

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)  
Glu 298-Asp POLİMORFİZMİNİN KLİNİK VE  
BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Yurdanur Çebi

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)  
Glu 298-Asp POLİMORFİZMİNİN KLİNİK VE  
BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Yurdanur Çebi**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Belgin Süssleyici Duman**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2006**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

<b>1. ÖZET</b> .....	1
<b>2. SUMMARY</b> .....	2
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	3
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
<b>4.1. KALP DAMAR SİSTEMİ</b> .....	4
4.1.1. Kalp Damar Fizyolojisi.....	4
4.1.2. Arter Yapısı.....	4
4.1.3. Koroner Dolaşım.....	5
4.1.4. Dolaşım Sisteminin Görevi ve Düzenleyici Mekanizmalar.....	6
4.1.5. Prostosiklin ve Tromboksan A2.....	7
4.1.6. Nitrik Oksit ve Kalp Damar Fizyolojisindeki Rolü.....	7
4.1.7. Endotelinler.....	9
4.1.8. Kininler.....	9
4.1.9. Adrenomedüllin.....	10
4.1.10. Atrial Natriüretik Hormon.....	10
4.1.11. Nitrik Oksit Sentaz ve Görevleri.....	10
<b>4.2. AKUT KORONER SENDROM</b> .....	11
4.2.1. Akut Koroner Sendrom.....	11
4.2.2. Akut Koroner Sendrom Patogenezi.....	11
4.2.3. Akut Koroner Sendrom Risk Faktörleri.....	13
<b>4.3. KRONİK KORONER ARTER HASTALIĞI</b> .....	14
4.3.1. Stabil Anjina Pektoris.....	14
<b>4.4. ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ</b> .....	15
4.4.1. eNOS Geni.....	15
4.4.2. eNOS Geni Glu 298-Asp Polimorfizmi ile İlişkili Hastalıklar...18	18

<b>4.5. POLİMORFİZM.....</b>	<b>18</b>
<b>5. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
<b>5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER.....</b>	<b>19</b>
5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	19
5.1.2. Kullanılan Çözeltiler.....	20
<b>5.2. ÇALIŞMA GRUBU.....</b>	<b>20</b>
5.2.1. Çalışma Dışı Tutulanlar.....	21
<b>5.3. KULLANILAN İNCELEME YÖNTEMLERİ.....</b>	<b>21</b>
5.3.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanma Koşulları.....	21
5.3.2. Uygulanan Biyokimyasal Laboratuvar Analizleri.....	22
<b>5.4. ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ GEN AMPLİFİKASYONU VE Glu 298-Asp POLİMORFİZMİNİN TESPİTİ İLE İLGİLİ YÖNTEMLER.....</b>	<b>22</b>
5.4.1. DNA İzolasyonu.....	22
5.4.2. DNA Miktarının Ölçülmesi.....	23
5.4.3. Primerlerin Hazırlanması.....	23
5.4.4. PZR Ürünlerinin Yatay Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi...25	
5.4.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi Analizi.....	26
<b>6. BULGULAR.....</b>	<b>27</b>
<b>7. TARTIŞMA.....</b>	<b>36</b>
<b>8. SONUÇ.....</b>	<b>40</b>
<b>9. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>41</b>
<b>10. KAYNAKLAR.....</b>	<b>42</b>

## 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>	: Endothelium-derived relaxing factor
<b>eNOS</b>	: Endotelyal nitrik oksid sentaz
<b>ET</b>	: Endotelin
<b>G</b>	: Guanin
<b>His</b>	: Histidin
<b>HDL</b>	: Yüksek dansiteli lipoprotein
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir nitrik oksid sentaz
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IP<sub>3</sub></b>	: İnositoltrifosfat
<b>KKAH</b>	: Kronik koroner arter hastalığı
<b>LDL</b>	: Düşük dansiteli lipoprotein
<b>Leu</b>	: Lösin
<b>Mİ</b>	: Miyokard infarktüsü
<b>NO</b>	: Nitrik oksid
<b>Nt</b>	: Nükleotid

<b>nNOS</b>	: Nöronal nitrik oksid sentaz
<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 2005/010 numaralı karar ile onaylanmıştır.

**Araştırma Projesi Numarası : TBG/0162004**

## 1. ÖZET

Nitrik oksid (NO), nitrik oksid sentaz (NOS) enzimi tarafından L-Argininden sentezlenir. NOS enziminin nöronal (nNOS), indüklenebilir (iNOS) ve endotelial (eNOS) olmak üzere üç izoformu vardır. eNOS geni Glu 298-Asp polimorfizmi koroner arter spazmı, koroner arter hastalığı, miyokard infarktüsü, ateroskleroz, koroner ateroskleroz yaygınlığı ve hipertansiyon ile olan ilişkisi çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir.

Bu çalışmada amacımız, akut koroner sendrom (AKS) ve kronik koroner arter hastalığı (KKAH) tanısı konmuş hastalarda eNOS geni Glu 298-Asp polimorfizminin hastalık oluşumu üzerindeki ve biyokimyasal parametrelere olan etkileri araştırmak idi. Bu amaçla, 17 adet AKS ve 13 adet KKAH tanısı konmuş hasta ve rutin sağlık kontrolleri için müracaat edip koroner anjiyografiyle koronerlerinin normal olduğu tespit edilen 46 sağlıklı kişi incelendi. eNOS Glu 298-Asp genotipleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon uzunluk parça polimorfizmi (RFLP) yöntemlerinin uygulanması ile saptandı.

Endotelial nitrik oksid sentaz genine ait Glu 298-Asp genotip sıklıkları; AKS' lu grupta %70,6 Glu/Glu, %23,5Glu/Asp, %5,9 Asp/Asp; KKAH grupta %76,9 Glu/Glu, %15,4 Glu/Asp, %7,7 Asp/Asp ve kontrol grupta %17 Glu/Glu, %51,1 Glu/Asp, %31,9 Asp/Asp olarak bulundu. AKS'lu ve KKAH gruplarda Glu/Asp ve Asp/Asp genotiplerinin sıklıklarını normal genotip olan Glu/Glu'ya kıyasla daha düşük yüzdelerde bulmamız Glu 298-Asp varyasyonunun hastalıkla ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca Glu 298-Asp genotiplerinin serum lipidleri üzerinde herhangi bir etkisine rastlanmadı. Sonuç olarak çalışmamızda eNOS geni Glu 298-Asp polimorfizminin nitrik oksit aracılı vasküler cevapları etkilemediğini tespit ettik.

## 2. SUMMARY

Nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine by the nitric oxide synthase (NOS) enzyme. NOS has three isoforms which are neuronal (nNOS), inducible (iNOS) and endothelial (eNOS). eNOS gene Glu 298-Asp polymorphism has been shown to have increased predisposition to various heart-vessel diseases such as; coronary spasm, coronary artery disease, myocardial infarction, atherosclerosis and hypertension.

The aim of our study was to determine the effects of eNOS gene Glu 298-Asp polymorphism over disease generation and biochemical parameters in patients with acute coronary syndrome (ACS) and chronic coronary artery disease (CCAD). For this purpose 17 patients with ACS, 13 patients with CCAD and 46 healthy individuals proven to have normal coronaries with angiography were analyzed. eNOS Glu 298-Asp genotypes were determined with polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) methods.

The frequencies of eNOS Glu 298-Asp genotypes were found to be 70,6% Glu/Glu, 23,5% Glu/Asp, 5,9% Asp/Asp for the ACS group; 76,9% Glu/Glu, 15,4% Glu/Asp, 7,7% Asp/Asp for the CCAD group, and 17% Glu/Glu, 51,1% Glu/Asp, 31,9% Asp/Asp for the control group. The lower frequencies of the Glu/Asp and Asp/Asp genotypes in the ACS and CCAD groups in comparison to controls may show that the Glu 298-Asp variation has no relationship with disease. Furthermore, Glu 298-Asp genotypes have not been found to be effective over serum lipids. As a conclusion, Glu 298-Asp polymorphism has not been found to affect nitric oxide-mediated vascular responses in the present study.



### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut Koroner Sendrom (AKS) terimi stabil olmayan anjina, ST elevasyonsuz miyokard infarktüsü (Mİ) ve ST elevasyonlu Mİ gibi durumları kapsar. AKS patogeneğinde ilk basamak ılımlı, stenotik, lipidce zengin kırılğan plakların kopmasıdır. Bu plakları tehlikeli yapan 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 anstabil anjina (unstable angina pectoris) veya Mİ meydana gelir.

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

Bu çalışmanın amacı, AKS ve kronik koroner arter hastalığı (KKAH) tanısı konmuş hastalarda eNOS geni Glu 298-Asp polimorfizminin hastalık oluşumu üzerindeki ve biyokimyasal parametrelere olan etkilerini araştırmaktır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. KALP DAMAR SİSTEMİ

#### 4.1.1. Kalp Damar Fizyolojisi

Kalp gerçekte iki ayrı pompadan oluşur; Akciğerlere kan pompalayan sağ kalp ve çevre organlara kan pompalayan sol kalp. Bunların her biri, bir atrium ve bir ventrikülden oluşan iki bölmeli atım pompasıdır. Atrium, ventrikül için zayıf bir hazırlayıcı pompa işlevi görererek kanı ventrikül içine yöneltir. Ventrikül ise, kanı ya pulmoner ya da periferik dolaşıma iten ana kuvveti sağlar (1). Bir kalp atımının başlangıcından, bir sonraki kalp atımının başlangıcına kadar gerçekleşen kalp olaylarına, kalp döngüsü denir. Dolaşım sistemi sistemik ve pulmoner dolaşım olmak üzere iki bölümde incelenir.

#### 4.1.2. Arter Yapısı

Normal bir arterde içteki intima tabakasında endotel hücreleri bulunur. Endotel hücrelerinin görevleri antitrombotik olarak kan dolaşımını devam ettirmek, damar duvarına materyal girişine karşı bariyer oluşturmak ve düz kas hücre fonksiyonlarını düzenlemektir. Arterin media tabakasında bulunan düz kas hücreleri damar tonusunu ayarlar. Bu aradaki destek dokuyu sağlayan unsurlar ise ekstrasellüler fibriller ve proteoglikanlar' dır. Gevşek bir bağ dokudan oluşan adventisya tabakası içinde fibroblast, ekstrasellüler matriks ve vazo vazorum bulunur.

**Tunika intima:** Bazal lamina üzerinde bulunan endotel hücre tabakası olan tunika intima heterojen bir yapıya sahiptir. Endotel hücreleri doğrudan kan ile temasta bulunarak iç yüzey tabakasını oluştururlar. Vasküler denge için önemli basamaklar endotel hücreleri tarafından yürütülmektedir (2, 3)

Endotel hücre tabakası; kollojen IV, laminin, fibronektin gibi kollajen tipte bileşimler ve başka hücre dışı matriks moleküllerinin oluşturduğu bazal membran üzerinde yer almışlardır (3, 4). Atardamar ağacında bazı yerler diğerlerine göre ateroskleroza yol açmadan daha kalın intima tabakaları oluşturmaktadır. Diffüz intima kalınlaşması, lipid birikiminden bağımsız olarak ve büyük ölçüde aterom oluşumuna sebep vermeden gelişebilir (4).

Sağlıklı damarlarda endotel: trombomodülin, heparin sülfat, doku faktör inhibitörü ve aneksin V' i salgılayarak kanın pıhtılaşmasına engel olur (5). Endotel hücrelerinin ürettiği plazminojen aktivatörlerle sağlıklı endotel hücrelerin yüzeylerinde tromboz tehlikesi olduğu durumlarda fibrinolitik mekanizma harekete geçmektedir (6). Endotelin gördüğü zarar nedeniyle vasküler geçirgenlik artması sonucu, lipid, monosit ve düz kas hücreleri daha kolay intimaya geçip birikebilirler. Düz kas hücreleri çoğalır ve kan pıhtılaşmasında bir artış meydana gelir. Pıhtılaşma düz kas hücreleri ile makrofajların proliferasyonunu kolaylaştırabilir (7).

Endotel hücreleri, nitrik oksit (NO) üretilip salgılayarak düz kas hücrelerine gevşeme sinyalini verir. NO, kolayca membranlardan geçebildiği için, üretildiği hücreden doğrudan komşu hücrelere ulaşabilmektedir. 5-10 saniye arasında değişen çok kısa yarı ömrü nedeniyle, hücre dışı alanda sadece bölgesel bir etkiye sahiptir. Endotel hücreleri, sinir ile düz kas hücreleri arasında asetilkolin ile sinyal bağlantısı kurmaktadır. Asetilkolin, sinir hücreleri tarafından kan damarlarına salgılanmaktadır (4).

#### **4.1.3. Koroner Dolaşım**

Koroner kan akımı hemen hemen tümüyle kasın oksijen gereksinimiyle orantılı olarak düzenlenir. Kan akımı, kalbin metabolik oksijen tüketimiyle orantılı olarak artar (1). Artan O<sub>2</sub> gereksinimi, koroner vasküler dirençte azalma yani kan akımının artışı ile karşılanır. Egzersiz veya stres şartlarında oksijen gereksinimi artınca koroner vasküler direnç azalarak yeterli kan ve oksijen temin edilir.

İstirahatte kalp debisinin % 5'i koroner arter sisteminden geçer. Bu geçiş daha çok ventrikül diyastolünde olur. Sistolde kasılmış olan sol ventrikülün kas içi basıncı, kalp içi basınçtan daha yüksektir ve intramiyokardiyal arteriyoller sistolde sıkılırlar. Sağ ventrikülün sistolik basıncı düşük olduğundan bu özellikler sağ ventrikül için geçerli değildir. Yine de epikardiyal koroner arterlerde sistolde az bir akım olabilmektedir. Sol ventrikül kasının kanlanması veya oksijen teminini etkileyen faktörler; diyastol süresi, aortanın diyastolik basıncı, koroner arter sisteminin çapı ve direncidir. Koroner arterioller kan akımını 5 kat arttıracak şekilde genişleyebilirler. Koroner aterosklerozunda büyük arterlerin direncinin koroner arter hastalığında (KAH) arttığı bilinmektedir. Koroner kan akımının belirti verecek kadar azalabilmesi için damar çapının 2/3 oranında daralması gerekir (8).

#### 4.1.4. Dolaşım Sisteminin Görevi ve Düzenleyici Mekanizmalar

Dolaşımın sisteminin görevi, besinleri dokulara taşımak, artık maddeleri dokulardan uzaklaştırmak, hormonları vücudun bir bölümünden diğerine taşımak ve genel olarak tüm hücrelerin optimal işlev görebilmesi ve yaşayabilmesi için tüm doku sıvılarında uygun çevreyi korumaktır. Vücuttaki bütün dokuların kan akımı daima doku ihtiyaçlarına göre hassas biçimde kontrol edilir. Dolaşım sistemi, arteryel basıncı düzenleyen yaygın bir sistemle donatılmıştır (1)

Kardiyovasküler düzenleyici mekanizmalar, etkin dokulara kan sağlanmasını artırır ve kanın yeniden dağılımı ile vücuttan ısı kaybını azaltır ya da çoğaltır. Kanama gibi durumlarda kardiyovasküler düzenleyici mekanizmalar, kalp ve beyinin kanlanmasını sürdürür. Dolaşıma ait ayarlamalar; kalbin dakika atım hacmi (debi), arteriyollerin çapı veya venlerde göllenmiş kan miktarı değiştirilerek yapılır. Arteriyollerin çapı, otheregölasyonun bir parçası olarak ayarlanır. Ayrıca bu çap, etkin dokularda yerel olarak üretilen vazodilatatör metabolitler tarafından artırılır, endotelden salınan maddelerden etkilenir ve sistemik dolaşımda bulunan vazoaktif maddeler ve arteriyolleri inerve eden sinirler tarafından sistemik olarak düzenlenir. Venlerin çapı da, dolaşımdaki vazoaktif maddeler ve vazomotor sinirler tarafından etkilenir. Sistemik düzenleyici mekanizmalar, yerel mekanizmalarla işbirliği yaparak, bütün vücutta damar yanıtlarını ayarlar.

Damarların büzülmesi (vazokonstriksiyon) ve genişlemesi (vazodilatasyon) genellikle, direnç damarlarının daralması ve genişlemesini belirtmek için kullanılır. Dokuların kendi kan akımını düzenleme yeteneği, özdüzenleme (otheregölasyon) 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, otheregölasyona 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. K<sup>+</sup>, yerel olarak birikerek damar gevşetici etki gösteren bir diğer maddedir. Laktat da dilatasyona katkıda bulunabilir. Hasarlı dokularda harap olan hücrelerden serbest kalan histamin kapiller

geçirgenliği artırır. Böylece histamin, inflamasyon bölgelerindeki şişmenin bir bölümünden sorumlu olabilir. Kalp kasında damar gevşetici rolü olan adenozinin, iskelet kasında böyle bir etkisi yoktur. Adenozin, aynı zamanda noradrenalin salınımını da engeller.

Endotel hücreleri bir çok büyüme faktörleri ve vazoaktif maddeler salgılar. Vazoaktif maddeler arasında prostaglandinler, tromboksanlar, NO ve endotelinler sayılabilir (9).

#### **4.1.5. Prostaglandin ve Tromboksan A2**

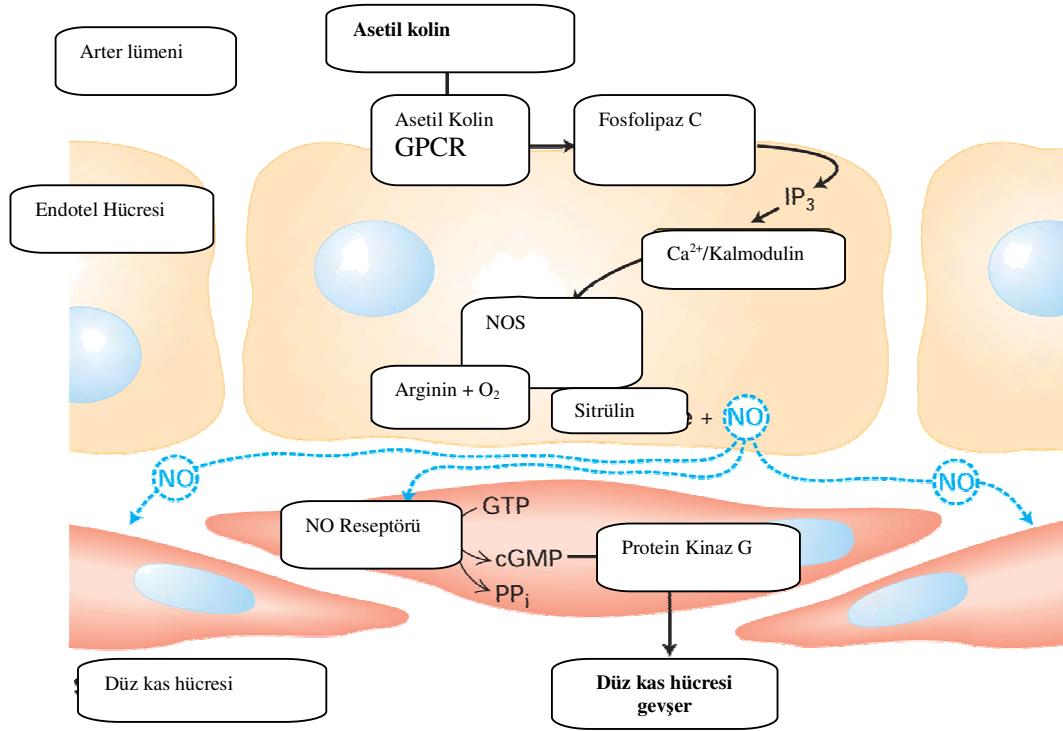
Prostaglandin endotel hücreleri tarafından, tromboksan A2 ise trombositler tarafından, siklooksijenaz yolu ile ortak öncül maddeleri olan araziidonik asitten üretilir. Tromboksan A2 trombosit kümelenmesi ve damar büzülmesini uyarırken, prostaglandin trombosit kümelenmesini önler ve vazodilatasyona neden olur. Tromboksan A2 ve prostaglandin arasındaki denge bölgesel trombosit kümelenmesi ve pıhtı oluşumunu artırırken, pıhtının aşırı yayılmasını önler ve pıhtı çevresindeki kan akımının devamlılığını sağlar (9).

#### **4.1.6. Nitrik Oksit ve Kalp Damar Fizyolojisindeki Rolü**

Nitrik oksit 1995 yılında keşfedilmiş olup, 1998 yılında Nobel'e konu olmuştur. NO'in bulunmasından kısa bir süre sonra endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) klonlandı ve bu enzimin substratı olan L-Arginin tanımlandı (10, 11, 12, 13). NO endotelden üretilip salgılanan ve damar düz kasının gevşemesini sağlayan gevşetici faktördür (EDRF) (10, 11, 14, 15). NO, bölgesel vasküler denge için esansiyel olup, kimyasal olarak stabil olmayan bir serbest radikaldir. 5-10 saniye arasında değişen yarı ömrü nedeniyle hücre dışı alanda lokal bir etkiye sahiptir. NO, tüm nitrovazodilatörlerin aktif komponentidir (10, 12,16) Düz kas hücrelerinin gevşetilmesi, trombosit aktivasyonu inhibisyonu, damar düz kas hücrelerinde büyüme ve göçün baskılanması ile damar duvarında sentezlenen endotelinin düzenlenmesi NO'in başlıca görevleridir (17, 18). NO eksikliğinde vasküler endotelin artışına bağlı olarak periferik dirençte artış meydana gelir (19, 20, 21). NO, hemoglobin tarafından etkisizleştirilir.

NO sentezine etkili olan başlıca uyarıcılar; kan akımının damar üzerinde oluşturduğu basınç, asetilkolin ve bradikininidir (20, 22, 23). Asetilkolin, endotel hücre yüzeyinde bulunan G-reseptörüne bağlandığında G-reseptöründe yapısal değişiklik meydana gelir ve fosfolipaz-

C aktiflenir. Aktiflenen fosfolipaz-C, fosfatidilinozitolbifosfatı (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 aktive eder. NOS, Arginin + O<sub>2</sub>'den, Sitrülin ve NO sentezler (Şekil 1) ( 20, 24, 25 ).



**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 (20, 25).

Nitrik oksit sentezi 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 anjiogenezise ve aterosklerozun patogenezeine 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 nitrovazodilatatörler, guanilil siklazı, tıpkı NO gibi uyararak etki gösterir.

#### **4.1.7. 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 (26, 27).

#### **4.1.8. Kininler**

Vücütte kininler olarak adlandırılan, birbiriyle bağlantılı iki vazodilatatör peptid bulunur. Biri nanopeptid olan bradikinin, diğeri kalidin olarak da bilinen bir dekaeptid olan lizilbradikinin'dir. Lizilbradikinin, aminopeptidazla bradikinine çevrilebilir. Her iki peptid, karboksil ucu Arg'i uzaklaştıran bir karboksipeptidaz olan kininaz 1 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 (9)

#### **4.1.9. Adrenomedüllin**

Adrenomedüllin (AM), NO üretimini arttırarak depresör etki gösteren bir polipeptiddir. AM, tuzdan yoksun bırakılmış hayvanlarda aldosteron salgısını durdurur. AM, böbreküstü bezine ek olarak, beyin ve böbrek dahil birçok dokuda ve plazmada bulunur. AM' nin kardiyovasküler rolü bilinmemektedir (9).

#### 4.1.10. Atrial Natriüretik Hormon

Kardiyak miyositler tarafından üretilip dolaşıma salınan atrial natriüretik hormon (ANF) sempatik aktivasyon inhibitörü olan bir vazodilatatördür. 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 (28).

#### 4.1.11. Nitrik Oksit Sentaz ve Görevleri

Nitrik Oksid Sentaz (NOS), L-Argininden NO sentez eder. NOS'ın üç izoformu mevcuttur. Bunlar;

- nNOS: Nöronal izoformudur. Sempatik sinir sonlarında bulunur.
- iNOS: Uyarılabilir izoformudur. Aktif makrofaj ve miyositlerde bulunur.
- eNOS: Endotelial izoformudur. Vasküler endotelium, trombositler ve endokardiumda bulunur (29, 30).

NOS'un endotelial ve nöronal izoformları  $Ca^{2+}$ -kalmodulin mekanizmasına bağımlı bir şekilde bazal NO seviyesini az miktarda yükseltir. Buna karşılık iNOS doğru fizyolojik uyararı verildiğinde 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 (29, 30, 31).

## 4.2. AKUT KORONER SENDROM

### 4.2.1. Akut Koroner Sendrom

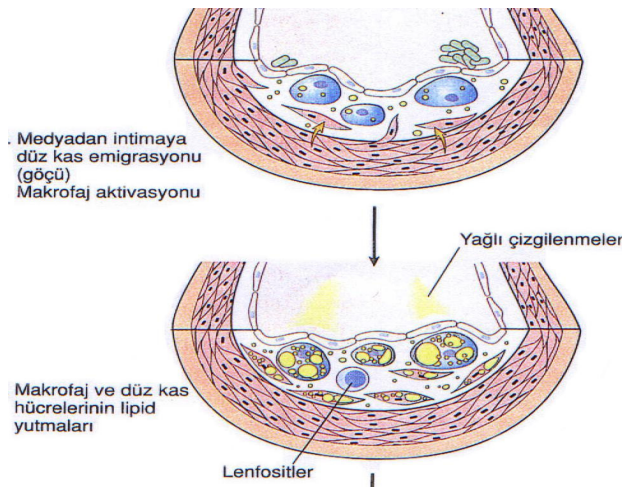
Akut koroner sendrom (AKS) heterojen bir hasta topluluğunu ifade etmektedir. AKS, koroner arterlerde meydana gelen aktif blokaj sonucu meydana gelir. AKS, stabil olmayan anjina pektoris, ST elevasyonsuz miyokard infarktüsü (Mİ) ve ST elevasyonlu Mİ gibi durumları ifade eder (32). Dünyada bulunan 143 milyon koroner arter hastasının %5-6'lık dilimini AKS nedeniyle hastanelere başvuran kişiler oluşturmaktadır. AKS hastalarının, yaklaşık 2/3'sinde, ST elevasyonsuz Mİ ve anstabil anjina pektoris gözlenirken, sadece 1/3



oranında ST elevasyonlu Mİ gözlenmektedir (33, 34). AKS'u tehlikeli yapan asıl faktör, hasta 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 3-4 yıl sonrasına kadar artarak devam etmektedir. Ölüm oranları AKS şikayetinden 1 ay sonra %1.7 iken, 2 yıl sonra %9.5'dur (33, 34). AKS tanısı konmuş kişilerde %2 oranında ölüm beklenmesine rağmen bu oran %4-5 civarında gerçekleşmektedir.

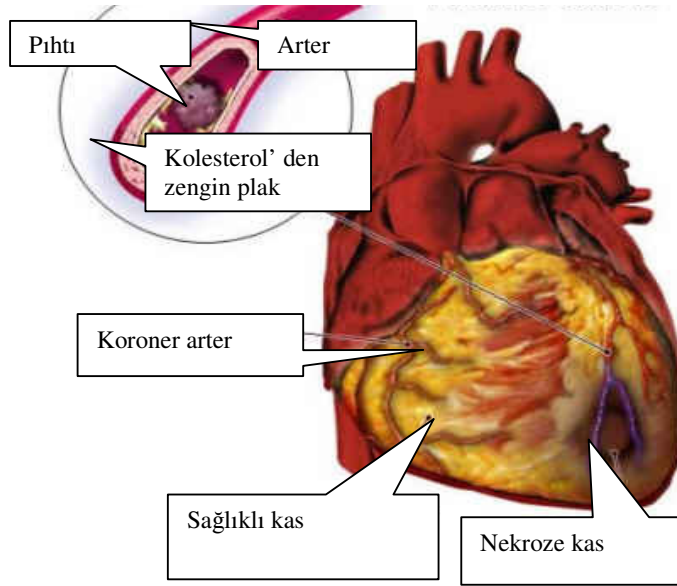
#### 4.2.2. Akut Koroner Sendrom Patogenezi

Akut koroner sendrom patogenezinde ilk basamak lipid bakımından zengin, ince fibröz tabakaya sahip, kırılabilir plakların kopmasıdır. Oluşan kırılabilir plaklar X-ışın anjiyografisinde ortaya çıkarılmadığı gibi, hastalık oluşumundaki etkileri de stenoz oluşturma yönünde değildir. Kırılmaya çok yatkın olan bu plaklar yerlerinden koparak farklı seviyelerde koroner obstrüksiyona neden olurlar (35, 36, 37). AKS patogenezinin ilk basamağı olan plak oluşumu aterosklerozda olduğu gibi endotelial fonksiyon bozukluğundan kaynaklanır (36, 36, 37). 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 (38). Monositler infiltre oldukları alanda aktive olarak, makrofajlara dönüşürler. Makrofajların ve ilerleyen aşamalarda, miyositlerin sitoplazmasında LDL-kolesterol birikimi ile birlikte lipid bakımından zengin plaklar meydana gelir (Şekil 2).



## Şekil 2. Akut koroner sendrom' da plak oluşumu

Plak yerinden koptuğunda, yaralı endotel sağlam olmadığından asetilkolin (Ach) uyarısını alamaz. Ach'ın endoteli uyarabilmesi için endotelin sağlam olması gerekmektedir (26, 37). Bu nedenle, AKS ile hastaneye başvuran hastalara koroner içine Ach verilmesine rağmen, vazodilatasyon elde edilememiştir (37). Ach uyarısını almayan endotel hücreleri NO üretimine geçemezler. NO eksikliğinde, koronerlerde tromboz ve vazokonstürksiyon sınırlanamadığından, akut ve şiddetli göğüs ağrısı ile karakterize olan stabil olmayan angina pectoris veya Mİ meydana geldiği düşünülmektedir (Şekil 3).



Şekil 3: Akut koroner sendrom' da kırılğan plak ve pıhtı oluşumu

### 4.2.3. Akut Koroner Sendrom Risk Faktörleri

- **Tip II Diyabet:** Tip II diyabette plazma lipid metabolizma bozukluklarına çok sık rastlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda insülin, büyüme faktörlerinin stimülasyonu ile, damar düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve bağ dokusu sentezinin arttığı, damarlarda lipid plaklarının oluşumunun hızlandığı ve gerilemesinin engellendiği gösterilmiştir (39, 40).

- **Yaş Faktörü ve Erkek Cinsiyeti** : Yaş ilerledikçe AKS riski artar. Erkeklerde ve oral kontraseptif kullanan kadınlarda AKS sıklığı fazladır (40).
- **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 arttırarak ve HDL-kolesterol düzeyini düşürerek ateroskleroz oluşumunda etkili olur (15, 25, 40).
- **Hipertansiyon** : Hipertansiyonu olan kişiler AKS için yüksek risk altındadır (40).
- **Hiperkolesterolemi ve Hiperlipidemi**: Yapılan araştırmalar AKS hastalarının büyük kısmında hiperkolesterolemi ve hiperlipidemi gözlemlendiğini kanıtlamıştır (40, 41).
- **Kalıtsal Metabolik Hastalıklar**: Kalıtsal metabolik hastalık AKS için bir risk faktörüdür (40).
- **Geçirilmiş Serebrovasküler Olay**: AKS' li kişilerin % 7'sinin önceden geçirilmiş serebrovasküler olayı bulunmaktadır (40).

### 4.3. KRONİK KORONER ARTER HASTALIĞI

#### 4.3.1. Stabil Angina Pectoris

Anjina pectoris terimi miyokard iskemisine bağlı semptomları tanımlamak için kullanılmaktadır. Anjinanın sıklığı, şiddeti ve süresinde önemli değişiklikler olmaksızın haftalarca aynı karakterde ortaya çıkması durumunda bu tablo “stabil anjina = kararlı anjina” olarak adlandırılır. Özellikle miyokard oksijen tüketiminin arttığı durumlarda ortaya çıkar. Çevresel ve duygusal faktörlere bağlı olarak stabil anjinada da bazen semptom karakterinde değişiklik olabilir.

Miyokard iskemi atakları bazan ağrısız olabilir. Bu durum “sessiz iskemi” olarak adlandırılır. Bazı kişilerde iskemi atakları her zaman sessiz olabilirken, aynı kişide anginal ve sessiz iskemi atakları birlikte de bulunabilir.

Angina pectoris miyokard perfüzyonu ve miyokardın oksijen gereksinimi arasında dengesizlik olduğunda ortaya çıkar. Buna çoğu kez koroner arterlerin ateromatöz daralmaları

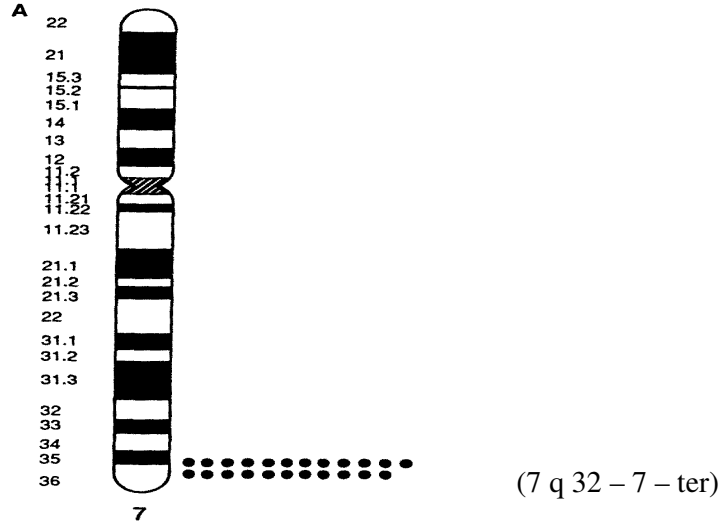
neden olur. Koroner kan akımının miyokardın egzersiz veya stresle artan oksijen gereksinimini karşılayamaması için koroner arterlerdeki daralmanın en az %50-70 olması gerektiği kabul edilmektedir. Bununla beraber darlığın klinik önemi lümen çapı yanında darlık sayısı ve uzunluğu ile de ilgilidir. Ayrıca özellikle egzantrik darlıklarda lümen çapı sabit olmayıp, koroner tonusundaki değişikliklerden etkilenebilir.

Stabil anginalı hastaların çoğunda prognoz iyidir. Ölümcül olmayan Mİ yılda %2-3, mortalite %2-3 düzeyindedir (42). Doğal gidiş yoğun risk faktörü modifikasyonu ve yüksek riskli hastalarda revaskülarizasyonla değiştirilebilir. Stabil anginalılarda koroner ateroskleroz çoğu kez yavaş ilerler. Anjiyografik olarak kompleks plaklarda ilerleme olmayanlara göre daha hızlıdır. Ancak hızlı ilerleyiş gösterecek plakların anjiyografik tanı şansı yüksek değildir. Darlık derecesi ile gelişecek kardiyak olaylar arasında da ilişki yoktur (43).

#### **4.4. ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ (eNOS)**

##### **4.4.1. eNOS Geni**

Endotelial nitrik oksit sentaz geni 7 q 32-7 q terminal (ter) bölgesinde yer alır (Şekil 4). nNOS geni ise 12. kromozomda bulunur. eNOS geni 26 ekson içerir ve yaklaşık olarak 21 kilobazlık genomik DNA'dan oluşur. eNOS genine ait ayrıntılı bilgiler Şekil 4, Tablo 1 ve Tablo 2'de görülmektedir. eNOS geninin kodladığı mRNA 4052 nükleotid içerir ve haploid genomda tek kopya olarak bulunur (16).



**Şekil 4:** eNOS genine ait kromozomal yerleşim

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

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	TCATCTCTTGCAAG	CCAG
11	CCAA	GTGGGT	CTTCCTCTCCCGCAG	CGCC
12	CCGG	GTAGGG	TCTTCCCACCCACAG	GTCC
13	AGAG	GTGAGA	CACTCCCCTCGCCAG	AGCT
14	ACAA	GTGAGT	GTCCTCTCTTGCCAG	GAGT
15	TCAG	GTCAGG	ACCCTGCACCCCAG	GTTC
16	CCAG	GTGAGC	CCCGCTGTCCCGCAG	GCCG
17	CCAG	GTGGGC	CCTCCCCGCCCCAG	GTCT
18	CCAC	GTGAGG	TCTCCCCACCCCAG	GAGG
19	CCTG	GTGAGG	GTGCACTATCCCAG	GTGG
20	CCAG	GTTGGG	ATCCTGCCCCGCCAG	GATC
21	CAGG	GTGAGG	CCTTCCCACCCCAG	ATGG
22	GGGG	GTAAGT	TGTCTCTCCTGCCAG	GGCT
23	AAAG	GTGAGG	CGGGGTTGCTTGCCAG	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

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

#### 4.4.2. eNOS Geni Glu 298-Asp Polimorfizmi ve İlişkisi Kanıtlanmış Hastalıklar

**Ateroskleroz:** Aterosklerotik plaklarda yapılan direkt NO ölçümü, bu hastalarda eNOS ekspresyonunda ve endojen nitrat sentezinde düşüş olduğunu göstermiştir (19, 20, 44).

**Koroner spazm:** Anormal eNOS alleli olanlarda koroner spazm anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (10, 45, 46).

**Mİ:** Klinik olarak araştırıldığında eNOS mutasyonu açısından homozigot genotipe sahip hastaların şiddetli koroner vazospazm geçirdikleri, bazılarının da yapılan anjiyografilerde organik stenoz olmamasına rağmen akut Mİ geçirdikleri gözlenmiştir (45, 46, 47).

#### 4.5. 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 allel varlığıdır. Genetik polimorfizm, bir popülasyonda, farklı allellere bağlı, genetik olarak belirlenmiş iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Çoklu allel içeren bir bölge polimorfiktir (48, 49).



## 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 100 bp DNA ladder	Fermentas	# SM0241
Ban II (Eco 241)	Fermentas	#ER0281
dATP, dCTP	Fermentas	# R0161, # 0171
dGTP, dTTP	Fermentas	# 0141, # 0151
Primerler	IDT	#14846500, #14846498
Taq polimeraz	Fermentas	# EP0402
MgCl	Sigma	# M0250
10 X PZR Tamponu		
Agarose	Sigma	#A5093
Proteinaz K	Sigma	# P4914
Polaroid film 3000/36 °C(677)	Sigma 3000/36°C(677)	# F 4638
Sucroz	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

#### 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. 10XPZR Tamponu

## 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 sistolik ve diyastolik fonksiyonları ve 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 ÇOĞALTILMASI VE Glu 298-Asp POLİMORFİZMİNİN TESPİTİ İLE İLGİLİ YÖNTEMLER**

Hasta ve kontrol grubuna ait kişilerden alınan venöz kan örneklerinden, genomik DNA'larının izolasyonunu takiben 517 bç eNOS gen ürününü çoğaltmak amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulandı. Çoğaltılan ürünler, eNOS Glu 298-Asp genotiplerinin belirlenmesi amacıyla restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemine tabi tutuldu.

### **5.4.1. DNA İzolasyonu**

Yüksek tuz konsantrasyonları kullanılarak genomik DNA elde edildi (50).

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. Süpernatant 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-base; 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. Inkübasyon 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 (51).

### 5.4.3. Primerlerin Hazırlanması

eNOS genotiplerinin belirlenmesi için kullanılan liyofilize formda ileri (298F) ve geri (298R) 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 Glu 298-Asp genotiplerini tespit etmek amacıyla PZR'da kullanılan ileri (298F) ve geri (298R) primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir.

298F: 5'-GAC CCT GGA GAT GAA GGC AGG AGA -3'

298R: 5'-ACC ACC AGG ATG TTG TAG CGG TGA -3'

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

dNTP'ler (2mM)	200 µM
Kalıp DNA	100 ng
Çift distile su	Total hacim 25 µl' ye tamamlanır
<b>Kullanılan temel komponentler</b>	<b>Final konsantrasyonu</b>
10 X PZR Tamponu	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2.0 mM
İleri primer	0.4 µM
Geri primer	0.4 µM
Taq polimeraz (5U/µl)	0.5 U

**Tablo 3.** e(NOS) Glu 298-Asp PZR reaksiyon karışımı içeriği

### **PZR Programı**

1. 95 °C'de 5 dk. denatürasyon
2. 30 kez tekrarlanacak şekilde;  
94 °C'de 1 dk.  
58C'de 1 dk.  
72 °C'de 1 dk. sentez ve uzama
3. 72 °C'de 5 dk.

### **5.4.4. PZR ürünlerinin Yatay Jel elektroforezinde Görüntülenmesi**

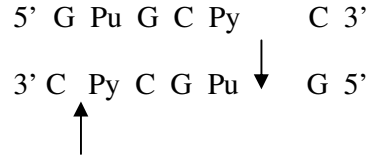
PZR ürünlerinin jel elektroforezinde kullanılacak agaroz jelin konsantrasyonu ayrıştırılmak istenen parçanın büyüklüğüne göre değişmektedir. Bu çalışmada çoğaltılan eNOS gen ürünleri % 1.5'lik agaroz jelde yürütüldü ve agaroz jeller ultraviyole (UV) ışık altında incelendi.

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

5 µl 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 100 bp DNA ladder moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak belirlendi.

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

eNOS Glu 298-Asp genotiplerinin belirlenmesi amacıyla çoğaltılan PZR ürünleri BanII (Eco 241) enzimi ile kesildi.



Şekil 7: BanII (Eco241) enziminin kesim bölgesi

eNOS Glu298-Asp genotiplerinin belirlenmesi amacıyla çoğaltılan PZR ürünleri BanII enzimi ile kesildi. 20 µl PZR ürünü 3 U (0.3ml) BanII enzimi ile 37 °C' lik etüvde 12 saat inkübe edilerek kesildi.

## 6. BULGULAR

Bu çalışmada 17 adet AKS hastası, 13 adet KKAH ve 46 adet KKAH'lığı bulunmayan ve anjiyografik olarak koronerleri normal olan sağlıklı kontroller ile çalışıldı. Akut koroner sendrom grubu, yaş ortalamaları  $62.00 \pm 2.21$  olan 10 erkek ve 7 kadından, KKAH grubu yaş ortalamaları  $60.31 \pm 2.47$  olan 8 erkek ve 5 kadından; kontrol grubu ise yaş ortalamaları  $58.97 \pm 1.65$  olan 13 erkek ve 33 kadından oluşturuldu.

Akut koroner sendrom ve KKAH gruplarına ait klinik özellikler incelendiğinde; AKS hastalarının %41.2'si (7) kişi ST elevasyonlu Mİ, %29.4'ü (5 kişi) ST elevasyonsuz Mİ, %35.3'ü ise (6 kişi) stabil olmayan anjina pektoris nedeniyle hastanede takip ve tedaviye alınmıştır. AKS hastalarının %41.2'sine (7 kişi) perkütan intra-koroner girişim, %35.3'üne (6 kişi) koroner by-pass greft, %23.5'ine (4 kişi) de medikal takip yapılmıştır.

KKAH'larının %76.9 (10 kişi) daha önceden bilinen ve uzun süredir devam eden eforlu göğüs ağrısı bulunan stabil angina pektoris olanlar, %92.3 (12 kişi) stabil angina pektoris tanısıyla perkütan intra-koroner girişim uygulanmak üzere hastaneye başvuranlar ve %15.4'ü (2 kişi) kronik stabil angina pektoris tanısıyla koroner by-pass greft operasyonu için hastaneye müracaat edenlerdir. Tedavi kapsamında KKAH'larının %15.4'üne (2 kişi) perkütan intrakoroner girişim, %61.5'ine (8 kişi) koroner by-pass greft ve %23.1'ine (3 kişi) medikal takip uygulanmıştır.

Çalışma grubumuzu oluşturan AKS, KKAH ve kontrol gruplarına ait demografik özellikler Tablo 4'de verilmiştir. KKAH grubunda kilonun ( $p \leq 0.01$ ) kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda yüksek olduğu bulundu. Gruplar boy ve 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 (n=17)</b>	<b>KKAH (n=13)</b>	<b>Kontrol (n=46)</b>
Boy (m)	1.66 ± 0.02	1.66 ± 0.03	1.61 ± 0.01
Kilo (kg)	77.67 ± 3.33	83.13 ± 3.01 <sup>a</sup>	68.43 ± 1.86
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.13 ± 1.59	28.44 ± 2.00	26.24 ± 0.62

Değerler ortalama ± SE olarak ifade edilmiştir.

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

a: KKAH grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek ( $p \leq 0.01$ )

Tablo 5'te AKS, KKAH ve kontrol gruplarına ait biyokimyasal özellikler karşılaştırılmıştır. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldıklarında, 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 (n=17)</b>	<b>KKAH (n=13)</b>	<b>Kontrol (n=46)</b>
Total-kolesterol (mg/dl)	204.53 ± 9.88	220.92 ± 17.16	188.49 ± 6.18
HDL-kolesterol (mg/dl)	44.47 ± 3.19	38.42 ± 3.56 <sup>a</sup>	46.91 ± 1.15
LDL- kolesterol (mg/dl)	130.47 ± 8.05	143.67 ± 13.88	124.41 ± 4.47
Trigiserid (mg/dl)	133.18 ± 13.24	205.00 ± 29.27	135.20 ± 9.08
Glikoz (mg/dl)	123.71 ± 15.22 <sup>b</sup>	141.75 ± 16.22 <sup>b</sup>	63.57 ± 1.60
Lökosit (sayım/mm <sup>3</sup> )	10612.50 ± 711.74 <sup>b</sup>	8350.00 ± 569.65 <sup>b</sup>	4828.72 ± 134.46

Değerler ortalama ± SE olarak ifade edilmiştir.

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

a: Kontrol grubuna kıyasla daha düşük, (p≤<0.01)

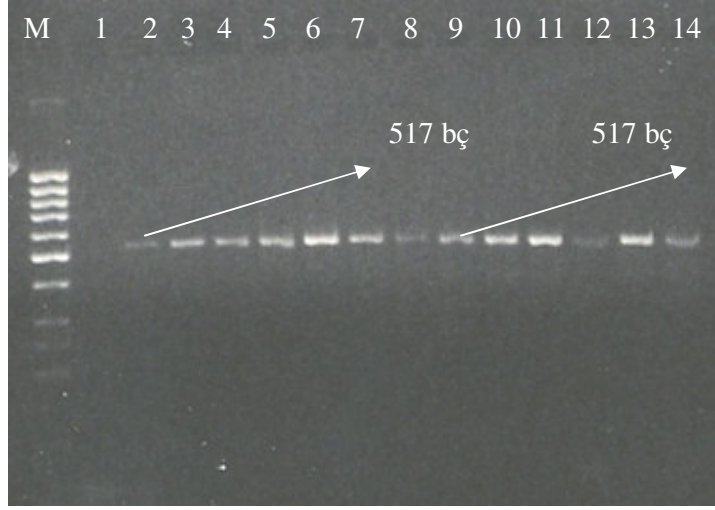
b:Kontrol grubuna kıyasla daha yüksek, (p≤0.001)

Endotelial nitrik oksit geninde Glu 298-Asp genotiplerini saptamak amacı ile yapılan PZR sonucunda 517bç'lik ürün elde edildi (Şekil 5). PZR ürünleri Ban II restriksiyon enzimi ile kesildi. Ban II enzimi ile kesim sonrası, Glu 298 alleli açısından homozigot olan PZR ürünlerinden kesim meydana gelmezken, Asp 298 alleli açısından homozigot olan PZR ürünlerinden 346 ve 171bç'lik DNA parçaları, heterozigot olan PZR ürünlerinden ise 517,346 ve 171bç'lik DNA parçaları oluştu (Tablo 6).

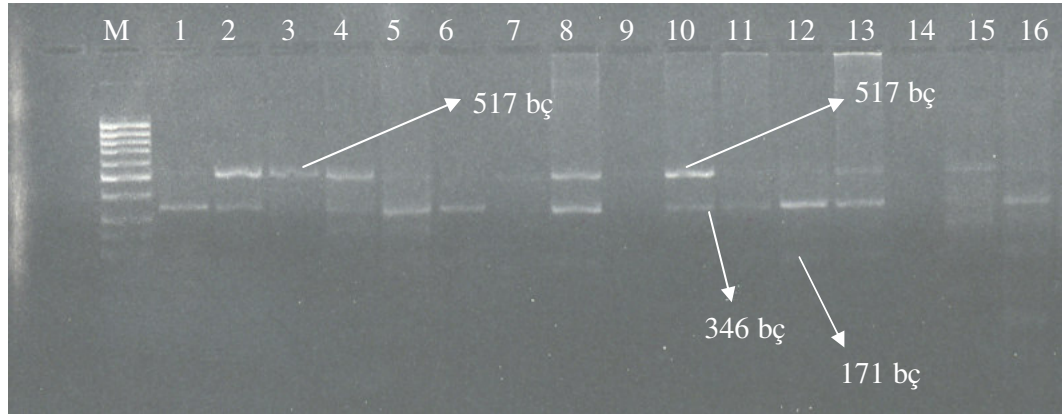
**Tablo 6.** eNOS PZR ürünlerinin Ban II enzimi ile kesiminden ortaya çıkan DNA parçalarının uzunlukları

	<b>Normal</b>	<b>Heterozigot</b>	<b>Homozigot Mutant</b>
	<b>Glu /Glu</b>	<b>Glu/ Asp</b>	<b>Asp/Asp</b>
<b>517bç</b>	————	————	
<b>346bç</b>		————	————
<b>171bç</b>		————	————

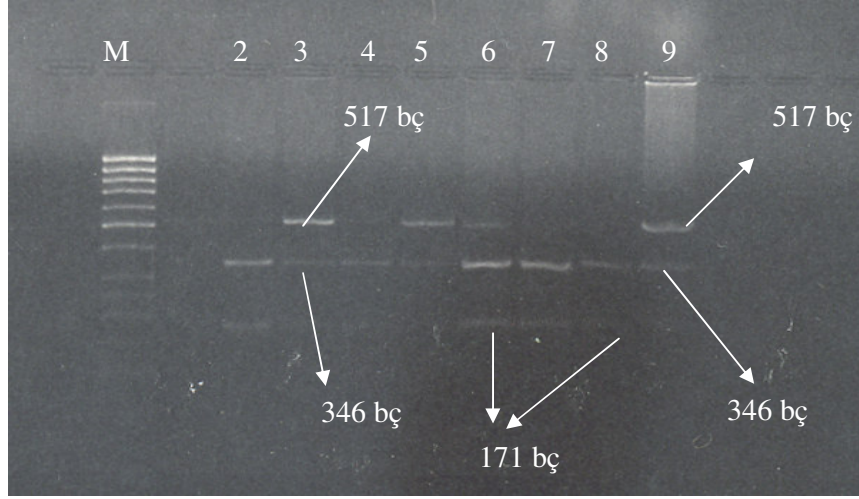
Allelik polimorfizmler, restriksiyon bölgesinin her iki allede de bulunmaması (normal); Glu/Glu, restriksiyon bölgesinin her iki allede de bulunması (mutant); Asp/Asp ve restriksiyon bölgesinin sadece bir allede bulunması (heterozigot); Glu/Asp şeklinde açıklanabilir (Şekil 5,6, 7, 8).



**Şekil 5.** eNOS geni Glu 298-Asp polimorfik bölgesini taşıyan PZR ürünleri  
M: 100bç DNA moleküler ağırlık merdiveni, 2-14. kuyular: 517 bç' lik PZR ürünleri



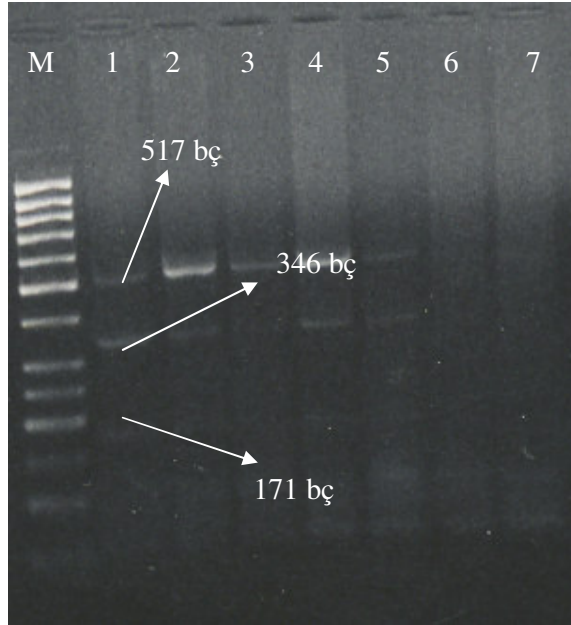
**Şekil 6.** PZR ürünlerinin kesimi ile elde edilen Glu 298-Asp genotipleri  
M: 100bç DNA moleküler ağırlık merdiveni; 1, 5, 6, 11, 12, 16. kuyular: Asp/Asp genotipi; 2, 4, 8, 10, 13, 15. kuyular: Glu/Asp genotipi; 3, 7. kuyular: Glu/Glu genotipi



**Şekil 7.** PZR ürünlerinin kesimi ile elde edilen Glu 298-Asp genotipleri

M: 100bç DNA moleküler ağırlık merdiveni; 2, 4, 7, 8. kuyular: Asp/Asp genotipi; 3, 5, 6, 9.

kuyular: Glu/Asp genotipi



**Şekil 8.** PZR ürünlerinin kesimi ile elde edilen Glu 298-Asp genotipleri

M: 100bç DNA moleküler ağırlık merdiveni; 1, 2, 4, 5. kuyular: Glu/Asp genotipi; 3. kuyu:

Glu/Glu genotipi

AKS, KKAH ve kontrol gruplarına ait eNOS Glu 298-Asp genotip dağılımları Tablo 7’ de verilmiştir. AKS’ li grupta 12 kişi normal, 4 kişi heterozigot ve 1 kişi mutant; kontrol grupta 8 kişi normal, 24 kişi heterozigot ve 15 kişi mutant; KKAH grupta ise 10 kişi normal, 2 kişi heterozigot ve 1 kişi mutant olarak bulunmuştur. eNOS Glu 298-Asp genotip dağılım sıklıkları; AKS’ lu grupta %70.6 Glu/Glu, %23.5 Glu/Asp, %5.9 Asp/Asp; KKAH grupta %76.9 Glu/Glu, %15.4 Glu/Asp, %7.7 Asp/Asp ve kontrol grupta %17 Glu/Glu, %51.1 Glu/Asp, %31.9 Asp/Asp olarak tespit edilmiştir. Hem AKS hemde KKAH gruplarında Glu/Glu genotip sıklığı Glu/Asp ve Asp/Asp genotiplerine kıyasla anlamlı olarak fazla bulundu. Kontrol grubunda ise Glu/Asp genotip sıklığı en fazla, Glu/Glu genotip sıklığı ise en düşük oranda gözlemlendi ( $p \leq 0.001$ ) (Tablo 7).

**Tablo 7.** Akut koroner sendrom, kronik koroner arter hasta ve kontrol gruplarında eNOS geni Glu 298-Asp genotip dağılımları

	eNOS Glu 298 -Asp genotipleri		
	Glu/Glu;n(%)	Glu/Asp;n(%)	Asp/Asp;n(%)
<b>AKS</b>	12 (70.6)*	4 (23.5)	1 (5.9)
<b>Kontrol</b>	8 (17)	24 (51.1)*	15 (31.9)
<b>KKAH</b>	10 (76.9)*	2 (15.4)	1 (7.7)

AKS: Akut koroner sendrom, KKAH: Kronik koroner arter hastalığı  
Genotip sıklıkları dağılımları  $\chi^2$  yöntemi ile karşılaştırıldı, \*  $p \leq 0.001$

AKS ve KKAH grupları birlikte ele alındığında ise, Glu/Glu genotipi en yüksek sıklıkta, Asp/Asp genotipi en düşük sıklıkta bulunurken; kontrol grubunda Glu/Asp genotipi en yüksek sıklıkta, Glu/Glu genotipi ise en düşük sıklıkta gözlemlendi,  $p \leq 0.001$  (Tablo 8).

**Tablo 8.** Hasta (Akut koroner sendrom ve kronik koroner arter hastaları birlikte) ve kontrol gruplarında eNOS geni Glu 298-Asp genotip dağılımları

Grup	eNOS Glu 298 -Asp genotipleri		
	Glu/Glu;n(%)	Glu/Asp;n(%)	Asp/Asp;n(%)
<b>AKS+ KKAH</b>	22 (73.3)*	6 (20)	2 (6.7)
<b>Kontrol</b>	8 (17)	24 (51.1)*	15 (31.9)

AKS: Akut koroner sendrom, KKAH: Kronik koroner arter hastalığı  
Genotip sıklıkları dağılımları  $\chi^2$  yöntemi ile karşılaştırıldı, \*p<0.001

Hasta (Akut koroner sendrom ve kronik koroner arter hastaları birlikte) ve kontrol gruplarına ait biyokimyasal parametrelerin değerleri eNOS Glu 298-Asp genotiplerine göre Tablo 9’da verilmiştir. Buna göre eNOS Glu/Glu ve Glu/Asp genotipleri arasında total-kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid, glikoz ve lökosit değerleri açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

**Tablo 9.** Hasta (Akut koroner sendrom ve kronik koroner arter hastaları birlikte) ve kontrol gruplarında eNOS Glu 298-Asp genotiplerine göre biyokimyasal parametreler

<b>Grup</b>	<b>eNOS Glu 298-Asp Genotipleri</b>	
	<b>Glu/Glu (n=22)</b>	<b>Glu/Asp (n=6)</b>
<b>AKS+KKAH</b>		
Total-kolesterol (mg/dl)	205.48 ± 25.98	237.33 ± 34.15
HDL-kolesterol (mg/dl)	39.90 ± 2.67	46.50 ± 4.89
LDL-kolesterol (mg/dl)	134.43 ± 7.91	143.3 ± 20.85
Trigliserid (mg/dl)	172.38 ± 19.29	158.50 ± 28.15
Glikoz (mg/dl)	120.47 ± 8.21	113.60 ± 19.88
Lökosit (sayım/mm <sup>3</sup> )	9247.37 ± 531.54	10140.00 ± 688.19
<b>Kontrol</b>	<b>Glu/Glu (n=8)</b>	<b>Glu/Asp (n=24)</b>
Total-kolesterol (mg/dl)	177.67 ± 15.85	189.29 ± 33.43
HDL-kolesterol (mg/dl)	46.43 ± 2.83	48.58 ± 1.44
LDL-kolesterol (mg/dl)	140.86 ± 13.43	126.96 ± 5.85
Trigliserid (mg/dl)	109.58 ± 12.22	156.38 ± 15.16
Glikoz (mg/dl)	60.23 ± 3.96	63.26 ± 2.26
Lökosit (sayım/mm <sup>3</sup> )	4425.00 ± 259.12	5010.42 ± 196.53

Değerler ortalama ± SE olarak ifade edilmiştir.

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



## 6. TARTIŞMA

Endotelial nitrik oksit sentaz gen ekspresyonunu düzenleyen polimorfizmlerin genotipe bağılı düzenlenmeleri, Mİ, hipertansiyon, renal vasküler hastalık ve serebral vasküler hastalık gibi çeşitli damar hastalıklarıyla ilişkilidir.

e(NOS) geni Glu 298-Asp polimorfizminin koroner arter spazmı (52), koroner arter hastalığı (32), miyokard infarktüsü (53, 54), koroner ateroskleroz yaygınlığı (55, 56), ve hipertansiyon (31) ile olan ilişkisi çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir.

Benjafield ve ark (57) eNOS Glu 298-Asp polimorfizmi ile serum lipid düzeyleri arasında herhangi bir ilişki bulmaz iken, Pereira ve ark. (58) total-kolesterol düzeyleri 209 mg/dl' nin üzerinde olan Asp/Asp genotipine sahip kişilerde hipertansiyon riskinin arttığını gözlemişlerdir. Bu çalışmada hasta ve kontrol gruplarında eNOS Glu 298-Asp polimorfizminin araştırılan serum lipid seviyeleri ile anlamlı bir ilişkisine rastlanmadı.

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 endotelial fonksiyon bozukluğuna ve koroner hastalıklara yatkın hale getiriyor olabilir. Endotelial nitrik oksid sentaz Glu 298-Asp polimorfizminin AKS yada KAH için risk faktörü olup olmadığına dair veriler farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda farklılık göstermektedir. Türk toplumunda Berdeli ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (59), renin-angiotensin sistem genlerinin (ACE I/D, AGT T/M, AT 1R T/C) eNOS Glu 298-Asp polimorfizmi ile birlikte sinergistik olarak prematür KAH oluşumunda rol aldığını kanıtlamıştır. Şöyleki, eNOS Asp/Asp genotipindeki kişilerin aynı zamanda ACE DD, AGT MM yada AT 1AA genotipi taşıyıcısı olmaları durumunda prematür koroner arter hastalığı riski artmaktadır. Berdeli ve ark. (59) aksine Afrasyap ve ark. ise (60) Türk toplumunda eNOS geni Glu 298-Asp polimorfizmi ile KAH arasında ilişki ilişki bulamamışlardır. Bizde Afrasyap ve ark. gibi eNOS geni Glu 298-Asp polimorfizmini KAH ile ilişkili bulunmadı.

Bazı araştırmacılar Japon ve Koreli bireylerde Glu 298-Asp varyasyonu ile KAH arasında ilişki bulmazken (61, 62), diğerleri aynı varyantın anlamlı olarak iskemik kalp hastalığı (63) ve sigara içimi ile ilişkili KAH ile (15) bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir. Cai ve ark. (64) Beyaz Avustralyalı halkında Glu 298-Asp polimorfizmini, KAH oluşumu yada ciddiyeti ile ilişkili bulmazken, Colombo ve ark. (56) aynı gen polimorfizmini İtalyan toplumunda KAH oluşumu ve ciddiyeti için majör risk faktörü olarak saptamıştır. İngiliz halkında yapılan iki ayrı çalışmanın sonuçları ise birbiri ile çelişmektedir. Şöyleki; Hingorani ve ark. (65) Glu 298-Asp polimorfizmini KAH için risk faktörü olarak tespit ederken, Jeerooburkhan ve ark. (66) aynı polimorfizmi KAH için risk faktörü olarak bulmamıştır. Fransa (67), İrlanda (67) ve Kanada (68) toplumlarında yapılan çalışmalarda Glu 298-Asp polimorfizmi ile KAH arasında bir korelasyon tespit edilmemiştir. Alman toplumunda yapılan bir çalışmada ise Glu 298-Asp polimorfizmi ile KAH arasında ilişki saptanmazken aynı çalışma grubundaki 298 Asp alleli taşıyan genç bireylerde hastalık riskinin arttığı gösterilmiştir (69).

Bilgimiz dahilinde literatürde akut koroner sendromlu hastalarda eNOS geni Glu 298-Asp polimorfizminin sıklığını ve hastalıkla ilişkisini araştıran yalnızca bir çalışma bulunmaktadır (70). Fatini ve ark. (70) 477 adet AKS'lu hastada ve 537 adet sağlıklı kontrolde eNOS genine ait Glu 298-Asp, 4a4b ve T-786C polimorfizmlerini çalışmış ve eNOS geni Glu 298-Asp polimorfizmini AKS için bir risk faktörü olarak tespit etmemişlerdir. Bizde çalışmamızda Fatini ve ark.'nın sonuçları ile paralel olarak eNOS geni Glu 298-Asp polimorfizmi AKS ile ilişkili bulunmadı.

Fatini ve arkadaşlarının çalışması (70) AKS'lu ve sağlıklı kişilerde eNOS genine ait Glu 298-Asp genotip dağılımları ve allel sıklıklarını hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı olarak farklı bulmuşlardır. Detaylı olarak, AKS' lu hastalarda Glu/Glu genotipine sahip kişilerin sıklıklarını %38.8 oranında saptarken Glu/Asp genotip sıklıklarını %44.6, Asp/Asp genotip sıklığını ise %16.5 oranında bildirmişlerdir. Çalışmamızda da Glu 298-Asp genotip sıklıkları Fatini ve ark. bildirdiği gibi AKS ve kontrol grupları arasında anlamlı çıkmakla beraber genotiplerin sıklıkları farklı idi. Şöyleki, çalışmamızda AKS' lu hastalarda Glu/Glu ve Glu/Asp genotiplerine sahip kişilerin sıklıkları Fatini ve arkadaşlarının çalışmasına kıyasla daha yüksek (sırasıyla %70.6 ve 23.5), Asp/Asp genotipine sahip kişilerin sıklığı (%5.9) ise daha düşük olarak bulunmuştur. Çalışmamızda

AKS'lu (%70.6) ve KKAH' larında (%76.9) eNOS geninin en çok rastlanan genotipi Glu 298-Asp olarak bulundu. AKS'lu kişilerde Asp/Asp genotip sıklığı (%5.9) ise KKAH gruba (%7.7) benzer şekilde düşük sıklıkta bulundu. Kontrol grubunda ise Glu/Asp (%51.1), ve Asp/Asp (%31.9) genotipleri, literatürde bildirilen diğer toplumlardaki sağlıklı bireylerin Glu/Asp ve Asp/Asp genotiplerine kıyasla oldukça yüksek sıklıkta saptandı. Çalışmamızda Glu 298-Asp genotip sıklıklarının AKS, KKAH ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiğini tespit ettik. Ancak eNOS Glu 298-Asp genotiplerinin sıklıkları AKS'lu hastalarda ve KKAH'lığı bulunan kişilerde incelendiğinde, AKS'lu ve KKAH gruplarda Glu/Asp ve Asp/Asp genotiplerinin sıklıklarını normal genotip olan Glu/Glu' ya kıyasla daha düşük yüzdelerde bulmamız Glu 298-Asp varyasyonunun hastalıkla ilişkili olmadığını düşündürdü.

Wang ve arkadaşları (15) Taiwan toplumunda yaptıkları çalışmada Glu/Glu, Glu/Asp ve Asp/Asp genotip sıklıklarını KAH'ları için sırasıyla %81.7, 17.4, 0.9; kontroller için %81.2, 17.4 ve 1.4 olarak bildirmişlerdir. Colombo ve ark. İtalyan erken dönem koroner arter hastaları ve kontrollerde Glu/Glu, Glu/Asp ve Asp/Asp genotip sıklıklarını sırasıyla 45.3, 38.8, 15.9 ve 42.1, 51.8, 6.1 olarak saptamışlardır (56).

Yoshimura ve ark. (64) 45 KAH ile yaptığı çalışmada Glu/Glu, Glu/Asp ve Asp/Asp genotip sıklıklarını %84.4, 11.1 ve 4.4 olarak bulmuştur. GENICA çalışmasında Rossi ve ark. (71) 1225 koroner arter hastasında Glu/Glu, Glu/Asp ve Asp/Asp genotip sıklıklarını sırası ile 43.3, 37 ve 19.7 olarak bildirmişlerdir. Colombo ve ark. (55) 268 koroner arter hastası ve 147 kontrol ile yaptıkları çalışmalarında Glu/Glu, Glu/Asp ve Asp/Asp genotip sıklıklarını hasta grubunda sırasıyla %40.7, 43.3, 16 ve kontrol grubunda 44.2, 49 ve 6.8 olarak bulmuştur. Türk toplumunda koroner arter hasta grubunda Glu 298-Asp polimorfizmini araştıran iki adet çalışma yayınlanmıştır (55). Afrasyap ve ark. (60), Glu 298-Asp genotip sıklıklarını koroner arter hasta grubu için, Glu/Glu %45.6, Glu/Asp %41.2 ve Asp/Asp %13.2 olarak; kontrol grubu için, Glu/Glu %49.3, Glu/Asp %41.3 ve Asp/Asp %9.3 olarak saptamışlardır. Sağlıklı Hintlilere ait eNOS geni Glu/Glu, Glu/Asp ve Asp/Asp genotip sıklıkları sırası ile %71.2, 28.06, 0.72 olarak saptanmış ve eNOS Glu 298-Asp polimorfizminin KAH'lığı için bir risk faktörü olmadığı saptanmıştır (72). Jaramillo ve ark. (73) ise KAH bulunan Şili'li bireylerde Asp/Asp genotip sıklığını %7, kontrol grubunda ise %1 oranında bulmuş ancak eNOS Glu 298-Asp polimorfizmini KAH

için bir risk faktörü olarak tespit etmemiştir. Bu çalışmadaki koroner arter hasta grubumuzda Asp/Asp genotip sıklığını literatürdeki çalışmaların sonuçlarına benzer şekilde düşük sıklıkta (%6.7) bulundu. Mutant (Asp/Asp) ve heterozigot (Glu/Asp) genotip sıklıklarının toplamını (%26.7) koroner arter hasta grubunda (AKS+KKAH) normal (Glu/Glu) genotip sıklığından (%73.3) daha düşük bulunması eNOS Glu 298-Asp polimorfizminin çalışma grubunda koroner arter hastalığı ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Ancak bu çalışma grubunda yer alan sağlıklı kontrollerin mutant (%31.9 Asp/Asp) ve heterozigot (%51.1 Glu/Asp) genotipleri diğer toplumlara göre yüksek bir oranda taşınması, Türk halkında Glu 298-Asp varyasyon sıklığının fazla olduğunu ancak koroner hastalıkla ilişkili olmadığını göstermektedir.

## 8. SONUÇ

Sonuç olarak, AKS' lu ve KKAH gruplarda Glu/Asp ve Asp/Asp genotiplerinin sıklıklarını Glu/Glu' ya kıyasla daha düşük yüzdelerde bulmamız eNOS geni Glu 298-Asp varyasyonunun hastalık oluşumunda rol almadığını düşündürmektedir. Ayrıca eNOS Glu 298-Asp polimorfizminin serum lipid düzeyleri üzerinde herhangi bir etkisine rastlanmamıştır. Çalışma eNOS geni Glu 298-Asp polimorfizminin nitrik oksit aracılı vasküler cevapları etkilemediğini göstermektedir. Hasta ve kontrol gruplarımızın kısıtlı sayıda kişiden oluşmasına rağmen, bu çalışma AKS ve KKAH hastalarında eNOS Glu 298-Asp 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 Süsleyici 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 ve hep yanımda olan dostluğunu her zaman hissettiğim arkadaşım Tıbbi Biyolog Süreyya Melil'e saygılarımla çok teşekkür ederim.

Beni destekleyen ve her zor durumda bana yardımcı olan eşim Yılmaz Çebi' ye, yoğun çalışmalarım sırasında bana anlayış gösteren, hayatımdaki herşeyi anlamlı kılan çocuklarım Naz Çebi ve Ahmet Çebi' ye çok teşekkür ederim.

## 10. KAYNAKLAR

1. Chesebro JH. Acute coronary syndromes: pathogenesis, acute diagnosis with risk stratification, and treatment. *Am Heart Hosp J.* 2004, 1: 21-30.
2. Braunwald E, Zipes D, Libbi P. Heart disease: A textbook of cardiovascular medicine. Ed-in chief: R.Zorab. 6<sup>th</sup> edition, WB.Saunders, 2001.
3. Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, Soukhomovskaia O, Cicchitelli G, Macri G, Ferrari R. et al. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Arc Bioche Biophys.* 2003, 255-256.
4. Auer J, Berent R, Maurer E, Mayr H, Weber T, Eber B. Acute coronary syndromes. *Herz.* 2001, 26: 99-110.
5. Choy JC, Ganville DJ, Hunt DW. Endothelial cell apoptosis; biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2001, 33:1673-1690.
6. Özcan R. Kalp Hastalıkları. İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları. 1983.
7. Haug C, Schmid Kotssas A, Zorn U, Schuett S, Gross HJ, Gruenert A, Bachem MG. Endothelin-1 synthesis and endothelin B receptor expression in human coronary artery smooth muscle cells and monocyte-derived macrophages is up-regulated by low density lipoproteins. *J Mol Cell Cardiol.* 2001, 33: 1701-1704.
8. Conti CR, Hill JA, Mayfield WR. Unstable angina pectoris: pathogenesis and management. *Curr Probl Cardiol.* 1998, 14: 549-624.
9. Ganong WF. Review of medical physiology, McGraw-Hill, 2001.
10. Lüscher T. F, Noll G, Is it all in genes? Nitric oxide synthase and coronary vasospasm. *Circulation.* 1999, 99: 2855-2857.
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. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988, 333:664-666.
14. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation.* 1998, 30: 2494-2498.

15. 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.
16. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Shappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993, 268; 17473-17488.
17. Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. *Am J Physiol.* 1994, 267: 1405-1413.
18. Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, Groot PG, Sixma JJ. *Circulation* 1992, 85: 2284-2290.
19. 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.
20. Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JA, Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzalez I, Alvarez V, Coto E. Association between the NOS3 (2786 T/C) and the ACE(I/D) DNA Genotypes and Early Coronary Artery Disease. *J Biol Chem.* 2001, 5: 343-348.
21. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991, 43:109–42.
22. Vidal MJ, Romero JC, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor inhibits renin release. *Eur J Pharmacol.* 1998, 14: 401–402.
23. Nadaud, S, Bonnardeaux A, Lathrop G M and Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem. Biophys Res Commun.* 1994, 198: 1027–1033.
24. 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. *AJH* 1998, 11: 125–128.
25. Powell JT and Higman DJ. Smoking, nitric oxide and the endothelium. *Br J Surg.* 1994, 81: 785–787.



26. 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: 1319-26.
27. Ramzy D, Rao V, Tumiati LC, Xu N, Miriuka S, Delgado DH, Ross HJ. Role of endothelin and nitric oxide bioavailability in transplant-related vascular injury: comparative effects of rapamycin and cyclosporin. *Circulation*. 2006, 114: 1214-9
28. Barrett CJ, Schultz HD. Sympathoinhibitory effects of atrial natriuretic peptide in rats with heart failure. *J Card Fail*. 1999, 5: 316.
29. McNamara D, Holubkov R, Postava L, Ramani R, Janosko K, Mathier M, MacGowan G.A, Murali S, Feldman A.M, 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.
30. Khan SD, Khan T, Zeballos GA, Mathew L, Potharlanka 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.
31. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*. 1998, 32: 3-8.
32. Auer J, Berent R, Maurer E, Mayr H, Weber T, Eber B. Acute coronary syndromes. *Herz*. 2001, 26: 99-110.
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: 1190-201.
35. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. *Circulation* 1994, 90: 775-778.
36. Ambrose JA, in Fuster V (Ed.), *Syndromes of atherosclerosis: Correlations of clinical imaging and pathology*, Futura publishing Company Inc, Armonk, NY, 1996, 105-122.

37. Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, Soukhomovskaia O, Cicchitelli G, Macri G, Ferrari R, Mastrorilli F, Paolini M, Francollini G, Canistro D. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Arc Biochem Biophys*. 2003, 255-261.
38. Biasucci LM, Santamaria M, Liuzzo G. Inflammation, atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Minerva Cardiol*. 2002, 50: 475-486.
39. Facila L, Bertomeu-Gonzalez V, Sanchis J, Bodi V, Nunez J, Llacar 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.
40. Fendon D, Acute coronary syndrome (ACS) refers to the active process of a blockage in the coronary artery that may result in a heart attack. *Acad Emerg Med*. 2004, 11: 1237-1244.
41. 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.
42. Silver MT, Rose GA, Paul SD, O'Donnell CJ, O'Gara PT, Eagle KA. A clinical rule to predict preserved left ventricular ejection fraction in patients after myocardial infarction. *Ann Intern Med*. 1994, 121: 750-756.
43. Brunelli C, Cristofani RL, Abbate A. The OD1 Study Group: Long-term survival in medically treated patients with ischemic heart disease and prognostic importance of clinical and electrocardiographic data. (The Italian CNR Multicenter Study OD1). *Eur Heart J* 1989, 10: 292-303.
44. Lüscher TF, Noll G. It is all in the genes ? Nitric oxide synthase and coronary vasospasm. *Circulation* 1999, 99: 2855-2857.
45. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Kazuwa 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.
46. Yasue H. Pathophysiology and treatment of coronary arterial spasm. *Chest*. 1980, 78: 216-223.
47. Furchgott RF. Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. *Circ Res*. 1983, 53: 557-573.

48. Albrechts B, Bray D, Lewis J. *Molecular biology of the Cell*. 3. Ed, 1994.
49. Lewin B. *Genes VII*. Oxford University Press, 2000.
50. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998, 16: 1215.
51. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour, New York 1982.
52. Yoshimura M, Yause H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298 Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 1998, 103: 65-69.
53. Shimasaki Y, Yasueh, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y. Association of the missense Glu298 Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1998, 31: 1506-1510.
54. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemure S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*. 1998, 32: 521-6.
55. Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masseti S, Biagini A, Clerico A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and risk of coronary artery disease. *Clin Chem*. 2003, 49: 389-395.
56. Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masseti S, Rossi G, Clerico A, Biagini A. Evidence for association of common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart*. 2002, 87: 525-528.
57. Benjafield AV, Morris BJ. Association analyses of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2000 Sep, 13: 994-998.
58. Pereira AC, Sposito AC, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Mill JG, Krieger JE. Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipid in the arterial blood pressure. *Atherosclerosis*. 2006 Jan,

184: 193-200

59. Berdeli A, Sekuri C, Sirri Cam F, Ercan E, Sagcan A, Tengiz I. Association between the eNOS (Glu298 Asp) polymorphism and premature coronary artery disease in a Turkish population. *Clin Chim Acta*. 2005, 351: 87-94.
60. Afrasyap L, Ozturk G. NO level and endothelial NO synthase gene polymorphism (Glu298 Asp) in the patient with coronary artery disease from the Turkish population. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2004, 36: 661-666.
61. Yhon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphism in coronary artery disease. *Clin Chem* 2000, 46: 1626-1630.
62. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M. Endotelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*. 1998, 32: 521-526.
63. Cai H, Wilcken DE, Wang XL. The Glu298 Asp(894G-T) mutation at exon 7 of the endotelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J Mol Med*. 1999, 77: 511-514.
64. Yashimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298Asp variant in the endotelial nitric oxide syntase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet*. 1998, 103: 65-69.
65. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydok SA. 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.
66. Jeerooburkan N, Jones LJ, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Vallace P, Humperies SE. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension*. 2001, 38: 1054-1061.
67. Poirier O, Mao C, Mallet C, Nicaud V, Herrmann SM, Evans A, Ruidavets JB. Polymorphism of the endotelial nitric oxide synthase gene-no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest*. 1999, 29: 284-290.
68. Nassar BA, Bevin LD, Johnstone DE, O'neil BJ, Bata IR, Kirkland SA, Title LM. Relationship of the Glu 298 Asp polymorphism of the endotelial nitric oxide synthase

- gene and early-onset coronary artery disease. *Am Heart J.* 2001, 142: 586-589.
69. Gardeman A, Lohre J, Cayci S, Katz N, Tillmans H, Haberbosch W. The T allele of the missense Glu 298 Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with coronary heart disease in younger individuals with high atherosclerotic risk profile. *Atherosclerosis.* 2002, 160: 167-175.
70. Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S, Lapini I, Rostagno C, Come M, Bro 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.
71. Rossi GP, Cesari M MD, Zanchetta M, Colonna SMD, Maiolino G, Pedon LMD, Cavallin M, Maiolino P, Pessina AC. Polymorphisms and Cardiovascular Disease 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.
72. Srivastava K, Biswas UK, Narang R, Varghese JJ, Das N. Prevalence of eNOS Glu 298 -Asp polymorphism in healthy volunteers from region or Northern India. *Community Genet.* 2005, 8:180-183.
73. Jaramillo PC, Mumoz MA, Lanaz MC, Lanaz ZF, Salazar LA. Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism in Chilean subjects with coronary artery disease and controls. *Clin Chem Acta.* 2006, 371: 102-106.