

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

156857

**ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ GENİ
4. İNTRON 27 bç VNTR POLİMORFİZMİ VE KORONER
ARTER HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİ**

Dr. Selçuk MATYAR

**TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. Gülen ATTİLA**

UZMANLIK TEZİ

ADANA-2004

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Kıymet Aksoy, Prof. Dr. Levent Kayrın, Prof. Dr. Nurten Dikmen, Doç. Dr. Abdullah Tuli ve Doç. Dr. Mehmet Akif Çürük'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gerek uzmanlık eğitimim gerekse tez çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen, beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Gülen Attila'ya eğitimimdeki bilimsel ve sosyal katkı ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimin önemli bir bölümünü oluşturan Ç.Ü Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarındaki bulunduğum süre içerisinde yardımlarından dolayı başta sorumlu hocası Prof. Dr. İsmail Hakkı Dünder olmak üzere diğer öğretim üyelerine ve çalışanlarına, ayrıca deneyimlerini ve bilgilerini benden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Tamer İnal'a eğitimime olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımdaki desteklerinden ve örneklerin sağlanmasında katkılarından dolayı Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Esmeray Acartürk'e ve Dr. Onur Akpınar'a, çalışmanın istatistiksel verilerindeki katkılarından dolayı Dr. Gülşah Seydaoğlu'na teşekkür ederim.

Tez çalışmalarına olan katkılarından dolayı DNA laboratuvar çalışanları; başta Tek. Halil Gülsev olmak üzere Mikail Kalaycı ve Erdal Öz dolap'a, uzmanlık eğitimim sırasında birlikte çalıştığım Ç. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı asistanlarına ve bölüm çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince sabır ve desteğini esirgemeyen başta annem olmak üzere aileme destekleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TF2002LTP86 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Dr. Selçuk MATYAR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
KISALTMA LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ateroskleroz ve Koroner arter hastalığı	3
2.1.1. KAH Epidemiyolojisi	3
2.1.2. KAH Patogenezi	3
2.2. Aterosklerozda Temel Basamaklar	5
2.2.1. Endotel Disfonksiyonu	5
2.2.2. LDL Oksidasyonu	6
2.2.3. Köpük Hücre, Lipid Çekirdek ve Fibröz Başlık Oluşumu	6
2.2.4. İmmün Mekanizmalar ve Plak Vaskülarizasyonu	6
2.3. Koroner Arter Hastalığı Risk Faktörleri	7
2.3.1. KAH ile İlişkili Genetik Faktörler	10
2.3.1.1. Lipid Metabolizmasıyla İlişkili Genetik Faktörler	10
2.3.1.1.1. Lipoprotein Lipaz gen polimorfizmleri	10
2.3.1.1.2. LDL-Reseptör gen polimorfizmleri	10
2.3.1.1.3. Kolesterol Ester Transfer Protein gen polimorfizmleri	11
2.3.1.1.4. Apolipoprotein A1 gen polimorfizmleri	11
2.3.1.1.5. Apolipoprotein (a) gen polimorfizmleri	11
2.3.1.1.6. Apolipoprotein B gen polimorfizmleri	11
2.3.1.1.7. Apolipoprotein C-III gen polimorfizmleri	12
2.3.1.1.8. Apolipoprotein E gen polimorfizmleri	12

2.3.1.2. Hemostaz ile İlişkili Genetik Faktörler	12
2.3.1.2.1. Fibrinojen gen polimorfizmleri	12
2.3.1.2.2. Faktör II gen polimorfizmleri	13
2.3.1.2.3. Faktör V gen polimorfizmleri	13
2.3.1.2.4. Faktör VII gen polimorfizmleri	13
2.3.1.2.5. Faktör XII gen polimorfizmleri	13
2.3.1.2.6. Faktör XIII gen polimorfizmleri	13
2.3.1.2.7. Von Willebrand Faktör gen polimorfizmleri	14
2.3.1.2.8. Plazminojen aktivatör inhibitör-1 gen polimorfizmleri	14
2.3.1.2.9. Trombosit reseptör gen polimorfizmleri	14
2.3.1.3. Renin-Anjiotensin Sistemi ile ilişkili genetik faktörler	14
2.3.1.3.1. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim gen polimorfizmleri	15
2.3.1.3.2. Anjiotensinojen gen polimorfizmleri	15
2.3.1.4. Homosistein gen polimorfizmleri	15
2.3.1.5. KAH ile ilişkili diğer genetik faktörler	15
2.3.1.6. KAH ile ilişkisi halen araştırılmakta olan genetik faktörler	16
2.3.1.7. Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizmleri	16
2.3.1.7.1. Nitrik Oksit Molekül Yapısı	16
2.3.1.7.2. Nitrik Oksit Sentezi	17
2.3.1.7.3. Nitrik Oksitin Etki Mekanizması	18
2.3.1.7.4. Nitrik Oksit Sentaz Enzimi ve İzofomları	19
a. Nöronal NOS	20
b. Endotelyal NOS	20
c. İndüklenebilir NOS	20
2.3.1.7.5. NOS Enzim Yapısı ve Koenzimleri	21
2.3.1.7.6. NOS Enzimlerinin Genetik Özellikleri	22
2.3.1.7.7. NOS Enzimlerinin Kontrolü	23
2.3.1.7.8. Nitrik Oksit Metabolizması	23
a. NO ile oksihb/oksiMb arasındaki tepkimeleri	23
b. Kendiliğinden oluşan oksidasyon tepkimeleri	23
2.3.1.7.9. Nitrik Oksitin Vücuttaki Etkileri	24
2.3.1.7.9.1. Kardiyovasküler sistem üzerine etkiler	27

a. Fizyolojik etkiler	27
b. Patolojik etkileri	27
c. Ateroskleroz ve NO	28
2.3.1.7.10. NOS gen polimorfizmleri ve ilişkili hastalıklar	28
a. eNOS geni intron 4 polimorfizmi	28
b. eNOS geni 7.ekzon Glu298Asp polimorfizmi	29
c. eNOS geni 5' flanking bölge -786 T/C ve İntron 23 G10-T	
polimorfizmleri	29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
3.1. Gereçler	30
3.1.1. Cihazlar	30
3.1.2. Kimyasal Maddeler	30
3.2. Örnek Seçimi ve Eldesi	31
3.3. Analiz Yöntemleri	31
3.3.1. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri	31
3.3.1.1. Total Kolesterol Ölçümü (CHOD-PAP Metodu – Enzimatik Kolorimetrik Yöntem)	32
3.3.1.2. HDL Kolesterol Ölçümü (Direkt Homojen Enzimatik Kolorimetrik Yöntem)	32
3.3.1.3. LDL Kolesterol Ölçümü	33
3.3.1.4. Trigliserid Ölçümü (GPO-PAP Metodu, Enzimatik Kolorimetrik Yöntem)	34
3.3.2. Moleküler Analiz Yöntemleri	35
3.3.2.1. Tam Kandan Fenol-Kloroform (Modifiye Poncz) Yöntemi ile DNA Eldesi	35
3.3.2.2. PCR ile eNOS Geninin Amplifikasyonu	37
a. Amplifikasyon Koşulları	38
b. PCR Programı	39
c. Amplifikasyon Kontrolü	39
3.3.3. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
5. TARTIŞMA	47

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR	58
8. ÖZGEÇMİŞ	73



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Koroner arter hastalığı temel risk faktörleri	7
Tablo 2. Koroner arter hastalığına yol açan diğer risk faktörleri	8
Tablo 3. Total, LDL ve HDL kolesterol risk sınırlarının değerlendirilmesi	8
Tablo 4. TG risk sınıflaması	9
Tablo 5. NO ile ilişkili fizyolojik olaylar	26
Tablo 6. NO ile ilişkili patolojik durumlar	26
Tablo 7. KAH (-) ve KAH (+) olan bireylerin klinik karakteristikleri ve biyokimyasal parametrelerinin istatistiksel verileri	43
Tablo 8. KAH (-) ve KAH (+) bireylerin eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR polimorfik yöresine ait allel dağılımları	44
Tablo 9. KAH (-) ve KAH (+) bireylerin eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR polimorfik yöresine ait genotip dağılımları	46
Tablo 10. KAH gelişiminde belirleyici değişkenlerin lojistik regresyon modeli sonuçları	46

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Normal arter duvarının histolojik organizasyonu	4
Şekil 2. Hasara yanıt teorisi	5
Şekil 3. Ateroskleroz oluşum süreci	7
Şekil 4. Nitrik oksit molekül yapısı	16
Şekil 5. Nitrik oksitin sentezi	18
Şekil 6. Vasküler düz kas endotel hücrelerinde yapısal NOS ve iNOS enzimlerinin aktivasyonu ile oluşan NO'nin hedef hücrelerindeki etki mekanizmaları	19
Şekil 7. Nitrik oksit sentaz enzimi izoformları	19
Şekil 8. NOS enzimi bölgeleri ve koenzimleri	21
Şekil 9. Kalsiyum/Kalmodulin kompleksi ve yapısal NOS enzimlerin aktivasyonu	22
Şekil 10. eNOS gen yapısı ve çalışılmakta olan polimorfizmleri	22
Şekil 11. Endotel hücrelerinde NO sentezi ve vasküler düz kas kas hücrelerinde oluşturduğu gevşemenin mekanizması	25
Şekil 12. Endotel kaynaklı nitrik oksitin düz kasları üzerinde olan etkilerinin mekanizması	27
Şekil 13. PCR döngüsü	37
Şekil 14. eNOS geni intron 4 polimorfizmi genotiplerinin jel görüntüsü	40
Şekil 15. Olgularımızın PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	43
Şekil 16. KAH (-) ve KAH (+) gruplarda eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR bölgesi allel sıklıklarının dağılımı	44
Şekil 17. KAH (+) ve KAH (-) olgularda eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR bölgesi genotip sıklıkları	45

ÖZET

ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ GENİ 4. İNTRON 27 bç VNTR POLİMORFİZMİNİN KORONER ARTER HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİ

Aterosklerotik koroner arter hastalığı (KAH) dünyada ve ülkemizde kadın ve erkeklerde en başta gelen ölüm nedenlerinden birisidir. KAH etyopatogenezinde çevresel faktörler yanı sıra günümüzde daha çok gen-çevre ve gen-gen etkileşimleri üzerinde durulmaktadır.

Çalışmamızda antiaterojenik bir molekül olan nitrit oksit'in sentezinde görev alan endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimi geni 4. intron 27 bç VNTR polimorfizmi ile KAH arasında ilişki olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

Çalışma grubu, Ç.Ü. Tıp Fakültesi hastanesi kardiyoloji polikliniğine başvuran ve koroner arterleri koroner anjiyografi ile değerlendirilen 133 KAH (+) ve 133 KAH (-) birey olmak üzere toplam 266 kişiden oluşturuldu. Olguların tümünün lipit parametreleri ölçüldü.

KAH (+) olgular KAH (-) olgularla karşılaştırıldığında HDL-K dışında diğer tüm lipit parametreleri (TK, LDL-K, TG) anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$).

Olguların lökosit DNA'ları elde edilip, PCR ile eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR bölgesi uygun primerler kullanılarak amplifiye edildi. Genotip ve allel sıklıkları belirlendi. Olguların tümü ele alındığında aa, ab ve bb genotip sıklıkları sırasıyla %2.3, %30.8, %66.9 olarak belirlendi. KAH (+) ve KAH (-) olgular karşılaştırıldığında KAH (+) olgularda a allel sıklığı KAH (-) olgulara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Yine KAH (+) olgularda aa + ab genotip taşıyıcılığı toplamı (%39.1), KAH (-) olgulara (27.1) kıyasla istatistiksel olarak oranda yüksek idi ($p<0.05$).

Çalışmamızda saptadığımız genetik veriler sonucunda Çukurova Bölgesi'nde eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR polimorfizminin KAH gelişimi ile ilişkisi olduğu kanısına varıldı.

Anahtar sözcükler : Endotelyal nitrik oksit sentaz geni, koroner arter hastalığı, polimorfizm

ABSTRACT

ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE 27 bp VNTR POLYMORPHISM IN INTRON 4 AND ITS RELATION WITH CORONARY ARTERY DISEASE

Atherosclerotic coronary artery disease (CAD) is the leading cause of death for both women and men in all over the world as well as in our country. In addition to environmental factors, more and more studies are recently focused on gene-environment and gene-gene interactions in the pathogenesis of coronary atherosclerosis.

The aim of our study was to identify whether the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene, responsible from the synthesis of nitric oxide that has recently been shown to have anti-atherogenic features, 27 bp polymorphism in intron 4 associated with CAD. Moreover some of the risk factors in the pathogenesis of CAD were also investigated.

The study population were selected among the patients admitted to the Department of Cardiology of our hospital who underwent coronary angiography. A total of 266 subjects [(133 with CAD (+) and 133 control subjects who doesn't have CAD)] were enrolled in the study. All lipid profile were measured.

Patients with CAD had higher values of total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides ($p < 0.05$). There were no statistically significant difference for the high density lipoprotein cholesterol between groups.

DNA was extracted from the peripheral leukocytes and amplified by PCR then genotypes and frequency of alleles of eNOS were determined. Among the study population, the frequencies for the eNOS genotypes aa, ab and bb were 2.3%, 30.8% and 66.9% respectively. The frequency of allele a was significantly higher in the patients with CAD ($p < 0.05$). Also in patients with CAD, the sum of aa and ab genotypes were significantly higher than the control group ($p < 0.05$).

According to our genetic data we suggest that the eNOS gene 27 bp VNTR polymorphism in intron 4 in Çukurova region is a associated with the development of CAD.

Key words : Coronary artery disease, endothelial nitric oxide synthase gene, polymorphism.

KISALTMA LİSTESİ

ACE	:	Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
AGT	:	Anjiotensinojen
AMI	:	Akut Myokard İnfarktı
ApoA1	:	Apolipoprotein A1
Apo B	:	Apolipoprotein B
ApoC-III	:	Apolipoprotein C-III
Apo E	:	Apolipoprotein E
ATP III	:	Erişkin Tedavi Paneli III
bç	:	Baz çifti
Ca²⁺	:	Kalsiyum
CaM	:	Kalmodulin
(CA)_n	:	Dinükleotid Ardışık Tekrar
cAMP	:	Siklik Adenozin Monofosfat
CETP	:	Kolesterol Ester Transfer Protein
cGMP	:	Siklik Guanozin Monofosfat
CRP	:	C-reaktif protein
DM	:	Diabetes mellitus
eNOS	:	Endotelyal NOS
FAD	:	Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	:	Flavin Mono Nükleotid
Gp	:	Glikoprotein
GS	:	Guanilat Siklaz
GTP	:	Guanozin Trifosfat
HDL-K	:	Yüksek Dansiteli Lipoprotein-Kolesterol
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
HT	:	Hipertansiyon
iNOS	:	Uyarılabilir NOS
ICAM-1	:	Hücreler Arası Adhezyon Molekülü-1
IL	:	İnterlökin
KAH	:	Koroner Arter Hastalığı

LDL	:	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LDL-R	:	LDL-Reseptörü
LPL	:	Lipoprotein Lipaz
MCP-1	:	Monosit Kemotaktik Protein-1
mmLDL	:	Minimally Modified LDL
NAD(P)H	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid (Fosfat) (indirgenmiş)
NCEP	:	Ulusal Kolesterol Eğitim Programı
nNOS	:	Nöronal NOS
NO	:	Nitrik Oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
NO₃⁻	:	Nitrat
N₂O₃	:	Dinitrojen Trioksit
N₂O₄	:	Dinitrojen Tetraoksit
NO₂	:	Nitrojen dioksit
NO₂⁻	:	Nitrit
ONOO⁻	:	Peroksinitrit
OxLDL	:	Okside LDL
PAI-1	:	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
RAS	:	Renin-Anjiotensin Sistemi
SBS	:	Sistatinyonin Beta Sentaz
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
TG	:	Trigliserid
THB	:	Tetrahidrobiopterin
TK	:	Total Kolesterol
TNF-α	:	Tümör nekroz faktör-alfa
VCAM-1	:	Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü-1
VLDL-K	:	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein-Kolesterol
VNTR	:	Variable Number of Tandem Repeats
vWf	:	von Willebrand Faktör

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner arter hastalığı (KAH), koroner arterlerin iç kısmında çeşitli maddelerin birikimi sonucu oluşan intimal plakların bu arterleri daraltması ya da tıkanmasına bağlı olarak ortaya çıkan, yavaş seyirli, kompleks bir hastalıktır. İntimal plaklar arterlerin antitrombotik ve esneklik özelliklerinin bozulmasına yol açarak kan akımını önemli derecede azaltır ve o bölgede bulunan hücrelerin oksijenlenme ve beslenmesini bozarak Anjina Pektoris, Akut Myokard İnfarktüsü (AMI) ve ani ölümlere neden olabilirler^{1,2,3,4}.

KAH, ülkemizde olduğu gibi Avrupa ülkelerinde de, özellikle 45 yaş üzeri erkekler ve 65 yaş üzeri kadınlarda başlıca mortalite ve morbidite nedenidir^{5,6}. Türkiye’de KAH’nın yıllık mortalite oranı kadınlarda %0.33 erkeklerde ise %0.51 olarak belirlenmiştir⁵. Toplumumuzda koroner ateroskleroz gelişiminde rol oynayan en önemli risk faktörleri obezite, sigara, hipertansiyon (HT), trigliserid (TG) yüksekliği ve yüksek dansiteli lipoprotein-kolesterol (HDL-K) düşüklüğüdür⁷.

KAH etyolojisinde, genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu faktörler hastalığın süreç ve prognozunu etkilerler. Bireyin proaterojen faktörlere yanıtı ve damar duvarının aterojen uyarıya yatkınlığını genetik yapı belirler. Çevresel faktörler ise daha çok hastalığın ilerleme hızını (plak oluşumu) etkileyerek KAH’nın ortaya çıkmasında önemli rol oynarlar^{8,9,10,11}.

Geleneksel risk faktörleri KAH etyopatogenezinin yalnızca %50’sinden sorumludur. Bu nedenle son yıllarda genetik faktörler daha çok önem kazanmıştır ve KAH oluşumundan sorumlu olabileceği düşünülen genler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmıştır. Araştırmalar sonucunda KAH ile ilişkili olduğu belirlenen çok sayıda genetik bölge açığa çıkarılmıştır^{12,13,14,15,16}. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi izoformları tarafından sentezlenen endotelial vazodilatör etkili nitrik oksit (NO) miktarında azalmaya neden olan NOS enzimi gen polimorfizmlerinin de KAH etyopatogenezinde rol oynayacağı ileri sürülmüştür. NO, damar duvarında antiaterojenik etkileri olan bir moleküldür ve aterojenik olayların erken evrelerinde NO salınımında azalma olduğu gözlenmiştir^{17,18,19,20,21}. Son çalışmalarda, başta KAH olmak üzere birçok vasküler hastalığın etyopatogenezinde, endotelial NOS (eNOS) aktivite kaybına neden olan eNOS gen polimorfizmleri sorumlu tutulmakta ve üzerinde çalışmalar yapılmaktadır^{22,23,24,25}.

Biz de bu çalışmamızda; Çukurova Bölgesi'nde, koroner arterleri koroner anjiyografi ile değerlendirilen hastalarda KAH ile ilişkili olduğu düşünülen genetik risk faktörlerinden eNOS geni 4. intron polimorfizminin KAH oluşumu üzerine etkisini araştırmayı ve ayrıca HT, diabetes mellitus (DM), sigara, yaş, total kolesterol (TK), düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol (LDL-K), HDL-K,TG gibi bazı risk faktörlerini değerlendirmeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz ve Koroner arter hastalığı

Ateroskleroz, arter intimasında aterojenik lipoproteinlerin birikimi sonucu oluşan enflamatuvar fibroproliferatif bir olaydır. Arterlerin iç bölümünde lipid, fibroblast, makrofaj, düz kas hücreleri, kalsiyum ve hücre dışı maddelerin birikimine bağlı olarak karakteristik intimal plaklar oluşur. İntimal plaklar, ilerleyici arteryel darlık ve tıkanmalara yol açarak arter kan akımını önemli derecede azaltır ve arterin beslediği bölgede bulunan hücrelerin oksijenlenmesini bozar^{1,2,3,26,27,28,29}.

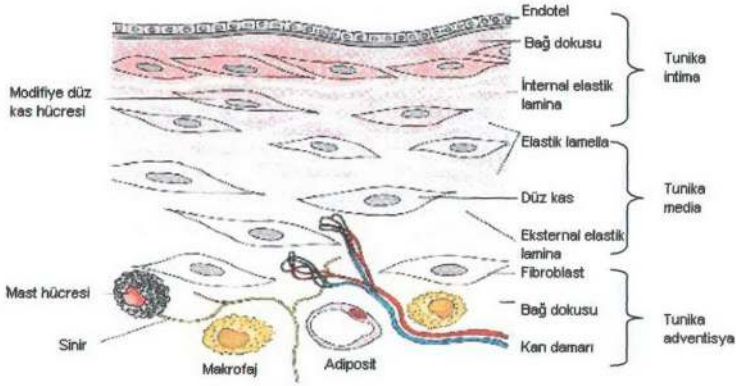
Ateroskleroz, klinikte genellikle KAH, daha az oranda ise serebrovasküler hastalık veya periferik arter hastalığı şeklinde ortaya çıkar³⁰. KAH, koroner arterlerin ateroskleroza bağlı olarak daralması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Ender olarak non-aterojenik sebepler, örneğin; arterit, travma, metabolik depo hastalıkları ve intimal proliferatif hastalıklar da KAH'na neden olabilirler^{29,31}.

2.1.1. KAH Epidemiyolojisi

Koroner arter hastalığı, dünyada, tüm etnik gruplarda en başta gelen ölüm nedenlerinden biridir^{5,32,33}. Türk Kardiyoloji Derneği tarafından 1990 yılından başlanarak yürütülen TEKHARF çalışmasının 10 yıllık izlem verilerine göre Türkiye'de yaklaşık 2 milyon kişide KAH bulunduğu tahmin edilmektedir. Resmi veriler ve TEKHARF verileri birlikte değerlendirildiğinde, ülkemizde tüm ölümlerin % 45'ini kalp damar hastalıkları oluşturmaktadır⁵.

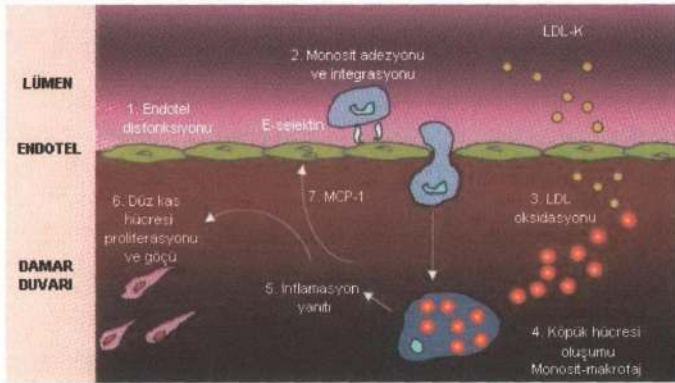
2.1.2. KAH Patogenezi

Normal bir arter morfolojik olarak üç ayrı tabakadan oluşur. En içte lümeni çevreleyen intima, ortada media ve en dışta adventisya tabakası bulunur (Şekil 1)^{15,34,35}.



Şekil 1. Normal arter duvarının histolojik organizasyonu³⁵.

Arter duvarında aterosklerotik sürecin başlamasında hangi durum veya durumların rol oynadığı tam olarak bilinmemekle birlikte günümüzde en çok kabul gören teori *hasara yanıt* teorisidir. Ross tarafından ortaya atılan teoriye göre olayı metabolik, mekanik, toksik, immünolojik nedenler ve/veya enfeksiyonlar sonucu oluşan endotel disfonksiyonun başlattığı düşünülmektedir^{36,37,38}. Endotel disfonksiyonu sonucu subendotelial alana geçen monositler burada önce makrofajlara, makrofajlar ise daha sonra okside LDL (oxLDL)'yi fagosite ederek köpük hücrelerine dönüşürler. Köpük hücrelerine dönüşen makrofajlardan; büyüme faktörleri, sitokinler, hidrolitik enzimler ve prokoagülan maddeler salgılanır. Bu maddeler de endotel hasarını artırarak yerel vazokonstriksiyona, bölgenin trombositlerle ilişkiye girmesine, düz kas hücrelerinin aktivasyonuna ve hücre dışı matriks oluşumuna neden olurlar (Şekil 2). Sonuçta gelişen inflamatuvar ve proliferatif olaylar sonucu aterosklerotik plak oluşur^{34,36,39}.



Şekil 2. Hasara yanıt teorisi³⁹.

MCP-1 : Monosit kemotaktik protein-1, LDL-K : Düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol

2.2. Aterosklerozda Temel Basamaklar

Ateroskleroz yedi aşamalı bir süreçte oluşur.

1) Endotel Disfonksiyonu, 2) LDL Oksidasyonu, 3) Köpük Hücre Oluşumu, 4) Lipid Çekirdeğin Oluşumu, 5) Düz Kas Çoğalması ve Fibröz Başlık Oluşumu, 6) İmmün Mekanizmalar 7) Plak Vaskülarizasyonu

2.2.1. Endotel Disfonksiyonu

Ateroskleroz patogeneğinde ilk basamağı oluşturur^{11,40}. Endotel hücreleri aterogeneizde rol oynayan ve koroner vazomotor tonusun kontrolüne katkıda bulunan çok sayıda madde ve bağ doku elemanının sentezinden sorumludur. Bu maddeler; prostasiklin, NO, endotelin, anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interlökin-1 (IL-1) gibi endotel proliferasyonunu inhibe eden sitokinler, hücreler arası adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi çeşitli adhezyon molekülleri ve monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) ve IL-8 gibi kemokinler'dir. Aterosklerozda bu maddelerin endotelden düzenli salınımını bozulur ve endotelin düzeylerinin artışına bağlı olarak vazokonstriksiyon gelişir. Ayrıca NO sentezinin inhibe olması sonucu trombosit agregasyonu artar ve açığa çıkan serbest oksijen radikalleri NO aktivitesini azaltır^{39,41,42,43,44,45,46,47,48}.

2.2.2. LDL Oksidasyonu

Oksidasyon sırasında LDL molekülünde gözlenen ilk değişiklik endotel yüzeyi yakınında meydana gelir ve lipoproteinin yapısında bulunan apo B değişime uğrar. Değişimin en az olduğu bu evrede oluşan proinflamatuvar molekül “minimally modified” LDL (mmLDL) adını alır^{39,49,50}. mmLDL daha sonra makrofajlardan salgılanan lipooksijenaz, reaktif oksijen türevleri ve malondialdehitin etkisiyle tekrar oksidasyona uğrar ve makrofajlar üzerinde bulunan çöpçü reseptörlerce daha kolay tanınabilen aterojenik bir molekül olan oxLDL’ye dönüşür^{51,52,53}.

2.2.3. Köpük Hücre, Lipid Çekirdek ve Fibröz Başlık Oluşumu

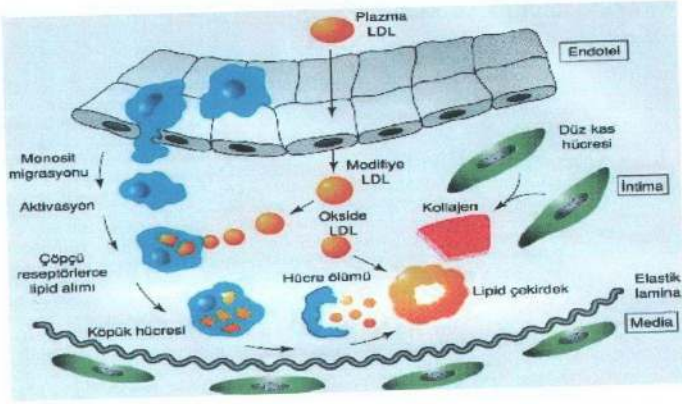
Çöpçü reseptörler doğal LDL reseptörü gibi düzenlenmediğinden (down regulation) hücre içine lipid girişi kontrolsüz olarak devam eder ve lipidle dolu hale gelen köpük hücre oluşur^{49,53}. Lezyonun ilerlemesiyle oluşan köpük hücre nekrozu ve apoptozuna bağlı olarak hücre içi lipidler hücre dışı alana salınır ve lipid çekirdek oluşur^{39,54,55}.

Bu bölgede bulunan hücrelerden salgılanan büyüme faktörlerinin etkisiyle düz kas hücreleri proliferer olur^{38,39}. Düz kas hücreleri ve enflamatuvar hücrelerden oluşan fibröz başlık, makrofaj hücreleri ile kolesterol kristalleri içeren lipidden zengin nekrotik çekirdeği dışardan sarar⁵⁴.

2.2.4. İmmün Mekanizmalar ve Plak Vaskülarizasyonu

Aterogeneizde saptanan en erken hücrel immün yanıtlardan biri monositlerin ve T lenfositlerin arter intimasında fokal olarak birikmesidir⁵⁶. Aterosklerozun ilerlemesi ve intimal kalınlaşma sonucunda adventisya tabakasından lezyonun tabanına doğru uzanan patolojik yeni damarlanmalar meydana gelir⁵⁷.

Şekil 3’te ateroskleroz oluşum süreci görülmektedir⁵⁸.



Şekil 3. Ateroskleroz oluşum süreci⁵⁸.

2.3. Koroner Arter Hastalığı Risk Faktörleri

Ateroskleroz, genetik ve çevresel faktörler arasındaki çeşitli etkileşimler sonucunda ortaya çıkar. KAH'ına ilişkin temel risk faktörleri Tablo 1'de, KAH ile ilişkili olduğu kabul edilen diğer risk faktörleri ise Tablo 2'de gösterilmiştir^{59,60,61,62,63}.

Tablo 1. Koroner arter hastalığı temel risk faktörleri⁶¹.

Pozitif risk faktörleri

- Yaş
 - Kadın ≥ 55
 - Erkek ≥ 45
- Pozitif aile öyküsü
- Sigara
- Hipertansiyon
 - Halen içiyor veya bırakalı henüz 12 yıl olmamış olmak
- Total kolesterol
 - $\geq 140/90$ mmHg veya HT tedavisi alıyor olmak
- Yüksek LDL kolesterol
 - > 200 mg/dl
- Düşük HDL kolesterol
 - > 130 mg/dl
- Diabetes mellitus
 - < 40 mg/dl

Negatif risk faktörü

- Yüksek HDL kolesterol
 - > 60 mg/dl

Tablo 2. Koroner arter hastalığına yol açan diğer risk faktörleri^{62,63}.

- | | |
|--|------------------------------|
| • Trigliserid yüksekliği | • İnflamasyon belirteçleri |
| • Lp (a) yüksekliği | (CRP, sitokinler) |
| • İnsülin direnci | • Erkek cinsiyet |
| • Homosistein yüksekliği | • Obezite |
| • Fibrinojen yüksekliği | • Fiziksel inaktivite |
| • Plazminojen aktivatör inhibitör-1 yüksekliği | • Düşük sosyo-ekonomik düzey |

Lp (a) : Lipoprotein (a) , CRP : C-reaktif protein,

Yüksek serum TK ve LDL-K ile düşük serum HDL-K düzeyleri KAH için bağımsız risk faktörlerini oluşturmaktadır. Tablo 3'te Ulusal Kolesterol Eğitim Programı (NCEP) tarafından önerilen erişkin tedavi paneli III (ATP III)'e göre lipoproteinlerin risk sınıflaması gösterilmiştir^{64,65,66}.

Tablo 3. Total, LDL ve HDL kolesterol risk sınırlarının değerlendirilmesi⁶⁶.

Total kolesterol (mg/dl)	
<200	İdeal
200-239	İdeale yakın / çok az yüksek
≥240	Yüksek
LDL kolesterol (mg/dl)	
<100	İdeal
100-129	İdeale yakın / çok az yüksek
130-159	Sınırdan yüksek
≥190	Çok yüksek
HDL kolesterol (mg/dl)	
<40	Düşük
≥60	Yüksek

KAH riskinin önceden belirlenmesinde plazma TK/HDL-K oranı da önemli bir göstergedir ve erkeklerde 5, kadınlarda ise 4.4'ün altında olması istenir⁶⁷.

Son veriler, hipertrigliserideminin de KAH için bağımsız risk faktörü olduğunu ve riskin kadınlarda erkeklere kıyasla daha yüksek ve önemli olduğunu göstermektedir^{68,69,70}. Tablo 4'te NCEP tarafından önerilen ATP III'e göre TG risk sınıflaması gösterilmiştir²⁹.

Tablo 4. TG risk sınıflaması²⁹.

<u>Trigliserid (mg/dl)</u>	<u>Risk</u>
< 150	İdeal
151 – 199	Sınırdaki yükseklik
200 – 499	Yüksek
> 500	Çok yüksek

Seroepidemiolojik verilerin çoğu enfeksiyöz ve viral ajanların (*Klamidya pnömoni*, *Helikobakter pilori*, *Herpes simpleks virüs* ve *Sitomegalovirüs*) endotel disfonksiyonuna yol açarak aterosklerotik plağın şekillenip çökmesine neden olabileceğini göstermektedir^{71,72,73,74,75}. İnflamasyon, vücudun oluşan hasara yanıtıdır ve aterosklerozun başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynar^{76,77}. Bu nedenle KAH klasik risk faktörlerine eklenen yeni risk faktörleri arasında inflamasyon belirteçleri önemli yer tutmaktadır^{77,78,79}. Son dönemlerde CRP, fibrinojen, sitokinler (*IL-1*, *IL-6*, *TNF-α*), adhezyon molekülleri (*ICAM-1*, *E-selektin*, *serum amiloid A*), gebelikle-ilişkili plazma protein A, fosfolipaz A₂ ve albumin gibi inflamasyonun sistemik belirteçlerinin asemptomatik erkek ve kadınlarda koroner olayları öngörmede güçlü parametreler olarak ortaya çıktığı gözlenmektedir^{78,80,81}.

Ateroskleroz patogeneğinde hemostatik sistemin de önemli rolü vardır. Fibrinojen, faktör V, faktör VII, plazminojen aktivatör inhibitör-1 (*PAI-1*), doku plazminojen aktivatörü, D-dimer ve trombositler gibi bazı sistemik hemostatik faktörlerin KAH'nı öngörme özellikleri olduğu bildirilmektedir^{68,82,83}.

2.3.1. KAH ile İlişkili Genetik Faktörler

Kronik hastalıkların çoğunda olduğu gibi KAH oluşumunda da genetik faktörlerin rolü büyüktür^{8,9,10}. Mevcut çalışmalar, insanlarda ateroskleroza yatkınlığın çeşitli gen mutasyonları ve/veya polimorfizmlerinin kombinasyonu ve bunların çevresel faktörlerle etkileşimi sonucu ortaya çıktığını göstermektedir^{8,14,22,84,85}. Son yıllarda KAH gelişiminde rol oynayabileceği düşünülen çok sayıda gen üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır^{13,86}.

2.3.1.1. Lipid Metabolizmasıyla İlişkili Genetik Faktörler

Lipid metabolizmasının genetik faktörlerden etkilendiğinin belirlenmesiyle lipid metabolizmasının metabolik enzimleri ve apolipoproteinler genetik çalışmaların en önemli odağını oluşturmuştur^{14,87}.

2.3.1.1.1. Lipoprotein Lipaz (LPL) gen polimorfizmleri

En sık gözlenen LPL gen polimorfizmi olan 447 Ser→X'in popülasyondaki taşıyıcılık oranı ortalama % 20 civarındadır. Bu polimorfizm LPL aktivitesini artırarak TG düzeylerinin düşmesine, HDL-K'ün yükselmesine yol açmakta ve böylece KAH riskinin azalmasına neden olmaktadır. LPL geni 9 Asp→Asn ve 291 Asn→Ser polimorfizmlerinin ise lipidler üzerinde proaterojenik etkileri bulunmasına karşın KAH ile ilişkileri gösterilememiştir¹⁴. LPL geninde yeni saptanan 93 T→G, 9 Asp→Asn, 291 Asn→Ser ve 447 Ser→X polimorfizmleri ise KAH açısından halen araştırılmaktadır⁸⁸.

2.3.1.1.2. LDL-Reseptör (LDL-R) gen polimorfizmleri

LDL'nin hücre içine alınmasından sorumlu olan LDL-R'ü, yeterince çalışmadığında LDL-K dolaşımdan tam olarak uzaklaştırılmaz, bu durum kolesterol ve diğer lipidlerin kanda birikmesine neden olur^{14,89,90}. Erken yaşlarda KAH gelişen ailesel hiperkolesterolemili bireylerde 19. kromozomda bulunan LDL-R geni ile ilişkili çok sayıda mutasyon gösterilmiştir. Bu mutasyonlar reseptör yapısında değişikliğe ve/veya hücrelerin yüzeyinde bulunan LDL-R sayısında azalmaya neden olmaktadır^{14,89,91,92}. Örneğin; LDL-R geni 15. intron Pvu II polimorfizmi P1P1 genotipi taşıyan bireylerde TK, TG, çok düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol (VLDL-K) ve LDL-K yüksek ve HDL-K düşük bulunmuş ve KAH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁹³.

Ayrıca Pocathikorn ve ark. LDL-R ilişkili protein geni 22. ekzon 200 C→T polimorfizminin de prematür KAH için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir⁹⁴.

2.3.1.1.3. Kolesterol Ester Transfer Protein (CETP) gen polimorfizmleri

Kolesterol ester transfer proteini kolesterol esterlerinin HDL molekülleri arasında ve HDL'den VLDL ve LDL'e transferinde görev alır^{14,90}. Yapılan çalışmalarda CETP geni B1/B2 polimorfizminin TG düzeylerinde artışa ve HDL-K düzeylerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir⁸⁷. Yine CETP geni -629 A taşıyıcılığın ise KAH için koruyucu, 442 G mutasyonunun ise risk faktörü olduğu belirlenmiştir^{95,96}.

2.3.1.1.4. Apolipoprotein A1 (ApoA1) gen polimorfizmleri

Apolipoprotein A1 HDL yapısında bulunan başlıca proteindir. Apo A1 geninde gözlenen polimorfizm ve mutasyonlar Apo A1'in ve HDL'nin azalmasına yol açarak erken KAH riskine neden olmaktadır^{90,97}. Yapılan çalışmalarda Apo A1 geni 1. intronda gözlenen MspI polimorfizmlerinin (+83 bp C→T, +84 bp G→A ve -75 bp G→A) yüksek serum Apo A1 ve HDL-K düzeylerine yol açtığı, ayrıca -75 bp G→A ve +83 bp C→T veya G→A polimorfizmlerinin de KAH'ına karşı koruyucu etki yaptıkları bulunmuştur^{98,99,100}.

2.3.1.1.5. Apolipoprotein a [Apo (a)] gen polimorfizmleri

Altıncı kromozomda bulunan apo (a) gen lokusuna ait çok sayıda allel saptanmış ve plazmada 34 farklı apo (a) izoformu bulunmuştur. Utermann ve arkadaşları apo (a) izoformları ile plazma Lp (a) konsantrasyonları arasında ters bir korelasyon olduğunu öne sürmüşlerdir¹⁰¹. Yakın bir zaman önce apo (a) geni transisyonel başlangıç bölgesi -1371. pozisyonda saptanan pentanükleotid TTTTA(n) polimorfizminin de yüksek Lp (a) düzeylerine neden olduğu ve bunun sonucunda KAH'na yol açtığı gösterilmiştir^{102,103,104}.

2.3.1.1.6. Apolipoprotein B (Apo B) gen polimorfizmleri

Son veriler Apo B polimorfizmlerinin (XbaI, EcoRI ve SpIns/Del) Apo B, TK, LDL-K ve TG düzeylerini arttırdığı ve bu nedenle KAH için genetik bir belirteç olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Apo B sinyal peptidi delesyon / delesyon, B XbaI (X+X+) ve EcoRI polimorfizmlerinin KAH ve Akut myokard infarktüsü (AMI) ile ilişkili olduğu

gösterilmiştir^{14,105,106}. Ayrıca apo B geni 3500 Arg→Gln polimorfizminin de kolesterol yüksekliğine yol açarak erken KAH nedeni olarak bilinen ailesel hiperkolesterolemiye neden olduğu belirlenmiştir¹⁰⁷.

2.3.1.1.7. Apolipoprotein C III (Apo C-III) gen polimorfizmleri

Apolipoprotein C-III, TG'den zengin lipoproteinlerin metabolizmasında önemli rol oynar. Apo C-III geni polimorfizmleri TG yüksekliği ile ilişkili bulunmuş ancak KAH riski açısından çelişkili sonuçlar gözlenmiştir. Apo C-III geni insülin-yanıt elementi (IRE) promotor bölge 455 T→C, 3. ekzon 1100 C→T ve Sst polimorfik (S1/S2) (3238. pozisyonda C→G) bölgesi üzerinde yapılan çalışmalarda -455 C homozigot bireylerde KAH riskinin önemli ölçüde arttığı saptanmıştır¹⁰⁸. Sst (S1/S2) polimorfizmi S2 allel taşıyıcılığının serum TK, TG, apoC III artışı ve KAH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir¹⁰⁹.

2.3.1.1.8. Apolipoprotein E (Apo E) gen polimorfizmleri

Apolipoprotein E, amfipatik bir protein olup şilomikron, VLDL, orta yoğunluklu lipoprotein ve HDL'in yapısında bulunur ve bu lipoproteinlerin dolaşımdan reseptör bağımlı uzaklaştırılmasında ligand görevi yapar^{84,90,110,111}. İnsanlarda 19. kromozomda bulunan polimorfik bir gen olan Apo E'nin üç farklı alleli (ε2, ε3 ve ε4) mevcuttur. Bu izoformlara ait aminoasit dizileri 112 ve 158. pozisyonlarda farklılık gösterir. Apo ε3, 112. pozisyonda arginin ve 158. pozisyonda sistein içerirken, apo ε2 her iki pozisyonda sistein apo ε4 ise arginin içerir. Araştırmalar Apo E ε4 allel taşıyıcılığının KAH için önemli bir risk faktörü olduğunu ve ε4/ε4 homozigot olan bireylerde çok erken yaşlarda KAH ortaya çıktığını göstermektedir^{8,14,85,111,112,113,114}.

2.3.1.2. Hemostaz ile İlişkili Genetik Faktörler

Tromboz ve koagülasyon kardiyovasküler hastalıkların mortalite ve morbiditesinde önemli rol oynamaktadır⁸.

2.3.1.2.1. Fibrinojen gen polimorfizmleri

Fibrinojen, üç çift polipeptid zincirinden (Aα, Bβ, γ) oluşur ve geni 4. kromozom uzun kolunda lokalizedir^{115,116}. Fibrinojen yüksekliğinin KAH için bağımsız bir risk faktörü olduğu ve AMI ile fibrinojen polimorfizmleri arasında ilişki olduğu

belirlenmiştir^{8,14,59,68,86}. Beta-fibrinojen geni 455 G→A polimorfizminin yüksek plazma fibrinojen düzeylerine neden olduğu ve KAH için genetik risk faktörü olabileceği gösterilmiştir^{14,117,118}. Ayrıca Beta-fibrinojen geni promotor bölge 147 C→T polimorfizmi T/T genotipi ile karotid aterosklerozu arasında da ilişki bulunmuştur¹¹⁹.

2.3.1.2.2. Faktör II (protrombin) gen polimorfizmleri

Faktör II, fibrinojeni fibrin monomerine dönüştüren trombinin öncüsüdür. Protrombin geni 20210 G→A polimorfizminin protrombin yüksekliğine neden olduğu belirlenmiş olup, koroner tromboz ve AMI için genetik bir risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür^{86,120,121,122,123}.

2.3.1.2.3. Faktör V gen polimorfizmleri

Faktör V, protrombinin trombine dönüşümünde kofaktör olarak görev yapar. Aktif protein C ise kofaktör protein S varlığında aktif faktör V ve aktif faktör VIII'i inaktive ederek antikoagülan etki gösterir ve eksikliğinde tromboza eğilim artar. Faktör V Leiden geninde gözlenen bir tek nokta mutasyonunun (1691 G→A) % 95 olasılıkla, Aktif Protein C'ye karşı direnç oluşmasına neden olduğu saptanmıştır. Faktör V Leiden mutasyonu taşıyan heterozigot genç erişkinlerde AMI riskinin iki-üç kat arttığı ve bu mutasyonun venöz tromboz içinde risk faktörü olduğu gösterilmiştir^{59,85,86,120,121}.

2.3.1.2.4. Faktör VII gen polimorfizmleri

Faktör VII geni kodlama bölgesi 353 Arg→Gln polimorfizminin plazma faktör VII düzeylerini %20-25 düşürerek AMI riskini azalttığı belirlenmiştir^{14,86,120}.

2.3.1.2.5. Faktör XII (Hageman faktör) gen polimorfizmleri

Faktör XII geni 5'-tercüme edilmeyen bölge polimorfizminin (46 C→T) serum faktör XII miktarını büyük ölçüde etkilediği ve AMI öyküsü olan hastalarda aktif faktör XII'nin yüksek olduğu gösterilmiştir^{86,124}.

2.3.1.2.6. Faktör XIII gen polimorfizmleri

Faktör XIII, fibrin monomerleri ile çapraz bağlantı yaparak yeni şekillenen pıhtı tabakasını stabilize eder ve pıhtılaşmanın son basamağında çözünmez sağlam fibrin

trombüsü oluşturur. KAH'ı olan kişilerde plazma Faktör XIII yüksekliğinin AMI için risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Faktör XIII A subunitini kodlayan gendeki 34. pozisyon Val→Leu polimorfizminin AMI'ne karşı koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir^{14,86}.

2.3.1.2.7. Von Willebrand (vWF) Faktör gen polimorfizmleri

Von Willebrand Faktör hemostazın ilk basamağı olan trombosit adhezyonunda görev alır ve Faktör VIII'in aktivasyonunda rol oynar. Eksikliğinde kanama bozuklukları gözlenir¹²⁵. vWF geni -1793 C→G promotor bölge polimorfizminin vWF yüksekliğine neden olarak KAH riskini arttırdığı gösterilmiştir¹²⁶.

2.3.1.2.8. Plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) gen polimorfizmleri

Bir çok çalışmada azalmış fibrinolizis ve yükselmiş PAI-1 aktivitesinin KAH ile ilişkili olduğu saptanmıştır¹²⁷. PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmi ilk kez Dawson ve arkadaşları tarafından gösterilmiş ve 4G allel taşıyıcılığı veya 4G homozigotluğu olan bireylerde PAI-1 aktivitesinin önemli ölçüde arttığı saptanmıştır^{128,129}. Bu mutasyonu taşıyan gençler ve postmenopozal kadınlarda PAI-1 aktivite artışı ile KAH ve AMI gelişimi arasında ilişki gösterilmiştir^{8,14,86}.

2.3.1.2.9. Trombosit reseptör gen polimorfizmleri

Trombosit membranında bulunan üç farklı adheziv glikoprotein'e (Gp) ait genlerde, Gp'lerin antijenitesinin değişmesine yol açan polimorfizmler gözlenir⁸⁶. Gp IIIa PLA1/PLA2 (HPA) polimorfizminin vasküler tromboz, akut koroner sendrom ve ateroskleroz için önemli bir risk faktörü olduğu ve Gp Ia 807 T/C polimorfizminin de KAH için risk faktörü olduğu belirlenmiştir^{14,86,130,131,132,133}. Gp Ibα polimorfizmi de AMI ve KAH ile ilişkili bulunmuştur¹³⁴.

2.3.1.3. Renin-Anjiotensin Sistemi (RAS) ile ilişkili genetik faktörler

Renin-anjiotensin sistemi, kardiyovasküler sistem hemostazının sürdürülmesinde önemli rol oynar. Anjiotensin II, düz kas hücre proliferasyonu, migrasyonu, LDL oksidasyonu ve endotel vazomotor fonksiyonu gibi bazı ateroskleroz bileşenlerini etkileyerek koroner ve periferik damarlarda vazokonstriksiyona neden olur. Sonuçta damar tonusu ve kan basıncını arttırarak ateroskleroz gelişmesinde rol oynar^{9,84,135}. Son

yayınlar HT ve KAH etyolojisinde RAS bileşenlerini kodlayan genlerdeki polimorfizmler sorumlu tutulmaktadır^{105,136}.

2.3.1.3.1. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) gen polimorfizmleri

Anjiotensin Dönüştürücü Enzim geni, 17. kromozomun kısa kolunda lokalizedir¹³⁶. İnsersiyon (I) ve delesyon (D) adını alan iki farklı alleli mevcuttur^{8,137}. Yapılan çalışmalarda ACE geni D allel taşıyıcılığı ile ateroskleroz ve AMI arasında ilişki gösterilmiş, özellikle DD genotipi olan bireylerde serum ACE aktivitesi daha yüksek bulunmuştur^{8,9}.

2.3.1.3.2. Anjiotensinojen (AGT) gen polimorfizmleri

AGT geni 2. ekzon 235. pozisyonunda metionin→ treonin değişimi TT genotipinin oluşmasına neden olmaktadır. TT genotipi ise AGT düzeylerini arttırarak HT ve KAH için risk oluşturmaktadır^{14,112,114}.

2.3.1.4. Homosistein gen polimorfizmleri

Homosistein metabolizmasında görev alan bazı enzimlere ait gen mutasyonları KAH için bağımsız risk faktörü olan hiperhomosisteinemiye neden olurlar. Homosisteinin metionine remetilasyonunda görev alan *metilen tetrahidrofolat redüktaz* enzim geni 677. pozisyonunda C→T değişimi sonucu oluşan ve homosistein yüksekliğine neden olan polimorfizm ile KAH arasında ilişki gösterilmiştir^{87,138}. Homosisteinin metionine remetilasyonunda görevli diğer bir enzim olan *betain-homosistein metiltransferaz* enzim geni 6. ekzon 239 Arg→Gln mutasyonu taşıyıcılığının ise KAH riskini azalttığı saptanmıştır¹³⁸. Ayrıca *Sistatinyonin Beta Sentaz* (SBS) geni mutasyonuna bağlı olarak oluşan SBS enzim eksikliğinin homosistein yüksekliğine neden olduğu ve KAH ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir^{14,139,140}. SBS geninde en sık gözlenen iki mutasyon 278 Ile→Thr ve 307 G→S'dir. Diğer çalışılan mutasyonlar ise 85 Gly→Arg, 191 Thr→Met, 234 Asp→Asn, 444 Asp→Asn ve yakın zaman önce saptanan 243 Gln→X'dir. 699 C→T ve 1080 C→T polimorfizmleri ise SBS genine ait en sık rastlanan polimorfizmlerdir^{139,140,141}.

2.3.1.5. KAH ile ilişkili diğer genetik faktörler

- TNF-α geni 308 G→A polimorfizmi¹⁴².

- İnterlökin-1 reseptör antagonist geni intron 2 Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs) polimorfizmi allel 2 taşıyıcılığı^{143,144,145}.
- İnterlökin-6 geni 174 G→C polimorfizmi^{75,146}.
- G protein beta 3 subünit geni 825 C→T polimorfizmi¹⁴⁷.

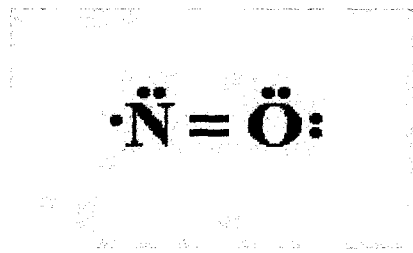
2.3.1.6. KAH ile ilişkisi halen araştırılmakta olan genetik faktörler

- Östrojen reseptör alfa geni pomotor bölge birinci ekzon upstream 1174 baz çiftlik adenin ve timin dinükleotid tekrar dizisi¹⁴⁸.
- Peroksizom Prolifere Edici Aktive Reseptörler γ geni 161 C→T varyantı ve apo E $\epsilon 4$ genotipi etkileşimi¹⁴⁹.
- Lektin-benzeri Düşük Dansiteli Okside Lipoprotein Reseptör 1 geni polimorfizmleri (intron 4 G→A, intron 5 T→G ve 3' tercüme edilmeyen bölge T→C)¹⁵⁰.
- Endotoksin reseptör CD14 geni 159 C→T polimorfizmi ve CRP düzeyleri ile ilişkisi^{151,152}.
- NAD(P)H oksidaz geni p22phox subüniti 242 C→T polimorfizmi ve 640 A→G polimorfizmleri¹⁵³.

2.3.1.7. Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizmleri

2.3.1.7.1. Nitrik Oksit molekül yapısı

Renksiz bir gaz olan ve sıvı formda da bulunabilen NO lineer, yüksüz ve polar yapıda bir moleküldür. Tek bir nitrojen ve oksijen atomunun birleşmesinden oluşur. Doğada bulunan en küçük 10 molekülden biri olan NO çok kısa bir yarı ömüre (6-30 saniye) sahiptir. Son yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron içermesi nedeniyle serbest radikal özelliği gösterir ve yüksek oranda reaktiftir (Şekil 4)^{38,154,155,156}.



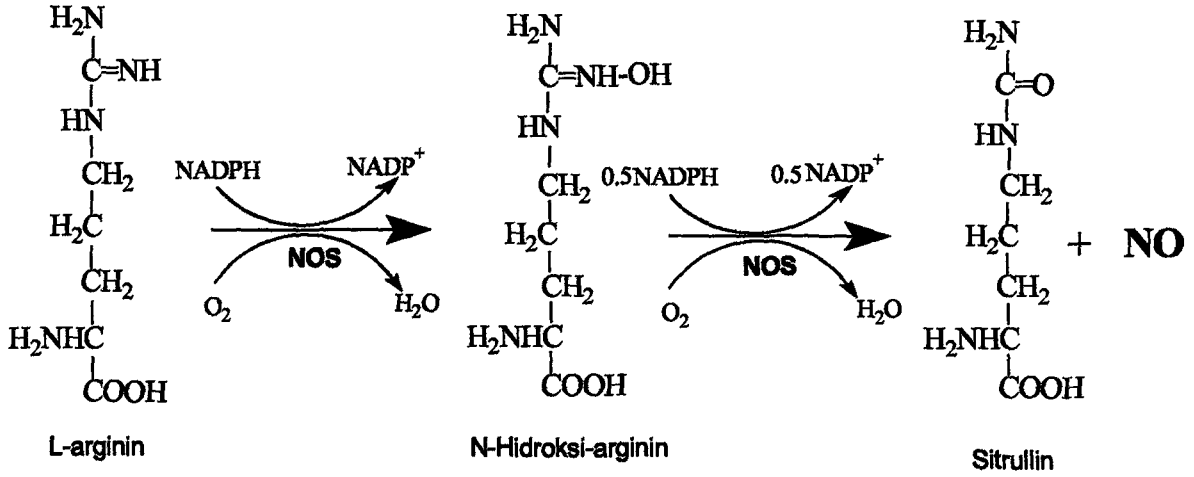
Şekil 4. Nitrik oksit molekül yapısı.

Serbest radikal özelliği nedeniyle hücrelerde bulunan moleküler oksijen (O_2), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve proteine bağlı demir gibi metaller ile kolaylıkla reaksiyona girer^{38,154,156}.

NO, ilk olarak 1620 yılında Paracelsus'un öğrencisi Jan Baptista Von Helmont tarafından hazırlanmış, oksijen ve nitrojen yapıları 1770 yılında Lavoisier tarafından açıklanmıştır. İnhalasyonunun toksik etkileri ise Sir Humphrey Davy tarafından 1799 yılında ortaya konulmuştur¹⁵⁷. 1970'li yılların sonlarına değin ozon tabakasını yıkan ve kansere yol açan yüzlerce zehirli molekülden biri olarak kabul edilen NO'nin vücut içindeki fonksiyonları 1977 yılında Ferid Murad'ın NO ve NO'e dönüşebilen nitro bileşiklerinin (nitrogliserin, nitroprussid vb.) vazodilatör etkilerini guanilat siklaz (GS) enzimini aktive ederek gösterdiğini bulmasıyla açığa çıkmaya başlamıştır. Ignarro ve Feelish 1980 yılında nitrovazodilatör bileşiklerin aktif maddesinin NO olduğunu belirlemişlerdir^{155,156,158,159,160}. Endotelden derivate salgılatıcı faktör olarak bilinen molekülün NO olduğunu ise 1986 yılında Ferid Murad ve Louis Ignarro isimli farmakologlar, birbirlerinden bağımsız birer bildiri ile açıklamışlardır^{43,154,158}. NO, hakkındaki verilerin çarpıcılığı nedeniyle 1992 yılında Science dergisi tarafından yılın molekülü ilan edilmiş ve Ferid MURAD, Louis IGNARRO ve Robert FURCHGOTT isimli üç araştırmacı, NO'nin kardiyovasküler sistemde görev alan önemli bir sinyal molekülü olduğunu gösteren buluşlarıyla 1998 yılı Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nü almaya hak kazanmışlardır^{25, 155,158}.

2.3.1.7.2. Nitrik Oksit Sentezi

NO, arginin aminoasitinden moleküler oksijen, NADPH (elektron donörü) varlığında ve NOS enzimleri katalizörlüğünde iki aşamada sentezlenir. Önce argininin guanidino nitrojeni hidroksillenir ve hidroksi arginin (N-OH-Arginin) ara ürünü oluşur. Stabil ve enzime sıkıca bağlı olan bu ara ürün, ikinci aşamada sitrullin ve NO'e dönüşür (Şekil 5).

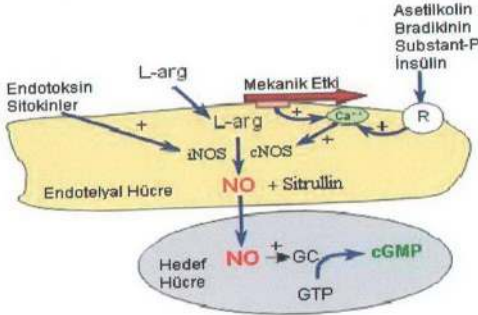


Şekil 5. Nitrik oksitin sentezi¹⁶¹.

NO sentezinin her iki aşaması da NOS enzimin monooksijenaz aktivitesi ile gerçekleşir^{23,162,163,164}. NOS enzimlerinin en önemli prostetik grubu hem'dir. Hem demiri, proteinin bir tiyol grubu (sistein yan zinciri) ile beşinci koordinasyon bağımlı yapar ve tepkimenin ikinci aşamasında hem demiri tekrar indirgenerek oksijen molekülünü bağlar, sonuçta NO ve sitrullin oluşur^{161,165,166}.

2.3.1.7.3. Nitrik Oksitin Etki Mekanizması

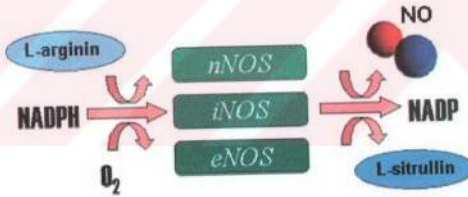
NO'nin hedef proteinlerdeki biyolojik etkinliğini hem-demirine olan aşırı ilgisi sağlar^{91,161,165}. NO, guanozin trifosfattan (GTP) siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunu katalizleyen sitoplazmik GS enzimini "hem" grubuna bağlanarak aktive eder^{155,159,161,167}. Oluşan cGMP etkisini cGMP ile kontrol edilen iyon kanalları, fosfodiesterazlar ve protein kinazlar yoluyla gösterir¹⁶¹. NO'nin etkileri yalnızca cGMP aracılığı ile gerçekleşmez. Uyarılmış makrofajlar, iNOS'u aktive ederek yüksek derişimde NO sentezine yol açarlar. Yüksek derişimdeki NO'de hedef hücrelerde DNA sentezi ve solunum zinciri anahtar enzimlerinin Fe-S merkezlerine bağlanarak mitokondriyal solunumu inhibe eder ve hücrelerin ölümüne neden olur (Şekil6)^{156,158,168,169}.



Şekil 6. Vasküler düz kas endotel hücrelerinde yapısal NOS ve iNOS enzimlerinin aktivasyonu ile oluşan NO'nin hedef hücrelerindeki etki mekanizmaları¹⁶⁹.

2.3.1.7.4. Nitrik Oksit Sentaz Enzimi ve İzofomları

NO sentezinden sorumlu NOS enzimlerinin üç farklı gen lokusundan sentezlenen üç farklı izoformu mevcuttur. Bunlar nöronal (nNOS, NOS I), indüklenebilir (iNOS, NOS II) ve endotelial (eNOS, NOS III) NOS enzimi olarak adlandırılır (Şekil 7)^{38,155,170,171}.



Şekil 7. Nitrik oksit sentaz enzimi izoformları¹⁷¹.

NOS enzimleri NO sentezini katalizleyebilmek için aktif form olan homodimerik yapıyı oluşturmak zorundadırlar^{172,173}. Yapısal izoformlar olan eNOS ve nNOS enzimlerinin allosterik aktivatörü kalsiyum/kalmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) kompleksidir ve aktiviteleri sitoplazmik Ca^{2+} derişimi ile kontrol edilir^{159,161,164}.

a. Nöronal NOS

Merkezi sinir sistemi nöronlarında haberci molekül olarak görev yapan NO'nin üretiminden sorumludur^{155,174}. İlk olarak 160-161 kDa molekül ağırlığında sitoplazmik bir protein olarak beyinde tanımlanmıştır^{43,161,162,175}. Ayrıca periferik nöronlar, iskelet kası, pankreas β -adacıkları, böbrek makula densa hücrelerinde ve çeşitli epitel hücrelerinde de gösterilmiştir^{43,176,177,178}. Periferik sinir uçlarında nNOS etkisiyle sentezlenen NO nörotransmitter olarak görev yapar ve düz kaslarda cGMP düzeylerini arttırarak mide dilatasyonu, penil ereksiyon gibi fizyolojik olaylarda rol oynar^{154,158}.

b. Endotelial NOS

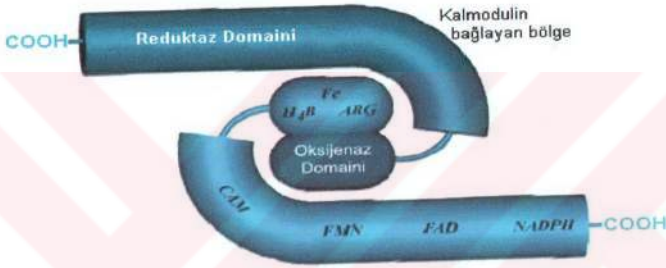
Yapısal bir izoformdur ve büyük oranda (%90) zar yapısında bulunur^{155,163,174}. Endotelde eNOS tarafından sentezlenen NO, difüzyonla düz kas hücrelerine geçerek GS enzimini aktive eder ve cGMP düzeylerini arttırarak düz kaslarda gevşemeye neden olur^{38,158,176}. Çok sayıda doku ve organda eNOS aktivitesi gösterilmişse de (mast hücreleri, trombositler, pankreas β -adacıkları, CA1 nöronlar vb.) temel kaynağının dokulardaki vasküler endotel hücreleri olduğu kabul edilmektedir^{161,170,178,179}.

c. İndüklenebilir NOS

İlk olarak murin makrofajlarında saptanmış olan sitoplazmik bir enzimdir^{162,170,175}. Alt birim olarak CaM'e gereksinim duyar, ancak diğer NOS enzimlerinden farklı olarak aktivitesi Ca^{2+} dan bağımsızdır. Salınımı gen transkripsiyonu düzeyinde kontrol edilir. iNOS sentezi bakteriyel ürünler ve inflamatuvar sitokinler (IFN- γ , IL-1, IL-2, TNF- α) tarafından indüklenir^{38,170}. Sadece fagositik lökositlere özgü bir enzim olmayıp; uygun indüksiyon sağlandığında bütün çekirdekli hücreler tarafından sentezlenebilir^{160,161,167}. CaM'in enzimi aktif formda tutması iNOS'un uzun süreli ve yüksek derişimde NO sentezleyebilmesini sağlar. Sitokin indüksiyonu sonrası iNOS sentezi birkaç saat içinde başlar 24 saat sonra en yüksek düzeye çıkar ve daha sonra hızla düşüş gösterir. Bulunduğu ortamda substrat kısıtlaması olmadığı ve yıkılmadığı sürece aktiftir. İndüksiyonu glukokortikoidler ile inhibe edilebilir¹⁶¹. Hastalık durumlarında ve damar hasarı sonrası aterosklerotik plakta, intima veya media da, iNOS ekspresyonu uyarılabilir²⁰.

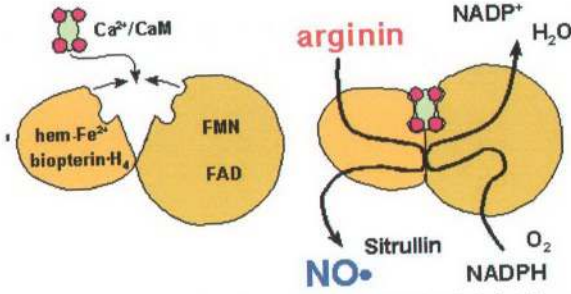
2.3.1.7.5. NOS Enzim Yapısı ve Koenzimleri

NOS enzimleri redüktaz ve oksidaz bölgeleri olmak üzere iki farklı alt birim içerir (Şekil 8). Her üç izoformun karboksi-terminal bölgesi yapı ve fonksiyon olarak, sitokrom p450 redüktaz enzimine benzerlik (% 60 homoloji) gösterir. Elektron akımından sorumlu olan bu bölge redüktaz bölgesi olarak adlandırılmıştır. Enzimin N-terminal bölgesi ise sitokrom p450 oksidaz enzimine benzer ve oksidaz bölgesi olarak adlandırılır. Oksidaz bölgesi, altbirimler arası etkileşimi sağlar ve dimerizasyondan sorumludur (Şekil 8)^{161,165,171,172,173,175,180,181}.



Şekil 8. NOS enzimi bölgeleri ve koenzimleri¹⁷¹.

NOS enzimlerinin aktiviteleri için gerekli koenzimler flavin adenin dinükleotid, flavin mononükleotid, tetrahidrobiopterin ve demir-protoporfirin IX yapısında bulunan hem-grubudur^{164,173,182}. Sitoplazmik kalsiyumun artması ile her bir CaM molekülü dört Ca^{2+} iyonu bağlar. Bu bağlanma ile CaM aktif konformasyona dönüşür ve Ca^{2+} /CaM kompleksi şeklinde eNOS ve nNOS enzimlerine bağlanarak aktive eder, bölgeler arasında kenetlenme sağlanır ve NO sentezi başlar (Şekil 9)^{161,180,183}.



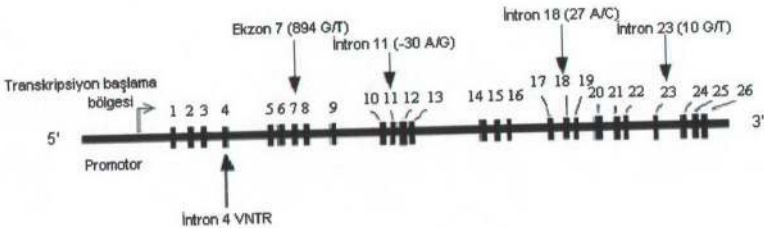
Şekil 9. Kalsiyum/Kalmodulin kompleksi ve yapısal NOS enzimlerin aktivasyonu¹⁸³.

CaM veya $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, NOS enzimlerine redüktaz ve oksidaz bölgeleri arasındaki orta bölümden bağlanarak bu bölgelerinin uygun konformasyonlara dönüşümünü ve enzimin aktivasyonunu sağlar^{20,163,164,184}. Her üç NOS enziminde de iki bölge arasındaki elektron akımı CaM kenetlenmesi tarafından sağlanır. Dimerizasyon sonrasında ortamda arginin eksikliği olduğunda ortamda akan elektronlar, NO sentezi yerine süperoksit yapımında kullanılır^{161,163,165}. NO ve süperoksit birlikte tepkimeye girerek hidroksil radikali kadar reaktif bir ürün olan peroksinitrit (ONOO^-) oluştururlar^{161,163}.



2.3.1.7.6. NOS Enzimlerinin Genetik Özellikleri

iNOS ve eNOS genleri 26, nNOS geni ise 29 ekzondan oluşur. İlk kez endotel hücrelerinde tanımlanan eNOS enzimi geni 21kb uzunluğundadır ve 7.kromozomun kısa kolunda lokalizedir (Şekil 10)^{19,48,170,185,186}.



Şekil 10. eNOS gen yapısı ve çalışılmakta olan polimorfizmleri¹⁹.

nNOS geni $\geq 100\text{kb}$ uzunluğunda olup, 12'nci kromozom üzerinde bulunur^{24,38,177,170}. iNOS geni ise 37kb uzunluğunda olup, 17. kromozom üzerinde yerleşiktir^{161,162,177}.

2.3.1.7.7. NOS Enzimlerinin Kontrolü

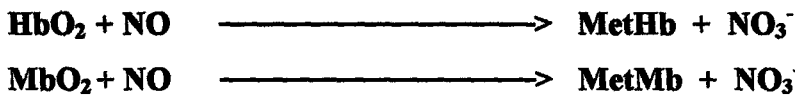
Yapısal NOS enzimleri olan nNOS ve eNOS'un düzenlenmesi, hücre içi Ca^{2+} derişimi, enzimin zarsal ve sitoplazmik bölgelerdeki dağılımının kontrolü ve fosforilasyon-defosforilasyon tepkimeleriyle gerçekleştirilir^{175,187,188,189}. Sadece eNOS için geçerli diğer bir aktivite kontrolü ise, protein-protein etkileşimidir^{21,23,165,190}. iNOS sentezi bazı inhibitör sitokinler (IL-4, IL-8, IL-10), büyüme faktörleri (TGF- β 1,2,3, PDGF-BB) ve nükleer faktör- κB gibi inhibitörler tarafından baskılanır^{161,175}.

2.3.1.7.8. Nitrik Oksit Metabolizması

Nitrik oksiti ortamdaki uzaklaştıracak herhangi özel bir enzim sistemi yoktur. Çok kısa yarı ömürlü bir molekül olan NO'nun yıkımından başlıca iki mekanizma sorumludur¹⁶¹.

a. NO ile oksihemoglobin (HbO_2) ve/ oksimiyoglobin (MbO_2) arasındaki tepkimeler

NO, eritrositler içinde bulunan oksihemoglobin (HbO_2) ya da kasta bulunan oksimiyoglobin (MbO_2) ile temas ettiğinde hızla inaktive olarak nitrata (NO_3^-) dönüşür. Fizyolojik koşullarda temel yıkım yolu budur^{155,161,191}.



b. Kendiliğinden oluşan oksidasyon tepkimeleri

NO molekülleri birbirleriyle ve oksijen molekülleri ile tepkimeye girebilir. Plazmada oluşan bu oksidasyon tepkimeleri sırasında önce reaktif nitrojen oksit türleri olan nitrojen dioksit (NO_2), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve dinitrojen tetroksit (N_2O_4) oluşur. Bu moleküllerde daha sonra ortamda bulunan farklı biyomoleküller ya da su ile tepkimeye girerek nitrit'e (NO_2^-) okside olurlar^{161,168,191}.

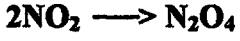
1) Oksijen molekülleriyle olan tepkime



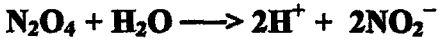
2) NO moleküllerinin birbirleriyle olan tepkimeleri



Sonuçta her iki tepkime sonucu açığa çıkan iki mol NO_2 kendiliğinden N_2O_4 'e dönüşür.



N_2O_4 molekülü ise daha sonra H_2O ile tepkimeye girerek nitrit oluşturur.

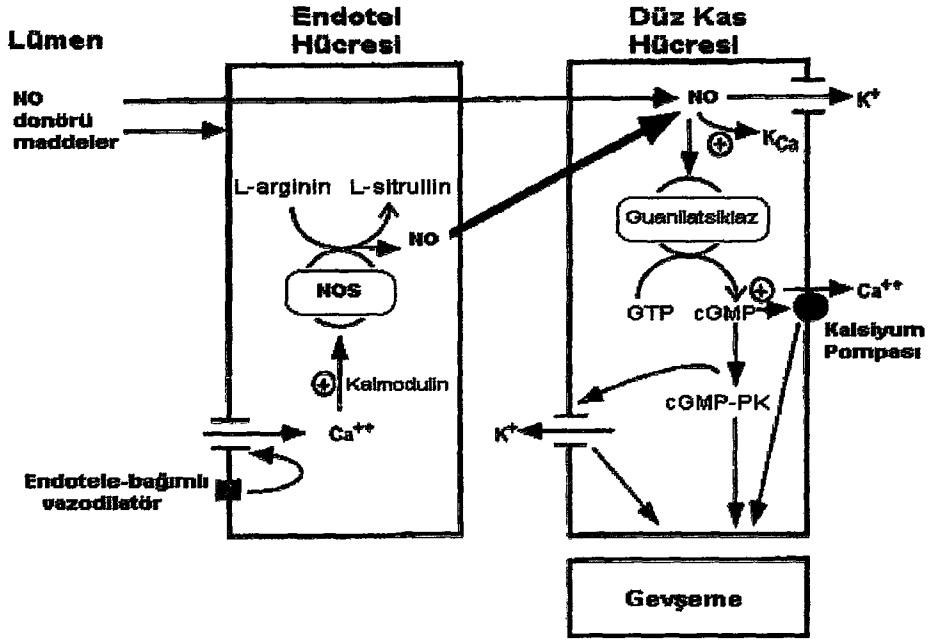


Ortamda oluşan nitrit, oksitleyici bir etken olmadıkça nitrata dönüşemez. Plazma ve idrarda NO yıkım ürünleri olarak nitrit ve nitrat gözlenir^{155,168}.

2.3.1.7.9. Nitrik Oksitin Vücuttaki Etkileri

Vücut içinde önemli hem yararlı ve hem de zararlı etkileri vardır. Yüksüz ve yağda çözünür bir molekül olması nedeniyle hücre membranları arasından kolayca diffüze olarak hücre içi ve hücrelerarası biyolojik haberci molekül olarak görev yapar. Gaz yapısındaki tek haberci moleküldür ve veziküllerde depo edilmez^{38,161,188}. Ayrıca gen transkripsiyonu, mRNA translasyonu ve sentez sonrası protein modifikasyonu düzeyinde de etkisi vardır^{159,161}.

Endotelial kaynaklı NO insan ve hayvanlarda, damar gevşetici etki yaparak, damar duvar geçirgenliğini etkiler ve böylece kan basıncı kontrolü, penil ereksiyon ve yemeği takiben mide dilatasyonu gibi fizyolojik olayları düzenler (Şekil 11)^{154,156}.



Şekil 11. Endotel hücrelerinde NO sentezi ve vasküler düz kas hücrelerinde oluşturduğu gevşemenin mekanizması¹⁵⁶.

K_{Ca} : Kalsiyum iyonuna bağımlı potasyum kanalı, NOS : Nitrik oksit sentaz, NO : Nitrik oksit, GTP : Guanozin trifosfat, cGMP : Siklik guanozin monofosfat, PK : Protein kinaz.

Ayrıca beyinde sinaptik iletimin artması hafızanın şekillenmesiyle bağlantılı olduğu düşünülen uzun süreli güçlendirme (long-term potentiation) ve makrofajlar aracılığıyla tümör hücrelerinin yok edilmesi olayını meydana getirir^{154,158,168,187,188,192}. Uygunsuz yerlerde ve miktarlarda bulunduğu, yaşamsal önemi olan demir-sülfür içeren enzimlerle reaksiyona girerek bunların etkinliğini engeller. Böylece hücrelerin yaşaması için gerekli temel biyokimyasal olaylardan biri olan mitokondriyal solunumu baskılar, genetik yapı taşı olan DNA'da yıkımlara yol açabilir ve serbest oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek son derece olumsuz etkileri olan peroksinitrit gibi ürünlerin açığa çıkmasına neden olur^{154,158,159,181,193}. Ayrıca nörolojik, inflamatuvar ve otoimmün bozukluklar sonucu oluşan doku hasarından NO'nin aşırı miktarda salınımı sorumludur^{168,194}. NO ile ilişkili temel fizyolojik olaylar ve patolojik durumlar Tablo 5 ve 6'da gösterilmiştir.

Tablo 5. NO ile ilişkili fizyolojik olaylar^{154, 155,158,168}

- | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| • Normal vasküler tonus | • Penil ereksiyon |
| • Guanilat siklaz enzim aktivasyonu | • Antitümoral etki |
| • Siklooksijenaz enzim aktivasyonu | • Yemek sonrası mide dilatasyonu |
| • Trombosit agregasyonu inhibisyonu | • Mukoza hücre korunması |
| • Lökosit hücre adhezyon inhibisyonu | • Uzun süreli hafızanın oluşumu |

Tablo 6. NO ile ilişkili patolojik durumlar^{154, 155,158,168}

Azalmış nitrik oksit salınımı

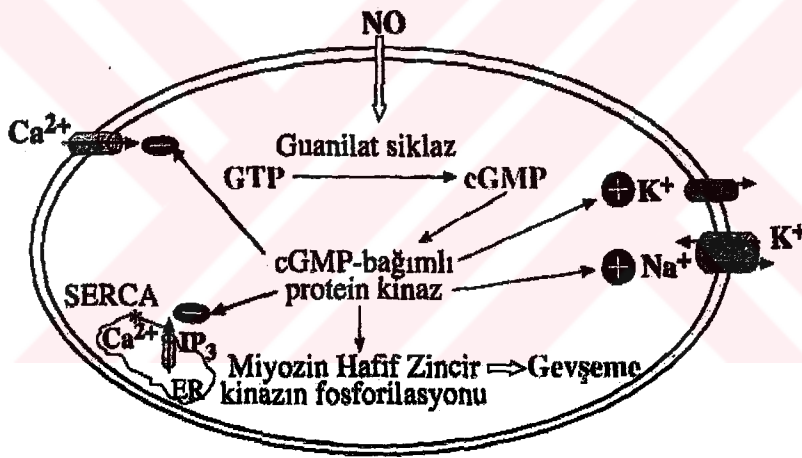
- Ateroskleroz
- Anjina pectoris
- Hipertansiyon
- Pulmoner hipertansiyon
- Erişkin solunum zorluğu sendromu
- Kartegener Sendromu
- İnfantil pilor stenozu
- İmpotans

Artmış nitrik oksit salınımı

- Septik şoka bağlı hipotansiyon
- Endotoksik şok
- Dilate kardiyomiyopati
- Ülseratif kolit
- Serebral iskemi ve paralizi
- Multiple Skleroz
- Epilepsi
- Alzheimer hastalığı
- Lupus eritematozis
- Romatoid artrit
- Allograft rejeksiyonu
- Mitokondriyal solunumun baskılanması

2.3.1.7.9.1. Kardiyovasküler sistem üzerine etkiler

a. Fizyolojik etkileri : Vasküler dilatasyon en önemli etkisidir. Kan akış hızının artışı, düz kas vasküler endotel hücreleri üzerinde mekanik bir kuvvet oluşturarak hücre içi Ca^{2+} 'un artmasına neden olur. Ayrıca asetilkolin, bradikinin gibi ajanlarda vasküler endotel reseptörlerini aktive ederek hücre içi Ca^{2+} 'un artmasına neden olur. Hücre içi Ca^{2+} artışı endotel hücrelerinde bulunan NOS enzimini aktive eder ve NO sentezini arttırarak düz kaslarda vazodilatasyona neden olur^{168,177,191}. Şekil 12'de düz kaslarda NO etkisiyle oluşan cGMP artışı, cGMP-bağımlı protein kinaz G (PKG)'lerin aktivasyonunun sitoplazmik kalsiyum derişimini düşürmeye yönelik olayları başlatması, PKG etkisiyle miyozin hafif zincir kinazın inaktivasyonu ve kasılmanın inhibe edilerek gevşemenin oluşması gösterilmiştir (Şekil 12)¹⁶¹.



Şekil 12. Endotel kaynaklı nitrik oksit düz kasları üzerinde olan etkilerinin mekanizması¹⁶¹.

SERCA: Sarkoplazmik/endoplazmikretikulum kalsiyum ATP'az, IP₃: İnositol trifosfat, cGMP :Siklik guanozin monofosfat,

Ca²⁺: Kalsiyum, K⁺: Potasyum kanalı, Na⁺: Sodyum kanalı.

b. Patolojik etkileri : Endotoksik şok gibi patolojik durumlarda, bazı sitokin ve endotoksinlerin salınımıyla iNOS uyarılır ve bunun sonucunda aşırı miktarda üretilen NO hipotansiyona neden olur^{41,155,168}. Kanserli hastalarda sitokin tedavi sonucu oluşan hipotansiyondan, septik şok ve sirozda gözlenen vazokonstriktörlere direçli vazodilatasyondan ve dilate kardiyomiyopatiye bağlı kardiyak disfonksiyondan iNOS uyarısı sonucu aşırı miktarda sentezlenen NO sorumludur^{155,158,168,194,195}.

c. Ateroskleroz ve NO: NO antiaterojenik etkili bir moleküldür. Antiaterojenik etkileri antiplatelet, antiproliferatif, antienflamatuar ve LDL oksidasyonunu inhibe edici özellikleri yoluyla oluşmaktadır^{20,38,196,197}.

1. Antiplatelet etki: NO, siklik GMP'ye bağımlı bir mekanizmayla cAMP

konsantrasyonunu arttırarak trombosit agregasyonunu, adhezyonunu ve trombosit aktive edici faktörün trombini uyarmasını inhibe eder^{43,48,198}. Trombositler ayrıca kendileri de NO üreterek, negatif feedback yoluyla trombosit agregasyonunu inhibe edebilirler^{43,168}.

2. Antiproliferatif etki: NO ve donörleri vasküler düz kas hücre proliferasyonu, migrasyonu ve ekstrasellüler matriks sentezini inhibe ederler^{20,163,168,198}.

3. Anti-inflamatuar etki: Aterojenik uyarı kemokinlerin ve adhezyon moleküllerinin salınımını arttırarak yeni enflamatuar hücrelerin de olaya katılmasına neden olur. NO, nükleer transkripsiyon faktörü üzerindeki inhibitör etkisi ile lökosit adhezyon moleküllerinin (*P-Selektin*, *E-Selektin*, *VCAM-1*) sentezini baskılayarak nötrofil ve monositlerin adhezyon ve aktivasyonlarını azaltır^{20,25,46,161,165}.

4. LDL'nin oksidasyonunu inhibe eder¹⁹⁹.

2.3.1.7.10. NOS gen polimorfizmleri ve ilişkili hastalıklar

eNOS geninde çok sayıda VNTR ve ardışık dinükleotid tekrar [(CA)] polimorfizmleri bulunmaktadır^{17,200,201}. KAH açısından en çok incelenen eNOS 4. intron VNTR ve 7. ekzon Glu298Asp polimorfizmleridir^{17,18,19,28,114,186,201,202,203,204,205}. Bunlar yanı sıra eNOS geni "5' flanking" bölgede bulunan nokta polimorfizmleri (-786 T→C, -922 A→G ve -1468 T→A), intron 13'te bulunan ardışık çok sayıda tekrar polimorfizmi (CA), 18. intronda bulunan biallelik polimorfizm ve 23. intron (10 G→T) polimorfizmi de KAH yönünden incelenen diğer NOS gen polimorfizmleridir^{28,186,203,206,207}.

a. eNOS geni intron 4 polimorfizmi

eNOS geni 4. introndaki 27 baz çift (bç)'lik VNTR polimorfizmidir, sırasıyla dört ve beş tekrardan oluşan iki allel (a ve b) içerir. 27 bç'nin 19'uncu bazındaki beş tekrardan oluşan b allelinde (420 bç), ilk üç tekrar AAA ve son iki tekrar ise GG'dir. Daha küçük olan ve dört tekrardan oluşan a allelinde (393 bç) ise ilk iki tekrar AA ve son iki tekrar ise GG'dir. Yapılan çalışmalarda a allel taşıyıcılığının KAH, AMI, esansiyel HT, kronik

böbrek yetmezliği ve duodenal ülser kanaması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir^{9,17,110,114,186,200,201,202,203,205,208,209}.

b. eNOS geni 7.ekzon Glu298Asp polimorfizmi

eNOS geni 894'üncü pozisyonda G→T polimorfizmi saptanmıştır. Bu polimorfizm glutamik asit yerine aspartik asit geçmesine neden olmaktadır. Bu polimorfizmin; KAH, AML, ateroskleroz, koroner spazm, esansiyel HT, beyin infarktı ve kronik böbrek yetmezliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir^{16,18,19,28,48,114,185,186,202,203,204,205,206,210,211,212}.

c. eNOS geni 5' flanking bölge -786 T/C ve İntron 23 G10-T polimorfizmleri

Yapılan çalışmalarda her iki polimorfizm ile KAH arasında ilişki olduğu gösterilmiştir^{28,186,202,203,206,207}.



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Cihazlar

- UV Spektrofotometre.....Shimadzu UV-260
- UV Spektrofotometre.....Shimadzu UV-1601
- Mikrosantrifüj.....Beckman Microfuge E
- Soğutmalı masa üstü santrifüj.....Eppendorf centrifuge 5403
- Thermal Cycler.....Perkin Elmer Cetus 9600
- Speed Vac Konsantratör.....Savant SVC 100H
- Elektroforez Tankı.....Bio-Rad Sub-Cell GT
- Elektroforez Güç Kaynağı.....Pharmacia Power Supply EPS 500/400
- Mikrodalga Fırın.....Arçelik MD
- Derin Dondurucu.....Bosch
- Kar Makinası.....Scotsman AF- 10
- Polaroid Kamera.....MP4 Land Camera
- Su Banyosu.....Electro-mag N-72
- Etüv.....Nüve EN 400
- Analitik Terazisi.....Mettler AJ 100
- Digital pH Metre.....Beckman Century SS-1
- Otomatik Pipet.....Gilson P-2, P-20, P-100, P-1000µl
- Manyetik Karıştırıcı.....Heidoph MR 2002
- Vorteks.....Nüve NM 110, elektro-mag M 16
- Biyokimya otoanalizörü.....Olympus AU5200

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Proteinaz K.....Sigma

- Deoksi Nükleotid Trifosfat (dNTP).....Sigma
- Taq DNA Polimeraz.....Sigma
- Dimetil sulfoksit (DMSO).....Sigma
- Primerler (HPLC grade).....WG Biotech AG, Almanya
- Agaroz.....Sigma
- NuSieve Agaroz.....Sigma
- Etidiyum Bromür.....Merck
- Marker x174DNA / Hinf IFermentase

Kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

3.2. ÖRNEK SEÇİMİ ve ELDESİ

Çalışma kapsamına, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Polikliniğine göğüs ağrısı yakınmasıyla başvuran ve KAH ön tanısı konularak koroner arterleri koroner anjiyografi (Judkins tekniği) ile değerlendirilen hastalar alındı. Hasta grubu koroner anjiyografisinde plak ya da darlık belirlenen, kontrol grubu ise koroner anjiyografisinde lezyon saptanamayan bireylerden oluşturuldu.

Hastaların koroner anjiyografi işlemi öncesi 12 saat aç kalmaları sağlandı ve kan örnekleri koroner anjiyografiden hemen önce düz ve Na-EDTA içeren iki ayrı tüpe alındı ve hiç bekletilmeksizin Merkez laboratuvarına iletili.

Antikoagülansız düz tüplere aktarılan venöz kan örneklerinin serumları bekletilmeksizin ayrıldı ve lipid profilleri (total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserid) tam otomatik Olympus AU5200 biyokimya otoanalizöründe çalışıldı. EDTA içeren tüplere alınan kan örnekleri buzdolabında (+4°C) saklandı ve en geç bir hafta içerisinde lökosit DNA'ları izole edilip konsantrasyon ve verimleri ölçülerek -20°C'de saklandı.

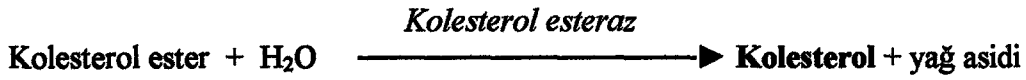
3.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.3.1. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri

3.3.1.1. Total Kolesterol Ölçümü [(Kolesterol oksidaz-Peroksidaz-4-Aminoantipirin (CHOD-PAP) Metodu – Enzimatik Kolorimetrik Yöntem)]²¹³

Total kolesterol ölçümleri; Olympus AU5200 otoanalizöründe CHOD-PAP yöntemi ile yapıldı.

Prensip: Kolesterol esterlerinin tümü kolesterol esteraz ile serbest kolesterol ve yağ asitlerine dönüştürülür. Serbest kolesterol oksijen varlığında, kolesterol oksidaz ile kolesten-3-one ve hidrojen peroksit (H₂O₂)'e çevrilir. Açığa çıkan H₂O₂, peroksidaz varlığında fenol ve 4-aminoantipirin ile reaksiyona girerek kinonimin kompleksi oluşturur. Oluşan renk şiddeti kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 500 nm'de fotometrik olarak ölçüm yapılır.



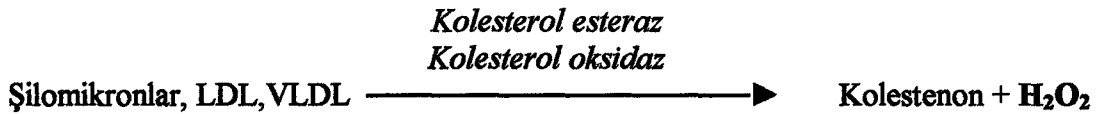
Referans değer : < 200mg/dl²¹³.

3.3.1.2. HDL Kolesterol Ölçümü (Direkt Homojen Enzimatik Kolorimetrik Yöntem)²¹⁴.

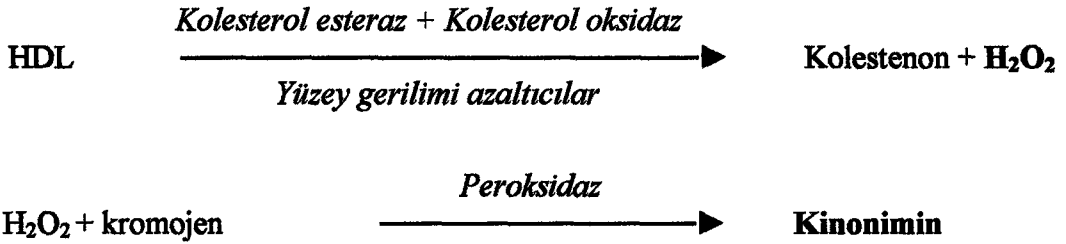
HDL-K ölçümü, Olympus AU5200 otoanalizöründe yapıldı.

Prensip: Ölçüm, iki farklı tepkime basamağını içerir. İlk aşamada; Şilomikronlar, VLDL ve LDL enzimatik reaksiyonlarla uzaklaştırılır. İkinci aşamada ise HDL spesifik enzimatik reaksiyonlarla ölçülür.

1. Aşama : Kolesterol esteraz, kolesterol oksidaz ve son aşamada katalaz enzimleri ile VLDL-K, LDL-K ve şilomikronların ayrıştırılması esasına dayanır;



2. Aşama : Serbest kalan HDL-K'ün özgül ölçümü gerçekleşir;



Açığa çıkan kinonimin yoğunluğu, 593 nm' de ölçüldüğünde, HDL konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Referans değer : 35 – 60 mg/dl²¹⁴.

3.3.1.3. LDL Kolesterol Ölçümü

LDL kolesterol ölçümünde kişilerin TG düzeylerine bağlı olarak iki farklı yol izlendi. TG düzeyleri 400mg/dl'nin altında olan hastalarda çöktürmesiz enzimatik kolorimetrik yöntem, TG düzeyleri 400mg/dl'nin üzerinde olan hastalarda ise direk enzimatik yöntem kullanıldı.

1. Çöktürmesiz Enzimatik Kolorimetrik Yöntem

Prensip: Bu yöntemde LDL-K düzeyleri ölçülen total-kolesterol, HDL-kolesterol (HDL-K) ve trigliserid düzeyleri Friedewald formülünde yerine konularak hesaplanır.

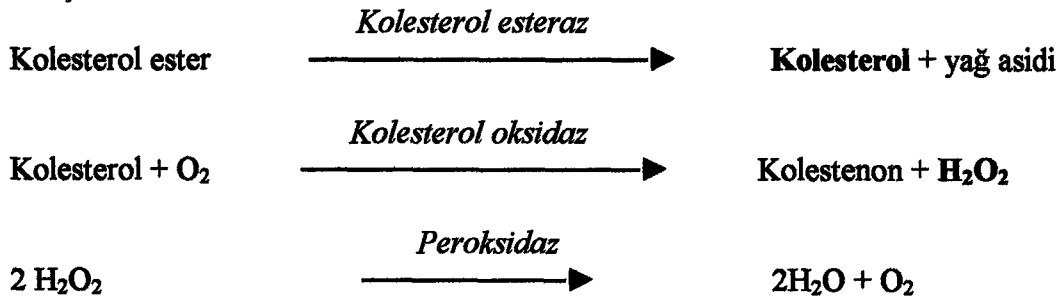
Friedewald formülü :

$$\text{LDL-K (mg/dl)} = \text{Total kolesterol (mg/dl)} - [(\text{HDL-K (mg/dl)} + \text{TG/5 (mg/dl)})] = \text{mg/dl}^{29,215}.$$

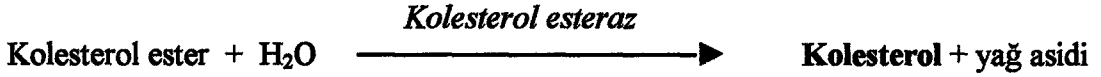
2. Direkt Enzimatik Yöntem

Prensip: Birinci aşamada kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz, son aşamada ise katalaz enzimleri kullanılarak VLDL-K, HDL-K ve şilomikronlar ayrıştırılır. İkinci aşamada da; deterjan etkisiyle serbestleşen LDL-K enzimatik olarak ölçülür²¹⁵.

1. Aşama :



2. Aşama :



HDAS : N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoksianilin.

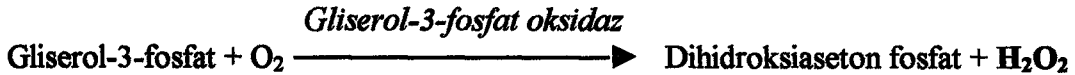
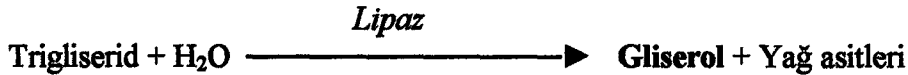
600 nm' de ölçülen kinonimin düzeyleri, LDL ile doğru orantılıdır.

Referans değer : < 130mg/dl²¹⁵.

3.3.1.4. Triglicerid Ölçümü [(Gliserol fosfat oksidaz-Peroksidaz 4-Aminofenazon (GPO-PAP) Metodu, Enzimatik Kolorimetrik Yöntem)]²¹⁶.

Triglicerid ölçümü, Olympus AU5200 otoanalizöründe, GPO-PAP yöntemi ile gerçekleştirildi.

Prensip: Trigliceridlerin lipaz enzimi ile hidrolizi sonucu gliserol ve yağ asitleri açığa çıkar. Gliserol, ATP varlığında gliserol kinaz enzimi ile gliserol-3-fosfata, gliserol-3-fosfatta oksidaz ile dihidroksiaseton fosfat ve H₂O₂'e dönüşür. Oluşan H₂O₂, peroksidaz varlığında fenol ve 4-aminofenazon ile reaksiyona girerek kinonimin boyasını oluşturur. Oluşan renk şiddeti (500nm) triglicerid konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



Referans değer : < 200mg/dl^{216,217}.

3.3.2. MOLEKÜLER ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.3.2.1. Tam Kandan Fenol-Kloroform (Modifiye Poncz) Yöntemi ile DNA Eldesi²¹⁸

Prensip: EDTA'lı tüplere alınan tam kan örneklerinin plazması uzaklaştırılır. Hemolizat içindeki eritrositler hipotonik parçalayıcı çözelti ile hemoliz edilir ve santrifüj edilerek lökositler ayrıştırılır. Lökosit pelleti üzerine sodyum dodesil sülfat (SDS) ve proteinaz K eklenir ve bir gece inkübe edilerek hücre zarlarının ve proteinlerin hidrolizi gerçekleştirilir. Daha sonra karışımdaki protein ve hücre artıkları fenol-kloroform eklenerek uzaklaştırılır. Saflaştırılan DNA soğuk etanolla çöktürülerek, genomik DNA elde edilir²¹⁸.

Ayrıraçlar:

1. Parçalayıcı (Lizis) Tampon Çözeltisi : Günlük hazırlanmalıdır.

Amonyum klorür (NH_4Cl)	131 mM	(7.14g)
---	--------	-----------

Amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3)	0.9 mM	(0.07g)
--	--------	-----------

distile su ile bir litreye tamamlanır

2. 4 M NaCl

3. Proteinaz K Çözeltisi (25mg/ml) : 2.5 ml Tris-HCl (10 mM, pH'sı 7.4) içinde çözülür ve -20°C 'de saklanır.

4. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS %10) : 100 g SDS bir litre saf suda çözülür ve 37°C 'de saklanır.

5. Tampon Çözeltisi :

150mM NaCl

25 mM EDTA Disodyum (pH 7.5)

100 mg SDS (% 0.1)

5 mg Proteinaz K distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

6. Doymuş Fenol Çözeltisi : 250g kristalize fenol 50ml saf suda çözülür. Üzerine eşit hacimde 0.5 M Tris-HCl tamponu (pH 8.0) eklenir ve iyice karıştırılarak fazlar ayrışınca kadar bekletilir. Üst fazın pH'sı ölçülür, şayet pH 8.0'in altında ise üst faz aspire edilerek üzerine eşit hacimde 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) eklenerek aynı işlem tekrarlanır. Bu işleme üst faz pH'sı 8.0 oluncaya kadar devam edilir. Son olarak konsantrasyonu % 0.1 olacak şekilde 8-hidroksi kinolin (1 g) eklenir ve $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanır.

7. Kloroform

8. Saf soğuk Etanol (%95)
9. % 70'lik Etanol

Yöntem:

- EDTA'lı tam kan örneğinden 500 µl alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılır.
- Üzerine 1 ml günlük hazırlanmış parçalayıcı tampon eklenerek oda ısısında bir kaç dakika yavaşça karıştırılıp 10 dakika buz üstünde bekletilir. Daha sonra 4°C'de, 2500rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek eritrositlerin parçalanması sağlanır. Süpernatant tüp yavaşça ters çevrilerek uzaklaştırılır ve tüp dibinde lökosit pelleti gözlenir. Parçalayıcı çözelti ile yıkama işlemi bir veya iki kez tekrarlanarak pellet saflaştırılır.
- Lökosit pelleti üzerine 500 µl tampon çözeltisi eklenir ve bir gece 37°C'de inkübe edilir.
- Ertesi sabah solüsyon kıvamlı bir hal alır. Eğer lökositler tam olarak parçalanmamışsa 55°C'de iki saat daha inkübasyonda tutulur. Ardından eşit hacimde doymuş fenol eklenir. Hızlı bir şekilde birkaç dakika alt üst edilir, 10 dakika + 4°C'de bekletilerek 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
- Üstteki berrak faz pipetle çekilerek temiz bir tüpe aktarılır ve işlem tekrarlanır.
- Kloroform ve fenolden eşit hacimde eklenir, hızla çalkalanarak, 10 dakika buzda bekletilir ve 4°C'de, 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
- Üst faz pipetle dikkatlice çekilerek soğuk etanol bulunan bir kaba aktarılır, alt fazdan fenol çekilmemesine dikkat edilmelidir. DNA görünür ipliksi hale gelinceye ve presipite oluncaya kadar etanolde yavaşça hareket ettirilir.
- DNA yumağı ependorf tüpüne alınır, üzerine saf alkol eklenerek 13000 rpm'de iki dakika santrifüj edilir ve alkol uzaklaştırılır.
- Çöken DNA pelleti üzerine %70'lik etanol eklenir ve 13000 rpm'de iki dakika santrifüj edilerek ependorf yavaşça ters çevrilir ve dikkatlice alkol atılır.
- Elde edilen DNA pelletinin miktarına göre üzerine steril saf su (50-100 µl) eklenir ve bir gece 37°C'de çözünmesi için bekletilir.
- 10 µl çözünmüş DNA 590 µl saf suyla karıştırılır ve 260 nm'deki absorbansı ölçülerek konsantrasyonu hesaplanır.

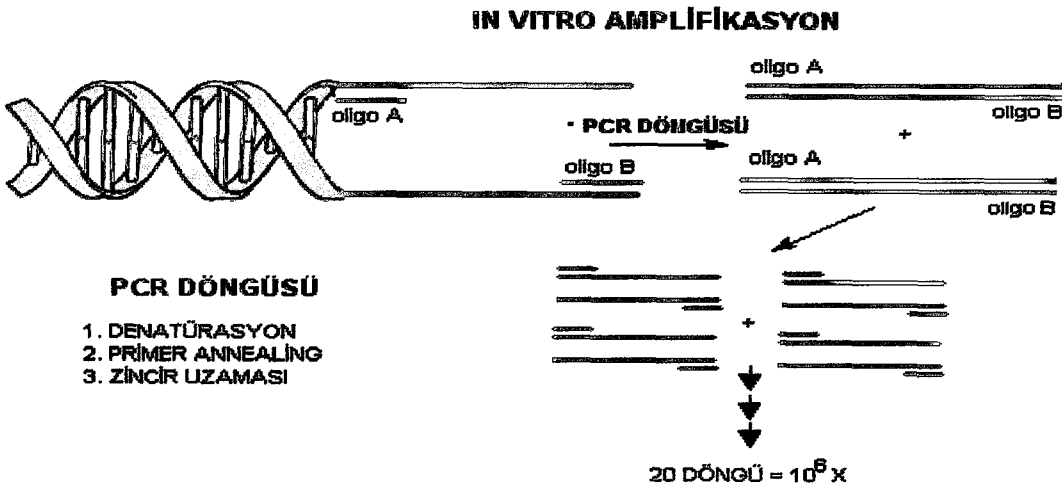
DNA konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) = $\text{OD}_{260} \times \text{sulandırma katsayısı (60)} \times 50$ (ekstinksiyon katsayısı)

DNA'nın 280 nm'deki absorbanı ölçülerek, $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ oranından verim hesaplanır. Verimin 1.5'dan daha yüksek olması istenir.

3.3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile eNOS Geninin Amplifikasyonu

PCR, DNA içinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi invitro koşullarda çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak isimdir²¹⁹.

Prensip: PCR, çift sarmal bir DNA molekülünde bulunan hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Bu amaçla önce kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edilir ve DNA çift sarmalının açılması sağlanır. Bunun ardından amplimer olarak da adlandırılan primerler DNA molekülleri üzerinde kendilerine komplementer olan bölgelere bağlanırlar. Primerlerin spesifik olarak bu hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. Daha sonra uygun ısıya çıkılır ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört deoksiribonükleotid fosfatlar (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) eklenerek DNA'nın 3' OH ucundan uzaması sağlanır. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni bir DNA molekülü sentezlenmiş olur (Şekil 13)²¹⁹.



Şekil 13. PCR döngüsü²¹⁹

Amplifikasyonun bir döngü sonucu oluşan ürünleri sonraki döngü için kalıp işlevi gördüğünden her bir başarılı döngü temel olarak istenilen DNA ürününün miktarını ikiye katlar. Bu işlem 25-30 kez tekrarlandığında, çoğaltılmak istenilen bölge, yaklaşık bir milyon kez çoğaltılmış olur²¹⁹.

Ayrıçlar:

1. 10 X PCR Tamponu :

MgCl ₂	(1M)	75µl
KCl	(1M)	1.25ml
Tris-HCl	(1M)	0.5ml pH 8,4
Jelatin		5mg
Steril distile su		3.2ml eklenerek 37°C’de çözülür.

2. 6.0 mM dNTP Karışımı :

dATP	100 mM	60µl
dGTP	100 mM	60µl
dCTP	100 mM	60µl
dTTP	100 mM	60µl, alınarak üzerine 760 µl steril su eklenir.

3. % 100’lük dimetil sülfoksit (DMSO) :

4. Taq polimeraz

5. Primerler :

25’er pmol eNOS geni 4. intron 27 bç’lik polimorfik bölge amplifikasyonu için gerekli primerlere ait baz dizileri aşağıda verilmiştir^{110,201,207}.

Primer I : 5' AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT - 3'

Primer II : 5' TCT CTT AGT GCT GTG CTC AC - 3'

a. Amplifikasyon Koşulları : Bir örnek amplifikasyonu için aşağıda içeriği açıklanan şekilde PCR karışımı hazırlanır ve anlık santrifüj sonrası örnek tüpüne bu karışımdan 49µl aktarılır. Daha sonra tüpe 0.5 µg DNA örneği eklenir. Son aşamada ise tüpe 0.1µl (0.5 ü) Taq Polimeraz enzimi eklenerek karıştırılıp santrifüj edildikten sonra PCR cihazına (thermal cycler) konularak uygun PCR programında spesifik amplifikasyon gerçekleştirilir.

PCR Karışımı (bir örnek için) : (total hacim 50 µl)

10 x PCR tamponu : 5 µl

Primer I : 1 µl (25 pmol/µl)

Primer II : 1 µl (25 pmol/µl)

dNTP's : 0.5 µl (6mM)

DMSO : 5 µl (% 100)

Saf su : 36.5 µl

b. PCR Programı (Perkin Elmer 9600 Thermal Cycler)²⁰¹

eNOS geni 4. introndaki 27 bç'lik polimorfik bölge amplifikasyonu için PCR programı :

Denatürasyon

94 °C'da 5 dakika

Döngüler

94°C'da 1 dakika

56 °C'da 1 dakika

72 °C'da 2 dakika

denatürasyon

yapışma (annealing)

uzama (extension)

35 döngü

72 °C'da 5 dakika

son uzama

c. Amplifikasyon Kontrolü

Agaroz Jel Elektroforezi

Prensip : Elektriksel alanda, % 2'lik NuSieve agaroz-agaroz jel üzerine aplike edilen DNA'ların anoda doğru göç etmesi esasına dayanır. Örnekler DNA belirteci eşliğinde yürütülerek oluşan DNA bantlarının baz uzunluklarının saptanması sağlanır²⁰⁷.

Ayırıcılar :

1. 10xTBE (Tris Borat EDTA) tampon :

Tris baz 108 g

Borik asit 55 g

200 ml 0.1 M EDTA (pH 8.0) içinde çözülür ve daha sonra 1000 ml'ye saf su ile tamamlanır. Kullanılacağı zaman 1:20 sulandırılarak 0.5xTBE tampon hazırlanır.

2. %2'lik NuSieve agaroz-agaroz (1:1) jel :

NuSieve agaroz 1 g

Agaroz 1 g

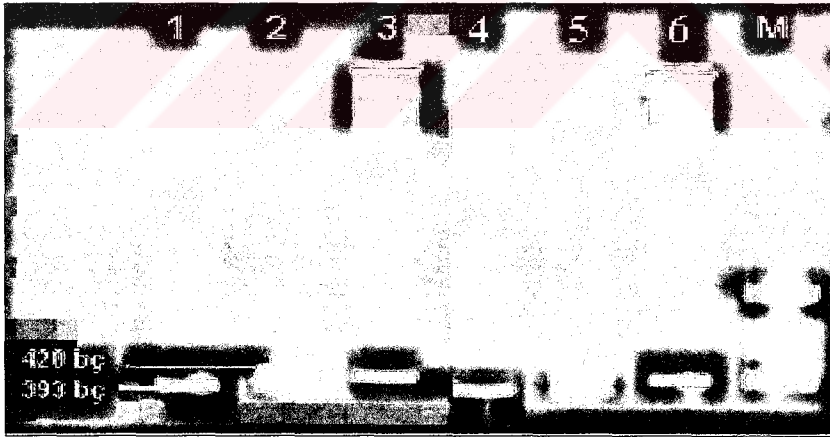
10 ml 0.5xTBE tamponda çözülür.

3. Etidyum bromür : 5mg/ml olacak şekilde saf suda hazırlanır.

4. Yükleme Boyası (loading dye) : 15 g ficoll, 50-100 mg bromfenol mavisi, 10 ml gliserol ve 90 ml 0.5xTBE tampon bir erlene konularak manyetik karıştırıcıda ısı yardımıyla çözülür. Çözünme işleminden sonra 100 ml'ye 0.5xTBE tamponla tamamlanır.

PCR işlemi sonrası, PCR ürünleri % 2'lik NuSieve agaroz-agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilir. PCR ürünü (5 µl) yükleme boyası (5 µl) ile karıştırılarak , 150 volt akımda yaklaşık 60 dakika yürütülür.

Görüntüleme : Elektroforez işlemi sonrası agaroz jel etidyum bromür içinde yaklaşık 30 dakika bekletilir ve su ile yıkanarak jelin artık boyalardan temizlenmesi sağlanır. UV transillüminatörde kamera ile deney sonucu görüntülenir ve çekilen fotoğraflar değerlendirilerek eNOS genotipleri belirlenir (Şekil 14).



Şekil 14. eNOS geni intron 4 polimorfizmi genotiplerinin jel görüntüsü.

1 : aa kontrol, 2 : ab kontrol, 3 : bb kontrol, 4 : aa hasta, 5 : ab hasta, 6 : bb hasta

M : Marker (x174 DNAHinfI)

3.3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS paket programı (version 10.0) ile analiz edildi. Çalışma gruplarının biyokimyasal parametreleri ortalama $\pm$ SD verileri ile tanımlandı. KAH (+) ve KAH (-) olan bireylerin klinik özellikleri ve lipid parametreleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için Student t testi kullanıldı. Grupların karşılaştırılmasında KAH(+) ve KAH(-) olgular arasındaki genotip dağılımları X^2 ve Fisher's Exact testi ile belirlendi. Allelik sıklıklar gene-counting yöntemi ile saptandı. Belirleyici değişkenler ve eNOS genotiplerin KAH (+) ve KAH (-) gruplar arasındaki riskini % 95 güven aralığında belirlemek için lojistik regresyon modeli kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışma grubu kapsamına Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji polikliniğine başvuran ve KAH ön tanısı konularak koroner arterleri koroner anjiyografi ile değerlendiren 266 hasta alındı. Koroner anjiyografi sonucunda, sol anterior inen arter, sağ veya sirkümfleks koroner arter ya da bunların birincil dallarının iç çapında % 40 ve üzeri daralma saptanan 133 birey KAH (+) olan grubu, anjiyografik lezyon saptanamayan 133 birey ise KAH (-) grubu oluşturdu.

Çalışma grubunu oluşturan tüm bireylerin klinik karakteristikleri ve biyokimyasal parametrelerinin istatistiksel verileri Tablo 7’de gösterilmiştir.

KAH (-) bireylerin 65’i erkek ve 68’i kadın; KAH (+) bireylerin ise 89’u erkek, 44’ü kadındı. Çalışma grupları risk faktörlerine göre değerlendirildiğinde erkek cinsiyette KAH oranı kadınlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.03$). KAH (-) bireylerin yaş ortalaması 51.98 ± 9.84 , KAH (+) bireylerin ise 52.75 ± 10.68 olarak bulundu. Grupların yaş ortalamaları dikkate alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$). Çalışma grubumuz içinde toplam 109 kişi hipertansif, 38 kişi DM hastasıydı. KAH (-) bireylerin % 35.3’ü ve KAH (+) bireylerin ise % 46.6 ‘sı HT hastasıydı. Yapılan istatistiksel analizler sonucu gruplar arasında HT açısından anlamlı bir istatistiksel fark bulunamadı ($p > 0.05$). KAH (-) bireylerin % 8.3’ü, KAH (+) bireylerin ise % 20.3’ü DM hastasıydı. KAH (+) grupta DM anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.005$). Sigara içenlerin toplam sayısı ise 102 olarak bulundu. Sigara faktörü dikkate alındığında, sigara içme oranı KAH (+) grupta (% 48.1), KAH (-) gruba (% 28.6) göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.001$). Gruplar lipid parametreleri açısından karşılaştırıldığında. KAH (+) bireylerin Total-K, LDL-K ve TG ortalamaları, KAH (-) bireylerin ortalamalarına göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek bulundu ($p < 0.05$). Bunun yanı sıra HDL-K ortalamaları değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$).

Tablo 7. KAH (-) ve KAH (+) olan bireylerin klinik karakteristikleri ve biyokimyasal parametrelerinin istatistiksel verileri.

	KAH (-) n = 133	KAH (+) n = 133	p*
Erkek / Kadın (n, n)	65 / 68	89 / 44	*
Yaş (x ± SD)	51.98 ± 9.84	52.75 ± 10.68	-
Hipertansiyon (n, %)	47 %35.3	62 %46.6	-
Diabetes mellitus (n, %)	11 %8.3	27 %20.3	**
Sigara kullanma (n, %)	38 %28.6	64 %48.1	***
Total-K (mg/dL) (x ± SD)	196.00 ± 9.00	215.00 ± 40.00	***
LDL-K (mg/dL) (x ± SD)	119.00 ± 32.00	132.00 ± 33.00	***
HDL-K (mg/dL) (x ± SD)	43.00 ± 10.00	43.00 ± 8.00	-
TG (mg/dL) (x ± SD)	169.00 ± 83.00	193.00 ± 111.00	*

KAH : Koroner arter hastalığı, Total-K : Total kolesterol, HDL-K : Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol, LDL-K : Düşük dansiteli lipoprotein kolesterol, TG : Trigliserid

*p - Gruplarda klinik karakteristikler ve biyokimyasal parametrelerin istatistiksel önemini belirtmektedir.

*p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001

Çalışma grubu kapsamındaki tüm bireylerin lökosit DNA'ları izole edildi ve eNOS geni 4. intron 27 bç'lik polimorfizmi PCR ile uygun primerler kullanılarak amplifiye edildi. Tüm olgulara ait eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR bölgesi allel ve genotipleri belirlendi (Şekil 15).

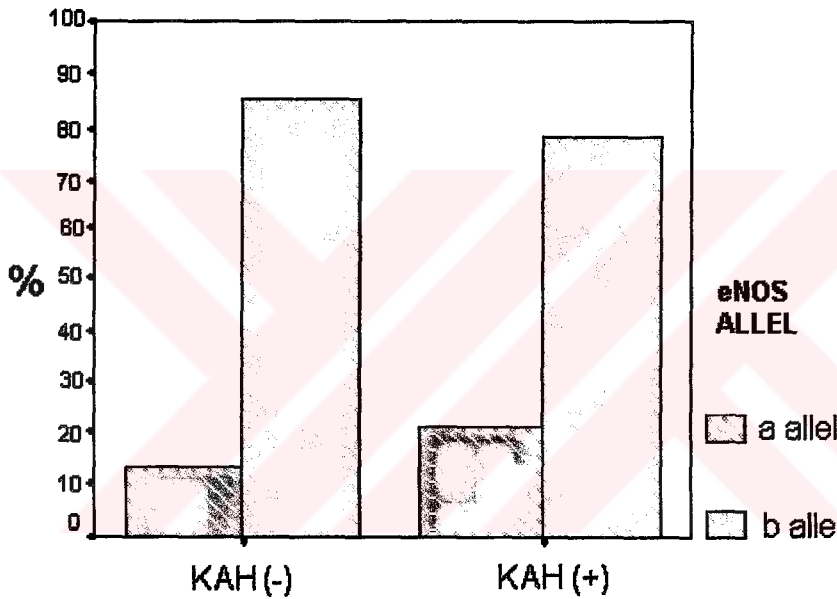


Şekil 15. Olgularımızın PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.
M : Marker (x174 DNAHinf I)

KAH (-) grupta a allel (393 bç) ve b allel (420 bç) taşıyıcılığı sırasıyla % 13.9 ve % 86.1; KAH (+) grupta ise sırasıyla %21.4 ve %78.6 olarak bulundu (Şekil 16).

Yapılan istatistiksel analizlerde KAH (+)grupta a allel sıklığı, KAH (-) gruba kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bulundu ($p=0.02$). Cinsiyetlere göre değerlendirildiğinde erkeklerde grup olarak a allel taşıyıcılığı açısından incelendiğinde KAH (-) erkeklere kıyasla KAH (+) erkeklerde a alleli yine anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.037$). Kadınlarda ise anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$).

KAH (-) ve KAH (+) olguların eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR yöresine ait allel sıklıkları Tablo 8’de sunuldu.



Şekil 16. KAH (-) ve KAH (+) gruplarda eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR bölgesi allel sıklıklarının dağılımı.

Tablo 8. KAH (-) ve KAH (+) bireylerin eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR polimorfik yöresine ait allel dağılımları.

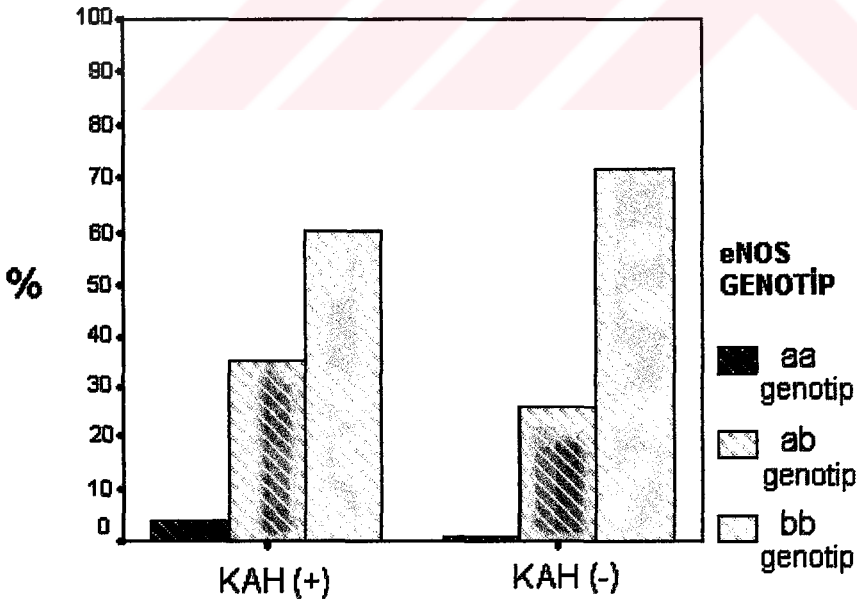
Allel	Toplam		Erkek		Kadın	
	KAH (-)	KAH (+)	KAH (-)	KAH (+)	KAH (-)	KAH (+)
a allel	%13.9	%21.4*	%15.4	%25.3*	%12.5	%13.6
b allel	%86.1	%78.6	%84.6	%74.7	%87.5	%86.4

KAH : Koroner arter hastalığı,

* $p < 0.05$

Olguların eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR yöresine ait genotipleri incelendiğinde, KAH (-) bireylerde aa, ab ve bb genotip sıklıkları sırasıyla % 0.8, % 26.3 ve % 72.9, KAH (+) bireylerde ise sırasıyla % 3.8, % 35.3 ve % 60.9 olarak bulundu (Şekil 17) (Tablo 9).

Olguların genelinde, cinsiyete bağlı olmaksızın bb genotipi daha yüksek oranda saptandı. KAH (-) ve KAH (+) bireylerde aa genotipi sırasıyla %0.8, %3.8, bb genotipi ise sırasıyla % 72.9, % 60.9 bulundu. KAH (-) ve KAH (+) gruplar gerek aa, gerekse bb genotip taşıyıcılığı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$). aa ve ab genotipi taşıyan bireylerin toplamı, KAH (+) grupta (% 39.1) KAH (-) gruba (% 27.1) kıyasla anlamlı oranda yüksek bulundu ($p < 0.05$). Cinsiyet yönünden incelendiğinde erkeklerde KAH (+) grupta, aa ve ab genotip taşıyan bireylerin toplamı (% 44.9), KAH (-) grupla (% 29.2) kıyaslandığında yine anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.05$). Kadınlarda aa genotipi taşıyan hiçbir olgu bulunmadı. Yine kadınlarda ab genotipi ve bb genotipi taşıyanlar arasında KAH açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Tablo 9'da KAH (-) ve KAH (+) bireylere ait eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR bölgesine özgü genotip dağılımları gösterildi.



Şekil 17. KAH (+) ve KAH (-) olgularda eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR bölgesi genotip sıklıkları.

Tablo 9. KAH (-) ve KAH (+) bireylerin eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR polimorfik yöresine ait genotip dağılımları.

Genotip	Toplam		Erkek		Kadın	
	KAH (-)	KAH (+)	KAH (-)	KAH(+)	KAH (-)	KAH(+)
	n, %		n, %		n, %	
aa	1 (%0.8)	5 (%3.8)	1 (%1.5)	5 (%5.6)	0 (%0.0)	0 (%0.0)
ab	35 (%26.3)	47 (%35.3)	18 (%27.7)	35 (39.3)	17 (%25.0)	12 (%27.3)
bb	97 (%72.9)	81 (%60.9)	46 (%70.8)	49 (%55.1)	51 (%75.0)	32 (%72.7)
aa + ab	36 (%27.1)	52(%39.1)*	19 (%29.2)	40(%44.9)*	17 (%25.0)	12 (%27.3)

KAH : Koroner arter hastalığı,

*p<0.05

Lojistik regresyon modelinde KAH gelişiminde rol oynayabilecek değişkenler analiz edildi ve bu parametrelerin risk katsayıları, %95 güven aralıkları ve istatistiksel olarak anlamlılıkları belirlendi (Tablo 10).

Tablo 10. KAH gelişiminde belirleyici değişkenlerin lojistik regresyon modeli sonuçları.

Belirleyici Değişkenler	Katsayı	Standart Hata	X ²	Göreceli risk (OR)	% 95 Güven Aralığı	p değeri
Cinsiyet*	1.015	0.217	21.831	2.760	1.803 – 4.225	0.000
Yaş	0.037	0.010	12.420	1.037	1.016 – 1.059	0.000
Hipertansiyon	0.662	0.205	10.447	1.938	1.297 – 2.895	0.001
Diabetes mellitus	1.182	0.295	16.085	3.262	1.830 – 5.813	0.000
Sigara**	1.024	0.219	21.888	2.784	1.813 – 4.276	0.000

Referans değişkenler, cinsiyet, kadın, sigara; içmeyen**

Lojistik regresyon analizi sonucunda KAH riskinin, erkek cinsiyette 2.76 kat, her bir yaş artışıyla 1.037 kat, HT varlığıyla 1.938 kat, DM hastalığı olmasıyla 3.262 kat ve sigara içmeyle 2.784 kat arttığı ve bu verilerin, KAH için bağımsız birer risk faktörleri oldukları istatistiksel olarak belirlendi (p < 0.05) (Tablo 10).

5. TARTIŞMA

KAH, aterojenik lipoproteinlerin koroner arterlerde birikmesi sonucunda oluşan koroner ateroskleroza bağlı olarak gelişen bir hastalıktır^{26,27,31}. Dünyada en başta gelen ölüm nedenlerinden biri olan KAH'nın, Dünya Sağlık Örgütü'nün hazırladığı yaşamı kısıtlayan önde gelen nedenler listesinde 2020 yılında birinci sırayı alacağı tahmin edilmektedir³². Yapılan çalışmalarda kırk yaş sonrası KAH gelişme riski erkeklerde % 49, kadınlarda ise % 32 olarak belirlenmiştir²²⁰. Ülkemizde de KAH'ı ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır⁵.

Aterosklerozun patogenezinin sorumlu tutulan endotel disfonksiyonu olayların başlama, ilerleme ve klinik komplikasyonlarında önemli rol alır ve bilinen risk faktörlerinin hemen tamamı (*sigara, HT, DM, hiperkolesterolemi, OxLDL-K*) endotelde işlev bozukluğuna yol açabilmektedir^{2,11,36,221}.

Kronik hastalıkların (*HT, tip II diabet vb.*) bir çoğunda olduğu gibi KAH etyopatogenezinin de çok sayıda genetik ve çevresel faktör sorumlu tutulmaktadır^{8,9,10}. Son 50 yıldan bu yana yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ise ateroskleroz gelişimiyle ilişkili pek çok çevresel ve genetik risk faktörü üzerinde durulmaktadır^{15,16}.

Bizde bu çalışmamızda; Çukurova Bölgesi'nde, KAH oluşumunda rolü olduğu düşünülen risk faktörlerinden yaş, HT, DM, sigara, TK, LDL-K, HDL-K ve TG gibi bazı risk faktörlerinin ve yine KAH oluşumunda önemli rolü olduğu düşünülen genetik risk faktörlerinden eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR polimorfizminin bizim toplumumuzda KAH oluşumu üzerine etkisini araştırdık.

Çalışma kapsamına alınan kontrol ve hasta gruplarını koroner anjiyografik değerlendirme sonuçlarına göre belirledik. Koroner anjiyografisinde plak ve/veya darlık belirlenen 133 birey KAH (+) olan grubu, plak ve/veya darlık saptanamayan 133 birey ise KAH (-) (kontrol) grubumuzu oluşturdu. HT, DM, sigara yönünden seçici davranılmadı.

Grupların klinik karakteristikleri ve biyokimyasal parametrelerinin verildiği Tablo 7'de de gözlenildiği gibi KAH (+) olan grupta erkek cinsiyet, DM, sigara, TK, LDL-K ve TG yüksekliği, KAH (-) gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$, $p < 0.005$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ ve $p < 0.05$).

Yaş, HT, HDL-K açısından ise KAH (-) ve KAH (+) gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$) (Tablo 7).

Çalışmamızda gruplar oluşturulurken cinsiyetler ve yaş dağılımları arasında anlamlı bir farklılık olmamasına olabildiğince özen gösterildi. KAH (-) grupta kadın (n:65) ve erkek (n:68) olgu sayısı arasında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). Buna karşın KAH (+) grupta kadın-erkek sayısı dengelenemedi, erkek (n:89) ve kadın (n:44) olgu sayısı arasında anlamlı fark vardı ($p < 0.05$) (Tablo 7). KAH (-) ve KAH (+) grupların yaş ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla 51.98 ± 9.84 , 52.75 ± 10.68) ($p > 0.05$).

Yaş artışı, KAH için güçlü bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Cinsiyet ve etnik farklılıklardan bağımsız olarak yaş artışıyla birlikte KAH mortalitesi de artış göstermektedir^{4,11}. Ayrıca bazı KAH risk faktörleri de yaşa bağlı olarak değişim gösterir. Örneğin homosistein artışı ve HT yaşı artmasıyla birlikte daha sık gözlenen risk faktörleridir⁶⁸. KAH yaş ilerlemesine bağlı olarak artan kronik bir hastalık olduğu için 33 yaş altı ve 70 yaş üstü kişileri çalışma kapsamına alınmadı ve bunun dışındaki her yaş grubundan örnek alınmasına özen gösterildi.

KAH' nın erkeklerde kadınlara kıyasla 10-15 yıl önce başladığı bilinmektedir. Bunun nedeni kadınlarda menapoza değin salgılanan endojen östrojen hormonudur. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmalarda, 60 yaşına değin her 17 kadından sadece birinde KAH ortaya çıkarken, erkeklerde bu sayının daha yüksek olduğu ve her 5 erkekten birinde KAH geliştiği, altmış yaş sonrasında ise bu sayının eşitlendiği saptanmıştır^{4,222}. Bilindiği gibi östrojen, KAH için önemli risk faktörleri olan TK, LDL-K, TG, Lp(a) ve homosistein düzeylerini düşürerek koruyucu etki göstermektedir. Ayrıca östrojenler LDL reseptörlerinin güçlü düzenleyicileridir. Menapozla birlikte östrojenlerin azalmasıyla LDL reseptör aktivitesi azalır ve LDL düzeyleri yükselmeye başlar. HDL'de ise artış durur ve düşüş başlar^{68,223}. Postmenapozal dönemde ise bu etkiler ortadan kalktığı için kadınlarda tüm lipid parametreleri artmaktadır. Kadınlarda premenapozal seyrek görülen KAH insidansı ilerleyen yaş ve endojen östrojen seviyelerinde düşüş ile birlikte 55 yaş sonrasında dramatik olarak artar^{68,224}. KAH (+) olgu grubumuzda kadın / erkek sayısının eşitlenememesinin ve KAH (+) kadın olgu sayısının erkeklere kıyasla düşük olmasının başlıca nedeni olabilir.

Bölgemizde daha önce yapılan bir çalışmada KAH (+) olgularda HT anlamlı olarak yüksek bulunurken bizim olgularımızda KAH (+) bireylerde HT açısından anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$)¹¹¹.

Çalışma grubumuzda HT açısından anlamlı fark gözlenmemesi KAH (-) grupta da yaş, obezite, DM, kolesterol yüksekliği ve sigara gibi HT açısından risk oluşturan faktörlerin kişilerde mevcut olmasıyla açıklanabilir. Toplumumuzda HT yaygın olarak gözlenmektedir. Mahley ve ark. tarafından Türklerde yapılan çalışmada kadınların ortalama %26'sı ve erkeklerin %17'sinde sistolik basıncının 140 mmHg ve diyastolik basıncın 90 mm Hg'nın üzerinde olduğu bulunmuştur²²⁵.

Diabetes Mellitus, Amerikan Kalp Birliği tarafından kardiyovasküler bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. DM, KAH için güçlü ve bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilir ve KAH nedeniyle oluşan ölümlerin %75-80'inden sorumlu tutulmaktadır. Erkeklerde KAH riskini iki kat arttırırken, kadınlarda bu artış dört kata kadar çıkmaktadır^{68,226}.

Hasta ve kontrol gruplarımız DM açısından karşılaştırıldığında DM'li olgu oranı KAH (+) grupta literatür verileriyle uyumlu bir şekilde anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.005$). Bu veriler bölgemizde daha önce yapılmış olan çalışmayla da uyumluydu¹¹¹.

Çalışmamızda sigara içenlerin sayısı da KAH (+) grupta, KAH (-) gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Sonuçların bölgemizde daha önce yapılmış olan çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlendi^{111,225}. Mahley ve ark.'nın yaptığı çalışmada sigaranın Türk'lerde KAH için en yaygın risk faktörü olduğu (kadınlarda % 30-40, erkeklerde ise % 50-70) bulunmuştur²²⁵.

Sigara, ateroskleroz için tanımlanan majör risk faktörleri arasındadır ve KAH riskini iki-dört kat arttırdığı ve kardiyovasküler hastalığa bağlı olan tüm ölümlerin %50'sinden sorumlu olduğu düşünülmektedir^{227,228}. Sigara ayrıca diğer risk faktörlerini sinerjik olarak etkileyerek KAH riskini arttırmaktadır^{2,228}.

Yüksek serum TK ve LDL-K ile düşük serum HDL-K düzeyleri KAH için bağımsız risk faktörleridir^{64,65}. Çalışma gruplarımız lipid parametreleri açısından irdelendiğinde, TK düzeyleri KAH (+) grupta (215.00 ± 40.00) literatür bilgileri ve bölgemizde daha önce yapılan çalışmayla uyumlu olarak KAH (-) gruba (196.00 ± 9.00) kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$)^{68,111}.

Bölgemizde TK düzeylerinin diğer bölgelere kıyasla yüksek olduğu Mahley ve ark. 'nın Türkiye'de 6 değişik bölgede 9000 erkek ve kadında yaptığı çalışmada ortaya konulmuştur. Bu çalışmada diğer bölgelerle karşılaştırıldığında İstanbul ve Adana' da ortalama plazma TK düzeylerinin (erkeklerde 184mg/dl, kadınlarda 190mg/dl) yüksek olduğu, ancak Türk'lerde TK düzeylerinin diğer popülasyonlarla kıyaslandığında çok fazla yüksek olmadığı belirlenmiştir²²⁵.

Serum kolesterol düzeyleri ile KAH arasında güçlü bağlantı olduğu ve damar duvarında hastalığın başlaması ve ilerlemesi için serum kolesterolünün belli bir düzeyde olması gerektiği bilinmektedir. TK düzeyleri 150mg/dL (4 mmol/L) veya altında olan toplumlarda başka bir risk faktörü mevcut olsa bile aterosklerotik olaylar seyrek gözlenir^{12,64,229}. NCEP ATP III'e göre TK'ün ideal olarak 200mg/dl'nin altında olması istenmekte ve 240mg/dl ve üzeri yüksek risk olarak kabul edilmektedir⁶⁶.

NCEP ATP III sınıflamasına göre LDL-K düzeylerinin < 100mg/dl olması idealdir⁶⁶. Çalışmamızda LDL-K ortalamaları KAH (+) grupta (132.00 ± 33.00) KAH (-) gruba (119.00 ± 32.00) kıyasla oldukça yüksek bulundu (p < 0.001). KAH (+) grupta gözlenen anlamlı LDL-K yüksekliği literatürle uyumlu bulundu^{68,111}. Ayrıca Bersot ve ark. tarafından Türklerde yapılan Türk Kalp Çalışmasında saptanan ortalama LDL-K düzeyleri (119mg/dl) bizim kontrol grubunda saptadığımız ortalama LDL-K düzeyleriyle uyumlu bulundu²³⁰.

Çalışmamızda HDL-K ortalamaları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı (p > 0.05). Ancak daha önce bölgemizde yapılan bir çalışmada ise verilerimizden farklı olarak KAH (+) grup ile KAH (-) grup kıyaslandığında ortalama HDL-K düzeylerinin KAH (+) grupta anlamlı olarak düşük olduğu gözlenmiştir¹¹¹.

Çeşitli popülasyonları kapsayan epidemiyolojik çalışmalardan elde edilmiş çok sayıda veri, kan kolesterolünün 1/4'ünü taşıyan plazma HDL-K düzeyleri ile KAH gelişme riski arasında güçlü bir ters ilişkinin varlığını göstermektedir^{4,48,230}. HDL' nin bu koruyucu etkisinin periferden kolesterolü karaciğere taşıması ve böylece plaklardan aşırı kolesterolü uzaklaştırarak, plağın büyümesini yavaşlatması yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir^{65,97}.

Yüksek plazma HDL-K'ü (> 60mg/dl) negatif risk faktörü olup KAH ve AMI'üne karşı koruyucu etki yapar. Düşük HDL-K ise (<40mg/dL) önemli bir pozitif risk faktörüdür^{61,65,97}. KAH olan kişilerde yapılan çalışmalarda, HDL-K düşüklüğünün (<40mg/dl) KAH için en yaygın lipid risk faktörü olduğu tespit edilmiştir²³⁰.

Bersot ve ark. tarafından Türk popülasyonunda, 20 yaş üzerindeki 9837 yetişkinde yapılan çalışmada erkeklerin %75'i, kadınların ise %50'sinde HDL-K düzeylerinin 40mg/dl'nin altında olduğu ve ortalama HDL-K düzeylerinin erkeklerde 36mg/dl ve kadınlarda ise 42mg/dl olduğu saptanmıştır²³⁰.

Bersot ve ark. Türkleri düşük TK ve LDL-K yanısıra çok düşük HDL-K'üne sahip ve yaygın KAH bulunan bir popülasyon olarak karakterize etmişlerdir²³⁰.

İdeal olarak TG düzeylerinin 150mg/dl'nin altında olması istenir²⁹. Mahley ve ark. tarafından Türk popülasyonunda yapılan çalışmada erkeklerde gözlenen TG düzeyleri Amerikalı ve Alman erkekler ve Almanya da yaşayan Türk erkeklerle uyumlu (120-150mg/dl), Türk kadınlarında ise diğer popülasyonlara kıyasla düşük (90-110mg/dl) olduğu bulunmuştur^{225,231}.

Hipertrigliseridemili kadın ve erkekde KAH için anlaşılması zor olan bir bağımsız risk faktörüdür. Diğer lipidler ile TG'ler arasındaki güçlü etkileşimlerin olması, bireyler arası ve birey içi biyolojik değişkenliklerin yüksek olması ve metodolojik zorluklar nedeniyle TG düzeyleri değerlendirmeyi güçleştirir. TG yüksekliği, düşük HDL düzeyleri ile birlikte olduğunda KAH riski daha da çok artmaktadır. TG yüksekliği ve KAH riski arasındaki ilişki kadınlarda erkeklere kıyasla daha fazladır^{68,69,70}.

Çalışmamızda TG ortalamaları KAH (+) grupta (193.00 ± 111.00) KAH (-) gruba (169.00 ± 83.00) oranla yüksek bulunmuştur (p < 0.05). Bu bulguların da literatür verileriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir²³².

Yapılan çalışmalar insanlarda ateroskleroza yatkınlığın gen mutasyonlarının kombinasyonu ve bunların çevresel faktörlerle etkileşimleri sonucu olduğunu göstermektedir^{8,85}. Bireyin, proaterojen faktörlere ve damar duvarının aterojen uyarıya yanıtını daha çok genetik yapısı belirlemektedir. Bunun yanısıra çevresel faktörler de hastalığın ilerleme hızını (plak oluşumu) belirgin şekilde etkilemektedir¹¹.

KAH' nın bir ailede birden fazla kişide ortaya çıkması ve semptomların erken yaşta görülmesi KAH gelişiminde genetik faktörlerin etkisini açık bir şekilde ortaya koymaktadır^{89,113}. Bazı ailelerde bireylerinin bir çoğunda kolesterol düzeyleri çok yüksektir. Bu durum erken yaşta KAH gelişimine neden olmaktadır. Ailesel hiperkolesterolemiyle ilgili yapılan çalışmalarda bu olgularda LDL-R mutasyonlarına çok sık rastlanmıştır. Ailesel hiperkolesterolemi otozomal dominant kalıtım gösteren bir hastalıktır^{14,89}.

Günümüzde KAH oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülen çok sayıda gen üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Başlıca çalışılan genler; ACE, LPL, LDL-R, Apo B, Apo E ve NOS genleridir^{9,88,93,94,107,111,114}.

Bir çok kardiyovasküler sistem hastalığının (*Ateroskleroz, Anjina pectoris, HT, Pulmoner HT*) etyopatogenezinden yetersiz NO salınımı sorumlu tutulmaktadır^{154,155,168}. Bu verilerden yola çıkılarak NO miktarında azalmaya yol açan NOS enzimi gen polimorfizmlerinin KAH etyopatogenezinde rol oynayacağı kanısına varılmış ve çok sayıda çalışma yapılmıştır^{18,19,20}.

eNOS geninde saptanan başlıca polimorfizmler;

- 4. intron 27 bç VNTR polimorfizmi^{186,201,202,203}
- 7. ekzon Glu298Asp polimorfizmi^{28,114,204,205}
- 11. intron (-30 A → G) polimorfizmidir¹⁹
- 13. intron ardışık çok sayıda tekrar polimorfizmi²⁰⁷
- 18. intronda biallelik polimorfizmi²⁰⁷
- 23. intron (10 G → T) polimorfizmi²⁰⁷
- eNOS geni "5' flanking" bölge -786 T → C, -922 A → G ve -1468 T → A nokta

polimorfizmleridir^{28,186,206,203}

Bu polimorfizmler arasında KAH açısından en çok incelenenler eNOS 4. intron 27 bç VNTR polimorfizmi ve 7. ekzon Glu298Asp polimorfizmleridir^{17,18,19,28,200,201,202,204,205}.

Yapılan çalışmalar sonucunda plazma NO ve stabil son ürünleri olan nitrit ve nitrat düzeylerinin bazı eNOS gen polimorfizmleriyle (intron 4 VNTR ve 7 ekzon Glu298Asp) ilişkili olduğu rapor edilmiştir^{24,207}.

eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR polimorfik bölgesi dört tekrar içeren a (393 bç) ve beş tekrar içeren b (420 bç) allelerinden oluşur^{114,208}.

Wang ve ark. tarafından Beyaz ırkta ve sağlıklı kişilerde yapılan bir çalışmada, eNOS geni 4. intron 27 bç polimorfizminin plazma NO düzeylerini %25 oranında etkilediği ve plazma nitrit ve nitrat düzeylerinin ise homozigot aa genotipine sahip kişilerde artış gösterdiği bildirilmiştir²⁴.

Biz de çalışmamızda bu verilerden yola çıkarak, KAH oluşumunda rolü olduğu düşünülen genetik risk faktörlerinden eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR polimorfizminin KAH oluşumu üzerine etkisini araştırdık.

Bu amaçla olgularımızın tümünün eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR yöresine ait allelik yapı ve genotiplerini belirledik (Tablo 8, 9).

Çalışmamızda a allel sıklığı KAH (-) olan grupta % 13.9, KAH (+) olan grupta ise % 21.4 olarak bulundu. Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p=0.02$). Cinsiyetler dikkate alındığında, erkeklerde a allel taşıyıcılığı hasta grubunda anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p=0.037$), kadınlarda anlamlı bir fark gözlenmedi ($p> 0.05$) (Tablo 8).

Japonyada AMI'li olgularda yapılan bir çalışmada da bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak gerek toplamda ($p=0.000.7$) gerekse cinsiyetler göz önüne alındığında erkeklerde a allel sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş ($p=0.016$), kadınlarda ise gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0.05$)¹⁷.

Kontrol grubumuzda (n:133) saptanan eNOS 4. intron 27 bç allelik dağılımları diğer çalışma gruplarının verileriyle karşılaştırıldığında olgularımızda gözlenen a allel sıklığı (% 13.9), daha önce Türk popülasyonunda Demirel ve ark. tarafından yapılmış olan çalışmanın kontrol grubunda (n:65) gözlenen a allel sıklığından (%6) oldukça yüksek bulunmuştur²⁰⁸. Bu farklılığın nedeni Demirel ve ark. tarafından yapılan çalışmanın Türkiye'nin farklı bir bölgesinde yapılmış olması ve kontrol örneklerinin sayısının (n:65) bizim kontrol grubumuza kıyasla daha az olmasıyla ilişkili olabileceği kanısına varılmıştır.

Avustralya popülasyonunda Wang ve ark. tarafından yapılan çalışmada 153 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubunun (n:153) a allel sıklığı (%17) bizim kontrol grubumuzdaki orandan yüksek bulunurken, Ichihara ve ark. tarafından Japon popülasyonunda yapılan çalışmada kontrol grubunda (n:550) a allel sıklığı %10 bulunmuş ve bizim kontrol grubumuzdan düşük olduğu gözlenmiştir^{201,17}. Ancak Fatini ve ark. tarafından İtalyan toplumunda yapılan bir çalışmada ise 544 kişiden oluşan kontrol grubunda bulunan a allel sıklığı (%15) bizim kontrol grubumuzda gözlediğimiz a allel sıklığıyla uyumlu olduğu gözlenmiştir²³³. Bu benzerlik Akdeniz bölgesi insanların genetik ve yaşamsal özelliklerinin yakınlığıyla ilişkilendirilebilir.

KAH (+) grupta gözlenen allelik dağılımlar diğer çalışma gruplarının verileriyle karşılaştırıldığında a allel sıklığımız (% 21.4), daha önce Türklerde, iskemik KAH'lı (n:29) olgularda saptanan a allel sıklığına (%5) kıyasla oldukça yüksek olduğu bulunmuştur²⁰⁸. Bu farklılığında yine diğer çalışmada hasta grubunda örnek sayısının (n:29) daha az olmasından ve yöresel farklılıklardan kaynaklandığı düşünüldü. Avustralya popülasyonunda 549 KAH (+) hastada ve Japon popülasyonunda 455 AMI'li hastada

yapılan çalışmalarda allel sıklıkları aynı (%14) bulunmuştur^{201,17}. Bu veriler bizim saptadığımız a allel sıklığından düşük bulunmuştur. Ancak yine İtalyanlarda 304 karotid aterosklerozlu hastada yapılan çalışmada gözlenen a allel sıklığı (%22) bizim KAH (+) grubumuzun a allel sıklığıyla uyumlu bulunmuştur²³³. Bu verilerin yakınlığı yine her iki popülasyon grubu arasındaki coğrafik ve genetik benzerliklere bağlanmıştır.

Kontrol grubumuzda gözlenen b allel sıklığı (% 86.1) diğer popülasyonlarda gözlenen dağılımlarla uyumlu bulunmuştur^{17,201}.

Kontrol ve hasta grubumuzun b allel sıklıkları (sırasıyla % 86.1 ve % 78.6), cinsiyet faktörü göz önüne alınarak ve alınmadan karşılaştırıldığında daha önce yapılmış çalışmalarla benzer olarak allel sıklıkları arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p > 0.05$)^{17,114,208}.

Olgularımızın eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR bölgesine özgü genotip dağılımları incelendiğinde KAH (-) ve KAH (+) bireylerde cinsiyete bağlı olmaksızın aa genotip sıklıkları sırasıyla % 0.8 ve % 3.8 olarak bulunmuştur (Tablo 9). Gruplar aa genotip dağılımı açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Çalışmamızda aa genotip dağılımları cinsiyet faktörü dikkate alınarak değerlendirildiğinde ise erkeklerde, KAH (-) ve KAH (+) gruplarda aa genotip sıklıkları sırasıyla %1.5 ve %5.6 olarak bulunmuştur. Kadınlarda ise aa genotipli bireye ne kontrol ne de hasta grubunda rastlanmamıştır (sırasıyla %0, %0). Ancak toplamda ve cinsiyetler göz önüne alınarak incelendiğinde de gruplar arasında aa genotipi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

eNOS 4. intron 27 bç VNTR yöresinde aa genotipi nadir olarak gözlenir ve etnik olarak farklı popülasyonlarda dağılımı %1-%10.6 arasında bulunmuştur²³⁴. KAH ve aa genotipi arasında ilişki olduğu ilk olarak Wang ve ark. tarafından Avusturalya da yapılan bir çalışmada gösterilmiştir²⁰¹. Ancak daha sonra Japonya ve Avrupa'da yapılan çalışmalarda bizim verilerimizle uyumlu olarak KAH ve aa genotipi arasında ilişki bulunamamıştır. Ancak AMI ve aa genotipi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir^{17,114,201,235}.

Olgularımızda saptadığımız aa genotip sıklıkları Wang ve ark'nın 702 olguyu kapsayan çalışmalarında KAH (-) ve KAH (+) olgularda gözledikleri (%0.7 ve %3.3) oranlarla uyumlu olduğu gözlenmiştir²⁰¹. Yine Demirel ve ark. tarafından Türklere yapılan çalışmada olguların hiçbirinde (kontrol ve hasta) aa genotipli bireye rastlanmamıştır (%0)²⁰⁸. Japon popülasyonunda aa genotip sıklıkları, kontrol grubunda bize benzer

şekilde %1, AMI'lı hastalarda ise %2 olarak bulunmuştur¹⁷. Tayvanlılarda yapılan çalışmada ise kontrol grubunda aa genotipi hiç gözlenmemiş, KAH (+) grupta ise % 0.6 olarak bulunmuştur²³⁶.

Çalışmamızda KAH (-) ve KAH (+) bireylerde bb genotipi sırasıyla % 72.9 ve % 60.9 olarak bulundu. Kontrol grubu ve KAH (+) grup bb genotip taşıyıcılığı açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$). Literatürde bulunan kontrol ve hasta gruplarına ait bb genotip sıklıkları sırasıyla; Demirel ve ark %88, %90, Wang ve ark. %66.7, %74.6, Ichiara ve ark. %81, %75, ve Hwang ve ark. %80, %77.9 olarak rapor etmiştir. Hasta grubu verilerimiz bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, KAH (+) grupta bb genotip sıklığı diğer çalışmalara göre daha düşük bulunmuştur^{17,201,236}.

bb genotip sıklıkları cinsiyetler açısından incelendiğinde Japon popülasyonunda yapılan çalışmayla da uyumlu olarak bb genotip dağılımı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır¹⁷.

Çalışmamızda KAH (-) ve KAH (+) gruplarda ab genotip sıklıkları sırasıyla % 26.3 ve % 35.3 olarak bulunmuştur. KAH (-) ve KAH (+) gruplar ab genotip sıklığı açısından karşılaştırıldığında önceki çalışmalarla uyumlu olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p > 0.05$)^{17,114,201,208,233,234,236}.

Literatürde bulunan kontrol ve hasta gruplarına ait ab genotip sıklıkları sırasıyla; Demirel ve ark. %12, %10, Wang ve ark. %32.7, %22.1, Ichiara ve ark. %18, %23, Hwang ve ark. %20, %21.5 şeklinde rapor etmişlerdir. Verilerimizle karşılaştırıldığında bizim ab genotip sıklıklarımız hem KAH (-) ve hem de KAH (+) grupta literatür verilerine göre daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda ab genotipi sıklığı erkeklerde KAH (-) grupta %27.7 ve KAH (+) grupta ise %39.3 olarak, kadınlarda ise yine sırasıyla %25.0 ve %27.3 bulunmuştur. Cinsiyet faktörü dikkate alındığında, Japon popülasyonunda yapılan çalışmayla uyumlu olarak ab genotip dağılımı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır¹⁷.

KAH (-) ve KAH (+) olgularda a alleli taşıyan genotiplerin (aa ve ab) toplamı KAH (+) grupta % 39.1 ve KAH (-) grupta % 27.1 olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde aa + ab genotiplerinin toplamının KAH (+) grupta anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). Cinsiyetler dikkate alınarak yapılan değerlendirmede ise aa + ab genotipi taşıyan bireylerin toplamı KAH (+) grupta % 44.9 KAH (-) grupta % 29.2 bulunmuş, her iki grup karşılaştırıldığında yine anlamlı derecede

yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). Kadınlarda ise aa ve ab genotipi taşıyan bireylerin KAH (-) (%25) ve KAH (+) gruplarda (%27.3) farklı olmadığı gözlenmiştir ($p > 0.05$).

Ichihara ve ark. da AMI ile eNOS geni 4. intron polimorfizmi ilişkisini irdeledikleri çalışmalarında AMI'lü grupta aa ve ab genotipi taşıyan bireylerin toplamını kontrol grubuna göre hem toplam popülasyonda ($p=0.007$) hem de erkeklerde ($p=0.016$) anlamlı derecede yüksek bulmuşlar ve bizim çalışmamızla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Kadınları dikkate aldıklarında ise yine bizim verilerimizle uyumlu olarak anlamlı fark bulamamışlardır ($p > 0.05$)¹⁷.

Kunnas ve ark. ani kardiyak ölüm sonrası 700 Kafkas kökenli Finli'de otopsi verilerine dayanarak yaptıkları çalışmada aterosklerotik lezyon alanlarının ve koroner stenoz yüzdelerinin eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR polimorfizmi ile ilişkisini çalışmamızda olduğu gibi kontrol ve hasta gruplarında, a allel taşıyan (aa + ab) bireylerin toplamını karşılaştırmışlar, çalışmaları sonucunda bizim verilerimizden farklı olarak KAH yaygınlığı ve koroner stenoz yüzdeleri ile eNOS geni 4. intron polimorfizmi a allel taşıyıcılığı arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlar, aksine eNOS geni 4. intron VNTR polimorfizmi a allel taşıyıcılığının AMI için koruyucu olabileceğini rapor etmişlerdir ($p=0.004$)²³⁴.

Çalışmamız sonucunda KAH'nın bilinen risk faktörlerinin Yaş, HT ve HDL-K dışında hemen tümünün bizim KAH (+) olgularımız içinde geçerli olduğunu saptadık. Yine çalışmamızda saptadığımız genetik veriler sonucunda Çukurova Bölgesi'nde eNOS geni 4. intron 27 bç VNTR polimorfizminin KAH gelişimi ile ilişkili olduğunu gözlemledik. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürde aynı veya farklı grup hastalarda yapılmış mevcut bazı çalışmalarla uyumlu^{17,201,233} ve bazılarıyla ise uyumsuz bulundu^{208,234,235,236}.

Değişik popülasyonlarda yapılan genetik çalışmalarda farklı sonuçlar bulunmasının nedeni sadece farklı büyüklükte popülasyon seçimiyle ilişkili olmayıp bu farklı sonuçlar örnek toplanmasında farklı seçim kriterlerinin kabul edilmiş olması, özellikle de hastalık tipi, hastalığın derecesi, yaş, ırk, coğrafik farklılıklar ve birlikte bulunan çevresel faktörler gibi etkenler nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Zıt sonuçların popülasyonlardaki genetik heterojeniteden kaynaklandığını düşündürmüştür.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışma sonuçlarımıza göre eNOS geni 4. intron a allel taşıyıcılığının KAH açısından genetik bir marker olabileceği ve bu moleküler varyantın KAH için yeni bir risk faktörü olarak kabul edilebileceği kanısına varılmıştır.

Bu veriler KAH patogeneğinde çevresel faktörler yanı sıra genetik risk faktörlerinin önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

KAH açısından yüksek riskli bireylerin önceden saptanmasında genetik risk faktörlerinin de diğer risk faktörleriyle birlikte değerlendirilmesi ve gen-gen etkileşimleri üzerinde durulması önerilmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. **National Heart, Lung, and Blood Institute.** (nhlbiinfo@nhlbi.nih.gov). Atherosclerosis (coronary artery disease). **Erişim:** (www.diet-and-health.net/Diseases/Atherosclerosis.html). Erişim Tarihi: 10.05.2004.
2. **American Heart Association.** Atherosclerosis. **Erişim :** (<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=44440>). Erişim Tarihi:10.05.2004.
3. **Heper C.** Ateroskleroz. **Erişim:** (<http://www.kardiyo.net/kitap/ateroskleroz.shtml>). Erişim Tarihi: 21.05.2003.
4. **American Heart Association.** Risk factors and coronary heart disease. **Erişim:** (<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4726>). Erişim Tarihi:10.05.2004.
5. **Türk Kardiyoloji Derneği.** *Türkiye Kalp Raporu 2000.* Yenilik Basımevi, İstanbul 2000: 11-25.
6. **Boersma H, Doornbos G, Bloemberg BPM, Wood DA, Kromhout D, Simoons ML.** Cardiovascular diseases in Europe. European registries of cardiovascular diseases and patient management. *European Society of Cardiology*, Sophia Antipolis, France, 1999:15-22.
7. **Kültürsay H.** Giriş ve Epidemiyoloji. Kültürsay H. Koroner Kalp Hastalığı, *Primer ve Sekonder Koruma*. 1. Baskı, İstanbul: ARGOS İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Tic. A.Ş., 2001: 1-30.
8. **Knowles JW, Maeda N.** Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20:2336.
9. **Nakagami H, Ikeda U, Maeda Y, Yamamoto K, Hojo Y, Kario K, Shimada K.** Coronary artery disease and endothelial nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms. *J Thromb Throm*, 1999; 8:191-195.
10. **Malek A M, Alper S L, Izumo S.** Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. **Erişim:** (<http://Hemodynamic%20Shear%20Stress%20and%20Its%20Role%20in%20Ather...>) Erişim Tarihi: 03.04.2003.
11. **Falk E, Fuster V.** Atherogenesis and Its determinants. In: Fuster V, Alexander R W, O'Rourke R A, Eds. *Hurt's The Heart*, New York: McGraw-Hill, 2001: 1065-1099.
12. **Walker A R P.** Cholesterol: How low is low enough? *Br Med J*, 1999; 318:538-544
13. **Samani NJ.** Molecular genetics of coronary artery disease: measuring the phenotype. *Clin Sci*, 1998; 95:645-646.
14. **Winkelmann BR, Hager J, Kraus WE, Merlini P, Keavney B, Grant PJ, Muhlestein JB, Granger CB.** Genetic of coronary heart disease: Current knowledge and research principles. *Am Heart J*, 2000; 140:11-26.
15. **Lusis AJ.** Atherosclerosis. *Nature*, 2000; 407:233-241.
16. **Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K.** Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*, 1998; 32:3-8.

17. Ichihara S, Yamada Y, Fujimura T, Nakashima N, Yokota M. Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population. *Am J Cardiol*, 1998; 81:83-86.
18. Markus HS, Ruigrok Y, Ali N, Powell JF. Endothelial nitric oxide synthase exon 7 polymorphism, ischemic cerebrovascular disease, and carotid atheroma. *Stroke*, 1998; 29:1908-1911.
19. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the endothelial constitutive nitric oxide synthase (Glu²⁹⁸ → Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*, 1999; 100:1515-1520.
20. Channon KM, Qian HS, George SE. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20:1873-1881.
21. Fulton D, Papapetropoulos A, Zhang X, Catravas JD, Hintze TH, Sessa WC. Quantification of eNOS mRNA in the canine cardiac vasculature by competitive PCR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000; 278:658-665.
22. von der Leyen HE, Dzau VJ. Therapeutic potential of nitric oxide synthase gene manipulation. *Circulation*, 2001; 103:2760-2765.
23. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: Which, where, how, and why? *J Clin Invest*, 1997; 100:2146-2152.
24. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J, Almasy L, Badenhop RB, Wilcken DEL. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997; 17:3147-3153.
25. Lüscher TF, Noli G. Is it all in the genes...? Nitric oxide synthase and coronary vasospasm. *Circulation*, 1999; 99:2855-2857.
26. Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, Breslow JL, Frank JS. Ultrastructure of early lipid accumulation in apoE-deficient. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19:847-853.
27. Williams KJ, Tabas L. The respons-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol*, 1998; 9:471-474.
28. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T⁻⁷⁸⁶→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*, 1999; 99:2864-2870.
29. Naito HK. Coronary Artery Disease and Disorders of Lipid Metabolism. In: Kaplan LA, Pesce AS, Kazmierczak SC, Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*, St. Louis: Mosby Inc, 2003: 603-608.
30. American Heart Association. 1999 Heart and stroke: Statistical update. Dallas: American Heart Association, 1999. **Erişim:**
http://www.amhrt.org/presenter.jhtml?identifier=10000015&/org/heart/inktomi/ParamMapper.col=inter&_D:/org/heart/inktomi/ParamMapper.col=+&/org/heart/inktomi/ParamMapper.gt=1999+Heart+and+Stroke&_D:/org/heart/inktomi/ParamMapper.gt=+&_DARGS=/hearheader.jhtml&x=26&y=14 Erişim Tarihi: 22.06.2004.
31. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. *A textbook of cardiovascular medicine*. 6th Ed, Philadelphia: WB Saunders Company, 2001.
32. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 1997; 349:1269-1276.

33. **Steinberger J, Daniels SR.** Obesity, Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Risk in Children. *Circulation*, 2003; 107:1448-1453.
34. **Vallace P.** Vascular endothelium, its physiology and pathophysiology. In: Weatherall DJ, Ed. *Oxford Text Book of Medicine*, Oxford, UK: Oxford Medical Publications, 1996; 2:2295-2300.
35. **Ulusoy B.** Ateroskleroz: Süreç. Davies MJ. *Koroner Arter Hastalığı Atlası*. İstanbul: Yelkovan Yayıncılık, 2000; 25-61.
36. **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis. *Nature*, 1993; 362:801-809.
37. **Pratt RE, Dzau VJ.** Genomics and hypertension : Concepts, potentials, and opportunities. *Hypertension*, 1999; 33:238-247.
38. **Lloyd-Jones DM, Bloch KD.** The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *AR Medicine*, 1996; 47:365-375.
39. **Öngen Z, Yılmaz Y.** Aterosklerozun Patogenezi. Kültürsay H. *Koroner Kalp Hastalığı, Primer ve Sekonder Koruma*. 1. Baskı, İstanbul: ARGOS İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Tic. A.Ş., 2001; 31-66.
40. **Kotamraju S, Hogg N, Joseph J, Keefer LK, Kalyanaraman B.** Inhibition of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in endothelial cell by nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 2001; 276:17316-17323.
41. **Lüscher TF, Barton M.** Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*, 1997; 20:3-10.
42. **Wenzel RR, Puthiers N, Noll G, Bucher J, Kaufmann U, Luscher TF.** Endotelin and calcium antagonists in the skin microcirculation of patients with coronary artery disease. *Circulation*, 1996; 94:316-322
43. **Cooke JP, Dzau VJ.** Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*, 1997; 48:489-509.
44. **Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP.** Novel mechanisms for endothelial dysfunction: Dysregulation of dimethylarginine dimethylhydrolase. *Circulation*, 1999; 99:3092-3095
45. **Diodali JG, Dakak N, Gilligan DM, Quyyumi AA.** Effect of atherosclerosis on endothelium dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation*, 1998; 98:17-24.
46. **Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL.** Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1995; 270:319-324.
47. **Vegnani L, Hatric S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, Brovkovich V, Fellin R, Malinski T.** Effect of native and oxidized LDL on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. *Circulation*, 2000; 101: 1261-1266
48. **Napoli C, Ignarro LJ.** Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide*, 2001; 5:88-97.
49. **Steinberg D, Witztum JL.** Lipoproteins and atherogenesis. *JAMA*, 1990; 264:3047-3052.
50. **O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD.** Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques: Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*, 1993; 92:945-951.

51. Takashashi M, Kitagawa S, Masuyama JT, Ikeda U, Kasahara T, Takahashi YI, Furukawa Y, Kano S, Shimada K. Human monocyte-endothelial cell interaction induces synthesis of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation*, 1996; 93:1185-1193.
52. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*, 1994; 334:793-797
53. Annex BH, Denning SM, Channon KM, Sketch M, Stack RS, Morrissey JH, Peters KG. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndrome. *Circulation*, 1995; 91:619-622.
54. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1994; 14:133-140.
55. Guyton JR, Klemp KF. Development of the atherosclerotic core region: Chemicalb and ultrastructural analysis of microdissected atherosclerotic lesions from human aorta. *Arterioscler Thromb*, 1994; 14:1305-1314.
56. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulations of VCAM-1 and Icam-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the apoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998; 18:842-851.
57. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen M, Alpers C. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*, 1996; 93:672-682.
58. Hansson G K, Nilsson J. Pathogenesis of Atherosclerosis. In: Crawford M, DiMarco J P, Eds. *Cardiology*, London: Mosby International Limited, 2001: 1-12.
59. Toprak Ö. Koroner arter hastalığı gelişimi için yeni risk faktörleri. Erişim: (<http://www.omer.gmxhome.de/yenirisk.htm>). Erişim Tarihi: 21.05.2003.
60. Hassel C A. Diet, blood cholesterol, and cardiovascular disease. Erişim: (<http://Diet,%20Blood%20Cholesterol,%20and%20Cardiovascular%20>)..... Erişim Tarihi: 07.04.2003.
61. Wright R S, Kottke T E, Gau G T. Hyperlipidemia and Other Risk Factors for Atherosclerosis. In: Murphy J G, Ed. *Mayo Clinic Cardiology Review*, Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins, 2000: 133-144.
62. Eckel RH. Obesity and heart disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation*, 1997; 96: 3248-3250
63. Fletcher GF, Balady G, Blair SN, Blumenthal J, Caspersen C, Chaitman B, Epstein S, Froelicher ESS, Froelicher VF, Pina IL, . Pollock ML. Statement on exercise: benefits and recommendations for physical activity programs for all Americans: a statement for health professionals by the committee on exercise and cardiac rehabilitation of the council on clinical cardiology, American Heart Association. *Circulation*, 1996; 94:857-862
64. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of ardiology. *Circulation*, 1999; 100:1481-1492.
65. American Heart Association. Cholesterol. Erişim: (<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4488>). Erişim Tarihi:10.05.2004.

66. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, 2001; 285:2486-2497.
67. Tietz N W. *Clinical Guide to Laboratory Tests*. 3rd Ed, Philadelphia: WB Saunders Company, 1995: 130-131.
68. van Lennep JER, Westerveld HT, Erkelens DW, van der Wall E. Risk factors for coronary heart disease: implications of gender. *Cardiovasc Res*, 2002; 53:538-549.
69. Austin MA, Hokanson JE, Edwards K. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*, 1998; 81:7-12.
70. Stensvold I, Tverdal A, Urdal P, Graft-Iversen S. Non-fasting serum triglyceride concentration and mortality from coronary heart disease and any cause in middle aged Norwegian women. *Br Med J*, 1993; 307:1318-1322.
71. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: Is there a link? (review). *Lancet*, 1997; 350:430-436.
72. Danesh J, Youngman L, Clark S, Parish S, Peto R, Collins R. Helicobacter pylori infection and early onset myocardial infarction: Case-control and sibling pairs study. *Br Med J*, 1999; 319:1157-1162.
73. Ridker PM, Kundsin RB, Stampfer MJ, Poulin S, Hennekens CH. Prospective study of chlamydia pneumoniae IgG seropositivity and risks of future myocardial infarction. *Circulation*, 1999; 99:1161-1164.
74. Prasad A, Zhu J, Halcox JPJ, Wacławski MA, Epstein SE, Quyyumi AA. Predisposition to atherosclerosis by infections role of endothelial dysfunction. *Circulation*, 2002; 106:184-190.
75. Georges JL, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Poirier O, Bickel C, Hafner G, Nicaud C, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Impact of pathogen burden in patients with coronary artery disease in relation to systemic inflammation and variation in genes encoding cytokines. *Am J Cardiol*, 2003; 92:515-521.
76. Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999; 340:115-126.
77. American Heart Association. Inflammation, heart disease and stroke: The role of C-reactive protein. Erisim: (<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4648>). Erisim Tarihi:10.05.2004.
78. Trevethan CS. Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiol Mex*, 2003; 73:141-145.
79. Tracy RP. Inflammation, the metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Int J Clin Pract Suppl*, 2003; 134:10-17.
80. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation*, 1998; 98:731-733.
81. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: Meta-analyses of prospective studies. *JAMA*, 1998; 279:1477-1482.
82. Fuster V, Gotto AM, Libby P, Loscalzo J, McGill HC. Task Force 1: Pathogenesis of coronary disease-The biologic role of risk factors. *J Am Coll Cardiol*, 1996; 27:964-976.
83. Maresca G, Blasio AD, Marchioli R, Minno GD. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: An Update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19:1368-1377.

84. **Mansur AP.** Analysis of the genetic componenet of coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol*, 2000; 74:534-536.
85. **Keavney B.** Genetic epidemiological studies of coronary heart disease. *Int J Epidemiol*, 2002; 31:730-736.
86. **Williams M, Bray PF.** Genetics of arterial prothrombotic risk states. *Exp Biol Med*, 2001; 226:409-419.
87. **Ashavaid TF, Shalia KK, Kondkar AA, Todur S, Nair SR.** Gene polymorphism and coronary risk factors in Indian population. *Clin Chem Lab Med*, 2002; 40:975-985.
88. **Ferencak G, Pasalic D, Grskovic B, Cheng S, Fijal B, Sesto M, Skodlar J, Rukavina AS.** Lipoprotein lipase gene polymorphism in Crotian patients with coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med*, 2003; 41:541-546.
89. **NSW Genetics Education Program.** (genetics@med.usyd.edu.au). Genetic fact sheet: Cardiovascular disease I familial hypercholesterlameia. Erişim: (<http://www.genetics.com.au>). Erişim Tarihi: 21.08.2003.
90. **Alliance For Aging Research.** Genes are involved in coronary artery disease? Erişim: (http://www.agingresearch.org/geneticsinaging/htd_1_4.html). Erişim Tarihi: 13.08.2003.
91. **Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Bollean C, Beroud C.** Software and database for the analysis of mutations in the human LDLR receptor gene. *Nucleic Acids Res*, 1997; 25:172-180.
92. **Wang D, Wu B, Li Y, Heng W, Zhong H, Mu Y, Wang J.** A Chinese homozygote of familial hypercholesterolemia: identification of a novel C263R mutation in the LDL receptor gene. *J Hum Genet*, 2001; 46:152-154.
93. **Salazar LA, Hirata MH, Forti N, Diamant J, Giannini SD, Issa JS, Hirata RD.** Pvu II intron 15 polymorphism at the LDL receptor gene is associated with differences in serum lipid concentrations in subjects with low and high risk for coronary artery disease from Brazil. *Clin Chim Acta*, 2000; 293:75-88.
94. **Pocathikorn A, Granath B, Thiry E, Van Leuven F, Taylor R, Mamotte C.** Influence of exonic polymorphism in the gene for LDL receptor-related protein (LRP) on risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2003; 168:115-121.
95. **Zheng KQ, Zhang SZ, Zhang KL, Zhang L, He Y, Kong XD, Sun Y, Su ZG.** Study on the association of cholesteryl ester transfer protein gene mutations with the susceptibility to coronary atherosclerotic heart disease. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2003; 20:23-26.
96. **Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Jiang XC, Poirier O, Lackner KJ, Meyer J, Cambien F, Tiret L.** Common genetic variation of the cholesteryl ester transfer protein gene strongly predicts future cardiovascular death in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 41:1990-1993.
97. **Ebstein JA, Rader DJ, Parmacek MS.** Perspective: Cardiovascular disease in the postgenomic era-lessons learned and challenges ahead. *Endocrinology*, 2002; 143:2045-2050.
98. **Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Laakso M.** MspI polymorphism at +83 bp in intron 1 of the human apolipoprotein A1 gene is associated with elevated levels of HDL cholesterol and apolipoprotein A1 in nondiabetic subjects but not in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *Diabetes Care*, 2000; 23:791-795.
99. **Wang XL, Badenhop R, Humphrey KE, Wilcken DE.** New MspI polymorphism at +83 bp of the human apolipoprotein A1 gene: association with increased circulating high density lipoprotein cholesterol levels. *Genet Epidemiol*, 1996; 13:1-10.

100. Zou Y, Hu D, Yang X, Wang L, Cui L, Liu X, Gao M, Wei Y, Xu Z. Relationships among apolipoprotein A1 gene polymorphism, lipid levels and coronary atherosclerosis disease. *Chin Med J*, 2003; 116:665-668.
101. Marcovina SM, Koschinsky ML. Lipoprotein(a) as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 1998; 82:57-66.
102. Hu B, Zhou X, Li L, Li X. A preliminary study of pentanucleotide repeat polymorphism apolipoprotein(a) gene in coronary atherosclerotic heart disease. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2002; 19:46-48.
103. Amemiya H, Arinami T, Kikuchi S, Yamakawa KK, Li L, Fujiwara H, Hiroe M, Marumo F, Hamaguchi H. Apolipoprotein(a) and pentanucleotide repeat polymorphism are associated with the degree of atherosclerosis in coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 1996; 123:181-191.
104. Kalina A, Csaszar A, Fust G, Nagy B, Szalai C, Karadi I, Duba J, Prohaszka Z, Horvath L, Dieplinger H. The association of serum lipoprotein(a) levels, apolipoprotein(a) size and (TTTAA)(n) polymorphism with coronary heart disease. *Clin Chim Acta*, 2001; 309:45-51.
105. Mansur AP, Annicchino-Bizzacchi J, Favaro D, Avakian SD, Cesar LAM, Ramires JAF. Angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein B Polymorphisms in coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 2000; 85:1089-1093.
106. Chiodini BD, Barlera S, Franzosi MG, Beceiro VL, Inrona M, Tognoni G. APO B gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis. *Atherosclerosis*, 2003; 167:355-366.
107. Castillo S, Tejedor D, Mozas P, Reyes G, Civeira F, Alonso R, Ros E, Pocovi M, Mata P. The apolipoprotein B R3500Q gene mutation in Spanish subject with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 2003; 165:127-135.
108. Olivieri O, Straineri C, Bassi A, Zaia B, Girelli D, Pizzolo F, Trabetti E, Cheng S, Grow MA, Pignatti PF, Corrocher R. ApoC-III gene polymorphism and risk of coronary artery disease. *J Lipid Res*, 2002; 43:1450-1457.
109. Russo GT, Meigs JB, Cupples LA, Demissie S, Otvos JV, Wilson PWF, Lahoz C, Cucinotta D, Couture P, Mallory T, Schaefer EJ, Ordovas JM. Association of the Sst-I polymorphism at the APOC3 gene locus with variations in lipid levels, lipoprotein subclass profiles and coronary heart disease risk: the Framingham offspring study. *Atherosclerosis*, 2001; 158:173-181.
110. Wang Y, Kikuchi S, Suzuki H, Nagase S, Koyama A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in intron 4 affects the progression of renal failure in non-diabetic renal diseases. *Dial Transplant*, 1999; 14:2898-2902.
111. Attila G, Acartürk E, Eskandari G, Akpınar O, Tuli A, Kanadaşı M, Kayrın L. Effects of apolipoprotein E genotypes and other risk factors on the development of coronary artery disease in Southern Turkey. *Clin Chim Acta*, 2001; 312:191-196.
112. Batalla A, Alvarez R, Reguero JR, Hevia S, Iglesias-Cubero G, Alvarez V, Cortina A, Gonzalez P, Celada MM, Medina A, Coto E. Synergistic effect between apolipoprotein E and angiotensinogen gene polymorphisms in the risk for early myocardial infarction. *Clin Chem*, 2000; 46:1910-1915.
113. Brscic E, Bergerone S, Gagnor A, Colajanni E, Mayullo G, Scaglione L, Cassader M, Gaschino C, Leo MD, Brusca A, Pagano GF, Piazza A, Trevi GP. Acute myocardial infarction in young adults: Prognostic role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type I receptor, apolipoprotein E, endothelial constitutive nitric oxide synthase, and glycoprotein IIIa genetic polymorphism at medium-term follow-up. *Am Heart J*, 2000; 139:979-984.

114. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S. Endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*, 1998; 32:521-526.
115. Tybjaerg-Hansen A, Agerholm-Larsen B, Humphries SE, Abildgaard S, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common mutation (455 G→A) in the β -fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. *J Clin Invest*, 1997; 99:3034-3039.
116. DeLoughery TG. Coagulation abnormalities and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 1999; 10:443-448.
117. Carter AM, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Beta-fibrinogen gene-455 G/A polymorphism and fibrinogen levels. Risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM. *Diabetes Care*, 1996; 19:1265-1268.
118. Yu Q, Safavi F, Roberts R, Marian AJ. A variant of beta fibrinogen is a genetic risk factor for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Investig Med*, 1996; 44:154-159.
119. Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K, Horner S, Becsagh P, Reinhart B, Schumacher M, Weinrauch V, Kostner GM. Beta-fibrinogen gene polymorphism (C148→T) is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian stroke prevention study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998; 18:487-492.
120. Ardissino D, Manucci PM, Merlini PA, et al. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood*, 1999; 94:46-51.
121. Doggen CJM, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors. *Circulation*, 1998; 97:1037-1041.
122. Durante-Mangoni E, Davies GJ, Ahmed N, Ruggiero G, Michaelides K. The prothrombin G20210A polymorphism in patients with myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2002; 13:603-608.
123. Burzotta F, Paciaroni K, De Stefano V, Crea F, Maseri A, Leone G, Andreotti F. G20210A prothrombin gene polymorphism and coronary ischaemic syndromes: a phenotype-specific meta-analysis of 12034 subjects. *Heart*, 2004; 90:82-86.
124. Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki M, Niho Y. A common genetic polymorphism (46C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood*, 1998; 91:2010-2014.
125. Cott E M, Laposata M. Coagulation. In: Jacobs D S, DeMott W R, Oxley D K, Eds. *Laboratory Test Handbook*. Cleveland: Lexi-Comp, 2001: 327-358.
126. Van Der Meer IM, Brouwers GJ, Bulk S, Leebeek Fw, Van Der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC, Gomez Garcia EB. Genetic variability of von willebrand factor and risk of coronary heart disease: the Rotterdam study. *Br J Haematol*, 2004; 124:343-347.
127. Mannucci PM, Mari G, Merati G, Peyvandi F, Tagliabue L, Sacchi E, Taioli E, Sansoni P, Bertolini S, Franceschi C. Gene polymorphism predicting high plasma levels of coagulation and fibrinolysis proteins-a study in centenarians. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997; 17:755-759.
128. Dawso SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen-activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem*, 1993; 268:10739-10745.

129. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation*, 1997; 95:59-62.
130. Goldschmidt-Clermont PJ, Coleman LD, Pham YM, Cooke GE, Shear WS, Weiss EJ, Kral BG, Moy TF, Yook RM, Blumenthal RS, Becker DM, Becker LC, Bray PF. Higher prevalence of GPIIb PLA2 polymorphism in siblings of patients with premature coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med*, 1999; 123:1223-1229.
131. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Linpaintner K. PI^{A1/A2} polymorphism glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet*, 1997; 349:385-388.
132. Boekholdt SM, Peters RJ, de Maat MP, Zwinderman AH, van Der Wall EE, Reitsma PH, Jukema JW, Kastelein JJ. Interaction between a genetic variant of the platelet fibrinogen receptor and fibrinogen levels in determining the risk of cardiovascular events. *Am Heart J*, 2004; 147:181-186.
133. Moshfegh K, Willemin WA, Redondo M, Lammle B, Beer JH, Liechti-Gallati S, Meyer BJ. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/Ia receptor with risk of myocardial infarction: A case-control study. *Lancet*, 1999; 353:351-354.
134. Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Zama T, Aoki N, Yoshino H, Watanabe G, Ishikawa K, Ikeda Y. Coronary artery disease polymorphism in a receptor mediating shear-stress-dependent platelet activation. *Circulation*, 1997; 96:3281-3286.
135. Dizimiri N, Basco C, Moorji A, Meyer B. Angiotensin-converting enzyme polymorphism and the risk of coronary heart disease in the Saudi male population. *Arch Pathol Lab Med*, 2000; 124:531-534.
136. İsbir T, Yılmaz H, Ağaçhan B, Aydın M, İsbir CS. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and coronary artery disease. *IUBMB Life*, 1999; 48:205-207.
137. Zee RYL, Lou Y, Griffiths LR, Morris BJ. Association of a common polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Hypertension*, 1992; 184:9-15.
138. Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer JM, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med*, 1995; 332:706-712.
139. Weisberg HS, Park E, Ballman WK, Berger P, Nunn M, Suh DS, Breksa AP, Garrow TA, Rozen R. Investigations of a common genetic variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) in coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2003; 167:205-214.
140. Kraus JP, Janosik M, Kozich V, Mandell R, Shih V, Sperandeo MP, Sebastio G, de Franchis R, Andria G, Kluijtmans LA, Blom H, Boers Gordon RB, Kamoun P, Tsai MY, Kruger WD, Koch HG, Ohura T, Gaustadnes M. Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum Mutat*, 1999; 13:362-375.
141. De Lucca M, Casique L. Characterization of cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria Venezuelan patients: identification of one novel mutation in exon 6. *Mol Genet Metab*, 2004; 81:209-215.
142. Vendrell J, Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Zamora A, Simon I, Bardaji A, Ricart W, Richart C. A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor-alpha gene (-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*, 2003; 167:257-264.
143. Worrall BB, Azhar S, Nyquist PA, Ackerman RH, Hamm TL, DeGraba TJ. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in carotid atherosclerosis. *Stroke*, 2003; 34:790-793.

144. Dewberry R, Holden H, Crossman D, Francis S. Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20:2394-2400.
145. Francis SE, Camp NJ, Dewberry RM, Gunn J, Syrris P, Carter ND, Jeffery S, Kaski JC, Cumberland DC, Duff GW, Crossman DC. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. *Circulation*, 1999; 99:861-866.
146. Chapman CML, Beilby JP, Humphries SE, Palmer LJ, Thompson PL, Hung J. Association of an allelic variant of interleukin-6 with subclinical carotid atherosclerosis in an Australian community population. *European Heart Journal*, 2003; 24:1494-1499.
147. von Beckerath N, Schusterschitz Y, Koch W, Griesser K, Mehilli J, Gorchakova O, Schomig A, Kastrati A. G protein beta 3 subunit 825T allele carriage and risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2003; 167:135-139.
148. Pollak A, Rokach A, Blumenfeld A, Rosen LJ, Resnik L, Dresner Pol R. Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphism the angiographic extent of coronary artery disease. *Eur Heart J*, 2004; 25:240-245.
149. Peng DQ, Zhao SP, Nie S, Li J. Gene-gene interaction of PPAR γ and ApoE affects coronary heart disease risk. *Int J Cardiol*, 2003; 92:257-263.
150. Chen Q, Reis SE, Kammerer C, Craig WY, LaPierre SE, Zimmer EL, McNamara DM, Pauly DF, Shraf B, Holubkov R, Bairey MCN, Sopko G, Bontempo F, Kamboh ML. Genetic variation in lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX1) gene and the risk of coronary artery disease. *Circulation*, 2003; 107:3146-3151.
151. Hubacek JA, Stavek P, Pit'ha J, Skodova Z, Poledne R. CD14 (C-159→T) polymorphism and levels of C-reactive protein. *Cas Lek Cesk*, 2003; 142:174-176.
152. Risley P, Jerrard-Dunne P, Sitzler M, Buehler A, von Kegler S, Markus HS. Promoter polymorphism in the endotoxin receptor (CD14) is associated with increased carotid atherosclerosis only in smokers: the carotid atherosclerosis progression study (CAPS). *Stroke*, 2003; 34:600-604.
153. Gardemann A, Mages P, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The p22 phox A640G polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis*, 1999; 145:315-323.
154. Aydos TR, Güç MO. Yaşamı hem sürdüren hem de sonlandıran bir madde : nitrik oksit. *Güncel Gastroenteroloji*, 1997; Aralık:494-499.
155. Krishnan R. Nitric oxide-Friend or foe? : Basic sciences. **Erişim:**
(<http://www.google.com.tr/search?hl=tr&ie=UTF-8&q=Dr.R.Krishnan+clinical+applications&btnG=Arama&meta=>). Erişim Tarihi: 22.6.2003.
156. Butler AR, Flitney FW, Williams DLH. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci*, 1995; 16:18-22.
157. Editorial. NO news is good news. *Science*, 1992; 80:248-259.
158. Çakmakçı M. Zehirli Moleküllerden Haberci Maddelerin Kraliçeliğine. **Erişim:**
(<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/dergi/99/ocak/nitrik.pdf>). Erişim Tarihi: 11.07.2003
159. Vanin AF. Biological role of nitric oxide: History, modern state, and perspectives for research. *Biochemistry*, 1998; 63:731-733.

160. Murad F. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *JAMA*, 1996; 276:1189-1192.
161. Kılınç A, Kılınç K. *Nitrik Oksit: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri*. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2003.
162. Wang Y, Marsden P A. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. Erişim: (<http://metallo.scrips.edu/Promise/NOS.html>). Erişim Tarihi: 27.04.2001.
163. Stuehr DJ, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem*, 2001; 276:14533-14536.
164. Nishida CR, Ortiz de Montellano PR. Electron transfer and catalytic activity of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1998; 273:5566-5571.
165. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*, 1999; 43:521-531.
166. Wang ZQ, Wei CC, Stuehr DJ. A conserved tryptophan 457 modulates the kinetics and extent of n-hydroxy-L-arginine oxidation by Inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2002; 277:12830-12837.
167. Elsevier Science Publishers Ltd. Nitric oxide as a neuronal messenger. *TIPS*, 1991; 12:125-128.
168. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 1993; 329:2002-2012.
169. NO'nin hedef hücrelerindeki etki mekanizmaları Erişim: (www.oucom.ohiou.edu/CVPhysiology/BF011.htm). Erişim Tarihi: 21.6.2004
170. Förstermann U, Boissel J, Kleinert H. Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*, 1998; 12:773-790.
171. Nitric Oxide Synthase. Erişim: (www.sghms.ac.uk/depts/immunology/~dash/no/nos.gif) Erişim tarihi: 04.02.2004.
172. Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997; 37:339-359.
173. Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JW, Venema VJ. Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 1997; 272:1276-1282.
174. Huang PLH. Disruption of the endothelial nitric oxide synthase gene: Effect on vascular response to injury. *Am J Cardiol*, 1998; 82:585-586.
175. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001; 280:193-206.
176. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*, 1997; 28:1283-1288.
177. Bonnardeaux A, Nadaud S, Charru A, Jeunemaitre X, Corvol P, Soubrier F. Lack of evidence endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. *Circulation*, 1995; 91:96-102.
178. Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*, 1998; 32:958-964.
179. Kingwell BA. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J*, 2000; 14:1685-1696.
180. Aoyagi M, Arvai AS, Tainer JA, Getzoff ED. Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin. *EMBO J*, 2003; 22:766-775.

181. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 1992; 258:1898-1902.
182. Adak S, Aulak KS, Stuehr DJ. Chimeras of nitric-oxide synthase types I and III establish fundamental correlates between heme reduction, and catalytic activity. *J Biol Chem*, 2001; 276:23246-23252.
183. Nitric Oxide Synthase: substrates, cofactors, and overall reaction. Erişim: (www.pharmazie.uni-halle.de/.../NOS.gif) 1995. Erişim tarihi: 04.02.2004.
184. Gervaziev IV, Sokolov NN. Mechanisms of regulation by calmodulin of nitric oxide synthase. *Vopr Med Khim*, 1999; 45:187-199
185. Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ, Sessa WC. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu²⁹⁸ → Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2001; 276:26674-26679.
186. Tesaro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary P, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary disease: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci*, 2000; 97:2832-2835.
187. Bashkatova VG, Rayevsky KS. Nitric oxide in mechanisms of brain damage induced by neurotoxic effect of glutamate. *Biochemistry*, 1998; 63:866-1020.
188. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol Psychiatry*, 1997; 2:300-310.
189. Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem*, 1998; 273:3125-3128.
190. Schmidt K, Andrew P, Schrammel A, Groschner K, Schmidt V, Kojda G, Mayer B. Comparison of neuronal and endothelial isoforms nitric oxide synthase in stably transfected HEK 293 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001; 281:2053-2061.
191. Raij L. Workshop: Hypertension and cardiovascular risk factors. *Hypertension*, 2001; 37:767.
192. Kiss JP. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Research Bulletin*, 2000; 52:459-466.
193. Crane BR, Arvai AS, Gachhui R, Wu C, Ghosh DK, Getzoff ED, Stuehr DJ. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science*, 1997; 278:425.
194. Babu BR, Frey C, Griffith OW. L-arginine binding to nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 1999; 274:25218-25226.
195. Maunikhina EB, Mashina SY, Simrin BV, Lyamina NP, Senchikhin VN, Vanin AF, Malyshev IY. Role of nitric oxide in adaptation and adaptive defense. *Physiol Res*, 2000; 49:89-97.
196. Wever RMF, Lüscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 1998; 97:108-112.
197. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*, 1998; 97:2494-2498.
198. Miyazaki H, Matsuoaka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Circulation*, 1999; 99:1141-1146.

199. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett*, 1993; 334:170-174.
200. Hou L, Osei-Hyiaman D, Yu H, Ren Z, Zhang Z, Wang B, Harada S. Association of a 27-bp repeat polymorphism in eNOS gene with ischemic stroke in Chinese patients. *Neurology*, 2001; 56:490-496.
201. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredite RM, Wilcken DEL. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*, 1996; 2:41-45.
202. Suzuki H, Nagase S, Kikuchi S, Wang Y, Koyama A. Association of a missense Glu298Asp mutation of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with end stage renal disease. *Clin Chem*, 2000; 46:1858-1860.
203. Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JR, Iglesias-Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzalez I, Alvarez V, Coto E. Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 2001; 5:343-348.
204. Lembo G, Luca ND, Battagli C, Iovino G, Aretini A, Musicco M, Frati G, Pompeo F, Vecchione C, Trimarco B. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an Independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke*, 2001; 32:735.
205. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El-Khattabi O, Mourad M, Horie S, Feron O, Balligand JL, Wattiez R, Pirson Y, Chauveau D, Lens XM, Devuyst O. Modifier effect of eNOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet*, 2002; 11:229-241.
206. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, Harada M, Kajiyama N, Kishimoto I, Kuwahara K, Hino J, Ogawa E, Hamanaka I, Kamitani S, Takahashi N, Kawakami R, Kangawa K, Yasue H, Nakao K. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a-786T→C mutation in the associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet*, 2000; 9:2629-2637.
207. Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clinical Chemistry*, 2000; 46:1626-1630.
208. Demirel Ş, Çine N, Tükek T, Sözen AB, Erk O, Erginel-Ünaltuna N, Erdine S. Endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism in the Turkish population. *Türk Kardiyoloji Dern Arş*, 2001; 29:637-641.
209. Serrano T, Piazeulo E, Benito R, Santolaria S, Lanas A. Bleeding duodenal ulcer and association with polymorphism of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene. *Dig Dis Sci*, 2002; 47:996-1000.
210. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet*, 1998; 103:65-69.
211. Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension*, 1999; 33:933-936.
212. Elbaz A, Poirier O, Moulin T, Chedru F, Cambien F, Amarenco P. Association between the Glu298Asp polymorphism in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene and brain infarction. *Stroke*, 2000; 31:1634.

213. **Burtis CA, Ashwood ER.** *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd Ed, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999; 809-862.
214. **Gordon T.** HDL cholesterol. *Am J Med*, 1977; 62:707.
215. **Allain CC, Poon LS, Chan CGS, Richmond W, Fu PC.** Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, 1974; 20:470-475.
216. **Fossati P, Prencipe L.** Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*, 1982; 28:2077-2080.
217. **Stein EA, Myers GL.** National cholesterol education program recommendations for triglycerides measurement: Executive summary. *Clin Chem*, 1995; 41:1421-1426.
218. **Poncz M, Solowiejzk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S.** Construction of human gene library from small amounts of peripheral blood. Analysis of β -like globin genes. *Hemoglobin*, 1982; 6:27-36.
219. **Attila G, Arpacı A.** Polimeraz Zincir Reaksiyon Tekniği. Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay F Z. *Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon Ve Kalite Yönetimi*. 1. Baskı. İstanbul: Mart Matbaacılık Hizmetleri A. Ş, 2000: 426-435.
220. **Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D.** Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet*, 1999; 353:89-92.
221. **Vogel RA.** Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. *Clin Cardiol*, 1997; 20:426-432.
222. **Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz HM, LaRosa J, Ockene IS, Pearson TA, Reed J, Washington R, Smith SC.** Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association. *Circulation*, 1998; 97:1876-87.
223. **Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnika V, Sacks FM.** Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med*, 1991; 325:1196-204.
224. **Belchetz PE.** Hormonal treatment of postmenopausal women. *N Engl J Med*, 1994; 330:1062-1071.
225. **Mahley RW, Paloğlu KE, Atak Z, Dawson-Pepin J, Langlois AM, Cheung V, Onat H, Fulks P, Mahley LL, Vakar F.** Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J Lipid Res*, 1995; 36:839-859.
226. **Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC, Sowers JR.** Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*, 1999; 100:1134-1146.
227. **MacKenzie TD, Bartecchi CE, Schrier RW.** The human costs of tobacco use (2) *N Engl J Med*, 1994; 330:975-80.
228. **Ockene IS, Miller NH.** Cigarette smoking, cardiovascular disease, and stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. American Heart Association Task Force on Risk Reduction. *Circulation*, 1997; 96:3243-3247.
229. **Roberts WC.** Preventing and arresting coronary atherosclerosis. *Am Heart J*, 1995; 130:580-600.

230. Bersot TP, Pepin GM, Mahley RW. Risk determination of dyslipidemia in populations characterized by low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *Am Heart J*, 2003; 146:1052-1060.
231. Luttmann S, von Eckardstein A, Wei W, Funke H, Kohler E, Mahley RW, Assmann G. Electrophoretic screening for genetic variation in apolipoprotein C-III: identification of a novel apoC-III variant, apoC-III(Asp45-->Asn), in a Turkish patient. *J Lipid Res*, 1994; 35:1431-40.
232. Assmann G, Gotto AM Jr, Paoletti R. The hypertriglyceridemias: risk and management. *Am J Cardiol*, 1991; 68:1A-4A.
233. Fatini C, Sofi F, Gensini F, Sticchi E, Lari B, Pratesi G, Pulli R, Dorigo W, Pratesi C, Gensini GF, Abbate R. Influence of eNOS gene polymorphisms on carotid atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2004; 27:540-544.
234. Kunnas TA, Ilveskoski E, Niskakangas T, Laippala P, Kajander OA, Mikkelsen J, Goabeler S, Penttilä A, Perola M, Nikkari ST, Karhunen PJ. Association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with risk of coronary artery disease and myocardial infarction in middle-aged men. *J Mol Med*, 2002; 80:605-609.
235. Sigusch HH, Surber R, Lehmann MH, Surber S, Weber J, Henke A, Reinhardt D, Hoffmann A, Figulla HR. Lack of association between 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest*, 2000; 60:229-235.
236. Hwang JJ, Tsai CT, Yeh HM, Chiang FT, Hsu KL, Tseng CD, Liao CS, Tseng YZ, Lai LP. The 27-bp tandem repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene is not associated with coronary artery disease in a hospital-based Taiwanese population. *Cardiology*, 2002; 97:67-72.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Selçuk MATYAR
Doğum Tarihi ve Yeri : 1969-Adana
Medeni Durumu : Bekar
Adres : Reşatbey mah. Adalet cad.
Güleryüz Apt. Kat : 2 No :5
Seyhan - ADANA
Telefon : 0 322 4541060
E-mail : selcukmatyar@yahoo.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi
Varsa Mezuniyet Derecesi : -
Görev Yerleri : Örenburç Köyü – Saray – VAN
Davultepe - Mersin
Dernek Üyelikleri : Türk Biyokimya Derneği
Alınan Burslar : -
Yabancı Dil(ler) : İngilizce
Diğer Hususlar :