Fermantas, lot:00084676)
2. Lizis solüsyon(Fermantas, lot:00084606)
3. Wash Buffer I (Fermantas, lot:00097676)
4. Wash Buffer II (Fermantas, lot:00084624)
5. Elution Buffer (Fermantas, lot:00084630)
6. Taq polimeraz (Fermantas, Lot:00099921)
7. Nco I (Restriksiyon Enzimi) (Fermantas, Lot: 00083925)
8. Primerler 644 A/G (1205291909-1)
644 A/G (1205291909-2)
9. Agaroz (Biomax, Lot: 104514R)
10. Nusieve (Prona (Gamma Micropor) Lot: 12505PR)
11. pUC mix marker (Fermantas, Lot: SM 0303)
12. Loading dye (Vivantis, Lot: 4011)
13. 100 mM dNTP set (Fermantas, Lot: 00070408)
14. Trisma Base (Amresco, Lot: 1621726)
15. Borik Asit (Amresco, Lot: 111110 625)
16. EDTA (Amresco, Lot: 3228B038)
17. Ethidium Bromide (Serva, 090107)
18. NaOH (Sodyum Hidroksit) (Riedel-de Haen, Lot:70440 UN 1823)

3.2.3. *Çözeltiler*

EDTA Solüsyonu (0,5 M) Hazırlanışı

18,16 Na₂EDTA·2H₂O 80 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Çözülmenin oluşabilmesi için 2,0 g NaOH karışma eklendi (pH: 8,0 olacak). pH ayarlaması HCl ile yapıldı ve 100ml'ye tamamlandı (distile su ile). Hazırlanan EDTA solüsyonu, otoklavlanıp oda sıcaklığında saklandı.

5XTBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu

54 g Trisma Base, 27,5 g Borik Asit ve 20 ml EDTA 500 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Homojen olunca 1 litreye distile su ile tamamlanarak çözüldü. Çözelti oda ısısında saklandı.

Etidyum Bromid Solüsyonu (10mg/ml)

0,1 g Etidyum Bromid 10ml distile su içerisinde bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Kullanılacak tüpler alüminyum folyo ile kaplandı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de saklandı.

Elektroforez Yürütme Tamponu

5X TBE tamponundan distile su ile seyreltilerek 1X TBE hazırlandı.

%2'lik Agaroz Jel (100ml)

2 g agaroz, 100 ml 1XTBE erlenmayer içerisinde karıştırılıp mikrodalga fırında 1,5 dakika ısıtıldı. Hafif soğuması beklenerek (yaklaşık 60-70°C) 3µl Etidyum bromid (10mg/ml) eklenip hızlı bir şekilde iyice karıştırıldı ve yükleme yapılacak tarakları hazırlanmış olan kasete döküldü.

3.3. Yöntem

3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Gerekli Alet ve Kimyasallar Listesi

1. Genomic DNA Purification Kit (Fermantas) (ürün no:00098151)
2. Filtreli tüpler
3. Receiver tüpleri
4. Eppendorf tüpleri
5. Proteinaz K
6. Lysis solution
7. Ethanol (96-100%)
8. Wash buffer I
9. Wash buffer II
10. Elution buffer
11. Otomatik pipetler (10–100 µl ve 100–1000 µl)
12. Steril sarı ve beyaz pipet uçları
13. 1.5 ml'lik Eppendorf tüpleri
14. Vorteks (Heidolph Reaks Top)
15. Santrifüj (Sigma 1–15)
16. Su banyosu (Nüve BM 302)
17. Steril eldiven

EDTA'lı tüpe alınan periferik kan lenfositlerinden DNA izole edilmiştir. İzolasyon Fermentas Genomic DNA Purification Kit ile gerçekleştirildi. EDTA'lı tüplerden 200 µl kan eppendorf tüplere aktarıldı. Üzerine 20 µl proteinaz K ve 400 µl Lysis buffer A eklenerek 7-8 saniye vortekslendi. 56 °C su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Spin filtreler, Recevier tüplerine yerleştirildi. Daha sonra üzerine 200 µl ethanol (% 96-% 100) eklendi, 7-8 saniye vortekslendi ve filtrelili tüplere aktarıldı. Daha sonra üzerine 500 µl Wash Buffer I eklendi. Bu filtrelili tüpler 8000 rpm de 1 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi bitiminde filtreler Recevier tüplerinden çıkarıldı ve recevier tüpleri boşaltıldı. Filtreler tekrar Recevier tüplerine yerleştirildi ve filtrelerin üzerine 500 µl Wash buffer II eklenerek tekrar santrifüje yerleştirildi. 12000 rmp de 3 dakika santrifüj işlemi uygulandı ve tekrar Recevier tüpleri boşaltıldı. Santrifüj işlemi bitiminde Recevier tüpleri boşaltılarak filtreler Eppendorf tüplerine alındı. Bu işlem bitimi sonucunda Elution buffer her örnek için 200 µl olmak üzere filtrelerin üzerine bırakılarak 8000 rpm de 1 dakika santrifüj yapılarak DNA izolasyon aşaması bitirildi.

3.3.2. DNA'nın Kalitatif Tayini

1,2 g agaroz, 60ml 1XTEB içerisinde kaynatılarak çözündürüldü, 60°C' ye kadar soğutulduktan sonra 1,8µl EtBr (10mg/ml) eklendi. Sıvı haldeki jel, tarakları yerleştirilmiş olan agaroz jel elektroforez kabına dökülerek donmaya bırakıldı. 1-2µl DNA, toplam hacim 4µl olacak şekilde 10X yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Örnekler 1XTEB tamponu içerisinde, 120 voltta(v) 20 dakika yürütüldükten sonra jel, UV altında incelendi ve genomik DNA'nın kalitesi analiz edildi.

3.3.3. DNA'nın Kantitatif Tayini

Çift zincirli DNA preparasyonlarının yaklaşık saflığı 260/280 nm'deki absorbanların oranıyla (A_{260}/A_{280}) belirlemek mümkündür. Saf çift zincirli DNA için

$A_{260}/A_{280} = 1,8$ 'dir. Saf RNA'nınki 2 civarında, proteininkide 1'den küçüktür. DNA'ların derişimleri, 260nm dalga boyunda okunan OD değerinin, sulandırma katsayısı ve DNA katsayısı ile çarpılması sonucu $\mu\text{g/ml}$ cinsinden belirlendi.

$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Sulandırma oranı} \times 50 \text{ (katsayı)}$

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pzr) Tekniği

PZR, DNA üzerindeki spesifik bölgeleri çoğaltmak amacı ile kullanılan ve çoğunlukla 10 kb'a kadar DNA parçalarının çoğaltılmasını sağlayan in vitro bir yöntemdir (Özalpan ve Ünsal, 2008).

PZR, hedef DNA veya RNA dizisinin çoğaltılarak gösterilmesi esasına dayanır. Teknik olarak bir PCR döngüsü; denatürasyon (94°C 'de 30-90 sn.), primerin bağlanması (55°C 'de 30-120 sn) ve uzama (72°C 'de 60-180 sn) basamaklarının tekrar eden döngülerinden oluşur. Bu işlem ortalama 30 döngü devam eder. 30 siklus 230 kopya üretir (Ergin, 2004). Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerindeki ilgili istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır (Temizkan ve Arda, 2008).

PZR karışımı için kullanılan malzemeler şunlardır; Kalıp DNA, dH_2O , "buffer", MgCl_2 , dNTP'ler (serbest nükleotidler), primerler ve Taq polimeraz'dır (Ergin, 2004). Kalıp DNA; PZR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir (Temizkan ve Arda, 2008).

3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Rflp) Analizi:

Organizmadan alınan doku örneklerinin toplam DNA'larının izole edilip bu ürünün nükleik asit sıralanışını tanıyan restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve oluşan DNA parçacıklarının elektroforezde ayrıldıktan sonra yorumlanması, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) olarak bilinir.

PZR bazlı olup olmamasına göre iki şekilde yapılır. Kromozomal DNA'nın direkt restriksiyon enzimi ile kesimi ancak temiz ve fazla miktarda DNA varlığında iyi sonuç verir. Yöntemin güvenilirliğini artırmak amacıyla eklenen yeni metotlarda zamanı ve maliyeti arttırmaktadır. Bu nedenle PZR bazlı RFLP çoğunlukla tercih edilmektedir (Yağcı, 2006).

PZR-RFLP moleküler biyolojide en çok analizi ile tür ve orijin belirlenmesi üzerine kullanılan metotlardan birisidir. RFLP metodu ayrıca ökaryot ve prokaryot hücre genomik DNA analizinde, bakteriyel ve viral suşlardaki mutasyonları tanımlamada, epidemiyolojik çalışmalarda, genetik kaynakların kontrol altında tutulması ve korunması ve daha pek çok genetik hastalıkların tanısında kullanılmıştır. RFLP yöntemi uygulaması kolay fazla zaman gerektirmeyen bir yöntemdir. Dezavantajı çok sayıdaki sık bantların seçimi bazen mümkün olmayabilir. Bu nedenle enzim seçimine dikkat etmek gerekir (Yağcı, 2006; Eroğlu, 2011).

3.6. Elektroforez Tekniği

Sulu bir çözelti içinde, suspansiye ya da çözünmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine elektroforez denir (Kaya, 2002). Agaroz, kırmızı bir alg türünden izole edilen doğrusal bir polisakkarittir. Agoroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğunda katı bir jel oluşturur. Agaroz konsantrasyonu % 0.5-3 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece küçük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun şekilde yürütmesi sağlanabilir (Temizkan ve Arda, 2008).

3.7. *Npc1* Gen Polimorfizminin Analizi

3.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun (PZR) Analizi

NPC1 geninin +644 A→G polimorfizminin belirlenmesi için Weiwei Ma ve arkadaşlarının yapmış oldukları PZR-RFLP yöntemi aşağıda belirtildiği şekilde modifiye edilerek uygulanmıştır (Weiwei ve ark. 2010).

Bu polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan primerler, PZR karışımları ve amplifikasyon sıcaklıkları aşağıda verilmiştir.

NPC1 geni +644 A→G Polimorfizmi;

NPC1 geninin +644 A→G bölgesindeki polimorfizmi belirlemek için yapılan PZR'larda, hedef gen bölgelerine özgün olarak kullanılan primerler, PZR karışımları ve çoğalma sıcaklıkları sırasıyla Tablo 3.2, Tablo 3.3 ve Tablo 3.4 'te gösterilmektedir.

Tablo 3.2. NPC1 geni +644 A→G Polimorfizminin analizinde kullanılan primerler

Bölge	Primerler
NPC1 geni +644 A→G polimorfizmi	Forward primer; 5'GGGTTGCCTTGGTATGTG-3' Reverse primer; 5'- ATCGTCCAGGGAGCAG-3'

Tablo 3.3. NPC1 geni +644 A→G bölgesindeki polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı.

	PZR bileşenleri	ml /TÜP
1.	Steril bidistile Su	17 µl
2.	PZR buffer	2,5 µl
3.	MgCl ₂ (25mM)	1.5 µl
4.	dNTP Mix (12,5mM)	0.3 µl
5.	Forward primer 644 A/G (10pmol/ µl)	0.8 µl
6.	Reverse primer 644 A/G (10pmol/ µl)	0.8 µl
7.	Taq Polimeraz (5 u/µl)	0.1 µl
8.	Genomik DNA	2 µl
	Toplam	25 µl

Tablo 3.4. NPC1 geni +644 A→G bölgesindeki polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan optimum PZR programı

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	5 dk.	1
Denatürasyon	94	20 sn.	34
Primer bağlanması (Annealing)	60	30 sn.	
Zincir uzaması (Extension)	72	35 sn.	
Final Extension	72	5 dk.	1

NPC1 geni +644 A→G bölgesindeki polimorfizmleri restriksiyon enzim analizi yöntemi ile belirlemek amacıyla Tablo 3.3'te verilen +644 A→G bölgesinin çoğaltımında kullanılan PZR karışımına göre; her bir PZR tüpünde bulunan 23'er µl 'lik karışımın içerisine 2 µl DNA ilave edilerek toplam hacim 25 µl yapıldı. Tablo 3.4 'teki NPC1 geni +644 A→G bölgesinin polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR programına göre çoğaltılması sağlandı.

3.7.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi:

Bu çalışmada, NPC1 geninin polimorfizmi için PZR programı ile çoğaltılmış polimorfik noktasını içeren PZR ürünleri restriksiyon enzimi ile aşağıda verilen NPC1 geninin nükleotit dizisinin bir kısmı (600-720) üzerinde bulunan +644 A→G noktasında kesilmektedir.

↓

GCACCTTTTACCATCACTCCTGTGTTTTTCAG | ATTTTCCAGTCC^ATGGGATGGAGCCCATG
 AACAAATGCCACCAAAGGCTGTGACGAGTCTGTGGATGAGGTCACAGCACCATGTAGCTGC

NPC1 genin +644 A→G polimorfizmini belirlemek için Tablo 3.5.' de belirtilen oranda restriksiyon enzim karışımı hazırlandı ve Nco1 restriksiyon enzimi ile 37 °C'de etüvde 25 dakika kesime bırakıldı.

Tablo 3.5. NPC1 geni +644 A→G bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan enzim kesimi koşulları

Buffer	2,0 µl
Nco I enzimi (10u/µl)	1 µl
5'... C ↓ C A T G G...3' 3'... G G T A C ↑ C...5'	
dH ₂ O	17 µl
PZR ürünü	10 µl
Toplam	30µl

3.8. İstatistiksel Yöntemler

Verilerin istatistiksel analizi, SPSS 13.0 ve OpenEpi İno 2.2 programları kullanılarak yapıldı. Sonuçlar standart sapma ortalamasına göre verildi. NPC1 polimorfizmi ile klinik ve demografik özellikler arası ilişki ki-kare testi kullanılarak analiz edildi. Güven aralığı %95'e göre iki uçluydu ve p değeri 0.005'ten düşük olanlar önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada; NPC1 gen polimorfizminin analizi PZR-RFLP yöntemiyle gerçekleştirildi. Her iki grup yaş ve cinsiyet dağılımına göre değerlendirildiğinde hasta grubunda yaş 39 - 78 arası iken (ortalama yaş 62,12) kontrol grubunda ise 35- 80 arasında (ortalama yaş 59,30) bulunmuştur. Hasta grubu 77 erkek ve 23 kadın olmak üzere toplam 100 hastadan oluşurken kontrol grubunu 64 erkek, 36 kadın oluşturmaktaydı. Çalışmaya dahil edilen koroner hastaları ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 4.1.'de verildi.

Tablo 4.1. Çalışmaya alınan koroner hastalarının ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımı

	Koroner grubu (n=100)	Kontrol grubu (n=100)	P değeri
Kadın	23(% 23)	36 (%36)	0.044
Erkek	77 (%77)	64 (%64)	
Yaş Ortalaması	62,12	59,30	

Karakteristik özellikler açısından değerlendirildiğinde hasta ve kontroller arasında; aile hikayesi, diabetes ve sigara kullanımı yönlerinden fark yoktu ($p>0,005$). Hipertansiyonda ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0,005$). Populasyonun klinik karakteristik özellikleri Tablo 4.2' de görülmektedir.

Tablo 4.2: Hasta ve kontrollerin klinik karakteristik özellikleri

Karakteristik Özellikler	Koroner grubu (n=100)	Kontrol grubu (n=100)	p
Aile hikayesi	36	31	0.275
Sigara kullanımı	15	28	0.019
Hipertansiyon	73	49	0.001
Diyabet	28	52	0.314

Hasta ve kontrol grubu serum lipid düzeyleri açısından karşılaştırıldığında hasta grubunda LDL düzeyi açısından ortalama düzeyleri anlamlı yüksektir ($p < 0,005$). HDL varlığına göre ise populasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0,005$). Hasta ve kontrol grubu serum lipid düzeyleri tablo 4. 3' de görülmektedir.

Tablo 4.3: Hasta ve kontrol grubunun serum lipid düzeyleri açısından değerlendirilmesi
Serum Lipid Seviyeleri (mg/dl)

	Hasta Grubu n=100	Kontrol Grubu n=100	p değeri
LDL	113.94	132.67	0,001
HDL	44.69	45.12	0,801

Tablo 4.4.'de NPC1 gen polimorfizmi ile koroner arter hastalarında gözlenen klinik karakteristik özellikler arasında değerlendirme yapılmıştır. NPC1 gen polimorfizmi ile koroner risk faktörleri arasında herhangi bir bağlantı bulunmamıştır ($p>0,005$).

Tablo 4.4.'de NPC1 gen polimorfizmi ile koroner arter hastalarında gözlenen klinik karakteristik özellikler

NPC1 GENİ	
Klinik Karakteristik Özellikler	P Değeri
Cinsiyet	0.586
Yaş	0.395
Aile hikayesi	0.534
Sigara kullanımı	0.417
Hipertansiyon	0.051
Diabet	0.889
HDL	0.819
LDL	0.290
TG	0.454

4.1. Dna'nın Kalitatif Tayini

Genomik DNA'lar %2 (w/v)'lik agaroz jel elektroforezinde her bir bölge için analiz edildi. Genomik DNA'lara ait bantlar ultraviyole (UV) ışık altında gözlemlendi.

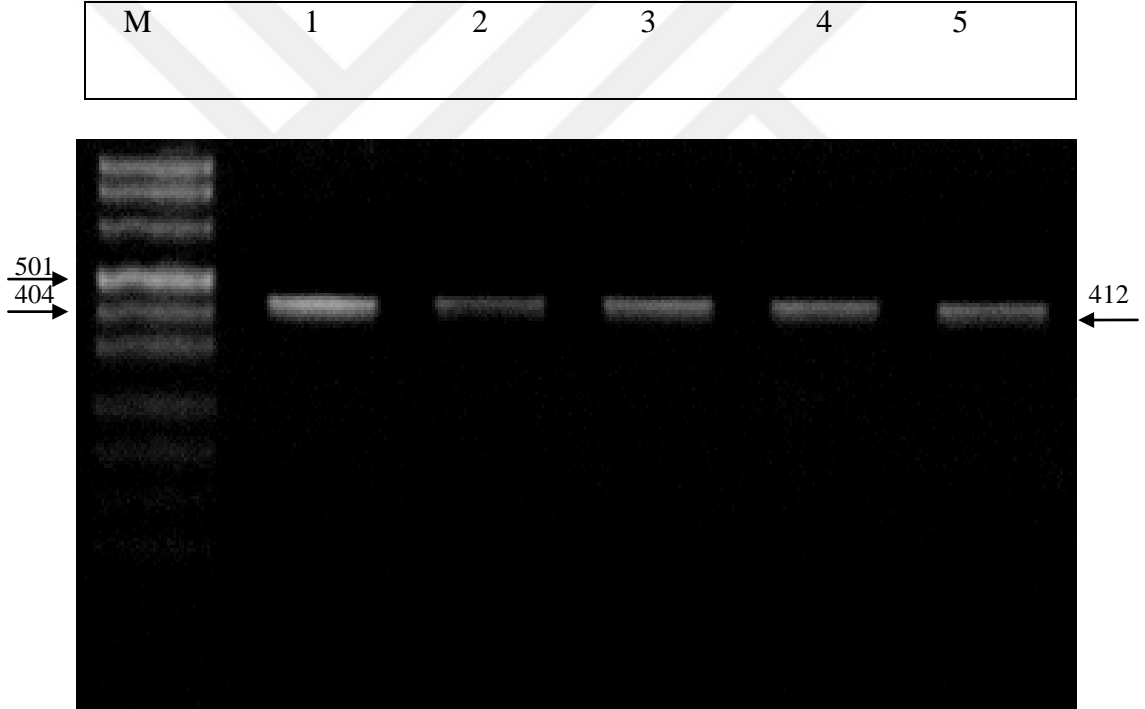
4.2. Dna'nın Kantitatif Tayini

Genomik DNA'nın kantitatif tayini, spektrofotometrik ölçümler ile yapıldı. DNA'ların saflığı OD260 ve OD280 değerlerinin birbirlerine olan oranı alınarak hesaplandığında, örneklerin saflığının 1.52- 1.79 değerlerinde olduğu belirlendi.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pzr) Analizleri

NPC1 geni +644 A→G Polimorfizmi;

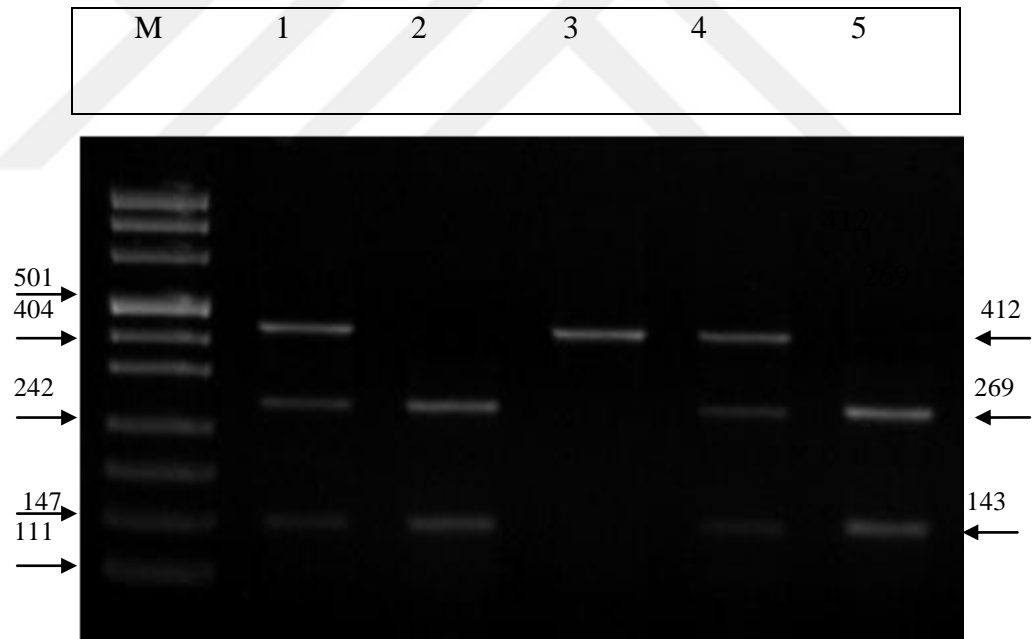
NPC1 geninin restriksiyon enzim kesim analizi yapılacak olan +644A→G Polimorfik noktasını içeren 412 bç'lik bölgesi Tablo 3.3'de verilen PZR karışımına ve Tablo 3.4'de belirtilen PZR programına göre çoğaltılarak %2'lik agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. NPC1 geninin +644 A→G polimorfik noktalarını içeren 412 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünümü. M: pUC mix Marker

4.4. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Rflp) Analizleri

NPC1 geni +644 A→G Polimorfizmi kromozom 18'de bulunan polimorfik noktaları içeren 412 bç'lik bölgesi NPC1 Gen Polimorfizminin Analizi Bölümü'nde belirtilen PZR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra NcoI restriksiyon enzimi ile 37 °C'de yaklaşık 30 dakika kesime bırakıldı. NPC1 geninin +644 A→G polimorfizmini görüntülemek için önceden hazırlanmış 100ml 1xTBE tamponu içerisinde çözünmüş % 2'lik (1,4 gr agaroz ve 0,6 gr nusieve) olarak hazırlanmış jele yüklenen kesim ürünleri elektroforezde 120 V'da 30 dakika yürütüldü ve ultraviyole ışıkta incelendi. NPC1 geninin +644 A→G polimorfizminin incelendiği, NcoI restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu PZR ürünü, enzim tanıma bölgesindeki değişime bağlı olarak beklendiği gibi, homozigot A/A bireylerde 269 ve 143 bç'lik DNA parçaları şeklinde, heterozigot A/G bireylerde 412, 269, 143 bç'lik DNA parçaları şeklinde, homozigot G/G bireylerde 412 bç'lik DNA parçaları şeklinde gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. NPC1 geninin +644 A→G polimorfizminin incelendiği NcoI restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiş PZR ürünlerinin % 2'lük (1,4 gr agaroz ve 0,6 gr nusieve) jel görünümü (AA:269,143 bç; AG:412,269,143 bç GG: 412 bç). M: pUC mix marker (2 ve 5 no'lu örnekler AA; 1 ve 4 no'lu örnekler AG; 3 no'lu örnek GG).

4.5. İstatistiksel Analiz Bulguları

Koroner hastaları ve kontrol grubunda NPC1 geninin (+644A/G) polimorfizminin istatistiksel analizi Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. NPC1 geninin (+644 A→G) polimorfizminin istatistiksel analizi

Polimorfizm	Hastalar n=100	Kontroller n=100	p	OR (CI 95%)
Genotipler				
AA	35	52	0.003	
AG	33	35		
GG	32	13		
AA+AG : GG	68 : 32	87 : 13	0.001	3.13 (1.54-6.61)
AA : AG+GG	35 : 65	52 : 48	0.015	2.01 (1.14-3.56)
Alleles				
A	103	139	0.0002	2.14 (1.42-3.24)
G	97	61		

NPC1 gen polimorfizmi allel ve genotip sıklıkları ile koroner arter hastalığı arasında ileri düzeyde anlamlılık tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Modern toplumda çok yaygın olan ateroskleroz, multifaktöriyel bir hastalıktır. Fenotipik etkileşim, çevresel, sosyoekonomik ve genetik faktörler hastalığın gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Aterosklerozun başlaması ve ilerlemesi ile ilgili birçok konu çözülecek kalmıştır. Özellikle endotel disfonksiyonu öncesinde midir yoksa lipid depolama sonrasında mı oluşur konularında tartışmalar mevcuttur (Topol ve ark. 2008).

Damar hastalıklarında yeni moleküler hedefleri ortaya koymak için gen araştırma teknolojileri ve yeni tedavi moleküllerini tasarlamak için proteomikler gibi yeni teknolojiler kullanılmaktadır. İnsan gen dizisinin bir sonucu olarak yeni tedaviler için çok sayıda reseptör tanımlanmıştır. Nükleer genomun sayısız polimorfizmi aterosklerozun klinik dışı vurumlarının sadece birkaç yüzdesini açıklamaya yardım etmektedir. Genomdaki yeni sekans varyasyonlarının bilgisi, insanlarda yeni biyolojik yolları aydınlatma potansiyeline sahiptir ve böylece teşhis ve tedavi daha çabuk gelişmektedir. Ailelerde yapılan genom-çap bağlantı analizleri ve popülasyonlardaki ilişkili çalışmalar, koroner arter hastalığıyla ilişkili bir düzineden daha çok genetik bölge tanımlanmıştır. Yeri belirlenen nedensel genler ve varyantları haritalanan bölgeden taşımak ve bu genlerin koroner hastalığına nasıl yol açtığına moleküler anlayışını geliştirmek şimdi önemli bir sorundur (Nobel ve ark. 2006).

Lipit hipotezine göre kan plazmasında bulunan LDL endotelin içine sızıp yükseltgendiği (oksitlendiği) zaman kalp hastalığı için risk oluşturur. LDL oksidasyonuna etki eden karmaşık biyokimyasal reaksiyonlar zinciri vardır ve bunlar en çok endotelde bulunan serbest radikallerden kaynaklanır. Ateromdaki kolesterolün kaynağı LDL'dir. Dokulardaki kolesterolü karaciğere geri taşıyan HDL miktarı az ise bu LDL birikiminin başlattığı süreç daha da hızlanır. Köpük hücreleri ölünce içlerindeki kolesterol ve diğer lipitler ateromda birikmeye başlar. İnsanların aksine hayvan modellerinde yapılan pek çok çalışmada hayvan türlerinin aterosklerotik lezyon oluşumuna önemli bir şekilde dirençli olduğu trombotik komplikasyonlar göstermediği bulunmuştur (Onat ve ark. 2002).

Son bir GWAS meta analiz çalışması serum lipid seviyeleri ile ilişkili 95 bölge tanımlamış ve genetik polimorfizmler bu genlerin ifadesiyle ya da modifiye edilen fonksiyonuyla MI'nın ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (Teslovich ve ark. 2010). Ailesel hiperkolesterolemi gibi birkaç mendeliyen hastalık bu hipotezi desteklemiştir (Austin ve ark. 2004).

Son zamanlarda LDL reseptörünün yapısı ve biyosentezi ile ayrıntılı çalışmalar yürütülmüştür. Bu reseptörün görevi, hücre içine kolesterol taşıyan lipoproteinleri taşımaktır. Reseptörler, golgi kompleksi yoluyla lipoproteinleri endoplazmik retikulum membranlarında sentez yerine taşımaktadır. Daha sonra da endozom yoluyla hücre yüzeyine geri döndürmektedir. LDL reseptöründe doğal olarak meydana gelen mutasyonlar bu taşıma yollarının birkaçını bozabilmektedir.

Lizozom içinde LDL'den üretilen kolesterolün HMGCoA redüktaz enzimini baskılamadan sorumlu ajan olduğu kanıtlanmıştır. LDL'den üretilen kolesterol, sterol düzenleyici element bağlayan protein yolu sayesinde HMGCoA redüktaz geninin transkripsiyonunun baskılanmasında ve enzim proteininin bozulmasını hızlandırmada rol oynar (Brown,1999 ; Gil,1985). LDL'den üretilen kolesterol hücrenin kolesterol içeriğini sabit tutarken aynı zamanda diğer süreçlerin koordineli hareketini de düzenler. SREBP yolağının inhibe edilmesiyle LDL reseptör geninin transkripsiyonu baskılanır. Daha sonra hücreler metabolik ihtiyaç için gerekli olan kolesterolü sağlamak ve üretilen kolesterolün aşırı birikimi olmadan LDL reseptör sayısını ayarlamaya izin verir. Bu düzenleme mekanizmaları yoluyla hücreler membranlarında önemli bir şekilde esterleşmemiş kolesterol seviyesini sabit tutar. NPC1'in sterol bağlayan bölgesinin rolü hakkında bilgi kazanmak için LDL'den üretilen kolesterol ve sfingolipidler taşınmasında NPC1'de sterol bağlayan bölgelerde nokta mutasyonlarının etkileri üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Elizabeth ve ark. 2005).

Hücrel kolesterol metabolizmasını anlamamızda büyük bir boşluk yatmaktadır. Bir organelden bir diğerine taşınan kolesterol yolları hakkında bilgimiz sınırlıdır. Son zamanlarda NP-C denilen bir genetik hastalığın incelenmesiyle bu konuda bazı gelişmeler kaydedilmiştir. Bu resesif hastalık için homozigotlar, vücudun tamamında özellikle karaciğer hücrelerinde ve merkezi sinir nöronlarındaki hücre lizozomlarında kolesterol birikimi göstermektedir (Pentchev ve ark.1995). Nöronlarda

NPC1 fonksiyon kaybı asıl olarak merkezi sinir sistemi (MSS) patogenezinin sorumludur. NPC1 hastalıklı bir fare modelinde nöron hedefli gen kurtarma çalışması MSS kolesterol birikiminin yeterli kalitede düzeltilebileceğini göstermiştir. Fare modelleriyle yapılan çalışmada NPC1'in nörodejenerasyonu önleyebileceğini, glia aktivitesini azaltacağını ve hayvan sağlığını önemli bir şekilde iyileştirebileceğini göstermiştir (Manuel ve ark. 2013). Sekonder enzim defektlerini düzeltmek için enzimi yerine koyma gibi tedaviler ve gelecekte NPC1 hastası hastaların nöronlarında hedeflenen genetik müdahaleler uygun tedaviyi gerçekleştirecektir (Devlin ve ark. 2010).

İnfante ve arkadaşlarının yaptığı biyokimyasal çalışmalarda artılan NPC1 oksisterolün yanı sıra kolesterol, 25-hidroksikolesterol ve 27-hidroksikolesterolü de bağlayabilmektedir (Infante ve ark.2008). Birkaç çalışmada NPC1 ve ateroskleroz arasındaki bağlantı tahmin edilmiştir. NPC1 delesyonu kolesterol çıkışını bozmaktadır ve hücrel oksidatif stres teşvik ederek aterosklerozisi tetiklemektedir (Weiwei ve ark. 2010). Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, farelerin Ldlr makrofajlarında NPC1 'in bozulan ifadesi ve NPC1 ifadesinin yokluğu proaterojenik olduğunu göstermiştir (Zhang ve ark. 2008).

Nieaman pick C1-like 1 (NPC1L1) bağırsak kolesterol emiliminde önemli rol oynayan bir proteindir. NPC1L1, insan NPC1 proteininin homolojisine dayalı olarak tanımlanmıştır (Davies ve ark. 2000). Eliana ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NPC1L1 geninde meydana gelen mutasyonların koroner arter hastalığının insidansı, prevalansı ve lipid seviyelerini etkilediği gösterilmiştir (Eliana ve ark.2010).

Bugüne kadar farklı toplumlarda NPC1 geni ve varyantları arasında bağlantı çalışmaları yapılmıştır. Aşağıdaki tabloda NPC1'de bulunan bazı gen polimorfizmleri ve ilişkilendirilen hastalıklar yer almaktadır.

Tablo 4.6. NPC1 gen polimorfizmleri ve ilişkilendirilen hastalıklar

NPC1 GENİ		Hastalık	P değeri
ekson 21	I1061T (T→C)	Niemann pick hastalığı	anlamlı
SDD	Ile642Met	T2D	0.0137
ekson 6	His215Arg	Obezite	0.01
		Koroner	0.039
		Hipertansiyon	0.035

Batı Avrupa toplumunda niemann pick hastası olan bireylerle yapılan bir çalışmada klasik jüvenil formla ilişkili bir mutasyon tanımlanmıştır. I1061T NPC1 geninin ekson 21 bölgesinde bulunan T→C ye dönüşümünde kaynaklanan transisyonel bir mutasyondur. Tahminen NPC1'in transmembran 10 bölgesini etkilemektedir. I1061T sık bir NPC1 mutasyonu olarak görüldüğünden dolayı genotip fenotip korelasyonlarını incelemişlerdir. I1061T'de meydana gelen bir mutasyon hücresel LDL kolesterol işlenmesinde ciddi bir bozukluğa yol açmaktadır (Millat ve ark.1999).

Al-Daghri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda 6 varyant tanımlanmıştır fakat onlardan sadece ikisi sterol hemostasinin etkilendiği alanlarda bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi olan rs1805081 (His215Arg), lop1 de bulunmaktadır. Diğeri ise sterole duyarlı bölge (SDD) olan rs1788799 (Ile642Met) bulunmaktadır. Memeli NPC1 analizlerinde kodon 215 nispeten çeşitlidir oysa 642 konumu tüm türlerde korunmuştur. Suudi Arabistan'da yaklaşık 1500 bireyden (820 obez ve 648 obez olmayan kontrol) oluşan bir popülasyonun toplanmasıyla bu iki SNP'lerin obezite ve kilo alınımları arasındaki rolü analiz edilmiştir. Sonuçlar bu SNP'lerin obeziteyle hiçbir ilişkisi olmadığını göstermiştir. Benzer şekilde belirlenen NPC1 varyantları ve vücut kitle

indeksi arasında hiçbir ilişki yoktur. Daha sonra T2D için rs1805081 ve rs1788799 yakınlık rolü değerlendirilmiştir. rs1805081'in T2D üzerine yakınlığı gözlenmemişken, rs1788799 ve T2D üzerinde önemli bir ilişki belirlenmiştir (Minor allel 642Met, $P = 0.0137$, ihtimal oranı (OR) = 1.24). Daha sonra NPC1 haplotiplerinin diabete yakınlıktaki etkisi analiz edilmiştir. Yaş, cinsiyet ve VKI düzeltildikten sonra iki haplotipin karşı bir etkiyle T2D ile ilişkili olabileceği bulunmuştur. Özellikle, AC haplotipinin hastalığı koruduğu AG haplotipini ise hastalığa yakınlığı (rs1805081-rs1788799, 215His-642Ile ve 215His- 642Met) gözlenmiştir. Son olarak, yaklaşık 1500 bireyin açlık plazma lipid seviyeleri üzerinde NPC1 haplotiplerinin rolü değerlendirilmiştir. NPC1 haplotiplerinin LDL kolesterol üzerine belirlenen hiçbir etkisi bulunmamıştır. Ancak, farklı NPC1 haplotiplerinin hem erkek hem de bayanlarda HDL kolesterol ve trigliserid seviyeleri ilişkili bulunmuştur (Al-Daghri ve ark. 2012).

Avrupa popülasyonunda obesiteyle ilişkili olan polimorfizmlerden biri de NPC1 ekson 6'da bulunan 1805081'dir. Yaklaşık 1700 meksikalı çocuklar üzerinde yapılan bir çalışmada NPC1 rs1805081 ve açlık serum insülin seviyeleri arasında önemli bir ilişki bulunmuştur (A risk alleli; $P = 0.01$). Ancak popülasyon çalışmalarında NPC1 rs2815752 obezite ve VKI üzerinde çelişkili sonuçlar olduğundan dolayı tartışmalar mevcuttur (Mejía-Benítez ve ark. 2013).

Bugüne kadar farklı toplumlarda NPC1 geni ve koroner arasında bağlantı çalışmaları da yapılmıştır. NPC1 geninin kromozom 18'de bulunan +644 A→G tek nükleotid polimorfizmi plazma kolesterol düzeyi ve KAH'de NPC1 proteinin düzeyi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Weiwei ve ark. 2010). Weiwei ve arkadaşları Çin'de yaşayan bir toplumda (873 koroner hastası ve 864 sağlıklı birey) NPC1 geninin +644 A→G polimorfizminin genotip ve allelik sıklık dağılımlarını incelemiştirler. +644 A→G polimorfizminin genotip ve allel sıklığı bakımından koroner ile bağlantılı olduğu gösterilmektedir. Çin popülasyonunda +644 bölgesindeki G allelini (resesif model GG vs. AG+AA: [OR] , 95% CI 0.647 (0.428-0.980), $P = 0.039$ katkı modeli GG vs. AG vs. AA: OR , 95% CI 0.847(0.718-0.998), $P = 0.0471$ olarak bulmuşlardır. Weiwei ve arkadaşlarının çalışma sonuçlarına göre, +644 A→G polimorfizmin çalışma popülasyonunda koroner ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma +644A>G, NPC1'in yaygın bir varyantı olduğunu ve koroner arter hastalarında azalan bir riskle

ilişkili olduğunu göstermektedir. Sigara içenlerde NPC1 GG taşıyanlar AA ve AG taşıyanlarla karşılaştırıldığında koroner kalp hastalığının azalan bir riskine sahiptir (Weiwei ve ark. 2010).

Bu çalışmada koroner patogenezinde rolü olduğu düşünülen NPC1 genin +644 A→G polimorfizminin Türk toplumunda koroner hastalığı ile olası bağlantısının önemi araştırıldı. Çalışmaya 100 koroner hastası 100 koroner hastası tanısı almayan kontrol grubu dahil edildi.

Çalışma sonuçlarımız, NPC1 geni +644 A→G polimorfizmi ile koroner arasında allel ve genotip sıklık dağılımı bakımından anlamlı bir bağlantı olduğunu gösterdi. NPC1 geni +644A→G polimorfizmi ile ilgili AA, AG ve GG genotiplerinin sıklıkları sırasıyla hastalarda % 35, % 33, % 32 ve kontrol grubunda % 52, % 35, % 13 olarak bulundu. Allel sıklıkları hastalarda A alleli için % 51,5, G alleli için % 48,5 ve kontrol grubunda A alleli için % 69,5, G alleli için % 30,5 bulundu ($p=0.0002$, OR: 1.96, %95 CI: 1.42-3.24).

Çalışma sonuçlarımızı diğer toplumlarda yapılan çalışmalarla karşılaştırdığımızda, Çin'de yaşayan bir toplumda yapılan çalışmada bizim bulgularımıza benzer şekilde +644 A→G polimorfizmi ile koroner arasında bağlantının olduğu gösterilmektedir. Weiwei ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında ise NPC1 geninin +644 A→G polimorfizmi ile koroner arasında birbiriyle bağlantılı bulgular bulunmaktadır.

Yaptığımız bu çalışmada, Türk koroner hastaları için NPC1 geninin +644 A→G polimorfizmi ile koroner arasında anlamlı bir bağlantı bulundu. NPC1 geninin +644 bölgesinde A nükleotidinin G nükleotidine dönüşmesi ile homozigot GG genotipli hasta bireylerin, kontrol grubundaki homozigot GG genotipli bireylerle karşılaştırıldığında bu polimorfizmin koruyucu olduğunu düşündürmektedir ($p=0.003$). Ayrıca Türkiye popülasyonunda +644 bölgesindeki G allelinin (resesif model GG vs. AG+AA: [OR] , 95% CI 3.13 (1.54-6.61), $P=0.001$ katkı modeli GG vs. AG vs. AA: OR , 95% CI 2.01 (1.14-3.56), $P=0.015$) koruyucu olduğu kanıtlanmıştır.

Hiperkolesterolemi koroner arter hastalığının geleneksel risk faktörlerinden biridir. Ancak bu çalışmada koroner arter hastaları kolesterol seviyelerini kontrol etmek için kolesterol düşüren ilaçlar almışlardır. Bu yüzden LDL kontrollerle karşılaştırıldığında önemli derecede düşük ($p=0.001$), HDL ise çok daha yüksektir ($p=0.801$).

B Xi ve arkadaşlarının hipertansiyonlu Çin çocukları üzerine yaptığı bir çalışmada NPC1 rs 1805081: $p=0.0351$ diastolik kan basıncıyla önemli bir şekilde bağlantılı bulmuşlardır (B Xi ve ark. 2013). Çalışma sonuçlarımız, NPC1 geni +644A/G polimorfizmi ile hipertansiyonlu koroner arter hastalarında bir bağlantılı olmadığı gösterilmiştir ($P=0.056$).

Weiwei ve arkadaşları koroner aterosklerozda sigara ile NPC1 etkileşimi üzerine yaptığı çalışmada sigara kullanan ve kullanmayan koroner arter hastası iki grubun +644 A/G ilişkisini analiz etmişlerdir. Koroner arter hastalarında sigara içenler arasında G allelinin homozigot ve heterozigot frekansları hem resesif modelde hem de katkı modelinde çok daha düşük bulunmuştur. Sonuç olarak +644 A/G polimorfizmin NPC1 G alleli taşıyanlar A allel taşıyanlara göre koroner arter hastalığında daha koruyucudur (Weiwei ve ark. 2010). Bizim yaptığımız çalışmada 644 A/G ile sigara kullanma arasında koroner arter hastalığı arasında benzer bir şekilde ilişkili olmadığı gösterilmiştir.

Son zamanlarda Avrupa popülasyonunda yapılan bir çalışmada, insan NPC1 gen polimorfizmi ciddi ve erken başlangıçlı obeziteyle ilişkilidir (Meyre ve ark. 2009). Avrupalılarla yapılan bir başka çalışma rs 1805081'in obeziteyle ve artan vücut kitle indeksiyle (VKI) yatkın rol oynadığı doğrulanmıştır. Fakat varyant, tip 2 diabet ve plazma lipid seviyeleri arasında ilişki bulunmamıştır (Sandholt ve ark. 2011). Asya popülasyonlarında yapılan çalışmalarda ise NPC1, SNP'lerin yüksek VKI ve obezite riski üzerine etkisi hala tartışmalıdır (Xi ve ark. 2011; Wu ve ark. 2010). Bo ve arkadaşlarının Çinli çocuklar üzerine yaptığı son bir çalışmada GWAS' da santral obeziteyle ilgili 11 VKI ilişkili bölge tanımlanmıştır. Ancak bunlardan 4 genin bağlantılı bulunurken NPC1 rs 1805081'in santral obeziteyle ilişkili bulunmamıştır (Bo ve ark. 2013).

NPC1'deki mutasyonlar ya da polimorfizmlerdeki bu gözlemler karaciğer lipid hemostasinin değişimiyle sonuçlanır ve bunu kilo kazanma ve insülin direnci takip etmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada koroner arter hastalarında 644 A/G ile VKI arasında benzer bir şekilde ilişkili olmadığı gösterilmiştir (P= 0.461).

Bu çalışmaların bizi getirdiği nokta koroner fenotiplerinin daha dikkatle ayrılması gerektiğidir. Bu genlerin etkisinin kanıtlanması için daha geniş çalışma gruplarının toplanması ve daha spesifik yöntemlerin kullanılması önemlidir. Ayrıca polimorfizm sıklıklarının ırklar ve etnik gruplar arasında farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bunlara ek olarak toplumlararası sosyoekonomik farklılığın çalışma sonuçlarındaki çelişkiye sebep olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; bu çalışma literatürü taradığımız kadarıyla Türk toplumunda koroner ile NPC1 gen polimorfizmleri arasındaki bağlantıyı araştıran ilk çalışmadır. Bu nedenle toplumumuzdaki gelecek çalışmalar NPC1 geninin diğer polimorfizmlerinin de koroner ile bağlantıları analiz edilmelidir. Bu tür çalışmalar ateroskleroz patogenezinde NPC1 geninin rolünün anlaşılmasına katkıda bulunmanın yanı sıra, ileri dönemde bireylerin genotipleri ile tedaviye verdikleri cevaplar arasındaki bağlantının ortaya konulmasında ve yeni farmakolojik hedeflerin tespit edilerek etkinliği daha yüksek ilaçların geliştirilmesine de yardımcı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Ağırbaşı, D., Çırakoglu, B., Eren, F., Sümerkan, M., Aksoy, S., Aral, C., 2011. Effects of lecithin: cholesterol acyltransferase genotypes, enzyme levels and activity on high density lipoprotein levels. *J Clin Lipidol* ; 5: 152-8.
- Al-Daghri, N.M., Cagliani, R., Forni, D., Alokail, M.S., Pozzoli, U., Alkharfy, K.M., Sabico, S., Clerici, M., Sironi, M., 2012. Mammalian NPC1 genes may undergo positive selection and human polymorphisms associate with type 2 diabetes, *10:140*
- Anitschkow, N., Chalator, S., 1913. On experimental cholesterol steatosis and its significance in the origin of some pathological processes
- Austin, M.A., Hutter, C.M., Zimmern, R.L., Humphries, S.E., 2004. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. *Am J Epidemiol* 160: 421-429.
- Babalola, J.O., Wendeler, M., Breiden, B., Arenz, C., Schwarzmann, G., Locatelli-Hoops, S. and Sandhoff, K., 2007. Development of an Assay for the Intermembrane Transfer of Cholesterol by Niemann-Pick C2 Protein, *The Journal of Biological Chemistry* 388: 617-626
- Besler, C.T., Luscher, U.L., 2011. Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med* 4, 251–268
- Bi, X., Liao, G., 2010. Cholesterol in Niemann-Pick Type C disease. *Subcell Biochem* 51: 319–335
- Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., 1999. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* ;22:347–351.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., et al. 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* ;22:336–345.

- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* ;96:11041–8.
- Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., et al., 1997. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*. ;277:228–231.
- Casas, J.P., Cooper, J., Miller, G.J., Hingorani, A.D., Humphries, S.E., 2006. Investigating the genetic determinants of cardiovascular disease using candidate genes and meta-analysis of association studies. *Ann Hum Genet* ; 70: 145-69.
- Cheruku, S.R., Xu, Z., Dutia, R., Lobel, P., and Storch, J., 2006. Mechanism of Cholesterol Transfer from the Niemann-Pick Type C2 Protein to Model Membranes Supports a Role in Lysosomal Cholesterol Transport, *The Journal of Biological Chemistry* 281 (42): 31594-31604
- Chugh, S.S., Uy-Evanado, A., Teodorescu, C., Reinier, K., Mariani, R., Gunson, K., Jui, J., 2009. Women have lower prevalence of structural heart disease as a precursor to sudden cardiac arrest. The Oregon Sudden Unexpected Death Study). *J Am Coll Cardiol.* 54: 2006-2011
- Crawford, M., DiMarco, J., 2001. *Cardiology*. Mosby; 1.1.7-9
- Cohen, J., Pertsemlidis, A., Kotowski, I.K., Graham, R., Garcia, C.K., Hobbs, H.H., 2005. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* 37:161– 65
- Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley, T.H., Hobbs, H.H., 2006. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 354:1264–72
- Cooper, R., Cutler, J., Des vigne-Nickens, P., 2000. Trends and disparities in coronary heart disease, stroke, and other cardiovascular diseases in the United States: Findings of the National Conference on Cardiovascular Disease Prevention. *Circulation* ; 102:3137.

- Cooper, G.M., Hausman, R.E., 2006. Hücre Moleküler Yaklaşım. (3.Baskı). (Sakızlı, M.,Atabey, N., Çev.) İzmir. İzmir Tıp Kitapevi., 355-536
- Coxey, R.A., Pentchev, P.G., Campbell, G., Blanchette-Mackie, E.J., 1993 Differential Accumulation of Cholesterol in Golgi Compartments of Normal and Niemann-Pick Type-C Fibroblasts Incubated with LDL - a Cytochemical Freeze-Fracture Study. *Journal of Lipid Research* 34: 1165–1176.
- Dandona, S., Stewart, A.F., Roberts, R., 2010. Genomics in coronary artery disease: past, present and future. *Can J Cardiol.*;26(suppl A):56A–59A.
- Davies, J.P., B. Levy., and Ioannou, Y.A., 2000. Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1. *Genomics* . 65 : 137 – 145 .
- Devlin, C., Pipalia, N.H., Liao, X., Schuchman, E.H., Maxfield, F.R., Tabas, I., 2010. Improvement in lipid and protein trafficking in Niemann-Pick C1 cells by correction of a secondary enzyme defect. *Traffic.* ; 11:601–615.
- Demir, H., Gürakan, F., Vanier, M.T., Yüce, A., Özen, H., Saltıktemiz, i.n., 2005. Niemann Pick Disease Type C: 5 Case Reports, *Journal of Pediatric Surgery* 1(10): 66-68
- DiMarco, J.P., Paulus, W.J., editors., 2001. *Cardiology* 1st ed. USA. Elsevier Science Limited; p. 1.1. 1-12.
- Dixit, S.S., Sleat, D.E., Stock, A.M., and Lobel, P., 2007. Do mammalian NPC1 and NPC2 play a role in intestinal cholesterol absorption? *The Journal of Biological Chemistry* 408: 1-5
- Eliana, P., Inga, P., Jason, S.S., Robert, A.H., Michele, R., Ian, F., James, S., Christopher, P., Wouter, J.J., Anton, J.M., Rudi, G.J.W., 2010. Brendan M. B., and Ernst J. S., on behalf of the Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk (PROSPER) Investigators. DOI 10.1194/jlr.P001172.

- Engberding, N., Wenger, N.K., 2008. Cardiovascular disease prevention tailored for women. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 6:1123-34.
- Elizabeth, E.M., Sarah, E.G., Nicole, D., Jessie, Z., Jean, E. S., and Daniel, S., Ory., 2005. The Sterol-sensing Domain of the Niemann-Pick C1 (NPC1) Protein Regulates Trafficking of Low Density Lipoprotein Cholesterol. 63110-1010
- Ergin, M., 2004. Moleküler Patoloji. *Aegean Pathology Journal* 1, 103- 107.
- Eroğlu, O., Firidin, B. ve Çiftçi, Y., 2011. A study on determination of origin and species by using sequense and PCR-RFLP analisis in salmonids. *Bibad Bilolojical Sciences*, 4(1): 77-83.
- Ford, E.S., Capewell, S., 2007. Coronary heart disease mortality among young adults in the U.S. *J Am Coll Cardiol*. 50: 2128-32
- Freedman, D.S., Katzmarzyk, P.T., Dietz, W.H., Srinivasan, S.R., Berenson, G.S., 2009. Relation of body mass index and skinfold thicknesses to cardiovascular disease risk factors in children: The Bogalusa heart study. *Am J Clin Nutr* 90: 210–216.
- Gaw, A., Packard, C.J., Shepherd, J., 2000. Statins The HMG CoA Reductasen Inhibitors in Perspective ; 1:7
- Gil, G., Faust, J.R., Chin, D.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1985. Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* ;41:249–58.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2009. The LDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29:431–8
- Haase, C.L., Tybjaerg-Hansen, A., Qayyum, A.A., Schou, J., Nordestgaard, B.G., et al. 2012. LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: a Mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 97: E248-256

- Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee.,
Circulation 2010; 121: e46- e215.
- Helgadottir, A., Thorleifsson, G., Manolescu, A., et al., 2007. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 316:1491–1493.
- İliçin, Biberoglu, Süleymanlar, Ünal., 2003. İç Hastalıkları. Güneş Kitabevi , 2. baskı, Sayfa, 449-47
- Infante, R.E., Wang, M.L., Radhakrishnan, A., Kwon, H.J., Brown, M.S., et al., 2008 NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 15287–15292.
- Infante, R.E., Radhakrishnan, A., Abi-Mosleh, L., Kinch, L.N., Wang, M.L., Grishin, N.V., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2008. Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop. *J Biol Chem* ;283:1064–75.
- Ioannou, Y.A., 2005. Guilty until Proven Innocent: the case of NPC1 and Cholesterol, *TRENDS in Biochemical Sciences* 30 (9): 498-505
- Jalil, J.E., Córdova, S., Ocaranza, M., Schumacher, E., Braun, S., Chamorro, G., Fardella, C., Lavandero, S., 2002. Angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and adrenergic response to exercise in hypertensive patients. *Med Sci Monit* 8:CR566– CR571.
- Jelinek, D., Heidenreich, R.A., Erickson, R.P., Garver, W.S., 2010. Decreased *Npc1* gene dosage in mice is associated with weight gain. *Obesity (Silver Spring)* , 18(7):1457–1459.
- Jelinek, D., Millward, V., Birdi, A., Trouard, T.P., Heidenreich, RA., Garver, W.S., 2011. *Npc1* haploinsufficiency promotes weight gain and metabolic features associated with insulin resistance. *Hum Mol Genet* , 20(2):312–321

- Justin, M., Bachmann, M.D., 2012. Association Between Family History and Coronary Heart Disease Death Across Long-Term Follow-Up in Men
- Kaya, A., 2002. Elektroforez yöntemleri. Dicle Tıp Dergisi (Journal Of Medical School), C:29 S:3.
- Kathiresan, S., Myocardial Infarction Genetics Consortium. 2008. A PCSK9 missense variant associated with a reduced risk of early-onset myocardial infarction. N. Engl. J. Med. 358:2299–300
- Koylan, N., 2000. Koroner kalp hastalığı epidemiyolojisi, lipid düşürücü ilaç ile ilgili büyük klinik çalışmalar. Tür. Klin. Kardiol. Der. 13: 9-20.
- Kumar, A., Cannon, C.P., 2009. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. Mayo Clin Proc. 84(10):917-38.
- Kumar, Cotran, Robbins Türkçesi, 2000. Basic Pathology, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. Temmuz . Sayfa 283-289
- Kulyte, A., Ryden, M., Mejhert, N., Dungner, E., Sjolín, E., Arner, P., Dahlman, I., 2011. MTCH2 in human white adipose tissue and obesity. J Clin Endocrinol Metab, 96(10):E1661–1665
- Kwon, H.J., Abi-Mosleh, L., Wang, M.L., Deisenhofer, J., Goldstein, J.L., et al. 2009. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. Cell 137: 1213–1224
- Lloyd-Jones, D., Adams, R.J., Brown, T.M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., et al., 2010. Heart disease and stroke statistics- update: a report from the American
- Li, N.F., Zhou, L., Wu, W.D., Shi, Y., Wang, X.L., Wang, J., Li, H.J., Zhang, D.L., Zu, H., Ouyang, W.J., Bu, K.L., Zhou, K.M., Cheng, Q.Y., Guli, N., Zhu, D.H., 2004. The relationship between the variants in 5' upstream core promoter A(-6)G and A(-20)C of angiotensinogen gene and essential hypertension in Kazakans of Xinjiang (in Chinese). Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi ; 21: 23–28

- Liang, Y.J., Xi, B., Song, A.Q., Liu, J.X., Mi, J., 2012. Trends in general and abdominal obesity among Chinese children and adolescents 1993–2009. *Pediatr Obes* 7: 355–364
- Liu, B.C., Xie, J.A., Richardson, S.D., Turley, and J.M., Dietschy., 2007. Receptor-mediated and bulk-phase endocytosis cause macrophage and cholesterol accumulation in Niemann-Pick C disease. *J. Lipid Res.* 48: 1710–1723.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P., 2011 *Moleküler Hücre Biyolojisi*. (6.Baskı). (Geçkil, H., Özmen, M., Yeşilada, Ö. Çev) Ankara. Palme Yayıncılık., 579- 621.
- Lopez, M.E., Klein, A.D., Dimbil, U.J., and Scott, M.P., 2013. Departments of Developmental Biology, Genetics, and Bioengineering, Howard Hughes Medical Institute, Stanford University School of Medicine Clark Center, 318 Campus Drive, Stanford, California, U.S.A. 94305-5439.
- Marteau, J.B., Zaiou, M., Siest, G., Visvikis-Siest, S., 2005. Genetic determinants of blood pressure regulation. *J Hypertens* . 2127–2143.
- McPherson, R., Pertsemlidis, A., Kavaslar, N., et al., 2007. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 316:1488–1491.
- Mejía-Benítez, A., Klünder-Klünder, M., Yengo, L., Meyre, D., Aradillas, C., Cruz, E., Pérez-Luque, E., Malacara, J.M., Garay, M.E., Romero, J.P., Huerta, S.F., Mena, J.G., Froguel, P., Cruz, M., and Bonnefond, A., 2013. Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children , 14:21
- Meyre, D., Delplanque, J., Chevre, J.C., Lecoœur, C., Lobbens, S., Gallina, S., Durand, E., Vatin, V., Degraeve, F., Proenca, C., et al., 2009. Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet* 41(2):157–159.
- Millat, G., Marchais, C., Rafi, M.A., Yamamoto, T., Morris, J.A., Peter, G., Ohno, P.K., Wenger, D.A., and Vanier, M.T., 1999. Niemann-Pick C1 Disease:

The I1061T Substitution Is a Frequent Mutant Allele in Patients of Western European Descent and Correlates with a Classic Juvenile Phenotype 65:1321–1329,

Milicevic, Z., Raz, I., Beattie, S.D., Campaigne, B.N., Sarwat, S., Gromniak, E., Kowalska, I., Galic, E., Tan, M., Hanefeld, M., 2008. Natural history of cardiovascular disease in patients with diabetes: role of hyperglycemia. *Diabetes Care* . 31(Suppl 2):S155-S160

Morrish, N.J., Wang, S.L., Stevens, L.K., Fuller, J.H., Keen, H., 2001. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* . 44(Suppl 2):S14-S21.

Mohlke, K.L., Boehnke, M., Abecasis, G.R., 2008. Metabolic and cardiovascular traits: an abundance of recently identified common genetic variants. *Hum Mol Genet* 17(R2):R102-R108.

Nobel, E.G., Pyeritz, R.E., Seidman, C.E., 2006. Braunwald's Heart Disease. 67-98

Nordlie, M.A., Wold, L.E., Kloner, R.A., 2005. Genetic contributors toward increased risk for ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* ; 39: 667-79.

Onat, A., Başar, Ö., Erer, B., et al., 2001. Yetişkinlerimizde sigara içmenin sıklığı, HDL ile ilişkisi ve koroner olaylara etkisi. *Türk Kardiyoloji Dern. Arş.*; 29: 493-98.

Onat, T., Emerk, K., Sözmen, Y.E., 2002. İnsan Biyokimyası. Ankara. Palme Yayıncılık., 291-352.

Oram, J.F., 2002. Molecular Basis of Cholesterol Homeostasis: Lessons from Tangier Disease and ABCA1, *TRENDS in Molecular Medicine* 8 (4): 168- 173

Osler, W., 1892. *The Principles and Practice of Medicine*, Baltimore, Appleton

Öngen, Z., 2004. Aterosklerozun patogenezi: *Klinik Kardiyoloji*. Erol Ç (editör), Birinci baskı baskı, Nobel Yayınevi, Ankara , S:1-21.

- Özalpan, A., Ünsal,P.N., 2008. Genomik Uygulamalar.İstanbul Kültür Üniversitesi Yayınevi. İstanbul.1-25.
- Özcan, N., 1997. Koroner Kalp Hastalıkları. (Ankara). 1-165
- Pajukanta, P., Nuotio, I., Terwilliger, J.D., et al., 1998. Linkage of familial combined hyperlipidaemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet* ;18:369–373.
- Pajukanta, P., Lilja, H.E., Sinsheimer, J.S., et al., 2004. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet* ;36:371–376.
- Park, W.D., O'Brien, J.F., Lundquist, P.A., Kraft, D.L., Vockley, C.W., Karnes, P.S., Patterson, M.C., Snow, K., 2003. Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Hum. Mutat.* 22:313–325.
- Pentchev, PG., Vanier, MT., Suzuki, K., Patterson, MC., 1995. Niemann-Pick disease type C: A cellularcholesterol lipidosis.. In: Scriver, CR.; Beaudet, AL.; Sly, WS.; Valle, D., editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Vol. 7 ed.. McGraw-Hill Inc.; New York: p. 2625-39.
- Paul, D., Allan, S., 2001. Fast Facts- Hyperlipidaemia 1. Baskısının Türkçesi. Editör: Uzm Dr. Arif Nihat Dursun; Çeviri; Dr. Bülent Genç. And Danışmanlık Eğitim Yayıncılık ve Organizasyon Ltd. Şti. Sayfa 18-28.
- Prinz, W.A., 2010. Lipid Trafficking sans Vesicles: Where, Why, How? *Cell* 143: 870–874
- Rokitansky, K., 1855. *The Organs of Circulation: A Manuel of Pathological Anatomy*, Vol IV. Philadelphia, Blanchard & Lea
- Runz, H., Dolle, D., Schlitter, A.M., Zschocke, J., 2008 NPC-db, a Niemann-Pick type C disease gene variation database. *Hum Mutat* 29(3):345–350

- Sandholt, C.H., Vestmar, M.A., Bille, D.S., Borglykke, A., Almind, K., Hansen, L., Sandbaek, A., Lauritzen, T., Witte, D., Jorgensen, T., Pedersen, O., Hansen, T., 2011. Studies of metabolic phenotypic correlates of 15 obesity associated gene variants. *PLoS One*, 6:e23531.
- Sayre, N., Liscum, L., 2007. Cholesterol Homeostasis in a Niemann-Pick C Variant, *Abstracts/ Chemistry and Physics of Lipids* 149 : 1-10
- Schulze, H., Kolter, T., and Sandhoff, K., 2009. Principles of Lysosomal Membrane Degradation Cellular Topology and Biochemistry of Lysosomal Lipid Degradation *Biochimica et Biophysica Acta*
- Shaw, L.J., Bugiardini, R., Merz, N.B., 2009. Women and ischemic heart disease: Evolving Knowledge. *J Am Coll Cardiol.* 54: 1561-1575
- Shoji, S., Nishida, M., Ishii, K., Moriyama, T., Komuro, I., Takihara, K.Y., 2012. Smoking Promotes Subclinical Atherosclerosis in Apparently Healthy Men (*Circ J* ; 76: 2884 – 2891)
- Shen, G., Archacki, S.R., Wang, Q., 2004. The molecular genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. *Acute Coronary Syndrome* ;6:129–141.
- Stocker, R., Keaney, J.F., 2004. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol Rev.* 84: 1381–1478
- Subramanian, K., and Balch, W.E., 2008. NPC1/NPC2 Function as a Tag Team Duo to Mobilize Cholesterol, *Proceeding of the National Academy of Sciences* 105 (40): 15223-15224
- Swaiman, K.F., Ashwal, S., 1999. *Pediatric Neurology*. 3rd. edition, St Louis, Missouri, p.447-449.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004. İstanbul Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM). *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler Kitabı. Genişletilmiş 2. Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevi*

- Teslovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A.V., Edmondson, A.C., Stylianou, I.M., et al. 2010. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466: 707-713.
- Tokgözoğu, L., 2002. Ateroskleroz Patogenezi. *Hiperlipidemi ve Ateroskleroz Dergisi*. Tokgözoğlu ed. Argos İletişim Hizmetleri, İstanbul . 22-27.
- Topol, E.J., Califf, R.M., Prystowsky, E.N., Thomas, J.D., Thompson, P.D., 2008. *Cardiovascular Medicine*. 3. Baskı. Kozan, Ö., Çev. Güneş Tıp Kitap., 1-10
- Ünay, B., Vurucu, S., Akın, R., Kürekçi, E., Gül, D., Gökçay, E., 2003. Niemann-Pick Tip C Hastalığı : Olgu Sunumu, *Gülhane Tıp Dergisi* 45 (3): 271-273
- Valentin, F.R., Alexander, W., Rourke, R.O., 2002. *Hurt's The Heart*. 10. Baskısının Türkçe çevirisi. And Danışmanlık Eğitim Yayıncılık ve Organizasyon Ltd. Şti. 1. Basım. Sayfa, 1065-1109
- Vance, J.E., Hayashi, H., Karten, B., 2005. Cholesterol Homeostasis in Neurons and Glial Cells, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16: 193- 212
- Vance, J.E., 2006. Lipid Imbalance in the Neurological Disorder, Niemann-Pick C Disease, *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters* 580: 5518-5524
- Vance, J.E., Peake, K.B., 2011. Function of the Niemann-Pick type C proteins and their bypass by cyclodextrin. *Curr Opin Lipidol* 22: 204–209.
- Vanier, M.T., 2010. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet. J. Rare Dis.* ;5:16.
- Virchow, R., 1858. *Cellular Pathology*, London, John Churchill
- Voight, B.F., Peloso, G.M., Orho-Melander, M., Frikke-Schmidt, R., Barbalic, M., et al. 2012. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* 380: 572-580.
- Yağcı, A., 2006. Restriction Fragment Length Polymorphism ve Polimeraz Zincir Reaksiyon Bazlı Tipleme Yöntemleri. İnönü Üniversitesi.

- Zhang, J.R., Coleman, T., Langmade, S.J., Scherrer, D.E., Lane, L., Lanier, M.H., Feng, C., Sands, M.S., Schaffer, J.E., Semenkovich, C.F., et al., 2008. Niemann-Pick C1 protects against atherosclerosis in mice via regulation of macrophage intracellular cholesterol trafficking. *J Clin Invest* , 118(6):2281-2290.
- Zipes, D.P., Wellens, H.J., 1998. Sudden cardiac death. *Circulation* ;98:2334–2351.
- Wang, Q., Chen, Q., 2000. Cardiovascular disease and congenital defects. *Nature Encyclopedia of Life Sciences* ;3:646–657.
- Weiwei, Ma., Xu, J., Wang, Q., Xin, Y., Zhang, L., Zheng, X., Wang, H., Sun, K., Hui, R., Huang, X., 2010. Interaction of functional NPC1 gene Polymorphism with smoking on coronary heart disease. 11:149.
- Willer, C.J., Sanna, S., Jackson, A.U., Scuteri, A., Bonnycastle, L.L., et al. 2008. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat. Genet.* 40:161–69
- Wu, L., Xi, B., Zhang, M., Shen, Y., Zhao, X., Cheng, H., Hou, D., Sun, D., Ott, J., Wang, X., Mi, J., 2010. Associations of six single nucleotide polymorphisms in obesity-related genes with and risk of obesity in Chinese children. *Diabetes*, 59:3085-3089.
- Xi, B., Liang, Y., He, T., Reilly, K.H., Hu, Y., et al. 2012. Secular trends in the prevalence of general and abdominal obesity among Chinese adults, 1993–2009. *Obes Rev* 13: 287–296
- Xi, B., Wang, C., Wu, L., Zhang, M., Shen, Y., Zhao, X., Wang, X., Mi, J., 2011. Influence of physical inactivity on associations between single nucleotide polymorphisms and genetic predisposition to childhood obesity. *Am JEpidemiol* , 173:1256-1262.
- Xi, B., Cheng, H., Shen, Y., Chandak, G.R., Zhao, X., et al. 2013. Study of 11 - Associated Loci Identified in GWAS for Associations with Central Obesity in the Chinese Children. *PLoS ONE* 8(2): e56472. doi:10.1371/journal.pone.005647

7. ÖZGEÇMİŞ

28/05/1982 yılında Tokat'ta doğdu. İlk ve orta öğreniminin ardından Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2004 yılında Biyoloji lisans eğitimini tamamladı. 2010-2011 eğitim yılı 1.Yarıyılında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde açılan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.

