

T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KALP YETMEZLİĞİNDE ENDOTEL NİTRİK  
OKSİT SENTAZ 3 (NOS3) GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Esmâ ALTUN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ**

**ŞANLIURFA**

**2019**

T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KALP YETMEZLİĞİNDE ENDOTEL NİTRİK  
OKSİT SINTAZ 3 (NOS3) GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Esmâ ALTUN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ**

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (HÜBAP) tarafından 18267 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ŞANLIURFA**

**2019**

**T. C.**  
**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**

**JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI**

Esma ALTUN'nun hazırladığı "Kalp Yetmezliğinde Endotel Nitrik Oksit Sentetaz (NOS3) Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması" başlıklı çalışması 24/06/2019 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**BAŞKAN**

**Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ**

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

  
**ÜYE**

**Prof. Dr. Recep DEMİRBAĞ**  
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kardiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

**ÜYE**

  
**Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI**  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27.10.2019 tarih ve 2019/11/07..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ**  
**Enstitü Müdürü**



## TEŞEKKÜR

Akademik eğitimim süresi boyunca ve tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım başta Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Danışman hocam Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ'e ve Anabilim Dalımız Öğretim Üyesi Doç. Dr. Halit AKBAŞ'a,

Tezime ait çalışma grubu örneklerinin toplanması ve tezimin klinik sürecinde rol alan Kardiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Recep DEMİRBAĞ, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Beğenç TAŞCANOV, Dr. Halil FEDAI ve Dr. Mustafa ÇETİN'e, kan toplamama yardımcı olan Kardiyoloji Anabilim Dalının diğer personeline,

Çalışmam sırasında motivasyon desteğini sağlayan arkadaşlarım Tuba ARSLAN, Şehriban ÜNALAN, Bahar KARTAL, Esmâ KAPLANER, Zeynep HAYIRLI, Gizem YÜCEGÖNÜL ve yakınlarım Fehime KUYUMCU, Zeliha GENİŞ, Halime ERMEYDAN ve Elif TÖRK'e,

Bu çalışmam sırasında fikirleri ve her türlü destekleri ile katkıda bulunan Derya AKÇIÇEK, Nüket KARAÇİZMELİ ÇALIŞKAN, Özlem MORÇAL, Yeşim KORAY ve Semra UĞUR'a,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışmam sırasında da beni sürekli olarak manevi açıdan destekleyen, yoğun çalışmalarım sırasında bana sabır gösterdiği ve bana katlandığı için anneme, babama ve kardeşlerim Kübra, Merva Safa, Zeynep ve Beyza'ya, farklı şekilde emeği geçen ve destek olan arkadaşlarıma, yakınlarıma teşekkür ederim.

**Esmâ ALTUN**

<b>İÇİNDEKİLER</b>	
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>i</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>iv</b>
<b>KISALTMALAR VE SİMGELER</b> .....	<b>v</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. KARDIOVASKÜLER SİSTEM ANATOMISI .....	3
2.2. KALP YETMEZLİĞİ (KY).....	4
2.2.1. EPİDEMİYOLOJİ.....	5
2.2.2. RISK FAKTÖRLERİ.....	6
2.2.3. KALP YETMEZLİĞİNİN KLİNİK BULGULARI .....	6
2.2.4. KALP YETMEZLİĞİNİN SINIFLANDIRILMASI .....	7
2.2.5. EJEKSİYON FRAKSİYONU (EF) .....	7
2.2.6. FİZYOPATOLOJİ.....	8
2.2.7. ETİYOLOJİ.....	8
2.2.8. KALP YETMEZLİĞİNDE GENETİĞİN ROLÜ.....	9
2.3. ENDOTEL HÜCRELER .....	9
2.3.1. NİTRİK OKSİT SENTAZLARIN (NOS) ÇEŞİTLERİ .....	11
2.3.2. ENDOTEL NİTRİK OKSİT SENTAZ 3 (NOS3) VE GÖREVLERİ .....	12
2.3.3. NİTRİK OKSİT (NO) VE SENTEZİ.....	15
2.3.4. NO FONKSİYONLARI.....	16
2.3.5. ENDOTEL HÜCRE BOZUKLUKLARI.....	17
2.3.6. NOS3 POLİMORFİZMLERİ VE KALP YETMEZLİĞİ İLE İLGİLİ ROLÜ .....	18
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>20</b>
3.1. ARAÇ VE GEREÇLER.....	20
3.2. MOLEKÜLER VE KİMYASAL MALZEMELER .....	20
3.3. DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN TAMPONLAR.....	21
3.4. HASTA VE KONTROL GRUBU BİREYLERİ .....	22
3.5. DNA ANALİZİ.....	23
3.6. PCR-RFLP (POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU - RESTRIKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ) TEKNİĞİ.....	24
3.7. İSTATİKSEL ANALİZ .....	29
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>30</b>
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>33</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b> .....	<b>38</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	<b>39</b>
<b>8. EKLER</b> .....	<b>48</b>
EK-1: ETİK KURUL KARARI.....	
EK-2: TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ.....	
EK-3: TURNİTİN RAPORU 1 .....	
EK-4: TURNİTİN RAPORU 2.....	
EK-5: TEZ VERİ GİRİŞ FORMU.....	

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 2.1:** Kardiyovasküler sistemin genel yapısı

**Şekil 2.2:** Vasküler sistem içinde endotel hücrelerinin yerleşimi

**Şekil 2.3:** Kan damarlarında endotel hücre tabakasının yerleşimi

**Şekil 2.4:** İnsan 7. Kromozomu ve *NOS3* geninin yerleşimi

**Şekil 2.5:** İnsan 7. Kromozomu ve *NOS3* geninin diğer genlere yakınlığı

**Şekil 2.6:** *NOS3* geni korunan alanları

**Şekil 2.7:** Endotel hücresinde NO'nun sentezi ve düz kas hücresinde gevşeme

**Şekil 2.8:** *NOS3* genin ilişkili olduğu varsayılan hastalıklar

**Şekil 3.1:** *NOS3* geni c.-51-762C>T gradient PCR profili

**Şekil 3.2:** *NOS3* c.-51-762C>T noktasının *MspI* restriksiyon profili

**Şekil 3.3:** *NOS3* geni c.894T>G gradient PCR profili

**Şekil 3.4:** *NOS3* geni c.894T>G noktasının *BanII* restriksiyon profili

## TABLolar DİZİNİ

**Tablo 3.1:** Çalışmada kullanılan primer dizileri

**Tablo 4.1:** Hasta ve kontrol grubu bireylerinin demografik ve klinik veri dağılımı

**Tablo 4.2:** Hasta ve kontrol gruplarında *NOS3*: c.-51-762C>T ve *NOS3*: c.894T>G polimorfizm oranlarının dağılımı.

**Tablo 4.3:** Kalp yetmezliği hastalarında *NOS3* geni normal ve polimorfik genotipler arasında demografik ve klinik parametrelerin değerleri



## KISALTMALAR ve SİMGELER

<b>Asp</b>	Aspartat
<b>bNOS</b>	Bakteriyel nitrik oksit sentaz
<b>Ca<sup>++</sup></b>	Kalsiyum
<b>cGMP</b>	Siklik guanozin mono fosfat
<b>DAG</b>	Diasil gliserol
<b>EF</b>	Ejeksiyon Fraksiyonu
<b>FAD</b>	Flavin adenin dinükleotid
<b>FADH<sub>2</sub></b>	İndirgenmiş flavin adenin dinükleotid
<b>FMN</b>	Flavin mononükleotid
<b>FNR</b>	Ferredoksin redüktaz
<b>eNOS</b>	Endotel nitrik oksit sentaz
<b>Glu</b>	Glutamat
<b>GTP</b>	Guanozin trifosfat
<b>Hb</b>	Hemoglobin
<b>HDL</b>	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
<b>HFmrEF</b>	Orta derecede jeksiyon fraksiyonu ile kalp yetmezliği
<b>HFpEF</b>	Korunmuş ejeksiyon fraksiyonu ile kalp yetmezliği
<b>HFrEF</b>	Azaltılmış ejeksiyon fraksiyonu ile kalp yetmezliği
<b>IP3</b>	Fosfoinositol 1,4,5-trifosfat
<b>KY</b>	Kalp Yetmezliği
<b>LDL</b>	Düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>LVEF</b>	Sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonu
<b>MRG</b>	Manyetik rezonans görüntüleme
<b>NAD</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NADH</b>	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NADP</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NADPH</b>	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>nNOS</b>	Nöronal nitrik oksit sentaz
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>NOS1</b>	Nitrik oksit sentaz 1
<b>NOS2</b>	Nitrik oksit sentaz 2
<b>NOS3</b>	Nitrik oksit sentaz 3
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
<b>RVEF</b>	Sağ ventriküler ejeksiyon fraksiyonu
<b>VKİ</b>	Vücut kitle indeksi



## ÖZET

### KALP YETMEZLİĞİNDE ENDOTEL NİTRİK OKSİT SENTAZ 3 (*NOS3*) GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esmâ ALTUN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Kalp Yetmezliği (KY), kalbin dokulara metabolik ihtiyaçlarına uygun miktarda kanı pompalayamaması veya bu miktar kanı ancak yüksek dolum basıncı altında pompalayabilmesi olarak tanımlanmaktadır. Nitrik oksit sentaz 3 (*NOS3*) geni polimorfik alanlarının kalp yetmezliği üzerine olan ilişkileri araştırılmış, ancak tüm çalışmaların aynı sonuçları vermediği görülmüştür. Bu çalışmada, *NOS3* geni polimorfizmlerinin genotip ve allel oranlarının kalp yetmezliğine etki edip etmediği, heterozigot ve polimorf homozigot genotiplerin hastaların klinik ve demografik verileriyle ilişkili olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

KY teşhisi konan 100 hasta ve 81 sağlıklı kontrol bireyden EDTA'lı kan alındı. Alınan bireylerin kanlarından tuzla çöktürme yöntemi ile DNA izole edildi ve PCR işlemine kadar -20°C'de tutuldu. *NOS3* geni NM\_000603.5:c.-51-762C>T ve c.894T>G polimorfik noktalarının genotip ve allel frekansları polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) tekniği ile analiz edildi.

Yapılan çalışma sonuçlarına göre *NOS3* geni c.-51-762 TT genotipi ve T alleli ve c.894 GG genotipi ve G alleli oranları KY hastaları ile kontrol grubu hastaları arasında istatistiki olarak herhangi bir fark görülmedi ( $p>0.05$ ).

Sonuç olarak *NOS3* geninin her iki polimorfik alanının KY gelişiminde bir risk oluşturamayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *NOS3*, Kalp Yetmezliği, PCR, RFLP, Polimorfizm

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE 3 (*NOS3*) GENE POLYMORPHISMS IN HEART FAILURE

Esma ALTUN

Medical Biology Department, Master's Thesis

Heart Failure (HF) is defined as the fact that the heart cannot pump blood to the tissues in accordance with its metabolic needs, or that this amount of blood can only be pumped under high filling pressure. The relationship between nitric oxide synthase 3 (*NOS3*) gene polymorphic areas and heart failure was investigated, but all studies did not show the same results. It is aimed that whether genotype and allele ratios of *NOS3* gene polymorphisms affect heart failure, heterozygous and polymorphous homozygous genotypes should be clinically and demographically targeted.

EDTA blood was collected from 100 patients diagnosed with HF and 81 from healthy controls. The DNA was isolated from the blood of the subjects by salt precipitation and kept at -20°C until PCR. The genotype and allele frequencies of the *NOS3* gene NM\_000603.5: c.-51-762C>T and c.894T>G polymorphic points were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique.

According to the results of the study, *NOS3* gene c.-51-762 TT genotype and T allele and c.894 GG genotype and G allele ratios were not statistically different between patients with HF and control group ( $p>0.05$ ).

As a result, both polymorphic areas of the *NOS3* gene were not found to pose a risk for development of HF.

**Key words:** *NOS3*, Heart Failure, PCR, RFLP, Polymorphism

## 1. GİRİŞ

Kalp Yetmezliği (KY), kalbin vücudun metabolik ihtiyaçlarına uygun miktarda kanı pompalayamaması veya bu miktar kanı yüksek dolum basıncı altında pompalayabilmesi olarak tanımlanabilir (1, 2). KY'nin toplumdaki genel sıklığı %0,3-2 arasında iken Türkiye'de %2,9 ve yaygınlığı nedeniyle önemli derecede morbiditeye sebep olan bir sendromdur (3, 4). KY ve KY'nin gelişmesine yol açan risk faktörlerinin birçoğu son 30 yılda önemli ölçüde değerlendirmekle birlikte, morbidite ve mortalite yükselmektedir. 1996'dan 2050'ye kadar hastaneye yatışlarda 3 kat artış olacağı öngörülmektedir (5).

Nitrik oksit (NO), damarın endotel tabakasının vasodilatörü olduğu, Mısır'da kardiyovasküler hastalarda nitrik oksit sentaz 3 (*NOS3*) geni 7. eksonu üzerinde bulunan c.894T>G polimorfizmleri çalışılmış ve bunların hastalık üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (6). Tayvan'da aynı hastalık üzerinde yapılan bir çalışmada *NOS3*'ün bu polimorfik alanının hastalıkla ilişkili olduğu bulunmuştur (7). Sudan'da essential hipertansif hastalarında *NOS3* geni c.-51-762C>T polimorfizmlerinin etkili olduğu bulunmuştur (8). İran'da multiple skleroz hastalarında *NOS3*: c.-51-762C>T ve c.894T>G polimorfizmlerinin hastalık üzerinde etkili olduğu görülmüştür (9). Türkiye'de ölüm nedenlerinin başında gelen ve genetik ile çevresel etkenlerin etkisiyle oluşan koroner kalp hastalığında *NOS3* geni c.894T>G polimorfizmi çalışılmış ve genin bu polimorfizminin hastalık seyrinde etkili olmadığı, ancak vücut kitle indeksinin (VKİ) etkili olduğu bulunmuştur (10). Tunus'ta diyabet üzerinde yapılan bir çalışmada c.894T>G polimorfizminin bu hastalık üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (11). *NOS3* geninin kodladığı endotelial nitrik oksit sentaz (NOS), vaskulatör olarak NO'nun sentezinden sorumlu olduğu bulunmuştur (12). İran'da idiopatik infertil erkeklerde *NOS3* polimorfizmlerinin azospermi üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (13). Türkiye'de intrakranial kanaması olan hastalarda, homozigot c.-51-762 TT genotipinin risk sebebi olarak görülmüştür. Ancak bu konuda ortak kabul edilebilir bir sonuca ulaşmak için farklı toplumlardan deneklerin dahil edildiği çok merkezli çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (14).

Endotelyum, dolaşım sisteminin içini döşeyen endotel hücrelerinden oluşan tek katlı tabakadır. Endotel fonksiyonun bozulması ile vasküler hastalıklar ortaya çıkar (15). Kan damarlarının içini döşeyen tek katlı endotelyum; vasküler tonüs, yapı ve fonksiyonu

düzenleyerek kardiyovasküler homeostazisin sağlanmasında kritik bir role sahiptir. Bu rolü bazı maddeler salgılayarak sağlar (16). Bu maddelerden birisi olan lipofilik nitrik oksit (NO); nöronal (NOS1), inducible (NOS2) ve endotel (NOS3) sentaz olarak isimlendirilen üç farklı sentaz tarafından L-arginin amino asidinden sentezlenir (17). *NOS3*, damarlarda rol oynayan NO sentezler ve kardiyovasküler sistemde rol oynar. Bunun inhibisyonu ile hipertansiyon ve kardiyovasküler sorunlara yol açar (18).

Kardiyovasküler sistemde NO'nun rolleri araştırılmış ve bunun küçük bir gaz ve lipofilik bir molekül olduğu, kardiyovasküler homeostazisinin düzenlenmesinde kritik bir role sahip olduğu belirlenmiştir (19). NO'nun en önemli görevi, vasküler tonuyu kontrol etmek ve düz kas hücrelerinde demir içeren heterodimerik çözünebilir guanil siklazı aktive etmeye aracılık eder (20). Aktive guanil siklaz guanosin trifosfatı (GTP) siklik guanozin monofosfata (cGMP) çevirir, bu da protein kinaz G'yi aktive ederek, hücresel protein hedeflerinin çoklu fosforilasyonunu sağlar. Bunun neticesinde hücre içi serbest  $Ca^{++}$  konsantrasyonu düşer ve vasküler gevşemeyi sağlar (21). 1,4,5 inositoltrifosfat'ın hedefi endotel hücrelerde endoplazmik retikulum zarında bulunan  $Ca^{++}$  kanalları ve vasküler düz kaslarda  $Ca^{++}$  ile aktive edilen  $K^{+}$  kanallarıdır (22).

Bilinen *NOS3* polimorfizmleri arasında en çok incelenen ve işlevsel olarak kabul edilen varyantlar c.-51-762C>T (rs2070744) ve c.894T>G (rs1799983)'dir (13, 14, 19). *NOS3* geni, 7. kromozomun uzun kolu (7q36.1) üzerinde 27 ekson ve 26 introndan oluşmaktadır. 1203 aminoasidinden oluşan nitrik oksit sentaz'ı (NOS) kodlayan gen 1993'te klonlanmıştır. Bu genin üzerinde çok sayıda genetik varyant (tek nükleotid değişimi) içermesiyle yüksek derecede polimorfiktir (23-25). KY'nin oluşumunda rol alan *NOS3* geni, endotel hücrelerde NOS'u ifade eder. NOS, arjinin aminoasidi üzerinden NO sentez eder ve bu molekül ikincil mesajcı olarak düz kas hücrelerinde guanil siklazı aktive eder. Guanil siklaz, cGMP'yi üretir. cGMP, düz kasın gevşemesinde, trombosit agregasyonunu önlemede ve bir anti-enflamatuar ajan olarak rol alır. İlgili gende oluşan polimorfizmler, genin ürettiği enzimin biyolojik aktivitesinin düşmesine, bozuk nitrik oksit salınımına, içinde kalp yetmezliğinin de bulunduğu farklı hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır (20). *NOS3*'ün KY hastalığı üzerine etkileri ile ilgili farklı sonuçlar alınmıştır.

Bu çalışmanın amacı, *NOS3* geni polimorfizmik noktalarının genotip ve allel oranlarının KY'nin meydana gelmesinde risk oluşturup oluşturmadığını tespit etmektir.

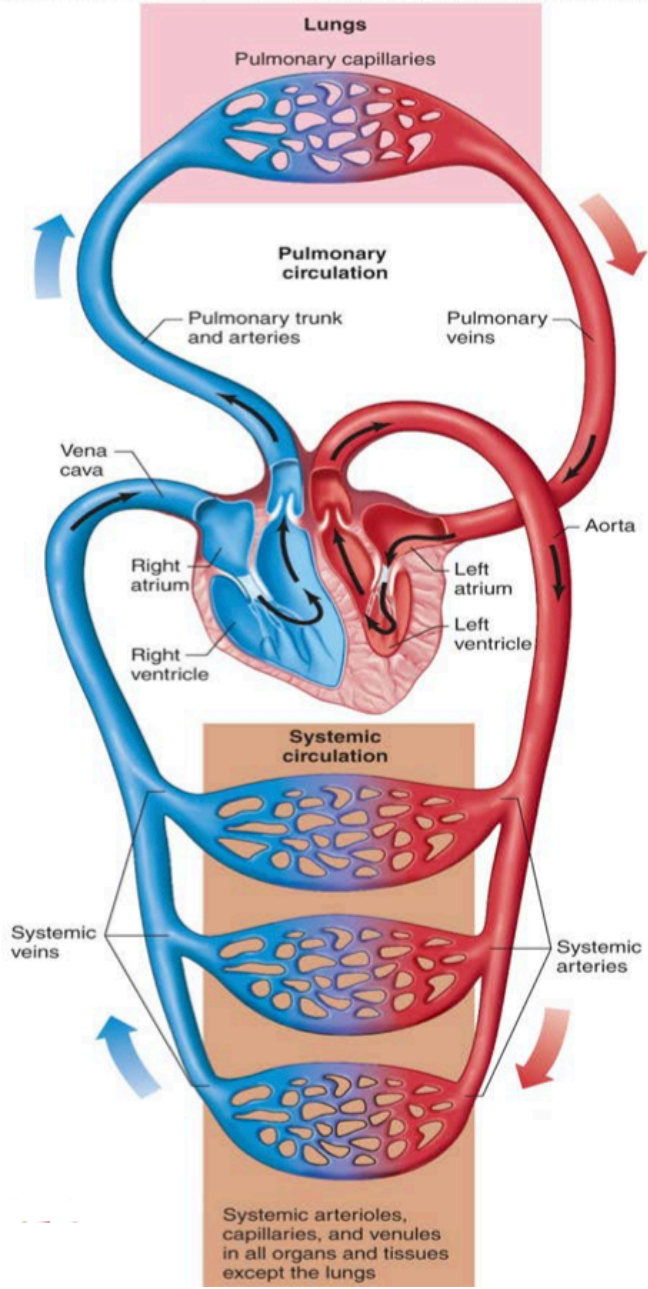
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kardiovasküler Sistem Anatomisi

Kalp, içte endokardiyum, ortada kalın miyokard ve dışta epikard olmak üzere üç katmandan oluşur. Fizyolojik bir pompa işlevi görür. Kaslı Miyokard her kasılma ile kanı hareket ettirmek için gereken kuvveti oluşturur. Endokardiyum, non-trombojenik bir yüzeyi sağlayan endotel hücreleri ile kaplanmıştır. Epikardiyum, kalp ve seröz viseral perikard arasında ek bir yağ ve bağ dokusu tabakası görevi görür.

Dört odacıklı kalp iki atriyum (kulakçık) ve iki ventrikül (karıncık) içerir. Sağ atriyum, inferior vena kava ve superior vena kava yoluyla vücuttan deoksijenlenmiş kanı alır ve oksijenle yüklemek üzere akciğerlere pompalayarak sağ ventriküle iletir. Kan, akciğerde oksijenlendikten sonra pulmoner ven yoluyla kalbin sol kulakçığına getirilir ve oradan sol karıncığına verilir. Sol karıncık kasılarak vücudun metabolik ihtiyaçlarını karşılamak üzere aort üzerinden kanı vücuda pompalar. Kalbin uyarı üretmesi superior vena kavanın sağ atriyuma keşiştiği yerde yer alan sinüs düğümü aracılığı ile sağlanır.

Kalp boyunca tek yönlü akış, sağ kulakçık ile karıncık arasındaki triküspit kapak, sol kulakçık ile ventrikül arasındaki mitral kapak ve sağ ve sol karıncık çıkış yollarında bulunan pulmoner ve aort kapakçıkları tarafından sağlanır. Brüt olarak, semilunar pulmoner ve aort kalp kapakçıkları, ventriküler sistolün ileri kan akışına maruz kaldığında kolayca açılan ve daha sonra diyastolün minimum ters akışı ile hızla kapanan üç ince uçtan oluşur (26). Diyastol sırasında kulakçıklara uygulanan kuvvete rağmen, lunula olarak adlandırılan zirvenin hilal şeklindeki bir bölgesinde, zirvelerin büyük miktarda toplanması ile sarkma önlenir (Şekil 1) (27, 28).



Şekil 2.1. Kardiyovaküler sistemin genel yapısı (28).

## 2.2. Kalp Yetmezliği (KY)

KY, kalbin yapısı veya fonksiyonunun bozulduğu ve dispne, yorgunluk ve sıvı retansiyon gibi kalp yetmezliğinin semptom ve bulgularının görüldüğü, beklenen yaşam süresinin kısalması ile karakterize olan klinik bir sendrom olarak tanımlanabilir (2).

### 2.2.1. Epidemiyoloji

KY'nin toplumdaki genel sıklığı %0,3-2 arasında iken Türkiye'de %2.9 ve yaygınlığı nedeniyle önemli derecede morbiditeye sebep olan bir sendromdur (3, 4). KY ve KY'nin gelişmesine yol açan risk faktörlerinin birçoğu son 30 yılda önemli ölçüde değerlendirmekle birlikte, morbidite ve mortalite yükselmektedir. 1996'dan 2050'ye kadar hastanede yatışlarda 3 kat artış olabileceği düşünülmektedir (5).

KY hem erkek hem de kadınlarda hastaneye başvuruda en sık karşılaşılan hastalıktır. Hem KY insidansı ve hem de KY prevalansı, koroner arter hastalığı gibi risk faktörleriyle yapılan mücadele sonucu hastaların sağ kalımının iyileştirilmesi nedeniyle artmaktadır. Erkeklerin her yaşta KY insidansı kadınlara nazaran biraz daha yüksektir, ancak kadınlar yaşlı nüfusun daha büyük bir bölümünü temsil ettiğinden, KY ile yaşayan insanların yarısından fazlası (%51) kadındır. Kadınlar, yaşamları boyunca KY gelişme riskinin %20'sine sahiptir. Genel olarak, erkekler kalp yetmezliğinden daha büyük bir ölüm oranına sahiptir. Yine de Amerika Birleşik Devletleri'ndeki tüm KY ölümlerinin %63'ü kadındır (29). Framingham çalışmasında, tanı konduktan sonra kadınların 3,2 yıl ve erkeklerin 1,7 yıl sağ kaldıkları gözlenmiştir. KY'nde ölüm riski birçok kanser çeşidinden daha yüksektir. Framingham izlem çalışmalarında 5 yıllık mortalite erkeklerde %62, kadınlarda %42 olarak bulunmuştur (30).

KY, birçok hastalığın birikiminin son evresini oluşturur. Amerikan kalp birliği (American Heart Association) verilerine göre Amerika'da 5.2 milyon KY olan hasta bulunmakta ve bunlara her yıl 600.000 yeni olgu katılmakta, yılda KY nedeniyle bir milyondan fazla hastaneye yatış söz konusu olmaktadır (31).

Ulusal kalp sağlığı politikası verilerine göre ülkemizde KY prevalansı ve insidansı ile ilgili yeterli veri olmamakla birlikte, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere ait verilere dayanarak ülkemize ait yaklaşık rakamlar oluşturulabilmektedir. KY insidansı özellikle nüfusun yaşlanmasına bağlı olarak tüm dünyada artmaktadır. Genel KY insidansı yılda binde 1-5 arasındadır ve ilerleyen yaşla beraber belirgin şekilde artmaktadır. Bundan dolayı ülkemizde her yıl 70.000-350.000 yeni klinik KY olgusunun ortaya çıktığı söylenilebilir. Ortalama KY prevalansı binde 3-20 arasındadır. Bu rakamlardan hareketle kalp yetmezliği epidemisinin bir milyon vatandaşımızı etkilediği düşünülebilir (3).

### 2.2.2. Risk Faktörleri

Kalp yetmezliğinde en yaygın risk faktörleri hem kadınlarda hem erkeklerde koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve kalp kapak hastalıklarıdır. Diyabet, obezite, nikotin kullanımı ve yaş diğer yaygın risk faktörleridir. Bununla birlikte, risk faktörlerinin göreceli rolleri cinsiyete göre değişmektedir. Hipertansiyon, diyabet, tütün kullanımı ve sol ventrikül hipertrofisi, kadınlarda erkeklerden daha güçlü risk faktörleridir ve fiziksel hareketsizlik kadınlarda değil, erkeklerde risk faktörüdür. KY olan kadınların ve erkeklerin %91'inde hipertansiyon vardır ve 55 yaşından sonra kadınların KY erkeklerden daha fazladır. Miyokard enfarktüsünden sonra, genel ejeksiyon fraksiyonu korunsa bile kadınların KY geliştirmesi daha olası görülmektedir.

Korunan sistolik fonksiyon, KY nedeniyle hastaneye yatırılan hastaların %40-60'ında mevcuttur. Framingham Çalışmasında kadınlar, diyastolik kalp yetmezliği olan hastaların %65'ini, ancak sistolik kalp yetmezliği olanların sadece %25'ini temsil etmektedir. Sol ventrikül sistolik fonksiyon bozukluğu olan hastalarda yapılan ve bu nedenle optimal tedavi sonuçları popülasyonda tam olarak değerlendirilmemiştir. Diyastolik kalp yetmezliği prevalansı yaşla birlikte artar ve diyastolik kalp yetmezliği hastalığında sistolik kalp yetmezliğinden daha düşüktür ve yıllık mortalite diyastolik kalp yetmezliği; %8-9, sistolik kalp yetmezliği; %15-19 olarak hesaplanmıştır (29).

### 2.2.3. Kalp Yetmezliğinin Klinik Bulguları

KY'nin klinik belirtilerinin değişkendir ve altta yatan temel nedenlerin patolojik ve fizyolojik durumlara dayandığı düşünülmektedir. Kalp damarlarında iskemi, kalp kasında gerçekleşen enfeksiyonlar (miyokardit) ve aniden gerçekleşen kalp kapakçığı yetmezliği (valvüler yetersizlik) gibi durumlar birden gelişen akut KY'ne neden olabilir. Kalp kasının ilk kasılmasından sonra kanın kalpten çıkışı birçok fizyolojik hareketler ile gerçekleşir. Renin-angiotensin sistem, natriüretik peptid sistem ve sinirsel tonda gerçekleşen bozukluklar zamanla inflamasyona yol açabilecek oksidatif strese neden olurlar (32). RAS, hipertansiyon ve ateroskleroz gelişimindeki rolüyle konjestif KY ve miyokard enfarktüsüne neden olabilir (33).

Uzun soluklu hormonlarda ve hücre yüzey reseptörlerinde gerçekleşen farklılıklar, solunum sırasında vücutta kas zayıflığına ve kas fonksiyonunun bozukluğuna



bu da zayıf egzersiz kapasitesi, yorgunluk, halsizlik, anormal nefes darlığına sebep olur (32). Sıklıkla görülen KY semptomları kan içeriğinin değişmesi sonucu tıkanıklık oluşumuna neden olabilir. KY'nin nedenleri, farklı bir veya birden fazla hastalığın etkileri göz önünde tutularak değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (34).

#### **2.2.4. Kalp Yetmezliğinin Sınıflandırılması**

Kalp yetmezliği sendromlarının sınıflandırılmasında değişik kriterler kullanılmaktadır. Başlıca klinik bulgular; nefes darlığı, yorgunluk, ödem ve ortopno hastanın yatar durumunda solunum yetmezliği, ama oturur durumunda rahatlaması durumu ile yüksek toplar damar basıncı, akciğer yetersizliği ve anormal kalp fonksiyonu sayılabilir (35).

#### **2.2.5. Ejeksiyon Fraksiyonu (EF)**

Kalp yetersizliği ile ilgili birçok patofizyoloji, ekokardiyografi ile ölçülen ejeksiyon fraksiyonu (EF) ile tespit edilmiştir. EF'ü ventriküllerden sistolde atılan kan miktarını ifade eder. Sağ ve sol olarak kategorize edilen ejeksiyon fraksiyonu; KY'de genel olarak sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun (Left ventricular ejection fraction-LVEF) ölçümü olarak kabul edilmektedir (35). Sol ventrikül, kalbin ana pompalama yeridir. EF değeri, yüzde olarak ifade edilir. Normalin altında olan bir EF değeri KY'nin bir ölçüsüdür. Sağ ventrikül EF'i (Right ventricular ejection fraction-RVEF), kalbin sağ tarafından akciğerlere ne kadar pompalandığını gösterir. EF, sol ventrikül ya da sağ ventrikül için kalbin her kasılmada ne derece kan pompalandığını gösterir (36).

#### **LVEF değerine göre kalp yetersizliği:**

1. Korunmuş ejeksiyon fraksiyonu (Heart failure with preserved ejection fraction - HFpEF); diyastolik kalp yetmezliği olarak da bilinir. Kalp kası normal olarak kasılır, ancak ventriküler gevşeme sırasında gerektiği gibi gevşemez.
2. Düşük ejeksiyon fraksiyonu (Heart failure with reduced ejection fraction - HFrEF); sistolik kalp yetmezliği olarak da anılır. Kalp kası normal bir şekilde kasılmaz ve bu nedenle vücuda oksijen bakımından zengin kan az pompalanır (37, 38).

Son çalışmalarda, mevcut sınıflamaya ek olarak KY'de orta aralık olarak kabul edilen yeni EF kategorisi tanıtılmıştır. Bu HFmrEF, HFfrEF hasta bulgularına benzerlik göstermektedir. Buna KY orta değer EF (Heart failure with mid range ejection fraction - HFmrEF) denmiştir. Bu konu üzerinde spesifik çalışmalar devam etmektedir (39).

### **Ejeksiyon fraksiyonunun belirlenmesinde kullanılan yöntemler:**

- ❖ Ekokardiyogram: Bu yöntem, EF değerini kontrol etmenin en yaygın yoludur; özel bir görüntüleme cihazı ses dalgalarını kullanarak, kalbin dört odasını, kapakçıklar ve kalbin kan pompalama durumunu gösterir.
- ❖ Kalbin manyetik rezonans (MR) ile taranması; kardiyovasküler sistemin belirli bir bölümünün enine kesit görüntülerini gösterir.
- ❖ Kalbin nükleer taraması: Kan dolaşımına az miktarda radyoaktif madde (talyum gibi) verilerek kan akışı izlenir.

Normal kalpte sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (LVEF) %50-70 arasında değişmektedir. Kalp yetmezliğinde ise bu değer %50'in altında gözlenmektedir (36).

### **2.2.6. Fizyopatoloji**

KY, geçmişte hemodinamik hasar ve sıvı toplanmasından ibaret bir hastalık olarak tanımlanırken, günümüzde nöro-hormonal yapının etkili olduğu düşünülmektedir. Nöro-hormonal yapı değişimine ek olarak genetik faktörler, programlı hücre ölümü, çeşitli sitokin etkileri ve endotel hücre görevlerinde bozuklukların oluşması hastalığın ortaya çıkmasına hizmet eder (40).

### **2.2.7. Etiyoloji**

KY, birçok hastalıkların eşlik ettiği sendromlar toplamıdır. Düşük veya normal ve yüksek debili kalp yetersizliklerinin toplam sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (41).

### 2.2.8. Kalp Yetmezliğinde Genetiğin Rolü

Son zamanlarda, NO'nun kardiyovasküler sistemin düzenlenmesinde önemli bir aktör olduğu ve NOS3'ün kardiyovasküler homeostazı sürdüren en önemli NOS olduğu kabul görmektedir. *NOS3* gen ekspresyonu ve aktivitesini bozan ve daha az NO oluşumuna neden olan genetik varyasyonlar kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olarak incelenmiştir. Çeşitli araştırmalar bu konuyu ele alırken, *NOS3* genetik polimorfizmlerinin kardiyovasküler sistemi kontrol eden diğer biyolojik sistemlerle etkileşime girdiği açıktır ve bu nedenle gen-gen etkileşimlerinin ortak kardiyovasküler hastalıkların genetik temelini oluşturmak için netleştirilmesi gerektiği açıktır (42). *NOS3* ekspresyon seviyelerinin kalp yetmezliği hastalarında azaldığı gösterilmiştir (43). NO sinyali, kalp fonksiyonu ve büyümenin modülasyonunda kilit bir rol oynar. Normal fizyolojinin düzenlenmesine ek olarak, değiştirilmiş *NOS3* işlevi kalp yetmezliği sendromuna önemli bir katkı sağladığı bilinmektedir (44).

Afrika kökenli Amerikan toplumu üzerinde yapılan bir çalışmada; endotelial nitrik oksit sentaz (*NOS3*) lokusundaki genetik heterojenitenin kalp yetmezliği sonuçlarını etkilediği bulunmuştur. *NOS3* varyantlarının prevalansı siyah ve beyaz kohortlarda farklılık gösterdiği, ancak bu farklılıkların nedeni henüz anlaşılamamıştır (45).

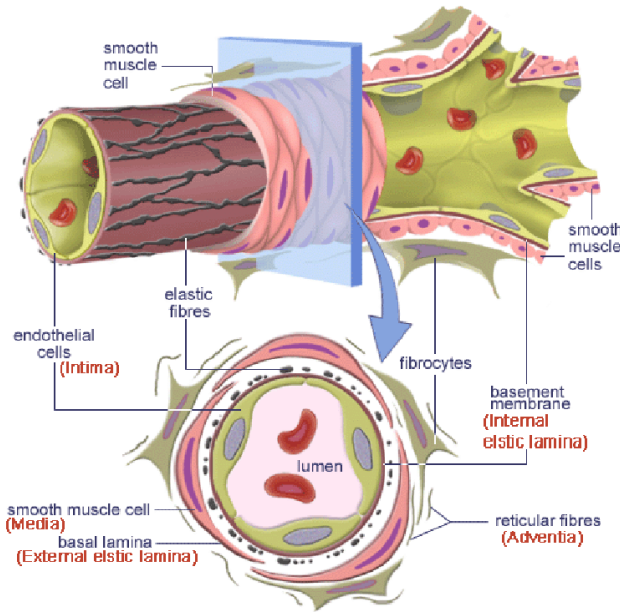
### 2.3. Endotel Hücreler

Vasküler endotel, damar lümeni ile vasküler düz kas hücreleri arasındaki tek tabakalı hücrelerden oluşmaktadır. Endotel hücrelerinde L-arginin aminoasidi üzerinden kalsiyum-kalmodulin bağımlı enzim nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından sürekli olarak NO sentezlenir. Bu madde, vasküler tonüs, hücre büyümesi trombositlerin ve diğer hücrelerin agregasyonlarının düzenlenmesi koruma gibi vasküler homeostazisini koruyan çok çeşitli biyolojik özelliklere sahiptir (46).

Mikroskobun geliştirilmesi ile kılcal kan damarlarının ince yapısı incelenmiş ve endotel hücrelerin yerleşim yerleri ve hücre içi yapıları aydınlatılmıştır. Endotel hücreleri, kan ve lenf damarlarının içini ve vücut boşluklarının içini döşediği belirlenmiştir (47).

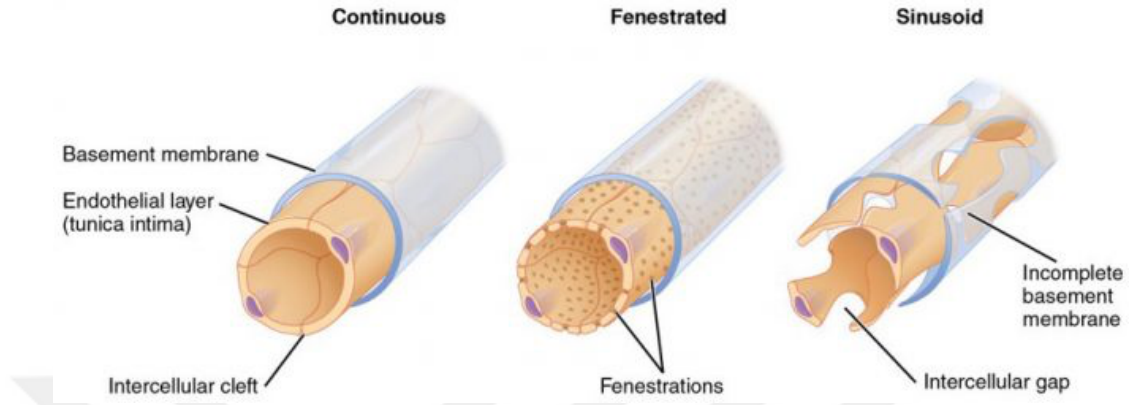
Ayrıca endotel hücreleri arasındaki farklılıklar karakterize edilmiştir. Bazı damarların lümenine bakan kısımlarında yerleşen endotel hücreleri birbirine sıkı bir şekilde

bağlanmış ve sürekli olan bazal membranın altında yerleşmiştir. Doku düzeni oluştururken bazen aralarında boşluklar bırakarak düzenlenmiştir. Bazı yerleşimlerde hücre tabakasının içinde geniş boşluklar bulunmaktadır (48, 49). Sıkı düzenlenmiş endotel tabakası beyin, kalp, kas, akciğer ve deride yer alan kılcal ve normal damarlarda bulunmaktadır. Boşluk bırakarak delikli yapı (50-60 nm) oluşturan endotel tabakası bazal membran ile düz kas tabakasına bağlanmıştır. Genellikle hormonal aktivitenin yüksek olduğu endokrin ve ekzokrin salgı bezlerinde, işlevin çok olduğu, midenin iç yapısında, beyinde, böbrek tüpçüklerinde ve böbrek glomerulusu gibi ince filtrasyon mekanizmalarının yer aldığı dokularda delikli endotel tabakaları bulunmaktadır. 100-200 nm çaplı gözenekler bırakarak tertiplenen endotel tabakaları düz kas tabakasının bulunmadığı dokularda yerleşmiştir (48, 50). Tek tabakalı endotelin bulunduğu vasküler sistemde; endotel damar içinde akan kan hücrelerinin birbirine yapışmasını engellemesinin yanında vasküler tonunun, trombosit akışının düzenlenmesi ve agregasyonun önlenmesi gibi görevlere sahiptir (51). Endotel hücreleri; kan damarı lümenine bakan kısımda yerleşmiş ve hemen üzerinde 80 nm kalınlığında bazal membrana tutunmuş durumdadır (Şekil 2) (52).



Şekil 2.2. Vasküler sistem içinde endotel hücrelerinin yerleşimi (52).

Bazal lamina kan damarları için çok önemli bir yapıdır. Bazal laminanın üstü perivasküler hücreler ile kaplanmıştır (53, 54). Tek tabakalı endotel, insan vücudunda  $10-60 \times 10^{12}$  m<sup>2</sup>'lik alanı kapladığı düşünülmektedir (Şekil 3) (48, 55-57).



Şekil 2.3. Kan damarlarında endotel hücre tabakasının yerleşimi (57).

### 2.3.1. Nitrik Oksit Sentazların (NOS) Çeşitleri

1989 yılında ilk kez tanımlanmış olan NOS enziminin 1994 yılına kadar üç izoformu tespit edilmiştir. Bu enzimlerin amino asit dizileri arasında %51-57 arasında bir homoloji tespit edildikten sonra bu enzimlerin izoformlarını kodlayan genlerin tanımlanmasına ağırlık verilmiş ve belirlenen genler klonlanmıştır. Sonraki çalışmalarda genlerin farklı hücrelerde kodladığı farklı yapıdaki NOS enzimlerinin yapısı, fonksiyonları ve bunların nasıl inhibe edildiğinin anlaşılmasına yoğunlaşmıştır. Daha sonraki çalışmalarda NOS enzim izoformlarının farklı hücrelerde bulunmadığı, farklı yerlerde lokalize oldukları, katalitik özelliklerinin farklı olduğu belirlenmiştir (58).

NOS'ların farklı tipleri; konstitif veya indüklenebilir yapıları, kalsiyumla ilişkili veya ilişkisiz olmaları, hücresel yerleşimleri, sitozola ait olup olmamalarına ve yapılarına katılan alt protein ünitelerinin moleküler ağırlıklarına göre sınıflara ayrılabilirler (59).

NOS'ların tiplerinden nöronal hücrelerde bulunan nöronal NOS (nNOS, NOS1), birçok hücrede indüklenebilen NOS (iNOS, NOS2) ve vasküler endotel hücrelerde ifadelenen NOS (eNOS, NOS3) (60-63).

Farklı tipleri olan NOS'lar, intraselüler kalsiyum seviyesi belli düzeye gelene kadar inaktifken kalsiyum ile kalsiyum-kalmodilin kompleksi oluşmaya başlayınca aktif

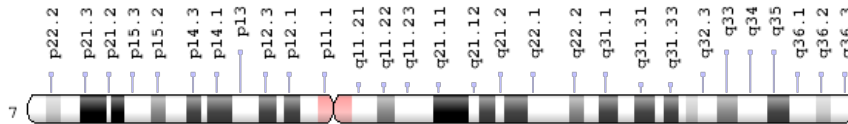
hale gelmektedir, kalsiyum-kalmodilin kompleksi kalsiyum düşüklüğüne bağlı olarak bozulması onların inaktivasyonuna neden olmaktadır. NO'nun düşük miktarları ara hücrelerin sinyalizasyon basamaklarında rol almaktadır. iNOS, normal şartlarda makrofaj ve hepatositlerde bulunmamaktadır. Ancak bu hücreler spesifik bir sitokinle uyarıldıklarında; iNOS düzeyi artmaktadır (64).

### 2.3.2. Endotel Nitrik Oksit Sentaz 3 (NOS3) ve Görevleri

NOS3 ilk önce koroner endotelde tanımlandı ve eNOS olarak adlandırıldı. NO, spesifik post translasyon sonrası modifikasyonlar (mesela cGMP'ye bağımlı protein kinaz fosforilasyonu, S-nitrosilasyon, vb.) ile aşağı akış proteinlerini modüle etmek için cGMP'ye bağımlı veya bağımsız yollarla vasıtasıyla sinyal verir. NOS'un işlev bozukluğu (yani değişmiş ifade, konum, aktivite vb.), KY gibi, kasılma işlev bozukluğuna ve hipertrofiyeye yol açar (65). NOS3 aktivitesindeki azalma NO üretiminin azalmasına ve bunun kalbe çok büyük zarar verdiği anlaşılmıştır (44).

NO, nörotransmisyon, antimikrobiyal ve antitümoral aktiviteler de dahil olmak üzere çeşitli işlemlerde biyolojik bir aracı olarak görev yapan reaktif bir serbest radikaldir. NO, L-arginin'den NOS3 ile sentezlenir. Bu gendeki varyasyonlar, koroner spazmlarla ilişkilidir. Gen mRNA'sının alternatif şekillerde işlenmesiyle bu genin çoklu transkript varyantlarının ortaya çıkmasını sağlamaktadır (63).

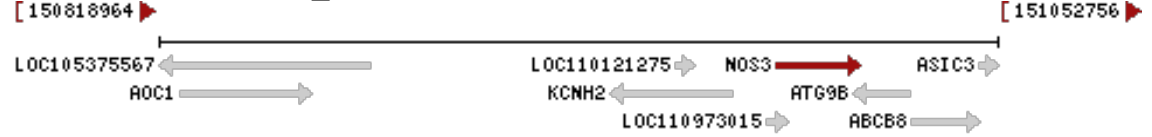
Nitrik oksit sentaz 3 (*NOS3*) geni; insanda 7. Kromozom (7q36.1) üzerinde lokalize olmuş (Şekil 4) (66) ve Gen ID: 4846 olup NG\_011992.1 erişim kodu ile 23544 baz çiftinden oluşmaktadır. İşlevsel mRNA'sı NM\_000603.5 erişim kodu ile 4366 bazdan ve primer protein yapısı NP\_000594.2 erişim kodu ile 1203 aminoasidinden oluşmaktadır (67).



Şekil 2.4. İnsan 7. kromozomu ve NOS3 geninin yerleşimi (66).

NM\_000603.5 transkript 27 ekson ve 26 introndan oluşmaktadır ve 2-26 nolu eksonlar proteine ait kodlar taşımaktadır. *NOS3* geni 1993'te klonlanmış ve 7q35-36 kromozomuna lokalize olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5) (63, 65).

### Chromosome 7 - NC\_000007.14



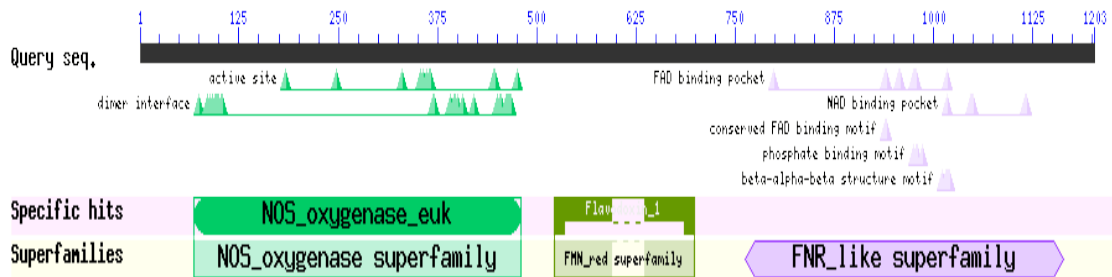
Şekil 2.5. İnsan 7. kromozomu ve *NOS3* geninin diğer genlere yakınlığı (63).

Kabaca 21 kb'lık genomik DNA'ya yayılan gen, 1203 amino asit içeren ve 135-kDa ağırlığında protein kodlayan 26 ekson içerir. Genin promotörü yaklaşık 1500 baz çifti yukarıda (upstream, genin 5' tarafında) yerleşmesiyle karakterize edilmiştir ve östrojenler tarafından regülasyona aracılık eden transkripsiyon faktörü bağlama sahaları içermektedir (68).

Anormal *NOS3* sinyalleri birçok kalp hastalığında anahtar rol oynar, hedeflenen modülasyon potansiyel olarak oksidatif stres kaynaklı bu patojenik kaynağı tersine çevirebilir (69).

Hem *NOS1* ve hem de *NOS3*, kardiyovasküler sistemde yapısal olarak ifade edilir. *NOS3* çoğunlukla koroner vasküler ve endokardiyal endotelial hücrelerde ve daha az ölçüde caveola ile birleştiği kardiyak miyositlerde bulunur (70, 71); *NOS1* baskın olarak sarkoplazmik retikulum (SR) (72) ve daha az bir ölçüde mitokondri (73), Golgi aparatı (74) ve sarkolemmal zara (75) lokalizedir.

Genin 5'UTR dizisi 1 ve 3'UTR dizisi 27 nolu eksonlar üzerinde yer almaktadır (76). Genin diğer canlı türleri arasında korunan bölgeleri bulunmaktadır (Şekil 6) (67).



Şekil 2.6. *NOS3* geni korunan alanları (67).

Gende; Nitric oxide synthase (NOS) eukaryotic oxygenase domain (NOS\_oxygenase\_euk, cd00795), Flavodoxin (Flavodoxin\_1, pfam00258) ve Ferredoxin reductase (FNR) (FNR\_like, cl106868), olmak üzere üç adet ortolog ana korunan domainleri olduğu görülmektedir (67).

**NOS\_oxygenase\_euk domaini:** NOS, ökaryotik oksijenaz alanı. NOS, L-arjininin bir guanidin azotunun beş elektronlu heme oksidasyonunu L-arjininin L-sitrüline indirgeyip, N-hidroksil-L-arginin olarak iki ardışık monooksijenasyon reaksiyonu yoluyla katalize ederek NO üretir. Memelilerde, üç ayrı NOS izozimi vardır: nöronal (nNOS veya NOS1), sitokin ile indüklenebilir (iNOS veya NOS2) ve endotel (eNOS veya NOS3). Nitrik oksit sentazları homodimerdir. Ökaryotlarda, her bir monomer, substrat L-Arginin, çinko ve heme kofaktörlerine ve 5.6.7.8- (6R) - tetrahidrobiopterin'e bağlanan bir N-terminali oksijenaz alanına sahiptir. Ökaryotik NOS'ler ayrıca sitokrom P450 redüktazına homolog olan ve NADH, FAD ve FMN'yi bağlayan redüktaz bölgesini sağlayan bir C-terminal elektrona sahiptir.

**Flavodoxin\_1:** Bu domain birçok alt domain alanlara bölünmüştür.

**FNR\_like domaini:** Bir FAD ve NAD (P) bağlayıcı protein olan ferredoksin redüktaz (FNR), kloroplast redüktaz aktivitesi olarak tanımlandı ve indirgenmiş demir sülfür protein ferredoksininden  $\text{NADP}^{+}$ 'ya elektron transferini fotosistem I'in elektron taşıma mekanizmasında son aşama olarak katalize eder. FNR, indirgenmiş ferredoksin'den FAD'e (yarı-kinon bir ara madde vasıtasıyla  $\text{FADH}_2$ 'yi oluşturur) elektronları aktarır ve daha sonra  $\text{NADP}^{+}$ 'ı  $\text{NADPH}$ 'ye indirger. FNR'nin çeşitli elektron alıcıları ve vericileri kullandığı ve birçok organizmada azot asimilasyonu, dinitrojen fiksasyonu, steroid hidroksilasyonu, yağ asidi metabolizması, oksijenaz aktivitesi ve metan asimilasyonu gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. FNR, alfa / beta sınıfının bir NAD (P) bağlayıcı etki alanına göre oryantasyon içinde değişen bir ayrık (genellikle N-terminal) flavin etki alanına sahiptir. N-terminal kısmı, bir flavin proteaz grubu (flavoenzimlerdeki gibi) içerebilir veya flavin'i substrat olarak kullanabilir (67).



### 2.3.3. Nitrik Oksit (NO) ve Sentezi

Nitrik oksit (NO), bir azot, bir oksijen atomundan oluşan ve birçok reaksiyonu etkileyen, zayıf oksidan veya indirgeyici rol oynayan serbest radikal olarak görev yapan bir moleküldür (77, 78).

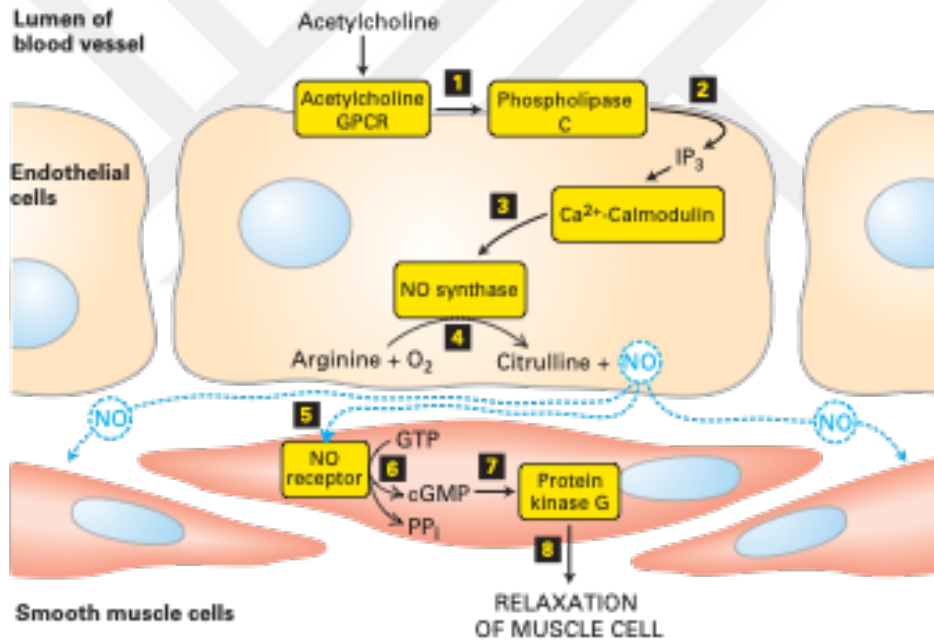
NO, çok iyi bir mesajcı molekül olarak görev alır ve sinyal iletimi sonrası nitrite dönüşür. NO üretildiği endotel hücreden dışarı kolayca hücre zarından diffüze olduğu ve hedef hücrelerdeki kendi reseptörüne bağlanarak hedef molekülleri harekete geçirdiği tespit edilmiştir (79).

Yarı ömrü 6-30 sn olan ve endotel hücrelerinde kalsiyum-kalmodilin bağımlı nitrik oksit sentaz tarafından L-arginin üzerinden sentezlenen bir gazdır (65). NO; hiperkolesterolemi (80, 81), ateroskleroz (82) ile koroner hastalıklarında (83) etkili olduğu gösterilmiştir. Kardiyovasküler hastalıklar için vasküler endotelin homeostatik fonksiyonunun anlaşılması önemlidir. NO'nun, endotel düzenleyici özelliklerinin birçoğuna aracılık etmedeki rolü ve bunun miyokart iskemisi, koroner damarların daralmasına veya yetersiz dilusyona uğramalarına, plak rüptürü ve tromboza, dengesiz anjinaya veya miyokart enfarktüsüne yol açtığı belirlenmiştir (84). NO'nun, endotelin düzenleyici özelliklerinin birçoğuna aracılık etmedeki rolü, artık ateroskleroz için "risk faktörleri" olarak kabul edilen koşulların ve hastalıkların oluşumunda rol aldığı, biyoaktivite kaybıyla endotel disfonksiyonuna neden olduğuna dair artan bir anlayış bulunmaktadır (85).

NOS enzimi, arginin üzerinden NO ve sitrulin sentezini katalizleyen bir enzimdir. Katalizlediği reaksiyon üzerinden oksijen atomunun arginin içindeki bir azot atomu ile birleştirilmesi sonucu NO oluşturmaktadır (59). Hiperkolesterolemi, sistemik hipertansiyon, sigara içme, diyabet, konjestif kalp yetmezliği, pulmoner hipertansiyon, östrojen eksikliği, hiperhomosisteinemi ve yaşlanma sürecinin kendisi de dahil olmak üzere büyüyen koşulların listesi, endotelin bozulmuş işlevleriyle ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, bu koşullarda damar duvarı, iltihaplanma, lipoproteinlerin oksidasyonu, düz kas proliferasyonu, hücre dışı matris birikmesi veya lizis, lipit bakımından zengin malzemenin birikmesi, trombosit aktivasyonu ve trombus oluşumunu sağlayabilir (46, 86).

NO'in sentezlenebilmesi için sinir hücresi motor uç plağından salınan asetilkolin ligandı, endotel hücre zarı üzerinde bulunan G-proteine bağlı asetilkolin reseptörüne

bağlanması gerekir. Asetilkolin ligandı-asetilkolin reseptörü kompleksi, G-proteinin alt ünitesi  $G_{\alpha}$ -GTP şeklinde aktive olur ve bu da endotel hücre zarında bulunan fosfolipaz C enzimini aktive eder. Fosfolipaz C, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>)'ı parçalayarak diasil gliserol (DAG) ve fosfoinositol 1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>)'a parçalar. IP<sub>3</sub>, endoplazmik retikulum zarında bulunan  $Ca^{++}$  kanallarını açarak, endoplazmik retikulumdan  $Ca^{++}$ 'un sitozole geçmesini sağlar.  $Ca^{++}$ 'u kalmodulin tutarak Ca-kalmodulin kompleksi sitoplazmada bulunan NOS'u aktive eder. Aktif NOS, arginin aminoasidini oksijen varlığında, sitruline kataliz ederken yan ürün olarak NO gazı oluşur. NO difüzyonla endotel hücresinden bazal membrana ve oradan düz kas hücresine geçerek guanil siklazı aktive eder. Guanil siklaz GTP üzerinden cGMP'yi oluşturur. cGMP'de protein kinaz G'yi aktive eder ve düz kasın gevşemesi sağlanır (Şekil 7) (87).



Şekil 2.7. Endotel hücresinde NO'nun sentezi ve düz kas hücresinde gevşeme (87).

### 2.3.4. NO Fonksiyonları

NO, karmaşık biyolojik aktivitelere karıştığı bilinmektedir. İnsanda zigotun oluşumu sırasında döllenmeden hemen sonra spermdeki NOS aktivitesi ile ovumun aktive olduğu bulunmuştur. Zigottan itibaren birçok gelişim basamağında NO'nun rol aldığı bilinmektedir. Sinyalizasyon işlemlerine katılarak transkripsiyon faktörlerinin aktive edilmesi, translasyon basamaklarının düzenlenmesi ve sitoplazmada bulunan

mRNA kararlılığının sağlanması ve gen ürünlerinin düzenlenmesi gibi görevlere sahiptir (88).

Ayrıca bu molekül; vazodilatör, nörotransmitter, immunodilatör ve antimikrobiyal gibi farklı işlevlere sahiptir. Asetilkolin molekülleri endotel hücrelerde kendi reseptörüne bağlandığında intrasellüler kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) düzeyinin artışına ve  $Ca^{++}$ -kalmazdülün kompleksinin oluşumunun ardından NOS3'ü aktive ederek NO salınımını sağlamaktadır. Salınan NO endotel hücreden dışarı difüzyonla çıkar, komşu düz kas hücresindeki reseptörüne bağlandıktan sonra guanil siklazın hem grubuna bağlanmaktadır. Guanil siklaz, cGMP gibi ürünleri ve protein kinazların seri reaksiyonlarını aktive ederek düz kas gevşemesini sağlamaktadır. Epitel hücrelerinde üretilen NO, düz kas hücrelerini gevşeten bir etkiye sahiptir. En iyi bilinen reseptörü, hem grubu taşıyan proteindir. NO kendi reseptörüne bağlandığında inaktif olan guanil siklaz aktif hale gelmektedir ve bu enzim GTP üzerinden cGMP oluşumuna sebep olmaktadır. Guanil siklaz aktivitesinin değişimi ile NO, arter, nöron ve birçok farklı hücre üzerinde farklı etkiler ortaya çıkar (64).

Dolaşım sisteminde lokal değişiklikler meydana geldiğinde, NO kan dolaşımı ile kan basıncını düzenlemektedir (58).

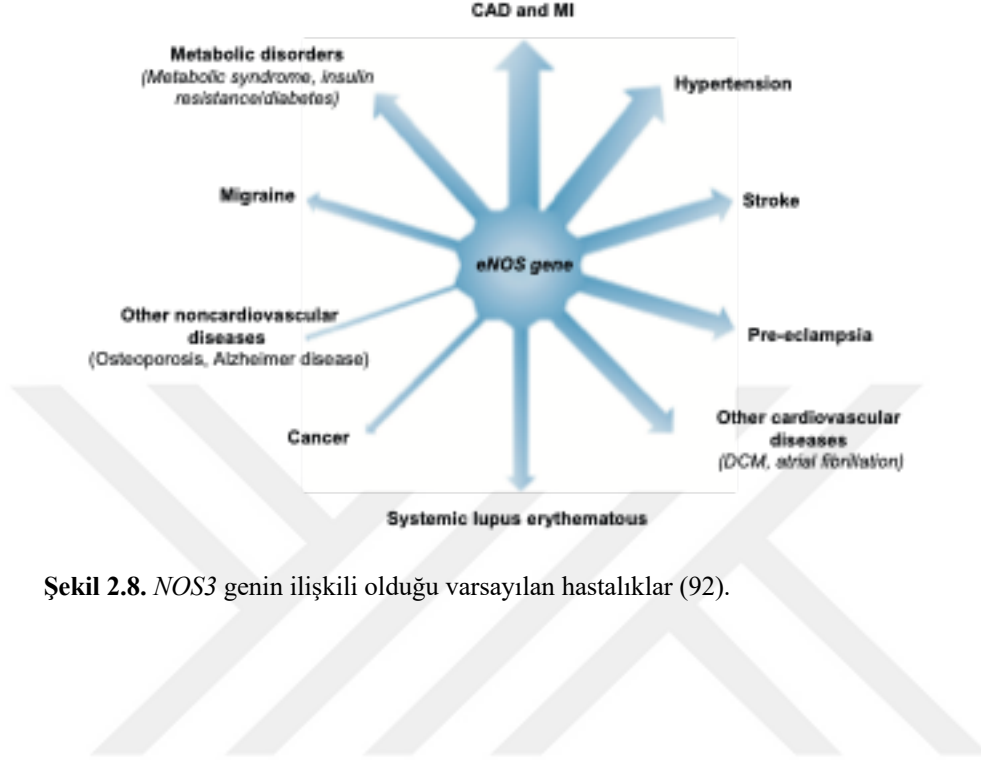
### **2.3.5. Endotel Hücre Bozuklukları**

Endotel disfonksiyonu şiddetli olduğunda, NO salınımı durur. Böylece düz kaslar uyarımsız kalır. Bu durumda, düz kas hücrelerinde hücre içi serbest  $Ca^{2+}$ 'daki artış, kasılmalarına neden olur. Endotel hücreleri normal olduğunda, NO'nun güçlü etkisi görülür. Böylece hücre asetilkolin, bradikinin, serotonin, adenosin, ADP, ATP, histamin ve trombin gibi etkenleri karşılar (89). Hiperkolesterolemi, sistemik hipertansiyon, sigara içme, diabetes mellitus, konjestif kalp yetmezliği gibi hastalıklar, endotelin bozulmuş fonksiyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, bu şartlardaki damar duvarı, iltihaplanmayı, lipoproteinlerin oksidasyonunu teşvik edebilir, düz kas proliferasyonu, hücre dışı matris birikmesi veya lizis, lipid bakımından zengin materyal birikimi, trombosit aktivasyonu ve trombüs oluşumuna yol açabilir. Endotel disfonksiyonunun tüm bu sonuçları, aterosklerozun gelişimine ve klinik ekspresyonuna katkıda bulunabilir (46). Kardiyovasküler hastalıklarda endotel disfonksiyonu çok erken evrede görülmektedir (90).

### 2.3.6. *NOS3* Polimorfizmleri ve Kalp Yetmezliği ile İlgili Rolü

*NOS3*'ün çok polimorfik noktası belirlenmiştir. Dizi analizleri sonucu bu polimorfik noktaların promotör, ekson ve intronlar üzerinde olduğu bulunmuştur. Bu polimorfik alanlar ile çeşitli kardiyovasküler hastalıklar arasındaki bağlantılar değişik çalışmalarda yer almıştır. Dilate kardiyomyopati hastalarında *NOS3*:c.-51-762C>T (rs20707449) polimorfizmi, kalp yetmezliğinin daha hızlı ilerlemesi riskinin artması için bir belirteç işlevi görür. Dilate kardiyomyopati'deki biyobelirteçlerin iskemik ve hipertansif etiyolojinin kalp yetersizliği ile ilgili belirgin şekli, bu hastalıkta yeniden şekillenmeyi sağlamaktadır (91). Özellikle endotel hücrelerinde yapısal olarak eksprese edilen bir enzim olan NOS (eNOS veya *NOS3*), endotel seviyesindeki NO biyoyararlanımından büyük ölçüde sorumludur. Endotel kaynaklı NO üretimindeki değişiklikler çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir ve insanlarda *NOS3* genindeki farklı polimorfizmlerin varlığı ile genetik olarak tespit edilebilir (Şekil 8) (92). Bugüne kadar, en çok çalışılan ve işlevsel olarak ilişkili polimorfizmler; c.-51-762C>T (rs2070744), c.894T>G (rs1799983) ve intron 4 üzerinde 27-baz çiftlik değişken ardışık tekrarlardır. Bu polimorfik alanlar koroner arter hastalığı, miyokard enfarktüsü, hipertansiyon, preeklampsi ve inme gibi kardiyovasküler hastalığa ve diğer karmaşık hastalıklar için risk teşkil ettikleri bulunmuştur. *NOS3* geninin sadece kardiyovasküler hastalıklarda değil diğer karmaşık hastalıklarda da rolünü değerlendiren önemli miktarda kanıt toplanmıştır. Ancak bu sonuçlar küçük çalışma gruplarından elde edilmiştir. Böylece sonuçlar örneklem büyüklüğü nedeniyle veya etnik köken veya hastalıklardaki farklılıklar nedeniyle yetersiz bulunmuştur. Farklı *NOS3* polimorfizmlerinin gerçek etkilerinin değerlendirilmesinde önemli bir engel, kısmen insanlarda NO ölçülmesindeki teknik karmaşıklık nedeniyle, *NOS3* gen fonksiyonunun güvenilir bir markörünün bulunmamasıdır. Bugüne kadar, her polimorfizmin farklı patolojilerle ilişkilendirilmesi için gen varyantlarının etkilerinin daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bir gerçektir. Aslında, izole edilmiş *NOS3* gen varyantlarını değerlendiren çalışmaların, *NOS3* genini ve NO'nun rolünü anlamada gerçek bir ilerleme sağlamıştır. Şimdiye kadar toplanan bulgular, özellikle kardiyovasküler alanda farklı patolojilerde *NOS3* geninin etkili olduğu bulunmuştur (92, 93). Türkiye'de endotel fonksiyon bozukluğu olan kronik kalp yetmezliği hastalarında yapılan *NOS3* geni intron 4'te 27-baz çiftlik değişken ardışık

tekrar sayılı polimorfizm çalışmalarında, hasta ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (90).



Şekil 2.8. NOS3 genin ilişkili olduğu varsayılan hastalıklar (92).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Araç ve Gereçler**

1. Buzdolabı (Bosch, Türkiye)
2. Derin Dondurucu (Sanyo, Japonya)
3. Hassas terazi (Vibra, İngiltere)
4. pH Metre (Consort, Belçika)
5. Soğutmalı Santrifuj (Hettich, Almanya)
6. Vortex (Labnet, Amerika)
7. PCR makinesi (Sensoquest Labcyclers, Almanya)
8. Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
9. Elektroforez güç kaynağı (Consort, Belçika)
10. Elektroforez tankı (CLP, Amerika)
11. Jel Analiz ve Dökümantasyon Sistemi (Gen-Box CFX, Türkiye)
12. Buharlı Otoklav (Hirayama, Japonya)
13. Mikrodalga Fırın (Vestel, Türkiye)
14. Laminar flow (Heraus, Almanya)
14. Deiyonize su cihazı (SG, Almanya)
15. 1,5 ml'lik kapaklı ependorf tüp (Isolab, Almanya)
16. 0,2 ml'lik PCR tüpleri
17. PCR pipet uçları
18. Sarı pipet ucu
19. Mavi pipet ucu
20. 5 ml'lik pipet ucu
21. Otomatik ayarlanabilir pipet takımı (Eppendorf, Almanya)

#### **3.2. Moleküler ve Kimyasal Malzemeler**

- Saf etil alkol (Merck, Almanya)
- Deiyonize su cihazı (SG, Almanya)
- Kloroform (Carlo Erba, İtalya)
- İzoamil alkol (Merck, Almanya)
- Proteinaz K (20 mg/ml) (Fermentas, Amerika)

Sodyum Dodecil Sülfat (SDS,) (Merck, Almanya)  
Triton X-100 (Bio Basic Inc., Kanada)  
NaCl (Merck, Almanya)  
Tris (Base) (Bio Basic Inc., Kanada)  
EDTA (Sigma-Aldrich, Almanya)  
Sakkaroz (Merck, Almanya)  
Agaroz A (Bio Basic Inc., Kanada)  
Lityum hidroksit monohidrat (Sigma-Aldrich, Almanya)  
Borik Asit (Merck, Almanya)  
Magnezyum Klörür (Merck, Almanya)  
Gliserol (Merck, Almanya)  
Bromo fenol blue (Merck, Almanya)  
Primerler (4 adet) (Metabion, Almanya)  
DreamTaq DNA Polimeraz (Thermoscientific, Amerika)  
MspI restriksiyon endonükleaz enzim (Thermoscientific, Amerika)  
BanII restriksiyon endonükleaz enzim (Thermoscientific, Amerika)  
Lityum borat elektroforez tamponu (pH 8.5)  
6x yürütme tamponu  
FastRuler (Fermantase, Amerika)

### **3.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar**

#### **5xEritrosit Lizis Tamponu**

1.6M Sukroz	final 0.32M
60mM Tris-HCl, pH 7.6	final 12 mM
25mM MgCl <sub>2</sub>	final 5mM
%5 Triton X-100	final %1 (otoklav sonrası katılır)

#### **5xLökosit Lizis Tamponu**

500mM NaCl	final 100mM NaCl
20mM EDTA	final 4mM EDTA
100mM Tris-HCl	final 20mM Tris-HCl

**SDS (%10)**

**Kloroform: İzoamil Alkol (24:1)**

**%70'lik Etanol**

**5.3 M'lık NaCl**

**6xYürütme Tamponu**

10mM Tris-HCl (pH7.6)

%60 gliserol

%0.03 Bromo fenol blue

60mM EDTA

**Lityum Borat (20X), pH 8.5**

0.2 M Lityum hidroksit

0.58 M Borik asit

### **3.4. Hasta ve Kontrol Grubu Bireyleri**

Prospektif olarak planlanan bu çalışmaya Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi kardiyoloji kliniğine başvuran 18-70 yaş arasındaki 56'sı erkek ve 44'ü kadın olmak üzere toplam 100 olgu ardışık olarak alındı. KY tanısı ekokardiyografik değerlendirme sonucunda sistolik ve diyastolik fonksiyonlara göre konuldu. Medikal tedavi altında asemptomatik olması stabil KY ve 3 ay üzerinde KY hikayesi olması ise kronik KY olarak tanımlandı. Kronik ve stabil KY tanısı konulan 100 hasta çalışma grubu, benzer yaş ve cinsiyette sağlıklı olan 32'si erkek ve 49'u kadın toplam 81 kişi de kontrol grubu olarak alındı.

Tüm bireyler, hipertansiyon, diyabet, obezite, ailede kalp hastalığı öyküsü, sigara, alkol, hiperlipidemi gibi risk faktörleri bakımından sorgulandı. Sistolik kan basıncı 140 mm Hg'nin, diyastolik kan basıncı 90 mm Hg'nin üzerinde olanlar ya da antihipertansif ilaç kullananlar hipertansif kabul edildi. Açlık LDL düzeyi 130 mg/dl'nin üzerinde



olanlar ya da statin kullananlar hiperkolesterolemik; açlık trigliserid düzeyi 150 mg/dl'nin üzerinde olanlar ya da antilipidemik ilaç kullananlar hipertrigliseridemik olarak belirlendi. Açlık kan şekeri 126 mg/dl'nin üzerinde olanlar veya diyabetes mellitus tanısıyla tedavi görenler diyabetik kabul edildi. Olgular sigara içenler ve hiç içmemiş olanlar şeklinde ayrıldı. Birinci derece yakınlarında koroner arter hastalığı olanlar için aile öyküsü pozitif kabul edildi.

Çalışma öncesi Etik Kurul izni ve tüm olgularda bilgilendirilmiş onam formları alındı, kabul etmeyenler çalışmaya alınmadı.

### 3.5. DNA Analizi

DNA izolasyonu için tüm bireylerden hastaneye başvuru sırasında aç karnına venöz 2-3 ml EDTA'lı kan alındı ve çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı.

DNA, EDTA'lı tam kandan tuzla çöktürme (salting-out) tekniğine (94) göre aşağıda belirtildiği gibi elde edildi. PCR'da her bir birey için 20-30 ng DNA kullanıldı.

1. 800µl 1x Eritrosit lizis tamponuna 300µl tam kan eklendi ve yavaşça alt üst edildi. Karışım oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
2. Karışım, 13.000xg'de 40 sn süre ve 4°C'de santrifüj edildi. Hücre çökeltisi, 800µl 1x eritrosit lizis tamponu ile iki defa daha aynı işlemde geçirildi.
3. 13.000xg'de 40 sn süre ve 4°C'de santrifüjden sonra nükleer hücre çökeltisi vortekslendi.
4. Çökeltiye, 60µl 5x Lökosit lizis tamponu, 30µl (%1) SDS eklendi ve 30 sn kuvvetlice vortekslendi ve ardından 1.5 µl (20 mg/ml) Proteinaz K (final 100 µg/ml) eklenir (toplam 300µl) ve hafifçe vortekslendi.
5. Karışım, 55°C'de 20 dakika süre ile tutuldu ve hemen ardından 2-3 dakika süre ile buzda bekletildi.
6. Karışıma 100µl NaCl (5.3M) eklendi (final 1.325M) ve 600µl kloroform: izoamil alkol (24:1) eklendi ve 15sn vortekslenerek 3 dakika süre ile santrifüjlendi.
7. DNA içeren üst faz (350µl) dikkatlice yeni bir tüpe alındı ve üzerine 700µl %100 soğuk etanol eklenerek DNA'nın presipite olması için 5 dakika buzda bekletildi.

8. 13.000xg'de 2 dak. süre ve 4°C'de santrifüjlendi. DNA çökeltisi, 1 ml %70'lik soğuk etanol ile yıkandı ve 2 dakika süre ile 4°C'de santrifüjlendi. Üst faz atıldı.
9. DNA taşıyan tüpler 65°C'de 5-10 dakika tutularak etanolun buharlaşması sağlandı.
10. DNA, 100µl deiyonize su ile çözüldü ve DNaz inhibisyonu için 70°C'de 10 dakika süre ile tutuldu ve PCR işlemine kadar -20°C'ye alındı.

### 3.6. PCR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Tekniği

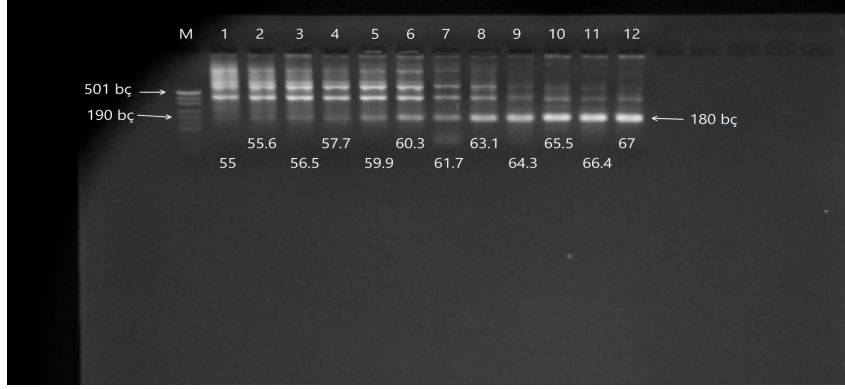
*NOS3* geni promotor bölgesi üzerinde bulunan NG\_011992.1: g.6933C>T (NM\_000603.4: c.-51-762C>T, rs2070744) polimorfik alanını içeren ve aşağıda dizisi gösterilen 180 baz çiftlik amplikon;

TGGAGAGTGCTGGTGTACCCACCTGCATTCTGGGAACTGTAGTTTCCCTAG  
TCCCCATGCTCCCACCAGGGCATCAAGCTCTTCCCTGGC GGCTGACCCTG  
CCTCAGCCCTAGTCTCTCTGCTGACCTGCGGCCCGGGAAGCGTGCGTCACT  
GAATGACAGGGTGGGGGTGGAGGC

çoğaltılmasında kullanılacak primer annealing (yapışma) sıcaklığının tespiti için "gradient PCR" çalışması yapıldı. Bu amaçla, gradient PCR reaksiyonu (10µl); 1X DreamTaq PCR tamponu (2mM MgCl<sub>2</sub> içerikli), 0.2 µM'lık forward ve reverse primerler (Tablo 1) (95, 96), 200 µM dNTP'ler, 30 ng genomik DNA ve 1 Unite DreamTaq DNA polimeraz ile hazırlandı ve ilk denaturasyon 3 dakika süreyle 94°C, ardından 30 siklus boyunca 94°C'de 30 sn, 61°C'de (6°C gradient) 30 sn, 72°C'de 30 sn ve final sentez için 72°C'de 5 dakika boyunca PCR programı uygulanarak 180 baz çifti uzunluğunda PCR ürünü elde edildi. Böylece en iyi DNA bandının meydana geldiği annealing sıcaklığı (65°C) belirlendi (Şekil 9).

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan primer dizileri (95, 96).

SNP	Primer dizileri	Amplikon
rs2070744C>T	5'-TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCA-3' (forward) 5'-GCCTCCACCCACCCCTGTC-3' (reverse)	180 bç
rs1799983T>G	5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3' (forward) 5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3' (reverse)	248 bç



**Şekil 3.1.** NOS3 geni c.-51-762C>T gradient PCR profili. Kuyu M: DNA Marker (pUC19, Fermentas, Amerika); kuyu 1-12(55-67°C'de) 180 baz çiftlik PCR ürünleri.

PCR reaksiyonu optimizasyonu yapıldıktan sonra PCR reaksiyonu;

Her kişiden 2'şer µl DNA etiketli PCR tüplerine dağıtıldı ve ardından aşağıda ifade edildiği gibi ortak PCR karışımı hazırlandı.

<u>Ana kons.</u>	<u>Final kons.</u>	<u>10µl hacim</u>
ddH <sub>2</sub> O	1x	6.2µl
PCR buffer (10X)	1x	1µl
dNTP'ler (10mM)	0.2mM	0.2µl
Forward primer (10µM)	0.2µM	0.2µl
Reverse primer (10µM)	0.2µM	0.2µl
DreamTaq DNA pol. (5U/µl)	1U/10µl	0.2µl (1U)

Karışım her bir PCR tüpüne 8'er µl şeklinde dağıtıldı ve aşağıda yazılı PCR programı uygulandı.

94°C'de 3 dakika (ilk denaturasyon)

30 siklus boyunca,

94°C'de 30 sn,

65°C'de 30 sn,

72°C'de 30 sn

72°C'de 5 dakika (final sentez)

### **RFLP reaksiyonu (30µl)**

	<b><u>Final kons.</u></b>	<b><u>Final Hacim (30µl)</u></b>
ddH <sub>2</sub> O	1x	17.8µl
RFLP Buffer (10x)	1x	2µl
MspI (5U/µl)	1U/30µl	0.2µl

Karışımdan 20µl alıp 10µl PCR ürününe katıldı ve hafifçe karıştırıldı. 37°C’de 2 saat süreyle inkübe edildi.

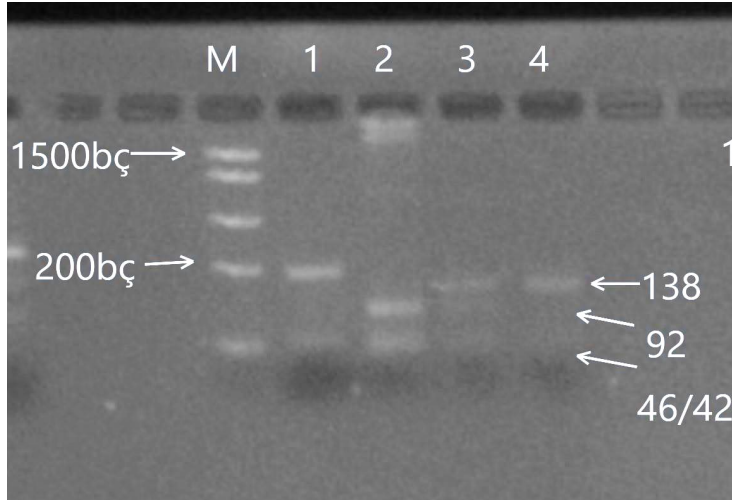
### **Elektroforez jeli (pH 8.5)**

ddH <sub>2</sub> O	1x	79.8ml
LB buffer (20x)	1x	4.2ml
EtBr (10mg/ml)	0.5µg/ml	4.2µl
Agaroz	%2.5	2.51gr

Karışımdan sonra jel mikrodalgada ardışık olarak düşük ayarda 2 dakika ve üç defa 1’er dakika sürelerle agaroz eritildi ve oda sıcaklığında el yakmayacak duruma gelince jel tablasına dökülerek 20’şer dişli taraklar konarak 15 dakika süre ile katılaşması beklendi.

PCR-RFLP ürünleri 6X yürütme tamponu ile karıştırdıktan sonra 1X Lityum borat (LB) elektroforez tamponu içindeki jelin kuyularına 10’ar µl şeklinde uygulandı. Elektroforez DNA marker (FastRuler, Fermentas) varlığında 200V ve 20 dakika süre ile yapıldı. Ardından jel musluk suyu ile hafifçe yıkanarak Jel Analiz ve Dökümentasyon sistemi ile görüntülenerek fotoğrafı çekildi.

Jel üzerinde 138, 46 ve 42 baz çifti şeklinde üç DNA bandı görülmesi CC genotipi (yabanil tip, homozigot), 138, 92, 46 ve 42 baz çiftlik dört DNA bandı görülmesi ise CT genotipi (polimorf, heterozigot) ve 138 ve 42 baz çiftlik DNA bandı görülmesi TT genotip (polimorf, homozigot) olarak değerlendirildi (Şekil 10).

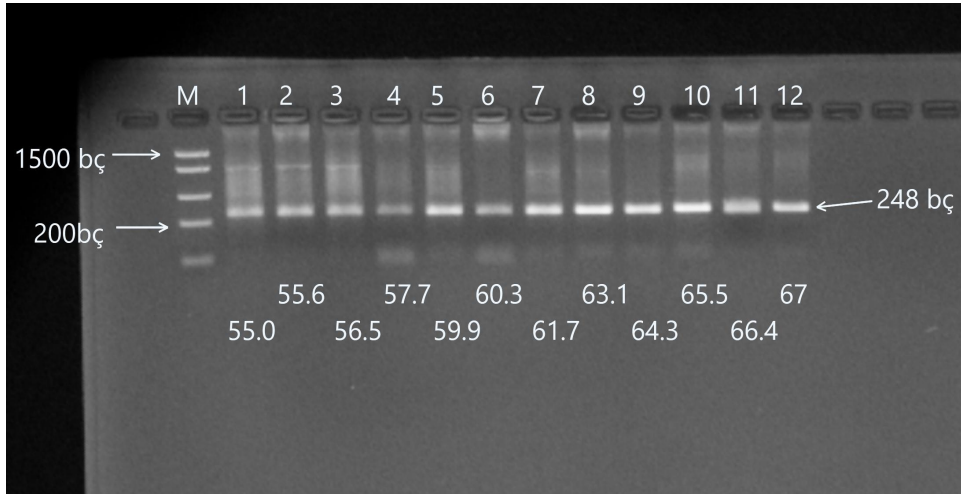


**Şekil 3.2:** *NOS3*:c.-51-762C>T noktasının *MspI* restriksiyon profili. Kuyu M: DNA Marker (FastRuler 1500-50 bç, Fermentas, Amerika); kuyu 1: kesilmemiş PCR ürünü; kuyu 2: CC genotipi (homozigot, normal); kuyu 3: CT genotipi (heterozigot); kuyu 4: TT genotipi (homozigot, polimorfik).

*NOS3* geni ekson 7 üzerinde bulunan NG\_01992.1:g.12965T>G (NM\_000603.4:c.894T>G, rs1799983, NP\_000594.2:p.Asp298Glu) polimorfik alanını içeren ve aşağıda dizisi gösterilen 248 baz çiftlik amplikon;

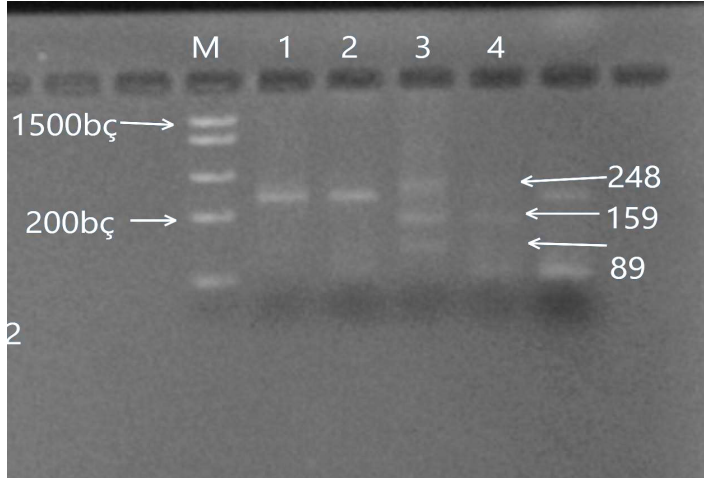
```
AAGGCAGGAGACAGTGGATGGAGGGGTCCCTGAGGAGGGCATGAGGCTCA
GCCCCAGAACCCCTCTGGCCCACTCCCCACAGCTCTGCATTCAGCACGGCT
GGACCCAGGAAACGGTCGCTTCGACGTGCTGCCCTGCTGCTGCAGGCC
CAGATGATCCCCCAGAACTCTTCTTCTGCCCCCGAGCTGGTCCTTGAGGT
GCCCTGGAGCACCCACGTGAGCACCAAAGGGATTGACTGGG
```

Amplifikasyonun optimizasyonunda uygulanan gradient PCR ve belirlenen annealing sıcaklığına (65°C) göre yapılan PCR yukarıdaki ile aynı şartlarda yapıldı (Şekil 11).



**Şekil 3.3.** *NOS3* geni c.894T>G gradient PCR profili. Kuyu M: DNA Marker (FastRuler 1500-50 bç, Fermentas, Amerika); kuyu 1-12 (55-67°C’de 248 baz çiftlik PCR ürünleri).

10 µl’lik PCR ürünü 30µl’lik restriksiyon reaksiyon hacminde 1 U *BanII* (*Eco241*) enzimi ile 2 saat boyunca 37°C’de kesimi yapıldı ve %2’lik agaroz jel elektroforezi ile 200V’ta ve 20 dak. süre ile ayrıştırıldı. Jel üzerinde 163 ve 85 baz çifti şeklinde iki band görülmesi TT genotipi (yabanil tip, homozigot), 163 ve 85 baz çiftlik iki DNA bandı GG genotipi (polimorf, homozigot) ve 248, 163 ve 85 baz çiftlik üç DNA bandı görülmesi ise TG genotipi (polimorf, heterozigot) olarak değerlendirildi (Şekil 12).



**Şekil 3.4.** *NOS3*:c.894T>G noktasının *Ban*II restriksiyon profili. Kuyu M: DNA Marker (FastRuler 1500-50 bç, Fermentas, Amerika); kuyu 1: kesilmemiş PCR ürünü; kuyu 2: TT genotipi (homozigot, normal); kuyu 3: TG genotipi (heterozigot); kuyu 4: GG genotipi (homozigot, polimorfik).

### 3.7. İstatiksel Analiz

Nümerik veriler ortalama  $\pm$  standart sapma, kategorik değişkenler ise sayı veya yüzde şeklinde ifade edildi. Kategorik veriler için ki-kare testi nümerik verilerde unpaired t-testi veya Mann-Whitney U-testi kullanıldı. *NOS3*: c.-51-762C>T ve c.894T>G'nin genotip frekansları dağılımına Hardy-Weinberg dengesine uyumluluk için ki-kare testi, genotip ile allel oranlarının değerlendirilmesi için SPSS v22'de Fisher's exact testi kullanıldı.

#### 4. BULGULAR

Hasta ve sağlıklı bireylerin klinik ve demografik verileri Tablo 2’de verilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hasta grubu bireylerinin yaş, üre ve K<sup>+</sup> değerleri kontrol grubu bireylerinin değerlerinden daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p<0.05). Aynı şekilde hasta grubunun HDL-C, LDL-C, Total kolesterol, Trigliserit, EF ve Na<sup>+</sup> değerleri kontrol grubu değerlerinden daha düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05). Buna ek olarak vücut kitle indeksi (VKİ), Hemoglobin (Hb), Hematokrit, Kreatinin, Keratin kinaz (CK), ALT, Troponin, Nabız, Sistolik ve Diastolik kan basınç değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 2).

**Tablo 4.2.** Hasta ve kontrol grubu bireylerinin demografik ve klinik veri dağılımı

	Kalp Yetmezliği Hastaları (n=100)	Kontrol Grubu (n=81)	p-değeri
Yaş (yıl)	66.33 ±13.49	45.17 ± 15.58	0.001
Cinsiyet (Erkek/Kadın)	56/44	32/49	0.036
VKİ (kg/m <sup>2</sup> )	26.79 ±4.92	27.95 ± 5.63	0.143
HDL-C (mg/dl)	38.33 ± 10.43	47.23 ±14.11	0.001
LDL-C (mg/dl)	86.86 ±28.96	101.31 ± 37.97	0.004
Total Kolesterol (mg/dl)	151.24 ±35.69	184.69 ±51.01	0.001
Trigliserit (mg/dl)	129.29 ±62.27	174.04 ±118.77	0.001
Ejeksiyon fraksiyonu (%)	34.14 ±10.92	60.55 ±4.03	0.001
Hemoglobin (g/dl)	14.79 ±14.76	14.21 ±2.18	0.730
Hemotokrit (%)	45.23 ±29.78	43.44 ±5.96	0.597
Üre (mg/dl)	56.91 ±34.42	27.60 ±10.94	0.001
Kreatinin (mg/dl)	3.92 ±21.31	0.76 ±0.24	0.184
Kreatin kinaz (U/L)	110.51 ±140.09	109.82 ±115.53	0.972
ALT (U/L)	45.53 ±196.20	18.18 ±9.82	0.212
Troponin (ng/ml)	1.01 ±2.93	0.73 ±2.26	0.469
Na (mEq/L)	136.5 ±3.74	138.28 ±3.29	0.001
-K (mEq/L)	4.68 ±0.76	4.32 ±0.46	0.001
Nabız	81.91 ±15.39	81.24 ±12.34	0.754
Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	120.90 ±16.72	119.59 ±17.83	0.612
Diastolik Kan Basıncı (mmHg)	71.83 ±10.79	74.22 ±10.44	0.134
Diabet	44	26	0.215
Sigara	26	22	0.865
Hipertansiyon	47	33	0.546

VKİ: Vücut kitle indeksi; HDL-C: High-density lipoprotein kolesterol, LDL-C: Low-density lipoprotein kolesterol, ALT: Alanin amino transferaz, Na: Sodyum, K: Potasyum.

Bu çalışmada, hasta ve kontrol gruplarında *NOS3* geni c.-51-762C>T (sırasıyla  $X^2 = 0.55$  ve 0.44) ve c.894T>G (sırasıyla  $X^2 = 0.09$  ve 0.6) polimorfik alanların genotip oranlarının Hardy-Weinberg dengesiyle uyumlu olduğu belirlendi (p>0.05). Böylece elde edilen genotip oranlarının Hardy-Weinberg dengesine uygun olduğu tespit edildi.



PCR-RFLP tekniğine göre *NOS3* geninin her iki polimorfik noktasına yönelik yapılan çalışmalardan hasta ve kontrol grubunda elde edilen genotip ve allel oranlarının Fisher's Exact testi ile yapılan değerlendirilmesi Tablo 3'de gösterilmektedir. Hasta ve kontrol grubunda *NOS3* geni c.-51-762C>T polimorfizm oranları Fisher exact testi yönünden incelendiğinde; hastaların CT (%47.0) genotipi ve TT (%25.0) genotip oranları kontrol grubundaki CT (%45.7) ve TT (%24.7) değerlere göre daha yüksek olsa da aralarında istatistiki bir farkın olmadığı görüldü ( $p>0.05$ ). Bunun yanında hasta grubunda c.894T>G polimorfik noktasına ilişkin TG (%41.0) ve GG (%23.0) genotip oranları kontrol grubundaki TG (%46.9) ve GG (%23.5) genotip oranlarından daha düşük oldukları tespit edilse de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p>0.05$ ) (Tablo 3).

**Tablo 4.3.** Hasta ve Kontrol gruplarında *NOS3*: c.-51-762C>T ve *NOS3*: c.894T>G Polimorfizm Oranlarının Dağılımı.

SNP Genotip/Allel	Kalp Yetmezliği Grubu (n=100)	Kontrol Grubu (n=81)	X <sup>2</sup>	OR (95% CI)	p-değeri
<b><i>NOS3</i>:c.-51-762C&gt;T</b>					
<b>Genotip</b>					
CC	28 (%28.0)	24 (%29.6)	1.167	Referans	Referans
CT	47 (%47.0)	37 (%45.7)	0.087	1.055 (0.586-1.898)	0.882
TT	25 (%25.0)	20 (%24.7)	0.000	1.017 (0.516-2.003)	1.000
<b>Allel</b>					
C	103 (%51.5)	85 (%52.5)	0.034	Referans	Referans
T	97 (%48.5)	77 (%47.5)	0.034	1.040 (0.687-1.574)	0.916
<b><i>NOS3</i>:c.894T&gt;G</b>					
<b>Genotip</b>					
TT	36 (%36.0)	24 (%29.6)	0.820	Referans	Referans
TG	41 (%41.0)	38 (%46.9)	0.636	0.786 (0.435-1.420)	0.454
GG	23 (%23.0)	19 (%23.5)	0.005	0.975 (0.487-1.950)	1.000
<b>Allel</b>					
T	113 (%56.5)	86 (%53.1)	0.421	Referans	Referans
G	87 (%43.5)	76 (%46.9)	0.421	0.871 (0.575-1.321)	0.526

X<sup>2</sup> = Ki Kare, OR = olasılık oranı, CI = güven aralığı, SNP = Tek Nükleotid Polimorfizmi.

Ayrıca, kalp yetmezliği taşıyan hastaların *NOS3* geni c.-51-762C>T alanı CC genotip (yabani tip, normal) ve TT genotipli (polimorfik) hastalar arasında incelenen klinik ve demografik parametreler bakımından troponin dışında diğer parametreler arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ). Ek olarak, KY taşıyan hastaların *NOS3* geni c.894 alanı TT genotip (yabani tip, normal) ve GG genotipli (polimorfik) hastalar arasında hipertansiyon taşıma sıklığı bakımından her iki grup

arasında hafif de olsa istatikselsel olarak anlamlı fark belirlendi ( $p<0.05$ ). Her iki grup arasında Yaş, VKİ, HDL-C, LDL-C, T. Kolesterol, Trigliserit, EF, Hb, Hemotokrit, Üre, Kreatinin, Kreatin kinaz, ALT, Na, K, Nabız, Sistolik ve Diastolik Kan Basıncı değerleri ile Diyabete sahip olma ve Sigara içiciliği yönünden anlamlı bir fark görülmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 4).

**Tablo 4.4.** Kalp yetmezliği hastalarında NOS3 geni normal ve polimorfik genotipler arasında demografik ve klinik parametrelerin değerleri.

	c.-51-762C=			c.894T>G		
	CC	TT	p-değeri	TT	GG	p-değeri
Genotip	CC	TT		TT	GG	
Bireyler (n)	28	25		36	23	
Yaş (yıl)	63.14±13.9	66.16±16.64	0.461	66.66±11.34	66.08±13.78	0.861
VKİ (kg/m <sup>2</sup> )	27.82±5.61	27.06±5.8	0.630	26.25±5.26	27.26±3.82	0.428
HDL-C (mg/dl)	36.37±9.82	38.28±9.4	0.475	39.13±11.69	35.93±9.07	0.269
LDL-C (mg/dl)	84.75±29.18	88.82±28.75	0.612	80.71±23.27	87.01±30.82	0.376
Total Kolesterol (mg/dl)	146.07±35.24	152.6±36.25	0.510	145.52±31.94	152.91±40.71	0.440
Trigliserit (mg/dl)	135.64±58.61	118.04±59.25	0.283	123.16±58.55	131.04±67.82	0.638
EF (%)	36.60±11.67	34.72±11.26	0.553	34.88±10.57	34.26±12.96	0.839
Hemoglobin (g/L)	18.11±27.72	13.22±2.20	0.384	17.17±24.40	13.57±2.83	0.486
Hematokrit (mg/dl)	50.72±55.54	42.19±6.13	0.449	41.94±6.49	42.78±8.40	0.670
Üre (mg/dl)	61.26±41.69	47.48±21.81	0.145	59.97±41.58	58.14±40.68	0.869
Kreatinin (mg/dl)	1.25±0.94	4.05±15.20	0.335	6.77±33.30	1.15±0.70	0.423
Kreatin kinaz (U/L)	119.06±170.23	121.82±187.0	0.955	127.19±154.45	106.26±174.92	0.632
ALT (U/L)	107.67±367.16	21.4±14.98	0.246	35.41±59.32	17.86±10.62	0.167
Troponin (ng/ml)	0.27±0.86	2.31±5.17	0.045	1.18±3.00	0.82±2.39	0.629
Na (mEq/L)	137.28±3.56	135.56±3.97	0.102	136.80±3.23	135.34±4.64	0.161
K (mEq/L)	4.57±0.66	4.74±0.65	0.356	4.56±0.72	4.86±0.90	0.174
Nabız	83.96±17.33	81.16±15.72	0.542	83.16±17.13	81.73±15.09	0.745
Büyük Kan Basıncı	121.07±15.49	117.72±17.28	0.460	119.02±16.63	120.60±19.56	0.741
Küçük Kan Basıncı	72.96±9.70	69.40±10.97	0.215	70.75±11.01	69.78±12.58	0.757
Diabet	13	13	0.786	16	11	1.000
Sigara	7	7	1.000	7	6	0.748
Hipertansiyon	14	16	0.407	13	15	0.036

Ortalama ± standart sapma, c.-51-762C>T alanı CC genotipi (normal) ve TT (polimorfik) ile c. 894T>G TT (normal) ve GG (polimorfik)

## 5. TARTIŞMA

KY hastalığı üzerinde *NOS3* geni c.-51-762C>T ile c.894T>G polimorfik noktalarının genotip ve allel oranlarının etkisinin olup olmadığının açığa çıkarılması için yaptığımız çalışmamızda; c.-51-762 CT ve TT genotipleri ile T allelleri oranları kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlense de istatistiksel olarak anlamsız olduğu tespit edildi ( $p>0.05$ ). Çalışılan bu polimorfik nokta *NOS3* geninin protein kodlamayan promotör dizisi üzerindedir. Bu bölge genin ekspresyonunda düzenleme rolü almaktadır. NCBI'daki son veriye göre bu nokta, genin ilk intronu üzerindedir. Ancak genin ilk eksonu kod taşımadığı için ilk ekson ve ilk intron promotora dahil olmaktadır. Endotel fonksiyonunun kalıtım derecesini değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Terzi ve arkadaşları çalışmalarında; *NOS3* geni c.-51-762C>T polimorfizminin CC ve TT genotiplerini taşıyan KY hastaları ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiş, ancak CC ve TT genotipleri hastaların mortalitesi arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Ayrıca bu çalışma ile KY hastaları ile kontrol grubunda hipertansiyon ve diyabet taşıyan bireyler arasında da bir fark bulunmamıştır (97). *NOS3* geni polimorfizmleri ve çevresel faktörler arasında çeşitli etkileşimler olduğu bildirilmiştir. Hint toplumunda koroner kalp hastalarında yapılan bir çalışmada; *NOS3* geni -51-762C>T allel ve genotip frekansları ve haplotiplerinin hasta ve sağlık kontrol grubu arasında anlamlı şekilde farklı oldukları bulunmuştur (98). Çin toplumunda yapılan başka bir çalışmada *NOS3* geni -51-762C>T polimorfizminin koroner arter hastalığı için risk taşıdığı belirlenmiştir. Meta-analizi çalışma sonuçları, *NOS3* c.-51-762C>T polimorfizminde T allelinin koroner arter hastalığı için risk oluşturabileceği ifade edilirken, bunu teyit eden az sayıda çalışmanın olduğu vurgulanmıştır (99).

Çalışmamızda, KY hasta ve kontrol grubunun bireyleri yaş, cinsiyet, VKİ, HDL-C, LDL-C, Total Kolesterol, Trigliserit, Ejeksiyon fraksiyonu, Hemogloblin, Hemotokrit, Üre, Kreatinin, Kreatin kinaz, ALT, Troponin, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Nabız, Sistolik Kan Basıncı, Diastolik Kan Basıncı, Sigara, Diyabet ve Hipertansiyon gibi klinik ve demografik parametreler arasında istatistiki karşılaştırma yapıldı. Hasta ve kontrol grubu bireylerinin ortalama yaş değerleri arasında değerlendirme yapıldığında, hasta grubu yaş ortalamasının kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). Bunun sebebinin, KY hastalığının ileri yaşlarda olması ve bu yaş aralığında sağlıklı kontrol grubu bireylerinin bulunamamasından dolayı olduğunu düşünmekteyiz.

Yaşla ilgili yapılan önceki çalışmalarda hem kalp yetmezliği insidansı ve hem de kalp yetmezliği prevalansı, risk faktörlerinin kontrol altına alınmasıyla sağ kalımın iyileştirilmesi sonucu koroner arter hastalığı ve kalp yetmezliğinin ileri yaşları kapsadığı bildirilmiştir. *NOS3* geni polimorfizmlerinin hipertansiyon, preeklampsi, felç ve diyabet ile ilişkisi belirsizliğini korumaktadır (29).

Aynı şekilde çalışmamızda hasta ve kontrol grubu bireylerinde cinsiyet dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu görmekteyiz. Ancak önceden yapılan çalışmalarda erkeklerin kadınlara göre her yaşta kalp yetmezliği insidansı biraz daha yüksektir, kadınlar yaşlı nüfusun daha büyük bir bölümünü (%51) temsil ettiğinden, kalp yetmezliği kadınlarda daha fazla görülmektedir (29). Framingham çalışmasında teşhisten sonra, sağ kalım süresi kadınlarda 3.2 yıl iken, erkeklerde 1.7 yıl olmaktadır. KY'nde ölüm riski birçok kanser çeşidinden daha yüksektir. Ayrıca izlem çalışmalarında 5 yıllık mortalite erkeklerde %62, kadınlarda %42 olarak bulunmuştur (30). Böylece cinsiyetin mortalite üzerinde anlamlı olmayan bir etkisi söz konusudur.

Kalp yetmezliği sendromu küresel bir sağlık sorunudur. Kalp yetmezliği olan hastaların durumu, önemli ölçüde morbidite ve sağ kalım yönünden kanser hastalarına benzemektedir (100, 101). Kalp yetmezliği çok büyük sağlık harcamalarına neden olmaktadır. Son zamanlarda yayınlanan bir dizi rapor, kalp yetmezliği ile yaşayan insan sayısında yaşanan nüfus nedeniyle ciddi bir artış olduğunu göstermektedir (8, 9, 102, 103). On yıllık süreç içinde pek çok Orta Doğu ile Batı ülkeleri kalp yetmezliği ve risk teşkil eden diabetes mellitus, obezite ve hipertansiyon gibi risk faktörleri karşılaştırılmış ve bu hastalıkların prevalansında artışlar gözlemlenmiştir (104).

Bizim çalışmamızda, hasta grubunda HDL-C, LDL-C, Total Kolesterol, Trigliserit, Ejeksiyon fraksiyonu kontrol grubuna göre daha düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Ek olarak hasta grubunda üre kontrol grubuna göre daha yüksek ve bu değer iki grup arasında anlamlı olduğu görülmektedir. Ayrıca hasta grubunda  $Na^+$  iyonu, kontrol grubuna göre daha düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, hasta grubunda  $K^+$  iyonu kontrol grubuna göre daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Bunun yanında hasta grubunda sistolik ve diastolik kan basıncı değerleri ile kontrol grubunun sistolik ve diastolik kan basıncı değerleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ). Her iki çalışma grubunda bireylerin sigara, diyabet ve hipertansiyon değerleri açısından anlamlı bir fark tespit edilemedi. Polonya'da farklı

toplumlar üzerinde yapılan bir çalışmada KY hasta grubu ile kontrol grubu arasında sistolik ve diastolik kan basıncı arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür (105). Sigara kullanımı, özellikle Asya popülasyonlarında intron 4 ve c.51-762 C>T polimorfizmleri çalışmalarda ana odak noktası olmuştur. Sigara içiminin intron 4 üzerinde 27 baz çiftlik tekrar polimorfizmi ile koroner darlık arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (106).

Hint toplumunda koroner kalp hastalarında yapılan bir çalışmada; koroner kalp hastalığı için yaş, kan basıncı, obezite, diabetes mellitus, sigara, vejeteryan diyet, aile öyküsü gibi risk faktörü oranlarının kontrollere göre anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir (98, 107). Diğer bir çalışmaya göre KY hasta bireylerin klinik parametrelerinden trigliserit dışında kalan VKİ, HDL, LDL, total kolesterol ve diabet yönünden istatistiki bir farkın olmadığı bulunmuştur (90). Ayrıca çalışmamızda EF değeri, KY ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve bu parametre KY'liğinde çok önemlidir. Zira KY hastalarında bulunan EF değeri sağlıklı kontrol bireylerinden oldukça düşük bulunmuştur. Amerikan toplumunda düşük KY'li hastaların %40'ının fazlasında izole diastolik fonksiyon bozukluğu tespit edilmiştir. Ejeksiyon fraksiyonu ve diastolik fonksiyon bozukluğu arasında ilişki bulunurken ve düşük EF'li KY hastalarında yüksek mortalite oranı bulunmuştur (98).

Çalışmamızda incelediğimiz *NOS3* geni 7. eksonu üzerinde bulunan c.894T>G polimorfik noktasında T olması nitrik oksit sentaz 3 enziminde Aspartat (Asp) aminoasidinin olduğunu ve T'in yerine G'nin gelmesi ile enzim protein dizisinin 298. pozisyonunda Asp amino asidi Glutamin (Glu) amino asidine dönüşmektedir. Bu aminoasit değişimi enzimde fonksiyon bozukluğuna neden olmamaktadır. Ancak enzimin moleküler yapısında farklılık yaparak kişiye avantaj veya dezavantaj sağlayabilmektedir. Vasküler endotelyumda eksprese edilen *NOS3* geninin c.894T>G polimorfik noktasının kardiyovasküler hastalıklarda risk faktörü araştırmalarında allellerinin kalıtımında bireyler arası farklılıkların etkili olduğu bildirilmiştir (34, 88, 90). Çalışmamızda c.894 TG ile GG genotipleri ve G alleli oranlarının hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirledik. Çalışmaya göre genin bu polimorfik noktasının KY üzerinde bir risk oluşturmadığını düşünmekteyiz. Ülkemizde yapılan bir çalışmada koroner arter hastalığı taşıyan hastalarda *NOS3* geni c.894T>G genotip oranları araştırılmış ve sonucun kontrol grubundan farklı olmadığı gösterilmiştir (10). Hint toplumu çalışmasında koroner kalp hastalığında c.894T>G polimorfizmlerinin anlamlı olmadığı

bulunmuştur (108). İsrail toplumunda ise sistolik KY hastalarında yapılan *NOS3*: c.894T>G polimorfizm oranları ile mortalite arasında bir ilişki bulunmuştur (109). Hint toplumu üzerinde yapılan başka bir çalışmada; dilate kardiyomiyopati, sistolik disfonksiyonun ardından kalp nakli gerektiren kalp yetmezliği hastalarında *NOS3* geni varyantlarının (c.-51-762C>T, c.894T>G ve intron 4 üzerinde 27 baz çiftlik ardışık tekrar dizisinin) haplotip analizi sonucu risk oluşturdukları bulunmuştur (110). Multi-etnik yapıya sahip Brezilya toplumunda Afrika kökenliler ile yerli kalp yetmezliği hastalar arasında *NOS3* c.894T>G polimorfizm sonuçları arasında farklar bulunmuştur. Afrika kökenlilerde genotip oranlarının yerlilere göre yüksek olduğu ve ülkenin değişik coğrafyalarında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Aynı şekilde, KY hastalarında klinik, ekokardiyografik ve genotip analizi c.894 allel ve hipertansiyon arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (111). Bir başka Brezilya toplumunda yapılan bir çalışmada; kökeni Avrupa, Afrika ve Kızılderili'lerden oluşan farklı toplumlardaki kalp yetmezliği hastaları üzerinde yapılan *NOS3* geni c.894T>G polimorfik alanların genotip ve allel oranları arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir (19, 112). Amerikan toplumunda kongestif kalp yetmezliği hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada; *NOS3* promotörü üzerindeki c.-51-762C>T polimorfik homozigotlu bireylerde, önemli dengesizliğe yol açtığı ve ani ölümlere sebep olduğu belirlenmiştir (113).

KY grubu içinde *NOS3*:c.-51-762C>T ile c.894T>G polimorfik noktaları bakımından homozigot normal ile homozigot polimorfik bireylerin oluşturduğu alt grupların bireylerinde tespit edilen klinik parametreleri arasında önemli farkların olup olmadığını belirlemek için ayrı bir değerlendirme yaptık. Bu değerlendirmeye göre KY hastalarında c.-51-762C>T polimorfik alanda CC (normal) ve TT genotipli (polimorfik) alt gruplarda incelenen klinik parametrelerden troponin dışında diğer parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ). Troponin değeri polimorfik olan TT genotipi taşıyan bireylerde daha yüksek bulundu. Troponinin yükselmesi miyosit (kas lifi) nekrozunun bir göstergesidir (114). Çalışmamızda kullanılan KY'liğinde troponin yükselmesi hastalarda miyosit hasarının olduğunu göstermektedir.

Ek olarak, kalp yetmezliği taşıyan hastaların *NOS3* geni c.894 alanı TT genotip (normal) ve GG genotipli (polimorfik) hastalar arasında hipertansiyon bakımından istatistiksel olarak fark olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). GG genotipli (polimorfik) bireylerin normal genotipli bireylere göre daha fazla hipertansiyona sahip oldukları tespit edildi.

Günümüzde hipertansiyonun hem kalp yetmezliği hem de koroner kalp hastalığı gelişim sürecinde rol oynamaktadır (115, 116).

Böylece çalışmamızın sonuçları, dünyanın değişik coğrafyalarında yapılan bazı çalışma sonuçlarıyla paralellik gösterirken, bazılarıyla zıt görünmektedir. Endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler risk faktörleriyle ilişkilidir ve kardiyovasküler hastalıkların oluşumuna katkısı büyüktür. Endotel NOS enziminin fonksiyonuna dolayısıyla KY hastalığı için risk oluşturup oluşturmadığının bilinmesi önemlidir. Bizim çalışmanın da dahil olduğu birçok çalışmada incelenen birey sayısının az olması sonuçların ortak bir noktada birleşmesine engel olduğunu düşünmekteyiz. Moleküler mekanizmaları ve klinik sonuçları daha iyi anlamak ve özellikle spesifik gen polimorfizmleri olan hastaların tıbbi ve girişimsel tedaviden fayda sağlayıp sağlayamayacaklarını değerlendirmek için daha fazla bireyi kapsayan daha çok sayıda araştırmaya ihtiyaç bulunduğu birçok çalışmada ifade edilmiştir (90, 117).

Özellikle, güvenilir bir sonuç elde etmek için, daha geniş bir çalışma popülasyonu üzerinde çalışılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca farmakogenetik stratejiler için potansiyel hedef olan gen polimorfizmleri ve tıbbi tedaviler arasında bir bağlantı olup olmadığını anlamak içinde ek klinik araştırmalara da ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamıza göre;

1. *NOS3*: c.-51-762C>T polimorfizmi ile KY arasında herhangi bir ilişki belirlenmedi.
2. *NOS3*: c.-51-762C>T CT ve TT şeklinde belirlenen heterozigot ve homozigot polimorf genotipe sahip KY bireylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir fark bulunmadı.
3. *NOS3*: c.-51-762C>T polimorfimik noktasında T alleli oranının KY riskini artırmadığı belirlendi.
4. *NOS3*: c.894T>G TG ve GG olarak belirlenen heterozigot ve homozigot polimorf genotipe sahip KY bireylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmedi.
5. *NOS3*: c.894T>G polimorfimik noktasında G alleli oranının KY üzerinde bir risk oluşturmadığı belirlendi.

Sonuçlarımıza göre, *NOS3* geninin diğer polimorfizmleri ile kalp yetmezliği arasındaki ilişki araştırılabilir. KY ile ilişkili olabileceği düşünülen gen veya genlerin polimorfik noktaları ile ilgili çalışmalarda, kesin sonuç elde etmek için hasta sayısı artırılarak ve farklı coğrafyalarda yaşayan insanları kapsayacak ileri araştırmaların yapılmasını önermekteyiz.



## 7. KAYNAKLAR

1. Özenci M. Kalp Yetersizliği: Klinik ve Tedavi. İçinde: Klinik Kardiyoloji. Ed: Çetin E, Kozan Ö, Sansoy V, Nobel Tıp Kitabevleri. Ankara: 2004. s.285-317.
2. Drexler H, Hasenfuss G. Normal ve Yetmezlik Durumundaki Kalbin Fizyolojisi. İn: Crawford Kardiyoloji. 1.baskı, 2. Cilt. Çeviren: Ülker T, AND Danışmanlık, Eğitim, Yayıncılık ve Organizasyon. İstanbul: 2003.
3. Değertekin M, Çetin E, Ergene O, Tokgözoğlu L, Aksoy M, Erol MK, ve ark. Türkiye’de kalp yetersizliği prevalansı ve öngördürücüler: HAPPY çalışması. Türk Kardiol Dern Arş. 2012 Jun;40(4):298-308.
4. Massie BM. Kronik Kalp Yetmezliği Olan Hastanın Yönetimi. İçinde: Crawford Kardiyoloji. 1.baskı, 2. Cilt. Çeviren: Ülker T, AND Danışmanlık, Eğitim, Yayıncılık ve Organizasyon. İstanbul: 2003.
5. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. J Biol Chem 1993 Aug 15;268(23):17478-88.
6. Maksoud SA, Ibrahim S, Samir F, Abou-Aisha K, Z Gad M. Correlation of Glu298Asp eNOS Polymorphism with Serum NO Levels in Egyptian Patients with Coronary Artery Disease. British Journal of medicine and Medical research 2013 May;3(4):1678-1687.
7. Lin NT, Lee MJ, Lee RP, Hong AI, Chen HI. Analysis of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with cardiovascular diseases in eastern Taiwan. Chin J Physiol 2008 Feb 29;51(1):42-7.
8. Gamil S, Erdmann J, Abdalrahman IB, Mohamed AO. Association of NOS3 gene polymorphisms with essential hypertension in Sudanese patients: a case control study. BMC Med Genet 2017 Nov 13;18(1):128.
9. Heidari MM, Khatami M, Tahamtan Y. Molecular Analysis of rs2070744 and rs1799983 Polymorphisms of NOS3 Gene in Iranian Patients with Multiple Sclerosis. Basic Clin Neurosci 2017 Jul-Aug;8(4):279-284.
10. Yılmaz Aydoğan H, İlikay S, Buğra Z, Öztürk O. Metabolic Effects of the rs1799983 Variation (Glu298Asp) of the Endothelial Nitric Oxide Synthase in Coronary Heart Disease. Deneysel Tıp Dergisi 2016 Aralık 1;6(12):21-31.
11. Sendesni R, Grira N, Lamine O, Aboukasssem S, Ayoub M, Stambouli N, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Glu298Asp Gene Polymorphism (G894T) as a Risk Factor for Type 2 Diabetes Mellitus in the Tunisian Population 2018 Jan;5:1-9.
12. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br J Pharmacol 2006 Jan;147:193-201.

13. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. The role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, G894T, and 4a/b gene polymorphisms in the risk of idiopathic male infertility. *Mol Reprod Dev* 2010 Aug;77(8):720-7.
14. Söylemez B, Özüm Ü. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 (27 base pair repeat) and promoter T786C polymorphism in patient with ruptured intracranial aneurysm. *Cumhuriyet Med J* 2013 Mar;35:400-406.
15. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium e Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis* 2016 May;248:97-109.
16. Bian K, Doursout MF, Murad F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2008 Apr;10(4):304-10.
17. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993 Dec 30; 329(27):2002-12.
18. Moreno H Jr, Metze K, Bento AC, Antunes E, Zatz R, de Nucci G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. *Basic Res Cardiol* 1996 May-Jun;91(3):248-55.
19. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006 Apr 4;113(13):1708-14.
20. Craven PA, DeRubertis FR. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem* 1978 Dec 10;253(23):8433-43.
21. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 2010 Sep;62(3): 525-63.
22. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, et al. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature* 2000 Mar 9;404(6774):197-201.
23. Cooke GE, Doshi A, Binkley PF. Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease. *Pharmacogenomics* 2007 Dec;8(12):1723-34.
24. Wilke RA, Simpson RU, Mukesh BN, Bhupathi SV, Dart RA, Ghebranious NR, et al. Genetic variation in CYP27B1 is associated with congestive heart failure in patients with hypertension. *Pharmacogenomics*. 2009 Nov;10(11):1789-97.
25. NCBI: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846?report=gene\\_table](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846?report=gene_table).
26. Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: quo vadis? *Curr Opin Biotechnol* 2011 Oct;22(5):698-705.

27. Onwuka E, King N, Heuer E, Breuer C. The Heart and Great Vessels. Cold Spring Harb Perspect Med 2018 Mar 1;8(3).
28. Eric P. Widmaier, Hershel Raff, Kevin T. Strang. Vander's Human Physiology. 11<sup>th</sup> Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc., 1221 Avenue of the Americas, New York, NY 10020. P. 361.
29. Murphy JG, Lloyd MA. Mayo Clinic Cardiology Concise Textbook. 3<sup>rd</sup> Edition. Mayo Clinic, and Mayo Clinic Scientific Press. Rochester, Kanada, 2007; 1069.
30. Tsao CW, Vasan RS. Cohort Profile: The Framingham Heart Study (FHS): overview of milestones in cardiovascular epidemiology. Int J Epidemiol. 2015 Dec;44(6):1800-13.
31. Kosiborod M, Soto GE, Jones PG, Krumholz HM, Weintraub WS, Deedwania P, et al. Identifying heart failure patients at high risk for near-term cardiovascular events with serial health status assessments. Circulation 2007 Apr 17;115(15):1975-81.
32. Goodlin SJ. Palliative care in congestive heart failure. J Am Coll Cardiol 2009 Jul 28;54(5):386-96.
33. Morshed M, Chowdhury EH. Encyclopedia of Biomedical Engineering. Gene Delivery and Clinical Applications. 2019; 345-351.
34. Binanay C, Califf RM, Hasselblad V, O'Connor CM, Shah MR, Sopko G, et al. Evaluation study of congestive heart failure and pulmonary artery catheterization effectiveness: the ESCAPE trial. JAMA 2005 Oct 5;294(13):1625-33.
35. Simon GP, Martin RC. Heart failure: classification and pathophysiology. Science Direct 2014 Oct;42(10):556-561.
36. <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/16950-ejection-fraction>.
37. <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-failure/diagnosing-heart-failure/ejection-fraction-heart-failure-measurement>.
38. Basuray A, French B, Ky B, Vorovich E, Olt C, Sweitzer NK, et al. Heart failure with recovered ejection fraction: clinical description, biomarkers, and outcomes. Circulation 2014 Jun 10;129(23):2380-7.
39. Webb J, Draper J, Fovargue L, Sieniewicz B, Gould J, Claridge S, et al. Is heart failure with mid range ejection fraction (HFmrEF) a distinct clinical entity or an overlap group. J Cardiol Heart Vasc 2018 Sep 6;21:1-6.
40. Özenci M. Kalp Yetersizliği: Klinik ve Tedavi. İçinde: Klinik Kardiyoloji. Eds: Çetin E, Kozan Ö, Sansoy V, Nobel Tıp Kitabevleri. Ankara. 2004: 285-317.

41. Gary SF, Pathak A. (2003). Sistolik Disfonksiyona Bağlı Konjestif Kalp Yetmezliği. İçinde: Crawford Kardiyoloji. 1.baskı, 2. Cilt. Çeviren: Ülker T, AND Danışmanlık, Eğitim, Yayıncılık ve Organizasyon. İstanbul.
42. Gustavo H, Paula O, Lacchini R, Jose E, Santos T. Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases. Nitric Oxide 2017 Feb 28;63:39-51.
43. Piech A, Massart PE, Dessy C, Feron O, Havaux X, Morel N, et al. Decreased expression of myocardial eNOS and caveolin in dogs with hypertrophic cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002 Jan;282(1):219-231.
44. Tang L, Wang H, Ziolo MT. Targeting NOS as a therapeutic approach for heart failure. Pharmacol Ther 2014 Jun;142(3):306-15.
45. McNamara DM, Tam SW, Sabolinski ML, Tobelmann P, Janosko K, Venkitachalam L, et al. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) polymorphisms in African Americans with heartfailure: results from the A-HeFT trial. J Card Fail 2009 Apr;15(3):191-8.
46. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. Curr Vasc Pharmacol 2012 Jan;10(1):4-18.
47. Weibel ER, Palade GE. New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. J. Cell Biol 1964 Oct;23:101-12.
48. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. Circ Res 2007 Feb 2;100(2):158-73.
49. Bennett HS, Luft JH, Hampton JC. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. Am J Physiol. 1959 Feb;196:381-90.
50. Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. In Moncada S, Higgs A (eds). Handbook of Pharmacology: The vascular endothelium I. 2006; 2-40.
51. Félétou M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells - Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
52. Pankaj Goyal. Dual function of LIMK2 in endothelial cells. Münih Ludwig Maximilians Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde insan biyolojisi doktora tezi, In Introduction. 2005: 1.
53. Fischer C, Schneider M, Carmeliet P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. In Moncada S, Higgs A (eds) Handbook of Pharmacology: The vascular endothelium II. 2006; 157–212.
54. Kalebic T, Garbisa S, Glaser B, Liotta LA. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. Science 1983 Jul 15;221(4607):281-3.

55. Huttner IG, Gabbiani G Vascular endothelium in hypertension. In: J. Genest, O. Kuchel, P. Hamet, M. Cantin (eds) Hypertension, McGraw-Hill, New York, 1983; 473-488.
56. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 2000 Sep;440(5):653-66.
57. Widmaier EP, Raff H, Strang K. Vander's Human Physiology. 11<sup>th</sup> Edition. The McGraw-Hill Companies, 1221 Avenue of the Americas, New York, 2019: 361.
58. Barbato JE, Tzeng E. Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg* 2004 Jul;40(1):187-93.
59. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615.
60. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999 May 5;1411(2-3):217-30.
61. NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4842>.
62. NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4843>.
63. NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846>.
64. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994 Feb 1;120(3):227-37.
65. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988 Jun 16;333(6174):664-6.
66. NCBI: <https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/7#idiogram>.
67. NCBI: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=NP\\_000594.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=NP_000594.2).
68. Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis* 2001 Feb 15;154(3):521-7.
69. Carnicer R, Crabtree MJ, Sivakumaran V, Casadei B, Kass DA. Nitric oxide synthases in heart failure. *Antioxid Redox Signal* 2013 Mar 20;18(9):1078-99.
70. Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1995 Jun 16;270(24):14582-6.

71. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996 Sep 13;271(37):22810-4.
72. Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jan 19;96(2):657-62.
73. Burkard N, Williams T, Czolbe M, Blömer N, Panther F, Link M, et al. Conditional overexpression of neuronal nitric oxide synthase is cardioprotective in ischemia/reperfusion. *Circulation* 2010 Oct 19;122(16):1588-603.
74. Percival JM, Anderson KN, Huang P, Adams ME, Froehner SC. Golgi and sarcolemmal neuronal NOS differentially regulate contraction-induced fatigue and vasoconstriction in exercising mouse skeletal muscle. *J Clin Invest* 2010 Mar;120(3):816-26.
75. Oceandy D, Cartwright EJ, Emerson M, Prehar S, Baudoin FM, Zi M, et al. Neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart is regulated by the sarcolemmal calcium pump 4b. *Circulation*. 2007 Jan 30;115(4):483-92.
76. NCBI: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846?report=gene\\_table](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846?report=gene_table)
77. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001 Apr;5(2):88-97.
78. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* 1998 Mar;17(1):7-23.
79. Liaudet L, Soriano FG, Szabó C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* 2000 Apr;28(4):37-52.
80. Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993 May;87(5):1468-74.
81. Gilligan DM, Guetta V, Panza JA, García CE, Quyyumi AA, Cannon RO 3rd. Selective loss of microvascular endothelial function in human hypercholesterolemia. *Circulation* 1994 Jul;90(1):35-41.
82. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986 Oct 23;315(17):1046-51.
83. Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991 Dec 21-28;338(8782-8783):1546-50.

84. Cannon RO 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998 Aug;44(8):1809-19.
85. Shibata M, Yamakoshi T, Yamakoshi K. Physiological role of nitric oxide in oxygen consumption by arteriolar wall. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2008;2008:1389-92.
86. Tousoulis D, Antoniades C, Tountas C, Bosinakou E, Kotsopoulou M, Toutouzas P, Stefanadis C. Vitamin C affects thrombosis/ fibrinolysis system and reactive hyperemia in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care* 2003 Oct;26(10):2749-53.
87. Lodish H, Berk A, Kaiser C, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, et al. *Molecular Cell Biology*, 8<sup>th</sup> edition. W. H. Freeman and Company, New York, 2016; 715.
88. Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 2001 Feb;11(2):66-75.
89. Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel JB. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am J Physiol*. 1998 Jan;274(1):214-20.
90. Kose M, Akpınar TS, Bakkaloglu OK, Tufan A, Sumnu A, Emet S, et al. Association of genetic polymorphisms with endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014;18(12):1755-61.
91. Bielecka-Dabrowa A, Sakowicz A, Misztal M, von Haehling S, Ahmed A, Pietrucha T, et al. Differences in biochemical and genetic biomarkers in patients with heart failure of various etiologies. *Int J Cardiol* 2016 Oct 15;221:1073-80.
92. Vecoli C. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in cardiovascular disease. *Vitam Horm* 2014;96:387-406.
93. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2006 Nov 15;164(10):921-35.
94. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988 Feb 11;16:1215.
95. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998 Jun;31(7):1506-10.
96. Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezzullo JC, Abernethy DR, Flockhart DA, et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics*. 2002 Jul;12(5):407-13.

97. Terzi S, Emre A, Yesilcimen K, Yazıcı S, Erdem A, Sadik Ceylan U, et al. The Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS3-786T>C) Genetic Polymorphism in Chronic Heart Failure: Effects of Mutant -786C allele on Long-term Mortality. *Acta Cardiol Sin.* 2017 Jul; 33(4): 420-428.
98. Bursi F, Weston SA, Redfield MM, Jacobsen SJ, Pakhomov S, Nkomo VT, et al. Systolic and diastolic heart failure in the community. *JAMA* 2006 Nov 8;296(18):2209-16.
99. Liu D, Jiang Z, Dai L, Zhang X, Yan C, Han Y. Association between the -786T>C polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Gene* 2014 Jul 15;545(1):175-83.
100. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2001 Jun;3(3):315-22.
101. Stewart S, Ekman I, Ekman T, Odén A, Rosengren A. Population impact of heart failure and the most common forms of cancer: a study of 1 162 309 hospital cases in Sweden (1988 to 2004). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2010 Nov;3(6):573-80.
102. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2017 Sep 5;135:146-603.
103. Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, Bluemke DA, Butler J, Fonarow GC, et al. Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail* 2013 May;6:606-19.
104. Al-Shamiri MQ. Heart failure in the Middle East. *Curr Cardiol Rev.* 2013 May;9(2):174-8.
105. Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation* 2008 Oct 28;118(18):1864-80.
106. 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 Jan;2(1):41-5.
107. Kumar GR, Spurthi KM, Kumar GK, Aiyengar TM, Chiranjeevi P, Nivas S, et al. Genetic polymorphisms of eNOS (-786T/C, Intron 4b/4a & 894G/T) and its association with asymptomatic first degree relatives of coronary heart disease patients. *Nitric Oxide* 2016 Nov 30;60:40-49.



108. Saini V, Bhatnagar MK, Bhattacharjee J. Association of endothelial dysfunction with endothelin, nitric oxide and eNOS Glu298Asp gene polymorphism in coronary artery disease. *Dis Markers*. 2011;31(4):215-22.
109. Azzam N, Zafrir B, Fares F, Smith Y, Salman N, Nevzorov R, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism and prognosis in systolic heart failure patients. *Nitric Oxide* 2015 May 1;47:91-6.
110. Matsa LS, Rangaraju A, Vengaldas V, Latifi M, Jahromi HM, Ananthapur V, et al. Haplotypes of NOS3 gene polymorphisms in dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 2013 Jul 29;8(7):e70523.
111. Velloso MW, Pereira SB, Gouveia L, Chermont S, Tardin OM, Gonçalves R, et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in a multi-ethnic population with heart failure and controls. *Nitric Oxide* 2010 Apr 1;22(3):220-5.
112. Oliveira RVM, Albuquerque FN, Duque GS, Freitas RGA, Carvalho EF, Brandão AA, et al. Heart failure and endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism frequency variations within ancestries. *Nitric Oxide* 2018 Feb 28;73:60-65.
113. Binkley PF, Nunziatta E, Liu-Stratton Y, Cooke G. A polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase promoter is associated with an increase in autonomic imbalance in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 2005 Feb;149(2):342-8.
114. Celebi OO, Diker E, Aydogdu S. [Clinical importance of cardiac troponins]. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2008 Jun;36(4):269-77.
115. Başgöz BH, Sağlam K. Hipertansiyon ve Kalp. *Turkiye Klinikleri J Cardiol-Special Topics*. 2017 ;10(3):187-91.
116. Tanus-Santos JE, Casella-Filho A. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and susceptibility to hypertension: genotype versus haplotype analysis. *Hypertension*. 2007 Jan;49(1):E1.
117. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*. 2001 Feb;2(2):91-9.

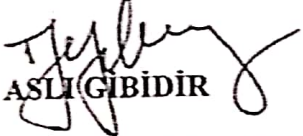
## 8. EKLER



EK-1: ETİK KURUL KARARI

Evrak Tarih ve Sayısı: 12/09/2018-E.35064

<b>HARRAN ÜNİVERSİTESİ</b> <b>TIP FAKÜLTESİ</b> <b>Etik Kurul Kararı</b>	
<b>TARİH</b>	: 06.09.2018
<b>OTURUM</b>	: 09
<b>SAAT</b>	: 13:00

18/09/15	<p><b>Karar:</b> Üniversitemiz Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ'in Üyesi yürütücüsü olduğu "Kalp Yetmezliğinde Endotel Nitrik Oksit Sentetaz (NOS3) Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması" başlıklı çalışmaya Etik Kurul onayı verilmesine,</p> <p>Oy birliği ile karar verilmiştir.</p> <p style="text-align: center;"> <b>ASLI GİBİDİR</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Prof. Dr. Zehra YILMAZ</b> <b>Etik Kurul Başkanı</b></p>
----------	--

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır



T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

**TEZ ÇALIŞMASI ORJİNELLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ**

**Öğrencinin**

Numarası : 165308001  
Adı, Soyadı : Esmâ ALTUN  
Anabilim Dalı (Bölümü) : Tıbbi Biyoloji AD.  
Programı :  Yüksek Lisans  Doktora  
Tezin Adı: "Kalp Yetmezliğinde Endotel Nitrik Oksit Sentetaz (NOS3) Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması"

**SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

Yukarıda başlığı belirtilen Y. Lisans tezi çalışmamın; *kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç* kısımlarından oluşan toplam 41 sayfalık kısmına ilişkin, 14/05/2019 tarihinde şahsım/ danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, benzerlik oranı %7'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç
- 3- Alıntılar hariç
- 4- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Yukarıda bilgileri verilen tezin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından kabul edilen lisansüstü orijinallik raporu alınması uygulama esasları ile belirlenen azami benzerlik oranlarını aşmadığını ve bütün bilgilerin, akademik kurallara uygun olarak toplanıp sunulduğunu, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı, blok şeklinde alıntılar yapmadığımı ve tüm alıntıların bilimsel atıf kuralları çerçevesinde kaynağını gösterdiğimi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ile Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesinin 8. maddesinde yer alan etik ihlallerden herhangi birisinin yer almadığını, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim. 14/05/2019

**Tezi Hazırlayan Öğrencinin**

Esmâ ALTUN

Yukarıda yer alan raporun ve beyanın doğruluğunu onaylarım. 14/05/2019

**Danışmanın**

Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ



## Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Esmâ Altun  
Ödev başlığı: KALP YETMEZLİĞİNDE ENDOTEL ...  
Gönderi Başlığı: KALP YETMEZLİĞİNDE ENDOTEL ...  
Dosya adı: Tez\_Turnitn.docx  
Dosya boyutu: 3.91M  
Sayfa sayısı: 41  
Kelime sayısı: 8,999  
Karakter sayısı: 61,360  
Gönderim Tarihi: 14-May-2019 09:48AM (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1130198127

T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KALP YETMEZLİĞİNDE ENDOTEL NİTRİK  
OKSİT SENTETAZ (NOS3) GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esmâ ALTUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ

Bu tez, Harran Üniversitesi Dilsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (HÜBAP)  
tarafından 14297 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA-2019

ÖZET

# KALP YETMEZLİĞİNDE ENDOTEL NİTRİK OKSİT SENTETAZ (NOS3) GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% **7**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **5**

İNTERNET  
KAYNAKLARI

Metin

% **4**

YAYINLAR

% **5**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

**1**

old.tkd.org.tr  
İnternet Kaynağı

% **1**

**2**

issuu.com  
İnternet Kaynağı

% **1**

**3**

www.spotidoc.com  
İnternet Kaynağı

% **1**

**4**

Submitted to Harran Üniversitesi  
Öğrenci Ödevi

<% **1**

**5**

istanbulsaglik.gov.tr  
İnternet Kaynağı

<% **1**

**6**

Submitted to Konya Necmettin Erbakan  
University  
Öğrenci Ödevi

<% **1**

**7**

Submitted to Adnan Menderes Üniversitesi  
Öğrenci Ödevi

<% **1**

**8**

Submitted to Istanbul University  
Öğrenci Ödevi

<% **1**

*Orhan İbrahim*

T.C  
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
ULUSAL TEZ MERKEZİ

## TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10263408
Yazar Adı / Soyadı	ESMA ALTUN
T.C.Kimlik No	41453032248
Telefon	5312751398
E-Posta	esmaltun.735@hotmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	Kalp Yetmezliğinde Endotel Nitrik Oksit Sentaz 3 (NOS3) Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması
Tezin Tercümesi	Investigation of Endothelial Nitric Oxide Synthase 3 (NOS3) Gene Polymorphisms in Heart Failure
Konu	Tıbbi Biyoloji = Medical Biology
Üniversite	Harran Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	63
Tez Danışmanları	PROF. DR. FUAT DİLMEÇ
Dizin Terimleri	Moleküler genetik=Molecular genetic ; Kalp yetmezliği=Heart failure
Önerilen Dizin Terimleri	

03.07.2019

İmza:.....  
