

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Kardiyoloji Anabilim Dalı

MGP GEN POLİMORFİZMİ’NİN KORONER
ARTER HASTALIĞI’NDAKİ ROLÜ

(UZMANLIK TEZİ)

Dr.MEHMET ZİHNİ BİLİK

TEZ YÖNETİCİSİ
PROF.DR.SAİT ALAN

DİYARBAKIR-2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
İÇİNDEKİLER	2
TEŞEKKÜR.....	5
ÖZET.....	6
ABSTRACT	7
TABLO LİSTESİ.....	8
ŞEKİL LİSTESİ.....	9
KISALTMALAR	10
1. GİRİŞ VE AMAÇ	12
2. GENEL BİLGİLER.....	14
2.1.Ateroskleroz	14
2.1.1.Arter Duvarının Anatomisi.....	15
2.1.2.Arter Duvarının Hücreleri	16
2.1.2.1.Endotel Hücreleri	16
2.1.2.2.Düz Kas Hücreleri.....	16
2.1.2.3.Makrofajlar.....	17
2.1.2.4.Trombositler.....	17
2.1.2.5.Adipositler.....	17
2.2.Aterosklerozun Patogenezi	17
2.2.1.Endotel Disfonksiyonu.....	19
2.2.2.LDL Oksidasyonu.....	20
2.2.3.Köpük Hücre Oluşumu	20
2.2.4.Lipid Çekirdeğin Oluşumu	21
2.2.5.Fibröz Kılıf Oluşumu	21
2.3.Aterosklerozda Risk Faktörleri	21
2.3.1.Modifiye Edilemeyen Faktörler.....	22
2.3.2.Modifiye Edilebilir Faktörler.....	22
2.3.2.1.Dislipidemi	22
2.3.2.2.Sigara	23
2.3.2.3.Hipertansiyon	23
2.3.2.4.Diyabet	24

2.3.2.5.Sedanter Yaşam Tarzı.....	24
2.3.2.6.Obezite	25
2.3.3.Yeni Kardiyovasküler Risk Faktörleri.....	25
2.3.3.1.Homosistein.....	25
2.3.3.2.İnflamatuvar Belirteçler	26
2.3.3.3.Lipoprotein (a)	26
2.3.3.4.İnfeksiyon Ajanları.....	27
2.3.4. Aterosklerotik Lezyonların Sınıflaması.....	27
2.3.4.1. Klasik Sınıflama.....	27
2.3.4.2. Amerikan Kalp Birliği (AHA) Sınıflaması.....	27
2.3.5. Plağın Yapısı ve Klinik Tablo Arasındaki İlişki.....	29
2.3.5.1. Kararlı (Stabil) Aterosklerotik Plak.....	29
2.3.5.2. Kararsız (Anstabil) Aterosklerotik Plak.....	29
2.3.6. Koroner Arter Hastalığının Tanısı.....	30
2.3.6.1.Koroner Arter Hastalığının Girişimsel Olmayan Tanısı.....	30
2.3.6.2 Koroner Arter Hastalığının Girişimsel Tanısı.....	31
2.3.6.3.Aterosklerotik Koroner Arter Hastalıklarında Tedavi Yaklaşımları.....	31
2.4. KORONER ARTER KALSİFİKASYONU (KAK).....	32
2.4.1. Patofizyoloji.....	32
2.4.2 Epidemiyoloji.....	33
2.5. Matriks Gla Protein	34
2.5.1. Yapısı.....	34
2.5.2. Vücuttaki dağılımı	35
2.5.3. İşlevi	36
2.6. MGP Geni	38
2.7. Özendirici Bölgede Yer Alan Düzenleyici Elementler	42
2.8. MGP Gen İfadesinin Düzenlenmesi	42
2.9. MGP Geninde Bilinen Çeşitlilikler ve Bu Çeşitliliklerin Fenotipe Yansıması...	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Grupların oluşturulması ve kan örneklerinin eldesi	45
3.1.1.Çalışmaya alınma kriterleri.....	45
3.1.2.Çalışmadan dışlanma kriterleri.....	45
3.2. Gereçlerin Temini.....	46
3.3.Gereçler.....	46

3.3.1 Kimyasal maddeler	46
3.3.2. Çözeltiler	46
3.4. DNA Eldesi	47
3.5. DNA analiz yöntemi	47
3.5.1. PZR İle ilgili Dizilerin Çoğaltılması	48
3.5.2. PZR Karışımının Hazırlanması	48
3.6. Agaroz Jel Elektroforez	50
3.7. Restriksiyon Enzimi İle Kesim	50
3.8. Sonuçların İstatistikî Yöntemlerle Analizi	51
4. BULGULAR VE SONUÇLAR	52
4.1. T-138C Gen Çokyapılılığının Analizi	52
4.2. G-7A Gen Çokyapılılığının Analizi	54
4.3. Thr83Ala Gen Çokyapılılığının Analizi	55
5.TARTIŞMA.....	57
6.KAYNAKLAR	60-74

TEŞEKKÜR

Kardiyoloji uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve tezimin hazırlanmasında katkısı büyük olan **Prof.Dr. Sait Alan'a** teşekkür ederim.

Kliniğin yorucu temposu içerisinde bilgisini, tecrübesini ve desteğini eksik etmeyen bölüm başkanımız **Prof.Dr.M.Sıddık Ülgen** başta olmak üzere değerli hocalarım ; **Prof.Dr.Nizamettin Toprak, Prof.Dr.Abdülaziz Karadede, , Doç.Dr.Serdar Soydinç, Doç.Dr.Mehmet Yazıcı, Yrd.Doç.Dr.Ömer Alyan, Yrd.Doç.Dr.Yahya İslamoğlu, Yrd.Doç.Dr.Zuhal Atılğan, Yrd.Doç.Dr.Ebru Tekbaş, Uz.Dr.Habib Çil** ile tüm asistan arkadaşlarıma, hemşire, teknisyen ve personellere teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında yardımlarından dolayı Dr.Ali Fuad Kara ve Bülent Gögebakan'a Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD çalışanlarına teşekkür ederim.

Dahiliye rotasyonlarım boyunca her türlü bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleri daim olan aileme, saygılarımı ve sevgilerimi sunarım.

ÖZET

Koroner arter kalsifikasyonu (KAK) ,koroner ateroskleroz varlığı ile ilişkilidir.Koroner arterlerde duvar kalsifikasyonu ile koroner arter hastalığı(KAH) arasında çok güçlü bir ilişki bulunmaktadır.Subklinik aterosklerozun bir göstergesi olan KAK yükünün ,kişinin kardiyovasküler riski yönünden konvansiyonel risk faktörlerinden bağımsız olarak prognostik bilgi verdiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. MGP (Matriks Gla protein)'nin arteryel kalsifikasyonun önlenmesinde oldukça etkin olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden kalsifikasyon inhibitörü olan MGP son zamanlardaki çalışmalarda daha da önem kazanmıştır.

Matriks Gla Protein geninin yapısal ve özendirici gen bölgelerinde saptanan nükleotid değişimlerinin koroner arter hastası ve normal bireyler arasındaki dağılımının koroner arter hastalığı oluşumu ile ilişkisinin belirlenmesi için bu çalışma planlanmıştır.

Çalışmaya Koroner arter hastalığı tespit edilen 58 hasta ile koroner arter hastalığı olmadığı tespit edilen 57 kontrol hastasından (toplam 115 hastadan) DNA analizi yapmak amacıyla kan örneği alındı. Elde edilen DNA'lar, MGP geninin kodlayıcı ve özendirici (promoter) bölgesindeki çeşitli nükleotid değişimlerini kapsayan, 3 çift primer seti kullanılarak Polimeraz Zincir Tepkimesi'ne (PZT) tabi tutuldu. Çoğaltılan gen bölgeleri RFLP yöntemi ile gen polimorfizmi yönünden analiz edildi.

MGP geni özendirici bölgesinde yer alan T-138C ve G-7A değişimi ile genin 4. ekzonunda rastlanan Thr83Ala değişiminin incelendiği çalışmamızda her 3 gen polimorfizminin de gruplar arasındaki dağılımları belirlenmiştir. Yapılan ki-kare analizlerinde her 3 bölge için gruplar arasındaki dağılımda anlamlı bir fark görülmemiştir

Anahtar Kelimeler: Koroner Arter Hastalığı ,Koroner Kalsifikasyon, Matriks Gla Protein, MGP Polimorfizmi

ABSTRACT

Coronary artery calcification (CAC) is associated with coronary atherosclerosis. There is a significant relation between coronary artery wall calcification and coronary artery disease (CAD). The measure of coronary artery calcification is an indicator of subclinical atherosclerosis. In some studies it has been showed that independent from conventional cardiovascular risks, coronary artery calcification suggests data about prognosis. Matrix Gla protein (MGP) appears to be an important protective modulator against calcification since it is a potential inhibitor of tissue calcification. Therefore, MGP as an inhibitor of calcification recently has been more important in studies.

In this respect, it is aimed to establish the relation between the distributions of nucleotide alterations found in promoter and coding regions of MGP gene in patients with coronary artery disease (CAD) and patients that have not coronary artery disease.

DNA samples were obtained from 58 patients with coronary artery disease (CAD) and 57 patients that had not CAD (Totally from 115 patients). The DNA samples obtained were analyzed by Polymerase Chain Reaction (PCR) method using the 3 sets of primer pairs which cover the coding (Thr83Ala in exon 4) and promoter regions (T-138C and G-7A) of MGP gene. Amplified regions were analyzed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method for possible polymorphisms.

The chi-square analysis of the results revealed that there is no statistical difference between control and study groups.

Keywords: Coronary Artery Disease, Coronary Calcification, Matrix Gla Protein, MGP Gene Polymorphism

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo 1. Sıçan dokularında MGP ifadesinin seviyeleri	35
Tablo 2. İnsan MGP geninin intron-ekzon yapısı	38
Tablo 3. MGP gen çökyapılılığının incelenmesinde kullanılan primerler ve uzunlukları.....	48
Tablo 4. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde tepkime karışım oranları	49
Tablo 5. Primerlere ait optimize edilmiş erime sıcaklıkları	49
Tablo 6. PCR tepkime koşulları	50
Tablo 7. Enzim kesim protokolü	50
Tablo 8. Restriksiyon enzimlerinin tanıma dizileri ve tepkime koşulları	51
Tablo 9. T-138C gen çökyapılılığı için genotiplerin gruplara göre dağılımı	54
Tablo 10. T-138C gen çökyapılılığı için allellerin gruplara göre dağılımı	54
Tablo 11. G-7A gen çökyapılılığı için 3 farklı genotipin gruplara göre dağılımı	55
Tablo 12. T-138C gen çökyapılılığı için allellerin gruplara göre dağılımı	56
Tablo 13. Thr83Ala gen çökyapılılığı için 3 genotipin gruplara göre dağılımı	57
Tablo 14. Thr83Ala gen çökyapılılığı için allellerin gruplara göre dağılımı	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No:

Şekil 1. Matriks Gla Proteini.....	35
Şekil 2. Sıçan dokularındaki MGP mRNA seviyelerinin Northern Blot Analizi.....	35
Şekil 3. MGP geninin intron-ekzon organizasyonu ve enzim haritası.....	39
Şekil 4. İnsan MGP geninin nükleotid dizisi	40
Şekil 5. İnsan MGP geninin moleküler varyantları	43
Şekil 6. T-138C nükleotid değişiminin RFLP yöntemiyle analiziyle elde edilen bant görüntüleri.....	53
Şekil 7. G-7A nükleotid değişiminin RFLP yöntemiyle analiziyle elde edilen bant görüntüleri	55
Şekil 8. Thr83Ala aminoasit değişimine neden olan A→G nükleotid değişiminin RFLP yöntemiyle analizi sonucu elde edilen bant görüntüleri	56

KISALTMALAR

ADP Adenozin difosfat

AP-1 Aktive edici protein-1

ATP Adenozin trifosfat

AKS: Akut Koroner Sendrom

AHA: Amerikan kalp Cemiyeti

BGP Bone Gla protein (Kemik Gla protein)

cAMP Siklik adenozin monofosfat

CK-MB: Kreatin Kinaz MB izoformu

CRP: C-Reaktif Protein

EDTA Etilen diamin tetra asetik asit

EGR-1 Early growth response

Gla Gama karboksi glutamik asit

Glu Glutamik asit

HDL: Yüksek Dansiteli Kolesterol

KAH: Koroner Arter Hastalığı

LDL : Düşük Dansiteli Kolesterol

IDL: Intermedier Dansiteli Lipoprotei

NCEP: National Cholesterol Education Programı

dNTP Deoksiribonükleik asit tri fosfat

MCP-1 Monosit atraktant protein-1

MGP Matrix Gla protein

MRE Metal responsive element (Metal cevap elementi)

mRNA Messenger (haberci) ribonükleik asit

NCBI National Center For Biotechnology information. <http://ncbi.nih.gov/>

PCI: Perkütan Koroner Girişim

PCR Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir tepkimesi)

PDGF Platelet derivated growth factor (Platelet türevli büyüme faktörü)

PLA2 Fosfalipaz A2

RFLP Restriction fragment length polymorphism

RGDS Arginin(**R**)-Glisin(**G**)-Aspartik asit(**D**)-Serin(**S**) peptidi

ROS Reaktif oksijen türevi

SDS Sodyum dodesil sülfat

SP-1 Specificity protein-1

TBE Tris-borik asit-EDTA tamponu

TxA: Tromboxan A2

VCAM 1: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü

VLDL: Çok Küçük Dansiteli Lipoprotein

vWF : Von Willebrand Faktör

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner arter lümeninin genellikle bir ateromatöz plakla daralması ya da tıkanması sonucu oluşan hastalığa, koroner arter hastalığı (KAH) denir. Aterosklerotik damar hastalığı yaşamın erken dönemlerinde başlar ve hayat boyu devam eder. Bu hastalıklar tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de başta gelen mortalite ve morbidite nedenleri arasındadır (1).

Hastaların bir bölümünün herhangi bir önbelirti olmadan akut miyokard infarktüsü veya ani kardiyak ölüm gibi tablolarla karşımıza çıkması, KAH'nın erken tanı ve tedavisinin önemini ortaya koymaktadır. Bu noktada kardiyovasküler hastalıklar için risk profili belirlenmesi ve uygun korunma programına başlanması oldukça önem kazanmaktadır.

Günümüzde sıklıkla kullanılmakta olan ve geleneksel kardiyovasküler risk faktörlerini (yaş,sigara,hiperlipidemi vs.) içeren korunma algoritmaları kişinin risk profilini belirlemede yetersiz kalabilmektedir. Son zamanlarda koroner arter kalsiyum (KAK) skrolama gibi yöntemler üzerinde giderek artan sıklıkta durulmaktadır (2).

KAK skrolama ,koroner ateroskleroz varlığını gösteren tekniklerden biridir. KAK, arteryel kalsifikasyonun göstergesidir.Koroner arterlerde duvar kalsifikasyonu ile KAH arasında çok güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Subklinik aterosklerozun bir göstergesi olan KAK yükünün ,kişinin kardiyovasküler riski yönünden konvansiyonel risk faktörlerinden bağımsız olarak prognostik bilgi verdiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (2).

Daha önce arter kalsifikasyonunun pasif bir süreç olduğu kalsiyum-fosfat birikimi,inflamasyon,lipit birikimi veya diyabet sonucu olduğu düşünülüyordu. Oysa son senelerde açık hale gelmiştir ki vasküler kalsifikasyon aktif bir süreç olup kardiyovasküler mortalite ve morbidite ile güçlü bir ilişkisi olan bağımsız bir patolojidir.(3-5) Klinik olarak vasküler kalsifikasyon damar duvarında sertleşmeye yol açar ve bu arteryel kompliansın azalmasına neden olur. Koroner perfüzyonun azalmasına yol açıp fatal komplikasyonların artışına sebep olur.(6,7) Kalsifikasyon yaşlı popülasyonda , kronik böbrek yetersizliği,diyabet,aort stenozu ve aterosklerozu olan hastalarda genelde bulunur.(8)

Bu nedenle damarlardaki kalsifikasyonu azaltma veya tersine çevirmeye yönelik bir sürü çaba gösterilmiştir

Arter kalsifikasyonu ile ilgili proteinlerden matriks Gla proteini (MGP) geniş birdoku dağılımına sahip önemli bir hücre dışı matriks proteindir (9). En çok akciğer ve kalpte sentezlenmekle beraber kemik ve böbreklerde de sentezi yapılmaktadır . Moleküler ağırlığı 10 kDa olan olgun MGP proteini 84 aminoasitten oluşmaktadır . Sahip olduğu glutamik asit

birimlerinin 5 tanesi sentez sonrası vitamin K ve bikarbonat iyonlarını gerektiren bir reaksiyonla γ - karboksilasyona uğrayarak gama karboksi glutamik asite dönüşür (10). Bu Gla birimleri kalsiyum (Ca^{2+}), fosfat, hidroksiapatit kristalleri için yüksek bağlanma ilgisi oluşturur . Ca^{2+} iyonları Gla ünitelerinde yapısal değişiklikleri teşvik etmekte ve proteinin uygun katlanmayı gerçekleştirmesini kolaylaştırmaktadır . Yapısında ayrıca 3 adet fosfoerin aminoasidi ve 1 adet sülfat bağı içermektedir . İnsanda 12p13.1 – p12.3 kromozomal yerleşimine sahip MGP geni genomda tek kopya halinde bulunur, 3937 baz çifti uzunluğundaki yapısal gen bölgesi 4 ekzondan ve genin % 85'ini oluşturan 3 büyük intronik diziden oluşmaktadır . Genin özendirici (promoter) bölgesi çeşitli düzenleyici elementler için bağlanma bölgeleri içermektedir (10).

İnsan MGP geni ile proteinin yapısı incelendiğinde her bir ekzonun proteinin her biri ayrı işleve sahip farklı bir alt birimine karşılık geldiğini göstermektedir (10). Buna göre ekzon 1; 5' translasyona uğramayan bölge ile zarlararası bölge ileti peptidini, ekzon 2; olgun proteinin 2–12. aminoasiti arasında yer alan α -helikal alt üniteyi kodlamaktadır (10). Bu bölgenin ne gibi bir işlevi olduğu bilinmemektedir (10). Ekzon 3 ve 4 sırasıyla gama karboksilaz tanıma bölgesi ile Gla içeren üniteyi kodlar (10). MGP, arterial kalsifikasyonun önlenmesindeki koruyucu mekanizmaya katılan proteinlerden biridir (11). MGP için tasarlanan fare modellerinde MGP eksikliğinde kıkırdak ve büyüme plaklarında aşırı mineralizasyon, ana arterlerde şiddetli kalsifikasyona bağlı damar tıkanmaları oluşmuş ve doğumdan sonra 8 hafta içinde farelerin torasik ve abdominal aorttaki hasarlar nedeniyle öldükleri belirlenmiştir (11). Normal yapısında kalsifiye olmayan bir hücre dışı matrikse sahip iki hücre tipinde (vasküler düz kas hücreleri ve kondrositler) MGP eksikliğinde şiddetli kalsifikasyonun gözlenmesi MGP'nin doku kalsifikasyonunu önleyici bir makromolekül olduğunu göstermektedir (12).

MGP, kalsifikasyonun engellenmesinde önemli bir role sahip bir proteindir (11). Hasta bireylerde, MGP'nin koroner arter hastalığı oluşumundaki rolünün anlaşılması hastalığın oluşumundaki moleküler mekanizmaya ışık tutacaktır. Böylelikle toplumumuzda sık rastlanılan koroner arter hastalığı hakkında moleküler düzeyde bilgiye sahip olunması ve elde edilecek verilerin hastalığın moleküler tanısına yönelik bir adım olarak kullanılmasıyla daha nitelikli sağlık hizmetlerinin sunulması ve yaşam kalitesinin arttırılması sağlanacaktır. Ayrıca bu çalışma bu konuda yapılabilecek daha sonraki çalışmalar için de bir temel oluşturacaktır.

Bu çalışmada, önemli bir kalsifikasyon engelleyici olan matriks Gla proteinin bilinen tek nükleotid değişimlerinin KAH hastası bireyler arasındaki dağılımı ve KAH varlığı arasındaki ilişkisi araştırılmış

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz:

Ateroskleroz, damar duvarının kalınlaşması ve esnekliğinin kaybolması ile karakterize arteriyel hastalık grubunun bir parçasıdır. Bu gruptaki diğer hastalıklar, küçük arterler ve arteriyollerin duvarlarında hyalen kalınlaşma ve proliferasyon ile beliren arteriyoloskleroz ve müküler arterlerin media tabakasının kalsifikasyonu ile karakterize olan Mönckeberg'in mediyal kalsifik sklerozudur (13).

Kardiyovasküler hastalıkların tedavisindeki devam eden gelişmelere rağmen, bu hastalıkların mortalitesi hala yüksektir (14). Birçok ülke ve ülkemizde kardiyovasküler hastalıklar tüm etnik gruplardaki erkek ve kadınlarda en başta gelen mortalite ve morbidite nedenidir (15). Kardiyovasküler hastalıklar tüm dünyada epidemik olmaya başlamıştır ve aterogenez ve sıklıkla eklenen tromboz altında yatan en sık nedendir. Kronik inflamatuvar bir hastalık olan ateroskleroz; aort, karotis ve iliyak arterler gibi elastik arterler ile koroner ve popliteal arterler gibi büyük ve orta çaplı müküler arterlerin hastalığı olmakla birlikte, nadir de olsa daha küçük çaplı arterleri de etkileyebilir (16). Aterosklerotik süreç çocukluk çağından itibaren başlayarak vücuttaki vasküler yapıyı etkilemekte ve bu sürecin klinik belirtileri ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Koroner, periferik arter hastalığı (PAH) ya da inme gibi klinik tablolarla karşımıza çıkan bu sistemik hastalık, pek çok risk faktörünün de katkısı ile progresif olarak ilerlemektedir. Sistemik bir hastalık olmasına rağmen, bu hastalığın komplikasyonları dolaşım sisteminin bazı bölgelerinde fokal olarak ortaya çıkmaktadır.

Hastalığın bu fokal olma özelliği ateroskleroz gelişimi açısından hiperlipidemi (HL), HT, DM ve sigara gibi risk faktörlerinin sistemik olması ve arter sisteminin tüm bölümlerini benzer şekilde etkileyebilme olasılığı ile ters düşmektedir. Bu durum ateroskleroz gelişiminde, sistemik risk faktörlerinin lokal faktörlerle birlikte rol aldığını göstermektedir. Aterosklerotik lezyonların kan akımının ayrıldığı damarların bifürkasyon noktaları ile arterlerin proksimal bölümlerinde oluşması, lezyon gelişiminde hidrodinamik etkinliğin de rolü olduğunu göstermektedir (17).

Aterosklerozun en erken lezyonu olan yağlı çizgilenmenin erken çocukluk döneminde aortta bulunduğu bilinmektedir. Hatta bugün aterosklerozun fetal gelişme döneminde, özellikle hiperkolesterolemisi olan annelerin fetüslerinde başladığı bilinmektedir (18). Ateroskleroza genetik yatkınlık bilinmekle beraber aterosklerozla ilişkili hastalıkların büyük çoğunluğu sonradan edinilir. Bu nedenden dolayı aterosklerozun genellikle hayatın ilerleyen

dönemlerinde ortaya çıkan klinik sonuçlarının önlenmesi mümkündür. Ateroskleroz; arter duvarında başlayıp lümenin tıkanmasına kadar uzanan bir süreci içeren kronik ilerleyici bir durumdur. Ateroskleroz orta ve büyük çaplı arterlerde endotel fonksiyon bozukluğu ile başlar ve arterin intima ve mediasında aterosklerotik plak gelişimi ile sonuçlanan yaygın yapısal değişikliklere neden olmaktadır (19).

2.1.1. Arter Duvarının Anatomisi:

Normal arterin çok basit bir anatomisi vardır. Üç tabakadan oluşur; Arter duvarı ve dolaşan kan arasında bariyer oluşturan tunika intima, kalın kas tabakası olan tunika media ve çevredeki organların bağ dokusu ile birleşen ve bağ dokusu tabakası olan tunika adventisyadır. Tunika İntima; Tek sıra biçiminde dizilmiş endotel hücreleri, bunları destekleyen subendotelyal matriks ve bazal membran intimayı oluşturur. İntima tabakası, media tabakasından internal elastik membran ile ayrılır. İntima tabakasını oluşturan temel yapılar, arter yatağının her kesiminde aynı olsa da, intima kalınlığı yerel farklılıklar gösterir (20). Farklılığın düzeyini kan akımının damar duvarında oluşturduğu mekanik güçler belirler. İntima kalınlığının en fazla olduğu bölgeler, arterlerin bifürkasyon yerleri ve yan dalların ağız kesimleridir. İntima tabakası yenidoğan döneminde sadece birkaç mikrometre kalınlığında iken, yaşam boyu ilerleyici intimal kalınlaşma olur ve erişkin aortasında, birkaç yüz mikrometre kalınlıkta olabilir. Bu durum bağ dokusu lifleri, proteoglikanlar ve mezenkimal hücrelerin sürekli birikimine bağlıdır (16).

Tunika Media; Arter duvarının en geniş tabakası olan media tabakası, vasküler düz kas hücrelerinden oluşmuştur. Vasküler düz kas hücreleri, arterin hücre kütlelerinin büyük kısmını oluşturur. Bu hücreler dairesel tabakalar şeklinde organize olup, arter lümenini konsantrik daireler şeklinde çevreler. Adventisya tabakasından eksternal elastik membran ile ayrılır. Tunika Adventisya; Arter duvarının en dış kısmını oluşturan adventisya tabakası bağ dokusu yapısındadır. iç kısmı fibröz olup, kollagen ve elastinden oluşmaktadır. Media tabakasından uzaklaştıkça, bunların yerini gevşek bağ dokusu almaktadır. Adventisya tabakası, bunların yanında fibroblastlar, mast hücreleri, adipositler ve sempatik sinir uçlarını da içermektedir. İntima kalınlığında artışa bağlı yastıklar ve arteriyel dezorganizasyon, arteriyel ağacın dallanma noktalarında bulunur. Burada, endotel tabakasındaki permeabilite artmıştır ve proliferasyon hızı daha yüksektir. İntima kalınlaşmıştır, medianın lameller organizasyonu bozulmuştur ve düz kas hücreleri daha yüksek hızla proliferasyon göstermektedir. Aterosklerotik lezyonların anatomik dağılımının, intimal yastıkların anatomik dağılımı ile aynı olması dikkat çekicidir.

Yastıkların lezyon oluşumu için substrat oluşturup oluşturmadığı veya yastık oluşumunu uyaran aynı faktörlerin (hemodinamik zorlanma) ateroskleroza da uyarıp uyarmadığı bilinmemektedir (21).

2.1.2. Arter Duvarının Hücreleri:

2.1.2.1.Endotel Hücreleri:

Vasküler endotel insan vücudundaki tüm kan damarlarının yüzeyini kaplayan, arter duvarı ile kan elamanları arasında bariyer oluşturmak ve damar permeabilitesini kontrol etmek üzere özelleşmiş tek sıra dizilmiş epitelyal hücrelerden oluşan tabakadır (22). Endotel hücresi, bariyer oluşturmak ve kan-arter permeabilitesini kontrol etmek üzere özelleşmiş, ince uzun bir epitel hücresidir. Endotelin üç önemli fonksiyonu vardır. Kan-doku permeabilitesini sağlamak, damar tonusunu kontrol etmek ve hemostaz ve enflamasyona göre damar yüzeyinin özelliklerini düzenlemek. Damar tonusu, arterin düz kas hücrelerinin kontraksiyon derecesi ile belirlenir. Ancak, endotel, düz kas hücre kontraktilesini, parakrin vazoaaktif mediyatörler salgılayarak kontrol eder. Bu mediyatörlerin en iyi şekilde tanımlanmış olanı, NO sentaz (bir endotelyal enzim) tarafından L-argininden oluşturulan inorganik bir gaz olan nitrik oksittir (NO) . Bu üretim, yapısal olarak gerçekleşir, ama endotelyum hücresi içinde intraselüler kalsiyum düzeyi yükseldiği zaman, asetilkolin, bradikinin ve bazı diğer dolaşan mediyatörlerin etkisi sonucunda artar. Nitrik oksit, endotelyal plazma membranından difüze olur, ekstraselüler aralıktan geçer ve düz kas hücresi içinde enzimatik bir kaskadı aktive eder. Bu durum, düz kasın gevşemesine ve damar tonusunun azalmasına yol açar (23).

2.1.2.2.Düz Kas Hücreleri:

Düz kas hücresi, arterlerde en fazla bulunan hücre tipidir (tüm hücrelerin %95'inden fazlasını oluşturur). Düz kas hücreleri, miyozin ve aktin filamanları içerir, ama kalp ve iskelet kasının çizgili kas hücrelerine göre, kontraktileleri daha az gelişmiştir. Vasküler düz kas hücresi özellikle primitiftir ve tonusunu değiştirebilme kapasitesini, damar duvarının geniş ekstraselüler matriksinin üreticisi olarak, fibroblasta benzer rol oynayabilmesi ile birleştirir.

Erişkin arterinde, hemen hemen tüm düz kas hücreleri, medial tabakada bulunur. Bunlar birbirlerine sıkı ve boşluklu bileşkeler içeren, bileşke kompleksleri ile bağlıdır. Bu durum, düz kas tabakasının sadece gerilim kuvvetini artırmaz, aynı zamanda arteryel düz kas boyunca, hücreler arasında sinyal moleküllerinin hızlı transferini de sağlar.

Düz kas hücreleri, endotelyum hücreler gibi, normalde bölünmeyen pasif hücrelerdir. Ancak, damar hasarı, medial düz kas hücrelerinin bölündüğü, intimaya göç ettiği ve sonra intimal kalınlaşma oluşturmak üzere tekrar tekrar bölündüğü proliferatif bir yanıtı ortaya

çıkartır. Anjiyoplasti ve damar cerrahisi sonrasında gözlenen restenoza benzeyen bu süreç, büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir (24).

2.1.2.3. Makrofajlar:

Normal arterde hücre popülasyonunun küçük ama önemli bir kısmını oluşturur. Kan monositlerinden kaynaklanırlar, lökosit adhezyon molekülleri ile etkileşime girerek, endotelyuma girerler (muhtemelen hem luminal endotel tabakasına, hem de vasa vazorum endotel tabakasına) ve intima ve adventisyada yerleşirler. Makrofajlar salgıladıkları mediyatörler ile düz kas hücreleri ve fibroblastların proliferasyonunu uyarırlar. Makrofajlar, aterosklerotik plaktaki esas fagositik hücreler olup, düz kas hücreleri ile beraber köpük hücrelerini de oluştururlar (16).

2.1.2.4. Trombositler:

Trombositler, komplike aterosklerotik plaktaki en önemli hücreler olup, içerdikleri granüllerde çeşitli sitokin ve vazoaktif maddeler taşırlar. Hassas aterosklerotik plağın bütünlüğünün bozulmasıyla aktive olan trombositler, salgıladıkları sitokinler ile fissüre ya da rüptüre olarak komplike olan aterosklerotik bölgede toplanarak trombüs oluşumuna neden olurlar ve böylelikle akut koroner sendromlara yol açarlar (16).

2.1.2.5. Adipositler:

Adventisyada sık bulunurlar ve arteri çevreleyen gevşek bağ dokusundaki majör hücre tipidir. Lokal fibroblastlardan kaynaklanırlar ve bunların sayı ve büyüklükleri, beslenme durumuna bağlıdır.

2.2. Aterosklerozun Patogenezi:

Aterosklerozun hastalık süreci, primer olarak arter duvarının intima tabakasına sınırlıdır. Bu tabaka, lipidler ve enflamatuvar hücreler tarafından infiltre olur ve değişik derecelerde fibrozis gelişir (1). Arteriyel travma, mediyal düz kas hücrelerinin, intima içine göç eden, fibroblasta benzer tamir hücrelerine fenotipik modülasyonunu içeren bir iyileşme reaksiyonu başlatır.

Bu hücreler, intima içinde proliferer olur ve ekstraselüler matriksi oluştururlar. Zarar damarın içinden de gelse, dışından da gelse, bu reaksiyon aynıdır. Arteriyel tamir sürecinin hemen hemen tamamen intima tabakası içinde gelişmesinin nedeni bilinmemektedir, ama daha uygun mekanik özellikler buna neden olabilir (13). Travmaya vasküler yanıt ve ateroskleroz arasındaki benzerliklerin ışığında, Ross ve Glomset 1976'da (25), ateroskleroz patogenezi için, "hasara yanıt" hipotezini öne sürmüşlerdir.

Bu hipotezin bazı yönleri, yıllar içinde değişmiş olmasına rağmen, genel kavram günümüzde yaygın olarak kabul görmüştür. Lipoprotein kaynaklı lipidlerin ve özellikle oksidatif olarak modifiye olan lipidlerin birikmesinin arteri hasara uğrattığına ve düz kas hücresine bağımlı tamir sürecini başlattığına inanılmaktadır (26). Bu durum, diğer iyileşme reaksiyonlarında görülen skar dokusuna benzeyen intimal plakların oluşmasına yol açar.

İyileşme reaksiyonları, sürekli travma ile engellendiği zaman, skar dokusu çoğunlukla hipertrofiye uğrar. Bu durum, aterosklerotik plakların gerilemek yerine (vasküler iyileşme yanıtının normal koşullarda gelişmesine izin verildiğinde plaklar geriler) neden büyümeye devam ettiklerini de açıklayabilir (13).

Aterosklerotik süreç belirgin olarak intimada lokalize olmasına rağmen, arter duvarının diğer tabakaları da hastalıktan etkilenir. Plakların arkasındaki media tabakasında, çoğunlukla düz kas hücresi kaybı ile birlikte atrofi görülür. Bu durum, media tabakasındaki hücrelere besin desteğinin azalmasına ve mediyal düz kas hücrelerinin birçoğunun intimaya göç etmiş olduğu gerçeğine bağlı olabilir. Mediyal atrofinin sonucu olarak arter dilate olur. Ancak, son dönemden önce bile, mediyada remodeling oluşur ve plakla uyum sağlamak için damar genişler ve böylece lümenin boyutları korunmuş olur (13).

Ateroskleroz, arterleri düzenli bir şekilde tutmaz, fokal bir hastalıktır. Hastalığın fokal olma özelliği, ateroskleroz gelişmesi açısından, hiperlipidemi, hipertansiyon, sigara ve diyabet gibi çoğu risk faktörlerinin sistemik olması ve arteriyel sistemin tüm bölümlerini benzer şekilde etkileyebilme olasılığı ile ters düşmektedir. Bu durum, sistemik risk faktörlerinin lokal faktörlerle uyum içinde etki etmesi gerektiğini açık bir şekilde göstermektedir. Bu lokal faktörlerden biri, kan akımı tarafından oluşturulan shear stresidir. Aterosklerotik plaklar, arteriyel sistem içinde tesadüfi olarak gelişmezler.

Daha çok lümen yüzeyi ile düşük dansiteli lipoprotein (LDL) gibi kandaki partiküller arasında etkileşim süresinin artmış olduğu, düşük shear stresi bulunan dallanma bölgelerine yakın yerlerde yerleşirler. Bu durum, lipoproteinlerin transendotelyal diffüzyonunda artışla ve hiperlipidemi varlığında, subendotelyal matrikste lipid birikiminde artışla ilişkilidir. Vasküler permeabilite üzerinde etkisi olabilecek diğer bir risk faktörü, homosisteinemidir, çünkü homosisteinin yüksek konsantrasyonları, endotel tabakasındaki hücrelerde hasara neden olabilir (13).

Aterosklerozun klinik semptomları, plak gelişimi ve büyümesinden ziyade, oluşmuş plakların dejenerasyonu ve rüptürü ile ilişkilidir. Lipid birikimi ve fibrozisle birlikte plak gelişimi, nadiren, kan akımını önemli ölçüde sınırlayacak derecede büyük lezyonlara neden

olur (%75'den fazla lümen daralması). Bu durumda bile, koroner arterlerde oluştuğunda, plağın yavaş oluşumu, küçük kollateral damarların oluşması için yeterli zaman sağlamış olur.

2.2.1. Endotel Disfonksiyonu:

Endotelyum insan vücudundaki en büyük organ sistemidir ve tek tabaka özelleşmiş hücrelerden oluşur. Mekanik ve hormonal stimulusları algılama ve bazı fonksiyonları gören vazoaaktif maddeleri salıverme becerisi bulunmaktadır. Bu fonksiyonlar arasında vasküler tonusun idamesi, antitrombolitik ve antienflamatuar süreçler yer almaktadır (27).

Endotel hücre yüzeyinde belli bazı lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonu monositler ve T-hücrelerinin endotele adezyonunu düzenlemektedir. İki geniş lökosit adezyon kategorisi bulunmaktadır. İmmünglobulin üst ailesi üyeleri vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1)'dir (28). Selektinler yaygın bir diğer lökosit adezyon kategorisini oluşturmaktadır. Selektinlerin prototipi olan E-selektinin erken dönem aterogenezele çok az ilgisi vardır. E-selektin tercihen polimorfonükleer lökositleri bir araya toplamaktadır. Nadiren erken dönem ateromlarda saptanmaktadır (29). VCAM-1, ICAM-1 ve selektinler dolaşan inflammatuar hücreleri çeker ve yakalar, bunların subendotelial aralığa göçünü kolaylaştırır.

Normal endotelial hücreler, bu molekülleri taşımazlar ama anormal arteriyal shear stresi, okside olmuş subendotelial lipid ve diyabetik hastalarda arter duvarında ileri glikolizasyon ürünleri, bunların ortaya çıkmasını uyarabilir. Aterosklerozun gelişmesinde selektinler ve adezyon moleküllerinin önemi yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. VCAM-1 ve ICAM-1 endotel disfonksiyonunu belirlemede kullanılan kan parametrelerinden biridir (30).

Damarlar normal şartlarda büyük ölçüde endotelial nitrik oksit sentezi ve salıverilmesine bağlı olarak vazodilatasyon durumundadır. NO, endotelde L-arjinin'den NO sentaz ile üretilir (31). Endotel kaynaklı NO bilinen en potent vazodilatördür (32). NO, vazorelaksasyona neden olur, konstriktif faktörlerin (ET-1 gibi) salınımını, düz kas hücre proliferasyonunu, inflammatuar hücrelerin farklılaşmasını, lökosit adezyonunu, platelet agregasyonunu ve doku faktörü üretimini inhibe eder (33). Bu vazoaaktif, antibüyüme, antiinflammatuar, antitrombotik etkiler sağlam endotel gerektirmektedir (31). NO aktivitesindeki azalma media tabakasında kalınlaşmaya ve/veya myointimal hiperplaziye neden olur, vasküler lezyonların gelişimi hızlanır ve bu da ateroskleroz gelişimine katkıda bulunur (32). Endotel disfonksiyonun da rol alan bir diğer faktör ET-1'dir. ET-1, endotelin polipeptit ailesine ait olan ve vasküler endotel hücreleri tarafından sentez edilen potent bir vazokonstriktör polipeptittir (34). Sağlıklı bireylerde endotel uyarısının baskın etkisi vazodilatasyondur.

Ancak hipertansiyon, DM, dislipidemi, sigara gibi risk faktörleri varlığında endotel kökenli konstriktif ve gevşetici faktörler arasındaki denge bozulur ve endotel disfonksiyonu ile sonuçlanır (35). Endotel disfonksiyonunun karakteristik özelliği antiaterosklerotik molekül olan NO'nun biyoaktivitesindeki azalmadır (36). Endotelyal disfonksiyonda uygunsuz vazokonstriksiyon oluşur. Endotelyal hasar genellikle yüksek shear stres ve yüksek oksidatif stresten kaynaklanır ve oksidatif stres düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonuna yol açar. Bu ürünler anormal NO sentezine ve eş zamanlı olarak vazokonstriksiyon, inflamasyon ve koagülasyonu arttıran maddelerin salıverilmesine sebep olur. İnflamatuvar hücreler okside LDL ile reaksiyon göstererek köpük hücreleri oluştururlar. Bu da endotelyal hücre ölümü ve/veya disfonksiyonu, hücre dışı matriks sindirimi vasküler düz kas proliferasyonuna sebep olur. Endotelyal disfonksiyon daha sonra subklinik ateroskleroza ve nihayetinde akut koroner ve vasküler sendromlara ilerleyebilir.

Endotelyal disfonksiyon genellikle aterosklerotik hastalıktan önce olduğundan endotel disfonksiyonunun erken dönemde belirlenmesi ateroskleroz için yüksek riskli hastalara daha erken tanı konmasını sağlayabilir. Endotel disfonksiyonunun şiddeti ne kadar fazlaysa kardiyovasküler hastalık riski o kadar fazladır. Endotel disfonksiyonu olan hastalarda koroner arterler anjiyografik olarak normal olsa bile miyokard iskemisi gelişebilir (sendrom X) (37).

2.2.2. LDL'nin Oksidasyonu

LDL'nin oksidasyonu, lizofosfatidilkolin gibi modifiye lipidlerin salınımına yol açar. Bu lipid türlerinin bazıları, endotelyum hücrelerini aktive eden sinyal molekülleri olarak rol oynayabilir (38). Bu durum, lökosit adhezyon molekülü olan, VCAM-1'in ekspresyonuna yol açar. VCAM-1, monositler ve T lenfositleri için bir reseptördür (39). LDL'nin oksidasyonu monositler, makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri, fibroblastlar ve düz kas hücrelerinde oluşabilmektedir (40). Okside LDL (Ox-LDL), normal arterlerde bulunmayıp sadece makrofajlarda aterosklerotik lezyonlarda bulunmaktadır. Vasküler hücrelerde oksidatif stres ve süperoksit anyonunun artması LDL'nin Ox-LDL'ye dönüşümünü arttırmaktadır (41).

Günümüzde LDL oksidasyonu ve ateroskleroz arasındaki ilişki, endotelyal hücrelere Ox-LDL aracılı hasar ispatlandığı zaman ilk olarak ortaya çıkmıştır. İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda karotis ve koroner arterlerden alınan aterosklerotik plak örneklerinde Ox-LDL'nin varlığı dikkat çekmiştir. Aterosklerotik lezyonlarda Ox-LDL'nin miktarı ile plazma Ox-LDL arasında da korelasyon olduğu bildirilmiştir (42).

2.2.3. Köpük Hücre Oluşumu:

Makrofaj, aterosklerotik lezyonun oluşmasında çok önemli bir rol oynar. Okside lipoproteinleri içine alma kapasitesi nedeniyle, kolesterolü biriktirir ve lipid dolu köpük

hücresine dönüştürür. Köpük hücresi, aterosklerozun prototip hücresidir. Brown ve Goldstein, makrofajların, önemli miktarda normal, yerli LDL almadığını gözlemişlerdi. Ancak, temizleyici reseptörler yoluyla, büyük miktarlarda okside LDL'i içlerine alabiliyorlardı (43). Bu hücre yüzey reseptörleri, birikmiş negatif yük içeren "makromoleküler şekiller"i tanıyorlardı; böyle şekiller, okside LDL'de bulunurlar, ama bakteri endotoksinleri ve diğer bazı makromoleküllerde de bulunabilirler (44). Böyle ligandlar, temizleyici reseptörlere bağlanırlar, lizozomların içine alınır ve parçalanırlar. Okside LDL'de bulunan kolesterol esterleri, hidrolize olur ve serbest kolesterol sitoplazma içine kaçır. Sitosolik enzimler tarafından yeniden esterifiye olur ve kolesterol ester havuzu, makrofaj içinde, intraselüler damlacıklar oluşturmaya başlar.

Okside LDL'nin alımının devam etmesi ile makrofaj, lipid yüklü köpük hücresine dönüşene kadar, bu lipid damlacıkları birikir. Yağlı çizgilenme, esasen sağlam endotelyumda, köpük hücrelerinin bir miktar T hücresi ve ekstraselüler kolesterolle (büyük ölçüde lipoproteinler) birlikte birikmesidir (45).

2.2.4. Lipid Çekirdeğinin Oluşumu:

Lezyon ilerledikçe hücre dışında da lipid birikmeye başlar. Ekstraselüler lipidin olası iki kaynağı vardır; dolaşımdaki LDL'nin doğrudan doğruya intima tabakasındaki proteoglikanlara bağlanması ya da köpük hücrelerinin ölmesi sonucu depolanmış olan kolesterol esterlerinin açığa çıkmasıdır. Hücre dışı lipidin çoğunluğunun bu ikinci yoldan kaynaklandığı kabul edilmektedir. Sonuçta oluşan lipid çekirdek, intima tabakasının bağ dokusu yapısı içinde kolesterol ve hücre yıkım ürünleri ile dolu boşluklardır. Bu aşamada lipid çekirdeğin üzerinde henüz fibrotik bir tabaka yoktur (46).

2.2.5. Fibröz Kılıf Oluşumu:

Olgunlaşmış aterom plağında lipid çekirdeğinin üstü fibroz bir başlıkla örtülüdür. Fibroz başlık yoğunlukla düz kas hücreleri ve onların ürettiği bağ dokusundan oluşur. Lezyonun yaşı ilerledikçe düz kas hücrelerinin sayısı da artar. Lipid çekirdek ve etrafındaki fibröz başlıktan oluşan ilerlemiş lezyona fibroaterom denir. Lipid çekirdek ve etrafındaki fibröz tabakanın miktarı, plağın zedelenebilirliğini belirler (46).

2.3. Aterosklerozda Risk Faktörleri:

Risk faktörlerinin tanımlanması ve bunların tedavisi asemptomatik kişilerde koroner kalp hastalığı (KKH)'nın önlenmesi (primer koruma) ve KKH belirlenmiş hastalığı olan kişilerde tekrarlayan olayların önlenmesi (sekonder korunma) için gereklidir.

2.3.1.Modifiye Edilemeyen Faktörler:

Modifiye edilemeyen risk faktörleri; yaş, cinsiyet, aile öyküsüdür. Ailede erken başlangıçlı KAH öyküsünün, bir sonraki nesilde yüksek riskle ilişkili olduğu, iyi bilinmektedir. Bu ilişki, ailede etkilenen kişi sayısı ile ifade edildiği için, şaşırtıcı şekilde sağlamdır. Yaşamın erken döneminde paylaşılan ortamı veya ortak genleri ne derecede yansıttığı, tam olarak belirgin değildir (47).

Cinsiyetin erkek olması birçok çalışmada başlı başına bir risk olarak belirlemektedir. Aterosklerotik damar hastalığı erkeklerde 10-20 yıl daha erken başlamakta olup sıklığı kadınlardan 3-6 kat daha fazladır. Erkeklerde 45 yaş ve üstünde, kadınlarda 55 yaş ve üstünde olmak çoğu çalışmada ateroskleroz gelişimi için önemli bir risk olarak görülmektedir.

2.3.2.Modifiye Edilebilir Faktörler:

2.3.2.1.Dislipidemi:

Yüksek serum total kolesterol (TK) ve LDL kolesterol düzeyleri ile düşük HDL kolesterol düzeyi KAH için bağımsız risk faktörüdürler (48). Kanıtlar, LDL kolesterolün primer aterojenik faktör olduğunu desteklemekte olup, kılavuzlar lipid düşürücü tedavide LDL kolesterolü primer hedef olarak göstermektedir (49). Lipoproteinlerin çeşitli reseptörler vasıtası ile dolaşımdan, vücut sıvılarından ve interstisyel boşluklardan alınmalarından sonra, içerdikleri kolesterol ve triaçilgliseroller (trigliseridler) farklı yollarla metabolize olurlar. Triaçilgliseroller adipoz ve kas dokularına taşınarak yağ asitleri olarak depolanır veya enerji üretimi için okside olurlar. Kolesterol ise karaciğer, barsak ve diğer ekstrahepatik dokular arasında devamlı olarak taşınır (50).

Yüksek LDL kolesterol seviyeleri, aterosklerozun tüm evrelerinde rol almaktadır. Plazmada yüksek LDL kolesterol seviyelerinin mevcudiyeti, LDL partiküllerinin arter duvarında oksidasyonuna ve çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin sekresyonuna neden olur (51). Bu olayların sonucunda okside LDL tarafından endotel hücre fonksiyonları bozulmaktadır. Serum kolesterol seviyeleri ile KAH riski arasındaki ilişki doğrusal olup, kolesterol düşürücü tedavinin KAH riskini azalttığını gösterilmiştir. Güçlü LDL düşürücü ajanlar olan statinler ile yapılan çalışmaların sonucunda, LDL kolesterol düzeyinin düşürülmesi ile majör koroner olaylarda belirgin bir azalma gözlenmiştir (52).

Düşük plazma HDL kolesterol düzeyleri ile koroner olay gelişme riski arasında da güçlü bir ilişki olup, HDL kolesterolde ortalama 1 mg/dl düşme, KAH riskini %2-3 artırmaktadır (53). Genetik faktörler, yaşam tarzı, sigara, fiziksel inaktivite ve obeziteye yol açan aşırı kalori alımı düşük HDL kolesterol düzeyleriyle ilişkilidir (54). Bunların yanı sıra beta blokörler, anabolik steroidler ve progestasyonel ajanlar gibi ilaçlar da HDL kolesterolü

düşürmektedir. Nikotinik asit, fibratlar ve statinler ise HDL kolesterol düzeyini yükseltmektedirler (55).

Son meta-analizler trigliserid yüksekliğinin koroner kalp hastalığı için bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur. Obezite ve kilo fazlalığı, fizik aktivite azlığı, aşırı alkol alımı, aşırı karbonhidratlı beslenme (toplam enerji tüketiminin %60'ından fazlası), diyabet, kronik böbrek yetersizliği, nefrotik sendrom gibi hastalıklar, kortikosteroidler, östrojenler, retinoidler, yüksek doz beta bloker gibi ilaçlar ve ailevi kombine hiperlipidemi, ailevi hipertrigliseridemi, ailevi disbetalipoproteinemi gibi genetik bozukluklar trigliserid (TG) yüksekliğine neden olurlar. Trigliserid yüksekliği sıklıkla metabolik sendromun bir ögesi olarak karşımıza çıkar.

2.3.2.2.Sigara:

Sigara tüketimi koroner arter hastalığı açısından tek, en önemli değiştirilebilir risk faktörüdür. Sigara içimi kardiyovasküler hastalık riskini iki kat artırmaktadır. İçilen sigara miktarı ile bu risk doğrusal olarak artmaktadır. Sigara içenlerde miyokard infarktüsü ve kardiyak ölüm riski, içmeyenlere göre erkeklerde 2.7, kadınlarda 4.7 kat daha fazla bulunmuştur (56). Aktif sigara içiciliğinin yanı sıra sigara dumanına çevresel olarak maruz kalma veya pasif içicilik de değiştirilebilir bir risk faktörü olarak saptanmıştır. Pasif sigara içiciliği de koroner dolaşımda endotel disfonksiyonuna neden olabilmektedir (57). Yapılan bir meta-analizde sigara içmeyen bir kişinin, sigara dumanına pasif maruz kalmasının kardiyak riski %20-30 artırdığı gösterilmiştir. Sigara içimi HDL kolesterol düzeyini düşürmekte ve LDL kolesterolün oksidasyonunu artırmakta, trombosit agregasyonunda artışa ve arter endotelinin hasarına yol açmaktadır. Sigara içenlerde kanın fibrinojen düzeyinin ve viskozitesinin arttığı gösterilmiştir.

2.3.2.3.Hipertansiyon:

Hipertansiyon koroner kalp hastalığı için çok önemli bir risk faktörüdür. Bütün aterosklerotik kardiyovasküler olayların %35'inden hipertansiyon sorumludur. Koroner kalp hastalığı, hipertansiflerde normotansiflere göre 2-3 kat daha fazladır (58). Hipertansiyon, kadın ve erkekte, akut miyokard infarktüsü riskini 2-3 misli artırmaktadır. Diyastolik kan basıncında 15 mmHg veya sistolik kan basıncında 25 mmHg'lık yükselme reinfarktüs riskini sırasıyla %40 ve %37 artırmaktadır (59) ve bu durum diğer risk faktörlerinden bağımsızdır.

Kardiyovasküler risk açısından daha önceki yıllarda bilinenin aksine sistolik kan basıncı ve nabız basıncı, diyastolik kan basıncı kadar önemlidir. Artık izole sistolik hipertansiyonun da toplam kardiyovasküler mortalite ve inme sonuçları açısından diyastolik kan basıncı kadar önemli olduğu bilinmekte ve etkili şekilde tedavisi önerilmektedir (60).

Yine sistolik ve diyastolik kan basıncı arasındaki fark olarak tanımlanan nabız basıncı da kardiyovasküler olay açısından artmış riskle ilişkilidir (61). Hipertansiyonda koroner kalp hastalığı riskinin arttığını gösteren etkenler şunlardır; nabız basıncında artış, mikroalbuminüri (günde 30-300 mg), hiperürisemi, sol ventrikül hipertrofisi, dislipidemi, diyabet, obezitenin varlığı ve C-reaktif protein yüksekliği.

2.3.2.4.Diyabet:

DM, KAH için bağımsız bir risk faktörü olup, erkek ve kadında KAH riskini sırası ile iki ile dört kat artırmaktadır (62). MI hikayesi olmayan diyabetik hastaların koroner mortalite riski, MI geçirmiş diyabetik olmayan hastaların riski ile aynıdır (63). Tip II DM' li hastalarda insülin rezistansı ile birlikte görülen ve diyabetik dislipidemi olarak bilinen anormal bir lipoprotein profili mevcuttur. Bu hastalarda yüksek LDL kolesterol, düşük HDL kolesterol ve artmış TG düzeyleri ile ilişkili bozuk bir lipoprotein profili mevcuttur (64).

Diyabet'in birkaç mekanizma ile ateroskleroza yol açtığı bilinmektedir. Diyabette de sık rastlanan hipertrigliseridemi ve düşük HDL örüntüsü, bazı büyüme faktörleri ve hiperinsülineminin aterogeneze rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca diyabetik hastalarda tromboza eğilim de vardır. DM'de LDLK düzeyi normal olabilir, fakat küçük yoğun LDLK yüksek olabilir. Ayrıca lipoproteinler glikolize olabilir ve bu da fonksiyonlarında anormalliklere yol açar. DM'li hastaların sonuçta %80'inde koroner ateroskleroz gelişmektedir. Bunun ötesinde, kalp ve damar hastalık riskinin klinik diyabet ortaya çıkmadan çok önce arttığı gösterilmiştir. Benzer biçimde, metabolik sendrom ve insülin direnci de majör kalp damar hastalığı risk faktörlerinden biridir. Diyabetik hastalarda koroner olayların çok sık görülmesi ve bu hastaların lezyonlarının yaygınlığı nedeniyle, DM artık kanıtlanmış koroner arter hastalığına eşit derecede riskli kabul edilmektedir. Diyabetik hastalarda mikroalbuminüri derecesinde nefropati bulunması risk oranını daha fazla artırır. Diyabetik hastalarda inme ve periferik damar hastalığı görülme sıklıkları da anlamlı derecede artmıştır (65).

Diyabetik hastalarda uzun dönemde koroner arter hastalığı riskinin azaltılması için mevcut risk faktörlerine müdahale gereklidir. Bu hastalarda sıklıkla eşlik eden obezite, hipertansiyon ve dislipidemi söz konusudur.

2.3.2.5.Sedanter Yaşam Tarzı:

Düzenli egzersiz miyokardın oksijen gereksinimini azaltır ve egzersiz kapasitesini artırır. Egzersiz yağlanmayı engelleyerek, DM insidansı ve kan basıncını düşürerek vasküler enflamasyon ve dislipidemi üzerine olumlu etkiler göstererek kalbi korur. Egzersizin kalbi koruyucu etkileri; vücuttaki yağlanmayı, diyabet insidansını, kan basıncını azaltması; vasküler

enflamasyon ve dislipidemi üzerine olumlu etkiler göstermesidir. Egzersiz ayrıca endotel hücre fonksiyon bozukluğunu iyileştirir; insulin duyarlılığını ve endojen fibrinolizi artırır.

Egzersizle ilgili güncel öneri, şiddetli fiziksel aktiviteden ziyade, orta düzeyde fiziksel aktiviteyi vurgular ve haftanın çoğu günlerinde, 30 dakikalık orta düzeyde aktiviteyi hedefler (66). Aktivite epizodları, en az 10 dakika sürmelidir. Amaç, aşırı bir kardiyorespiratuvar form sağlamak değil, aktif bir yaşam tarzı edinmek ve bunu idame ettirmektir. Düzenli fizik aktivite, ağırlığı kontrol etme özelliğine ek olarak, HDL kolesterolü yükseltir ve kemik kitlesi ve formunu korumaya yardımcı olur. Minör anksiyete ve depresyona karşı koruyucu olduğuna dair bulgular da vardır. Egzersiz kişinin kendini iyi hissettiği zamanlarda, açken veya yemekten iki saat sonra, yeterli sıvı alınarak, çok sıcak, nemli ve aşırı güneşli olmayan ortamda, rahat elbise ve ayakkabı ile yapılmalı, yavaş başlamalı ve yavaş sonlandırılmalıdır. Aşırı yorgunluk, göğüste baskı, ağrı ve benzeri rahatsızlık, nefes darlığı, kas, iskelet ve eklem ağrısı gibi yakınmalar ortaya çıktığında egzersize devam etmemeli ve doktora başvurulmalıdır (66).

2.3.2.6.Obezite:

Obezite ölçütü olarak kullanılan vücut kitle indeksi (VKİ) [ağırlık (kilo)/boy'un(m) karesi] ölçütüyle Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan sınıflamada VKİ:18.5-24.9 normal, 25-29.9 kilo fazlalığı, ≥ 30 obezite, ≥ 40 kg/m² ileri derecede obezite olarak tanımlanmaktadır (67). Obezite genel mortalitede de artışa yol açmaktadır. Tip 2 diyabeti olan olguların %67'sinde VKİ'nin kilo fazlalığı, yarısında ise obezite sınırlarında olduğu saptanmıştır. Eşlik eden metabolik anormallikler obezitenin derecesi ve süresi ile artmaktadır. Obez bireylerde CRP ve lipoprotein (a) düzeylerinin de yüksek olduğu gösterilmiştir (68).

Obeziteyi diğer koroner risk faktörlerinden ayıran başlıca özellik, bağımsız bir risk faktörü oluşu yanında hipertansiyon, hiperkolesterolemi, düşük HDL kolesterol, hipertrigliseridemi ve tip II DM gibi diğer birçok risk faktörüyle birliktelik göstermesidir. Obezite ile koroner arter hastalığı riski arasında doğrusal bir ilişki bulunduğu ve erişkin çağında orta derecede kilo alımının KAH riskini arttırdığı bilinmektedir.

2.3.3. Yeni Kardiyovasküler Risk Faktörleri:

2.3.3.1. Homosistein:

Homosistein diyetle bulunmayan nonesansiyel bir aminoasittir. Diyetle alınan metionin hücre boşluğunda vitamin B6 ve B12 ko-faktörlüğü ile homosisteine dönüştürülür. Artmış homosistein seviyelerinin düz kas hücre proliferasyonu ve endotel hasarı veya disfonksiyonu yoluyla ateroskleroza neden olduğuna inanılır (69-71). Artmış homosisteinin endotel disfonksiyonu, LDL kolesterolün artmış oksidasyonu, arteriyel vazodilatasyonun bozulması,

artmış trombosit aktivasyonu, inflamasyona yol açan interlökin 8 miktarının artması ve artmış oksidatif stres gibi olumsuz etkileri mevcuttur (60).

2.3.3.2. İnflamatuvar Belirteçler:

Kardiyovasküler riski belirleme yönünden en çok incelenen inflamatuvar markırlar CRP ve fibrinojen'dir. C-reaktif protein, karaciğerde üretilen bir akut faz proteindir ve protein inflamasyonun spesifik olmayan bir biyokimyasal belirteçidir. Düzeyi akut inflamatuvar durumlarda veya doku hasarında geçici olarak 1000 kata kadar artmakta, kronik inflamatuvar olaylarda ise sürekli yüksek değerler izlenmektedir. Birçok çalışmada, CRP ve diğer inflamasyon belirteçlerinde yükselme ile seyreden kronik inflamatuvar ve otoimmün olaylarda kardiyovasküler riskin de arttığı görülmüştür. Fonksiyonel olarak CRP, vasküler hastalığın ilerlemesini de etkilemektedir. C-reaktif proteinin inflamatuvar reaksiyonda birçok olayı aktive ettiği in vitro çalışmalar ile gösterilmiştir. İnflamasyonun basit bir belirteci olmaktan çok daha fazlası olarak CRP, lokal adhezyon moleküllerinin ekspresyonunun artması, endotel nitrik oksit biyoaktivitesinin azalması, makrofajlar tarafından LDL alımını etkilenmesi gibi çok sayıda mekanizma üzerinden damarın zedelenebilirliğini etkileyebilmektedir (72). CRP' nin yüksek duyarlılık analiz ile ölçüldüğünde (Hs CRP) kişilerde; MI, inme, PAH ve ani ölüm riski ile bağımsız olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir (73). Artmış Hs CRP düzeyi tekrarlayan koroner olaylar, anjiyoplasti sonrası trombotik olaylar, kararsız angina pectoris ve koroner bypass sonrası kötü prognozla ilişkilidir (74).

Fibrinojen, CRP gibi bir akut faz reaktanıdır. Fibrinojen karaciğerde sentezlenen bir glikoproteindir. Trombin gibi pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu, trombosit agregasyonu ve düz kas hücre proliferasyonunu stimüle eder (75). Hipertansiyon, diyabet, sigara, obezite, hiperlipidemi ve menopoz gibi risk faktörleri yüksek fibrinojen düzeyleri ilişkili bulunurken egzersiz, hormon replasman tedavisi ve yüksek HDL kolesterol durumunda fibrinojen düzeyleri düşük bulunmuştur (76). CRP ile karşılaştırıldığında öngörücü değerinin daha kısıtlı olması nedeniyle fibrinojen düzeyi ölçümü klinikte sınırlı olarak kullanılmaktadır. Yine fibrinojen düzeyi kişiler arasında CRP' den daha geniş bir aralıkta değişiklik göstermektedir.

2.3.3.3. Lipoprotein (a):

Lp (a) disülfid bağı ile apoprotein a polipeptid zincirine bağlanmış olan LDL partikülünden oluşmaktadır. Lp (a) plazminojen için yarışmalı bir inhibitör olup endojen fibrinolizisi baskıladığı öne sürülmüştür. Lp (a) seviyelerinin yüksek bulunması; Kardiyovasküler hastalık, miyokard infarktüsü, beyin damar hastalığı, periferik damar hastalığı, balon anjiyoplasti sonrası restenoz veya safen ven bypas greft operasyonu sonrası restenoz arasında bağımsız bir ilişki olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (77).

Yeni risk faktörleri içerisinde Hs CRP, en yüksek öngörüsüne değere sahiptir. Homosistein, fibrinojen ve lipoprotein (a)'nın aksine Hs CRP global risk öngörüsüne prognoza ilişkin verilerde eklemektedir (60).

2.3.3.4. Enfeksiyon Ajanları:

Hem virüslerin hem de bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların aterosklerotik plakların ilerlemesinde rol aldıkları düşünülmektedir. Özellikle Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, herpes simplex virus (HSV), Cytomegalo virus (CMV) ve Coxsaki virüsler başlıca suçlanan patojenlerdir.

2.3.4. Aterosklerotik Lezyonların Sınıflaması

2.3.4.1. Klasik Sınıflama:

a-Yağlı çizgi, on yaşın altındaki bir çocukta bile rastlanabilen bu lezyonlar makroskopik olarak kan akımına paralel sarı çizgiler şeklinde görülür. Temel olarak intima birikmiş yağ damlacıklarıyla yüklü makrofajlardan oluşur. Bu lezyonların bir kısmı aynı kalır ve hatta ilerlerken, damar yatağının ateroskleroza yatkın bölgelerindekiler uygun koşulların varlığında ileri evre lezyonlara dönüşürler.

b-Yaygın intima kalınlaşması, intimada, bağ dokusu içinde çok sayıda DKH'lerden oluşan bir yapıdır. Makrofajlar, T-lenfositler ve hücre dışı lipid birikintileri öbür elementleridir.

c-Fibröz plak, makroskopik olarak beyaz renkte ve genellikle damar yüzeyinden kabarıktır. Eğer lümen çapı kritik düzeyde daralmışsa klinik bulgular ortaya çıkar. İntima matriksi içinde çok sayıda DKH, çeşitli miktarlarda makrofaj ve T-lenfositlerinin yanı sıra hücre içi ve hücre dışı lipid birikiminden oluşur. Tipik olarak fibröz plak, çok yoğun bağ dokusundan oluşan bir fibröz başlık ile örtülüdür. Bu lezyona kanama, tromboz ve/veya kalsifikasyon eklendiğinde komplike lezyondan söz edilir (78).

2.3.4.2. Amerikan Kalp Birliği (AHA) Sınıflaması:

Koroner aterosklerotik plakların gelişimi stabil değildir, her yağlı çizgilenme ileri lezyona dönüşmez ancak bir kısmının ileri lezyonlara değiştiği gösterilmiş. AHA damar lezyonları komitesi, lezyonun ilerleme sürecini sekiz değişik safhaya ayıran yeni bir sınıflama önermiştir.(79)

Tip I lezyon: En erken lezyondur. Minör lipid birikimleri ve seyrek makrofaj köpük hücreleri ile karakterizedir.

Tip II lezyon: makrofoj köpük hücreleri daha fazla sayıdadır ve klasik olarak yağlı çizgilenmeler şeklinde organize olmuştur. Bu lezyonlarda az miktarda T hücreleri, mast hücreleri ve lipid dolu düz kas hücreleri de vardır.

Tip III lezyon: Klasik patoloji tarafından, aterosklerotik plak veya aterom olarak tanımlanan ilk safhayı yansıtır. Tip II den ayırt edici özelliği küçük ekstrasellüler lipit depozitlerinin varlığıdır.

Tip IV lezyon: Bu grupta ekstrasellüler lipit miktarı artmış ve hücreden yoksun bir kolestrerol depozit havuzu oluşmuştur. Lipit çekirdeği, enflamatuar hücreler tarafından çevrelenmiş ve ince bir düz kas hücre tabakası ve bağ dokusu tarafından kaplanmıştır. Bu lezyonlar genelde yarım ay şeklindedir ve damar duvarının kalınlığını artırır. Bu safhada orijinal lümen hacmini korumak için arterlerde yeniden yapılanma olur. Tip IV lezyonlar genellikle klinik olarak sessiz olmasına rağmen İVUS, MR, MSCT vb ile bu lezyonların tanınması önemli olacaktır. Çünkü bunların hızla semptom oluşturan yırtılmalara yol açma durumu vardır.

Tip V lezyon: Lipit çekirdeğini kaplayan fibröz dokuda artış ile karakterizedir. Bu fibrozis proliferen olan ve kollojen ve proteoglikanlar gibi ekstrasellüler matrix proteinlerini salgılayan düz kas hücreleri tarafından oluşturulur. Kollojen çoğu zaman tip V lezyonların önde gelen özelliğidir. Tip V lezyonlar çoğunlukla çok büyüktür ve bu nedenle arterde remodeling ile kompanzasyon gerçekleşemez sonuçta lümen darılır. Tip V lezyon Tip IV lezyona göre daha fazla fibröz doku içermelerine rağmen yırtılmaların çoğu halen bu lezyonda olmaktadır. Tip V lezyonlar genellikle lümeni istila ettiği ve laminer kan akımını bozduğu için gerilim kuvvetlerine daha fazla maruz kalır.

Tip VI: Trombotik depozitler veya kanama içeren plaklardır. Bu lezyonların gelişmesinin temel nedeni plak yırtılmasıdır ve sub endotelial fibröz dokuda fissürler, erozyon ve ülserasyonlar sık olarak gözlenir. Akut myokard infarktüsü ve kararsız anjina gibi klinik olaylar birkaç istisna dışında tip VI lezyonlara bağlıdır. Tip VI lezyon gelişmesi klinik semptomlar olmaksızın gerçekleşebilir. Koroner ateroskleroza olup non kardiyak nedenlere bağlı olarak ölen kişilerin otopsi incelemelerinde HT ve DM olanların %16 sında ve bu faktörleri olmayanların %8 inde yeni gelişmiş plak içi trombüs olduğu gösterilmiştir. Yırtılmış plak üzerindeki trombüsün çoğu fibrinolitik tarafından uzaklaştırılabilir ama materyalin bir kısmı plağın içine girebilir. Bu süreç anjiyografi ile görülen hızlı plak ilerleyişi vakalarının çoğundan sorumludur. Trombotik materyal yavaş yavaş düz kas hücreleri tarafından kolonize olur ve bu hücreler trombotik materyali fibröz dokuya dönüştürür. Bu iyileşme sürecinin sonucu olarak lezyon tip V morfolojisine geri döner.

Tip VII ve VIII lezyonlar lipit içermeyen veya az miktarda lipit içeren, kalsiyum depozit kitleleri içeren (Tip VII lezyonlar) veya ön planda kollojenden oluşan (Tip VIII lezyonlar) ilerlemiş lezyonlardır. Bu lezyonların hastalığın son safhasını yansıttığına inanılmaktadır. Plak kalsifikasyonunun klinik önemi belirgin değildir ama lezyonları daha az elastik ve

gerilim kuvvetlerine karşı daha duyarlı hale getirir. Tip VIII lezyonlar tip IV, tip V lezyonlara göre daha stabildir.

2.3.5. Plağın Yapısı ve Klinik Tablo Arasındaki İlişki

2.3.5.1. Kararlı (Stabil) Aterosklerotik Plak:

Komplike olma riski düşük olan plaklar kararlı plak olarak nitelendirilir. Kararlı plakta baskın yapı fibröz başlıktır. Kalın bir fibröz başlığa karşılık, lezyon hacminin en fazla %40'ını oluşturan lipit çekirdek vardır; DKH ve kollojen bakımından zengin, inflamasyon hücresi bakımından fakirdir. Düz kas hücreleri, plağın mekanik gücünü arttırmakla kalmayıp, proliferasyon olarak ve kollojen salgılayarak hasarlanmış plağın onarılmasını da sağlarlar. Kararlı aterosklerotik plağı lümeninde kritik düzeyde daralma yapacak kadar büyür ise oluşturacağı klinik tablo kararlı angina pectoristir.

2.3.5.2. Kararsız (Anstabil) Aterosklerotik Plak:

Kolay hasar görebilecek, komplikasyon riski yüksek plaklar kararsız plak olarak nitelendirilirler. Kararlı plağın aksine; kollojen içeriği azalmış ince bir fibröz başlık, plak hacminin %40'ından fazlasını oluşturan lipit çekirdek, çok sayıda inflamasyon hücresine karşılık az sayıda DKH içerir. Tip IV ve V lezyonlar, AHA sınıflamasına göre kararsız plaklardır. Kararsız plaklar bütün aterosklerotik plakların %10-20'sini oluştururken, AKS'lerin %80-90'ından sorumludurlar. Kararsız plakların hasarlanmaya en açık bölgeleri, omuz bölgeleri diye nitelendirilen, fibröz başlığın damar duvarı ile birleştiği bölgelerdir. İnflamasyon hücreleri en yoğun olarak buralarda birikmiştir. Proinflamatuvar sitokinler, lipidler, antijenler ve mikroorganizmalar inflamatuvar hücreleri aktive eder. Bir yandan MMPs fibröz başlığı parçalarken, öte yandan sitokinler (interferon- γ ve TNF- α) DKH'ların proliferasyonu ve sentezini inhibe ettiğinden plağın onarım mekanizması da bozulmuş olur. Neticede zayıflayan fibröz başlık mekanik streslere (kan pulsasyonu gibi) karşı dirençsiz hale gelir. Fibröz başlığın hasarlanması sonucunda subendotel dokudaki adeziv ve prokoagülan maddeler, kan elemanları ve pıhtılaşma faktörleri ile karşılaşarak trombus oluşumunu tetiklerler. Bu da AKS'nin gelişmesine yol açar. Bir aterosklerotik plağın komplike olması için koroner arteri kritik düzeyde daraltması gerekmez. Miyokard iskemisine neden olmayacak kadar küçük plaklar da, eğer kararsız özelliklere sahipse, zedelenerek AKS'ye yol açabilirler (80).

2.3.6. Koroner Arter Hastalığının Tanısı

Koroner arter hastalıklarından korunma yöntemlerinin yanısıra doğru tanı ve tedavinin uygulanması da çok önemlidir. Girişimsel olan ve olmayan çok sayıda tanı yöntemi olmakla beraber, koroner anjiyografi bizim için altın standart olmaya devam etmektedir.

2.3.6.1.Koroner Arter Hastalığının Girişimsel Olmayan Tanısı:

Egzersiz elektrokardiyografi stres testi; Gerek KAH tanısı, gerekse prognoz ve revaskülarizasyon sonrası değerlendirme amacıyla uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Uygun hastalarda çok güvenli bir prosedürdür. Ortalama duyarlılık %70, özgüllük ise %75 dolayındadır. Miyokard perfüzyon tek foton emisyon kompütarize tomografi; Talyum-201 ya da teknesyum-99m işaretli maddelerden birisi (sestamibi, tetrafosmin) ile tek foton emisyon kompütarize tomografi kullanılarak miyokard perfüzyonunun görüntülenmesi, göğüs ağrısıyla gelen hastalarda KAH'ın saptanması ve kronik KAH olan yada yeni MI geçiren hastalarda risk değerlendirilmesi amacıyla en sık kullanılan radyonüklid görüntüleme tekniği olarak ortaya çıkmıştır. İşlemin duyarlılığı %98, özgüllüğü ise %93 dolayındadır. En önemli avantajı miyokardiyal canlılık hakkında bilgi vermesidir.

Egzersiz radyonüklid ventrikülografi; Stres koşullarında global ve bölgesel ventrikül fonksiyonunun değerlendirilmesi, KAH'ı saptamak ve sonlanımı değerlendirmek için miyokard perfüzyon sintigrafisine bir alternatiftir. Ancak duyarlılığı ve özgüllüğü daha düşüktür. Bu nedenle çok tercih edilen bir yöntem değildir.

Ekokardiyografi; istirahat ekokardiyografisi sol ventrikül segment hareketleri, sistolik ve diastolik disfonksiyon varlığı, geçirilmiş MI varlığında anevrizma yada trombus mevcudiyeti ve MI'nın mekanik komplikasyonlarının varlığı hakkında bilgi verir.

Elektron ışını kompütarize tomografi: koroner arter duvarındaki kalsiyum, koroner ateroskleroz için duyarlı ve özgül bir belirteçtir. Semptomatik ya da asemptomatik hastalarda EBCT görüntüleme bilgisi kullanılarak, aterosklerotik olay riskini saptamak için koroner arter kalsiyum skoru geliştirilmiştir. Koroner arter kalsiyum skoru yüksek olan hastalarda koroner olay insidansının yüksek olduğu belirtilmiştir. Yaygın kullanımı için daha geniş klinik deneyimlere ihtiyaç vardır.

Kardiyak magnetik rezonans görüntüleme, kardiyovasküler morfoloji, fonksiyon, perfüzyon ve canlılığı değerlendirmede çok değerli bir yöntem olma potansiyeline sahiptir. Hatta koroner damarların görüntülenmesi bile mümkün olabilmektedir.

Kardiyak MR, istirahathte bölgesel duvar hareketi, global sol ventrikül fonksiyonu, miyokardiyal perfüzyon, canlılık, metabolizma ve KAH hakkında çok değerli bilgiler vermektedir. Bazı çalışmalarda duyarlılık %81, özgüllük %99 olarak gösterilmiştir ancak bu yöntem daha geniş tecrübelerle ihtiyaç duymaktadır.

2.3.6.2 Koroner Arter Hastalığının Girişimsel Tanısı:

Koroner anjiyografi; Bir takım kısıtlılıklarına rağmen günümüzde halen KAH tanısı için altın standart olarak kabul edilmektedir. Tıkalı KAH için kesin tanı konulmasında yararlı bir prosedürdür. Kabul edilebilir bir komplikasyon oranına sahiptir. Bu komplikasyonlar inme, akut MI, böbrek yetersizliği, allerjik reaksiyonlar, periferik damar yaralanmaları ve ölümdür. Koroner anjiyografi damarlardaki darlığın derecesi ve lokalizasyonunu göstermektedir. Ancak anjiyografik görüntülerin değerlendirilmesinde önemli ölçüde gözlemciler arası uyumsuzluk izlenmektedir. Yüksek maliyetinden dolayı her göğüs ağrılı hastaya kesin tanı amacıyla rutin olarak yapılması önerilmez. Öncelikle girişimsel olmayan testler düşünülmelidir.

Sol ventrikülografi; Sol ventrikül sistolik fonksiyonları, segment hareketleri ve kapak yetersizlikleri hakkında fikir verir.

Koroner anjiyoskopi; Küçük fiberoptik endoskoplar kullanılarak koroner arter lümeni içerisinde direkt olarak görsel inceleme yapma metodudur. Kan, distalde tuzlu su püskürten proksimal oklüzyon balonuyla görüntü alanından uzaklaştırılır. Bu yöntem aterosklerotik plaklarla ilgili patofizyolojik bilgiler sağlamıştır ancak rutin kullanımda sabit bir yer elde edememiştir.

İntravasküler ultrasonografi (IVUS); Kateter uçlu iki boyutlu bir ultrason probu kullanılarak yapılan girişimsel bir işlemdir. Arter lümeni ve duvarını aynı anda gösterir. Şüpheli bir lezyonun ve çevresinin çok açık olarak görüntülenmesini, koroner anjiyografik olarak saptanamayan lokal hastalığın yada intimal diseksiyonların tanınmasını ve arteriyel duvar yada plak içerisinde kalsifikasyonun saptanmasını sağlar. Tedavinin seçimini etkileyebilir. Rutin olarak kullanılmayan pahalı bir işlemdir. Daha çok çalışma amaçlı kullanılmaktadır (81).

2.3.6.3. Aterosklerotik Koroner Arter Hastalıklarında Tedavi Yaklaşımları

Koroner arter hastalığının tedavisinde medikal yaklaşım yanında girişimsel perkütan koroner müdahale (PCI) yöntemleri ve Aortokoroner By-Pass Greftleme (ACBG) cerrahisi uzun yıllardan beri kullanılmaktadır.

Farmakolojik tedavide aspirin, nitratlar, beta blokerler, kalsiyum kanal blokerleri (bazı hastalarda), anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri gibi ilaçlarla beraber kişide

bulunan risk faktörlerinin düzeltilmesine (lipid düşürücü tedavi, HT ve DM kontrolü) yönelik tedavi de önerilmektedir.

Girişimsel tedavi yaklaşımlarında Perkutan Transluminal Koroner Anjioplasti (PTCA), İntrakoroner stentler ve Aortokoroner By-Pass Greftleme (ACBG) cerrahisi gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Koroner arter hastalığında tedavinin amacı, semptomları gidererek yaşam kalitesini artırma yanında, MI ve MI'ya bağlı ölümleri önlemektir. Yaşam tarzı değişiklikleri ve bazı ilaçlar her iki amaca da hizmet eder. Bazı durumlarda revaskülarizasyon gibi girişimlere de ihtiyaç duyulabilir. Aterosklerotik risk faktörlerini araştırma, değiştirilebilir risk faktörlerini değiştirmeye yönelik çabalar ve prognozu etkileyecek yaşam tarzı değişikliklerini içeren genel tedbirler tedavinin önemli bir bölümüdür (82).

2.4. Koroner Arter Kalsifikasyonu (KAK)

2.4.1. Patofizyoloji

Koroner arterlerde kalsifikasyona neden olan mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Aterosklerotik kalsifikasyon kemik formasyonu gibi organize, düzenli ve çoğunlukla sadece ateroskleroz varlığında gözlenir. Matriks Gla(gama karboxi glutamat)-cointaining protein, osteokalsin benzeri bir protein olup kalsiyumun damar duvarına transportuna neden olur. Koroner kalsifikasyon patogenezinde anahtar rol oynadığı düşünülmüyor.(83–84)

Osteopontin ve buna ait m-RNA kemik mineralizasyonundan biliniyor. Bu elemanlar kalsifik aterosklerotik lezyonda da tanımlanmıştır.(91–92) Yine kalsifiye insan aterosklerotik plağında kemik morfogenetik protein 2a mRNA içerdiği gösterilmiştir. Bu hücreler osteoblastik diferansiyasyon gösterebiliyor.

Giachelli ve arkadaşları (87) immünohistokimyasal ve insitu hibridizasyon ile medial düz kas hücreleri injuriye uğramamış ratlarda osteopontin mRNA düzeyi daha düşük iken, injury gelişen ratlarda arterlerde zamana bağlı olarak osteopontin ve mRNA düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte fibroblast growth faktör, transforming growth faktör B ve anjiyotensin II ekspresyonu da injury gelişen damarda arttığı gösterilmiş.

Bu ve diğer yakın zamanlı bulgular koroner kalsifikasyonun kalsiyum fosfat kristallerinin neden olduğu pasif birikimden ziyade aktif bir olay olduğunu göstermektedir. (89–90)

2.4.2 Epidemiyoloji

Erken aterosklerozda 2–3.dekatta küçük miktarda kalsifikasyon görülür ileri yaşla birlikte ateroskleroz ilerlemesi ile birlikte kalsifikasyonda artar.

Koroner kalsifikasyon varlığının ateroskleroz ile korele olduğunun gösterilmesine karşın çalışmalarda aterosklerozun %50 sinin 20–29 yaş arası görüldüğü,%80 ninin 30–39 yaş arası görüldüğü; buna karşın koroner kalsifikasyonun %50 sinin 40–49 yaş arası ,%80 ninin 60–69 yaş arası mevcut olduğunu gösteriyor.

Koroner kalsifikasyon için en önemli iki risk faktörü yaş ve cinsiyettir.

- <40 yaş her iki grupta koroner kalsifikasyon oranı %14 iken
- >70 yaş erkek grubunda %93–100 oranında
- >70 yaş bayan grubunda %77–100 oranında koroner kalsifikasyon görülür.

Farklı çalışma ve hasta gruplarında yapılan çalışmalarda aşağıdaki risk faktörleri ile koroner kalsifikasyon arasında ilişki gösterilmiştir:

- Düşük HDL düzeyi
- Sigara
- Trigliserid yüksekliği
- Obesite
- Kan basıncı yüksekliği
- Diyabetes mellitus
- Risk faktörü sayısı ile

Risk faktörleri ile koroner kalsiyum varlığı arasındaki ilişki araştırılırken plazma kolesterol düzeyi ile koroner kalsiyum varlığı arasında tutarlı bir ilişki gösterilmiştir .(91–94)

Yapılan bir çalışmada koroner kalsiyumun önemli koroner stenoz göstermede marker olarak kullanılması ile sensitivitesi %25–78 arasında değişirken, spesifitesi %83–100 olarak belirlendi. (95)

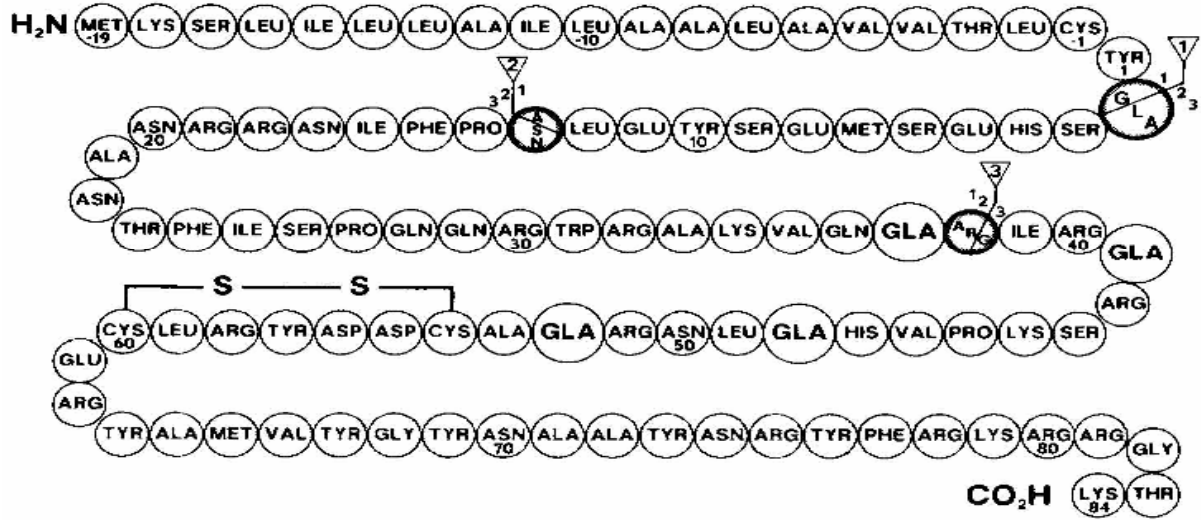
2.5. MATRİKS GLA PROTEİNİ

Arter kalsifikasyonu ile ilgili proteinlerden matriks Gla proteini (MGP) geniş bir doku dağılımına sahip önemli bir hücre dışı matriks proteinidir (96). İlk kez 1983 yılında sığır kemiği ekstraktından izole edilen MGP ardından ratlarda (1986), insanda (1988), fare (1991), köpek balığı (1994) ve tavuklarda (1998) protein ya da mRNA düzeyinde tanımlanmıştır (97).

2.5.1. Yapısı

Moleküler ağırlığı 10 kDa olan olgun MGP proteini 84 aminoasitten oluşmaktadır (175). 19 aa'lık zarlararası bölge ileti peptidi, γ - karboksilasyon tanıma bölgesi, Gla domaini, 11 aa'lık işlevi bilinmeyen bir peptidi içermektedir. MGP bilinen vitamin K bağımlı proteinler içerisinde propeptid formu olmayan tek proteindir(98).

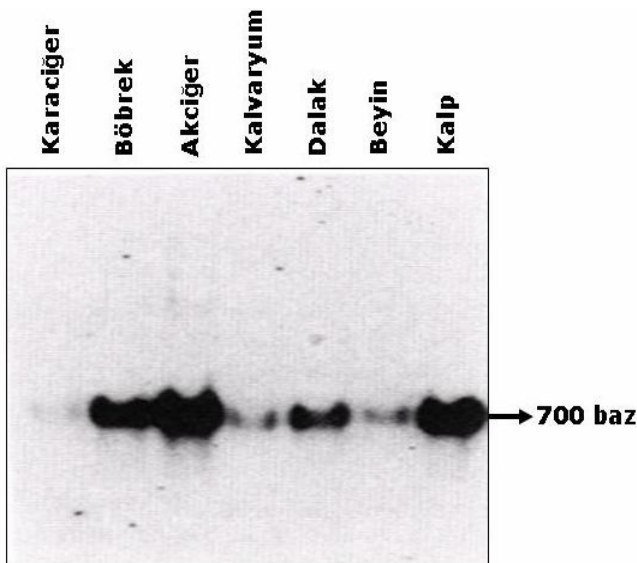
Sahip olduğu glutamik asit birimlerinin 5 tanesi sentez sonrası vitamin K ve bikarbonat iyonlarını gerektiren bir reaksiyonla γ - karboksilasyona uğrayarak gama karboksi glutamik asite dönüşür (99). Bu Gla birimleri kalsiyum (Ca^{2+}), fosfat, hidroksiapatit kristalleri için yüksek bağlanma affinitesi oluşturur (100). Ca^{2+} iyonları Gla ünitelerinde yapısal değişiklikleri teşvik etmekte ve proteinin uygun katlanmayı gerçekleştirmesini kolaylaştırmaktadır (97). Yapısında ayrıca 3 adet fosfoerin aminoasidi ve 1 adet sülfid bağı içermektedir (98). Çok sayıda hidrofilik ünitelerden oluşmasına rağmen çözünürlüğü oldukça düşüktür (10 $\mu\text{g/ml}$) (97).



Şekil 1. Matriks Gla Proteinini. Olgun proteinin ilk aminoasidi +1 olarak alınmıştır. Negatif sayılar pre-peptid bölgesini (-1 ile -19 arası) göstermektedir. 5 adet Gla birimi büyük daireler içinde koyu harflerle belirtilmektedir. Protein dizisindeki üç intronun konumu üçgenlerin yanında yer alan rakamlarla işaret edilmektedir. Aminoasitlere bitişik olan rakamlar kodonların yerleşimini gösterir. 54. ve 60. sistein aminoasitleri arasında kurulan disülfid bağı da şekilde görülmektedir(98).

2.5.2. Vücuttaki Dağılımı

En çok akciğer ve kalpte sentezlenmekle beraber kemik ve böbreklerde de sentezi yapılmaktadır (96).



Şekil 2. Sıçan dokularındaki MGP mRNA seviyelerinin Northern Blot Analizi(96).

DOKU	MGP
	ug/g doku
Yumuşak doku	
Akciğer	10.9
Kalp	5.9
Böbrek	1.4
Dalak	<0.4
Kemik	
Tibia	410
Epifiz	570
Kıkırdak	
Vertebral disk	330
Büyüme plağı	320

Tablo 1. Sıçan dokularında MGP ifadesinin seviyeleri (97).

2.5.3. İşlevi

Yüksek düzeyde ifade edildiği gelişmekte olan kemik ve kıkırdak dokularında hücre dışı matriksin kalsifikasyonunu düzenler (101, 102). Kemik, kalp, akciğer ve aort gibi yumuşak dokularda da düşük miktarda sentez edilir (96).

MGP fonksiyonunun moleküler mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen ,derlenen bilgiler onun major rolünün yumuşak doku kalsifikasyonunun inhibisyonu olduğunu ortaya çıkarmıştır. MGP'nin yumuşak doku kalsifikasyonunu inhibe ettiğini gösteren ilk bulgular , K-vitamin antagonisti olan warfarin ile tedavi edilen ratlarla yapılan çalışmalardan geldi.(104) Bu hayvanlarda masif kıkırdak kalsifikasyonu özellikle epifizlerde ve yüz kemiklerinde gelişti.(105) MGP kıkırdakta tanımlandıktan sonra kıkırdak kalsifikasyonunun MGP fonksiyonlarındaki kayıp ile alakalı olduğu söylendi.(106) Keşfinden sonra yıllarca MGP'nin öneminin kemik ve kıkırdak metabolizmasıyla kısıtlı olduğu düşünülüyordu. Ancak farelerde MGP geninin hedeflenen delesyonu ile rolü daha açık hale geldi. MGP'nin asıl fonksiyonunun arterlerin mediyal kalsifikasyonunun inhibisyonu olduğu tespit edildi .MGP-defektli olan hayvanlar 6-8 hafta içinde tunica medyadaki elastik lamelin kalsifikasyonuna bağlı gelişen büyük arterlerin rüptürü sonucu öldü.(107)

MGP'siz farelerde hidroksiapatit'e benzer oranlarda kalsiyum-fosfat çökmesine bağlı arteryel kalsifikasyon mevcuttu. Böylece kemik mineralizasyonunu taklit edecek seviyedeydi. Histokimyasal teknikler kullanarak araştırmacılar arteryel kalsifikasyonun vasküler düz kas hücrelerinin kondrosit benzeri hücrelere değişimiyle beraber olduğunu göstermişlerdir. MGP'nin kalsifikasyonu inhibe edici aktivitesinin mekanizmasını Price açıklamıştır. MGP'nin kristal nukleusa sıkıca bağlandığını böylece daha fazla büyümesini engellediğini öngörmüştür. Vasküler düz kas hücrelerinin, kondrosit ve osteoblast benzeri hücrelere dönüşümünü inhibe etmesi MGP'nin belki de ikinci fonksiyonudur. Bu inhibe edici özellik daha sonra Shanahan ve arkadaşları tarafından da kanıtlanmıştır. Onlar Mönckeberg's sklerozlu diabetik hastaların arterlerinin mediasında normal damarlara göre daha az MGP ekspresyonunun mevcut olduğunu göstermişlerdir. (108)

Sistemik MGP düzeylerinin arteryel kalsifikasyon üzerinde etkisi bulunmamaktadır. Bu, MGP'nin kalsifikasyonu inhibe edici etkisinin sistemik değil lokal olduğu anlamına gelebilir. İnsanlarda MGP'yi kodlayan genlerde mutasyon olması –fonksiyonel olmayan bir proteini öngörür- Keutel sendromuna yol açar. Bu hastalık anormal kıkırdak kalsifikasyonu ve

pulmoner stenozla karakterize olup nadir bir hastalıktır. Postmortem Keutel sendromlu genç bir hastada aşırı arteriyel kalsifikasyon tespit edilmiştir.(109)

Bir dekat öncesine kadar arter kalsifikasyonun pasif bir süreç olduğu düşünülüyordu. Oysa son senelerde açık hale gelmiştir ki vasküler kalsifikasyon aktif bir süreç olup kardiyovasküler mortalite ve morbidite ile güçlü bir ilişkisi olan bağımsız bir patolojidir.(108) Klinik olarak vasküler kalsifikasyon damar duvarında sertleşmeye yol açar ve bu arteriyel kompiansın azalmasına neden olarak sol ventrikül hipertrofisi gelişmesine neden olur. Koroner perfüzyonun azalmasına yol açıp fatal komplikasyonların artışına sebep olur.(110,111) Kalsifikasyon yaşlı popülasyonda ve kronik böbrek yetersizliği,diyabet,aort stenozu ve ateroskleroza olan hastalarda genelde bulunur.(108) Bu nedenle damarlardaki kalsifikasyonu azaltma veya tersine çevirmeye yönelik bir sürü çaba gösterilmiştir. Hayvan modellerinde arteriyel kalsifikasyonu reversibil olduğu gösterilmiştir.(108) Aynı zamanda regresyon sürecinin aktif olarak regüle edilen bir süreç olduğu gösterilmiştir.

KBY hastaları en yüksek arteriyel kalsifikasyon insidansına sahiptirler ve kardiyovasküler mortaliteleri normal insanlara göre 20 kat daha fazladır Üstelik hemodiyalize girenlerin %60-80’inde orta-ağır vasküler kalsifikasyon tespit edilmiştir.(112).

İmmünohistokimyasal çalışmalarda gösterilmiştir ki sağlıklı damarlarda MGP düşük oranlarda sentez edilmektedir.(108) Çünkü kalsifikasyon inhibisyonuna ihtiyaç azdır. Kalsifiye arterlerde yüksek düzeyde MGP tespit edilmiştir. Bu durum artmış MGP sentezinden kaynaklanıyor olabilir . Ancak artmış olan MGP’nin daha çok inaktif form olan ankarboksile MGP olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Hem medial hem de intimal arteriyel kalsifikasyonda raporlanmıştır.(108)

Yapı spesifik antikorların gelişmesiyle aktif, karboksile MGP ve inaktif,ankarboksile MGP (cMGPve ucMGP)’nin tespiti mümkün olmuştur.

Özellikle ucMGP aterosklerotik ve kalsifiye arterlerde toplanmaktadır. cMGP ise bu arterlerde hemen hemen mevcut değildir. Sweatt ve arkadaşları yaşlı ratların kalsifiye arteriyel lezyonlarının yüksek düzeyde MGP içerdiğini ve bunların ankarboksile yapıda olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada warfarin ile tedavi edildiği sırada ratların arterlerinde hızlıca gelişen kalsifiye lezyonların çevresinde masif ucMGP birikimi tespit edilmiştir.(108) Vasküler kalsifikasyon ,kardiyovasküler mortalite için önemli bir etkidir ve güncel bilgiler MGP’nin kalsifikasyonun asıl inhibitörlerinden biri olduğunu göstermektedir. Vasküler kalsifikasyonun kötü kardiyovasküler sonuçlarla birlikte olmasına rağmen Huang et al. postmortem olarak koroner arterlerdeki masif kalsifikasyonun plak stresiyle ilişkisi

olmadığını göstermiştir.(113) İnsan aterosklerotik lezyonların inspeksiyonu , plak rüptürü ile intimal kalsiyum depozitleri arasındaki ilişkinin küçük hücre membran fragmanlarından orijin alabileceğini ortaya çıkarmıştır.(114) Kalsifikasyon aktif regüle edilen bir süreç olmasına rağmen masif arteriyel kalsifikasyon kendini end-stage bir süreç olarak gösterir. Hem kardiyovasküler kalsifikasyon hem de MGP aktivitesi direk olarak vitamin K2 alımıyla koreledir.(108) Sağlıklı popülasyonda çoğu kalsifikasyona karşı optimal olarak koruyucu değildir. Çünkü mevcut olan MGP'nin bir kısmı ankarboksile, inaktif form olmaktadır.(115)

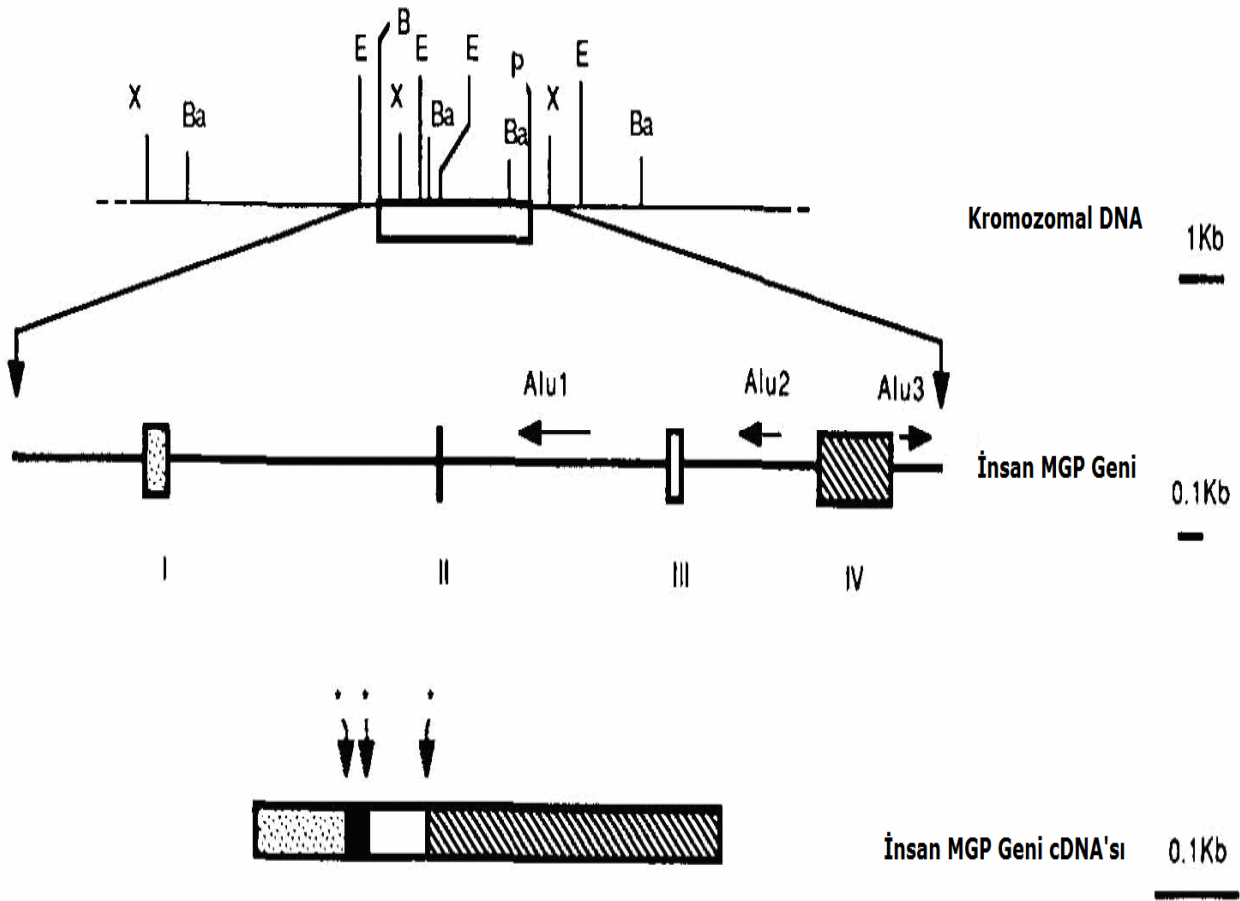
2.6. MGP Geni

İnsanda 12p13.1 – p12.3 kromozomal yerleşimine sahip MGP geni genomda tek kopya halinde bulunur, 3937 baz çifti uzunluğundaki yapısal gen bölgesi 4 ekzondan ve genin % 85'ini oluşturan 3 büyük intronik diziden oluşmaktadır. Özendirici (promoter) bölge ise 3398 baz çiftinden oluşmaktadır (99).

Tablo 2. İnsan MGP geninin intron-ekzon yapısı. Genin ekzonlarının uçlarında yer alan nükleotid dizileri tipik ökaryot genlerindeki gibidir. Gene ait 3 intron da 5'-(GT) ve 3'-(AG) kaynaşma uyumu dizileriyle sınırlanır (99).

Ekzon	Ekzon Uzunluğu	3' Vericisi	İntron No ve Uzunluğu	5' Alıcısı
1	163	TATG/GTGAGA	1 (1544)	C(T)10ATTTCAG/ AATC
2	33	CTTA /GTAAGT	2 (1165)	(T)4CTGTTCTAAG/ ATCC
3	76	AGAG/GTCAGT	3 (691)	CTTCCAC (T)3CTAG/GATC
4	389			

İnsan MGP geni ile proteinin yapısı incelendiğinde her bir ekzonun proteinin her biri ayrı işleve sahip farklı bir alt birimine karşılık geldiğini göstermektedir (176). Buna göre ekzon 1; 5' translasyona uğramayan bölge ile zarlararası bölge ileti peptidini, ekzon 2; olgun proteinin 2–12. aminoasiti arasında yer alan α -helikal alt üniteyi kodlamaktadır . Bu bölgenin ne gibi bir işlevi olduğu bilinmemektedir . Ekzon 3 ve 4 sırasıyla gama karboksilaz tanıma bölgesi ile Gla içeren üniteyi kodlar (99).



Şekil 3. MGP geninin intron-ekzon organizasyonu ve enzim haritası. En üstteki çizgi MGP lokusunun kısmi restriksiyon enzim haritasını göstermektedir. Daha aşağıda MGP geni, intron ekzonlarının organizasyonu ve Alu tekrarlarının yerleşimi görülmektedir. Her bir ekzon proteinin farklı bir birimini kodlamaktadır. Buna göre I; 5' translasyona uğramayan bölgeyi ve proteinin pre-domainini, II; α -helikal üniteyi, III; gama karboksilaz tanıma bölgesi, IV; Gla içeren alt birimi ve 3' translasyona uğramayan bölgeyi kodlamaktadır. Şeklin alt kısmında insan MGP cDNA'sının yapısı görülmektedir. Yıldızlar ve oklarla işaret edilen bölgeler intron-ekzon kaynaşma bölgeleridir (99). (X, XbaI; Ba, BarnHI; E, EcoRV; B, BglI; P, PstI).

AAATAAGCTAGTACTTCTGGGCCTGATGGTGTAGTGAAAACCTGTGCTTGAGGATACATT
 ACAGTGAAAGAGCAAAGTGAATAGTAGTACTTACCTCCTTAGGGAGGTGTGTT ^{enh} -879
 TGTGTTGCTGTGACATCCCCACAGCACCTAGCACAGTACCTTGCATCTCACCTGCCACTC
 ACTAAAAAGTCTATCAAGTTAGTTAATTATCGAGACAACGCCCTCAGAAATGAGAGAACA -759
 GTACCCCTCTTATCCTTGCTGACATTTCCAGCACTGATACGUTGCCTAAAGAGGACTAGG
 GCACAGGTTTGAATTAATGTCACAAAACCTGGATGGGCAAGTTACACGGTGTGATTAAG -639
 GAAACAGAACTCATGGGGCACCAGATATCTCCATCCTGATGAACCTTGGAAAAATGCCA
 AAGATGCATATCCCCAGGCAAAATGCCCTGATTAGTCTGGCATTGATAGATTGGTCTAGGAT -519
 TCAGCCCTACTGGGAAGATGTCTAAATTATAATCAGTGTAGAAAAGCGAAGTTCTCCTAGA
 AGAAGAGGCAAAAGGTTAAAAAGAAGAAAAGAAAAGAAAGTGAAGTCTTTCTCCCCAAA -399
 ACCTCTCATCAATCAATCAGGGTAACAAACAGAACACTAGGGCTCTGTCTGTGGACCAAA
 CCCAAAAGCCCTGCGGTCAGGGCCAGGAGGGTAGATCATGTGTTTGTGGCAACTTCTCT -279
 GTGGGCTTTTGGCCAGGCTCTGTCCTCCCAAGCATACGATGGCCAAAACCTTCTGCACCAGAGC
 AGCATCCTGTGTAAACACAGTCCAGGTCCAGCAGTTAGGGAAAACCTGCCCACTCAGAGTAGA -159
 TAATATCTGGAAGGAATGACGTGTTTGGGAAAAGTTCCAAATGCTAGTTTCACTGCCAACCT
 TCCCCACCTTCTCCAGCTCTCTCTCCCACTGGTTCTCTCCCTCTCAACTGCTCTGTTCTTA -39
 TAAAAACCTCACAGCCTTCCACTAACATCCCATAGGAGCCTCTCTCCCTACTGCTGCTAC
 (-19)
 ACAAGACCCCTGAGACTGACCTGCAGGACGAAACCATGAAGAGCCTGATCCTTCTTGCCAT
 (-10) (-1) (1)
 eLeuAlaAlaLeuAlaValValThrLeuCysTyrG
 CCTGGCCGCTTAGCGGTAGTAACCTTTGTGTTATGGTGAGAACTTTTCTCCATTTCTC
 TGTGTTTAC TTTCTGCTCTGACTTTGGCTTACTTCTATTTTCTCTCCCTCCTCCTC
 TTCTTCCCCCTTTCTCTGTATATAATCTTAAAGTACCATTACTTTTACATTTCCAGTCTC
 CGCAGAAAC TGATCTGTCTATTAAGTCTTTTATATCTTAAATATCCAGAGTCTTATG
 CAACTTAACAGGCAAAACCCGTTCAAGTGGTAAGTCTCTGTATATCTAGAACTCATATTT
 AGAAAGAAGATACCAATTTCCAGCCCCCTGCACTCTCTCATTTTAAAGGATATTTATTTAG
 ACTTTGGTATCAATGGGTTAAGGGTATTTGTTTAAACCACTTGCCTTTGAGAAAATCCATT
 TTTATGTGAAGTATTAAGTATAGCCCTTTCTAGGGACTGGACAATCTCATGAACCTACTA
 TGTGTTGTTCAATTAATTTTAAATAAAGTTTACATCAAAAGAATTTTAAAGAAAGA
 ATCATTTTCATAACTCCTGTGTGTCAGAAAATAAATTTTGCCTGTTTCTATATGATTA
 AATATACCTGCATTTGTTCAAAGCTTATAAAAGGAAATCTGAAGCAAAGTTATTTACTTA
 TTTCACTCTTTTGTTCATTTACCTAGATATTTTCAATTGTTTAAATTTAAATTTACATT
 AACAAACATAAAGATTATGCTTCTCACTCTTGTATTACAAATTTTCTGTATTAGAGGAT
 TTGATTTCTTCACTCTCTTTTAAAGTTTGAAGAAAATTCACCTTCTGGCAAAATATTAAT
 AGAAGCTTCTTATTTCCAAAATTTATCTGCTGTGCTCAGGAGAGTGGCAGAAAGAAAGAAA
 CTTGGGCTTTGATATCGTTTCAGTTCTCTCTGAACTGGCATCTGCTCCAGGGTGAGCT
 GTCAGCTGGAGCTAGTGGTTTCTGTGGCTGCCAATTTAACACAGGTTCTTAAGAGGCTTT
 CGGAACCCCTCTTAGAAACCTGCCCTAGTAAGCCAGCAGAGCAACTGCCCTGTAGTTCTC
 TTGCCCTGGAGAAACCTGGCTGCTTCTGGATCTCTTAACTCTCTTGACCTGTTCTC
 AAACAGGCTCTGAATAAATCAGAGAAGAGGTTCTCTGGAGACTTCTGTACAGCACTTAA
 AGTGTCTTATTTTGTCTGTAAGACGTCATAGCCCTTGGGAAATTTTAGCTGAAATG
 GCCACTCCCTCTTCAACATCAGAGAACTAAATATAGAGATATCCACAGCAAGGCCAG
 AGCTAGAGAAAAACCTCATAAATCCTAAATTCCTGAAATTTCTAATAACCACTGCTAA
 ATATATCTTCTCATGTTTTTAGACTCTTTCTCTTCTTCCATCCCTGTATTAAACTATCA
 CAGTGTCTAAATTGATAAATAAATAACATAATGAATCATGGATAAATATTGATATAATGAA
 (10)
 LuSerHisGluSerMetGluSerTyrGluLeuA
 TCTTTTTTTTTTAAATTTTCAAAATCCCTTGCATTAAGAACCTCTTCTTATTTTAAATA
 AATAATTTAACTTCTTTATTTCAAAATCCCTTGCATTAAGAACCTCTTCTTATTTTAAATA
 AACAGATGGAAAGATATATAACAGGGAGGGGAAAGGGGGCTCTTTTGGAAAACATAAG
 TAAATTTTAAATCTAATGACTATATAAATTTGCCAAGGAGCAATTTTAAAGTTTGAAG
 TAGTGCAATATGGGATTTAAGCTACAGGCGACATATTTAGAAGCCATAAAATCTCATTTG
 GAAATTTTAAATTTGGCACCACGTCACCTGCACAGATGGAAAACGAGGAGTAATGACAAAT
 GGTAAAGCACAGAGCTGGACGCCAAGTCAGCTGGGAGACCACAGGCGCCACGTTAAGCTG -2002

<u>ACTCTGTCGCCCGAGGCTAGAGTGCAGTGGTGTGATCTCGGGCTCGCCGCAACCTCCACCTC</u>	-2122
<u>CCAGGTTTCAGGCAATTCTCATGCCCTCAGCCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCCCATGA</u>	-2242
<u>CATCATGCCCTGGCTAATTTTIGTATTTTITAGTAGAGATGGGGTTTCACCATTGTTGTCCAG</u>	-2362
<u>GCTGGTCTCGAACTCCTGGCCTCAAGTGATCCACCCACCACAGCCTCCCAAAGTGCCGGG</u>	
<u>ATTACAGGCATGAGCCACCACACCCAGCCAGCTGATTGCTGTTGAATAGCTGGATTTATA</u>	
AAGACTGAGCATAGGAGGAAATGGCACATCAC TCTCATTTTTAAATTATTTCATTATTTTT	-2482
ATAGTGTTTAAACTGTTTCATGTATCGGCAATCTAGTTATGCTTCATAAATCCTCAGGACA	
GAGAATTTCTCCTCAAAAGGAATTTAAATCTACCAAGTAGAAATACAGAAATTAAGAAA	+2602
GGCAAAGTGATCGTCCAACTCAAAACCAACAAAGCCTATATGACAAGTCTCTAAGACAC	
ATGGATTGATTACTGATTTCATTTGATCAGGAAGTTAATGAAATCTACTTTATACTCTCC	+2722
TTTAATTTTGGCAATCTCCGTTTATATGAGTTGCATAAGTTAAGGCACTTTCAAATATA	
TTTGTGTCAAGGAATATTTCACGGAAATATTTTCAGCTATGTGTGCTAAAACGCAATTA	(20)
snProPheIleAsnArgArgAsnAlaAsnThrPheIleSerP	-2842
TTTATTTTCTGTTCTAAGATCCCTTCATTAACAGGAGAAATGCAAAATACCTTCATATCCC	(30)
roGlnGlnArgTrpArgAlaLysValGlnGluAr	
CTCAGCAGAGATGGAGAGCTAAAGTCCAAGAGAGGTCAAGTAACAAAACCTTCATGAGGAGT	
GGTCATTTTTCAGTGTAGATCACAGATCTGAATTGGAGTGGGAAACAGCTTTTTCATC	-2962
ATATACATTATTTCTAATTGTATCTTTAAATCAAAAAACTTAAAGCAATATTCAGAAA	
ACAACTGAATTATTAGAAAATTATTTGGGGAAAGATCCGGAAAGGAGAAGGAAGGAGGAG	+3082
AGAAAGGAGGACAGAAAGAAAACCTTCTATTTTCATTAAAAAAAAAAAAAAAAAATCTCCTGT	
TCTGCCTTCCCTCCCTGGTTTTTTTTTTGGTTGGTTGGTTGGTTTTCTGAGACAGAGTC	+3202
TCACTCTGTTGCCCAGACTGGATTATAGTGGCACTATCTCGTGCCTCAGCCTCCCAAGTA	
GCTGGGATTATAGGCACGTGCTACCATGTCCAGCTATTTTTCGATTTTTTGTAGAGACGG	+3322
GGTTTTGTTCATGTTGGCCAGGCTAGTCTTGAAGCTCCTGACCTCAAGTGATCCACCCACCT	+3442
CAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCCTGAGGCCACCGCACCCAGCCTCTCCCTGTTT	
TTTAAATATCTCTTAATATAGGGGGGCATGGAGAGAAAGTCTCTCCAATATTTCTTCTT	+3562
CTTTTCCATTTTGTATTTTCCACTTTATCCTTCTCAATTTTGGCCTCTTCTTCCACTT	(40)
gIleArgGluArgSerLysProValHisGluLeuAsnArgGluAlaCysAspAsp	(50)
TCTAGGATCCGAGAACGCTCTAAGCCTGTCCACGAGCTCAATAGGGAAGCCTGTGATGAC	(60)
	(70)
TyrArgLeuCysGluArgTyrAlaMetValTyrGlyTyrAsnAlaAlaTyrAsnArgTyr	+3682
TACAGACTTTGCGAACGCTACGCCATGGTTTATGGATACAATGCTGCCTATAATCGCTAC	(80)
PheArgLysArgArgGlyThrLys***	(84)
TTCAGGAAGCGCCGAGGGACCAATGAGACTGAGGGAAGAAAAAATCTCTTTTTTTCT	
GGAGGCTGGCACCTGAATTTGTATCCCCCTGTAGCAGCATTACTGAATACATAGGCTTA	+3802
TATACAATGCTTCTTCTGTATATTCTTGTCTGGCTGCACCCCTTTTCCGCCCCC	
AGATTGATAAGTAATGAAAGTGCAGTGCAGTGAGGGTCAAAGGAGAGTCAACATATGTGA	+3922
TTGTTCCATAATAAACTTCTGTGTGATACTTTCATCTTGTAATCTGCTT7CTTTTGGG	
AAGATATTGAGATATTTAAATCATGGCCACCTTACCCAAAATAGGAGATTCTGTTTCATC	+4042
TCATATCTAGTATTAATTAGAAAAATAACTACATAAAAAAGGAAGCTAAGAAGGCACCT	
CACTCAGCCATAAATTCTCTAACCCTCTCTACCTTGGGAATCGTGAAATGGAATCTGGTA	+4162
TGTTTTTTCAGGATTTTCCCTATTTGTAATTTGTGGCAATCAGGGCTCCCTTCATTTGC	
TTTTCATCTCTTATGCATCAAAGTCAAAAACATTTCTGAATCAAGATAATCTAGA	+4277

Şekil 4. İnsan MGP geninin nükleotid dizisi. Şekilde MGP geninin tüm nükleotid dizisi ve 5'-3' uç DNA dizileri yer almaktadır. mRNA işlenmesi esnasında guanin kapağın takıldığı şapka (CAP) bölgesi +1 olarak kabul edilmiş, ayrıca 2 ayrı olası transkripsiyon başlama bölgesindeki nükleotidler koyu harflerle gösterilmiştir. CAP bölgesinin yukarıdaki diziler negatif 3' ucundaki dizilerse pozitif sayılarla gösterilmektedir. Olgun proteinin ilk aminoasidine göre olası protein dizisi numaralandırılmıştır. Dur kodonu yıldız işareti (*) ile gösterilmektedir. 2 ve 3 numaralı intronlar ile 3' uç dizide yer alan Alu tekrarlarının ve çoklu adenilasyon bölgesinin altı çizilerek gösterilmektedir. Yine özendirici bölge (-1 ile -3398 arası)'de yer alan düzenleyici elementlerin bağlanma dizilerinin altı çizilerek gösterilmiştir. TATA, CAT, BGP ve GAGA kutusu, artırıcı element benzeri faktör (enh.core), metal cevap elementleri (MRE), hormon cevap elementleri (HRE1= vitamin D cevap elementi ve HRE2= retinoik asit cevap elementi), AP1, AP2 ve cAMP'ye bağlı transkripsiyon faktörleri ilgili dizilerin üstünde belirtilmektedir (99).

2.7. Özendirici Bölgede Yer Alan Düzenleyici Elementler

MGP geninin 5' ucundaki genomik dizisi RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen genlerle benzer elemanlar içerir (99). Transkripsiyon başlama bölgesinin hemen yukarısında -33. pozisyonda TATA uyuşum dizileri (TTATAAAAA) yer almaktadır .

Biri -119'da (CCAAT) diğeri -527'de (ATTGG-ters dizi motifi) yer alan iki CAT kutusu bulunmaktadır (116). Özendirici bölge iyi tanınan düzenleyici faktörlerin etkileştiği çok sayıda dizi motifini içermektedir. AP1 (TGACTCA)(117), AP2 (CCAGGC) (118), cAMP'ye bağımlı transkripsiyon faktörleri için olası bağlanma bölgesi (TGACGTCA)(119), metal cevap elementi (TGCA/GCT/CC) (120) bunlar arasındadır.

Daha önce BGP geninin özendirici bölgesinde tanımlanan vitamin D reseptörünün bağlanma bölgesinde yer alan dizi motiflerine MGP geninde de rastlanmaktadır. Bunlar 819 ile -832 arasında iki kez tekrar ederken CCACT ters dizi motifi ile -2095 ile -2112 arasında yine iki kez yer alan GGTGA direkt dizi tekrarıdır. Bu tekrarlardan ikincisi retinoik asit reseptör β geninde tanımlanan retinoik asit cevap elementiyle benzerlik göstermektedir (121). Bu dizilerin hormon cevap elementi olup olmadığı halen araştırılmaktadır.

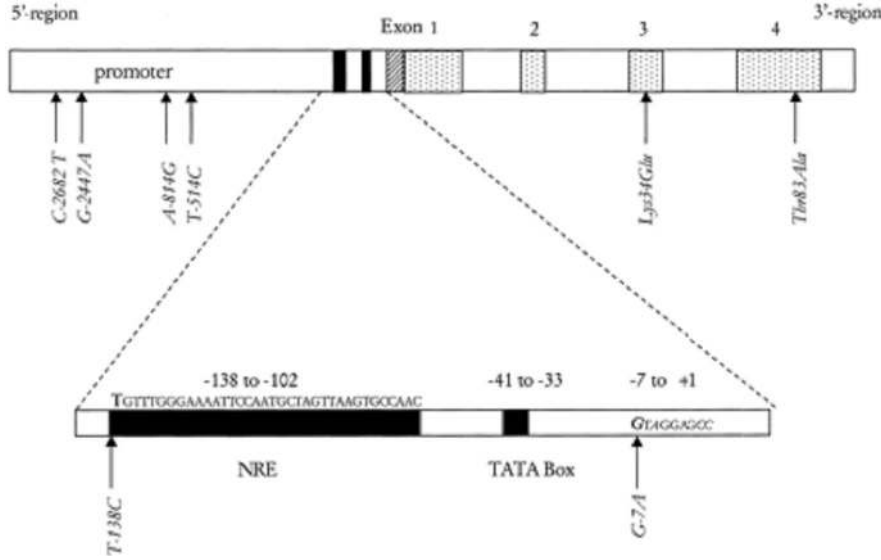
Daha önce BGP geni özendirici bölgesinde tanımlanan BGP kutusu ile ilk defa osteonektin ve sıçan BGP genlerinde tanımlanan GAGA kutusu MGP geninin özendirici bölgesinde yer alan diğer dizi motifleridir (99).

2.8. MGP Gen İfadesinin Düzenlenimi

MGP geni ifadesi deride, kemik ve kıkırdakta retinoik asit beta alıcı proteiniyle düzenlenmektedir (122). Retinoik asit beta genindeki retinoik asit cevap elementi insan MGP geninin düzenleyici bölgesinde de bulunmaktadır (121). Bu element, D vitamini ve steroid hormon alıcı proteinleri için de yardımcı transkripsiyon elemanıdır (123). Vitamin D3 insan osteoklastlarında, sıçan kondrositleri, osteoblast ve osteosarkom hücrelerinde MGP ifadesini arttırıcı role sahiptir . Kemikte ve enflamasyon bölgelerinde hücre dışı sıvı yüksek seviyede iyonik kalsiyum içerdiklerinden kalsiyum kristallerinin oluşma ihtimali artmaktadır. Kondrosit ve vasküler düz kas hücreleri sahip olduğu kalsiyum reseptörleri ile hücre dışındaki kalsiyum seviyesi değişimlerini algılayabilmekte ve bu değişime MGP ifadesini ve salınımını arttırarak yanıt vermektedir . Böylelikle hücre dışı kalsiyum, kristal oluşumunu teşvik ederken MGP sentezini de uyararak kalsifikasyonun düzenlenmesini sağlayan bir mesaj rolü üstlenmektedir (124).

2.9. MGP Geninde Bilinen Çeşitlilikler Ve Bu Çeşitliliklerin Fenotipe Yansıması

MGP geninde ikisi ekzonlarda, altısı genin özendirici (promoter) bölgesinde olmak üzere polimorfizm gösteren 8 farklı bölge tanımlanmıştır (125).



Şekil 5. İnsan MGP geninin moleküler çeşitlilikleri (125)

Promotor bölge: G-7A, T-138C, C-514T, A-814G, G-2447A, C-2682T

Ekzonlarda: Lys34Glu, Thr83Ala

MGP gen polimorfizmlerinden G-7A ve T-138C izoformlarının daha yaygın olduğu belirlenmiştir. Yapılan transfeksiyon çalışmaları her iki nükleotid değişiminin de in vitro özendirici bölgenin aktivitesinde önemli etkiye sahip olduğunu göstermiştir (125).

Ferzaneh-Far ve ark. (2001) T-138C gen polimorfizmlerinin genin transkripsiyonu için kritik bir bölgede yer aldığını ve 270 ile -102. nükleotidler arasında kalan bölgenin kaybedilmesiyle transkripsiyonun da önemli ölçüde azaldığını belirlemiştir. Bu değişim genin transkripsiyonunun forbol esterlerine bağlı uyarılmasına aracılık eden ve -142 ile -136. nükleotidler arasındaki bölgeye bağlanan aktive edici protein (AP-1 = pc-Jun, JunB, Fra-1, Fra-2 ve FosB) bileşeninin, ilgili uyuşum dizisine bağlanma ilgisini değiştirmekte buna bağlı olarak genin ifadesini ve proteinin serum değerlerini etkilemektedir (126). İlgili değişimin özendirici bölge aktivitesi ve gen ifadesi üzerine etkisini değerlendirmeye yönelik in vitro analizlerde farklı hücre hatları test edilmiştir.

Ferzaneh-Far ve ark. (2001) primer yetişkin sıçan vasküler düz kas hücrelerini kullanarak gerçekleştirdikleri ekspresyon çalışmasında -138C moleküler çeşidinin -138T 'den 4 kat daha

fazla etkin olduğunu ve -138CC homozigotlarının MGP'nin % 30 oranında daha yüksek serum değerlerine sahip olduğunu göstermiştir . Bu bulguya dayanarak -138C allelinin doku kalsifikasyonuna karşı koruma sağlayabileceğini ileri sürmüştür (126). Hermann ve ark. (2000) ise -138C allelinin fare vaskular düz kas hücrelerinde özendirici bölgenin etkinliğinin %20, insan fibroblast hücre hattında ise %50 oranında azalttığını belirlemiştir (125).

Wang ve ark. (2004) 204 kişilik bir böbrek hastası grubunda yaptığı çalışmada -138CC homozigot genotipin kardiyovasküler mortalite riskinin bu hastalarda daha yüksek olmasıyla ilişkili olduğunu bulmuştur (127).

Ferzaneh-Far ve ark. G-7A nükleotid değişiminin in vitroda genin ifadesinde önemli bir farklılığa yol açmadığını belirtirken, Hermann ve ark. (2000) -7A allelik formunun miyokardiyal enfarktüs geçiren hastalarda daha yaygın olduğunu ve femoral arterosklerotik kalsifikasyonun -7A alleleline sahip bireyler arasında daha sık görüldüğünü bildirmektedir (125, 126). Brenccaccio ve ark. (2005) T-138C ve G-7A MGP gen çokyapılılığının kronik böbrek hastaları (KBH) ile hemodiyaliz (HD) hastalarında normal popülasyondan farklı bir dağılım gösterdiğini tespit etmiştir (128). Araştırmanın bulgularına göre -138 TT genotipinin görülme sıklığının HD grubunda, -7 AA genotipinin ise HD ve KBH gruplarının her ikisinde de kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu ve KBH'lı -7A alleli taşıyıcılarında kalsifikasyon ve kardiyovasküler hastalık riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (128).

Genin 4. ekzonunda saptanan diğer bir nükleotid değişimi 83. pozisyonda yer alan polar bir aminoasit olan treonin (Thr)'in nonpolar bir aminoasit olan alanin (Ala)'e dönüşmesine neden olmaktadır . İnsan MGP cDNA'sı 84 aminoasitlik MGP proteinine karşılık gelmektedir (129). Ancak MGP'nin insan kemik ekstraktında tanımlanan bir formu 77 aminoasite sahip olup karboksil ucunda daha az aminoasit içermektedir . Bu kısalmış MGP formu karboksil ucunun işlenmesiyle oluşmaktadır . Karboksil ucundaki aminoasit değişimleri MGP'nin translasyon sonrası uğrayacağı değişimleri etkileyebilir. Buna bağlı olarak MGP molekülünün yükünün ya da sterik düzenleniminin değişmesiyle proteinin işlevselliği de değişebilir (129).

MGP 'nin karboksil ucundaki 2. aminoasiti etkileyen bu değişim proteinin Ca 2+ 'ya bağlanma kapasitesini azaltarak serbest kalsiyumun birikmesini hızlandıracağı düşünülmektedir (125) .

3. GEREÇ ve YÖNTEM:

3.1. Grupların oluşturulması ve kan örneklerinin eldesi:

01.02.2009-01.01.2010 tarihleri arasında D.Ü. Tıp Fakültesi Kardiyoloji kliniği'ne ve/veya koroner yoğun bakım ünitesine yatan ve rutin tetkik ve tedavi uygulamaları tamamlanan ve çalışma protokolünü kabul eden 115 hasta çalışmaya alındı. Koroner anjiyografide bir veya daha fazla koroner arterde %50 ve üzeri darlık olan 58 hasta (yaş ort:63,6,yaş aralığı:39-83) çalışma grubuna alındı.

Koroner arterleri normal olan (koroner anjiyografide darlık saptanmayan) 57 hasta (yaş ort:47,7 yaş aralığı:27-78) ise kontrol grubunu oluşturdu. Her iki gruptaki bireylerden, DNA eldesi için kullanılmak üzere EDTA'lı tüpe 5'er ml kan alındı. EDTA'lı tüplere alınan kanlar DNA eldesine kadar geçen süre içerisinde -20 °C'de saklandı

3.1.1. Çalışmaya Alınma Kriterleri

1. Dicle Üniversitesi Kardiyoloji Kliniği'ne ve/veya koroner yoğun bakım ünitesine yatan ve rutin uygulamaları (fizik muayene, Elektrokardiyografi, arteriyel tansiyon ölçümü, rutin biyokimya ölçümleri, Doppler-Ekokardiyografi, koroner anjiyografi) sonucunda koroner arter hastalığı tanısı konmuş olan hastalar çalışma grubuna dahil edilmiştir.
2. Dicle Üniversitesi Kardiyoloji Kliniği'ne ve/veya koroner yoğun bakım ünitesine yatan ve koroner arter hastalığı olmadığı belirlenmiş bulunan ve rutin uygulamaları tamamlanmış olan hastalar kontrol grubuna dahil edilmiştir.
3. Bilgilendirilmiş onay formunu okuyup çalışma protokolünü kabul edenler çalışmaya alınmıştır.

3.1.2. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

1. Dicle Üniversitesi Kardiyoloji Kliniği'ne ve/veya koroner yoğun bakım ünitesine yatan ve koroner arter hastalığı belirlenmiş ancak rutin uygulamaları tamamlanamayan veya eksik kalan hastalar,
2. Dicle Üniversitesi Kardiyoloji Kliniği'ne ve/veya koroner yoğun bakım ünitesine yatan ve koroner arter hastalığı olmadığı belirlenmiş bulunan ancak rutin uygulamaları tamamlanamamış veya eksik kalan hastalar,
3. Bilgilendirilmiş onay formunu okuyup çalışma protokolünü kabul etmeyen hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2.GEREÇLERİN TEMİNİ:

Bu çalışma için D.Ü. Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun **29.01.2009 tarihli 642 numaralı** onay kararı alındıktan sonra genetik malzemelerin temini için DÜBAP (Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü)'a çalışmanın projesi sunuldu. Projenin **2008-TF-65** sayılı onayıyla malzemeler DÜBAP tarafından temin edildi.

3.3. GEREÇLER

Santrifüj (Ependorf, Hamburg, Almanya), mikropipet (Ependorf, Hamburg, Almanya), derin dondurucu (Bosch, Almanya), manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, İtalya), vorteks (Velp Scientifica, İtalya), biyolojik emniyet kabini (Bilser, İstanbul, Türkiye), inkübatör (Uniequip, Martinsried, Almanya), düşük basınçlı kurutucu (Biometra, Almanya), mikrosantrifüj (Ependorf, Hamburg, Almanya), PZT aleti (MJ Research, Amerika), güç kaynağı (Consort, Belçika), mikrodalga fırın (Arçelik, İsviçre), yatay elektroforez tankı (EC,), hassas terazi (Shimadzu, Japonya), otoklav (Nüve, Ankara), rotor (Selecta, İspanya), görüntüleme cihazı (VilberLourmat, Torcy).

3.3.1. KİMYASAL MADDELER

NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya), Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Almanya), Üre (Merck, Darmstadt, Almanya), Proteinaz K (Sigma, St Louis, Amerika), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma, St Louis, Amerika), Etil alkol (Tekel, İstanbul, Türkiye), mono bazik sodyum fosfat (NaHPO₄) (Merck, Darmstadt, Almanya), Tris-HCl (Merck, Darmstadt, Almanya), Kloroform (Merck, Darmstadt, Almanya), Agaroz (Prona, Madrid, İspanya), EDTA (Merck, Darmstadt, Almanya), , dNTP (Fermentas, Vilnius, Litvanya), Taq DNA polimeraz (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 10X Amonyum sülfatlı PZT tamponu (Fermentas, Vilnius, Litvanya), MgCl₂ (Fermentas, Vilnius, Litvanya), Ksilen Siyanol (Sigma, St Louis, Amerika), Bromofenol Mavisi (Merck, Darmstadt, Almanya), pUC 19 MspI DNA belirteci (Fermentas, Vilnius, Litvanya), , NcoI RE (Fermentas, Vilnius, Litvanya), HaeIII RE (Fermentas, Vilnius, Litvanya), BseNI RE (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 10X RE tamponu (Fermentas, Vilnius, Litvanya).

3.3.2. ÇÖZELTİLER

10X TBE (108 g tris, 55 g borik asit, 8,3 EDTA), parçalama çözeltisi (300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl), üreli parçalama çözeltisi (4,2 g üre, 10mL su, 1 mL parçalama çözeltisi), NaCl (5M), Proteinaz K (10mg/ml), EDTA (0.5 M), SDS (200g/l) (130).

3.4. DNA Eldesi

I. gün

EDTA'lı tüpe alınan kanların oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra üzerlerine hacimleri kadar saf su eklendi. İyice altüst edildikten sonra 4000 devir/dakika'da 20 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı kısım atıldı. Bu işlem üç kez tekrar edildi. Üçüncü santrifüjün ardından, atılan sıvı kısmın yerine her bir tüpe 3 mL üreli parçalama çözeltisi eklendi ve çökeleğin iyice çözünmesi sağlandı. Ardından 400 µL %20'lik SDS ve 100 µL 10mg/mL proteinaz K eklenerek 37 C'de 1 gece için inkübasyona bırakıldı (130).

II. gün

İnkübasyondan çıkarılan örneklerle 2 mL 5M NaCl eklendi ve 10-15 dakika altüst edildi. Ardından, üzerlerine 8 mL kloroform konularak 4000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan 3 kısımdan üstteki kısım temiz bir tüpe alınarak, üzerine hacmi kadar soğuk %96'lık etil alkol eklendi. Alkol ilavesi ile çöken DNA'lar pipet ucu ile 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak üzerlerine 1000 µL %70'lik etil alkol eklendi. Tüpler 13000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilerek DNA'ların tüpün dibine yapışması sağlandı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. En son santrifüj işleminden sonra, alkol dikkatli bir şekilde döküldü. Tüplerin dibine yapışması sağlanan DNA'lar vakumlu kurutucuda yarım saat bekletildi ve üzerlerine gerekli miktarlarda deiyonize steril su eklendi. Bir gün +4°C'de bekletilerek çözünmesi sağlanan DNA'lar saklanmak üzere -20°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı (130).

3.5. DNA Analiz Yöntemi

Bu çalışmada DNA analizi için kullanılan PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği, ilgilenilen gen bölgesinin canlı dışı ortamda çoğaltılmasına dayanan, pratikliği ve güvenilirliği ile günümüzde moleküler biyolojik çalışmalarda en sık kullanılan tekniklerden biridir (130).

MGP geninin ilgili bölgelerinin çoğaltılması işlemi in-house türü MJ Research PTC-200 PZR cihazı ile gerçekleştirildi. PZR tepkimesi için gerekli karışımların tümü otoklavlanmış malzemeler kullanılarak biyolojik sağlık kabininde hazırlandı.

Nükleotid değişimi	Primer uzunluğu (nükleotid)	Nükleotid dizisi	Ürün (baz çifti)	Referans
G-7A	27 nt	5'-CTAGTTCAGTGCCAACCCCTCCCCACC- 3'	138	(134)
	27 nt	5'- TAGCAGCAGTAGGGAGAGAGGCTCCCA -3'		
T-138C	27 nt	5'- AAGCATACGATGGCCAAAACCTTCTGCA -3'	142	(134)
	27 nt	5'- GAACTAGCATTGGAACCTTTCCCAACC-3'		
Thr83Ala 3760A→G	20 nt	5'- CACGAGCTCAATAGGGAAGC-3'	188	(134)
	20 nt	5'- GCTGCTACAGGGGGATACAA- 3'		

Tablo 3. MGP geni polimorfizminin incelenmesinde kullanılan primerler ve büyüklükleri

3.5.1. PZR ile İlgili Dizilerin Çoğaltılması

Bu tezde kullanılan primerleri tasarlamak maksadıyla referans dizilim olarak NCBI veri tabanındaki; matriks gla proteinin yapısal gen bölgesi için NT_009714 kontig numaralı bölge içerisindeki gi:37543832 numaralı dizilim, özendirici gen bölge için ise AF067176 erişim numaralı bölge içerisindeki gi:3172535 nolu dizilim esas alındı.

Matriks Gla protein geni yapısal bölgesinde yer alan değişimin incelenmesinde kullanılan primer çifti <http://workbench.sdsc.edu/> adresindeki online primer tasarım programı kullanılarak tasarlandı. Özendirici gen bölgesine ait primerler Farzaneh-Far ve ark. (2001) 'nın çalışmasından alınmıştır (126).

3.5.2. PZT Karışımının Hazırlanışı

Polimeraz zincir tepkimesinde kullanılan primer çiftlerinin en verimli çalışabilecekleri erime sıcaklıklarının tespit edilmesi ve tepkime koşullarının iyileştirilmesi amacı ile ilk olarak örnekler içerisinde seçilen 1 DNA örneği ile 3 çift primer takımı için iyileştirme ve gradient PZT yapıldı. Seçilen örnek için 10 µl'lik hacimde gerçekleştirilen gradient PZT neticesinde Tablo 5'de verilen erime sıcaklıkları elde edildi. Uygun erime sıcaklıkları belirlendikten sonra Tablo 4 'da verilen miktarlar kullanılarak reaksiyon hacmi 20 µl'ye çıkarıldı ve çalışmaya dâhil edilen örneklerin ilgili bölgeleri çoğaltıldı.

Tablo 4. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde tepkime karışım oranları.

Eklenen kimyasal madde	Miktarı (µl)
Distile su	13,9
10X Taq buffer	2.4
25mM MgCl ₂	1,2
2mM dNTP mix	1.6
100 mM Primer F	0,16
100 mM Primer R	0,16
Taq polimeraz (5u/µl)	0,08
DNA	0.5
Toplam	20

Tablo 5. Primerlere ait optimize edilmiş erime sıcaklıkları

Primer Adı	Erime Sıcaklığı (T_m)
T-138C	59 °C
G-7A	65 °C
Thr83Ala	59 °C

Tepkime koşullarına ait değişkenler primerlere ait erime sıcaklıkları haricinde tüm tepkimelerde aynı tutulmuştur (Tablo 8). Elde edilen ürünler Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemi ile çökyapılılık yönünden araştırıldı.

Tablo 6. Polimeraz zincir tepkimesi koşulları.

Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	94 °C	5 dakika
Denatürasyon	94 °C	30 saniye
Bağlanma	Tablo ' deki değerler	30 saniye
Uzama	72 °C	1 dakika
	35 tekrar	
Son uzama	72 °C	5 dakika

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi PZR tepkimelerinin verimli çalışıp çalışmadığının kontrolünde kullanıldı. Örnekler, yüzde 1 oranında hazırlanmış olan agaroz jelde 90 voltta 40 dakika kadar (37–501 bç aralığında) pUC19 MspI kesimi DNA belirleyici eşliğinde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV ışık altında görüntülendi.

3.7. Restriksiyon Enzimi (RE) İle Kesim

0.2 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine 10 µ PZR ürünü konuldu. Tablo 8’de belirtilen ölçülerde hazırlanan karışımdan PZR ürününü ihtiva eden her tüpe 5 µl konuldu.

Tablo 7. Enzim Kesim Protokolü

İçerik	Miktarlar (µl)
Distile su (dH ₂ O)	3,4
10X RE tamponu	1,5
RE [BseNI, HaeIII, NcoI (10 u/µl)]	0,1
PZR ürünü	10
Toplam	15

Hazırlanan karışımı içeren tüpler tablo 7'deki koşullarda kesim işlemine tabi tutuldu.

Tablo 8. Restriksiyon enzimlerinin tanıma dizileri ve tepkime koşulları

Enzim	Tanıma dizisi	Enzimin çalışma koşulları	Enzimin durdurulması
BseNI (Bacillus species N)	5'... A C T G G N/...3' 3'... T G A C/C N...5'	65 °C, 16 saat	80 °C, 20 dakika
NcoI (Nocardia corallina)	5'...C/CATGG...3'. 3'...GGTAC/C...5'	37 °C, 16 saat	65 °C, 20 dakika
HaeIII (Haemophilus aegypticus)	5'...GG/CC...3' 3'...CC/GG...5'	37 °C, 16 saat	80 °C, 20 dakika

Kesim ürününün değerlendirilmesi için inkübasyondan sonra örnekler agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Örnekler, yüzde 3 oranında hazırlanmış olan agaroz jelde 90 voltta 40 dakika kadar (37- 501 bç aralığında) pUC19 MspI kesimi DNA belirleyici eşliğinde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV ışık altında görüntülendi. Elde edilen bantlar incelenerek her bir örneğin genotipi tayin edildi.

3.8. Sonuçların İstatistikî Yöntemlerle Analizi

Elde edilen bulgular ki-kare testi ile değerlendirmeye tabi tutuldu.

4. BULGULAR ve SONUÇLAR

Hasta ve kontrol grubunun klinik ve demografik özellikleri aşağıda gösterildiği gibidir.

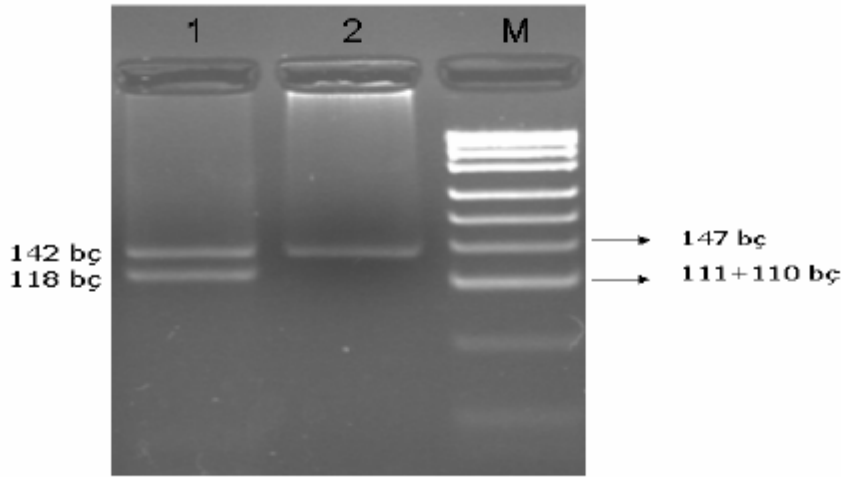
	HASTA n=58	KONTROL n=57	p
Cinsiyet	n (%)	n (%)	
Erkek	38 (%66)	30 (%53)	AD
Kadın	20 (%34)	27 (%47)	AD
DM			
Var	22 (%38)	3 (%5)	p<0,05
Yok	36 (%62)	54 (%95)	p<0,05
Hipertansiyon			
Var	37 (%64)	20 (%35)	p<0,05
Yok	21 (%36)	37 (%65)	p<0,05
Sigara			
Var	14 (%24)	19 (%33)	AD
Yok	44 (%76)	38 (%67)	AD
Dislipidemi			
Var	14 (%24)	8 (%14)	AD
Yok	44 (%76)	49 (%86)	AD
Yaş ort (Yaş aralığı)	63.6 (39-83)	47.7 (17-81)	p<0,05

AD: Anlamlı değil

Bu sonuçlara göre gruplar arasında sigara içme, dislipidemi ve cinsiyet açısından anlamlı farklılık yoktu. DM ve Hipertansiyon hasta grubunda anlamlı olarak daha fazla tespit edildi. Yaş ortalaması hasta grubunda anlamlı olarak daha yüksekti.

Bu çalışmada; KAH saptanmış 58 hastadan ve KAH tespit edilmeyen 57 hastadan alınan DNA örnekleri kullanılmıştır. Matriks Gla protein geni yapısal ve özendirici gen bölgesinde tespit edilen gen polimorfizmi ve bu yapıların gruplardaki dağılımı RFLP yöntemiyle analiz edilmiştir.

4.1. T-138C GEN POLİMORFİZMİNİN ANALİZİ



Şekil 6. T-138C nükleotid değişiminin RFLP yöntemiyle analiziyle elde edilen bant görüntüsü. PZT sonrası elde edilen 142 bç büyüklüğündeki ürün BseNI kesimine tabi tutularak % 3'lük agaroz jelde elektroforez edildi. -138. nüleotidin C olması durumunda enzim 142 bç'lik parçaya uygun tanıma bölgesi bulamazken, aynı pozisyonda T nükleotidinin bulunması ile enzim kesim işlemini gerçekleştirebilmektedir. Kesim sonrası 118 ve 24 bç uzunluğunda 2 DNA parçası elde edilmektedir. Buna göre 1 numaralı örnek TC, 2 numara CC genotipine sahiptir. M= DNA belirteci (pUC19 MspI kesimi)

Bu bölge için KAH saptanmış 58 hastanın ve KAH saptanmamış 57 hastanın DNA'ları analiz edilmiştir. Genotipler herhangi bir gruba özel bir dağılım göstermemektedir. Bununla birlikte çalışmaya dâhil edilen örnekler arasında CC genotipine daha sık rastlanmaktayken TC genotipine kontrol grubunda daha sık rastlanmaktaydı. (Tablo 9).

Tablo 9. T-138C gen polimorfizmi için genotiplerin gruplara göre dağılımı

Genotip	Kontrol (n=57) n (%)	Hasta (n=58) n (%)	<i>P</i>	OR (95% CI)
T/T	24 (42.1)	23 (39.7)		
T/C	26 (45.6)	22 (37.9)	0.762 ⁺	0.883 (0.394-1.977)
C/C	7 (12.3)	13 (22.4)	0.289 [*]	1.938 (0.656-5.721)
Toplam	57 (%100)	58 (%100)		

OR, Odds oranı, CI, güvenlik aralığı

⁺Ki-kare testi

^{*}Fisher's Exact Test

Bu bölge için alellerin gruplar arasındaki dağılımı Tablo 10' da gösterilmiştir.

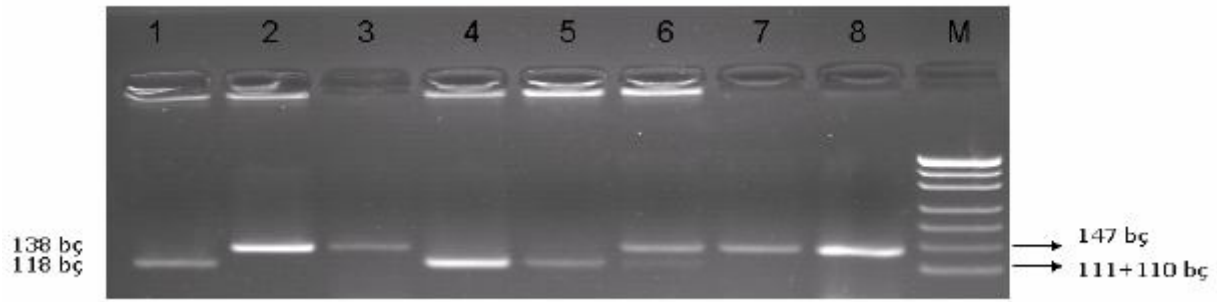
Tablo 10. T-138C gen polimorfizmi için alellerin gruplara göre dağılımı

Alleller	Kontrol (n=57) n (%)	Hasta (n=58) n (%)	<i>P</i>	OR (95% CI)
T	74 (64.9)	68 (58.6)		
C	40 (35.1)	48 (41.4)	0.326 ⁺	1.306 (0.766-2.226)

OR, Odds oranı, CI, güvenlik aralığı

⁺Ki-kare testi

4.2. G-7A GEN POLİMORFİZMİNİN ANALİZİ



Şekil 7. G-7A nükleotid değişiminin RFLP yöntemiyle analiziyle elde edilen bant görüntüsü. PZT sonrası elde edilen 138 bp büyüklüğündeki ürün NcoI enzimi kesimine tabi tutularak örnekler genotiplendirildi. Kesim ürünlerinin % 3'lük agaroz jelde DNA belirteci (pUC19 MspI kesimi) eşliğinde elektroforez edilmesiyle yukarda görülen bantlar elde edildi. -7. pozisyonda G nükleotidinin bulunan örneklerde enzim için gereken kesim bölgesi bulunmamaktadır. Aynı pozisyonda A nükleotidinin bulunması ile enzimin tanıma dizisi oluşmakta, 118 ve 20 baz çifti büyüklüğünde 2 parça üretilmektedir. Buna göre 2,3,7 numaralı örnekler ilgili bölgede GG; 1, 4, 5 numaralı örnekler AA; 6 numaralı örnek GA dizisine sahiptir. 8 numaralı örnek negatif kontrol olarak kullanıldı.

G-7A gen polimorfizmi için KAH saptanmış 58 hastanın ve KAH saptanmamış 57 hastanın DNA'ları analiz edilmiştir. Hasta grubunda GG ve AA genotipine daha sık rastlanmaktayken GA genotipine kontrol grubunda daha sık rastlanmaktaydı. Ancak gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamaktaydı. (Tablo 11).

Tablo 11. G-7A gen polimorfizmi için 3 farklı genotipin gruplara göre dağılımı

Genotip	Kontrol (n=57) n (%)	Hasta (n=58) n (%)	P	OR (95% CI)
G/G	22 (38.6)	23 (39.7)		
G/A	28 (49.1)	23 (39.7)	0.556 ⁺	0.786 (0.352-1.755)
A/A	7 (12.3)	12 (20.6)	0.422 [*]	1.640 (0.546-4.929)

OR, Odds oranı, CI, güvenlik aralığı

⁺Ki-kare testi

^{*}Fisher's Exact Test

Bu bölge için alellerin gruplar arasındaki dağılımı Tablo 12’te gösterilmiştir.

Tablo 12. G-7A gen polimorfizmi için alellerin gruplara göre dağılımı

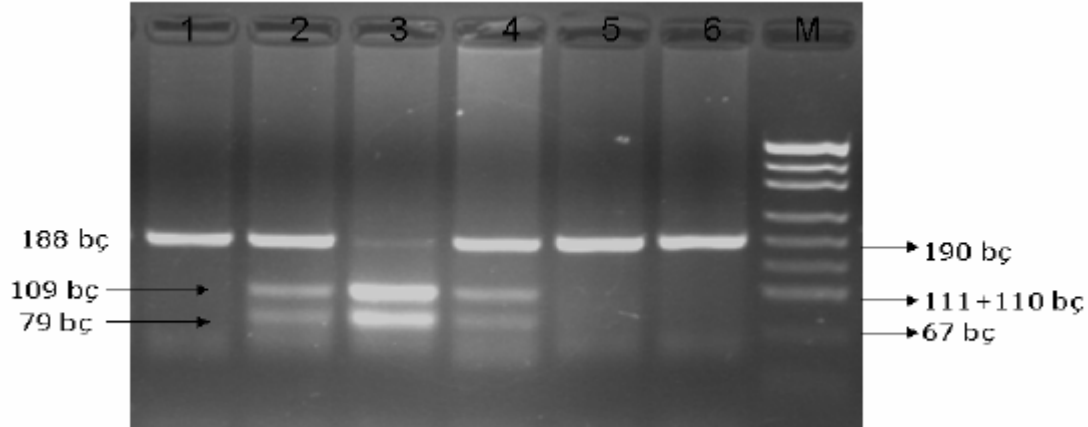
Alleller	Kontrol (n=57) n (%)	Hasta (n=58) n (%)	P	OR (95% CI)
G	72 (63.2)	69 (59.5)		
A	42 (36.8)	47 (40.5)	0.567 ⁺	1.168 (0.686-1.987)

OR, Odds oranı, CI, güvenlik aralığı

⁺Ki-kare testi

*Fisher’s Exact Test

4.3. Thr83Ala GEN POLİMORFİZMİNİN ANALİZİ



Şekil 8. Thr83Ala aminoasit değişimine neden olan A→G nükleotid değişiminin RFLP yöntemiyle analizi sonucu oluşan bant görüntüleri. PZT sonrası elde edilen 188 bp büyüklüğündeki ürün HaeIII enzim kesimine tabi tutularak % 3'lük agaroz jelde elektroforez edildi. İlgili pozisyonda A nükleotidinin bulunması ile HaeIII enzimi uygun kesim bölgesi bulamazken, A→G nükleotid değişimiyle yeni enzim kesim bölgesi oluşmasıyla 109 bp ve 79 bp uzunluğunda 2 DNA parçası oluşmaktadır. Threonin aminoasidini kodlayan ACC kodonunda meydana gelen bu değişim Alanin aminoasidini kodlayan GCC kodonunun

oluşmasına yol açmaktadır. Buna göre 1 ve 5 numaralı örnekler AA alleleline sahip olup proteinin 83. pozisyonunda Thr/Thr aminoasidini bulundururken, 2, 3 ve 4 numaralı örnekler sahip GA allelini taşımakta ve Thr/Ala amioasitlerini ilgili pozisyonunda bulundurmaktadır. 6 numaralı örnek enzim kesimine tabi tutulmayıp negatif kontrol olarak kullanıldı. M= DNA belirteci (pUC19 MspI kesimi)

İlgili bölge için KAH saptanmış 58 hastanın ve KAH saptanmamış 57 hastanın DNA'ları analiz edilmiştir. AG genotipi kontrol grubunda daha fazla bulunmaktayken GG genotipi hasta grubunda daha fazlaydı. Ancak gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamaktaydı. Elde edilen genotipik ve allelik dağılım Tablo 13 ve 14'da görüldüğü gibidir.

Tablo 13. Thr83Ala gen polimorfizmi için 3 genotipin gruplara göre dağılımı

Genotip	Kontrol (n=57) n (%)	Hasta (n=58) n (%)	P	OR (95% CI)
A/A	14 (24.6)	21 (36.2)		
A /G	35 (61.4)	27 (46.6)	0.120 ⁺	0.514 (0.222-1.194)
G/ G	8 (14.0)	10 (17.2)	0.777 [*]	0.833 (0.264-2.632)

OR, Odds oranı, CI, güvenlik aralığı

⁺Ki-kare testi

^{*}Fisher's Exact Test

Tablo 14. Thr83Ala gen polimorfizmi için allellerin gruplara göre dağılımı

Alleller	Kontrol (n=57) n (%)	Hasta (n=58) n (%)	P	OR (95% CI)
A	63 (55.3)	69 (59.5)		
G	51 (44.7)	47 (40.5)	0.518 ⁺	0.841 (0.499-1.420)

OR, Odds oranı, CI, güvenlik aralığı

⁺Ki-kare testi

Üç farklı grupta genotipik ve allelik dağılımları incelenen gen polimorfizmi için elde edilen sonuçlar ki-kare testi ile değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Buna göre gruplar arasında genotipik dağılımda istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Koroner arter hastalığının temel etyolojik nedeni ateroskleroz, endotelial disfonksiyon, vasküler inflamasyon ve intima tabakasında lipid ve inflamatuvar hücre birikimi ile karakterize bir patolojidir (1).

Aterosklerozun gelişmesinde ve progresyonunda hiperlipidemi, sigara içimi, diabetes mellitus ve hipertansiyon gibi klasik risk faktörleriyle birlikte özellikle genç hastalarda genetik risk faktörleri önemi rol oynayabilmektedir.

Genetik faktörlerin KAH gelişiminde rolü % 20-60' dır. (131)

KAH'lı hastaların bir bölümünün herhangi bir önbelirti olmadan akut miyokard infarktüsü veya ani kardiyak ölüm gibi tablolarla karşımıza çıkması, KAH'nın erken tanı ve tedavisinin önemini ortaya koymaktadır. Bu noktada kardiyovasküler hastalıklar için risk profili belirlenmesi ve uygun korunma programına başlanması oldukça önem kazanmaktadır.

Günümüzde sıklıkla kullanılmakta olan ve geleneksel kardiyovasküler risk faktörlerini (yaş,sigara,hiperlipidemi vs.) içeren korunma algoritmaları kişinin risk profilini belirlemede yetersiz kalabilmektedir. Son zamanlarda koroner arter kalsiyum (KAK) skrolama gibi yöntemler üzerinde giderek artan sıklıkta durulmaktadır (2).

KAK skrolama ,koroner ateroskleroz varlığını gösteren tekniklerden biridir. KAK, arteriyel kalsifikasyonun göstergesidir (2).

Koroner arterlerde duvar kalsifikasyonu ile KAH arasında çok güçlü bir ilişki bulunmaktadır (132). Subklinik aterosklerozun bir göstergesi olan KAK yükünün ,kişinin kardiyovasküler riski yönünden konvansiyonel risk faktörlerinden bağımsız olarak prognostik bilgi verdiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (2).

Arterlerde kalsifikasyonu engelleyen en önemli proteinlerden biri MGP'dir. MGP'nin bir kalsifikasyon önleyicisi olduğu MGP geni işlevsel olmayan fare modelleriyle açıkça ortaya konmuştur. Doğumda normal olan farelerde birkaç hafta içinde kıkırdak ve büyüme plaklarında aşırı mineral birikimi ve ana arterlerde şiddetli kalsifikasyonun neden olduğu damar yırtılmaları gözlenmiştir. Doğumdan sonra 8 hafta içinde ise torasik ve abdominal aorttaki hasarlar nedeniyle kaybedilmişlerdir (133).

Normal yapısında kalsifiye olmayan bir hücre dışı matrikse sahip iki hücre tipinde (vaskular düz kas hücreleri ve kondrositler) MGP eksikliğinde şiddetli kalsifikasyonun gözlenmesi MGP'nin doku kalsifikasyonunu önleyici bir makromolekül olduğunu göstermektedir (103). Bununla birlikte MGP ifadesinin yeniden kazandırılmasıyla arteriyel kalsifikasyonun önlendiğini görülmüştür (101).

Laboratuvar ortamında MGP geninde oluşturulan mutasyonlarla MGP'nin kalsifikasyon engelleyicisi olarak etkinlik gösterebilmesinde Gla ünitelerinin büyük öneme sahip olduğu belirlenmiştir . γ -karboksi glutamik asit (Gla); kalsiyum, hidroksi apatit gibi iyonlar için yüksek bağlanma ilgisi oluşturmaktadır. Gla üniteleri sentez sonrası glutamil karboksilaz enzimi, vitamin K ve bikarbonat iyonlarını gerektiren bir reaksiyonla sentez edilirler.

Bu tepkimenin gerçekleşebilmesi;

- 1) proteinin γ -karboksilazla etkileşen tanıma bölgesine sahip olması,
- 2) proteinin biyosentezi esnasında endoplazmik retikuluma taşınması,
- 3) γ -karboksilasyon tanıma bölgesi içinde glutamik asidin de bulunması,
- 4) hücre içinde vitamin K'nın mevcut olması gibi kriterlere bağlıdır .

Matriks Gla proteinde karboksilasyon tanıma bölgesi olgun protein dizisi içinde yer almaktadır . Bu bölgedeki aminoasitler vitamin K-bağımlı karboksilaza doğrudan bağlanabilmektedir. Bu dizide meydana gelecek mutasyonlar γ -karboksilasyonun gerçekleşmesini engellemekte ya da etkinliğini değiştirmektedir (134). Schurgers ve ark. (2005) yapısal özgünlük gösteren antipeptitler kullanarak sağlıklı ve aterosklerotik damar çeperinde Gla ve Glu-MGP'nin yerleşimini incelediği çalışmada sağlıklı damar duvarında MGP'nin Gla şekline rastlanırken, Glu-MGP'nin aterosklerotik plakların kalsifikasyon oluşan kısımlarında bulunduğu belirlenmiştir . Bu dağılım aterosklerotik plaklarda MGP'nin γ -karboksilasyon dönüşümünün yetersiz ya da etkisiz olduğunu ve bu bölgelerde MGP ifadesinde artışın uyarılamadığını göstermektedir (135).

MGP, yapısında fosforile olmuş serin aminoasitlerini de bulundurmaktadır. Ancak bu fosfoserin ünitelerinin MGP aktivitesinde ne derece önemli olduğu henüz bilinmemektedir (98).

Bu çalışmada; arteriyel kalsifikasyonu önleyici role sahip MGP proteininin yapısal ve özendirici gen bölgesinde daha önceden bilinen ve genin ifadesini etkilediği belirlenen tek nükleotid değişimlerinin koroner arter hastalarındaki dağılımı ve KAH ile ilişkisi araştırılmıştır. Farklı hücre tiplerinde MGP ifadesine etkileri incelenen bu tek nükleotid değişimlerinin koroner arterlerdeki MGP ifadesini ve proteinin işlevini ne yönde etkilediği henüz bilinmemektedir.

İlgili değişimler için koroner arter hastalarında yaygın görülen genotipin ve allelin belirlenmesiyle, MGP genindeki bu değişimlerin koroner arter hastalığı için bir yatkınlık oluşturup oluşturmadığı saptanmış olacaktır.

Bu çalışma matriks Gla proteininin işlevinin anlaşılmasına yardımcı olmasının yanında koroner arter hastalığının moleküler tanısı için kullanılabilecek olası allelik belirleyicilerin tespiti amaçlanmıştır. Bu çalışma kapsamında MGP geni yapısal gen bölgesinde ve özendirici bölgede yer alan 3 gen polimorfizmi incelemeye alınmıştır. Bunlar AP-1 transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesi içinde yer alan T-138C, transkripsiyon başlama bölgesinin 7 nükleotid yukarısındaki G-7A ve genin 4. ekzonunda yer alan A→G değişiminin neden olduğu Thr83Ala gen çok yapıllığı hedef bölgeler olarak seçilmiştir.

Ancak; koroner arter hastaları ile koroner arterleri normal olan bireylerin MGP genlerinde kıyaslamalı olarak yapılan bu araştırmada, gruplar arasında ortaya çıkan genotipik ve allelik dağılım ki-kare testi ile analiz edildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmadığı belirlenmiştir .

Çalışmamızın en önemli kısıtlayıcısı olan hasta sayısı genetik polimorfizm sıklığının belirlenmesini, bulgularımızın değerlendirilmesini ve yorumlanmasını güçleştirmektedir. Daha çok sayıda hastada yapılacak genetik çalışma toplumumuzda MGP gen polimorfizmiyle ateroskleroz ve KAH arasındaki ilişkinin tam olarak ortaya konulmasında yardımcı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. NEJM. 1999;340:115-126.
2. Değertekin M. Koroner Kalsiyum Skoru Tayininin Geleneksel Risk Faktörlerine Katkısı Türk Kardiyoloji Arşivi 2008;36(5):352-354
3. Zieman SJ, et al. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25: 932–943
4. Doherty TM, et al. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:11201–11206.
5. Rosenhek R, et al. Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. N Engl J Med 2000; 343:611–617.
6. Blacher J, et al. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. Hypertension 2001; 38: 938–942.
7. London GM, et al. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. Nephrol Dial Transplant 2003; 18: 1731–1740.
8. Proudfoot D, Shanahan CM. Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. Herz 2001; 26: 245–251.
9. Herrmann SM, Whatling C, Brand E, Nicaud V, Gariepy J, Simon A, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Henney A, Cambien F. Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:2386 –2393.
10. Scheid CR, Cao LC, Honeyman T, Jonassen JA. How elevated oxalate can promote kidney stone disease: changes at the surface and in the cytosol of renal cells that promote crystal adherence and growth, Frontiers in bioscience 2004 Jan 1;9, 797–808.

11. Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:379–388.
12. Worcester EM. Inhibitors of stone formation. *Semin Nephrol* 1996;16:474–486.
13. Crawford MH, DiMarco JP. Crawford Kardiyoloji 1. baskı. İstanbul, And Yayıncılık, 2003;1:1-4.
14. Fuster V. Epidemic of cardiovascular disease and stroke: The three main challenges. *Circulation.* 1999;99:1132-1137.
15. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of Disease Study. *Lancet.* 1997;349:1269-1276.
16. Crawford MH, DiMarco JP. Crawford Kardiyoloji. Editör: Dursun AN, 1. Baskı, AND Yayıncılık, İstanbul, 2003;1:2-14.
17. Libby P. The Vascular Biology of Atherosclerosis. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. Braunwald's Heart Disease. 7 th Edition. Elsevier Saunders. 2005;35:921-939.
18. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet.* 1999;354:1234-1241.
19. Kaş Y, Şahin M. Ateroskleroz, Aterotromboz ve Kardiyovasküler Korunma, İstanbul: Avantis Pharma Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi. 2003.
20. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glasgov S, Insuull WJr, Richardson M, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis prone regions. *Circulation.* 1992;85:391-405.
21. Schwartz SM, Helmark RL, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev.* 1990;70:1177-209.

- 22.** Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis an update. NEJM. 1986;314:488-500.
- 23.** Crawford MH, DiMarco JP. Crawford Kardiyoloji 1. baskı. İstanbul, And Yayıncılık, 2003;2:1-3.
- 24.** Reidy MA, Fingerle J, Lindner V. Factors controlling the development of arterial lesions after Injury. Circulation. 1992;86:11143-6.
- 25.** Ross R, Glomset, JA. The pathogenesis of atherosclerosis. NEJM.1976;295:420-5.
- 26.** Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. NEJM. 1989;320:915-25.
- 27.** Nagai M, Kamide K, Rakugi H, Takiuchi S, Imai M, Kida I. Role of Endothelin-1 Induced by Insulin in the Regulation of Vascular Cell Growth. Am JHypertens. 2003;16:223-228.
- 28.** Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the apoE-deficient Mouse. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998;18:842-843.
- 29.** Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. Trends Mol Med. 2003;9:263-264.
- 30.** Topol EJ, Califf RM, Thomas JD, Isner JM, Thompson PD, Young JB, et al. Textbook of Cardiovascular Medicine. 2005;1:5-56.
- 31.** Faulx MD, Wright AT, Hoit BD. Detection of Endothelial Dysfunction With Brachial Artery Ultrasound Scanning. Am Heart J. 2003;145:943-951.
- 32.** Çurgunlu A. Asimetrik Dimetilarginin (ADMA), Endotel Disfonksiyonu ve Ateroskleroz. Folia Hipertansiyon Diyabet Ateroskleroz Dergisi. 2005;5(1):5-8.

- 33.** Yang Y, Loscalzo J. Regulation of Tissue Factor Expression in Human Microvascular Endothelial Cells by Nitric Oxide. *Circulation*. 2000;101:2144-2148.
- 34.** Irving RJ, Noon JP, Watt GCM, Webb DJ, Walker BR. Activation of the Endothelin System in Insulin Resistance. *Q J Med*. 2001;94:321-326.
- 35.** Sainani GS, Maru VG, Mehra AP. Role of Endothelin-1 in Genesis of coronary Artery Disease. *Indian Heart J*. 2005;57:121-127.
- 36.** Wheatcroft SB, Kearney MT, Shah AM, Grieve DJ, Williams IL, Miell JP, et al. Vascular Endothelial Function and Blood Pressure Homeostasis in Mice Overexpressing IGF Binding Protein-1. *Diabetes*. 2003;52:2075-82.
- 37.** Murphy JG, Lloyd MA. *Mayo Clinic Cardiology Concise Textbook*. 2008;715-1338.
- 38.** Navab M, Berliner JA, Watson AD, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arteriosclerosis Thrombosis Vase Biol*. 1996;16:831-42.
- 39.** Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherosclerosis. *Science*. 1991;251:788-91.
- 40.** Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*. 2001;29(2):358-362.
- 41.** Weinbrenner T, Cladellas M, Covas MI, Fito M, Tomas M, Senti M. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2003;168:99-106.
- 42.** Ndrepepa G, Braun S, Beckerath Nv, Mehilli J, Gorchakova O, Vogt W. Oxidized low density lipoproteins, statin therapy and severity of coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta*. 2005;360:178-186.
- 43.** Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*. 1997;272:20963-6.

44. Krieger M, Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Penman M, Resnick D. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. *J Biol Chem.* 1993;268:4569-72.
45. Crawford MH, DiMarco JP. Crawford Kardiyoloji 1. baskı. İstanbul, And Yayıncılık, 2003;1:1-8.
46. Bayram AA. Tanısı yeni konulmuş hipertansiyon, Hiperlipidemi ile hipertansiyon ve hiperlipidemisi birlikte bulunan bireylerin diyet yağ asidi örüntüsü ve beslenme alışkanlıklarının değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniv. Sağlık Bilimleri Ens. Diyetetik Prog. Ankara. 2006.
47. Crawford MH, DiMarco JP. Crawford Kardiyoloji 1. baskı. İstanbul, And Yayıncılık, 2003;1:2-7.
48. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith SJr, Fuster V. Assesment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assesment equations: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation.* 1999;100
49. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). 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) final report. *Circulation.* 2002;106:3143-3421.
50. Hergenç G. Lipoprotein Fizyolojisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medicine Sciences.* 2005;1(20):1-11.
51. Flavahan NA. Atherosclerosis or lipoprotein induced endothelial dysfunction: Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation.* 1992;85:1927-1938.

- 52.** National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). 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) final report. *Circulation*. 2002;106:3143–3421.
- 53.** Manninen V, Huttunen JK, Heinonen OP, Tenkanen L, Frick MH. Relation between baseline lipid and lipoprotein values and the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Am J Cardiol*. 1989;63:42-47.
- 54.** Genest JJr, Martin-Munley SS, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner J, Myers RH. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation*. 1992;85:2025-2033.
- 55.** ACC/AHA Guideline Update for the Management of Patients With Chronic Stable Angina Summary Article. A Report of the American College of Cardiology/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. (Committee on the Management of Patients With Chronic Stable Angina) *Circulation*. 2003;107-149.
- 56.** Wilhelmsson C, Elmfeldt D, Elmfeldt D, Tibblin G, Wilhelmsen L. Smoking and myocardial infarction. *Lancet*. 1975;1:415-19.
- 57.** Ridker PM, Libby P. Risk Factors for Atherothrombotic Disease. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. *Braunwald's Heart Disease*. 7 th Edition. Elsevier Saunders. 2005;36:939-959.
- 58.** Kannel WP: Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *JAMA*. 1996;275:1571-76.
- 59.** Wong ND, Cupples LA, Ostfeld AM, Levy D, Kannel WB. Risk factors for long-term coronary prognosis after initial myocardial infarction: the Framingham Study. *Am J Epidemiol*. 1989;130:469-80.
- 60.** Ridker PM, Libby P. Risk Factors for Atherothrombotic Disease. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. *Braunwald's Heart Disease*. 7 th Edition. Elsevier Saunders. 2005;36:939-959.

- 61.** Staessen JA, Gasowski J, Wang JG, Thijs L, DenHold E, Boissel JP. Risks of untreated and treated isolated systolic hypertension in the elderly: Meta-analysis of outcome trials. *Lancet*. 2000;355:865-872.
- 62.** Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV. Diabetes and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 1999;100:1134-1140.
- 63.** Haffner SM, Letho S, Ronnema T, Pyörala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Eng J Med*. 1998;339: 229-234.
- 64.** Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15th Edition. 2001:1377-1387.
- 65.** Ulusal Kalp Sağlığı Politikası Ana İlkeleri. TKD, 2006.
- 66.** Pate RR, Pratt M, Blair SN. Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA*. 1995;273:402-7.
- 67.** World Health Organisation. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva: WHO; 2000.
- 68.** Rao SV, Donahue M, Pi-Sunyer X, Fuster V. Obesity as a risk factor in coronary artery disease. *Am Heart J*. 2001;142:1102-7.
- 69.** Celejermajer DS, Sorenson K, Ryalls M. Impaired endothelial function occurs in systemic arteries of children with homozygous homocysteinuria but not in their heterozygous parents. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:854-58.
- 70.** Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res*. 1980;18:113-21.

71. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:6369-73.
72. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.* 2000;1020:2165-2168.
73. Albert CM, Ma J, Rifai N, Stampfer MJ, Ridker PM. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation.* 2002;105:2595-2596.
74. Mueller C, Buettner HJ, Hodgson JM, Marsch S, Perruchoud AP. Inflammation and long term mortality after non- ST elevation acute coronary syndrome treated with a very early invasive strategy in 1042 consecutive patients. *Circulation.* 2002;105:1412-1415.
75. Griffin BP, Topol EJ. *Manual of Cardiovascular Medicine.* Lippincott Williams & Wilkins, 2th Edition USA, 2004;525:550-555.
76. Weksler BB. Hemostasis and thrombosis in Douglas PS (ed): *Cardiovascular health and disease in women.* Philadelphia, WB Saunders. 1993;58:231-38.
77. Cantin B, Gagnon F, Moorjani S, Despres JP, Lamarche B, Lupien PJ, Dagenais GR. Is lipoprotein (a) an independent risk factor for ischemic heart disease in men? The Quebec Cardiovascular Study. *JACC.* 1998;31:519-525.
78. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. Braunwald E (editor). *Heart Disease.* 5. Baski. Philadelphia: WB Saunders, 1997:1105-1125.
79. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association *Circulation.* 1995 Sep 1;92(5):1355-74

- 80.** Öngen Z, Yılmaz Y. Aterosklerozun Patogenezi. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2006;2:1-9.
- 81.** Crawford MH, DiMarco JP, Asplund K, Carabello BA, Drexler H, Falk E, et al. Crawford Kardiyoloji. Ülker T (Çeviren). 1. Baskı, İstanbul: AND,2003.
- 82.** Öztürk Ü. Aterosklerotik Okluziv Koroner Arter Hastalığı Ve Koroner Arter Ektazisi İle Normal Koroner Arter Anatomili Olgularda Adiponektin Düzeylerinin Karşılaştırılması Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, KardiyolojiBölümü, 2007.
- 83.** Vermeer C. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. Biochem J. 1990 Mar 15;266(3):625–36
- 84.** Price PA Gla-containing proteins of bone Connect Tissue Res. 1989;21(1–4):51–7
- 85.** Ikeda T, Shirasawa T, Esaki Y, Yoshiki S, Hirokawa K. Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. J Clin Invest. 1993 Dec;92(6):2814–20
- 86.** Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. J Clin Invest. 1994 Oct;94(4):1597–604
- 87.** Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. J Clin Invest. 1993 Oct;92(4):1686–96
- 88.** Doherty TM, Detrano RC. Coronary arterial calcification as an active process: a new perspective on an old problem. Calcif Tissue Int. 1994 Mar;54(3):224–30
- 89.** Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions J Clin Invest. 1993 Apr;91(4):1800–9

- 90.** Ross R. the pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature* 1993; 362:801 -9
- 91.** Detrano RC, Wong ND, French WJ, Tang W, Georgiou D, Young E, Brezden OS, Doherty T, Brundage BH Prevalence of fluoroscopic coronary calcific deposits in highrisk asymptomatic persons. *Am Heart J.* 1994 Jun;127(6):1526–32
- 92.** Goel M, Wong ND, Eisenberg H, Hagar J, Kelly K, Tobis JM. Risk factor correlates of coronary calcium as evaluated by ultrafast computed tomography *Am J Cardiol.* 1992 Oct 15;70(11):977–80
- 93.** Hoeg JM, Feuerstein IM, Tucker EE Detection and quantitation of calcific atherosclerosis by ultrafast computed tomography in children and young adults with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb.* 1994 Jul;14(7):1066–74.
- 94.** Mahoney LT, Burns TL, Stanford W, Thompson BH, Witt JD, Rost CA, Lauer RM. Coronary risk factors measured in childhood and young adult life are associated with coronary artery calcification in young adults: the Muscatine Study *J Am Coll Cardiol.* 1996 Feb;27(2):277–84.
- 95.** Timins ME, Pinski R, Sider L, Bear G The functional significance of calcification of coronary arteries as detected on CT. *J Thorac Imaging.* 1991 Dec;7(1):79–82
- 96.** Fraser JD, Price PA. Lung, heart and kidney express high level of mRNA for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the γ -carboxylase. *J Biol Chem* 1988; 263:11033.
- 97.** Hale JE, Fraser JD, Price PA. The identification of matrix Gla protein in cartilage, *J Bio Chern* 1988; 263,5820–5824.
- 98.** Hackeng TM, Rosing J, Spronk HMH, Vermeer C. Total chemical synthesis of human matrix Gla protein, *Protein Sci* 2001; 10, 864–870.

- 99.** Cancela L, Hsieh CL, Francke U, Price PA. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *J Biol Chem* 1990; 265, 15040–15048.
- 100.** Price, PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla protein, a new γ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 117, 765–771.
- 101.** Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP, Van Maldergem L, Ziereisen F, Yuksel B, Gardiner RM, Cung E. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* 1999;21,142–144.
- 102.** Luo G, D'souza R, Jogue D, Karsenty G. The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during development. *J Bone Miner Res* 1995; 10, 325–334,
- 103.** Luo G, Ducky P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386:78–81.
- 104.** Price PA, et al. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7734–7738.
- 105.** Howe AM, Webster WS. The warfarin embryopathy: a rat model showing maxillofacial hypoplasia and other skeletal disturbances. *Teratology* 1992; 46: 379–390.
- 106.** Hale JE, et al. The identification of matrix Gla protein in cartilage. *J Biol Chem* 1988; 263: 5820–5824.
- 107.** Luo G, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386: 78–81
- 108.** Schurger LJ, Cranenburg EC, Vermeer C. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost.* 2008 Oct;100(4):593-603.

- 109.** Munroe PB, et al. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* 1999; 21: 142–144.
- 110.** Blacher J, et al. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 2001; 38: 938–942.
- 111.** London GM, et al. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1731–1740.
- 112.** US Renal Data System. *USRDS 1998 annual data report*. Bethesda: National Institute of Diabetes and Kidney Diseases. 1999; 63–90.
- 113.** Huang H, et al. The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation* 2001; 103: 1051–1056.
- 114.** Shanahan CM. Inflammation ushers in calcification: a cycle of damage and protection? *Circulation* 2007; 116: 2782–2785.
- 115.** Cranenburg EC, et al. The circulating inactive form of Matrix Gla Protein (ucMGP) as a biomarker for cardiovascular calcification. *J Vasc Res* 2008; 45: 427–436.
- 116.** Benoist C, O'Hare K, Breathnach R, Chambon P. The ovalbumin gene sequence of putative control regions. *Nucleic Acids Res* 1980 Jan 11; 8(1):127–142.
- 117.** Lee W, Haslinger A, Karin M, Tjian R. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 325 (6102):368–372.
- 118.** Pamela J. Mitchell, Charlotte Wang, and Robert Tjian. Positive and negative regulation of transcription in vitro: Enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen, *Cell* 1987; 50, 847–861.
- 119.** Short, JM, Wynshaw-Boris A, Short HP, Hanson RW. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) promoter regulatory region. *J Biol Chem* 1986; 261, 9721–9726.

- 120.** Karin M, Haslinger A, Holtgreve H, Richards RI, Krauter PA, Westphal HM, Beato M. Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA, *Nature* 1984; 308, 513 – 519.
- 121.** de The H, Vivanco-Ruiz MM, Tiollais P, Stunnenberg H, Dejean A. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor β gene. *Nature (Lond)* 1990; 343, 177– 180.
- 122.** Cancela ML, Price PA. Retinoic acid induces matrix Gla protein gene expression in human cells. *Endocrinology* 1992; 130,102– 108.
- 123.** Tsukamoto K, Orimo H, Hosoi T, Miyao M, Yoshida H, Watanabe S, Suzuki T. Association of bone mineral density with polymorphism of the human matrix Gla protein locus in elderly women, *J Bone Miner Metab*, 2000; 18: 27–30.
- 124.** Proudfoot D, Shanahan CM. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology* 2006; 11, 455–461
- 125.** Herrmann SM, Whatling C, Brand E, Nicaud V, Gariepy J, Simon A et al, Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20, 2386–93.
- 126.** Farzaneh-Far A, Davies JD, Braam LA, Spronk HM, Proudfoot D et al. A polymorphism of the human matrix gamma-carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein–1 complex and is associated with altered transcription and serum levels. *J Biol Chem* 2001; 276,32466–73.
- 127.** Wang K, Honda H, Qureshi AR, Pecoits-Filho R, Axelsson J, Nordfors L et al. The matrix GLA protein –138 genotype is associated with clinical outcome in end-stage renal disease patients. ERA-EDTA XLI Congress 2004;May 15–18, , Lisbon, Portugal.
- 128.** Brancaccio D, Biondi ML, Gallieni M, Turri O, Galassi A,Cecchini F, Russo D, Andreucci V,Cozzolino M. Matrix Gla protein gene polymorphisms: Clinical correlates and cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients, *Am J Nephrol* 2005;25: 548–552.

- 129.** Gao B, Yasui T, Itoh K, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. A Polymorphism of Matrix Gla Protein Gene is Associated With Kidney Stones, *The Journal Of Urology* 2007, 177; 2361-2365
- 130.** Cantürk M. Böbrek taşı hastalarında bikunin gen çokyapılılığı ve mutasyon taraması. Yüksek Lisans Tezi. Gaziantep Üniversitesi. 2005, 30–31.
- 131.** Napoli C, Glass CK, Witztum JL, et al. Influence of maternal hypercholesterolemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet* 1999;354:1234–1241.
- 132.** Raggi P, Callister TQ, Shaw LJ. Progression of coronary artery calcium and risk of first myocardial infarction in patients receiving cholesterol-lowering therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jul;24(7):1272–7
- 133.** Yasui T, Fujita K, Sasaki S, Sato M, Sugimoto M, Hirota S, Kitamura Y, Nomura Y, Kohri K. Expression of bone proteins in urolithiasis model rats. *Urol Res* 1999; 27: 255–261.
- 134.** KIZILYER A. Matriks Gla Protein (Mgp) Geni Çokyapılılığının Böbrek Taşı Hastalarında Araştırılması ,Yüksek Lisans Tezi Gaziantep Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü,Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ; 2007
- 135.** Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH et al. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: Undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 2005; 25: 1629–33.