

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**AKUT KORONER SENDROM VE KRONİK KORONER  
ARTER HASTALARINDA ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD  
SENTAZ (eNOS) T-786C POLİMORFİZMİNİN KLİNİK VE  
BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tıbbi Biyolog Süreyya Melil**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**İSTANBUL, 2006**

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**AKUT KORONER SENDROM VE KRONİK KORONER  
ARTER HASTALARINDA ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD  
SENTAZ (eNOS) T-786C POLİMORFİZMİNİN KLİNİK VE  
BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tıbbi Biyolog Süreyya Melil**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Belgin Süsleyici Duman**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2006**

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. KALP DAMAR SİSTEMİ.....	4
4.1.1. Kardiyovasküler Düzenleyici Mekanizmalar.....	4
4.1.1.1. Prostaglandin ve Tromboksan-A <sub>2</sub> .....	5
4.1.1.2. Nitrik Oksid ve Kalp Damar Fizyolojisindeki Rolü.....	6
4.1.1.3. Endotelinler.....	7
4.1.1.4. Kininler.....	7
4.1.1.5. Adrenomedüllerin.....	8
4.1.1.6. Atrial Natriüretik Hormon .....	8
4.1.2. Nitrik Oksid Sentaz ve Görevleri.....	8
4.2. AKUT KORONER SENDROM.....	9
4.2.1. Akut Koroner Sendrom.....	9
4.2.2. Akut Koroner Sendrom Patogenezi.....	9
4.2.3. Akut Koroner Sendrom Risk Faktörleri.....	11
4.3. ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ (eNOS).....	11
4.3.1. eNOS Geni.....	11
4.3.2. eNOS Geni T-786C Polimorfizmi ile İlişkili Hastalıklar.....	15
4.4. POLİMORFİZM.....	15
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER.....	16
5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	16
5.1.2. Kullanılan Çözeltiler.....	16
5.2. ÇALIŞMA GRUBU.....	17
5.2.1. Çalışma Dışı Tutulanlar.....	17

5.3. KULLANILAN İNCELEME YÖNTEMLERİ.....	18
5.3.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanma Koşulları.....	18
5.3.2. Uygulanan Biyokimyasal Laboratuar Analizleri.....	18
5.4. ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ GEN AMPLİFİKASYONU VE T-786C MUTASYON TESPİTİ İLE İLGİLİ YÖNTEMLER.....	19
5.4.1.DNA İzolasyonu.....	19
5.4.2. DNA Miktarının Ölçülmesi.....	20
5.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	20
5.4.4. PZR Ürünlerinin Yatay Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi.....	22
5.4.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi.....	23
6. BULGULAR.....	24
7. TARTIŞMA.....	32
8. SONUÇ.....	36
9. TEŞEKKÜR.....	37
10. KAYNAKLAR.....	38

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>A</b>	Adenin
<b>Ach</b>	Asetil-kolin
<b>AKS</b>	Akut koroner sendrom
<b>AM</b>	Adrenomedüllin
<b>ANF</b>	Atrial natriüretik faktör
<b>Arg</b>	Arginin
<b>bç</b>	Baz çifti
<b>BKİ</b>	Beden kitle indeksi
<b>C</b>	Sitozin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalsiyum
<b>cGMP</b>	Döngüsel guanozin monofosfat
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>Dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleozid trifosfat
<b>EDRF</b>	Endotel kaynaklı gevşetici faktör
<b>eNOS</b>	Endotelyal nitrik oksid sentaz
<b>ET</b>	Endotelin
<b>G</b>	Guanin
<b>HDL</b>	Yüksek dansiteli lipoprotein
<b>His</b>	Histidin
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>IP<sub>3</sub></b>	İnositoltrifosfat
<b>iNOS</b>	İndüklenebilir nitrik oksid sentaz
<b>KKAH</b>	Kronik koroner arter hastalığı
<b>LDL</b>	Düşük dansiteli lipoprotein
<b>Leu</b>	Lösin
<b>Mİ</b>	Miyokard infarktüsü
<b>nNOS</b>	Nöronal nitrik oksid sentaz
<b>NO</b>	Nitrik oksid

<b>Nt</b>	Nükleotid
<b>O<sub>2</sub></b>	Oksijen
<b>OD</b>	Optik dansite
<b>Phe</b>	Fenil
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinozitolbifosfat
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RFLP</b>	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>SE</b>	Standart error
<b>Sn</b>	Saniye
<b>T</b>	Timin
<b>TG</b>	Trigliserid

T. C. Kadir Has Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 16.09.2005 tarih ve 2005/09 numaralı karar ile onaylanmıştır.

**Araştırma Projesi Numarası : TBG/0152004**

## 1. ÖZET

Nitrik oksid (NO), nitrik oksid sentaz (NOS) enzimi tarafından L-Argininden sentezlenir. NOS enziminin nNOS (nöronal), iNOS (indüklenebilir) ve eNOS (endotelial) olmak üzere üç izoformu vardır. eNOS geni T-786C polimorfizmi kalp yetersizliği (2, 3), koroner spazm (9, 10, 11, 12), miyokard infarktüsü (Mİ) (10, 13), ateroskleroz (14, 15, 16) gibi bir çok kalp-damar hastalığı ile ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmada amacımız, akut koroner sendrom (AKS) ve kronik koroner arter hastalığı (KKAH) tanısı konmuş hastalarda eNOS geni T-786C polimorfizminin hastalık oluşumu üzerindeki ve biyokimyasal parametrelere olan etkileri araştırmaktır. Bu amaçla, 10 adet AKS ve 20 adet KKAH tanısı konmuş hasta ve rutin sağlık kontrolleri için müracaat edip koroner anjiyografiyle koronerlerinin normal olduğu tespit edilen 31 sağlıklı kişi incelendi. eNOS T-786C genotipleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon uzunluk parça polimorfizmi (RFLP) yöntemlerinin uygulanması ile saptandı.

Endotelial nitrik oksid sentaz genine ait T-786C genotip sıklıkları; AKS' lu grupta %10 TT, %40 CT, %50 CC; KKAH grupta %75 TT, %20 CT, %5 CC ve kontrol grupta %67.7 TT, %25.8 CT, %6.5 CC olarak bulundu. AKS grubunda C/C genotipinin sıklığını kontrol grubuna kıyasla yüksek bulmamız, C/C genotipinin AKS oluşumunda rol alabileceğini düşündürmektedir. KKAH ve kontrol grupları arasında T-786C genotip sıklıkları açısından anlamlı bir fark olmayışı T-786C polimorfizminin KKAH ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Ayrıca T-786C genotiplerinin sol ventrikül hipertrofisi ve serum lipidleri üzerinde herhangi bir etkisine rastlanmadı.

## 2. SUMMARY

Nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine by the nitric oxide synthase (NOS) enzyme. NOS has three isoforms which are nNOS (neuronal), iNOS (inducible) and eNOS (endothelial). eNOS gene T-786C polymorphism has been shown to have increased predisposition to various heart-vessel diseases such as; heart failure (2,3), coronary spasm (9, 10, 11, 12), myocardial infarction (10, 13) and atherosclerosis (14, 15, 16).

The aim of our study was to determine the effects of eNOS gene T-786C polymorphism over disease generation and biochemical parameters in patients with acute coronary syndrome (ACS) and chronic coronary artery disease (CCAD). For this purpose 10 patients with ACS, 20 patients with CCAD and 31 healthy individuals proven to have normal coronaries with angiography were analyzed. eNOS T-786C genotypes were determined with polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) methods.

The frequencies of eNOS T-786C genotypes were found to be 10% TT, 40% CT, 50% CC for the ACS group; 75% TT, 20% CT, 5% CC for the CCAD group, and 67.7% TT, 25.8% CT, 6.5% CC for the control group. The higher frequency of C/C genotype in the ACS group compared to controls suggests that CC genotype may play role in ACS generation. The lack of significant difference of the T-786C genotype frequencies between CCAD and control groups shows that T-786C polymorphism has no relationship with CCAD. Furthermore, T-786C genotypes have no effect over left ventricle hypertrophy and serum lipids.



### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut Koroner Sendrom (AKS) terimi stabil olmayan anjina, ST elevasyonsuz miyokard infarktüsü (Mİ) ve ST elevasyonlu Mİ gibi durumları kapsar (1, 2). AKS patogenezinde ilk basamak ılımlı, stenotik, lipidce zengin kırılğan plakların kopmasıdır. Bu plakları tehlikeli kılan büyük damarların lümeninde daralma oluşturmalarından çok, kırılğan olmalarıdır. Plakların yerinden kopması değişik seviyelerde koroner tıkanmaya yol açar. Bu olaylar sonucunda akut ve şiddetli göğüs ağrısı ile karakterize olan stabil olmayan anjina (unstable angina pectoris) veya Mİ meydana gelir (2, 3, 4).

Nitrik oksid (NO), kalp-damar fizyolojisinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Endotelden salınan gevşetici faktör olan NO tüm vazodilatörlerin aktif bileşenidir ve yarı ömrü çok kısadır. NO, NO sentaz (NOS) enzimi tarafından L-Argininden sentezlenir. NO sentaz enziminin nöronal (nNOS), indüklenebilir (iNOS) ve endotelyal (eNOS) olmak üzere üç izoformu vardır. eNOS hem in vivo hem de in vitro şartlarda sürekli sentez edilen tek NOS izoformudur (2, 5, 6, 7).

Endotelyal nitrik oksid sentaz geni 26 ekson içeren, 21 kilobazlık genomik DNA dan oluşur ve haploid genomda tek kopya olarak bulunur. T-786C tek nükleotid polimorfizimi eNOS geninin promotör bölgesinde yer alır (8). eNOS geninde T-786C polimorfizmi kalp yetersizliği (2, 3), koroner spazm (9, 10, 11, 12), Mİ (10, 13), ateroskleroz (14, 15, 16) gibi bir çok kalp-damar hastalığı ile ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, AKS ve kronik koroner arter hastalığı (KKAH) tanısı konmuş hastalarda eNOS geni T-786C polimorfizminin hastalık oluşumu üzerindeki ve biyokimyasal parametrelere olan etkilerini araştırmaktır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. KALP DAMAR SİSTEMİ

#### 4.1.1. Kardiyovasküler Düzenleyici Mekanizmalar (17)

Kardiyovasküler düzenleyici mekanizmalar, etkin dokulara kan sağlanmasını artırır ve kanın yeniden dağılımı ile vücuttan ısı kaybını azaltır ya da çoğaltır. Kanama gibi organizmanın savaşıması gereken durumlarda kardiyovasküler düzenleyici mekanizmalar, kalp ve beyinin kanlanmasını sürdürür. Kanama çok fazla ise, yaşamsal organlara kan akımı, vücudun geri kalan kısmına ait dolaşımdan çekilerek sürdürülür.

Dolaşıma ait ayarlamalar, kalbin dakika atım hacmi (debi), başlıca arteriyollerin çapı veya venlerde göllenmiş kan miktarı değiştirilerek yapılır. Arteriyollerin çapı, otoregülasyonun bir parçası olarak ayarlanır. Ayrıca bu çap, etkin dokularda yerel olarak üretilen vazodilatör metabolitler tarafından artırılır, endotelden salınan maddelerden etkilenir ve sistemik dolaşımda bulunan vazoaaktif maddeler ve arteriyollerini innerve eden sinirler tarafından sistemik olarak düzenlenir. Venlerin çapı da, dolaşımdaki vazoaaktif maddeler ve vazomotor sinirler tarafından etkilenir. Sistemik düzenleyici mekanizmalar, yerel mekanizmalarla işbirliği yaparak, bütün vücutta damar yanıtlarını ayarlar.

Damarların büzülmesi (vazokonstriksiyon) ve genişlemesi (vazodilatasyon) deyimleri genellikle, direnç damarlarının daralması ve genişlemesini belirtmek için kullanılır. Dokuların kendi kan akımını düzenleme yeteneği, özdüzenleme (otoregülasyon) olarak adlandırılır. Damar yataklarının çoğu, damar direncindeki değişikliklerin perfüzyon basıncında yaptığı orta şiddette değişimleri karşılayacak özelliktedir. Bu yolla kan akımı olabildiğince sabit tutulur. Damar genişletici maddeler etkin dokularda birikme eğilimindedir ve bu metabolitler, otoregülasyona da katkıda bulunur. Kan akımı azaldığında damar genişletici maddeler birikerek damarları genişletir. Kan akımı arttığı zaman ise bu metabolitler dokudan yıkanarak uzaklaştırılırlar. Damarda genişleme yapan metabolik değişiklikler arasında, azalmış O<sub>2</sub> basıncı ve düşük pH yer alır. Bu değişiklikler, arteriyoller ve prekapiller sfinkterlerin gevşemesine neden olur. Artmış CO<sub>2</sub> basıncı ve

osmolarite de damarları genişletir. CO<sub>2</sub>' in damar genişletici etkisi, en belirgin olarak beyin ve deride gözlenir. Sıcaklıkta bir artış, doğrudan damar genişletici etki gösterir ve etkin dokulardaki sıcaklık artışı (metabolik ısıya bağlıdır) damar genişlemesine katkıda bulunabilir. K<sup>+</sup>, yerel olarak birikerek damar gevşetici etki gösteren bir diğer maddedir. Laktat da dilatasyona katkıda bulunabilir. Örselenmiş dokularda harap olan hücrelerden serbest kalan histamin kapiller geçirgenliği artırır. Böylece histamin, yangı bölgelerindeki şişmenin bir bölümünden sorumlu olabilir. Kalp kasında damar gevşetici rolü olan adenozinin, iskelet kasında böyle bir etkisi yoktur.

Endotel hücreleri birçok büyüme faktörleri ve vazoaaktif maddeleri salgılar. Vazoaaktif maddeler arasında, prostaglandinler, tromboksanlar, NO ve endotelinler sayılabilir.

#### **4.1.1.1. Prostatiklin ve Tromboksan-A2**

Prostatiklin endotel hücreleri, tromboksan-A2 trombositler tarafından, siklooksijenaz yolu ile ortak öncül maddeleri olan araşidonik asitten üretilir.

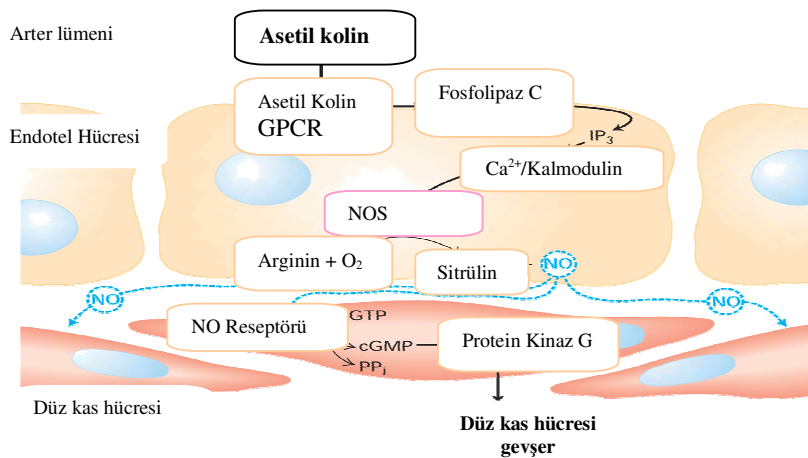
Tromboksan- A2 trombosit kümelenmesi ve damar büzülmesini uyarırken, prostatiklin, trombosit kümelenmesini önler ve vazodilatasyona neden olur. Tromboksan-A2 ve prostatiklin arasındaki denge bölgesel trombosit kümelenmesi ve pıhtı oluşumunu artırırken, pıhtının aşırı yayılmasını önler ve pıhtı çevresindeki kan akımının devamlılığını sağlar.

Düşük dozda aspirin, tromboksan -A2 prostatiklin dengesini prostatiklin yönüne kaydırabilir. Aspirin, etkin bölgedeki bir serin kalıtımsı asetilleyerek siklooksijenazı geri dönüşümsüz biçimde inhibe ederek, hem tromboksan-A2 hem de prostatiklin üretimini azaltır. Endotel hücreleri saatler içinde yeni siklooksijenaz üretirken trombositler enzim üretmediğinden enzim düzeyi dolaşıma yeni trombositlerin katılması ile yükselebilir. Az miktarda aspirinin uzun süre kullanılması pıhtı oluşumunu azalttığı için, Mİ, kararlı olmayan angina, geçici iskemik ataklar ve inmenin önlenmesinde değer taşır (17).

#### 4.1.1.2. Nitrik Oksid ve Kalp Damar Fizyolojisindeki Rolü

Nitrik oksid 1995 yılında keşfedilmiş olup, 1998 yılında Nobel' e konu olmuştur. NO' in bulunmasından kısa bir süre sonra eNOS klonlandı ve bu enzimin substratı olan L-Arginin tanımlandı (9, 11, 12, 18). NO endotelden üretilip salgılanan ve damar düz kasının gevşemesini sağlayan gevşetici faktördür (EDRF) (9, 11, 19, 20). NO, lokal vasküler denge için esansiyel olup, kimyasal olarak stabil olmayan bir serbest radikaldir. 5-10 saniye arasında değişen yarı ömrü nedeniyle hücre dışı alanda sadece lokal bir etkiye sahiptir. NO, tüm nitrovazodilatatörlerin aktif komponentidir (8, 9, 12). Düz kas hücrelerinin gevşetilmesi, trombosit aktivasyonunun inhibisyonu, damar düz kas hücrelerinde büyüme ve göçün baskılanması ile damar duvarında sentezlenen endotelin' in düzenlenmesi NO' in başlıca görevleridir (21, 22). NO eksikliğinde vasküler endotelin artışına bağlı olarak periferik dirençte artış meydana gelir (14, 23, 24). NO, hemoglobin tarafından etkisizleştirilir.

NO sentezine etkili olan başlıca uyarılar; kan akımının damar üzerinde oluşturduğu basınç, asetilkolin ve bradikininir (23, 25, 26). Asetilkolin, endotel hücre yüzeyinde bulunan G-proteine bağlı reseptörüne bağlandığında G-proteininde yapısal değişiklik meydana gelir ve fosfolipaz-C aktiflenir. Aktiflenen fosfolipaz-C, fosfatidilinozitolbifosfat'ı (PIP<sub>2</sub>) inositoltrifosfata (IP<sub>3</sub>) dönüştürür. Sitoplazmada IP<sub>3</sub> seviyesinin artışı endoplazmik retikulumda depolanan Ca<sup>2+</sup>' un sitoplazmaya geçişini tetikler. Sitozolde oluşan Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin kompleksinin NOS' ı aktiflemesi sonucu L-arginin ve O<sub>2</sub>' den, sitrülün ve NO sentezlenir (Şekil 1) ( 23, 27, 28 ).



Şekil 1. NO sentezi ve etki mekanizması

Endotel hücrelerinden salınan NO, düz kas hücrelerine difüzyon ile geçer. Kas hücresi içerisinde artan NO konsantrasyonu, cGMP artışını tetikleyerek protein kinaz G'yi aktive eder, hücre içi Ca<sup>2+</sup> seviyesi azalır ve kas hücresi gevşer (23, 28).

NO sentazı inhibe eden çeşitli arginin türevlerinin deney hayvanlarına verildiğinde gözlenen kan basıncındaki ani yükselme, NO' nun fizyolojik rolünü desteklemektedir. Normal kan basıncının korunması için NO' nun tonik salınımı gerekmektedir.

NO, damar yeniden yapılanması ile anjiogeneze ve aterosklerozun patogeneze katılır. Bu yönden, kalp nakli yapılan bazı hastalarda, kalp damarlarında hızla gelişen bir ateroskleroz görülmesi bu olayın endotel harabiyeti ile tetiklendiğini düşündürmektedir. Angina tedavisinde büyük değeri olan nitrogliserin ve diğer nitrovazodilatörler, guanilil siklazı, tıpkı NO gibi uyararak etki gösterir.

#### **4.1.1.3. Endotelinler**

Endotelinler, 21 amino asit ihtiva eden güçlü vazokonstrüktif peptidlerdir. Benzer özellikler gösteren farklı endotelin genlerinin kodladığı ET-1, ET-2 ve ET-3 olarak bilinen endotelin tipleri vardır. Bu üç endotelin izoformu, bir çok dokuda farklı oranlarda dağılmıştır. Endotelinin vazokonstrüktif etkisi yanında vazodilatatif, proliferatif ve diüretik etkileri vardır (29, 30).

#### **4.1.1.4. Kininler**

Vücütte kininler olarak adlandırılan, birbiriyle bağlantılı iki vazodilatör peptid bulunur. Biri nanopeptid olan bradikinin, diğeri kalidin olarak da bilinen bir dekapeptid olan lizilbradikinin'dir. Lizilbradikinin, aminopeptidazla bradikinine çevrilebilir. Her iki peptid, karboksil ucu Arg'i uzaklaştıran bir karboksipeptidaz olan kininaz I tarafından fonksiyonel olmayan parçalara metabolize edilir. Buna ek olarak, dipeptidil-karboksipeptidaz olan kininaz II, karboksil ucundaki Phe-Arg'i kopararak bradikinin ve lizilbradikininini inaktive eder. Kininaz II, anjiyotensin 1'in karboksil ucundaki His -Leu'i uzaklaştıran anjiyotensin-dönüştürücü enzim ile aynıdır (17).

#### **4.1.1.5. Adrenomedüllin**

Adrenomedüllin (AM), NO üretimini arttırarak baskılayıcı etki gösteren bir polipeptiddir. AM, tuzdan yoksun bırakılmış hayvanlarda aldosteron salgısını inhibe eder. AM, böbreküstü bezine ek olarak, beyin ve böbrek dahil birçok dokuda ve plazmada bulunur. AM' nin kardiyovasküler rolü bilinmemektedir (17).

#### **4.1.1.6. Atrial Natriüretik Hormon**

Kardiyak miyositler tarafından üretilip dolaşıma salınan atrial natriüretik hormon (ANF) sempatik aktivasyon inhibitörü olan bir vazodilatördür. ANF' nin görevleri, natriürez ve diürez oluşturmak, plazma renin aktivitesini ve aldosteron salgılanmasını baskılamaktır. ANF salınımının önemli düzenleyicileri arasında atriumların gerilmesi ve basınç yükseklikleri sayılabilir (31).

#### **4.1.2. Nitrik Oksid Sentaz ve Görevleri**

Nitrik oksid sentaz, L-Argininden NO sentezler. NOS' ın üç izoformu vardır. Bunlar;

- nNOS : Nöronal izoformudur. Sempatik sinir sonlarında bulunur.
- iNOS : Uyarılabilir izoformudur. Aktif makrofaj ve miyositlerde bulunur.
- eNOS: Endotelial izoformudur. Vasküler endotel, trombositler ve endokardda bulunur (5, 32).

NOS' un endotelial ve nöronal izoformları  $Ca^{2+}$ /kalmodulin mekanizmasına bağımlı bir şekilde bazal NO seviyesini az miktarda yükseltir. Buna karşılık uyarılabilir NOS doğru fizyolojik uyarı ile yüksek seviyelerde NO üretir. Bu üretim  $Ca^{2+}$  dan bağımsızdır. NOS enziminin her üç izoformu kalpte mevcuttur. eNOS hem in vivo hem de in vitro şartlarda sürekli sentez edilen tek NOS izoformudur (6, 7, 32).

## **4.2. AKUT KORONER SENDROM**

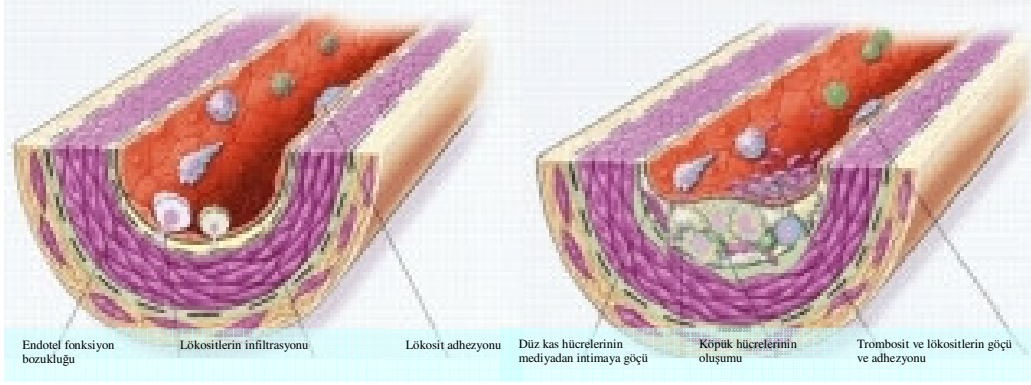
### **4.2.1. Akut Koroner Sendrom**

Akut koroner sendrom (AKS), koroner arterlerde meydana gelen aktif blokaj sonucu oluşur. AKS, stabil olmayan anjina, ST elevasyonsuz Mİ ve ST elevasyonlu Mİ gibi durumları içerir (1).

Dünyada 143 milyon koroner arter hastasının %5-6'lık dilimini AKS nedeniyle hastanelere başvuran kişiler oluşturmaktadır. AKS hastalarının yaklaşık 2/3'ünde, ST elevasyonsuz Mİ ve anstabil anjina pektoris gözlenirken, sadece 1/3'ünde ST elevasyonlu Mİ gözlenmiştir (33, 34). AKS' u tehlikeli kılan asıl faktör, hastane şikayetlerinin azalması ve iyiye gidiş gözlenmesi sebebi ile taburcu edilen hastaların aslında, orta ve uzun vadede yüksek ölüm riski ile karşı karşıya olmalarıdır. Bu risk şikayetin gözlendiği tarihten itibaren başlayarak 3-4 yıl sonrasına kadar artarak devam etmektedir. Ölüm oranları AKS şikayetinden 1 ay sonra %1.7 iken, 2 yıl sonra %9.5' dir (33, 34). AKS tanısı konmuş kişilerde %2 oranında ölüm beklenmesine rağmen bu oran %4-5 civarında gerçekleşmektedir.

### **4.2.2. Akut Koroner Sendrom Patogenezi**

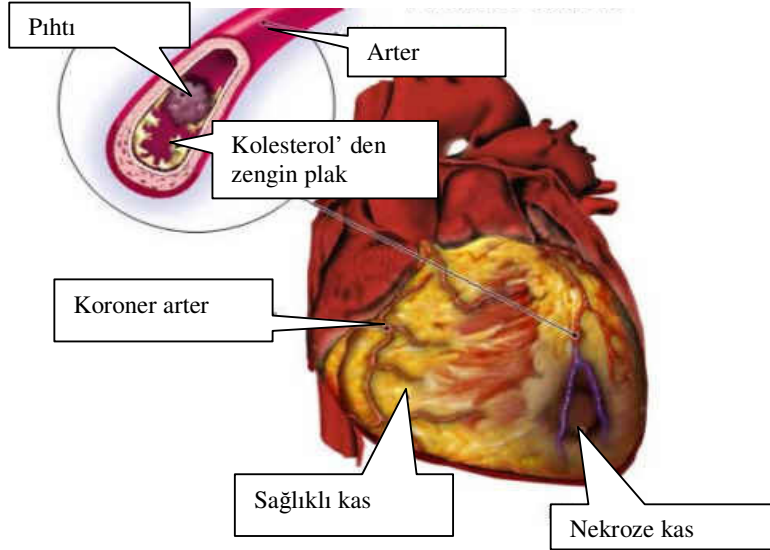
Akut koroner sendrom patogenezinde ilk basamak lipid bakımından zengin, ince fibröz tabakaya sahip, kırılabilir plakların kopmasıdır. Kırılmaya çok yatkın olan bu plaklar yerlerinden koparak farklı seviyelerde koroner obstrüksiyona neden olurlar (3, 35, 36). AKS patogenezinin ilk basamağı olan plak oluşumu endotel fonksiyon bozukluğundan kaynaklanır (3, 35, 36). AKS' da oluşan plaklar, endotel tarafından engellenemeyen inflamatuvar infiltrattan oluşur. AKS hastalarında inflamatuvar reaksiyonun sistemik bulguları gözlenebilir. Bu bulgular; dolaşımdaki inflamatuvar hücreler (nötrofiller, monositler, lenfositler) ile pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6 ve C reaktif protein gibi) artmış konsantrasyonudur (37). Monositler infiltrat oldukları alanda aktive olarak, makrofajlara dönüşürler. Makrofajların ve miyositlerin sitoplazmalarında düşük dansiteli lipoprotein birikimi ile birlikte lipid bakımından zengin plaklar oluşur (Şekil 2).



**Şekil 2.** Akut koroner sendrom' da plak oluşumu (38)

AKS' da plak yerinden koptuğunda, yaralı endotel intakt olmadığından asetilkolin (Ach) uyarısını alamaz. Ach' ın endoteli uyarabilmesi için endotelin intakt olması gerekmektedir (3, 29). Bu nedenle, AKS ile hastaneye başvuran hastalara koroner içine Ach verilmesine rağmen, vazodilatasyon elde edilememiştir (3).

Ach uyarısını almayan endotel hücreleri NO üretimine geçemezler. NO eksikliğinde, koronerlerde tromboz ve vazokonstiksiyon sınırlanamadığından, akut ve şiddetli göğüs ağrısı ile karakterize olan stabil olmayan angina pectoris veya Mİ meydana geldiği varsayılmaktadır (Şekil 3).



**Şekil 3:** Akut koroner sendrom' da kırılğan plak ve pıhtı oluşumu (39)



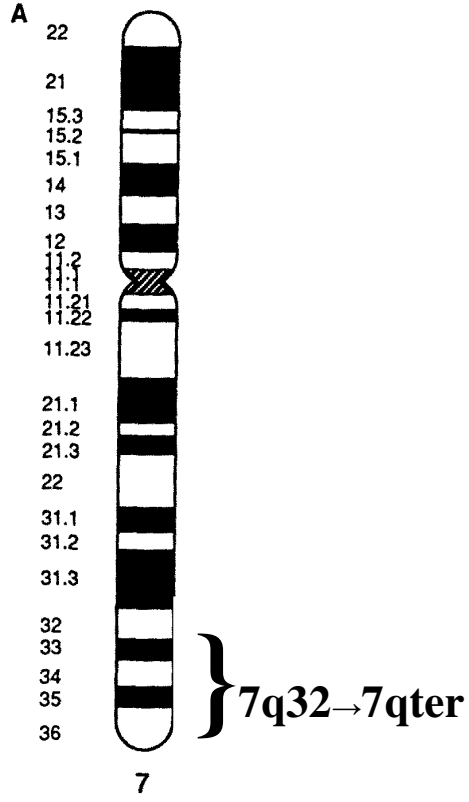
### 4.2.3. Akut Koroner Sendrom Risk Faktörleri

- **Tip II Diyabet:** Tip II diyabette lipid metabolizma bozukluklarına çok sık rastlanmaktadır. Tip II diyabetik hastalarda insülin ve büyüme faktörlerinin stimülasyonu ile, damar düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve bağ doku sentezinin arttığı, damarlarda lipid plaklarının oluşumunun hızlandığı ve gerilemesinin engellendiği gösterilmiştir (40, 41).
- **Yaş Faktörü ve Cinsiyet:** Yaş ilerledikçe AKS riski artar. Erkeklerde ve oral kontraseptif kullanan kadınlarda AKS görülme sıklığı fazladır (41).
- **Düşük Fiziksel Aktivite:** Düzenli yapılan egzersiz, miyokardın O<sub>2</sub> ihtiyacını azaltmakta, trigliserid ve LDL-kolesterol düzeyini düşürmekte, HDL-kolesterol düzeyini attırmaktadır.
- **Sigara Kullanımı:** Sigara içimi endotel fonksiyon bozukluğu oluşturarak, LDL-kolesterol oksidasyonunu artırarak ve HDL-kolesterol düzeyini düşürerek aterotromboz oluşumunda etkili olur (20, 28, 41).
- **Hipertansiyon:** Hipertansiyonu olan kişiler AKS için yüksek risk altındadır (41).
- **Hiperkolesterolemi ve Hiperlipidemi:** Yapılan araştırmalar AKS hastalarının büyük kısmında hiperkolesterolemi ve hiperlipidemi gözlendiğini kanıtlamıştır (41, 42).
- **Kalıtsal Metabolik Hastalıklar:** Kalıtsal metabolik hastalık AKS için bir risk faktörüdür (41).
- **Geçirilmiş Serebrovasküler Olay:** AKS' li kişilerin %7' sinin önceden geçirilmiş serebrovasküler olayı bulunmaktadır (41).

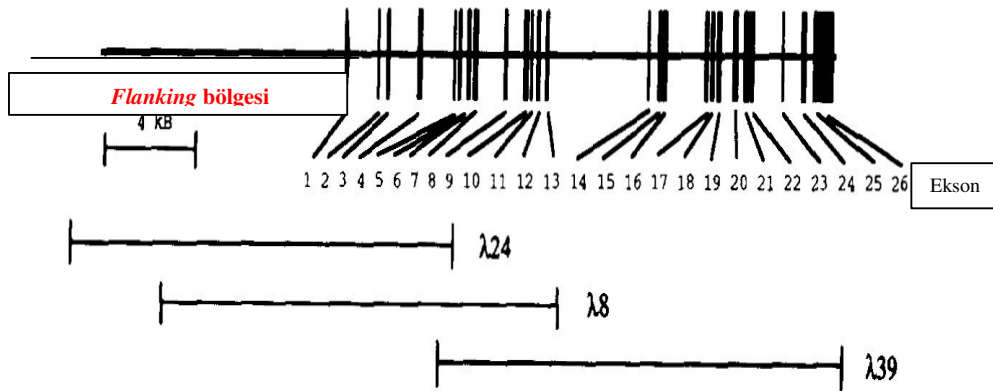
## 4.3. ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ (eNOS)

### 4.3.1. eNOS Geni

eNOS geni, 7q 32 → 7q terminal (ter) bölgesinde yer alır ( Şekil 4). nNOS geni ise 12. kromozom' da bulunur. eNOS geni 26 ekson içerir ve yaklaşık olarak 21 kilobazlık genomik DNA' dan oluşur. eNOS genine ait ayrıntılı bilgiler Şekil 5, Tablo 1 ve Tablo 2' de görülmektedir. eNOS geninin kodladığı mRNA 4052 nükleotid içerir ve haploid genomda tek kopya olarak bulunur (8).



**Şekil 4.** eNOS genine ait kromozomal yerleşim (8)



**Şekil 5.** eNOS geni üzerindeki *flanking* bölgesi ve eksonların yerleşimleri (8)

**Tablo 1.** eNOS geni ekson özellikleri ve intron-ekson bağlantıları (8)

intron	Ekson	5' Donör	3' Kabul eden	Ekson
1	ACAG	GTAAGG	CCTGGCTCCCAACAG	CCCC
2	GCAG	GTAAGG	ACTCCCTCGACCCAG	GATG
3	AGAG	GTGACA	CCCTCTCCTCCCCAG	GAGC
4	GCAG	GTGCGG	CCTCGGCTGGCTCAG	GTGT
5	TTCG	GTGAGT	CCCCATGCGTGCCAG	CTCG
6	CGAG	GTGGGC	GCCCACTCCCCACAG	CTCT
7	CCAC	GTGAGC	CCCCAACACCCCCAG	GCTG
8	GGAG	GTGAGG	ACCCTTCTGCCCCAG	GATG
9	CCAG	GTGCAG	CTCTCTCCCTTCCAG	CTAG
10	CCAG	GTGCCC	TCATCTCTCTGCAAG	CCAG
11	CCAA	GTGGGT	CTTCTCTCCCGCAG	CGCC
12	CCGG	GTAGGG	TCTTCCCACCCACAG	GTCC
13	AGAG	GTGAGA	CACTCCCCTCGCCAG	AGCT
14	ACAA	GTGAGT	GTCTCTCTTGCCAG	GAGT
15	TCAG	GTGAGG	ACCCCTGCACCCAG	GTC
16	CCAG	GTGAGC	CCCGCTGTCCCGCAG	GCCG
17	CCAG	GTGGGC	CCTCCCCGCCCCAG	GTCT
18	CCAC	GTGAGG	TCTCCCCACCCCCAG	GAGG
19	CCTG	GTGAGG	GTGCACTATCCCCAG	GTGG
20	CCAG	GTTGGG	ATCCTGCCCGCCAG	GATC
21	CAGG	GTGAGG	CCTTCCCACCCCCAG	ATGG
22	GGGG	GTAAGT	TGTCTCTCCTGCCAG	GGCT
23	AAAG	GTGAGG	CGGGGTTGCTTGCAG	GGCT
24	CAAG	GTGTGA	CCCGCCGCCCGCAG	ACCT
25	GCGG	GTGCGG	GCTCTTTTCCGACAG	GATC

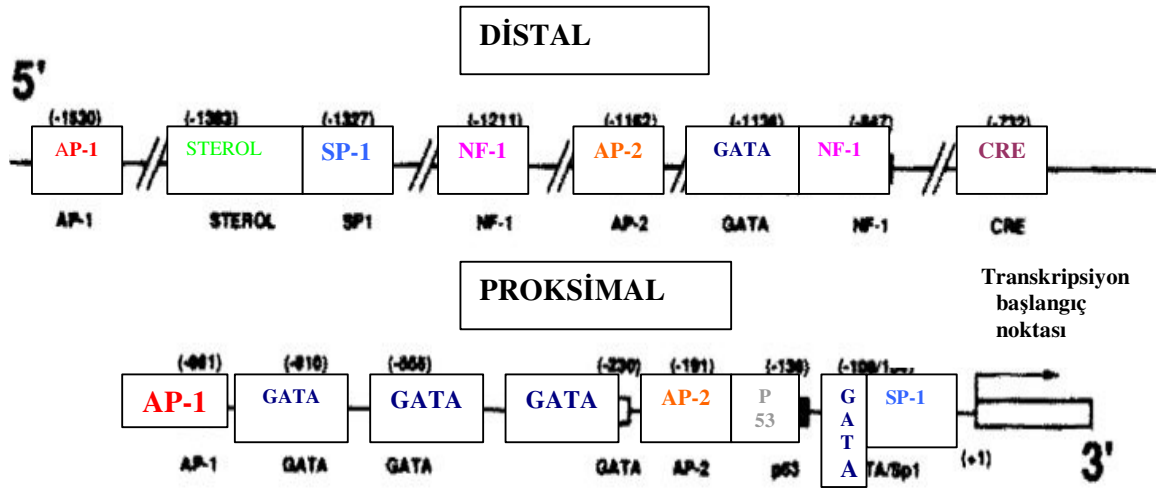
eNOS genine ait, intron-ekson bağlantılarında, intronların 5' ucunda GT, 3' ucunda ise AG baz çiftleri (bç) bulunmaktadır.

**Tablo 2.** Endotelial nitrik oksid sentaz geninde intron/ekson yerleşimleri ve uzunlukları (8)

Ekson	Boyut (bç)	Amino Asit	Özellik	Intron	bç	Tip
1	180	53	5'-UTR, asetilasyon	1	1235	II
2	112	37		2	≈ 300	0
3	149	50		3	≈ 1200	II
4	163	54		4	≈ 1400	0
5	92	31	Ca <sup>2+</sup> /Kalmodulin	5	90	II
6	142	47		6	265	0
7	140	47		7	104	II
8	175	58		8	≈ 500	0
9	102	34		9	≈ 700	0
10	195	65		10	115	0
11	74	25		11	203	II
12	145	48		12	234	0
13	105	35		13	≈ 4300	0
14	68	23		FMN bağlanma	14	391
15	117	39	15		96	II
16	175	58	16		≈ 1700	0
17	133	44	FAD bağlanma	17	125	I
18	79	27		18	130	II
19	188	62	NADPH bağlanma	19	530	I
20	173	58		20	309	0
21	211	70		21	91	I
22	88	30	3'- UTR bölgesi	22	≈ 1200	II
23	122	40		23	758	I
24	149	50		24	337	0
25	195	65		25	89	0
26	580	53				

eNOS geninde tip I, II, ve III intronların görülme sıklığı sırası ile % 48, % 16 ve % 36' dır. eNOS geninin 26. eksonunun 3' ucunda poliadenilasyon sinyali (AATAAA) bulunmamaktadır (8).

eNOS geninin 5' ucunda yer alan *flanking* bölgesi, promotör bölgesini de taşır. eNOS geni TATA kutusu yerine, proksimal promotör elementleri taşır. Yapılan çalışmalar proksimal elementlerin, endotel hücresinin yapısal genlerinde bulunan promotör elementleri ile uygunluk gösterdiğini ortaya koymuştur. eNOS geninin proksimal promotör elementleri AP-1, AP-2, sterol düzenleme bölgesi, SP-1, GATA kutusu, NF-1, CRE ve p53' dür (Şekil 6) (8).



Şekil 6. Proksimal promotör elementlerinin *flanking* bölgesi üzerindeki yerleşimleri (8)

**AP-1 ve AP-2:** Forbol esterleri ve cAMP ye cevap olarak AP-1 ve AP-2' nin eNOS transkripsiyonunu etkiledikleri düşünülmektedir. AP-1 nükleotid (nt) -1530 ve nt -661, AP-2 ise nt -1162 ile nt -191 de yer alır.

**Sterol düzenleme bölgesi:** Nt -1383 te başlayan iki adet sterol düzenleme bölgesi bitişik olarak yer alır. Sterollerin bölgeye bağlanması ile eNOS transkripsiyonu baskılanır. Sterollerin yokluğu ise eNOS transkripsiyonunu hızlandırır.

**SP-1:** RNA polimeraz II ile eNOS transkripsiyonunun başlaması bu bölgeye Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> çinko-parmak ailesinden olan SP-1 proteinlerinin bağlanmasını kolaylaştırır.

**GATA:** DNA' ya bağlanan proteinlerden olan çinko-parmak transkripsiyon faktörlerinden GATA kutusu ailesi tarafından tanınır. *Flanking* bölgesinde 5 adet GATA kutusu nt -1136, nt -610, nt -555, nt -230, nt -108'de yer alır.

**NF-1:** NF-1 transforme edici büyüme faktörü  $\beta$ ' ya yanıt oluşturur.

**CRE:** cAMP' ye cevap elementidir. Hücre içi cAMP değişikliklerine bağlı olarak transkripsiyonu düzenler. Gen transkripsiyonunun ani olarak hızlandırılmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

**p53:** Nükleer fosfoprotein olan p53, eNOS gen transkripsiyonunu aktive veya inhibe edebilir (8).

#### **4.3.2. eNOS Geni T-786C Polimorfizmi ile İlişkili Hastalıklar**

**Ateroskleroz:** Aterosklerotik plaklarda direkt NO ölçümü ile eNOS ekspresyonu ve endojen nitrat sentezinde düşüş olduğu gösterilmiştir (14, 16, 23).

**Koroner spazm:** Koroner spazm hastalarında T-786C mutasyonunda eNOS promotör aktivitesinde %50 oranında düşüş saptanmıştır (9, 10, 43).

**Mİ:** Klinik olarak eNOS T-786C mutasyonu açısından homozigot genotipe sahip hastaların şiddetli koroner vazospazm geçirdiği, bazı hastaların ise organik stenoz bulunmamasına rağmen akut Mİ geçirdiği anjiyografi ile belirlenmiştir (10, 13, 43).

#### **4.4. POLİMORFİZM**

Aynı tür organizmalar genellikle birbirinden farklı fenotip gösterirler. Bu farklılıklar genetik olarak belirlenmiştir ve polimorfizm olarak isimlendirilir. Bir çok gen lokusunda iki allel yer alır. Mutasyonların fenotipe farklı yansımalarının nedeni çoklu allelerin varlığındandır. Genetik polimorfizm, bir popülasyonda, farklı allelere bağlı, genetik olarak belirlenmiş iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Çoklu allel içeren bir bölge polimorfiktir (44, 45).

## 5. MATERYAL VE YÖNTEM

### 5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER

#### 5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal madde	Üretici Firma	Ürün kodu
Gene Ruler 100bp DNA ladder	Fermentas	# SM0241
Msp I restriksiyon enzimi	Fermentas	# ER 0541
dATP, dCTP	Fermentas	# R0161, # 0171
dGTP, dTTP	Fermentas	# 0141, # 0151
Primerler	IDT	#13906762, #13906763
Taq polimeraz	Fermentas	# EP0402
MgCl <sub>2</sub>	Sigma	# M0250
10 X PZR Tamponu	Sigma	# M0250
Agaroz	Sigma	#A5093
Proteinaz K	Sigma	# P4914
Polaroid film 3000/36 °C(677)	Sigma 3000/36°C(677)	# F 4638
Sukroz	Sigma	# S2395
Bromfenol mavisi	Merck	# 8122
Tris baz	Sigma	# T8524
Borik asit	Merck	# K21183760

#### 5.1.2. Kullanılan Çözeltiler

1. Jele Yükleme Tamponu  
% 0.25 Bromfenol mavisi
2. Etidiyum Bromid: 10 mg/dl
3. %1.5' lik Agaroz (mini jel)
4. %2' lik Agaroz (midi jel)
5. Proteinaz K: Çift distile suda 20 mg/ml
6. PZR primerleri : 0.4 µl

7. dNTP' ler: 10 mM
8. 10 X TBE
  - Tris baz 108 gr
  - Borik asit 55gr
  - 0.5 M EDTA 40ml, PH 8.0
9. Lizis tamponu
10. 10 X PZR Tamponu

## 5.2. ÇALIŞMA GRUBU

Çağlayan Florence Nightingale Hastanesi Kardiyoloji ünitesine 2003-2004 tarihleri arasında başvuran, AKS ve KKAH tanısı konmuş hastalar ve rutin sağlık kontrolleri için müracaat edip koroner anjiyografiyle koronerlerinin normal olduğu tespit edilen sağlıklı kişiler çalışma grubunu oluşturdu.

Hastaların ve sağlıklı kontrollerin; yaşları, öz geçmişleri, soy geçmişleri, sigara, alkol kullanıp kullanmadıkları kayıt edildi. Çalışmaya dahil edilen tüm kişilerin fizik muayeneleri yapılarak boy, kilo, vücut kitle indeksi, lipid profili, lökosit değerleri ölçüldü. AKS ve KKAH hastalarının ekokardiyografik olarak sol ventrikül hipertrofi mevcudiyeti incelendi. Hasta ve kontroller yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilerek seçildi. Hasta ve kontrol gruplarına çalışmanın amacı açıklanarak izinleri alındı.

### 5.2.1 Çalışma Dışı Tutulanlar

- a. Neoplazisi olan vakalar.
- b. Sekonder hipertansiyon vakaları (renal arter stenozu, glomerülonefrit, diyabetik nefropati (Kimmelstiel-Wilson sendromu), hipertansiyonla seyreden endokrinopatiler (feokromositoma, Cushing sendromu hiper ve hipotiroidizm)
- c. Psödohipertansiyonlu hastalar (büyük damar sklerozu, aort yetersizliği, aort koarktasyonu, vb).
- d. Doğum kontrol hapı kullanan kadınlar.

e. İlaç ve madde bağımlısı olan hastalar.

### **5.3. KULLANILAN İNCELEME YÖNTEMLERİ**

#### **5.3.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanma Koşulları**

Hasta ve sağlıklı kontrollerin açlık periferik kan örnekleri sabah saat 8.00-10.00 arasında 10 ml' lik vakumlu steril K<sub>3</sub>-EDTA ve antikoagülan içermeyen vakumlu tüplere alındı. K<sub>3</sub>-EDTA' lı kanlar alındıkları andan itibaren ilk 3-5 gün DNA' ları izole edilene kadar +4°C'de saklandı. Vakumlu tüplere alınan kanlardan serum ayrılarak lipid parametreleri saptandı.

#### **5.3.2. Uygulanan Biyokimyasal Laboratuvar Analizleri**

Hasta ve kontrol örneklerinin biyokimyasal analizlerinden total-kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid, lökosit, glikoz, BUN, kreatinin, ürik asit değerlerinin ölçümü yapıldı. Total-kolesterol düzeyleri Biotrol kiti kullanılarak Bayer Opera cihazında ve kolesterol oksidaz yöntemi ile; HDL-kolesterol düzeyleri Randox kiti ile Opera cihazında direkt HDL-kolesterol yöntemi ile; glikoz düzeyleri ise Biotrol kiti ile Bayer Opera cihazında glikoz oksidaz yöntemi ile ölçüldü.



## **5.4. ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ GEN AMPLİFİKASYONU VE T-786C MUTASYON TESPİTİ İLE İLGİLİ YÖNTEMLER**

Hasta ve kontrol grubuna ait kişilerden alınan venöz kan örneklerinden, genomik DNA'ların izolasyonunu takiben 512bç' lik eNOS gen ürününü çoğaltmak amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulandı. Çoğaltılan ürünler, eNOS T-786C genotiplerinin belirlenmesi amacıyla restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemine tabi tutuldu.

### **5.4.1. DNA İzolasyonu**

Yüksek tuz konsantrasyonları kullanılarak genomik DNA izole edildi (46).

1. 0.5 ml EDTA'lı kan üzerine lizis tamponu eklendi. (Lizis tamponu: 155mM NH<sub>4</sub>Cl; 10mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM EDTA)
2. Tüp +4 °C'de 15 dakika (dk) inkübe edildi.
3. 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
4. Süpenatant atıldı ve pellet üzerine lizis tamponu eklendi.
5. 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
6. 4. ve 5. basamaklar 2-3 kez tekrar edildi.
7. Nükleus pelleti üzerine, 150 µl nükleaz tamponu (Nükleaz tamponu: 10 mM Tris-baz; 400 mM NaCl<sub>2</sub>; 2 mM EDTA), 20 µl çift distile su, 1.5 µl proteinaz K ve 2.5 µl %10 SDS eklendi.
8. Karışım 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyon sonrası 1:1 oranında çift distile su ve 5 M NaCl<sub>2</sub> karışıma ilave edildi.
10. 10000 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi.
11. Süpernatant bir başka tüpe aktarıldı. Saf etanol eklendi ve birkaç kez tüp alt üst edilerek karıştırıldı.

12. 10000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
13. Pellet üzerine %70 izopropanol eklendi ve DNA çöktürüldü.
14. Süpernatant atıldı ve pellet 200 µl 1x TE içinde çözdürüldü.

#### **5.4.2. DNA Miktarının Ölçülmesi**

İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu 260 nm'deki optik dansitesinden (OD), saflığı da 260nm/280nm'deki OD oranından tespit edildi (47).

#### **5.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir. Aynen doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi PZR analizi, replikasyon sürecini taklit eder ve DNA'nın önceden seçilmiş belli bir bölgesini kısa süre içinde milyon kere çoğaltır. PZR çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır (48). Primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenirler. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PZR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Ardarda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PZR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PZR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır.

Matematiksel olarak amplifikasyon ( $2^n - 2n$ ) X formülü ile ifade edilir.

n = Döngü sayısı

2n = Birinci ve ikinci döngü sonucunda oluşan boyları bilinmeyen ürünler

X = Orjinal kalıbın kopya sayısı

PZR'nin temel bileşenleri; kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı , tampon ve MgCl<sub>2</sub>'dür.

### **Primerlerin hazırlanması**

eNOS genotiplerinin belirlenmesi için kullanılan liyofilize formda ileri (786F) ve geri (786R) primerler (HPLC yöntemi ile saflaştırılmış) kullanıldı. Primerler DNaz, RNaz içermeyen çift distile saf su ile çözüldürüldü (100pmol/ µl). Daha sonra stoklar (10pmol/ µl) hazırlanıp -20 °C'de saklandı.

### **Oligonükleotid Primerlerin Dizisi**

Bu çalışmada eNOS geni T-786 C genotiplerini tespit etmek amacıyla PZR'da kullanılan ileri (786F) ve geri (786R) primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir.

786F: 5'- CAG ATG CCC AGC TAG TG -3'

786R: 5'-GGA CCT CTA GGG TCA TGC -3'

Standart 25 µl'lik PZR karışımı 0.5 ml'lik ince duvarlı PZR tüplerinde Tablo 3' te belirtildiği gibi hazırlandı.

**Tablo 3.** PZR reaksiyon karışımı içeriği

<b>Kullanılan temel komponentler</b>	<b>Final konsantrasyonu</b>
10 X PZR Tamponu	1 X
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
786F primer	0,6 µM
786R primer	0,6 µM
Taq polimeraz (5ünite/µl)	1.25 ünite
dNTP'ler(2mM)	200 µM
Kalıp DNA	0,7 µg
Çift distile su	Total hacim 25µl'ye tamamlanır

**PZR Programı:**

1. 95 °C'de 3 dk. denatürasyon
2. 35 kez tekrarlanacak şekilde  
94 °C'de 30 sn.  
61 °C'de 1dk.  
72 °C'de 40 sn. sentez ve uzama
3. 72 °C'de 10 dk.

**5.4.4. PZR Ürünlerinin Yatay Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi**

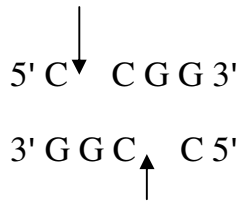
PZR ürünlerinin jel elektrofrezinde kullanılacak agaroz jelin konsantrasyonu ayrıştırılmak istenen parçanın büyüklüğüne göre değişmektedir. Bu çalışmada çoğaltılan eNOS gen ürünleri % 1.5'lik agaroz jelde yürütüldü ve agaroz jeller ultraviyole (UV) ışık altında incelendi.

Küçük boydaki jel tanklarında 0.4 gr agaroz, 10 X ana stoktan sulandırılmış 25 ml 1xTBE içersinde, 4 µl etidiyum bromid eklenerek % 1.5'lik jeller hazırlandı. Elle tutulabilecek sıcaklığa (55-50°C) düştüğünde 5 µl etidiyum bromid eklendi. İyice karıştırılıp kaset üzerine döküldü. Cepleri oluşturacak tarak yerleştirilip donması beklendi. Tarak dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra jel elektroforez tankına geçirildi.

5µl PZR ürünleri 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Jeldeki DNA, Consort E861 elektroforez sistemi ile 90V gerilimde ve 1XTBE tamponu içerisinde 30 dakika yürütüldü. PZR ürünlerinin büyüklükleri Gene Ruler 100bç DNA ladder moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak belirlendi.

#### 5.4.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi

Prokaryotlardan izole edilen, çift iplikli DNA'da özel dizileri tanıyan ve DNA'yı belli noktalardan kesen enzimlere restriksiyon enzimleri adı verilir (49). Restriksiyon enzimleri DNA' da 4-8 nükleotidlik spesifik dizileri tanır. Msp I enziminin DNA' daki kesim bölgeleri Şekil 7' deki gibidir.



Şekil 7: Msp I enziminin kesim bölgesi

eNOS T-786C genotiplerinin belirlenmesi amacıyla amplifiye edilen PZR ürünleri Msp I enzimi ile kesildi. 20 µl PZR ürünü 10 ünite (1µl) Msp I enzimi ile 37 °C' lik etüvde 5 saat inkübe edilerek kesildi.

## 6. BULGULAR

Bu çalışmada 10 adet AKS hastası, 20 adet KKAH ve 31 adet KKAH'lığı bulunmayan ve anjiyografik olarak koronerleri normal olan sağlıklı kontroller ile çalışıldı. AKS grubu, yaş ortalamaları,  $60.20 \pm 2.52$  olan 5 erkek ve 5 kadından, KKAH grubu yaş ortalamaları  $60.70 \pm 1.99$  olan 14 erkek ve 6 kadından, kontrol grubu ise yaş ortalamaları  $59.00 \pm 1.68$  olan 10 erkek ve 21 kadından oluşturuldu.

Akut koroner sendrom ve KKAH gruplarına ait klinik özellikler incelendiğinde; AKS hastalarının %30' u (3 kişi) ST elevasyonlu Mİ, %20' si (2 kişi) ST elevasyonsuz Mİ, %50' si ise (5 kişi) stabil olmayan anjina pektoris nedeniyle hastanede takip ve tedaviye alınmıştır. AKS hastalarının %30' una (3 kişi) perkütan intrakoroner girişim, %40' ına (4 kişi) koroner by-pass greft, %30' una (3 kişi) ise sadece medikal takip yapılmıştır. KKAH' larının %80' i (16 kişi) daha önceden bilinen ve uzun süredir devam eden eforlu göğüs ağrısı olan stabil anjina pektoris olanlar, %10' u (2 kişi) stabil anjina pektoris tanısıyla perkütan intrakoroner girişim uygulanmak üzere hastaneye başvuran ve %10' u (2 kişi) kronik stabil anjina pektoris tanısıyla koroner by-pass greft operasyonu için hastaneye müracaat edenlerdir. KKAH' larının %10' unda (2 kişi) geçmişte Mİ öyküsü mevcuttu. Tedavi kapsamında KKAH' larının %30' una (6 kişi) perkütan intrakoroner girişim, %50' sine (10 kişi) koroner by-pass greft ve %20' sine (4 kişi) medikal takip uygulanmıştır.

Çalışma grubumuzu oluşturan AKS, KKAH ve kontrol gruplarına ait demografik özellikler Tablo 4' te verilmiştir. KKAH grubunda boy ( $p \leq 0.01$ ) ve kilonun ( $p \leq 0.01$ ) kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda yüksek olduğu tespit edildi. Gruplar beden kitle indeksi değerleri açısından karşılaştırıldıklarında, anlamlı bir fark tespit edilmedi

(Tablo 4).

**Tablo 4.** Akut koroner sendrom, kronik koroner arter hasta ve kontrol guplarının demografik özellikleri açısından karşılaştırılması

<b>Parametre</b>	<b>AKS</b>	<b>KKAH</b>	<b>Kontrol</b>
Boy (m)	1.67 ± 0.25	1.69 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.01
Kilo (kg)	74.00 ± 5.15	82.57 ± 3.19 <sup>a</sup>	67.67 ± 2.33
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.50 ± 1.69	28.97 ± 1.26	26.04 ± 0.75

Değerler ortalama ± SE olarak ifade edilmiştir.

AKS: Akut koroner sendrom, KKAH: Kronik koroner arter hastalığı

a: Kronik koroner arter hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek

Tablo 5’ te AKS, KKAH ve kontrol gruplarına ait biyokimyasal özellikler karşılaştırılmıştır. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldıklarında LDL-kolesterol ve trigliserid düzeylerinin istatistiksel anlamlı bir fark göstermediği tespit edildi. HDL-kolesterol düzeyleri KKAH grubunda kontrol gruba kıyasla daha düşük ( $p \leq 0.01$ ), glikoz ve lökosit düzeyleri ise hem AKS hem de KKAH gruplarında kontrol gruba kıyasla daha yüksek bulundu ( $p \leq 0.001$ ) ( Tablo 5).

**Tablo 5.** Akut koroner sendrom, kronik koroner arter hastalığı ve kontrol gruplarının biyokimyasal özellikler açısından karşılaştırılması

<b>Parametre</b>	<b>AKS</b>	<b>KKAH</b>	<b>Kontrol</b>
Total-kolesterol (mg/dl)	216.10 ± 15.84	207.53 ± 10.42	198.69 ± 8.70
HDL-kolesterol (mg/dl)	43.70 ± 4.50	39.00 ± 2.29 <sup>a</sup>	47.11 ± 1.87
LDL- kolesterol (mg/dl)	136.90 ± 12.54	134.79 ± 9.16	125.89 ± 7.48
Trigiserid (mg/dl)	152.50 ± 18.08	168.74 ± 17.87	137.14 ± 9.27
Glikoz (mg/dl)	134.13 ± 26.21 <sup>b</sup>	126.80 ± 9.95 <sup>b</sup>	66.97 ± 2.26
Lökosit (sayım/mm <sup>3</sup> )	10466.67 ± 1075.48 <sup>b</sup>	8825.88 ± 426.73 <sup>b</sup>	4946.77 ± 154.92

Değerler ortalama ± SE olarak ifade edilmiştir.

AKS: Akut koroner sendrom, KKAH: Kronik koroner arter hastalığı

a: Kontrol grubuna kıyasla daha düşük

b: Kontrol grubuna kıyasla daha yüksek

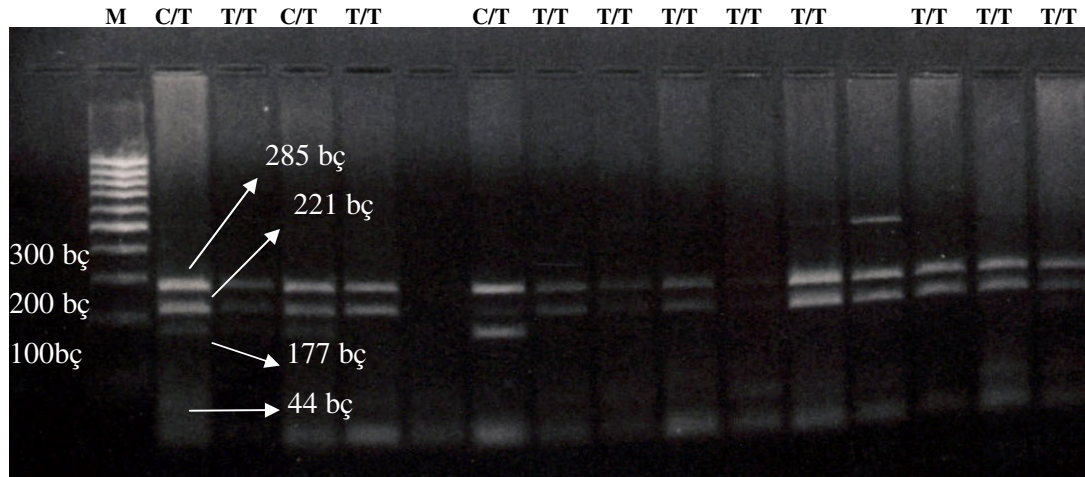
Endotelyal nitrik oksit geninde T-786C genotiplerini saptamak amacı ile yapılan PZR sonucunda 512bç' lik ürün elde edildi. PZR ürünleri Msp I restriksiyon enzimi ile kesildi. Msp I enzimi ile kesim sonrası, T alleli açısından homozigot olan PZR ürünlerinden 285 ve 221 bç' lik DNA parçaları, heterozigot olan PZR ürünlerinden 285, 221, 177 ve 44 bç' lik DNA parçaları ve C alleli açısından homozigot olan PZR ürünlerinden ise 285, 177 ve 44 bç' lik DNA parçaları oluştu (Tablo 6).



**Tablo 6.** eNOS PZR ürünlerinin Msp I enzimi ile kesimden ortaya çıkan DNA parçalarının uzunlukları

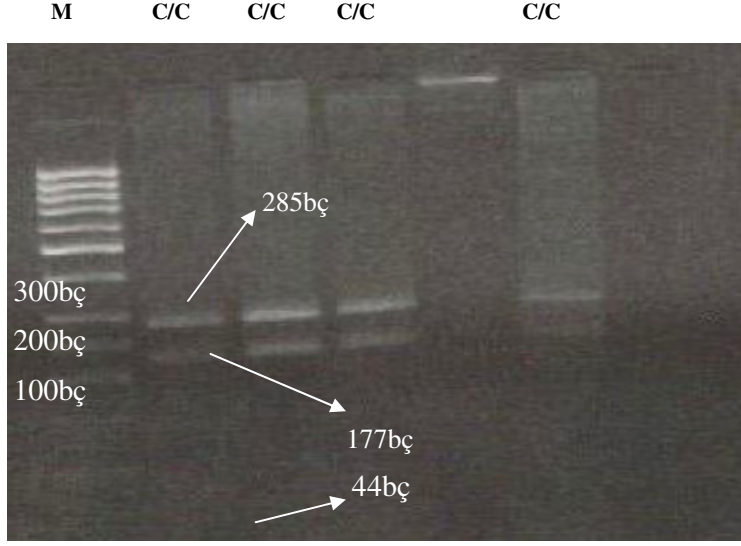
	Normal	Heterozigot	Homozigot Mutant
	T/T	C/T	C/C
285 bç	—	—	—
221 bç	—	—	—
177 bç		—	—
44 bç		—	—

Allelik polimorfizmler, restriksiyon bölgesinin her iki allede de bulunmaması (normal); TT, restriksiyon bölgesinin her iki allede de bulunması (mutant); CC ve restriksiyon bölgesinin sadece bir allede bulunması (heterozigot); CT şeklinde açıklanabilir (Şekil 8, 9).



M: 100bç DNA moleküler ağırlık merdiveni, T/T: Normal, C/T : Heterozigot C/C: Homozigot mutant

**Şekil 8.** Kronik koroner arter hastalarına ait yatay jel elektroforez fotoğrafı



M: 100bç DNA moleküler ağırlık merdiveni, T/T: Normal, C/T : Heterozigot C/C: Homozigot mutant

**Şekil 9.** Akut koroner sendrom hastalarına ait yatay jel elektroforez fotoğrafı

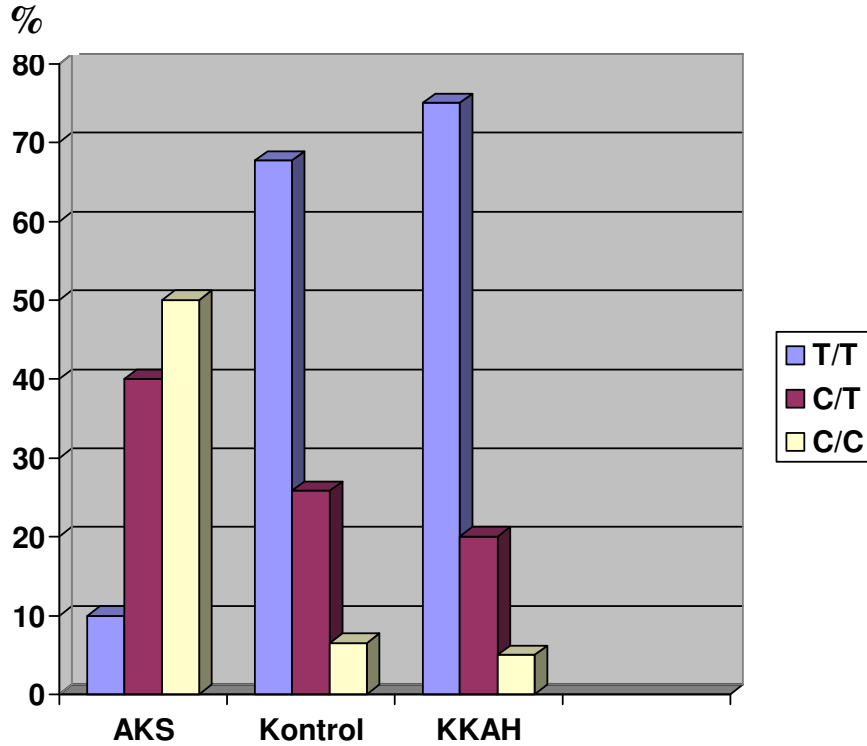
AKS, KKAH ve kontrol gruplarına ait eNOS T-786C genotip dağılımları Tablo 7’ de verilmiştir. AKS’ li grupta 1 kişi normal, 4 kişi heterozigot ve 5 kişi mutant; kontrol grupta 21 kişi normal, 8 kişi heterozigot ve 2 kişi mutant; KKAH grupta ise 15 kişi normal, 4 kişi heterozigot ve 1 kişi mutant olarak bulunmuştur. eNOS T-786C genotip dağılım sıklıkları; AKS’ lu grupta %10 TT, %40 CT, %50 CC; KKAH grupta %75 TT, %20 CT, %5 CC ve kontrol grupta %67.7 TT, %25.8 CT, %6.5 CC olarak tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grupları eNOS T-786C genotip sıklıkları açısından karşılaştırıldığında AKS grubunda CC genotipinin kontrol ve KKAH’ larına kıyasla anlamlı olarak fazla olduğu saptandı ( $p \leq 0.001$ ). Kontrol ve KKAH’ larında ise en sık rastlanan genotip T/T olarak belirlendi ( $p \leq 0.001$ ) (Tablo 7), (Şekil 10).

**Tablo 7.** Akut koroner sendrom, kronik koroner arter hasta ve kontrol gruplarında eNOS geni T-786C genotip dağılımları

	Genotip sıklıkları		
	T/T;n(%)	C/T;n(%)	C/C;n(%)
<b>AKS</b>	1(10)	4(40)	5(50)*
<b>Kontrol</b>	21(67.7)*	8(25.8)	2(6.5)
<b>KKAH</b>	15(75)*	4(20)	1(5)

AKS: Akut koroner sendrom, KKAH: Kronik koroner arter hastalığı

Genotip sıklıkları dağılımları  $\chi^2$  yöntemi ile karşılaştırıldı \*  $p \leq 0.001$



**Şekil 10.** Akut koroner sendrom, kronik koroner arter hastalığı ve kontrol gruplarında eNOS geni T-786C genotip dağılımlarının grafik ile gösterilmesi

Tüm hastalara ait (AKS ve KKAH birlikte) T-786C genotiplerine göre lipid değerleri Tablo 8’ de verilmiştir. Buna göre total-kolesterol (p=0.68), HDL-kolesterol (p=0.84), LDL-kolesterol (p=0.99) ve trigliserid (p=0.89) değerlerinde eNOS T-786C genotipleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 8).

**Tablo 8:** Tüm hasta grubunda (Akut koroner sendrom ve kronik koroner arter hastalığı) eNOS T-786C genotiplerine göre lipid parametreleri

	eNOS T-786C genotipleri		
	T/T (n=16)	C/T (n=8)	C/C (n=6)
<b>Total kolesterol</b>	207.00±39.81	216.75±42.38	210.83±70.63
<b>HDL-kolesterol</b>	41.07±13.60	38.50±9.46	42.33±12.69
<b>LDL-kolesterol</b>	138.07±41.48	134.63±24.52	130.33±53.46
<b>Trigliserid</b>	164.13±83.70	151.88±53.54	165.67±64.53

AKS ve KKAH’larına ait sol ventrikül hipertrofi özellikleri Tablo 9’ da gösterilmiştir.

**Tablo 9.** Akut koroner sendrom ve kronik koroner arter hastalarında sol ventrikül hipertrofi sıklıkları

Grup	Sol ventrikül hipertrofisi	
	var ; n(%)	yok; n(%)
<b>AKS</b>	3(30)	7(70)
<b>KKAH</b>	4(20)	16(80)

AKS: Akut koroner sendrom, KKAH: Kronik koroner arter hastalığı,  $\chi^2= 0.480$ , p= 0.488

Tüm hastalara ait sol ventrikül hipertrofi varlığı veya yokluğunun eNOS T-786C genotiplerine göre sıklıkları Tablo 10' da gösterilmiştir. Buna göre sol ventrikül hipertrofisi bulunmayan hastaların %56.5'i TT, %21.7'si CT ve %21.7'si CC genotiplerine sahip bulunmuştur (Tablo 10).

**Tablo 10.** Tüm hastaların sol ventrikül hipertrofi varlığı veya yokluğunun eNOS T-786C genotiplerine göre sıklıkları

	Sol ventrikül hipertrofisi		
	var	yok	Total
<b>T/T ; Genotip içindeki %</b>	81.3	18.8	100.0
sol ventrikül hipertrofisi içindeki %	56.5	42.9	53.3
<b>C/T ; Genotip içindeki %</b>	62.5	37.5	100.0
sol ventrikül hipertrofisi içindeki %	21.7	42.9	26.7
<b>C/C ; Genotip içindeki %</b>	83.3	16.7	100.0
sol ventrikül hipertrofisi içindeki %	21.7	14.3	20.0
<b>Total; Genotip içindeki %</b>	76.7	23.3	100.0
<b>Total; sol ventrikül hipertrofisi içindeki %</b>	100.0	100.0	100.0

AKS: Akut koroner sendrom, KKAH: Kronik koroner arter hastalığı, p= 0.52

## 7. TARTIŞMA

Endotele ait nitrik oksid sentaz T-786C promotör polimorfizminin KKAH' lığı için bir risk faktörü olup olmadığı halen araştırma konusudur. Bazı çalışmalar eNOS T-786C, CC genotipini KKAH' lığı için bir risk faktörü olarak bulurken diğerleri aynı sonuca ulaşamamıştır.

Rossi ve arkadaşları T-786C CC genotipini çok damar tıkanıklığı olan KKAH' lığı için bağımsız bir risk faktörü olarak bulurken (50) Alvarez ve arkadaşları (22) -786 T/C genotipini erken koroner arter hastalığı ile ilişkili bulmuştur. Ghilardi ve arkadaşları (14) ise -786 T/C genotipinin karotid arter stenozu için bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir.

Akut koroner sendromlu hastalarda eNOS geni -786 T/C polimorfizmini araştıran sadece bir çalışmaya rastlanılmıştır (51). Fatini ve arkadaşları (51) 477 adet AKS' lu hastada eNOS genine ait G894T, 4a4b ve T-786C polimorfizmlerini çalışmıştır. Araştırmacılar 4a4b homozigot ve hiperhomosisteinemi hastalarda -786 C/C genotipinin AKS hastalığına yatkınlığı arttırdığını bulmuşlardır (OR: 9.1, %95 CI 1.7-46.7, p=0.008). Fatini ve çalışma grubu (57) AKS' lu hastalarda -786 C/C genotipine sahip kişilerin sıklıkları %22.4 oranında saptarken T/C genotip sıklıklarını %51.8 T/T genotip sıklığını ise %25.7 oranında bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise AKS' lu hastalarda -786 C/C genotipine sahip kişilerin sıklığı Fatini ve arkadaşlarının çalışmasına kıyasla daha yüksek (%50), T/C genotipine sahip kişilerin sıklığı (%40) ve T/T genotipine sahip kişilerin sıklığı (%10) daha düşük olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada AKS' lu hastalarda eNOS geninin en çok rastlanan genotipi -786 C/C olarak bulundu (%50). KKAH' lığı olan kişilerde -786 C/C genotip sıklığını (%5) ise kontrol gruba (%6.5) benzer şekilde düşük sıklıkta bulundu. -786 T/C genotip sıklıklarının AKS, KKAH ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiği tespit edildi. Ancak eNOS T-786C genotiplerinin sıklıkları AKS' lu hastalarda ve KKAH' lığı bulunan kişilerde incelendiğinde, AKS' lu grupta CC genotipine sahip kişilerin diğer genotiplere kıyasla yüksek sıklıkta bulunması ( $p \leq 0.001$ ) CC genotipinin AKS için bir risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, AKS' lu hasta sayısının az olması sebebiyle eNOS geninin -786 T/C genotiplerinin AKS hastalığı için bağımsız bir risk

faktörü olup olmadığını test edilemedi. Çalışma grubunda yer alan KKAH' larında CC genotipine sahip mutantları %5 gibi düşük bir oranda bulunması mutant genotipinin KKAH' lığı ile ilişkili olmadığı sonucunu doğurmaktadır.

Gerek Alvarez ve ark. (23) gerekse Ghilardi ve ark. (14) kronik arter hastaları (KAH) ile yaptıkları çalışmalarda -786 C/C allelini kontrollere kıyasla daha yüksek sıklıkta bulmuşlardır. Alvarez ve ark. (23) -786 C/C genotipine sahip KAH ve kontrol sıklıklarını sırasıyla %22 ve %14 ( $p=0.039$ ), Ghilardi ve ark. (14) ise %26 ve % 13 ( $p=0.018$ ) olarak bildirmişlerdir. Granath ve ark. (52) ise hasta ve kontrol grupları arasında herhangi bir T-786C genotipini anlamlı olarak farklı sıklıkta bulmamıştır. Bu çalışmada KAH' ları ile kontrol grupları arasında T-786C genotiplerinin dağılımları açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı.

İtalyan (14) ve Japon (10) toplumlarına ait sağlıklı kişilerde eNOS T-786C varyantı araştırılan iki çalışmada genotip dağılımları farklı bulunmuştur. Buna göre, Ghilardi ve ark. İtalyan toplumunda eNOS T-786C genotip sıklıklarını TT:%41 CT:%46 CC:%13 olarak; Nakayama ve ark. (10) ise Japon toplumunda eNOS T-786C genotip sıklıklarını TT:%89 CT:%11 CC:%0 olarak bildirilmişlerdir. Türk toplumunda yapılmış olan bu çalışmada kontrol grubuna ait eNOS T-786C varyantının genotip dağılımları TT:%68 CT:%26 CC:%6 olup Nakayama' nın (10) sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

AKS veya KKAH' lığı bulunan hastalarda eNOS T-786C polimorfizminin lipid parametrelerine olan etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmadı. Sadece 118 sağlıklı kişi üzerinde yapılan bir çalışmada (53) T-786C polimorfizminin lipid parametreleri üzerine etkili olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada da AKS ve KKAH' lığı bulunan hasta grubunda söz konusu polimorfizm lipid parametreleri üzerine etkili bulunmadı.

eNOS geni ile ilgili yapılan ekspresyon çalışmaları hem T-786C varyantı hem de 27bç tekrar polimorfizminin eNOS ekspresyonunu kantitatif olarak düzenlediğini göstermiştir (54). Çeşitli eNOS polimorfizmleri tek başlarına eNOS ekspresyonunun düzenlenmesinde etkisiz olabilir. eNOS ekspresyonunun düzenlenmesinde meydana gelebilecek bu etki başka bir fonksiyonel varyant ile yakın bir bağlantı olduğunda ortaya çıkabilir (54). -786 C/C genotipine sahip kişilerde eNOS aktivitesinin normal homozigotlara kıyasla (T/T) 2.1 oranında daha düşük olduğu ( $p=0.03$ ) gösterilmiştir (55).

eNOS ekspresyonunu düzenleyen polimorfizmlerin genotipe bağılı düzenlenmeleri, Mİ, hipertansiyon, renal vasküler hastalık ve serebral vasküler hastalık gibi çeşitli damar hastalıklarıyla ilişkilidir. Bazı çalışma gruplarının araştırma sonuçları promotör bölgede yer alan T-786C varyantının azalmış eNOS promotör aktivitesi ve vasküler hastalık ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (10, 27, 56). T-786C varyantı Avustralyalı toplumda vasküler hastalıkla ilişkili bulunmamasına rağmen (20, 27), Senthil ve arkadaşlarının (54) in vitro transfeksiyon deneylerinde aynı varyantın transkripsiyonun verimliliğini etkilediğini bulmuşlardır. Çeşitli gen polimorfizmleri bağlantılı oldukları diğer genlerle birlikte çevresel faktörlerinden de etkilenerek fonksiyonel hale geliyor olabilir. Bu çevre faktörleri hemodinamik stres gibi lokal veya sigara gibi sistemik etkili olabilir (57).

İtalyan toplumunda internal karotid arter (ICA) stenozu araştırılarak yapılan çalışmada T-786 C varyantının hastalık üzerinde orta ile şiddetli derecede değişen bir etkisi olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmada C allel homozigotluğunun karotid aterosklerotik plak oluşumu için bağımsız bir risk faktörü olduğu rapor edilmiştir (14).

Endotel fonksiyon bozukluğuna yol açan hiperlipidemi ve hipertansiyonun neden olduğu NO-bağımlı vazodilatasyonla oluşan rahatsızlıkların derecesi kişiden kişiye değişiklik göstermektedir. Benzer şekilde klinik açıdan bakıldığında kardiovasküler risk faktörlerini taşıyan herkes hasta değildir veya bilinen risk faktörlerini taşımayan kişiler hasta olabilir. Böylece özellikle eNOS ekspresyonunu veya fonksiyonunu etkileyen gen mutasyonları kişileri endotel fonksiyon bozukluğuna ve koroner hastalıklara yatkın hale getiriyor olabilir.

Japon popülasyonunda yüksek oranda  $\omega$ -3 yağ asitlerinin alınımından dolayı koroner arter hastalık sıklığının düşük olduğu bildirilmiştir. Ancak bu toplumda anjiyografide görünür stenoz olmadığı halde koroner vazospazm olgularının oldukça yüksek oranda olduğu bildirilmiştir. Bu bilgiler hiperlipidemi olmadığı halde eNOS mutasyonlarının tek başına koroner vazospazm oluşturabileceğini göstermektedir. Japon toplumunda yüksek oranda  $\omega$ -3 yağ asiti tüketildiğinden bu kişilerde trombositlerin daha az trombojenik izoformda tromboksan (Tx) ürettiğini göstermiştir (56). Koroner vazospazm hastalarında yapılan çalışmalarda T-786C mutasyonunun eNOS transkripsiyonunu baskıladığı bulunmuş ve eNOS mutant alleli varlığında koroner arterlerde endotelin NO üretimini baskıladığı kanıtlanmıştır. Buna rağmen koroner



vazospazm şikayeti olan tüm hastalarda NO üretiminde bozukluk olup olmadığı halen tartışma konusudur. Nakayama 335 kişiden oluşan hasta grubunda sadece 3 kişide T-786C homozigot mutant alleli bulmuştur (10). Bu 3 kişinin her birinde şiddetli koroner vazospazm şikayetleri olduğu, ikisinde ise organik stenoz olmaksızın akut Mİ bulunduğu ortaya çıkmıştır. eNOS T-786C polimorfizmini heterozigot ve homozigot taşıyan hastaların klinik karakteristik özelliklerinde değişiklikler bulunması normal karşılanmaktadır (10).

## 8. SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada AKS grubunda -786 C/C genotipinin sıklığını kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunması, C/C genotipinin AKS oluşumunda rol alabileceğini düşündürmektedir. KKAH ve kontrol grupları arasında T-786C genotip sıklıkları açısından anlamlı bir fark olmayışı T-786C polimorfizminin KKAH ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Bununla beraber herhangi bir T-786C genotipinin sıklığının sol ventrikül hipertrofinde farklı bulunmayışı söz konusu polimorfizmin sol ventrikül hipertrofinde etkili olmadığını göstermektedir. Ayrıca eNOS T-786C polimorfizminin lipid değerleri üzerine herhangi bir etkisine rastlanmamıştır. Hasta ve kontrol gruplarının kısıtlı sayıda kişiden oluşmasına rağmen, bu çalışma AKS ve KKAH hastalarında eNOS T-786C gen polimorfizminin sıklığı ve klinik önemi hakkında bilgi vermektedir. Çalışmaya hasta ve kontrol grubundaki sayılar arttırılarak devam edilecektir.

## 9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana her türlü bilimsel desteği sağlayıp, yakın ilgi, güler yüz ve anlayışından dolayı danışmanım Sn. Doç. Dr. Belgin Süssleyici Duman'a çok teşekkür ederim

Hasta ve kontrol örneklerinin toplanması ve hasta verilerinin oluşturulması sırasında bilimsel desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Çavlan Çiftçi'ye, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Doç. Dr. Nedret Altıok'a saygılarımla teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında bilimsel yardımları, emeği ve dostluğu için Melike Ersöz'e, istatistiksel analizleri yapan Uzm. Dr. Penbe Çağatay'a, hep yanımda olan arkadaşım Uzm. Dr. Yurdanur Çebi'ye saygılarımla çok teşekkür ederim.

Beni destekleyen ve her zor durumumda bana yardım eden aileme ve eşim Cevdet Şengezer'e çok teşekkür ederim.

## 10. KAYNAKLAR

1. Auer J, Berent R, Maurer E, Mayr H, Weber T, Eber B. Acute coronary syndromes. *Herz*. 2001, 26:99-110.
2. Conti CR, Hill JA, Mayfield WR. Unstable angina pectoris: pathogenesis and management. *Curr Probl Cardiol*. 1998, 14:549-624.
3. Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, Soukhomovskaia O, Cicchitelli G, Macri G, Ferrari R. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Arc. Bioche. Biophys*. 2003, 22:255-261.
4. Chesebro JH. Acute coronary syndromes: pathogenesis, acute diagnosis with risk stratification, and treatment. *Am Heart Hosp J*. 2004, 1:21-30.
5. Katz SD, Khan T, Zeballos GA, Mathew L, Pothalanka P, Knecht M, Whelan J. Decreased activity of the L-arginine-nitric oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1999, 99:2113-2117.
6. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*. 1998, 32:3-8.
7. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999, 100:1515-1520.
8. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993, 268:17473-17488.
9. Luscher TF, Noll G. Is it all in genes? Nitric oxide synthase and coronary vasospasm. *Circulation*. 1999, 99:2855-2857.
10. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K T-786C mutation in the 5'-

- Flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999, 99:2864-2870.
11. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980, 299:373–376.
  12. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987, 327:524–526.
  13. Furchgott RF. Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. *Circ Res*. 1983, 53:557–573.
  14. Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Bernini M, Turri O, Massaro F, Guagnellini E, Scorza R. Independent Risk Factor for Moderate to Severe Internal Carotid Artery Stenosis: T786C Mutation of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene. *Clin Chem*. 2002, 48:989-993.
  15. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of cDNA encoding human endothelium derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992, 267:14519–14522.
  16. Mason RP. Nitric oxide mechanisms in the pathogenesis of global risk. *J Clin Hypertens*. 2006, 8:31-38.
  17. Ganong WF. *Review of medical physiology*, McGraw-Hill, 2001.
  18. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988, 333:664–666.
  19. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*. 1998, 30:2494–2498.
  20. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene *Nat Med*. 1996, 2:41–45.
  21. Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP *Am J Physiol*. 1994, 267:1405-1413.
  22. Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, Groot PG, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions *Circulation*. 1992, 85:2284-2290.

23. Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JR, Iglesias-Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzalez I, Alvarez V, Coto E. Association between the NOS3 (786 T/C) and the ACE (I/D) DNA Genotypes and Early Coronary Artery Disease *J Biol Chem*. 2001, 5:343-348.
24. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991, 43:109–142.
25. Vidal MJ, Romero JC, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor inhibits renin release. *Eur J Pharmacol*. 1998, 149:401–402.
26. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994, 198:1027–1033.
27. Uwabo J, Soma M, Nakayama T, Kanmatsuse K Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *Am J Hypertens*. 1998, 11:125–128.
28. Powell JT, Higman DJ. Smoking, nitric oxide and the endothelium. *Br J Surg*. 1994, 81:785–787.
29. Ramzy D, Rao V, Tumiati LC, Xu N, Sheshgiri R, Miriuka S, Delgado DH, Ross HJ. Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway. *Circulation*. 2006, 114:1319-1326.
30. Ramzy D, Rao V, Tumiati LC, Xu N, Miriuka S, Delgado D, Ross HJ Role of endothelin-1 and nitric oxide bioavailability in transplant-related vascular injury: comparative effects of rapamycin and cyclosporine. *Circulation*. 2006, 114:1214-1219.
31. Barrett CJ, Schultz HD. Sympathoinhibitory effects of atrial natriuretic peptide in rats with heart failure. *J Card Fail*. 1999, 5:316-323.
32. McNamara D, Holubkov R, Postava L, Ramani R, Janosko K, Mathier M, MacGowan GA, Murali S, Feldman AM, London B. Effect of the Asp 298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation*. 2003, 107:1598-602.
33. Bugiardini R. Risk stratification in acute coronary syndrome: focus on unstable angina/non-ST segment elevation myocardial infarction. *Heart*. 2004, 90:729-731.
34. Hasdai D, Behar S, Wallentin L, Danchin N, Gitt AK, Boersma E, Fioretti PM, Simoons ML, Battler A. A prospective survey of the characteristics, treatments and outcomes of

patients with acute coronary syndromes in Europe and the Mediterranean basin; the Euro Heart Survey of Acute Coronary Syndromes. *Eur Heart J.* 2002, 23:1190-1201.

35. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation.* 1994, 90:775-778.

36. Ambrose JA, Tannenbaum MA, Alexopoulos D, Hjemdahl-Monsen CE, Leavy J, Weiss M, Borrico S, Gorlin R, Fuster V. Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1988, 12:56-62.

37. Biasucci LM, Santamaria M, Liuzzo G. Inflammation, atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Minerva Cardioangiol.* 2002, 50:475-486.

38. Sloop GD, Williams KJ, Tabas I, Weissberg PL, Bennett MR, Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *NEJM.* 1999, 340:115-126.

39. [www.healthyheart.org](http://www.healthyheart.org)

40. Facila L, Bertomeu-Gonzalez V, Sanchis J, Bodi V, Nunez J, Llacer A, Bellido V. Glucose levels in non-diabetic patients. Is it a prognostic factor in acute coronary syndrome? *Rev Clin Esp.* 2006, 206:271-275.

41. Rosengren A, Wallentin L, Simoons M, Gitt AK, Behar S, Battler A, Hasdai D. Cardiovascular risk factors and clinical presentation in acute coronary syndromes. *Heart.* 2005, 91:1441-1447.

42. Goyal A, Petersen JL, Mahaffey KW. The evaluation and management of dyslipidemia and impaired glucose metabolism during acute coronary syndromes. *Curr Cardiol Rep.* 2004, 6:300-307.

43. Yasue H. Pathophysiology and treatment of coronary arterial spasm. *Chest.* 1980, 78:216-223.

44. Alberts B, Bray D, Lewis J. *Molecular biology of the cell.* 3. Ed, 1994.

45. Lewin B. *Genes VII.* Oxford University Press, 2000.

46. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1998, 16:1215.

47. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbour, New York. 1982.

48. Lench N, Stanier P, Williamson R. Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *Lancet*. 1988, 1:1356-1358.
49. Strobel SA, Dervan PB. Site-specific cleavage of a yeast chromosome by oligonucleotide-directed-triple helix formation. *Science* 1990, 249:73-75.
50. Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G, Pedon L, Cavallin M, Maiolino P, Pessina AC. The T-786C Endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. *J Am Coll Cardiol*. 2003, 41:930-937.
51. Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S, Lapini I, Rostagno C, Comeglio M, Brogi D, Gensini G, Abbate R. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 2004, 147:516-521.
52. Granath B, Taylor RR, van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J Cardiovasc Risk*. 2001, 8:235-241.
53. Paradossi U, Ciofini E, Clerico A, Botto N, Biagini A, Colombo MG. Endothelial function and carotid intima-media thickness in young healthy subjects among endothelial nitric oxide synthase Glu298-->Asp and T-786-->C polymorphisms. *Stroke*. 2004, 35:1305-1309.
54. Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, Wang X. Genotype-Dependent Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and Its Regulatory Proteins in Cultured Endothelial Cells. *DNA Cell Biol*. 2005, 24:218-224.
55. Dosenko VE, Zagoriy VY, Haytovich NV, Gordok OA, Moibenko AA. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. *Acta Biochim Pol*. 2006, 53:299-302.
56. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Ogawa H, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Kaneshige t, Hiramatsu H, Yoshioka T, Kamitani S, Teraoka H, Nakao K. Genetic risk factors for coronary artery spasm; significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786 C and missense Glu298Asp variants. *J Invest Med*. 2000, 48:367-374.



57. Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett.* 2000, 471:45–50.