

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

GLUTATYON S-TRANSFERAZ GENİNDEKİ DELESYONLARIN
(GSTT1 VE GSTM1) KORONER ARTER HASTALIĞI VE AKUT
MİYOKART İNFARKTÜSÜ İLE İLİŞKİSİ

SEMRA KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

ADANA – 2008

**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GLUTATYON S-TRANSFERAZ GENİNDEKİ DELESYONLARIN
(GSTT1 VE GSTM1) KORONER ARTER HASTALIĞI VE AKUT
MİYOKART İNFARKTÜSÜ İLE İLİŞKİSİ**

SEMRA KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Davut ALPTEKİN**

**Bu tez Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri TF2007YL3 nolu proje olarak
desteklenmiştir.**

Tez No:.....

ADANA - 2008

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütölmüş olan “Glutasyon S-Transföraz Genindeki Delesyonların (GSTT1 ve GSTM1) Koroner Arter Hastalığı ve Akut Miyokart İnfarktüsü ile ilişkisi” adlı çalışma aşğıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19/08/2008

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN
Çukurova Üniversitesi

Prof. Dr. Osman DEMİRHAN
Çukurova Üniversitesi

Doç. Dr. Akif ÇÜRÜK
Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki tez, yönetim kurulununtarih ve
.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Halil KASAP

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde beni destekleyen, yönlendiren, tez çalışmalarımın her aşamasında bilimsel ve sosyal katkılarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan, başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Osman DEMİRHAN olmak üzere Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerimize teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tez aşamasında her türlü desteklerini esirgemedikleri için, Öğr. Gör. Ali İrfan GÜZEL, Uzman Dr. Ayfer PAZARBAŞI ve laboratuvar çalışmalarında deneyimlerini paylaşarak tez çalışmamı kolaylaştıran Biyolog Sabriye Kocatürk Sel'e teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, manevi ve maddi desteklerini esirgemeyen ve sonuna kadar yanımda olacaklarına inandığım aileme özellikle onu dünyadaki bütün varlıkların üzerinde tuttuğum anneciğime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	İ
TEŞEKKÜR	İi
İÇİNDEKİLER	İii
ŞEKİLLER DİZİNİ	Vi
TABLolar DİZİNİ	Vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	Vii
ÖZET	X
ABSTRACT	Xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Aterosklerozun İnsidansı ve Prevalansı	3
2.3. Türkiye’de Ateroskleroza Bağlı Olayların İnsidansı ve Prevalansı	4
2.4. Tanımlar	5
2.4.1. Koroner Arter Hastalığı	5
2.4.2. Normal Arter Duvarı	5
2.5. Aterogenezde Rol oynayan Hücreler	7
2.5.1. Endotel Hücresi	7
2.5.2. Düz Kas Hücreleri	8
2.5.3. Makrofajlar	8
2.5.4. Trombositler	9
2.5.5. T lenfositleri	9
2.6. Aterogenezde Rol Alan Maddeler	10
2.6.1. Adezyon Molekülleri	10
2.6.2. Stokinler ve İnflamasyon Mediyatörleri	10
2.6.3. İnflamasyon Biomarker’leri	10
2.6.4. Büyüme Faktörleri	11
2.7. Aterosklerozun Lezyonları	11
2.7.1. Yağlı çizgi	11
2.7.2. Yaygın İntima Kalınlaşması	12
2.7.3. Fibröz Plak	12
2.8. Etiyolojisi	13
2.8.1. Serum Lipidlerinde Yükseklik	13
2.8.2. Diyet	13
2.8.3. Hipertansiyon	13
2.8.4. Diyabet	14
2.8.5. Sigara	14
2.8.6. Yaş	14
2.8.7. Cinsiyet	15

2.8.8. Aile Hikayesi	15
2.8.9. MTHFR (Metilen TetraHidrofolat Redüktaz)	15
2.8.10. Lipoprotein Metabolizması	15
2.8.10.1. HDL	15
2.8.10.2. LDL	16
2.8.10.3. Trigliseridler	16
2.8.11. GST (Glutasyon S-Transferaz)	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.2. Gereç	24
3.3. Kullanılan Başlıca Cihazlar ve Teknik Malzemeler	25
3.4. Yöntem	25
3.4.1. DNA İzolasyonu	26
3.4.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi	27
3.4.3. GST Geninin GSTT1 ve GSTM1 Polimorfizmleri İçin PCR Amplifikasyonu	27
3.4.4. PCR Ürününün Elektroforezi	30
3.4.4.1. Jelin Değerlendirilmesi	30
4. BULGULAR	31
4.1. Hasta Grubunun Genel Bilgileri	31
4.2. Pedigri bulguları	32
4.3. GST Gen polimorfizmleri	38
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖRNEKLER	47
7. KAYNAKLAR	48
EKLER	51
EK-1. Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Hazırlanışı	51
1.1. Lizis Tamponu	51
1.2. Fizyolojik Tampon	52
1.3. TE-9	52
1.4. SDS (Sodyum Dedosil Sülfat)	52
1.5. TE Tamponu	52
EK-2. PCR	53
2.1. Bir PCR Reaksiyonu İçin Gerekli olan Bileşenler ve Fonksiyonları	54
2.1.1. Kalıp Genomik DNA	54
2.1.2. Primerler	54
2.1.3. Reaksiyon Tamponu	55
2.1.4. DNA Polimeraz	55
2.1.5. Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTPs)	55
2.2. PCR Reaksiyonun Hazırlanması	55
EK-3. Jel Elektroforezi	57
3.1. DNA'nın Moleküler Büyüklüğü	57
3.2. Agaroz Konsantrasyonu	58
3.3. DNA'nın Konformasyonu	58
3.4. Uygulanan Voltaj	58

3.5. Elektrik Akımının Yönü	59
3.6. Baz Kompozisyonu ve Isı	59
3.7. Boyaların Etkisi	59
3.8. Elektroforez Tamponunun Kompozisyonu	59
EK-4. Agaroz Jelin Hazırlanması	61
4.1. Yükleme Tamponu (6X)	61
4.2. 5X TBE Tamponu (pH 8.0)	61
4.3. Ethidium Bromid (EtBr=10 mg/ml)	62
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1	Normal arter duvarının yapısı	6
Şekil 2	GSTT1 polimorfizmi için 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü	41
Şekil 3	GSTT1 polimorfizmi için 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü	42
Şekil 4	GSTT1 polimorfizmi için 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü	42
Şekil 5	GSTM1 polimorfizmi için 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü	43
Şekil 6.	GSTM1 polimorfizmi için 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 ve 86 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.	43
Şekil 7	GSTT1 ve GSTM1 Polimorfizimleri için 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.	44
Şekil 8	GSTT1 ve GSTM1 polimorfizmi için 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.	44

TABLÖLAR VE PEDİGRİLER DİZİNİ

Tablo 1	GSTT1 polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu	28
Tablo 2	GSTT1 polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu	29
Tablo 3	Çalışma grubunun cinsiyet ve yaş grubuna göre dağılımı	31
Tablo 4	Koroner arter hastası olan, yaşayan ve ölen d cinsiyet ve sigara içme durumuna göre dağılımı	32
Tablo 5	Çalışma grubunu oluşturan bireylerin genel bilgileri	32
Tablo 6	Agaroz ve akrilamid konsantrasyonları ve ayırabildikleri DNA büyüklükleri	57
Pedigri 1	Probandın ilk görüldüğü I. ve II. Kuşağın pedigrisi	32
Pedigri 2	74 yaşında vefat eden ve II. kuşakta kalp hastası olmayan tek erkek kardeşin ailesinin pedigrisi 3. ve 4. kuşakta ortaya çıkan erken ölümler	33
Pedigri 3	66 yaşında kalp hastalığı nedeniyle vefat eden II. kuşak 2. erkek kardeşin ailesinin pedigrisi ve III. kuşakta ortaya çıkan kalp hastalıkları.	34
Pedigri 4	Kendisi 75 yaşında vefat eden eşi de 72 yaşında kalp hastalığından vefat eden II. kuşak 3. erkek kardeşin ailesinin pedigrisi ve III. kuşakta ortaya çıkan erken kalp ölüm vakası	35
Pedigri 5	Kendisi 85 yaşında eşi de 80 yaşında her ikisi de kalp hastası olan II. kuşak 4. erkek kardeşin ailesinin pedigrisi ve III. kuşakta ortaya çıkan vakalar	36
Pedigri 6	Kendisi 66 yaşında kalp hastalığından vefat eden tek yumurta ikiz kardeşlerden birinin ailesinin pedigrisi ve III kuşakta ortaya çıkan vakalar	37
Pedigri 7	Kendisi 65 yaşında kalp hastalığından vefat eden tek yumurta ikiz kardeşlerden diğeri olup ailesinin pedigrisi ve III. kuşakta ortaya çıkan vaka	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
A	Alfa
A	Amper
ABCA1 geni	ATP Binding Cassette Sub-Family A
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADP	Adenin Difosfat
AHA	Amerikan Kalp Birliği
AMİ	Akut Miyokart İnfarktüsü
Bç	Baz çifti
C	Sitozin
CAD	Koroner Arter Hastalığı
cGST	Sitoplazmik GST
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	deoksi Nükleotid Trifosfat
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
G	Guanin
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon S Transferaz
GSTM1	Glutasyon S Transferaz mü 1
GSTT1	Glutasyon S Transferaz teta 1
HB-GF	Heparin Bağlayan Epidermal Büyüme Faktörü
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
ICAM-1	İnterselüler Adezyon Molekül-1
IFN γ	İnterferon γ
IL-1	İnterlökin 1
KAH	Koroner Arter Hastalığı
K.A.K.H.	Aterosklerotik Kalp Hastalıkları
Kb	Kilobaz
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
L	Litre
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
μ	Mikro
M	Mü
MAC-1	Makrofaj Antijen-1
MCP-1	Monosit Kemotaktik Protein-1
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
MMP	Metalloproteinaz
MTHFR	Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
NaCl	Sodyum Klorür

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

NF- κ B	Nükleer Faktör κ B
NO	Nitrik Oksit
P	Pi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGI ₂	Prostasiklin
RNA	Ribo Nükleik Asit
T	Teta
T	Timin
TBE	Tris Borik Asit-EDTA
TE	Tris Edta
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TEKHARF	Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı Risk Faktörleri
T _m	Erime ısısı
TNF α	Tümör Nekroz Faktörü alfa
UV	Ultra Viyole
V	Volt
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekül-1
VLA-4	Geç Aktivasyon Antigen-4
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinlerin
Z	Zeta

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Koroner kalp hastalığı olarak da bilinen koroner arter hastalığı (KAH), gelişmiş batı ülkelerinde en yaygın kardiyovasküler hastalıktır. Türkiye’de de kalp hastalıkları ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır. Amerika’da tüm ölümlerin 1/3’ine, kalp kökenli ölümlerin de %50-75’ine neden olmakta; yaklaşık olarak yılda 500 bin kişi bu hastalıktan yaşamını yitirmektedir^{1,2,3}.

KAH, birincil olarak erkekleri etkilemekte, ilk miyokart infarktüsü geçirme yaşı ortalama 50 yaş civarında gözlenmektedir³. Kadınlar, erkeklerde görülen ölüm oranlarını 10 yıl geriden takip etmektedirler⁴. 40 yaşından önce KAH görülme oranı 1/8, 40-60 yaş arası 1/4 ve 70 yaşından sonra 1/1’dir. Erkeklerde en yüksek insidans 50-60 yaşlarında, kadınlarda ise 60-70 yaş arasındadır⁵. KAH’ye bağlı ölüm oranı kadın ve erkeklerde 50 yaşlarında eşitlenir. Bunun nedenleri arasında, menopozdan sonra kadınlarda riskin daha fazla olması veya yüksek risk altındaki erkeklerin erken yaşlarda ölmesi gelmektedir⁴.

Epidemiyolojik çalışmalarla KAH, kişilik, genetik yapı ve çevre etmenleri ile ilişkilendirilmiştir. 1981’de Hopkins ve Williams, KAH ile ilgili 240 üzerinde risk etmenlerini kapsayan bir liste yayımlamışlardır. Bunlar arasında sigara içimi, artmış LDL-K ve total kolesterol, düşük HDL-K, hipertansiyon, durağan yaşam, obezite ve diyabet yer almaktadır⁶.

Bunun yanı sıra KAH’ye neden olabilen pek çok genetik etmen ortaya konmuş olup, uzun süredir araştırılmaktadır⁷. Özellikle sigara kullananlarda toksik maddelerin atılımı için metabolizmalarında bazı enzimlerin de aktif olması gereklidir. Bu enzimlerden en önemlisi Glutasyon S-transferaz (GST) olup ksenobiyotik metabolizması enzimlerinin süper aileleridir⁸. GST enzim grubu endojen ve eksojen toksinlerin ve kanserojenlerin detoksifikasyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir⁹. Bu enzimin 5 alt sınıfı vardır. Bunlar GST alfa(A), mu (M), pi (P), teta (T) ve zeta (Z)’dir. Buna ilaveten alt sınıflar birkaç gen ve izoenzimleri içerirler.

GSTM1 geni ürünü sigara da bulunan temel karsinojenlerden polisiklik aromatik hidrokarbonların parçalanmasında önemli rol oynar. Bu genin ürünü ayrıca doğal olarak

oluşan monoholometanların, diklorometanların ve etilen oksitlerin detoksifikasyonunda önemli rol oynar^{9,10}.

GSTM1 ve GSTT1 genlerindeki polimorfizmler enzim aktivitesinin azalmasına özellikle her iki gendeki homozigot delesyonlar (null genotip) enzimin tamamen aktivitesini kaybetmesine neden olmaktadır. Bu da sigara ile ilişkili kanser ve koroner arter hastalıklarının oluşumuna zemin hazırlamaktadır¹¹⁻¹². Hayvanlarla yapılan çalışmalarda da sigaradaki kimyasalların GST enzimini azalttığı ve aterosklerotik plak oluşumunu uyardığı bildirilmiştir¹³. GSTT1 ve GSTM1 genlerindeki delesyonlar GST enziminin aktivitesini azaltmakta, özellikle sigara içenlerde koroner arter hastalığının gelişimine katkıda bulunduğu birçok çalışmada bildirilmiştir^{10, 12, 14-15}. Yine GSTM1 ve GSTT1 genindeki null genotipinin KAH'nın ya da akut miyokard infarktüs (AMİ)'ün risk faktörü olduğu da bildirilmiştir¹⁶.

Bu çalışma; soy ağacı bilinen, 1.-4. kuşaklarda KAH ve AMİ olan, yaklaşık 200 kişinin oluşturduğu bir ailenin bulunabilen 100 bireyinden kan örneği alınarak yapıldı. KAH ve AMİ olan bireyler önceden bilinmektedir. Bu ailede koroner arter hastalıklarının GST geni ile ilişkili olup olmadığı araştırıldı. Eğer, GST genindeki (GSTT1 ve GSTM1) delesyonlar KAH ile ilişkili olduğu saptanırsa bu ailede önceden gerekli önlemlerin alınması sağlanacak, koroner kalp hastalıklarının önlenilmesine çalışılacaktır. Böylece, sağlık açısından yapılacak olan gereksiz harcamaların ve de mali kayıpların önüne de geçmiş olunacaktır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Tarihçe

Koroner arter hastalığı (KAH) dünyada yaygın bir şekilde görülen, yaşın ilerlemesine paralel olarak önem kazanan bir ölüm nedenidir.

Tarihçesine bakıldığında, II. CHARLES tarafından 1661'de CLARENDON Lordluğu verilen EDWARD HYDES'in biyografisinde angina pektorisin ilk tanımlarından biriyle karşılaşırız.

100 yıl sonra WILLIAM HEBERDEN, 1768 yılında verdiği bir konferansta EDWARD HYDES'in bulduğu tabloya angino pektoris adını verdi ve semptomlarını tanımladı.

JOHN FOTHERGILL ve JOHN HUNTERS'ın yazılarında 18. yüzyıl sonu ile 19. yüzyıl başlarında yaşlılarda koroner bozukluklar teşhis edildiğini kanıtlayan açıklamalar mevcuttur.

HERRICK'in 1912'de yayınlanmış olan araştırma sonuçları, miyokard infarktüsünün patolojik ve klinik tablosuna ilişkin bilgilerimizin temelini oluşturur; bunlar zamanla klinik uygulamada kabul edilmiştir.

1970 yıllarında, hemodinamik özellikler ve kardiyojenik şokla ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

1977 yılında koroner angioplasti yapılmıştır.

Koroner arter hastalığı ile ilgili olarak halen pek çok araştırmalar yapılmakta olup, yeni yeni koruyucu ve tedavi edici etkinliklerle ilgili çalışmalar sunulmaktadır¹⁷.

2.2. Aterosklerozun İnsidansı ve Prevalansı

Her yıl yaklaşık 4 milyon Avrupalı kardiyovasküler hastalıklar ve onun komplikasyonları (Koroner arter hastalıkları, miyokard infarktüsü, stroke, venöz tromboz, vb) yüzünden ölmektedir. Meydana gelen ölüm olaylarının %46'sından fazlası kardiyovasküler hastalıklar sorumludur¹⁸.

Aterotromboz toplumda en sık rastlanan kardiyovasküler hastalık olup, aynı zamanda en fazla sakatlanmaya ve ölüme yol açan hastalıktır. Ana belirtilerini koroner arter hastalıkları ve iskemik felç olarak yapar. Kuzey Amerika ve Avrupa'daki ölümlerin üçte birinden sorumludur. ABD ve Avrupa'da (17 Batı Avrupa ülkesinde) yıllık miyokard infarktüs insidansı (yeni olgu/yılda) 2.1 milyondur. Ancak aterotrombotik olaylara bağlı gelişen komplikasyonlar bir bölgeden bir bölgeye değişmektedir. Tıkalı miyokard olaylarının ABD'de (350 yeni olgu/100.000/yıl) diğer Avrupa ülkelerine (Fransa; 150 olgu; İtalya 150 olgu; İngiltere 250 olgu/100.000 populasyon/yılda) göre insidansı daha fazladır²⁷.

2.3. Türkiye'de Ateroskleroza Bağlı Olayların İnsidans ve Prevalansı

Ülkemizde epidemiyolojik verilere göre, Türkiye genelinde erişkinlerde, aterosklerotik kalp hastalığı prevalansı %3.8'dir (erkeklerde %4.1, kadınlarda %3.5'dir). Aterosklerotik kalp hastalığı prevalansı %2 veya altında iken 50-59 yaşlarında %8 sıklığındadır. "Türk Erişkinlerde Kalp Hastalığı Risk Faktörleri" (TEKHARF) çalışmasının sonuçlarına göre aterosklerotik kalp hastalıklarında hipertansiyon 3.2 kat, yüksek kolesterol veya diyabet normallerden 2 kat daha fazla sıklıktadır. Hipertansiyon 50 yaş üzeri erkeklerin %7.8'inde, kadınların %14'ünde mevcuttur. Önemli risk faktörlerinden olan diyabetin erkeklerde %2.5'lik prevalansına karşın kadınlarda %4'tür. Bir başka risk faktörü olan obezite, ülkemizde erkeklerde %9 civarında iken, kadınlarda %30 gibi yüksek rakamlara çıkmaktadır. Sigara içimi ise erkeklerde %59-60'lı rakamlara çıkmakta ise de kadınlarda %19 dolayındadır. Ülkemizde kalp-damar hastalıkları nedeniyle ölüm oranı %45 civarında olup tüm vakaları içerisinde ilk sırayı almaktadır. Bu ölümlerin önemli bir bölümü 41-58 yaş grubu arasında olmaktadır⁴⁰.

2.4. Tanımlar

2.4.1. Koroner Arter Hastalığı

Ateroskleroz, büyük ve orta boyuttaki arterlerin, temel olarak intima tabakasına yerleşen, kesintisiz bir süreçtir. Genel tanımı bu olmakla birlikte, bütün arter yatağı, aterosklerozdan eşit düzeyde etkilenmez. Kan akımını engelleyecek boyutlara ulaştığında klinik bulgular vermeye başlayan bu sürecin nedeni henüz bilinmemektedir¹⁸.

Günümüzde önceden inanıldığı gibi aksine, damar yatağının, kanı, kalpten dokulara ileten bir boru sisteminden daha çok, biyolojik olarak etkin, çeşitli işlevleri olan bir yapı olduğu bilinmektedir. Yakın zamana kadar kabul edilen bir başka kavram da aterom plağının sadece yağ, kireç ve fibroz dokudan oluştuğuydu. Bu yapının zaman içinde yavaş yavaş büyüdüğü, kritik bir düzeye ulaştığında klinik bozukluklara neden olduğu ve lümeni tam tıkayınca da akut değişiklikler oluşturduğuna inanılırdı. Ancak son yıllarda moleküler biyoloji ve hücre biliminde elde edilen çarpıcı gelişmeler ile durumun böyle olmadığı anlaşıldı. Artık aterom plağının dinamik ve yaşayan bir oluşum olduğu bilinmektedir. Damar duvarının yapısında bulunan hücreler, buraya göç eden kan hücreleri ve bunların salgıladıkları çeşitli maddeler, infeksiyon ajanları ve bütün bu sıralananların birbirleriyle etkileşimi, aterom plağına dinamik bir özellik verir. İşte o nedenle ki, koroner aterosklerozun gidişinin belirlenmesinde sadece aterom plağının anatomik özelliklerinin, bir başka deyiş ile lümeni ne kadar daralttığının bilinmesi ile yetinilmemekte, plağın ne kadar dinamik olduğunun da öğrenilmesine çalışılmaktadır¹⁸.

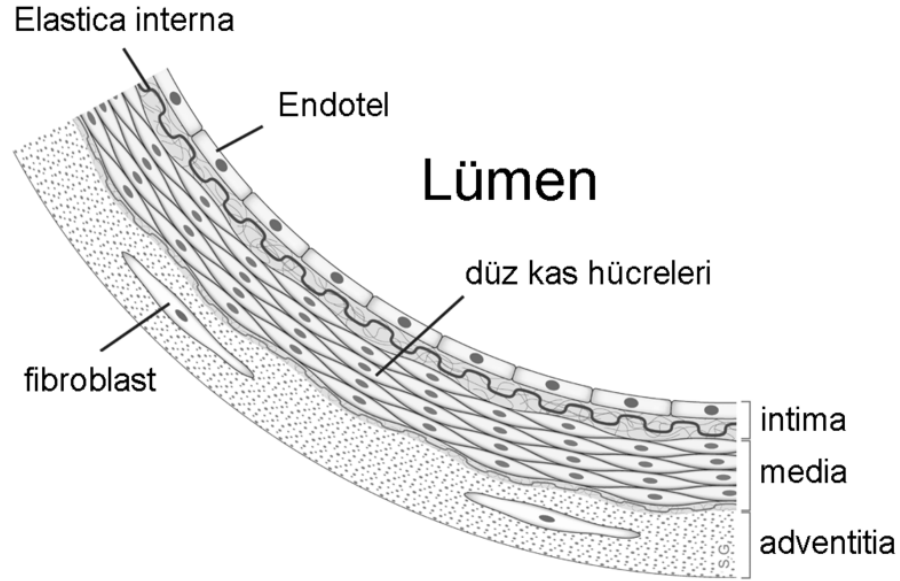
2.4.2. Normal Arter Duvarı

Aterosklerotik sürecin daha kolay anlaşılması için normal duvar damar yapısının bilinmesinde yarar vardır. Normal arter duvarı 3 tabakadan oluşur. En iç, bir başka deyiş ile lümeni çevreleyen tabaka intima'dır. Tek sıra biçiminde dizilmiş endotel hücreleri, bunları destekleyen subendotelial matriks ve bazal membran intimayı oluşturur. Diğer memelilerden farklı olarak, insan intimasında az sayıda düz kas hücresi de bulunmaktadır. İntima tabakası, medya tabakasından internal elastik membran ile ayrılır. Bu tabakayı oluşturan ve yukarıda sıralanan temel öğeler arter yatağının her kesiminde aynı olsa da,

intima kalınlığı yerel farklılıklar gösterir²¹. Farklılığın düzeyini, kan akımının damar duvarında oluşturduğu mekanik güçler belirler. Farklılaşmadaki amaç, kan akımını yatağın her bölümünde en iyi düzeyde tutmaktır. İntima kalınlığının en fazla olduğu bölgeler, yukarıda söylenen nedenden de anlaşılacağı gibi, arterlerin dallanarak ayrılma yerleri ve yan dalların ağız kesimleridir. Akımın fiziksel etkisi ile intimada tek tek bulunan düz kas hücreleri uyarılırlar ve bu bölgeyi kalınlaştıran proteoglikan üretirler. Kalınlaşmış kesimlerde, bebeklik yaşlarından başlayarak az da olsa makrofajlar da belirmeye başlar. Unutulmaması gereken bir nokta, kan akımına uyum nedeniyle oluşan bu kalınlaşmanın, damar lümenini kesinlikle daraltmadığıdır. Ancak dikkat çekici özellik, aterosklerozun daha çok bu bölgelere yerleşiyor olmasıdır. Fakat arter yatağının birçok yerinde var olan intima kalınlaşmalarının hepsinin aterosklerotik lezyonlara dönüşmemesi nedeniyle, bunları, aterosklerozun ön değişiklikleri olarak kabul etmek yerine, ateroskleroza yatkın bölgeler olarak tanımlamak daha doğru olur. Bu yaklaşım ile bakıldığında arter yatağı, yatkınlık derecesine göre üçe ayrılabilir²².

Orta tabakaya **medya** adı verilir. Kollajen, elastik lifler ve glikozaminoglikanlardan oluşan bir matriks içinde konsantrik olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşur. Adventisyadan eksternal elastik membran ile ayrılır.

En dış tabaka ise adventisya'dır. Gevşek bir bağ dokusu yapısındaki bu tabaka, boyuna dizilmiş kollajen liflerden, vaza vazorumlardan (büyük damarları besleyen damarlar) ve sinir uçlarından oluşur²³ (Şekil 1).



Şekil 1. Normal arter duvarının yapısı

2.5. Aterogenezde Rol Oynayan Hücreler

2.5.1. Endotel Hücresi

Endotel, arter duvarı ile kan elemanları arasında düzgün ve kesintisiz bir sınır oluşturan tek sıra biçiminde dizilmiş hücrelerden oluşan bir tabakadır. Normal endotel oldukça seçici geçirgen bir engel, trombüs oluşumuna dirençli bir yüzey, pek çok vazoaktif madde ile bağ dokusu yapılarının üretiminden sorumlu metabolik olarak etkin bir dokudur.

İntimaya yerleşen lipoprotein moleküllerinin ilk oksidasyonu endotel hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Okside LDL'nin oluşması aterogenezde bir dizi zincirleme olayı tetikleyen ilk temel basamaktır.

Hasar görmemiş olan endotel yüzeyi prostasiklin (PGI_2) ile nitrik oksit (NO) salgılar. NO, endotelin koruyucu işlevinde çok önemli bir rol üstlenmektedir. Güçlü antiagregan etkisi nedeniyle, trombositlerin endotel yüzeyinde kümeleşmesini engeller. Anti-inflamatuvar özelliği ise ateroskleroza, her evrede, engelleyici bir etki göstermesini sağlar. NO, bu etkisi ile adezyon moleküllerinin endotel yüzeyinde belirmesini, lipidlerin endoteli geçişini ve düz kas hücrelerinin proliferasyonunu önler²⁶⁻²⁸. Nitekim ateroskleroza kolaylaştırdığı bilinen bir hipertansiyon, diabetes mellitus, sigara içilmesi ya da süperoksit

düzeyinin artışı gibi durumlarda, endotelden NO yapımının azaldığı ya da yıkımının arttığı gösterilmiştir.

Yukarıda da sözü edildiği gibi endotel hücreleri ayrıca aterogeneizde rol oynayan çok sayıda maddenin ve bağ dokusu elemanlarının sentezinden sorumludur¹⁸.

2.5.2. Düz Kas Hücreleri

Normal arter duvarının medya tabakasında yer alan düz kas hücrelerinin esas görevi arter tonusunu sağlamaktır. Aterosklerotik plağın oluşumu sırasında medyadan intimaya geçen bu hücreler, lezyonun fibroproliferatif sürecinde görev alırlar. Bu yüzden düz kas hücrelerinin intimada birikmesi, ilerlemiş lezyonun göstergesi kabul edilir.

Düz kas hücreleri makrofajlar gibi lipoproteinleri fagosite edip kolesterol esterleri şeklinde depolayarak “köpük hücreleri”ni oluştururlar.

2.5.3. Makrofajlar

Makrofajlar, bebeklik çağından başlayarak endotel altı dokularda görülmeye başlarlar. Ancak bu dönemde tek tek bulunurlar ve küme oluşturmazlar. En yoğun bulundukları yerler kan akımına uyum için kalınlaşmış intima tabakasının olduğu kesimlerdir. Bu evrede sözü elden makrofajlar genellikle lipid damlacıkları içermemekle birlikte, kan kolesterol düzeyi çok yüksek kişilerde genç yaşlardan başlayarak köpük hücrelerine dönüşebilirler.

Makrofajlar dolaşımdaki monositlerden türeyen fagositik hücrelerdir. Aterosklerotik plakta yoğunlukla bulunurlar. Monositi kandan intimaya çeken güç, okside LDL partiküllerinin uyarıcılığı ile oluşan bazı kemotaktik maddelerdir. Bunlardan en iyi bilineni makrofaj kemotaktik proteini-1 (MCP-1)’dir. MCP-1, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve makrofaj tarafından salgılanır. Dokuya geçen monosit, monosit koloni uyarıcı faktör (M-CSF)’ün etkisiyle makrofaja dönüşür. M-CSF de yine okside LDL’nin uyarıcılığı altında endotel hücrelerince salınır. Makrofajlar bir kez lezyona yerleştikten sonra kendileri de pek

çok biyolojik madde salgılayarak, yeni makrofajların gelmesini, düz kas hücreleri, fibroblastların çoğalmasını ve bağ doku sentezini uyarırlar.

Köpük hücre oluşturan asıl hücreler makrofajlardır. Daha önce endotel tarafından başlatılan LDL partiküllerinin oksidasyonunu makrofajlar tamamlar. Bu oksidasyon sonucunda lipoprotein partikülünün üzerindeki ApoB proteini, “scavenger” (çöpçü) reseptörler tarafından tanınacak şekle dönüşürler. Düz kas hücreleri üzerinde de “scavenger” reseptörler vardır ama aterosklerotik plaktaki esas fagositik hücreler yine de makrofajlardır. Makrofajlar “scavenger” reseptörler aracılığı ile okside LDL’yi fagosit edip parçalarlar. Oluşan kolesterol bileşikleri, kolesterol esterleri şeklinde depolanır. Ancak hücrenin kolesterol yüklenmesiyle, “scavenger” reseptörlerde bir “down” regülasyon olmadığından, depolanma işi hücrenin ölümüne dek sürer. Böylelikle lipid damlacıkları ile dolan makrofajlar köpük hücrelerine dönüşür¹⁸.

2.5.4. Trombositler

Aterogenezin hemen her aşamasında lezyon üzerinde trombosit kümeleri veya duvar trombüsler görülebilir. Çekirdeksiz hücreler olduklarından protein üretememelerine karşın, trombositler içerdikleri granüllerde (α granülleri) çok sayıda değişik mitojenler, sitokinler ve vazoaktif maddeler taşırlar¹⁸.

2.5.5. T Lenfositleri

Aterosklerotik lezyonlarda hem CD4 hem de CD8 hücrelerin bulunması, aterosklerozun patogenezinde bağışıklık sistemine, hatta belki de otoimmüniteye ilişkin bileşenlerin de rol oynayabileceği fikrini doğurmaktadır. Makrofajların bağışıklık sisteminde T-lenfositlere antijen sunan birincil hücreler olduklarının bilinmesi ve aterosklerotik plakta T-lenfositlerle yoğun etkileşimlerinin gösterilmiş olması da bu kanıyı desteklemektedir¹⁸.

2.6. Ateroskleroz Patogenezinde Rol Alan Maddeler

2.6.1. Adezyon Molekülleri

İmmünoglobulin üst ailesinden olan “vascular cell adhesion molecule-1” (VCAM-1) ve “intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gibi moleküller lokösitlerin endotel hücrelerine daha kolay tutunmasına yol açarlar. İnsanda henüz kanıtlanamasa bile inflamasyon hücrelerinin (özellikle monosit ve T-lenfositlerin) endotele tutunup daha sonra da endotel bariyerini aşması ateroskleroza başlatan olaylardan biri olarak kabul edilmektedir¹⁸.

2.6.2. Sitokinler ve İnflamasyon Mediyatörleri

Gerek aterosklerozun başlamasında rol alan ve yukarıda sözü edilen adezyon moleküllerinin endotel yüzeyindeki miktarlarının artmasında, gerekse aterom plağının komplike olmasında sitokinlerin önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. İnterlökin -1 β (IL-1 β) ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi sitokinler endotel hücrelerinde VCAM-1 geninin transkripsiyonuna neden olarak aterosklerotik plağın oluşumuna yol açarlar. Bunun yanında, TNF- α öbür birçok hastalıkta olduğu gibi, inflamatuvar etkileri ile aterosklerotik sürecin ilerlemesine ve komplike olmasına katkıda bulunurlar. Aterom plağında bulunduğu gösterilen bir başka sitokin olan monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1), daha çok sayıdaki monositi plağın bulunduğu bölgeye çeker¹⁸.

2.6.3. İnflamasyon “Biomarker”leri

Aterosklerotik sürecin tüm evreleriyle ilişkisi bakımından en çok bilgiye sahip olunan CRP’dir. CRP, inflamasyon, infeksiyon ya da doku yaralanması durumlarında, IL-6 gibi sitokinlerin uyarısı ile karaciğerden salgılanır. İnflamasyonun varlığını göstermesinin yanında çeşitli özellikleri ile ateroskleroza da etkiler. Komplemanı bağlayıp etkinleştirmesi, hücre adezyon moleküllerinin ve doku faktörünün yapımını uyarması, LDL’yi opsonize ederek endotel makrofajları tarafından fagosite edilmelerini sağlaması, arter duvarına

monositlerin göçünü tetiklemesi ve monosit kemotaktik protein-1'in üretimini artırması, CRP'nin aterosklerozda dolayısıyla olarak üstlendiği işlevlerdir¹⁸.

2.6.4. Büyüme Faktörleri

Platelet Derived Growth Factor (PDGF):

Düz kas hücre reseptörlerine bağlanan PDGF, hücre siklusunu uyararak DNA yapımına neden olur. Bunun sonucu hücrelerin bölünüp çoğalmasındır. Bu etkileri yanında PDGF, düz kas hücrelerinin pinositoz yapmasını, protein ve RNA sentezini uyarır. Ayrıca hücre yüzeyindeki LDL reseptör sayısı artar. Bir başka deyişle bu mitojen ile karşılaşan düz kas hücreleri, hem proliferer olur hem de bağ dokusu sentezini arttırırlar.

Fibroblast Growth Factor (FGF): FGF, gerek düz kas hücrelerinin ve gerekse endotel hücrelerinin proliferer olmasını uyarır.

Transforming Growth Factor β (TGF- β): Düşük dozlarda düz kas hücrelerinin sekresyon ve proliferasyonunu uyarır. Yüksek dozlarda ise güçlü bir proliferasyon inhibitörüdür.

Heparin Binding Epidermal Growth Factor (HB-GF): Düz kas hücreleri için en az PDGF kadar etkili bir mitojendir. Aterosklerozdaki rolü halen araştırılmaktadır¹⁸.

2.7. Aterosklerozun Lezyonları

Yağlı çizgi, yaygın intima kalınlaşması ve fibröz plak diye üçe ayrılır.

2.7.1. Yağlı Çizgi: On yaşındaki çocuklarda bile görülebilen ateroskleroz lezyonudur. Makroskopik olarak bakıldığında damar lümeninde sarı alanlar olarak görülürler. Bu görünümü, endotel altında birikmiş olan, içleri yağ damlacıkları ile dolu köpük hücreleri verir. Bu evrede, lipidlerin lezyona girişi ile çıkışı arasında dinamik bir denge vardır. Örneğin kan LDL düzeyinin azaltılması ile lezyona göç eden lipid miktarı azalırken çıkan lipid düzeyi artar ve lezyon geriler. Yerinde bir sikatrıs dokusu kalır. Buna karşılık lezyona giren LDL düzeyi çıkandan fazla ise lezyon sonraki evrelere ilerler. Yağlı

çizgilerin gerek koroner arterlerdeki gerekse sistemik arterlerdeki yerleşimlerinin daha ileri evredeki ateroskleroz lezyonları ile aynı olması, bu lezyonların bir bölümünün ilerlediklerinin kanıtı sayılmaktadır.

Yağlı çizgilerinin esas hücresel elemanı içi yağ damlacıkları ile dolu köpük hücreleridir. Bir kez köpük hücresi oluştu mu, bunun hangi hücreden kaynaklandığını söylemek güçtür. Ancak monoklonal antikorlar ile yapılan çalışmalarda bunların çoğunluğunun makrofajlar olduğu, geri kalanının ise düz kas hücreleri ve T – lenfositlerinden kaynaklandığı bilinmektedir¹⁸.

2.7.2. Yaygın İntima Kalınlaşması: İntimada, bağ dokusu ile çevrelenmiş düz kas hücrelerinden oluşan bir yapıdır. Makrofajlar, T-lenfositler ve hücre dışı lipid birikintileri öbür elemanlarıdır¹⁸.

2.7.3. Fibröz Plak: Ateroskleroz lezyonunun en ileri biçimidir. Kireç içerir ya da trombüs ve/veya hemoraji ile birlikte bulunur ise komplike lezyondan söz edilir.

Makroskopik olarak beyaz renklidirler. Lümene doğru büyürler ve lümeni kritik düzeyde daraltırlar ise klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olurlar.

Mikroskopik olarak bu lezyonda da büyük miktarlarda düz kas hücreleri, makrofajlar ve T-lenfositleri bulunur. Bu evreden medyadan intimaya çekilen düz kas hücreleri bir fibröz başlık (“fibrous cap”) oluşturmak üzere dizilirler. Fibröz başlığın temel işlevi lümendeki kan ile lezyonun merkezindeki aterojenik lipid çekirdeği birbirinden ayırmaktır. Fibröz başlıktaki düz kas hücreleri ekstraselüler matriks yapma yeteneği olan onarıcı fenotiptedir. Bir plakta fibröz başlığı onarma yeteneği bir tek bu hücrelerde vardır. Fibröz başlıkta düz kas hücrelerinin yanında kollajen fibrilleri, elastin, proteoglikanlar bulunur. Fibröz başlığın hacminin bütün plağın hacmine oranı, ya da daha basit bir deyiş ile kalınlığı, oluşacak klinik durumları belirlemede en önde gelen etmendir.

Plakların durağan yapıda olduğu kabul edilirse lezyonların makro ve mikroskopisine göre yapılan bu sınıflama yeterli görülebilir. Ancak ateroskleroz lezyonlarının dinamik bir

yapısı vardır. Bu nedenle Amerikan Kalp Birliği (American Heart Association, AHA) ateroskleroz lezyonlarının tipleri ve evrelerini 1995 yılında yeniden tanımlamıştır. Buna göre lezyonlar, lezyonlar ilerleme süreci göz önüne alınarak altı tipe ve beş evreye ayrılmaktadır¹⁸.

2.8. Etiyolojisi

Özellikle gelişmiş toplumlarda ölümlerin en önemli nedenlerinin başında aterosklerotik kalp hastalıkları gelmektedir. Etnik gruplar, bölgesel yerleşim, yaşam tarzı, genetik faktörler hastalık popülasyonunu belirli nedenlere doğru çekmiş ve bugün için bu hastalığın gelişmesinde en etkili spesifik risk faktörlerini ortaya koymuştur.

Koroner arter hastalığında etiyolojik faktörler birçok değerli çalışmalarla ortaya konmaya çalışılmıştır. Bugün için koroner risk faktörleri adı altında toplanan bu çalışma sonuçlarına göre koroner aterosklerozun gelişmesinde rol oynayan faktörler şunlardır²⁹.

2.8.1. Serum Lipidlerinde Yükseklik: Çalışmalar, kolesterol, trigliserid ve β -lipoprotein yüksekliğinin koroner ateroskleroz gelişmesinde belirgin rolleri olduğunu gösterir³. Serum kolesterol seviyesi %300 mg.'ın üstünde bulunan kişilerde koroner aterosklerotik kalp hastalığı gelişmesi tehlikesi, serum kolesterol seviyesi %200 mg'ın altındaki kimselerden 4 defa daha fazladır³⁰.

2.8.2. Diyet: Total kalori değeri yüksek, yağ miktarı yüksek özellikle satüre yağ ve kolesterol miktarı yüksek, ağır karbonhidratlı ve tuzlu bir diyetle beslenmenin ateroskleroz insidansında artma yaptığı gösterilmiştir²⁹.

2.8.3. Hipertansiyon: Koroner aterosklerozun gelişmesinde kan basıncı yüksekliğinin rolü bulunabilir. Hipertansiyonun ateroskleroza hızlandığı bazı çalışmalarda ileri sürülmektedir²⁹.

2.8.4. Diabet: Aterosklerotik kalp hastalığı sıklığını ve aterosklerozun yaygınlığını arttıran önemli bir risk faktörüdür³⁰.

2.8.5. Sigara: Hem kadınlarda hem de erkeklerde ve tüm yaş gruplarında içilen sigara miktarı ile koroner arter hastalığı arasında güçlü bir ilişki gösterilmiştir. Sigara içiciliği koroner arter hastalığı riskini 2-3 kat arttırmaktadır ve diğer risk faktörleri ile etkileşerek riskin artışına neden olur³¹.

Sigaranın Aterosklerozun Gelişmesindeki Rolü: Sigaranın içiminde vücuda alınan etkin maddelerden birisi nikotindir. Nikotin deneysel çalışmalarda endotel hasarı yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca, nikotinin aterosklerozu hızlandırdığı, arter endotelyumuna vazotoksik etkisi bulunduğu görülmektedir. Birçok araştırmada yüksek kolesterolü veya yüksek hipertansiyonlu olgularda nikotin etkisinin daha bariz olduğu bulunmuştur.

Sigara içiminde alınan bir başka madde karbonmonoksittir. Karbonmonoksitin perivasküler ödem ve endotel permeabilitesinde değişiklik yaparak aterosklerozun gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Nikotinde olduğu gibi yüksek kolesterolü diyetle beslenen ve karbonmonoksit verilen deneysel çalışmalarda aterosklerozun daha hızlı ve erken geliştiği gözlenmiştir. Karbonmonoksitin hipoksi yoluyla endotel permeabilitesinde değişiklik yaptığı, bu durumda damar duvarında lipid depolanmasını arttırdığı sonucu çıkarılmaktadır.

Sigaranın bir diğer etkisi de plazma lipid seviyesini değiştirmesidir. Sigara içiminden sonra primer olarak nikotinin etkisi ile serum serbest yağ asitlerinde artma meydana gelir³¹.

2.8.6. Yaş: Orta ve ileri yaş grubunda daha sık görülür. Ateroskleroz erken yaşlarda başlayan ve sonuçları orta yaşlarda ortaya çıkan bir durumdur. Çalışmalar aterosklerozun 10 yaşlarında başlayabileceğini 30-35 yaşın üzerinde ise damar lümenini daraltacak seviyeler kadar ilerleyebileceğini göstermektedir²⁹.

2.8.7. Cinsiyet: Erkek hastalarda koroner atreskleroz kadınlara göre daha çok görülür. Kadınlarda ise menapoz döneminden sonra belirgin bir artış gösterir. Bu cinsiyet belirginliği siyah ırka göre beyazlarda daha da fazla olmaktadır²⁹.

2.8.8. Aile Hikayesi: Koroner aterosklerozun bazı aile gruplarında daha fazla görüldüğü bir gerçektir. Tam açıklıkla gösterilmemesine rağmen genetik bir istidadın olduğu, ayrıca buna ailenin sosyo ekonomik yapısının, beslenme alışkanlığının ve diğer risk faktörlerinin de etki ettiği söylenebilir²⁹.

2.8.9. MTHFR (Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz): İlk olarak 1991 yılında Kang ve arkadaşları MTHFR enziminin koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğunu tespit etmiştir. MTHFR enzimi folat metabolizmasında rol oynar. Folat ise homosistein metilasyonu ve nükleotid sentezi gibi pek çok biyokimyasal yolda görev yapan bir vitamindir. Hücre içerisindeki fazlalığı toksik olup, birikimi damar endotelinin bozulmasına neden olur³².

2.8.10. Lipoprotein Metabolizması:

2.8.10.1. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)

Plazma HDL düzeyleri ile koroner arter hastalığı arasında güçlü ters bir ilişki vardır. Prematür koroner arter hastalığı olanlarda düşük HDL düzeyleri saptanmaktadır. ATP Binding Cassette Sub-Family A gen ailesinin 1. üyesi (ABCA1), Lipoprotein lipaz / Hepatik lipaz mutasyonları ve Apoprotein A1 eksikliğine neden olan mutasyonlar plazma HDL düzeyinde değişikliğe neden olmakta ve dolayısıyla koroner arter hastalığı için bir risk faktörü oluşturmaktadır³³.

2.8.10.2. Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)

Plazma LDL kolesterol düzeyleri pek çok çalışmaya göre koroner kalp hastalığının en önemli belirleyicilerindendir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre plazma LDL düzeylerinin %50'sinin belirleyicisi genetik faktörlerdir. Ailesel hiperkolesterolemi'ye neden olan LDL reseptör geni ve apoprotein B mutasyonları plazma LDL seviyesinin artışına neden olmaktadır. Plazmadaki LDL kolesterolünün artışı sonucunda ise koroner arter hastalığı meydana gelmektedir³³.

2.8.10.3. Trigliseridler

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar uzun süre tek başına trigliserid yüksekliğinin tıkalı damar hastalığı için bir risk faktörü olduğunu sorgulamıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, ılımlı trigliserid yüksekliğinin, özellikle artık lipoproteinler ve çok düşük dansiteli lipoproteinlerin (VLDL) yükselmesinin aterojenik olduğunu göstermiştir. Ailesel hipertrigliseridemi, Ailesel Kombine Hiperlipidemi ve Ailesel dislipoproteinemi (Tip III hiperlipidemi)'ye neden olan mutasyonlar plazma trigliserid düzeylerini etkilemektedir ve sonuç olarak bu hastalarda ateroskleroz meydana gelmektedir³³.

2.8.11. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon (y glutamil sisteinil glisin) glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. İlk defa 1888'de izole edilmiş, fakat yapısı 40 sene sonra açıklanmıştır.

Glutasyon genelde GSH olarak kısaltılır; SH sisteinin sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alışveriş yapan kısmıdır. Glutasyon ile ksenobiyotiklerin reaksiyonunu katalizleyen enzimlere “*glutasyon S- transferazlar*” kısaca “*GST*” denir.

GST'lar ve onların merkaptürik asit biyosentezindeki rolleri ilk kez 1961' de Booth ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Ksenobiyotik metabolizmasında glutasyonun rolü; faz I enzimlerince oluşturulan reaktif türlerin glutasyon ile konjugasyona girmesi ve sonuçta hücre makromolekülleri (DNA, RNA, protein) ile bağlanmasını engelleyerek hücre hasarını önlemesi şeklinde gerçekleşmektedir. Ksenobiyotiğin reaktif türleri, bir proteine

bağlanıp onu değişikliğe uğratıp antijenik özelliğini değiştirebilir. Ksenobiyotik bir hapten yani tek başına antikor sentezini uyarmayan bir molekül gibi davranıp, antikorla birleşip hücreyi hasara götürebilir.

Glutasyon s-transferazlar elektrofilik ksenobiyotikleri inaktive ederek vücuttan atılmak üzere konjugasyonunu sağlayan dimerik enzimlerdir.

GST'lar doğada bakteriler, maya, küf, yumuşakçalar, kabuklular, solucanlar, kurbağalar, böcekler, bitkiler, balıklar, kuşlar ve memelilerde bulunur. En çok sıçanlarda ve insanlarda çalışılmıştır³⁵.

Glutasyon S-transferaz enzim sistemleri birçok farklı ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve biyotransformasyonunda önemli rol oynayan Faz II metabolizması enzimlerindendir³⁶. GST'lar membrana bağlı ve sitoplazmik olmak üzere iki grupta incelenmektedirler. Vertebralılarda yedi sınıf sitoplazmik GST tespit edilmiştir: alfa, mü, kappa, pi, sigma, theta ve zeta. Sitoplazmik GST (cGST)'lar iki aynı alt üniteden (homodimerler) veya farklı alt üniteden (heterodimerlerden) oluşmuşlardır. Sınıflandırma olarak Mannervik ve arkadaşlarının önerdikleri sınıflandırma kullanılmaktadır³⁵. İnsanda GST ailesinde bulunan sitoplazmik enzimler primer yapılarına göre α (alfa), μ (mü), Π (pi), θ (theta), δ (sigma) olmak üzere 5 sınıfa ayrılırlar. İnsanda GST ailesine ait enzimleri kodlayan pek çok gen polimorftir. Birinci kromozomun kısa kolu üzerinde (1p13 bölgesinde) GST μ sınıf enzime ait beş sınıf gen (M1-M5) tespit edilmiştir. Bunlardan GSTM1 genine ait enzim, sigara dumanında bulunan karsinojenlerden, benzo [a] piren'nin hidroksilat metabolitleri epoksid bileşikler gibi polisiklik aromatik hidrokarbonların detoksifikasyonunda rol alan izoenzimdir.

GST'lar her bir alt birim için katalitik bölgeye sahip globular dimerik proteinlerdir. 23.000-29.000 dalton moleküler ağırlığındadır. Her bir alt birim 200-240 aminoasitten oluşur.

Sınıf μ genleri popülasyonda polimorftir, aşağı yukarı 5 kb uzunluğunda ve 7 ekzon içerir. **Sınıf θ** genleri insanda polimorftir ve 5 ekzona sahiptir.

İnsanlarda glutasyon s transferaz M1 ve T1 genetik polimorfizmi sigara dumanında bulunan bazı kimyasalların aktivasyonu ve detoksifikasyonu ile ilişkilidir. Sigara içilmesi ve KAH riski arasındaki güçlü ilişkide GSTM1 VE GSTT1 genlerinin ateroskleroz veya

bunun klinik komplikasyonları için aday genler olabileceği düşünülmektedir. Enzimler genotip ve fenotip seviyesinde çalışılmıştır. Bir çok izoformları vardır. Deney hayvanlarında, sigara tütünündeki kimyasalların aterosklerotik plak oluşumunu uyardığını bildirilmiştir. Böylece GSTT1 ve GSTM1 genlerindeki delesyonlar, özellikle sigara içenlerde koroner ateroskleroz gelişimine katkıda bulunan enzim aktivitesini etkilemektedir. Sigara içenlerde GSTT1 ve GSTM1 null-genotiplerinin Koroner Arter Hastalığı (KAH) ile ilişkisi birçok araştırmanın konusu olmuştur. Böylece bizim amacımız KAH gelişiminde tek tek ve ya kombine (haplotip) GSTT1 ve GSTM1 polimorfizmlerindeki olası ilişkiyi araştırmaktadır¹⁰.

Epidemiyolojik çalışmalar; sigara içenler arasında farklı kanser risklerinin yükselmesi ile GSTT1 ve GSTM1 genlerinin ilişkili olduğunu göstermektedir. Sigara içenlerde, koroner arter hastalığı ve GST polimorfizmi arasında ilişki olduğu hakkında hala tartışmalar vardır. GST enzimi sigara tütünündeki karsinojenlerin detoksikifikasyonunu kapsamaktadır. Sonuçta koroner arter hastalığındaki DNA hasarı önemli ise bu gendeki polimorfizm kardiovasküler hastalıklara karşı hassasiyet oluşturabilir. Bu yüzden bu konular ile ilgili soruları gözden geçirdiğimizde anjiyografi ile koroner arteroma ve miyokard infarktüs geçmişi olan bireyler ile çalışmalar yapılmıştır^{12,13}.

GSTT1 GENİ

ORIGIN

```
1  ggccaggagt  tcaagaccag  cctggccaac  atggtgaaac  cctgtctcta  ctaaaaatac
61  aattagctga  gcatggtggc  acatgcctga  aatcccagct  acccggtg  ctgaggcacg
121 agaatcgctt  gaaccagga  ggcagaggtt  gcagtgcac  gagattgcac  cactgcactt
181 cagcctgagt  gacagagagg  ggcaaagtca  aaaaacaaac  aaacgaacca  acccacacac
241 tctcactttt  atcttggttc  tataaattaa  taaatacagc  ctttgtagt  tggtttatgt
301 gagtcagacc  caaagaaaat  gatcaatcct  gaaacgtgga  ccaaattagt  tgttttggtt
361 tttagttgga  gttactctct  tgtcgcccag  cctggagtgc  aatggcgag  tcttggcaca
421 cggcaacctc  tgcctctaga  gttcaacgat  tctcctgcct  cagcctcctg  agtagctgga
481 attacaggtg  catgccacca  cgcccagata  atttttatat  ttttagcaga  gatgggggtt
541 caccaagttg  gccaggctgg  tctcaaactc  ctgaactcag  gtgatccgcc  ggcctcagcc
601 tcccaaggtg  ctgggggtat  aggaatgagc  caccactccc  gccccaaatt  aggttttgaa
661 cttaaaagac  aggctgagcc  ttgaaccaga  atcctgacag  ctccctcctg  ggcctctgac
721 tggagttatc  cagaggtgag  gataaggcag  ccattgcctt  ctctgagtgt  ctacctcctt
781 tcaaaacttt  aacatggaaa  tctgaatttc  tcatctttcc  ttaatttttt  ttccagttaa
841 aatcattat  tactggccag  ttgtagtggc  tcacatctgt  aatcccagca  ggtggcagag
901 gtgggaggat  cagcctagga  aacatagtga  gaccctgcct  ctacagaaaa  aaattttttt
961 taactagctg  ggcgtctttg  tgcgcacctg  tagtcccagc  tacttgggga  ggctgagatg
```

1021	ggaggatggc	ttgagcccag	gagttggagt	ctgtagtgag	ctgtgatcat	gccactgcat
1081	tctaccctgg	gcaagagagt	gagactctat	ctaaataaaa	taaaacagtt	gttacttcca
1141	ctttattttg	agaaatgttc	cttattctct	agaaaacatt	atgcgttggc	tgacacactt
1201	tcagtgggat	tcgtttttag	aatgacatg	tgaccctgat	actatttgac	aggctccatg
1261	gcagcaaggg	gcaggcctgg	gcttacggct	cagcagatga	atccaggggg	gtggacttgc
1321	aaggactctg	gagggctcta	gcttccctgt	cattttaaag	atggagaaac	acaggcctgg
1381	agaaaggaag	aaataaaccc	agggaatgcg	atagatggca	ctgtgctggc	aggggcagga
1441	agaccaaggc	tgtgacattc	cagggaagtgc	gactgcagtg	aagcgagtga	ccacaaaaca
1501	ctgaacgtaa	gccctgaggc	tttgccactt	gctggcacca	aggactctgc	agtgttgagc
1561	caagaggatg	gacttttgag	ccagactttc	tgggtctata	atcattcagt	gtctgtctcc
1621	tcctctaaaa	tgcggaacgg	gggaaattct	gacacacgct	tcaacacaga	tgacacttga
1681	agacattatg	ctaagtgaag	tgagcgagcc	aggcacgaaa	gggatgggac	tggggcctct
1741	ctgtgcgtcc	ccctgagaga	caacgggtctc	ttggccaccc	accctgatcc	cacaggagcc
1801	aggcgggccc	agccctgaga	caggccgccc	gccgcccgca	attggactaa	agagtgtccc
1861	aggcgctccg	gccgcccatt	ggggcacagc	ggtcggggtg	cgtagccgca	ggggcggtgt
1921	ctgaggctcg	agaccgaggt	cctggcactg	gagtttgctg	actccctctg	gtttccggtc
1981	aggtcggctg	gtccccacta	tgggcctgga	gctgtacctg	gacctgtgtg	cccagcctg
2041	ccgcgctggt	tacatctttg	ccaagaagaa	cgacattccc	ttcgagctgc	gcacgtgga
2101	tctgattaaa	ggtagggtcca	gcctcggtgt	tggggaaccg	aaaagtcagg	aaggggacag
2161	gtaggcatat	atagcttagg	gaacttctcc	cagcgccacc	ttcttctctg	ggccattgct
2221	ggtctggttt	ggagaccgaa	cagagaaagg	tgagccagca	gggagatcca	agagtcgggg
2281	ctccccaaaa	ctctgctcgg	tctcacggaa	tagaccacgg	ggttccccct	aggccgaata
2341	aaggggtggg	gatcatgaag	agaagccaga	caggaggaca	aaaacgggcg	cagctgggtg
2401	caggggcaca	cgctgtagt	cccagcaact	cgagaggctg	gggtgggagg	atcgcttgag
2461	cccaggaatt	ccaggccgca	gtgcactatc	atggtgccct	tgaatagcca	ctgcactccc
2521	gtcagggcaa	tctagcgaga	ccccgtctta	aaaaaaaaaa	acaaaaaaaa	acaaaatgaa
2581	agcaggtgtg	acctcggcct	agggaaaggt	gggatgagag	aggtcaaggg	tgccaagtgt
2641	agagactggg	acagcgtcaa	gtcccttctt	tatggcccag	ctgctgagat	tctgcaacag
2701	caaacagctc	aggacgtgac	tttccatccc	tgccctctgc	actcgtccag	tctgcattgg
2761	ggtccctctt	tgtcccttcc	ttcctctggt	cctcctgttt	tgctctgac	cttgtccttg
2821	tccttttttt	tttgagacag	agtcttgctt	ttgctttggt	gcagtgcagt	ggcaccgata
2881	tcgaatcact	gcaaccacca	cctcccggtt	tcaagcaatt	ctcctgcttc	agcctcctga
2941	gtagctagat	tacaaatgtg	tgccactatg	tctggctaata	ttttttgtat	ttttaacaga
3001	gatgggattt	cacaattttg	gtcaggctgt	tctcgaaact	ctgacatcaa	atgatctgcc
3061	ggcttagcct	cccaaagtgc	tgggattaca	ggcatgagcc	actgtgcctg	gcccgaaggca
3121	ttttgtttat	ttgtttgttt	gtttttgaga	cggagtctcg	ctctgtcgcc	caggctggag
3181	tgacgtggca	ggatcacagc	tactgcaac	ctctgccgcc	cgaaaccttg	tcctctgcct
3241	cttgttcctg	ctggggaggt	aggttgcccc	aggctgctga	tgctggaagc	agcaggggga
3301	ccctggggct	tgatgagccc	tacaccctgt	tttgtttctc	tagcatgcct	ccaaggccct
3361	tgaggactca	gctggcaggc	ccaggcccag	gcccagtgca	gggtggggta	gtaggagggg
3421	ttggaagcag	aatccaggta	tggctggtgg	ggcaagtaag	gcgactctac	ttggctaagc
3481	cttctgcccc	gggctcccac	tccatggctg	gccctctgcc	tgaacttctt	ccacataatc
3541	tcctctgcaa	actgcccact	gtcctgcgca	aggacttctt	ctgcagagtg	tggagttagag
3601	gaaagggaa	gggggacaag	aggacgtcca	agctggttgt	caaagttagt	ggtgcagagg
3661	gaagtgtgtt	ttcccaggag	acagaggagg	gttttctctg	tgaaggaaca	gtctgaaggg
3721	aggggtgaaga	gagggtagca	ggctgggcat	ggtggctcac	acctgtaatc	ccagcacttt
3781	gggaggccga	agtaggaaga	ttacttgagg	ccagtagttc	aagaccagcc	tgggcaacat
3841	agttagaccc	caactgtaag	gggaataaaa	gtttggggca	caggggggtg	tagcaggtat
3901	gctacacaca	gctccacagt	gccaggggca	gggtgaacaa	agggacatgg	tggggcccagt
3961	agaagttgct	tctaagtagg	tagataccag	aaaaagacca	cttctctgtg	tttcatgacc
4021	ctgccttaga	attaatggtg	gaagggacaa	ggtagtcagt	cccctcaggt	gacctatcgt
4081	gcagcttggg	gtgctctgat	tgtgagttca	tgaagctggc	aatagtgga	agaggagatg
4141	ggtagggtgc	atgcaaaggt	ccaggaacca	caccctgcac	agttagctct	gttgagaggg
4201	ggcagcctgt	gggaggaggc	tgtgcctaca	ggacttagca	aggggtgttg	tctattttgt

4261	accagccggt	ggagtgggtct	cctcctcctc	ccgcaggggc	ccttccagtc	tttgccaacc
4321	aggagtgcag	actgggtggga	agaagaactg	tgaaactggg	gccagagcat	tgcagggagg
4381	ggcacaggcc	atggcgggct	cagcgttctc	ctcccaccac	ccaccatgct	ggactcttcc
4441	caggtcagca	cttaagcgat	gcctttgccc	aggtgaaccc	cctcaagaag	gtgccagcct
4501	tgaaggacgg	ggacttcacc	ttgacggaga	ggtaactggg	accctaggac	tgctgccagg
4561	cctgctggaa	ccatcctggt	ctaaccctct	atttcataga	caaggaaact	aaagtcttca
4621	gaggcagaga	gtctctgtgc	cccgcatcct	gcagagagtc	agtactggac	cccaggccct
4681	tgccttcctg	ctattccagt	tcaccctgat	gattagaaaa	gcaaatatct	actttacttc
4741	cacaccagtg	ctttggttgc	tggtgagtgg	tgagagtatc	cttgagacag	ggtaggccag
4801	aggacgatgg	cagctttgcc	caccgtgggg	caggcctctg	gccaagcttg	tgtggcgatg
4861	gctcagtggc	atctgggctg	cccggtggct	ccatctctgg	gctgcagctt	cccaggatgg
4921	gtcttcccca	tggaagagcc	accagatatg	gacgtcttac	atcacagctg	gtcccaagaa
4981	gttgaatcct	cttcaggaaa	agccaatctt	tccccagttc	tgcccttttt	gtcaccagag
5041	tcacccttcc	cctaacaaga	acctggagtt	tgtgctttaa	agctcatctc	tgaaatctca
5101	ggatggacgc	acctccgatg	aattcctctg	acattctgcc	agggcccgtc	ttcctccctg
5161	gtgccccagg	tgtcctgagt	ccttgtgtca	ctcagcgttg	tgacccccag	gtaccagcca
5221	gagtcaatgt	gcaatctctg	cctctgtcac	tactctcacc	ttcaggtctg	tggtcacag
5281	agacctgcag	ccctcctcag	aggtggcttg	aacaattggc	tgggagcaaa	aggagctcct
5341	gggacccctg	cacagacaac	ggagtcgtta	agctgggaca	cgtgtgtagc	cccagcttaa
5401	aagagaatat	aggcccgtgg	cagatacaga	ggttttctgc	ccttttgggc	tgcagccca
5461	acctttggga	aaccccaagt	tcctgaaagc	ttttctgtgt	ctccaaatgg	acacatcctg
5521	tgtccttcca	ggtccatgct	catctcatca	ccatggcggc	cctcaaaaacc	cagggaagga
5581	ggagagtgcc	agggggcctt	gtctgttctg	ttgttctagg	atcctgcagc	tgcaggagtg
5641	cttcttgagt	ggtacttttag	gaagccaaac	taccccagtc	agcttagata	ggagctgatt
5701	cttggcagaa	agaatgacag	aaagaacaaa	gggacacgga	agcctttttg	aacagtcagg
5761	ccatcagagg	ctggtcggaa	tcccagcaga	tgagagtgga	taccgaatgg	aaagaactga
5821	gcttcttttaa	agctcagctt	tgatgccccg	ttctcctgga	agctctctct	ggttctctga
5881	tcagaaactg	tctctaaaca	tttggcaaga	cattctgttg	tgggattttg	cctggtggta
5941	ggaaaagctt	gggtatttagc	ctcagaaaaga	ttctcagctc	tgccattaag	agctgtgtgc
6001	cctagggcaa	gtctctgcct	ttctaagcct	ggttttcttc	tctggaaaaa	gaggctaata
6061	ctttggcaaa	ttgtcagaaa	ggttaaagaa	gtgtgctggg	cacagtgggt	cacagctata
6121	atgccagcgc	tttgggatgc	caaggctgga	ggattgcttg	aggataggag	tttaagacca
6181	gcctggcaat	acagtgagat	cccattctcta	caaaaaagaa	aaaaggtagc	caggcatggt
6241	ggtgcactcc	tataaaaatt	gaagctgcag	tgagctgaga	ctgcaccact	gcactccagc
6301	ctgggtgact	gaggaagacc	ttgtctccaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaagg
6361	ccaggtgcgg	ttgcttatac	gtgtaatcac	agcactttgg	gaggccgagg	caggcagatc
6421	acaaggtcag	gagttcgaga	ccatcctggc	taatattggtg	aaaccccatc	tctactaaaa
6481	ctacaaaaaa	ttagccaggc	atggtggcac	gcacctgtag	ttccagctac	ttgggaggct
6541	gaggcaggag	aatcacttga	accggggagg	tggaggttgc	agtgagccaa	gatcgcacca
6601	ctgcactcca	gcctgagcga	cagagcgaga	ctccgtatca	aaaaaaaaaa	aaagcgacta
6661	tgtatgaaat	accagcacca	gtgcccttcc	cttaccatc	atgaccccca	caccacagtc
6721	gtggccatcc	tgctctacct	gacgcgcaaa	tataaggtcc	ctgactactg	gtacctcag
6781	gacctgcagg	cccggtcccg	tgtggatgag	tacctggcat	ggcagcacac	gactctgcgg
6841	agaagctgcc	tccgggcctt	gtggcataag	gtgaggctgg	gaatgtgggg	ggcggcagcg
6901	agagcattcc	ccaaaggtgt	tcaggcacca	gtctcttctt	ttcagttttg	gattatttct
6961	actgacctgt	ctttgccttc	acagattctt	tcctctgttg	tgccaaattg	ctattaagcc
7021	catccaatac	attcttttgtt	tgagatatgt	atttttcagc	tctggaaatt	ccattttggtt
7081	gtttttttaga	atttccactt	ctctgatgaa	attcaccatc	tgttcatcca	ttttatctgt
7141	cttttcttgt	aaattcttta	acatatttat	cactgttacc	taaaaatctt	tgtcaactaa
7201	tttcaacacg	taggtgttct	gtgggtctgg	tttttttgtt	ttgttttgtt	tttgagatgg
7261	ggtctcactc	tgtcacccag	gctgagtgca	atggtgcgat	ctcagctcac	tgcaacctcc
7321	acctcccagg	ctcaagcgat	tctcctgcct	cagcctcctg	cgtagctggg	attacaggca
7381	cccaccagca	cacctggcta	acttttgtta	tttgtagtgg	agaccgggtt	tcaccatggt
7441	ggccaggctg	gtttcgaact	ctccacctga	agtgattcgt	cctccttggc	ttcccaaagt

7501	gttgggatta	caggcatgag	ccaccatacc	cagcctacgg	gtctattttct	attgattggt
7561	gtttttctccc	tcttgattat	gggtcacatt	tgcttgcttc	tttgcatgtc	tcattgatgta
7621	ttatcattat	tttttatttt	tttgagacgg	actctcactc	cattgcccag	gctggcgtgc
7681	aatggcacga	tcttggtcca	ctgcaacctc	cgcctcctgg	gttcaagcga	ttctcccacc
7741	tcagcctccc	aagtagctag	aattacaggc	acctgccatc	atgcctggct	aatttttgta
7801	tttttgtaga	gacagggttt	caccatgttg	gccaggctgg	tcttgaactc	ctgacctcag
7861	gtgatccctc	catctcggcc	tcccaaagtg	ctgggattgt	aggcatgagc	caccatgccc
7921	ggcctcatga	tgtatccttg	tgtgccagac	attatgataa	aagaagagca	gagattgaat
7981	tgcataataa	acacccccaa	gaaagggtct	gcacttccct	gtgtcaggta	gccaggatgt
8041	gaggctgttc	tcttctaagc	taatcaggag	gtgggctggg	ttgcagggtt	agttgggttc
8101	agtttatctt	tggtttcaaa	tatcttgaat	gtgagatcag	gtcactagct	cagtctagca
8161	tggcttttga	atctaatac	caactacgat	gttgctgtga	agatctctct	gcttttcctc
8221	cctgccccca	gttcccaaac	tgctgtctag	tcagaaaagc	ccatgcctgt	gacagtcttt
8281	ctcccagcct	gcttggggcc	aaggaaatga	aattggaatg	aaagtagctc	atctaggaac
8341	ggcttatgcc	tctctggaat	ttagttcatt	tagtcaagtg	ctgtccgata	gaagtataaa
8401	gtgagccaca	tacgtaattt	taaattttct	agtaggcaca	tttaaaaagt	aaaaagagtc
8461	caggcacagt	ggctcatgcc	aataatccta	gcactttggg	aggccaaggc	agtggatcac
8521	ctgaggtcag	gagttcgaga	ccagcctggt	caacatgggg	aaaccttgct	tctactaaaa
8581	ccacaaaaat	tagccaggct	tgggtggcct	tgctataaat	cccagctact	caggatgtcg
8641	aggcaggaga	attgcttgaa	cccaggggcg	aaagttggca	gtgtgccgag	atggtgccac
8701	ttcactccag	cctgggtgac	agagctgaac	actgtctcaa	aagaaaaaaa	aaaagtaaaa
8761	ggaaattgat	atattttact	taacccaatg	tggtgagaat	attatcattt	tggccaacaa
8821	gtacaagaaa	agatgcttgg	ccgggcgcg	tggtcacgc	ctgtaatccc	agcactttgg
8881	gaggcggagg	caggcagatc	acaaggtcag	gagattgaga	ccatcctggc	taacacagtg
8941	aaacctgtgc	tctactaaaa	ataaaaaaaa	aattagctgg	gcgtgggtgg	gggcacctgt
9001	agtcccagct	actcgggagg	ctgaggcagg	agaatggcgt	gaaccaggga	ggcggagctt
9061	gcagtgagcc	gagatcaccc	cactgcactc	cagcctgggc	gagagagcaa	gactcagtct
9121	caaaaaaaaa	aaaaaaagaa	aagatgctca	gcactactaa	tcattagggg	aatgcaaata
9181	aaaactaact	ccctactcca	gtaactcccg	actttgcctg	cccaatcccc	aggtgatggt
9241	ccctgttttc	ctgggtgagc	cagtatctcc	ccagacactg	gcagccaccc	tcagcaggtt
9301	ctgcagtgacc	ctgcagttgc	ctgcagacaa	gttccctccag	aacaaggcct	tccttactgg
9361	tcctcacatc	tccttagctg	acctcgtagc	catcacggag	ctgatgcagt	tgagtgctgt
9421	gggcagggtga	accactagg	cagggggccc	tggttagttg	ctgaagtcc	gcttatgctg
9481	ccacaccggg	ctatggcact	gtgcttaagt	gtgtgtgcaa	acacctcctg	gagatctgtg
9541	gtccccaaat	cagatgctgc	ccatccctgc	cctcacaacc	atccatcccc	agtctgtacc
9601	cttttcccca	cagcccggtg	gtgctggctg	ccaagtcttc	gaaggccgac	ccaagctggc
9661	cacatggcgg	cagcgcgtgg	aggcagcagt	gggggaggac	ctcttccagg	aggcccatga
9721	ggtcattctg	aaggccaagg	acttcccacc	tcagaccccc	accataaagc	agaagctgat
9781	gccctgggtg	ctggccatga	tccggtgagc	tgggaaacct	caccttgca	ccgtcctcag
9841	cagtcacaaa	agcattttca	tttctaattg	cccatgggag	ccaggcccag	aaagcaggaa
9901	tggcttgcc	aagacttgcc	caagtcccag	agcacctcac	ctcccgaagc	caccatcccc
9961	accctgtctt	ccacagccgc	ctgaaagcca	caatgagaat	gatgcacact	gaggccttgt
10021	gtcctttaat	cactgcattt	cattttgatt	ttggataata	aacctgggct	cagcctgagc
10081	ctctgcttct	aactctaatt	tgtgatttat	ttgactttcc	tctgtcccag	acctggctat
10141	ggtctctatg	caaaagacaa	cccccttccc	aggccgtgtg	ggtcagcttc	cccctgatgt
10201	ttgccaagag	tgaaattaat	aaatgtggct	gaggccgcgt	gcgggtggctc	acgcttgtaa
10261	tcccagcact	ttgggaggcc	ggggcagggg	gatcacgagg	tcaggagatc	gagaccatcc
10321	tggctaacac	ggtgaaaccc	cgtctctact	aaaaatacaa	aaaattagcc	gggcgtgggtg
10381	gtgggtgcct	gtagtccag	ctactcggga	ggctgaggca	ggagaatggc	atgaaccag
10441	gaggcggacc	ttgcaatgag	ccgagatcgc	gccactgcac	tccagcctgg	gcaaccgagc
10501	gagactccat	ctcaaaaaaa	aaaaaagtgg	ctgagtgtgg	tagctcatac	ttataatcct
10561	agtacttttg	gaggtccagg	ttggggggat	tgcttgagtc	caggatttca	aaacaaactt
10621	tttttttttt	ttttttgaga	tagtgtcttg	ctctgttgcc	caggctggag	tgcaatggca
10681	tgatcacagc	tcactgcaac	ctccacctcc	caggttcaag	cgattctctt	gcctcagtct

10741	ccccagaagc	tgggattata	ggcacgcact	atcacacctg	gctaattttt	gtgttttttag
10801	tagaaacagg	gtttcaccgt	gttggtccagg	ctgggtgtcaa	actctgtacc	tcaaagtatc
10861	tgtgcacctc	cacctctgaa	agtgtctggga	ttaccatgag	ccactgtgcc	tgggtcccca
10921	aaaaaatatt	ttttcagaga	tgggggtctca	ctctgttgcc	cagcctggag	tgcagtggca
10981	cagtcatggc	tactgcagc	cttgacatcc	caggctcaag	caatattccc	acctcagcct
11041	cctaagaagc	tgggacaaca	ggtgcacccc	accacgccc	gctcatttct	tttttatttt
11101	tgtagagaca	gggtcttgcc	atgttgccc	ggctagccct	gcactcctgt	gctcaagaga
11161	tgctcccacc	tctacctccc	aaagtgtctg	gattacgggt	gccaagacac	cacacgcaac
11221	caaaagaaat	ttttttttta	attagtcagg	cgtgggtgatg	catacctgta	gttctagcta
11281	cttggggaggc	tgaggtggga	ggattgcttg	agcccaggag	ttcgaggctg	cagtgaagctc
11341	tgattgagcc	atagcactcc	agcctggggc	aacagaacaa	gatcctgtct	ctaaaaacac
11401	acaaagaaac	ccaaaacaaa	acaaaacaaa	acatttctctg	tagccttcta	attatcagag
11461	aaagtagttt	atctgaccgc	tcagggccc	gcagcatccc	acatttcttg	gctataagca
11521	tggtgacct	acagtcggct	gagttagcct	cccaggacat	gaccttact	ggtttttgga
11581	ttgtgtgtgt	gtgtgttttt	tttttttgtt	tgtttgtttg	tttttttgag	aaggagtgtt
11641	gctctttttg	cccaggctgg	agttcagtgg	caaaatctca	gctcaccaca	acctccgcct
11701	cccggttaa	agtgattctc	ctgcctcagc	cttctgagta	gctgggatta	caggcatgca
11761	ccaccacgcc	cagctaattt	tgtatttgta	gtagagacag	ggtttctcca	tgttggtcag
11821	gctggtctcg	aactcccaac	cacaggtgat	ctgcctgcct	cggcctccc	aagtgtctga
11881	attacaggca	taagccactg	cgttgggacg	actcttactg	tttttgtttt	gttttctttt
11941	gcttggtttt	tggatttttt	ttgagacagt	ctcgctttgt	cgccccggct	ggtgtgcagt
12001	agcgcaattt	cggctcactg	caagctccgc	ctcccgggtt	cacgccatto	tcctgectca
12061	gcctcccgag	tagcggggac	tacaggcgcc			

GSTM1 GENI

ORIGIN

1	atgcccata	tactggggta	ctgggacatc	cgtggggtaa	gcgaggggtcc	tctggtgggt
61	gggacagggg	gcggaggcgg	ggatgtgtgg	agtagctgca	ggactggctc	tagggaccgt
121	tcctcttcag	ggctgcccgc	ctcagaagg	cctgtgcatg	acgctgtgtg	tgtgtttggg
181	ggtggggg	ggtagaggag	gcgagggta	cgtgcagtat	agactagggc	tggcctgggt
241	cagagaaagt	caccaagtca	gggacctccc	atctctgacc	cgagcgcggg	ccatctctcc
301	cagctggccc	acgccatccg	cctgctcctg	gaatacacag	actcaagcta	cgaggaaaag
361	aagtatacga	tgggggacgg	taatgacacc	cttgtgtccg	ggctctgcac	tcacgctgag
421	ttggcaccaa	gcaacccatg	gtggccacct	gtcgtaacct	tgcaggcctc	ccctgctgga
481	gctgcaggct	gtcccttccc	tgagccccgg	tgaggagtcc	tgtggccttg	caaggcagaa
541	tgctggggcg	ggatagtggg	tcctgtttta	attgggttgg	gtgtcctcag	agcttcccaa
601	accctggaag	ccttagccgt	gtgggggtcca	gagcctcagc	gggattattt	gtccctgaac
661	cctgggatgt	gggactgagt	ggtcagattc	tagatccacc	tgtctcaggg	atcttgccac
721	tggttccttg	ggagggtccc	cggaaggagg	gctgggctct	ggggagggtt	gttttcaact
781	cttcttcccc	acggcagctc	ctgactatga	cagaacgcag	tggctgaatg	aaaaattcaa
841	gctgggcctg	gactttccca	atgtaggtgc	agggggaagg	ggcggttttg	ggggaaagtg
901	cgacgtgtct	ctgactgcat	ctcctctccc	cagattagag	gtgttcggat	caggagtctt
961	ctgcccattt	cctggttgct	tacacagccc	ctgcatgatg	ttctgtgtcc	cagctcattt
1021	gttcatgtga	cagtatttct	atgtcaggcc	tgcattgagc	ggcacagtga	gtctggtctc
1081	cccttgcata	taggaagggg	atgctgggga	gcctgctggc	cccaactgag	cttccccggg
1141	ttcccatcta	tccagctgcc	ctacttgatt	gatggggctc	acaagatcac	ccagagcaac
1201	gccatcttgt	gctacattgc	ccgcaagcac	aacctgtgtg	agtgtgggtg	gctgcaatgt
1261	gtggggggaa	ggtggcctcc	tccttggtcg	ggctgtgatg	ctgagattga	gtctgtgttt
1321	tgtgggtggc	aggtggggag	acagaagagg	agaagattcg	tgtggacatt	ttggagaacc
1381	agaccatgga	caaccatatg	cagctgggca	tgatctgcta	caatccagaa	tttgtgagt
1441	tccccagtga	gctgcatctg	acagagtttg	gatttggggc	caggactctt	gcatectgca
1501	cacattgggt	ttaagtccct	ggtaccattc	atcctccaag	tgctttccca	tcattctagca
1561	gtatctctac	gactccaatg	tcatgtcaac	aaaagcagag	gcaattccca	accaacctta

1621 ggacacgatt ccaggcattc ccagggtaga aatttcagtt cctgtatggt aaagtttgtg
1681 ttcagaatct ccttcacatc ctctggcctc tgacttctgt cctgggtcat ttctgtcagc
1741 cagttcacat cacctgcctg ctcttagaat atgcagactc aagtagaaga ctcaggaatg
1801 taatggcacc ctgcaattgc atcttctcct caacagtttt ctgagtgtctg tcattgacat
1861 gcacagggat ctgcgcatct tcataacaga cagctcagag gcagtcagag ggcctttatt
1921 cctctccctc cttcctttca acttgaactt ctcatctccc tggaaactag tcaacgttca
1981 ttgttttctt ctgccacccc attagaagga actttctact ttccctgagc tcccttagtt
2041 ctttgcatcc ttgattctgc tggctctggat ccagaggctg ccaggtgctt gggcgctcct
2101 ggggctgacc cagaggctat tgggaggtca gtgaggacag attcagggac agcatctcat
2161 tctctctctg cttctgatca gtttagatag ggtctgacac tcagtcagag tctaaaatgc
2221 tgagtatcca attgaagcct gcactgcccc agttccagac ttggggaaga tggctgcttg
2281 cccgtgccag cctggccgct cacagccccg gggaggccac gtctgtgcag ggagcttttg
2341 tccgagggtg gtgacagctg ttttctgcct caggagaaac tgaagccaaa gtacttggag
2401 gaactccctg aaaagctaaa gcctctactca gagtttctgg ggaagcggcc atggtttgca
2461 ggaaacaagg taaaggagga gtgatatggg gaatgagatc tgttttgctt cacgtgttat
2521 ggaggttcca gcccacacat tcttggcctt ctgcagatca cttttgtaga ttttctcgtc
2581 tatgatgtcc ttgacctcca ccgtatatttt gagcccaact gcttggaacgc cttcccaat
2641 ctgaaggact tcctctccc ctttgag

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışma; soy ağacı bilinen, 1.-4. kuşaklarda Koroner Arter Hastalığı (KAH) ve Akut Miyokart İnfarktüsü (AMİ) olan ailenin bulunabilen bireyleri ile yapılmıştır. Çalışmamızda 100 bireyden alınan kan örnekleri ile çalışılmıştır. Aynı zamanda ailenin 1.-4. kuşak bireylerinin soyağacı çıkarılarak kalp hastalıkları ile ilgili bilgiler de temin edilmiştir.

3.2. Gereç

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda verilmiştir.

1. Taq Polimeraz (Fermantas)
2. Magnezyum Klorür ($MgCl_2$) (Merck)
3. Sukroz (Merck)
4. Tris Baz (Amresco)
5. Sodyum klorür (NaCl) (Fermantas)
6. EDTA (Sigma)
7. Sodyum Dedosil sülfat (SDS) (Bio Basic Inc)
8. Proteinaz K (Sigma)
9. Brom Fenol Mavis (Fermantas)
10. Etidyum Bromür (Fermantas)
11. PCR Tamponu (Fermantas)
12. Hae III ile Kesilmiş PUC Marker DNA (Fermantas)
13. Primerler
14. Deoksinükleosit Trifosfat Seti (Roche)
15. Agaroz (promega)
16. Saf Etanol (Riedel-de Haen)

17. DNA izolasyonu, PCR ve elektroforez ile ilgili diğerk kimyasal maddeler (Sigma ve Merck)

3.3. Kullanılan Başlıca Cihazlar ve Teknik Malzemeler

1. Santrifüjler (Techne Cambridge, Universal 16R)
2. Spektrofotometre (Shimadzu UV-160)
3. Hassas terazi (Sartorius)
4. Su banyoları (Grant)
5. pH metre (Inolab)
6. Buzdolabı (Arçelik, Uğur)
7. Jel görüntüleme cihazı (Uvitec)
8. Yatay elektroforez tankı (Biogen)
9. Deepfreez (Beko, Siemens)
10. Vorteks (Nüve NM 110)
11. Mikrodalga fırın (Arçelik)
12. Elektorforez (EC 3000-90, E-C Apparatus Corporation)
13. Thermal cyclers (Bioer XP cyclers, Eppendorf Mastercycler)
14. Otoklav (Trans)
15. Otomatik pipetler (Socorex, Beta-Pette, Gilson, Rainin)
16. Mezür

Bu teknik malzemeler araştırmanın yapıldığı Ç.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda bulunmaktadır.

3.4. Yöntem

Bu çalışmada; öncelikle ailenin tüm kuşaklarındaki bireylerin bilgileri toplandı. Ailedeki kalp hastalıkları nedeniyle ölen bireyler ve halen kalp hastası olanlar tek tek saptandı. Buna göre; probandin ilk görüldüğü aileden başlayarak 1. ve 4. kuşakların soyağacı çıkarıldı.

İkinci olarak, bu ailenin bulunabilen bireylerinden kan örnekleri toplandı. Bireylerden toplanan kan örnekleri numaralandırılıp listelendi. Daha sonra bu örneklerin DNA izolasyonu (Doymuş tuz çözeltisi ile çöktürme yöntemi kullanıldı⁴¹) yapıldı. PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi ve agoroz jelde yürütülerek jel üzerindeki bantlara göre delesyonların olup olmadığı değerlendirildi.

3.4.1. DNA İzolasyonu

Doymuş Tuz Çözeltisi ile Çöktürme Yöntemi

1. 700 µl tam kan 1.5 ml'lik ependorf tüp içerisine alındı. Daha sonra 700 µl eritrosit lizis tamponu ile muamele edildi. Bir iki kez karıştırılıp 3 dk beklendi. Sonra santrifüj edilerek süpernatant pipet yardımı ile atıldı. Bu aşama iki kez tekrarlandı.
2. Eğer pellet yeterince temiz değilse 1 ml fizyolojik tamponla yıkandı. Bunun için pellet üzerine fizyolojik tampon eklendi, santrifüj edilerek süpernatant pipetle alındı ve atıldı.
3. Pellet üzerine 300 µl TE-9 (pH:9) tamponu ilave edilerek pellet çözündürüldü. Daha sonra üzerine 100 µl %10'luk SDS (Sodyum Dedosil Sülfat) ve 20 µl Proteinaz K ilave edildi. Tüp iyice karıştırılarak 65°C'de 1.5-2 saat inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda tüp içerisine 200 µl doymuş (6M) tuz çözeltisinden ilave edildi. Tüp iyice karıştırıldı ve süt beyazı rengine dönüştüğü gözlemlendi. Burada amaç; DNA dışındaki protein, lipid gibi moleküllerin DNA'dan uzaklaştırılmasıdır. Daha sonra bu karışım santrifüj edildi ve böylece DNA diğer moleküllerden ayrıştırıldı.
5. Bu kez süpernatant steril ependorf tüplerine alındı ve üzerine 900 µl saf alkol ilave edilerek DNA'nın yoğunlaşması gözlemlendi. DNA'nın tüpün dibinde çökmesi için santrifüj edildi.
6. Süpernatant döküldü ve pellet üzerine %70'lik alkolden 1000 µl ilave edilerek iyice karıştırıldı ve santrifüj edildi. Pellet halinde kalan DNA'nın üzerindeki süpernatant döküldü ve DNA kurutuldu.
7. Alkolü tamamen uçmuş DNA üzerine 200 µl TE ilave edilerek 65°C'de 15 dk bekletildi ve çalışmak üzere 4 °C'de bekletildi.

3.4.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi

PCR reaksiyonun hazırlanması aşamasında bilmemiz gereken diğer bir temel konu da DNA'yı çözdüğümüz sıvı ortam içerisindeki DNA konsantrasyonu ve saflık derecesidir. Bunun belirlenmesi UV spektrofotometresi ile yapılabilmektedir. DNA örneğinin içerisinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50 µg/ml, tek iplikli DNA (ssDNA) için 33 µg/ml, RNA için ise 40 µg/ml'lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir³⁸.

UV absorbansı DNA'nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de de proteinler pik verir). Saf bir DNA örneğinde 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı $A_{260nm}/A_{280nm}=1.8$ 'dir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla bulduğumuz değer 1.8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. Bu orandan düşük değerler örnekte fenol ya da protein kontaminasyonu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir. RNA için $A_{260nm}/A_{280nm}=1.8-2.0$ 'dır³⁸.

3.4.3. GST Geninin GSTT1 ve GSTM1 Polimorfizmleri İçin PCR Amplifikasyonu

Çalışmamızda GST genine ait iki değişik polimorfizme bakılmıştır. Elde edilen genomik DNA spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon için aşağıda verilen primerler kullanılmıştır^{10,15}.

GSTT1 için; Forward primer: 5'- TT CCT TAC TGG TCC TCA CAT CTC -3'

Reverse primer: 5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA -3'

GSTM1 için; Forward primer: 5'- GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C -3'

Reverse primer: 5'- GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G -3'

Örneklerimiz için uygun amplifikasyon koşullarının saptanması çeşitli denemelerle belirlendi. Magnezyum klorür, Taq polimeraz ve DNA'nın farklı konsantrasyonları yanında PCR programında farklı ısı döngüleri ve yapışma ısıları denendi. Her denemede bir

değişken dışındakiler sabit tutuldu. Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği koşullar, bütün PCR reaksiyonları için kullanıldı. Çizelge 1’de GSTT1 polimorfizmi için, çizelge 2’de ise GSTM1 polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonları verildi.

Tablo 1. GSTT1 polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu

PCR Tamponu (10X)	5 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTP	0.4 µl
Taq poimeraz	3 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Genomik DNA	2 µl
Su	32.6 µl
Toplam	50 µl

Optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri;

Ön denatürasyon:	94 °C	0:02:00 sn
Denatürasyon:	94 °C	0:00:30 sn
Yapışma:	66 °C	0:00:30 sn
Sentez:	72 °C	0:00:40 sn
Toplam döngü:	35	
Final sentez:	72 °C	0:10:00 sn

Tablo 2. GSTM1 polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu

PCR Tamponu (10X)	5 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTP	0.4 µl
Taq poimeraz	3 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Genomik DNA	2 µl
Su	32.6 µl
Toplam	50 µl

Optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri;

Ön denatürasyon: 94 °C 0:02:00 sn

Denatürasyon: 94 °C 0:00:30 sn

Yapışma: 64 °C 0:00:30 sn

Sentez: 72 °C 0:00:40 sn

Toplam döngü: 35

Final sentez: 72 °C 0:10:00 sn

Elde edilen PCR ürünleri 4 °C’de muhafaza edilmiştir.

PCR reaksiyonunun hazırlanmasında izlenen basamaklar;

1. 200 µl’lik PCR tüpleri üzerlerine örnek kodu yazılarak hazırlandı.
2. Tüm DNA örnekleri ve çözeltiler önce vorteks ile karıştırıldı, sonra santrifüj edildi.
3. PCR karışımı hazırlamak için daha önce belirlenmiş olan miktarlardaki PCR tamponu, primerler (GSTT1 ve GSTM1 polimorfizmleri için kendilerine özgü olan primerler kullanıldı), dNTP, Taq polimeraz, MgCl₂ çizelgede verilen oranlara göre tüp içine eklendi.
4. İyice karışması için tüp, önce vorteksle karıştırıldı, daha sonra santrifüj ile tüpün dibinde toplanması sağlandı.

5. Kodlanmış her bir PCR tüpüne hazırlanan karışım dağıtıldı ve her tüpe kodunu taşıyan genomik DNA daha önceden belirlendiği miktarda eklendi.
6. Yine önceden belirlenen miktarda her tüpe deiyonize su ilave edildi.
7. Her tüp ayrı ayrı vorteks ile karıştırıldı, santrifüj tüpün dibinde toplanması sağlandı ve thermal cycler'a (her bir polimorfizm için ayrı olan PCR programlarına) yerleştirildi.

3.4.4. PCR Ürününün Elektroforezi

Amplifiye edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Agaroz jel elektroforezinde her bir reaksiyon için oluşan bantın parlaklığına, nonspesifik bant olup olmadığına bakılarak değerlendirildi. Bunun için, PCR reaksiyonu ürünlerine 6X yükleme tamponundan 1/5 oranında ilave edildi, pipetlenerek karıştırıldı. Örnekler %2'lik agaroz jel kuyularına dikkatli bir şekilde yüklendi ve 80 V, 100 mA de 45 dk süreyle elektroforeze tabi tutuldu. Beklenen bant büyüklüğü GSTT1 için 459 bp, GSTM1 için 209 bp olduğundan Hae III ile kesilmiş pUC markerı ile birlikte yürütüldü. Beklediğimiz PCR bant büyüklüğü Uvitec jel görüntüleme cihazında bakılarak doğrulandı.

3.4.4.1 Jelin Değerlendirilmesi

Jelin değerlendirilmesi örneklerin oluşturduğu bantlar ile marker bantları kıyaslanarak yapıldı. GSTT1 için 459 bp, GSTM1 için 209 bp büyüklüğünde iki band elde edildi. Bu iki bandın elektroforezde gözükmesi genotipin sağlam olduğunu yani $T^{wild} M^{wild}$ genotipinin olduğunu gösterir. Ancak $T^{wild} M^{null}$ genotipinde sadece 459 bp büyüklüğünde bir band görülür. Yine $T^{null} M^{wild}$ genotipinde de tek band vardır. Ancak bandın büyüklüğü 209 bp'dir. $T^{null} M^{null}$ genotipinde ise homozigot delesyon olduğundan band görülmez.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Grubunun Genel Bilgileri

Çalışma grubunun yaş dağılımı 35 yaşından sonra KAH görülmesi nedeniyle denek grubu 20-35 yaş ve 36 ve üstü yaş olmak üzere iki gruba ayrıldı. Denek grubunun erkek ve kadınlara göre dağılımına baktığımızda erkeklerin 20-35 yaş grubunda %42, kadınların %44 oranında olduğu, 36 ve üstü yaş grubunda ise erkeklerin %58, kadınların ise %56 oranında olduğu saptandı (Tablo 3).

Tablo 3. Çalışma grubunun cinsiyet ve yaş grubuna göre dağılımı

Cinsiyet	20-35 yaş (%)	36 ve üstü yaş (%)	Toplam (%)
Erkek	23 (0.42)	32 (0.58)	55 (0.55)
Kadın	20 (0.44)	25 (0.56)	45 (0.45)
Toplam	43 (0.43)	57 (0.57)	100

Çalışma grubunda koroner arter hastası olup yaşayan ve ölen kişilerin kendilerinden ve yakınlarından edinilen bilgilere göre sigara içme durumu belirlendi. Erkeklerde sigara içme oranı %89 iken, kadınlarda %40 olduğu, cinsiyet gözetmeksizin baktığımızda ise %79 olduğu belirlendi. Çalışmamızda 19'u erkek 5'i kadın olmak üzere ölen veya yaşayan 24 koroner arter hastası olduğu tespit edildi. (Tablo 4).

Tablo 4. Koroner arter hastası olup, yaşayan ve ölen kişilerin cinsiyet ve sigara içme durumuna göre dağılımı

Hasta Grubu	Sigara içen (%)	Sigara içmeyen (%)	Toplam (%)
Erkek	17 (0.89)	2 (0.11)	19 (0.74)
Kadın	2 (0.4)	3 (0.6)	5 (0.21)
Toplam	19 (0.79)	5 (0.21)	24

Aşağıda yer alan tabloda çalıştığımız 100 bireyin yaş, cinsiyet, kalp hastalığı görülme durumu ve sigara kullanımı hakkında bilgiler yer almaktadır (Tablo5).

Tablo 5: Çalışma grubunu oluşturan bireylerin genel bilgileri

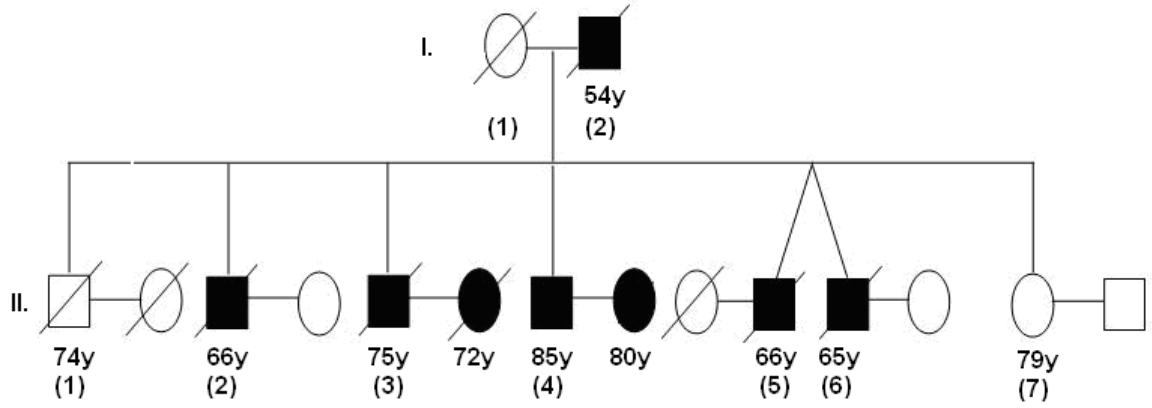
Sıra No	Adı Soyadı	Cinsiyeti	Yaşı	Kalp Hastalığı	Sigara Kullanımı
1	ÖA	E	38	-	-
2	SA	K	26	-	-
3	SA	K	39	-	-
4	SA	K	47	-	+
5	HA	E	52	+	+
6	CA	K	48	-	-
7	EA	K	80	+	-
8	İA	E	85	+	+
9	YA	E	59	+	+
10	YA	K	55	-	-
11	EA	E	34	-	-
12	RA	K	53	-	-
13	BA	E	24	-	+
14	HA	E	56	-	+
15	TA	E	32	-	-
16	CA	K	34	-	-
17	FA	K	94	-	-
18	ŞA	K	30	-	-
19	SA	K	29	-	-
20	HA	E	44	+	+
21	HA	K	70	-	-
22	SA	E	20	-	-
23	ZA	K	27	-	-
24	EA	E	20	-	-
25	EA	E	22	-	-
26	BA	E	25	-	+

27	OA	E	27	-	+
28	NA	K	60	+	-
29	MA	E	62	+	+
30	MA	K	62	-	-
31	DA	E	60	+	+
32	NA	E	35	+	+
33	OA	E	25	-	-
34	ÖA	E	55	+	+
35	MA	E	43	-	+
36	HA	K	30	-	-
37	HA	K	70	-	-
38	EA	E	20	-	-
39	KBA	K	22	-	-
40	MA	E	22	-	-
41	MEA	E	72	-	+
42	MBA	E	28	-	-
43	ABA	E	26	-	-
44	BEA	E	24	-	-
45	YEA	E	32	-	-
46	O A	E	54	-	+
47	YA	E	39	+	-
48	CA	E	24	-	-
49	ÖA	K	30	-	-
50	ZKA	K	56	-	-
51	VA	E	20	-	-
52	BA	K	20	-	-
53	SA	K	40	-	-
54	ZYA	E	60	+	-
55	DA	K	22	-	-
56	DA	E	25	-	-
57	YA	E	49	+	+
58	EA	K	52	-	-
59	HA	K	46	-	-
60	ZA	K	25	-	-
61	FA	K	55	-	-
62	ZA	K	36	-	-
63	GA	K	30	-	-
64	HA	K	79	-	-
65	SA	E	38	-	-
66	HA	K	45	-	+
67	MA	E	52	-	+
68	SA	K	50	-	-
69	MA	E	24	-	-

70	YA	E	59	+	+
71	ŞA	K	59	-	-
72	CA	K	34	-	-
73	EA	K	25	-	-
74	SA	K	27	-	-
75	SA	E	32	-	-
76	SA	K	37	-	-
77	MA	K	31	-	-
78	SYA	K	21	-	-
79	EA	E	21	-	-
80	YA	E	37	-	+
81	GA	K	32	-	-
82	SA	E	20	-	-
83	HA	K	36	-	-
84	SA	K	28	-	-
85	FA	K	24	-	-
86	AK	E	22	-	+
87	ZA	E	48	-	+
88	NA	K	50	-	-
89	ÇA	E	20	-	-
90	İA	E	20	-	-
91	DA	E	22	-	-
92	AA	K	40	-	-
93	MA	E	29	-	-
94	RA	E	37	-	-
95	MA	E	37	-	+
96	MA	E	46	+	+
97	MA	K	48	-	-
98	SA	E	24	-	-
99	BA	K	20	-	-
100	SA	K	22	-	-

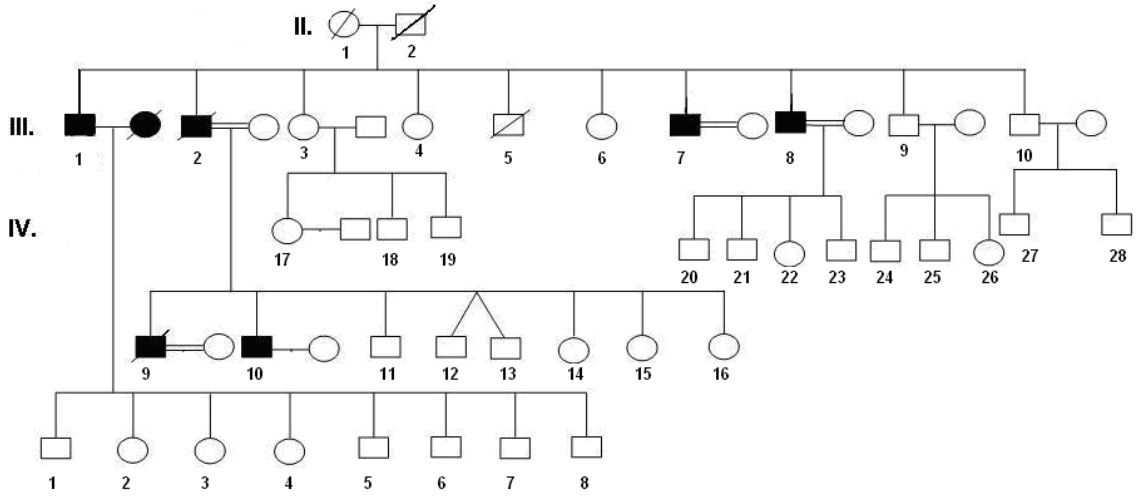
4.2. Pedigri Bulguları

Çalışmamızda soy ağacı bilinen, 1.-4. kuşaklarda KAH olan ve yaklaşık 200 kişinin oluşturduğu bir ailenin bulunabilen 100 kişinin kan örneğinden elde edilen genomik DNA'lar kullanıldı. KAH olan bireyler soyağacı çıkarılarak önceden belirlendi. Bu ailede KAH'nın GST geni ile ilişkili olup olmadığı araştırıldı.



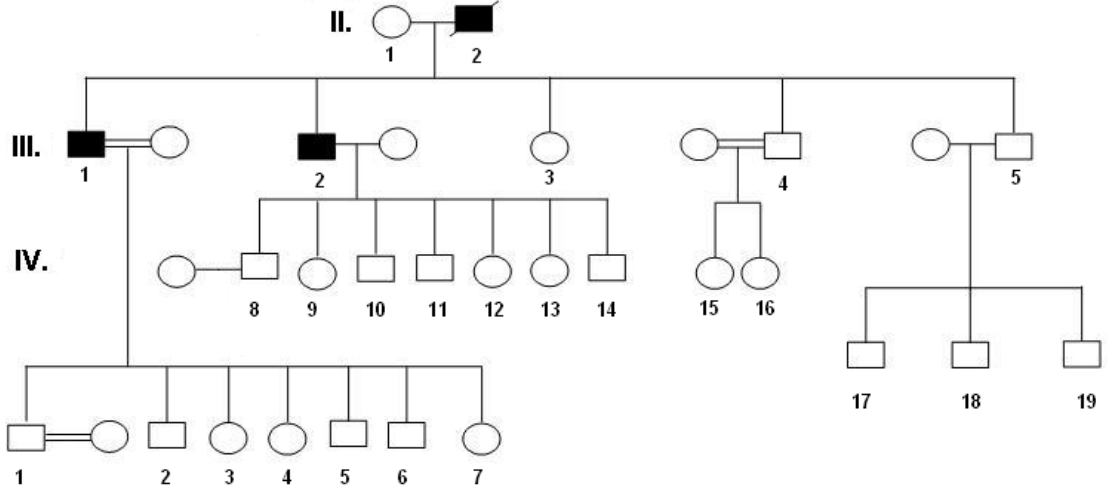
Pedigri 1. Probandin ilk görüldüğü I. ve II. kuşağın pedigrisi (54-85y bireylerin yaşlarını göstermektedir).

Çalışmamızdaki ailede ilk kalp hastalığından ölüm vakasının I. kuşakta ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. Çünkü II. kuşak bireylerin verdiği bilgilere göre babalarının erken yaşta (54 yaşında) aniden öldüğünü herhangi bir hastalığının olmadığını bildirmişlerdir. Ölen bu kişinin (I-2) 6 erkek çocuğu 1 kızı vardır. Altı erkek kardeşin sadece birinde kalp hastalığı görülmemiş olup 74 yaşında zatürreden vefat etmiştir. Diğer kardeşlerden biri (II-4) 25 yıldır kalp hastası olup düzenli ilaçlarını kullanarak hala yaşamını sürdürmektedir (85 yaşında). Diğer 4 erkek kardeş ise (II-2, II-3, II-5, II-6) 65-75 yaşlarında kalp krizi nedeni ile aniden vefat etmişlerdir. Kız kardeşte (II-7) kalp rahatsızlığı olmayıp yaşamını devam ettirmektedir (79 yaşında) (Pedigri 1).



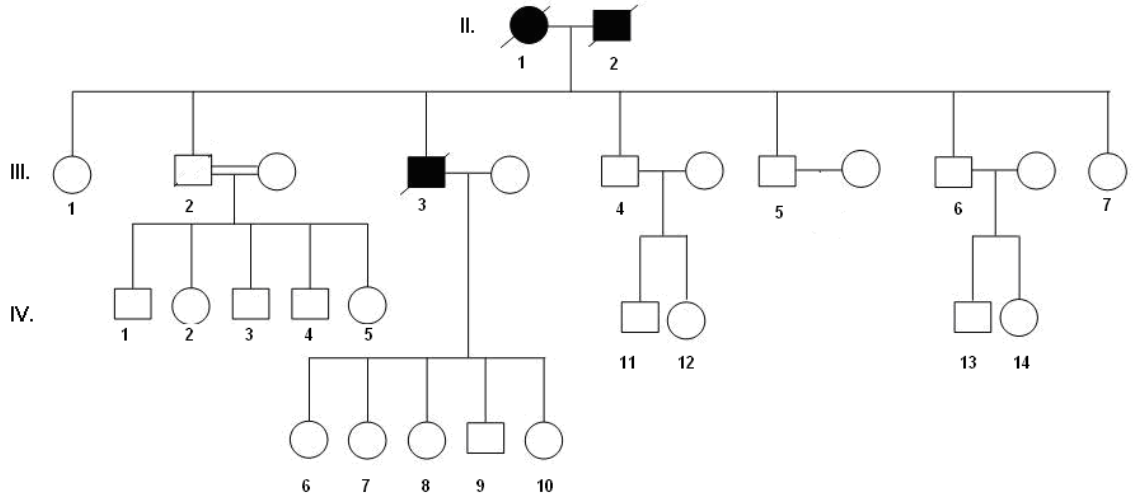
Pedigri 2. 74 yaşında vefat eden ve II. kuşakta kalp hastası olmayan tek erkek kardeşin ailesinin pedigrisi 3. ve 4. kuşakta ortaya çıkan erken ölümler.

İkinci kuşağın kalp hastalığından ölmeyen en büyük erkek kardeşin pedigrisine baktığımızda (Pedigri 2), III. kuşak bireylerden 4 erkek çocuğunda (III-1, III-2, III-7, III-8) kalp hastalığı ortaya çıktığı saptandı. Üçüncü kuşaktaki en büyük erkeğin eşinin de kalp hastalığından ölmesi bunların çocuklarının da (IV. kuşak) gelecekte risk grubunda olduğunu göstermektedir. Nitekim ikinci erkek kardeşin (III-2) 54 yaşında kalp hastalığı nedeni ile vefat etmesi ayrıca amcasının kızı ile evli olması bunun çocuklarından (IV. kuşak) en büyüğünün (IV-1) 40 yaşında vefat etmesi, 2. erkek kardeşin de (IV-2) (44 yaşında) 6 yıldır stendli yaşaması ailesel kalp hastalığının olduğunu ve kesin genetik geçişli olduğunu göstermektedir (Pedigri 2).



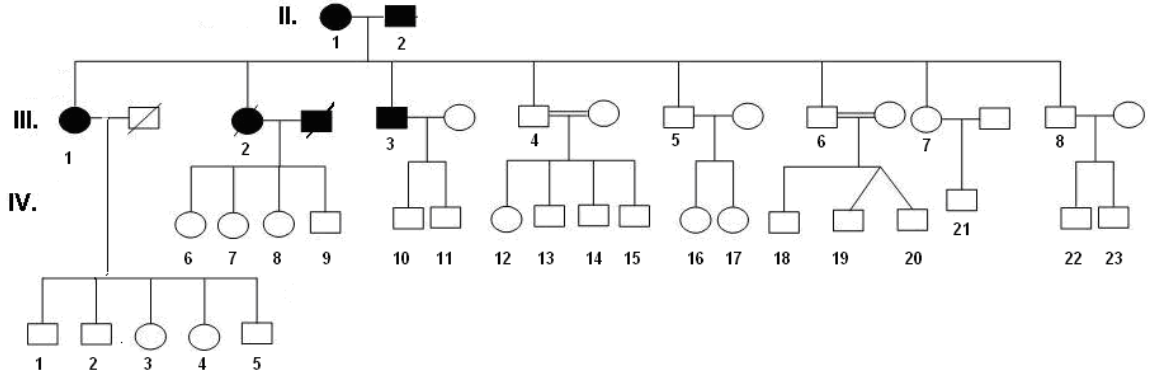
Pedigri 3. 66 yaşında kalp hastalığı nedeniyle vefat eden II. kuşak 2. erkek kardeşin ailesinin pedigrisi ve III. kuşakta ortaya çıkan kalp hastalıkları.

İkinci kuşağın ilk kalp hastalığından 66 yaşında (II-2) vefat eden 2. erkek kardeşin pedigrisine (Pedigri 3) baktığımızda çocuklarında 50 yaşından sonra kalp hastalığının yine ortaya çıktığı saptandı. İlk erkek kardeş (III-1) 62 yaşında kalp hastası, 2. erkek kardeş (III-2) 59 yaşında ve kalp damarlarında stent takılı olarak yaşamaktadır. Ancak bu ailenin 4. kuşağındaki kişilerin herhangi birinde hastalık ortaya çıkmadı.



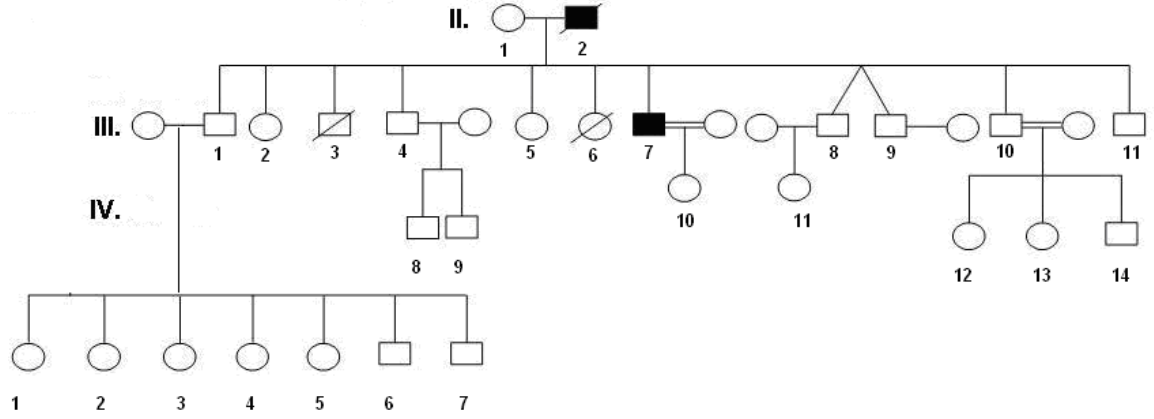
Pedigri 4. Kendisi 75 yaşında eşi de 72 yaşında kalp hastalığından vefat eden II. kuşak 3. erkek kardeşin ailesinin pedigrisi ve III. kuşakta ortaya çıkan erken kalp ölüm vakası.

II. kuşağın kalp hastalığında 75 yaşında vefat eden 3. erkek kardeşin (II-2) pedigrisine baktığımızda çocuklarının birinde (III-3) 45 yaşında hastalığın ortaya çıktığı ve 52 yaşında da vefat ettiği belirlendi (Pedigri 4). Ancak bu ailede şu ana kadar diğer kardeşlerde hastalığın ortaya çıkmadığı, fakat annenin (II-1) de 72 yaşında kalp hastalığı nedeniyle vefat etmesi diğer kardeşlerin veya IV. kuşaktakilerin risk grubunda olduğunu göstermektedir.



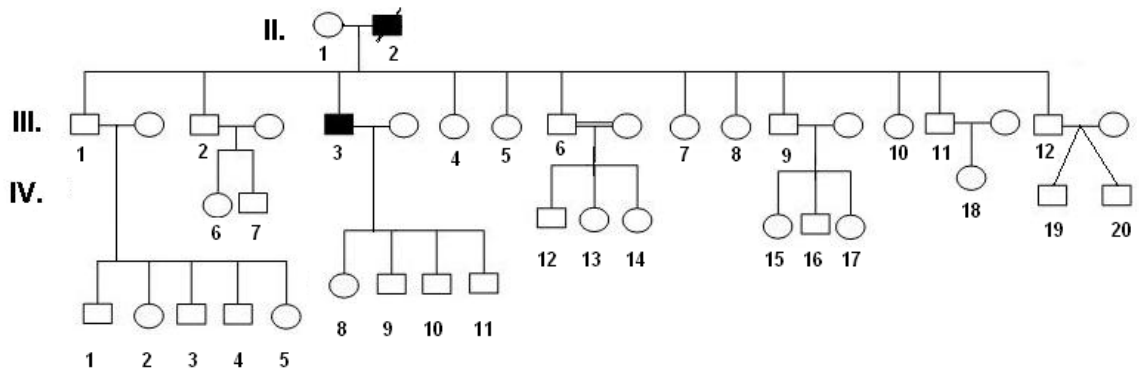
Pedigri 5. Kendisi 85 yaşında eşi de 80 yaşında her ikisi de kalp hastası olan II. kuşak 4. erkek kardeşin ailesinin pedigrisi ve III. kuşakta ortaya çıkan vakalar.

İkinci kuşağın kalp hastalığının ortaya çıktığı 4. erkek kardeş (II-2) olmasına rağmen 25 yıldır doktor kontrolünde yaşayan ve 85 yaşında olan tek kişidir (Pedigri 5). Ancak, bunun da çocuklarına baktığımızda III. kuşakta hastalığın ortaya çıktığı belirlendi. Nitekim ilk üç kardeş (III-1, III-2, III-3) hasta olup 2. kız kardeş (III-2) 54 yaşında kalp hastalığından vefat etmiştir. Üçüncü erkek kardeş (III-3) ise 38 yaşında by-pass olup yaşamını zor şartlar altında periton dializ ile idame ettirmektedir. Bu ailede şu ana kadar diğer kardeşlerde hastalık ortaya çıkmamıştır.



Pedigri 6. Kendisi 66 yaşında kalp hastalığından vefat eden tek yumurta ikiz kardeşlerden birinin ailesinin pedigrisi ve III kuşakta ortaya çıkan vakalar.

İkinci kuşağın kalp hastalığının ortaya çıktığı 5. erkek kardeşin (II-2, ikizlerden biri) pedigrisine (Pedigri 6) baktığımızda yine 66 yaşında erken ölümün olduğunu görüyoruz. Bilgilere göre çalışırken aniden vefat eden biri. Bu ailenin de çocuklarına baktığımızda yedinci kardeşin (III-7) 37 yaşında hasta olması hastalığın erken döneme indiğini göstermektedir. Ancak IV. kuşakta henüz hastalığın olmadığı saptandı.

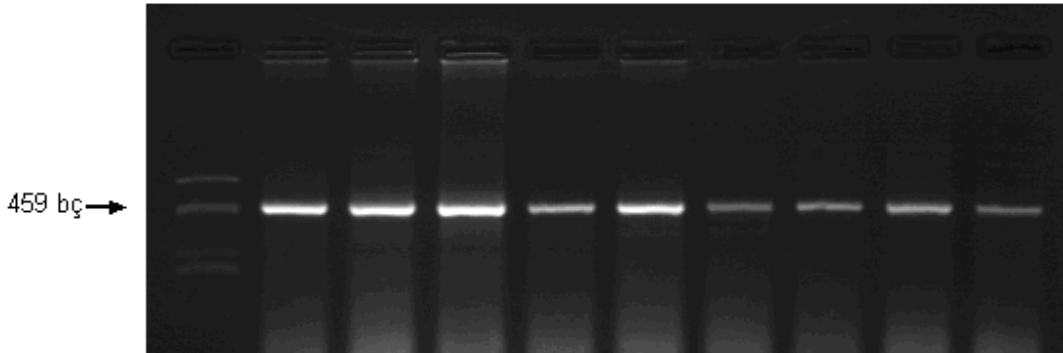


Pedigri 7. Kendisi 65 yaşında kalp hastalığından vefat eden tek yumurta ikiz kardeşlerden diğeri olup ailesinin pedigrisi ve III. kuşakta ortaya çıkan vaka.

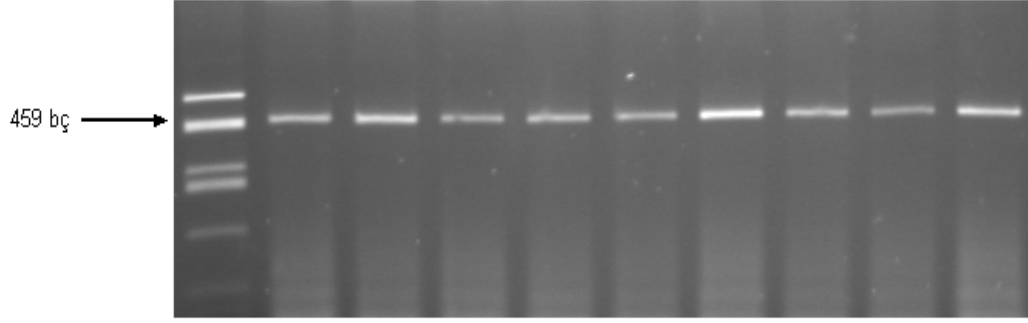
İkinci kuşağın kalp hastalığının ortaya çıktığı 6. erkek kardeşin (II-2, ikizlerden biri) pedigrisine baktığımızda yine 65 yaşında erken ölümün olduğunu görüyoruz. III. kuşak çocuklara baktığımızda üçüncü erkek kardeşin (III-3) 52 yaşında kalp hastası olduğunu ve bunun da 47 yaşında rahatsızlanarak iki koroner artere stent takıldığı belirlendi. Bu hali ile yaşamına devam etmektedir. Diğer kardeşlerde ve IV. kuşakta ise şu ana kadar bir rahatsızlığı olmadığı bilgileri edinildi.

4.3. GST Gen Polimorfizmleri

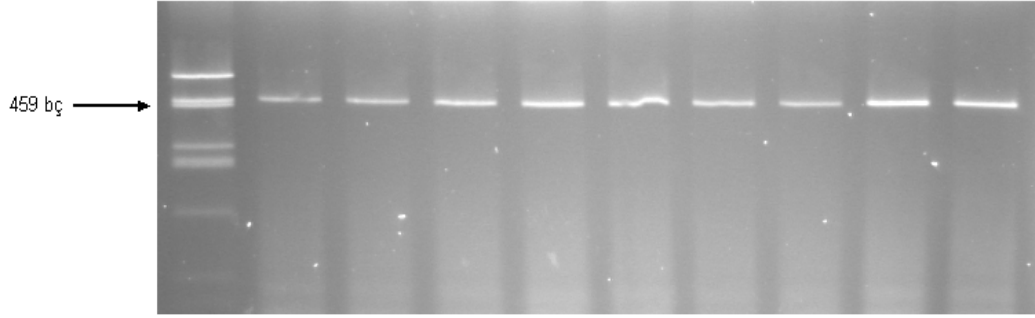
GSTT1 Polimorfizmi İçin; uygun primerler ile optimizasyon denemeleri yapıldıktan sonra 459 bp'lik DNA alanı PCR ortamında çoğaltıldı. Tüm örneklerden elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde 459 bp'lik fragmanı belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker ile beraber yürütüldü ve jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldı. Tüm örneklerin PCR'larının uygun olduğu yani istenilen DNA bölgesinin çoğaltıldığı saptandı. Denemelerimize göre çalışılan 100 kişinin tamamında GST genindeki GSTT1 geninin bulunduğu (T^{wild}) yani polimorfizmin olmadığı (T^{null}) saptandı. (Şekil 2-4).



Şekil 2. GSTT1 polimorfizmi için 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 ve 49 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.



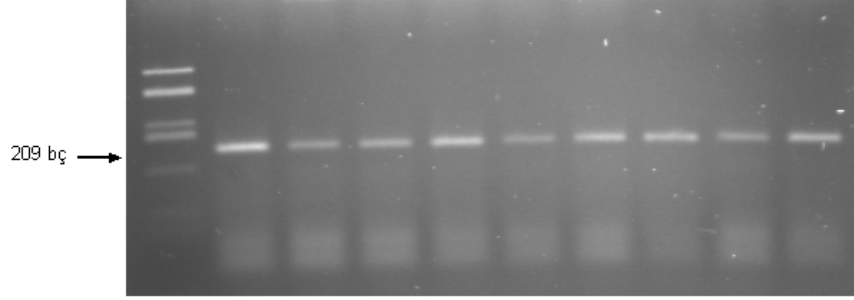
Şekil 3. GSTT1 polimorfizmi için 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 ve 68 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.



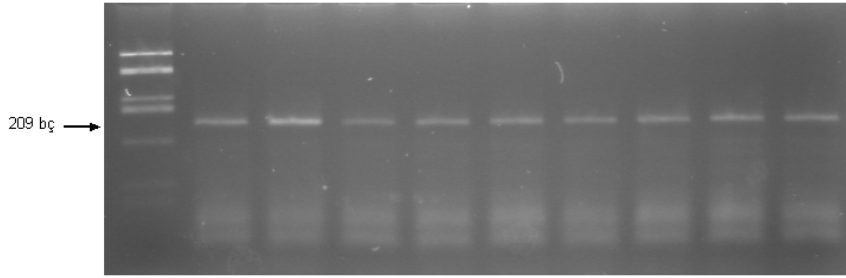
Şekil 4. GSTT1 polimorfizmi için 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76 ve 77 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.

GSTM1 Polimorfizmi İçin; uygun primerler ile optimizasyon denemeleri yapıldıktan sonra 209 bç'lik DNA alanı çoğaltıldı. Tüm örneklerden elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde 209 bç'lik fragmanı belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker ile beraber yürütüldü ve jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldı. Tüm örneklerin PCR'larının uygun olduğu istenilen DNA bölgesinin çoğaltıldığı saptandı. Denemelerimize göre çalışılan 100 örneğin tamamında GST

genindeki GSTM1 geninin bulunduğu (M^{wild}) yani polimorfizmin olmadığı (M^{null}) saptandı. (Şekil 5-6).

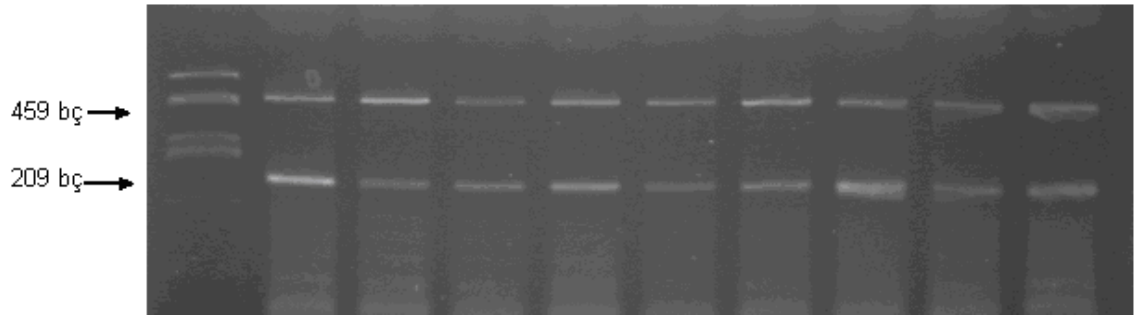


Şekil 5. GSTM1 polimorfizmi için 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 ve 68 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.

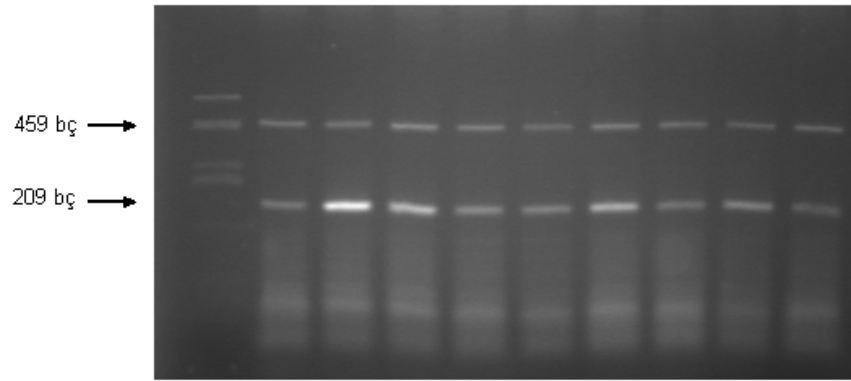


Şekil 6. GSTM1 polimorfizmi için 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 ve 86 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.

GSTT1 ve GSTM1 Polimorfizmleri İçin; uygun primerler ile optimizasyon denemeleri yapıldıktan sonra her bir örnek için birlikte çoğaltılan 459 ve 209 bç'lik DNA alanlarını veren PCR amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezine karıştırılarak yüklendi. Bu iki bandı belirlemeye olanak verecek marker ile beraber yürütülerek elde edilen görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı. Buradaki temel amaç aynı ortamada GST geni için $T^{wild} M^{null}$, $T^{null} M^{wild}$ ve $T^{null} M^{null}$ genotiplerini yani polimorfizmleri görmektir. Ancak hiçbir örnekte T^{null} ve M^{null} genotipine rastlanmadı (Şekil 7-8).



Şekil 7. GSTT1 ve GSTM1 Polimorfizmleri için 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 ve 68 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.



Şekil 8. GSTT1 ve GSTM1 polimorfizmi için 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76 ve 77 nolu örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada çalışma grubunun genel bilgilerine baktığımızda yaklaşık 200 kişilik bir aile olmasına rağmen KAH I. kuşakta 54 yaşında ölümle ortaya çıkmasından sonra II. kuşakta ölüm vakaları 65-75 yaşlarında olmuştur. Üçüncü kuşakta ise 40 yaşında ilk ölüm vakası, 35 yaşında ise KAH ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, çalışma grubunda 20 yaş üzerindeki bireyler dikkate alınarak erkek ve kadınlarda yaş grubu iki kategoriye (20-35 yaş ile 36 ve üstü yaş) ayrılmıştır. Yirmi yaşın altındaki bireyler KAH'nın 35 yaşından sonra gözükmesi nedeniyle dikkate alınmamıştır. Ancak ikinci kuşakta 65-75 yaşları arasında olan ölümler üçüncü kuşakta 40 yaşına inmiştir. Bu da dördüncü kuşakta hastalığın daha da aşağı yaşlara ineceğini düşündürmektedir. Koroner arter hastası olup da sigara içenlerin oranının cinsiyet gözetmeksizin %79 olması KAH ile sigaranın da ilişkili olduğunu göstermektedir. Edinilen bilgilere göre ikinci kuşaktaki kalp hastalığı nedeniyle ölenlerin sigara içmediği, ancak üçüncü ve dördüncü kuşaktaki hasta bireylerin çoğunluğunun sigara içmesi bu hastalığın sigaradan da kaynaklandığını düşündürmektedir. Nitekim sigaranın KAH ile ilişkili olduğu bir çok çalışmada da bildirilmiştir^{14,15,16}

Bu çalışmada pedigrı verilerine göre bu ailede KAH'nın kesin olarak kalıtsal olduğunu göstermektedir. Birinci kuşaktaki bireyin 54 yaşında ani ölümü, arkasından II. kuşaktaki bireyin 6 erkek kardeşten 4'ünün 65-75 yaşlarında ilaç tedavisi alırken ani ölümü ve kardeşin de 85 yaşında olmasına rağmen 25 yıldır kalp hastası olması hastalığın kesin kalıtsal olduğunu göstermektedir. Üçüncü ve dördüncü kuşağa geçtiğimizde hastalığın 35 yaş gibi daha da erken yaşlara inmesi ve erken ölümlerin ortaya çıkması bu düşüncemizi desteklemektedir. Ancak, edindiğimiz bilgilere göre KAH olanların büyük çoğunluğunun sigara içmesinin GST geni ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Sigara kullananlarda toksik maddelerin atılımı için metabolizmalarında bazı enzimlerinde aktif olması gereklidir. Bu enzimlerden en önemlisi Glutasyon S-transferaz (GST) olup ksenobiyotik metabolizması enzimlerinin süper aileleridir⁸. GST enzim grubu endojen ve eksojen toksinlerin ve kanserojenlerin detoksifikasyonunda önemli rol oynadığı

bilinmektedir⁹. Bu enzimin 5 alt sınıfı vardır. Bunlar GST alfa (A), mu (M), pi (P), teta (T) ve zeta (Z)'dir. Buna ilaveten alt sınıflar birkaç gen ve izoenzimleri içerirler.

GSTM1 geni ürünü sigara da bulunan temel karsinogenlerden polisiklik aromatik hidrokarbonların parçalanmasında önemli rol oynar. Bu genin ürünü ayrıca, doğal olarak oluşan monoholometanların, diklorometanların ve etilen oksitlerin detoksifikasyonunda önemli rol oynar^{9,10}.

GSTM1 ve GSTT1 genlerindeki polimorfizmler enzim aktivitesinin azalmasına özellikle her iki gendeki homozigot delesyonlar enzimin tamamen aktivitesini kaybetmesine neden olmaktadır. Bu da sigara ile ilişkili kanser ve koroner arter hastalıklarının oluşumuna zemin hazırlamakta, özellikle sigara içenlerde koroner arter hastalığının gelişimine katkıda bulunmaktadır¹¹⁻¹². Hayvanlarla yapılan bir çalışmada da sigaradaki kimyasalların GST enzimini azalttığı ve aterosklerotik plak oluşumunu uyardığı bildirilmiştir¹³.

Çalışmamızda GSTT1 için 459 bp ve GSTM1 için 209 bp büyüklüğünde iki band elde edildi. Bu iki bandın elektroforezde gözükmesi genotipin sağlam olduğunu yani T^{wild} M^{wild} genotipinin olduğunu gösterir. Soy ağacı bilinen, 1.-4. kuşaklarda KAH ve AMİ olan bir ailenin 20 yaş üzerindeki bulabildiğimiz 100 bireyinden alınan kanlardan yapılan çalışma sonucu bu iki bandın elektroforezde gözükmesi ailedeki koroner arter hastalığının GSTT1 ve GSTM1 genindeki delesyonlarla ilişkili olmadığını göstermiştir. Ancak bulgularımıza göre; GSTT1 ve GSTM1 genotiplerinde polimorfizmlerin yani null genotiplerin her ne kadar olmamasına rağmen koroner kalp hastası olanların çoğunluğunun (%75) günde 1 paketten fazla sigara içmesi GST enzim aktivitesini azaltarak KAH'larına neden olduğunu düşünmekteyiz. Nitekim bulgularımız yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir^{14,15,16}. Çünkü diğer çalışmalarda her ne kadar null genotipler olmasa da sigaranın GST enzim aktivitesini kesin azalttığı bildirilmektedir^{14,15,16}. GSTT1 ve GSTM1 polimorfizmi ile ilgili olarak Kuzey Hint popülasyonu ile yapılan benzer bir çalışmada, bizim bulgularımızdan farklı olarak GSTT1 null genotipinin koroner arter hastalığı ile anlamlı bir ilişki bulunmuş fakat GSTM1 genotipi ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır¹⁵.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Soyağacı bilinen bu ailede yaptığımız çalışmada; GST genindeki polimorfizmlere bağlı olabileceğini düşündüğümüz KAH'larının çalışabildiğimiz GSTT1 ve GSTM1 polimorfizmlerine bağlı olmadığını göstermektedir. Ancak, aynı genler üzerinde farklı mutasyonlar olabilir. Bu durumda GST genlerinin koroner arter hastalıkları ile ilişkili olmadığını söyleyebilmemiz için başka tekniklerle tamamının taranması gerekmektedir. KAH olup da sigara içenlerin oranının yüksek olması GST geninin enzim aktivitesini azaltabileceğinden bu ailede KAH'na yakalanma riskini de arttırmaktadır.

Bu durumda bu ailedeki pedigrî verilerine göre KAH her ne kadar GST geninde polimorfizm olmasa da başka genlere bağlı olarak genetik geçişli olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle ister GST genine, isterse başka genlere bağlı olsun sigara kullanımı bir risk faktörü olduğu için yeni jenerasyonun kesinlikle sigara kullanmaması gerekir. Ayrıca, bu ailenin KAH'nı tetikleyen diğer risk faktörlerini de (beslenme, alkol tüketimi, stres, vb) dikkate alması önerilir. Ayrıca bu ailede genetik yönden koroner arter hastalıklarına neden olabileceği düşünülen başka genlerin araştırılması önerilir.

7.KAYNAKLAR

1. **Kültürsay H.** Koroner Kalp Hastalığı, Primer ve Sekonder Koruma. 1.Baskı, İstanbul: ARGOS İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Tic. A.Ş., **2001**; 63-75.
2. **Weitzman LB.** Coronary artery Disease: Heart Attack. Erişim: <http://www.heartcenteronline.com/myheartdr/common/articles.cfm?ARTID=29> Erişim Tarihi: 05.07.2008
3. **Cheitlin MD, Sokolow M, McIlroy MB.** *Clinical Cardiology*. 6th. Ed., USA: Prentice –Hall International Inc, **1993**; 42-52
4. **Tuzcu M.** Kardiyovasküler Hastalıklar. Yalçın A. Cecil Essentials of Medicine. 2. Baskı, İstanbul: Yüce Yayınları A.Ş.; **1991**; 89-115.
5. **Kök H.** Klinik Kardioloji. 2.Baskı, Konya: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd.Şti, **2002**; 201-214.
6. **Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC.** Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Disease: A HuGE Review, American Journal of Epidemiology, **2002**; 155:487-495.
7. **Salazar LA, Hirata MH, Giannini SD, Forti N, Diamant J, Lima TM, Hirata RDC.** Seven DNA Polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically document coronary artery disease. *Clinica Chemica Acta*; **2000**; 300:139-149.
8. **Keterer B.** Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage. *Free Radical Research*, **1998**; 28: 647–658.
9. **Hanna E, MacLeod S, Vural E, Lang N.** Genetic deletions of glutathione-S-transferase as a risk factor in squamous cell carcinoma of the larynx: a preliminary report. *Am J Otolaryngol* , **2001**; 22(2):121-123.
10. **Abu-Amero KK, Al-Boudari OM, Mohamed GH, Dzimir N.** T null and M null genotypes of the glutathione S-transferase gene are risk factor for CAD independent of smoking. *BMC Med Genet*, **2006**; 7(38):1-7.
11. **Zhong S, Howie AF, Ketterer B, Taylor J, Hayes JD, Beckett GJ, Wathen CG, Wolf CR, Spurr NK.** Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, **1991**; 12(9):1533-1537.
12. **Tamer L, Ercan B, Camsari A, Yildirim H, Cicek D, Sucu N, Ates NA, Atik U.** Glutathione S-transferase gene polymorphism as a susceptibility factor in smoking-related coronary artery disease. *Basic Res Cardiol*, **2004**; 99(3):223-229.
13. **Penn A, Snyder CA.** Butadiene inhalation accelerates arteriosclerotic plaque development in cockerels. *Toxicology*, **1996**; 113(1-3):351-354.
14. **Van Schooten FJ, Hirvonen A, Maas LM, De Mol BA, Kleinjans JC, Bell DA, Durrer JD:** Putative susceptibility markers of coronary artery disease: association between VDR genotype,

smoking, and aromatic DNA adduct levels in human right atrial tissue. *Faseb J*, **1998**; 12(13):1409-1417.

15. **Girisha KM, Gilmour A, Mastana S, Singh VP, Sinha N, Tewari S, Ramesh V, Sankar VH, Agrawal S.** T1 and M1 polymorphism in glutathione S-transferase gene and coronary artery disease in North Indian population. *Indian J Med Sci*, **2004**; 58:520-526.
16. **Wilson MH, Grant PJ, Kain K, Warner DP, Wild CP:** Association between the risk of coronary artery disease in South Asians and a deletion polymorphism in glutathione S-transferase M1. *Biomarkers*, **2003**; 8(1):43-50.
17. **Turgay M.** Koroner kalp hastalıkları, Aşama matbaacılık, Ankara, **1988**; 21-87.
18. **Öngen Z.** Klinik kardiyoloji, MN Medikal and Nobel Basımevi, **2000**; 89-92.
19. **Onat A.** Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı yeni koroner olaylar ve kalpten ölüm sıklığı. Onat A, TEKHARF, Ohan matbaacılık, İstanbul, TR, **2000**; 16-23.
20. Türk halkında kalp kökenli ölümler. Türkiye Kalp Raporu, Yenilik Basımevi, **2000**; 11-15.
21. **Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, et al.** A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis prone regions. *Circulation*, **1992**; 85:391-405.
22. **Stary HC.** Atlas of atherosclerosis progression and regression, 2nd ed. The Partheonon Pulishing Group, New York, USA, **2003**; 13-15.
23. **Vallace P.** Vascular endothelium, its physiology and pathophysiology. In: Weatherall DJ et al. Oxford Text Book of Medicine, 3rd ed. Oxford Medical Publications, Oxford, UK, **1996**; 2:2295-2300.
24. **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *NEJM*, **1986**; 314:488.
25. **Schwenke DC, Carew TE.** Initiation of atherosclerotic lesion in cholesterol fed rabbits. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible site of arteries. *Atherosclerosis*, **1989**;9:908-918.
26. **Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke LP.** Nitric oxide regulates monocytes chemotactic protein-1. *Circulation*, **1997**; 96:934-40.
27. **Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke LP.** Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation*, **1996**; 94:1682-89.
28. **De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al.** Nitric oxide decreases cytokine- induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, **1995**; 96:60-68.
29. **Komsuoğlu B.** Kardiyoloji, Trabzon. Karadeniz Üniversitesi Basımevi, **1985**; 89-107.
30. **Sonel A. A.** *Kardiyoloji*, 3.Baskı, Ankara. Türk Tarih Kurumu Basımevi,**1987**; 67-75.
31. **Cordan C, Yeşilbursa D, Baran İ, Güllülü S.** *Kardiyoloji*, Bursa. Uludağ Üniversitesi Basımevi, **2005**; 21-24.

32. **Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J et al.** Thermolabile metylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet*, **1991**.
33. **Tokgözoğlu L.** *Aterosklerozun Genetiği*. Kumral E, İnce B. *Ateroskleroz ve Serebrovasküler Hastalıklar*, 1.Baskı, İstanbul.Tayf matbaacılık, **2003**; 14-18.
34. <http://www.tr.wikipedia.org/wiki/Ateroskleroz> Erişim Tarihi: 23.05.2007
35. http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/cocuk_sagligi/dr_murat_ekinci.pdf Erişim Tarihi: 25.05.2007
36. <http://www.cumhuriyet.edu.tr/edergi/makale/1412.pdf> Erişim Tarihi: 25.05.2007
37. **Kumral E.** Aterosklerozun Epidemiyolojisi ve Genel Özellikleri. Kumral E, İnce B. *Ateroskleroz ve serebrovasküler hastalıklar*, 1. Baskı, İstanbul: Tayf Matbacılık, **2003**; 3-9.
38. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1989**; 23-32.
39. **İşcan M.** *Moleküler Genetikte Modern Teknikler*. Telefoncu A, Küfrevioğlu Öİ, Pazarlıoğlu N. *Biyoinformatik-I* . 1. Baskı, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, **2003**; 71-82.
40. <http://www.yehhu.com/guncel-haber/haberdetay.asp?id=770> Erişim Tarihi: 04.08.2008
41. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **1988**; 16(3):125.

EKLER

Ek-1. Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Hazırlanışı

Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning Kataloğu” esas alınmıştır³⁸.

Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarına ulaştırmak için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüştürmelerinde $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formülünden yararlanılmıştır³⁸.

M_1 = Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

V_1 = Stoktan alınması gereken miktar (V)

M_2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V_2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (V)³⁸.

1.1. Lizis Tamponu

0.32 M sukroz

10 mM Tris

5 mM MgCl₂

%1 TritonX100

Hazırlanacak hacim için sukroz, Tris, MgCl₂ ve TritonX100 hesaplanarak tartılır ve üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.2. Fizyolojik Tampon

0.075 M NaCl

0.025 M EDTA

Hazırlanacak hacim için NaCl ve EDTA hesaplanarak tartılır ve üzeri saf su ile tamamlanır, pH 7.5-7.4'e ayarlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.3. TE-9

500 mM Tris baz

20 mM EDTA pH 9.0

10 mM NaCl

Hazırlanacak hacim için kullanılacak olan Tris, EDTA, ve NaCl hesaplanarak tartılır, üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.4. SDS (Sodyum Dedosil Sülfat) Solüsyonu

%10 SDS

20 ml için 2 gr SDS tartılır, 20 ml saf su ile bir şişe içerisinde iyice karıştırılır.

Kullanıncaya kadar buzdolabında veya oda ısısında tutulabilir.

1.5. TE Tamponu

10 mM Tris pH 8.0

0.1 mM EDTA pH 8.0

Hazırlanacak hacim için kullanılacak olan Tris ve EDTA hesaplanarak stoklardan alınır, üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

EK-2. PCR

PCR ilk kez Kaliforniya'da Berkeley yakınlarında, Cetus firmasında çalışan Kary Mullis tarafından 1985 yılında icat edilmiştir³⁹. PCR, kalıp DNA üzerindeki belirli bir gen bölgesinin ısıya dayalı olarak tekrar eden reaksiyon döngüleriyle ve enzimler aracılığı ile *in vitro* koşullarda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir.

Her bir PCR döngüsü, reaksiyon karışımının, reaksiyonun gerçekleşmesi için daha önceden belirlenmiş olan en uygun üç sıcaklık derecesi arasında transfer edilmesi ile tamamlanır. PCR bir zincir reaksiyonudur, çünkü, yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve istenildiği kadar tekrar edilir. 25-30 döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1 000 000 kez artış olur³⁹. Reaksiyon boyunca gereken sıcaklık, süre, döngü sayılarını kontrolü ve otomasyonu Thermal Cycler olarak bilinen cihazlarla yapılır³⁸. Bu yöntem ile, klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere, bol miktarda hedef DNA parçaları elde edilir³⁹.

DNA çift sarmalı üzerinde bulunan karşılıklı bazlar arasındaki hidrojen bağlarının kırılarak, primerlerin yapışabileceği tek iplikli DNA moleküllerinin oluşumunu sağlayan sıcaklık denatürasyon sıcaklığıdır (genellikle 94 °C). Burada kullanılacak DNA temiz olmak zorunda değildir. Kurumuş kan veya semen gibi adli tıp örnekleri, tek bir saç teli, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler, mumya kalıntıları ve fosil gibi değişik kaynaklardan genomik DNA elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır. Bu süreç yaklaşık 5 dakikadır ve bu süreçte enzimler çalışmaz³⁹.

Primerlerin tek iplikli DNA molekülü üzerinde komplementer olduğu bölgelere hibridize olduğu sıcaklık annealing (yapışma) sıcaklığıdır. Annealing sıcaklığı primer uzunluğuna ve baz içeriğine göre değişir. Reaksiyonun özgülüğü için son derece önemlidir. Primer-kalıp DNA hibridizasyonu sıcaklığa bağlı bir olay olduğundan annealing sıcaklığı hibridizasyonun oluşumunu sağlayacak kadar düşük ve yanlış bağlanmalara izin vermeyecek kadar da yüksek olmalıdır. Bu sıcaklık 50-70 °C arasındadır³⁸.

DNA polimeraz için optimum olan sıcaklık ise uzama (sentez) sıcaklığı olarak belirtilir. Bu sıcaklık kullanılan DNA polimerazlara göre farklılık gösterebilir. Örneğin Taq DNA polimeraz için 72 °C iken Pwo için 68 °C'dir. Polimeraz enzim, nükleotidleri 5'den

3'e doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli bir kopyasını oluşturur. Doğru pozisyon almamış primerler ve kalıp DNA arasındaki bağlar bu ısıda ayrılırlar³⁸.

2.1. Bir PCR Reaksiyonu İçin Gerekli olan Bileşenler ve Fonksiyonları

2.1.1. Kalıp Genomik DNA

PCR reaksiyonunda amplifiye edilecek bölge için kalıp görevi yapar. Yapılacak olan çalışmaya göre herhangi bir canlının kanından ve dokusundan izole edilebilir³⁸.

2.1.2. Primerler

PCR reaksiyonunda amplifiye edilecek bölgenin sınırlarını belirleyen sentetik oligonükleotidlerdir. Ayrıca polimerizasyon reaksiyonları için DNA polimeraz enzimine primer görevi yaparlar. Primerler sadece amplifiye edilecek olan hedef bölgenin kanat bölgelerine komplementer olmalıdır. Aksi takdirde non-spesifik amplifikasyonlar gözlenebilir. Bu nedenle reaksiyonun istenilen yönde gerçekleşmesini sağlayan en temel faktörlerden biridir ve seçiminde şu hususlara dikkat edilmelidir³⁸.

Primer dizisi 1-2 pürin bazı ile başlayıp bitmeli.

Kullanılan primerlerin kendi aralarında ve dizileri içerisinde komplementer bölgeler olmamalı.

Timin nükleotidi yanlış eşleşmeye daha toleranslı olduğundan 3' uçlarında bulunmamalı.

Tm'leri aynı veya çok yakın olmalı.

GC (Guanin-Sitozin) oranı %40-60 arasında olmalı.

Herhangi bir baz 4'den fazla arka arkaya tekrar etmemeli³⁸.

2.1.3. Reaksiyon Tamponu

PCR reaksiyonunda, reaksiyon koşullarının optimum şartlara getirilmesini sağlayan (iyonik direnci, pH, Mg^{+2} gibi) karışımdır³⁸.

2.1.4. DNA Polimeraz

PCR reaksiyonunda polimerizasyonun gerçekleşmesini sağlayan enzimdir. Isıya dayanıklı termofilik bakterilerden izole edildiğinden ötürü yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır³⁸.

2.1.5. Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTPs)

PCR reaksiyonunda, polimerizasyon için gerekli olan enerji ve nükleotid kaynağını oluşturur³⁸.

2.2. PCR Reaksiyonun Hazırlanması

Roche protokülünde PCR reaksiyonundaki bileşenlerinin miktarları 25 µl'lik reaksiyon hacmi için şu şekilde önerilmektedir.

5 µl 10X reaksiyon tamponlarının birinden

0.6 µl 10 mM dNTP karışımı

Her bir primerden 200 ng

150 ng Kalıp DNA

2 U Termostabil DNA Polimeraz

25 µl'ye tamamlayacak kadar deiyonize su

PCR'da tampon bileşimi ve ortam pH'sı reaksiyon verimini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Öncelikle, reaksiyon sonunda kalitatif ve kantitatif olarak en iyi sonucu verecek ve daha sonraki PCR reaksiyonlarında da kullanılacak olan tampon bileşiminin belirlenmesi için optimizasyon kitindeki bütün tamponların kullanıldığı bir optimizasyon

reaksiyonu hazırlandı. Reaksiyonlar mümkün olduğu kadar steril şartlarda ve buz üzerinde, en son enzim ilave edilecek şekilde hazırlandı³⁸.

Ek-3. Jel Elektroforezi

Bir su yosunundan elde edilen agaroz, D-Galaktoz ve 3,6-anhidro L-Galaktoz birimlerinin lineer polimerleridir³⁸.

Agaroz jeller, uygun tamponla berrak bir çözelti elde edene kadar ısıtılıp kaynatma yolu ile hazırlanır. İçine 0.5 µl/ml oranında ethidium bromide (EtBr) eklenerek jel dökme kabına dökülür ve polimerize olması için beklenir. Polimerize olan jel, yoğunluğu konsantrasyonu ile belirlenen bir matriks oluşturur. Jel boyunca elektrik akımı uygulandığı zaman, nötral pH'da negatif yüklü olan DNA, anoda doğru göç eder. Göç oranı pek çok parametre ile belirlenir³⁸.

3.1. DNA'nın Moleküler Büyüklüğü

Lineer çift iplikli DNA molekülleri bir elektrik alanında bir bütün halinde hareket etme eğilimindedir. Jel matriksi boyunca baz çifti sayısının 10 tabanına göre logaritması ($\log_{10}$) ile ters orantılı bir oranda göç eder. Büyük moleküller sürtünme direncinden ötürü daha yavaş hareket ederler ve porlar boyunca kat ettikleri yolu küçük moleküllere oranla daha fazla ısıtırlar (çizelge)³⁸.

Tablo 6. Agaroz ve akrilamid konsantrasyonları ve ayırabildikleri DNA büyüklükleri

Agoroz mik. (%)	DNA (kb)	Akrilamid mik. (%)	DNA (bp)
0.3	5-60	3.5	100-1000
0.6	1-20	5.0	80-500
0.7	0.8-10	8.0	60-400
0.9	0.5-7	12.0	40-200
1.2	0.4-6	20.0	10-100
1.5	0.2-4		
2.0	0.1-3		

3.2. Agaroz Konsantrasyonu

Bilinen büyüklükte lineer bir DNA parçası farklı agaroz konsantrasyonlardaki jellerde farklı oranda göç eder. Jel konsantrasyonu (γ) ile DNA'nın elektroforetik hareketinin (μ) logaritması arasında aşağıdaki eşitlikle tanımlanan lineer bir ilişki mevcuttur.

$$\text{Log}\mu = \text{Log}\mu_0 - K\gamma$$

μ_0 : DNA'nın serbest elektroforetik hareketi ve

Kr: Gecikme sabitesi (Jelin özelliklerine, büyüklüğüne ve göç eden molekülün göç şekline bağlı sabit bir sayıdır)³⁸.

3.3. DNA'nın Konformasyonu

Aynı moleküler ağırlıktaki süperhelikal sirküler (form I), çentikli sirküler (form II) ve lineer DNA (form III), agaroz jellerde farklı oranlarda göç eder. Üç formun rölatif hareketi primer olarak jeldeki agaroz konsantrasyonuna bağlıdır. Fakat uygulanan akımın gücü, tamponun iyonik gücü ve form I DNA'nın süperhelikal kıvrımlarının yoğunluğu da bu hareketi etkilemektedir. Aynı şartlar altında form I DNA, form DNA'dan daha hızlı göç eder; farklı şartlar altında ise durum tam tersidir³⁸.

3.4. Uygulanan Voltaj

Düşük voltajlarda, lineer DNA parçalarının göç oranı uygulanan voltajla orantılıdır. Yani agaroz jellerde etkili ayırma oranı voltaj arttıkça azalmaktadır. 2 kb'den daha büyük DNA parçalarını maksimum oranda ayırtırmak için agaroz jellere 5V/cm'den daha fazla voltaj uygulanmamalıdır. Mesafe jelin uzunluğu olarak değil, elektrodlar arasındaki en kısa yol olarak ölçülmelidir³⁸.

3.5. Elektrik Akımının Yönü

50-100 kb'dan daha büyük DNA molekülleri elektrik akımının yönü sabit kalırsa agaroz jelde aynı yönde göç ederler. Bununla birlikte elektrik akımının yönü periyodik olarak değiştirilerek DNA moleküllerinin zorunlu olarak yönlerini değiştirmesi sağlanır. Daha büyük olan DNA moleküllerinin yeni akım yönüne uyum sağlamaları daha uzun zaman alır. Pulsed-field jel elektroforezi ekstrem büyüklükteki DNA molekülü popülasyonunu ayırmak için kullanılabilir³⁸.

3.6. Baz Kompozisyonu ve Isı

Poliakrilamid jellerin tersine agaroz jellerde DNA'nın elektroforetik davranışı, DNA'nın baz kompozisyonu veya elektroforez esnasındaki ısıdan pek etkilenmez. Yani agaroz jellerde, farklı büyüklükteki DNA fragmanlarının elektroforetik hareketi 4-30 °C arasında değişmez. Agaroz jel elektroforezi genelde oda ısısında yapılır. %0.5'ten daha az agaroz içeren jeller ve düşük kaynama ısıları agaroz jeller daha narindir ve zarar görmemeleri için elektroforezlerinin 4 °C'de gerçekleştirilmesi daha iyi sonuç verir³⁸.

3.7. Boyaların Etkisi

Ethidium bromid, agaroz ve poliakrilamid jellerde DNA'yı gözlemek için kullanılan floresans bir boyadır ve lineer DNA'nın elektroforetik hareketini %15 oranında azaltır. Boya, baz çiftlerinin arasına girerek lineer ve çentikli sirküler DNA moleküllerinin boyuna uzatarak onları daha rijit hale getirir³⁸.

3.8. Elektroforez Tamponunun Kompozisyonu

Elektroforez tamponunun iyonik gücü ve kompozisyonu DNA'nın elektroforetik hareketini etkiler. Ortamda iyonlar olmazsa elektriksel iletkenlik minimal düzeydedir ve DNA oldukça yavaş hareket eder. Yüksek iyonik güce sahip tamponlarda (10X elektroforez tamponu yanlışlıkla kullanılırsa) elektriksel iletkenlik oldukça etkili olur ve önemli

oranda ısı ortaya çıkar. Daha da kötüsü jel kaynar ve DNA denatüre olur. Çift iplikli DNA'nın elektroforezi için kullanılabilen çeşitli tamponlar mevcuttur. Elektroforez tamponları genellikle konsantre çözeltiler halinde hazırlanırlar ve oda ısısında saklanırlar³⁸.

Agaroz jeller yatay kalıplara yaklaşık 0.5 cm kalınlıkta, poliakrilamid jeller ise dikey kalıplara 0.3 mm kalınlıkta dökülür. Oluşan DNA bantlarını jelde UV altında görebilmek için EtBr ile boyanması gerekmektedir. Boyama işleminde jel ya yürütme işleminden sonra EtBr içeren bir solüsyonda bekletilir ya da hazırlanma aşamasında içerisinde daha önce hazırlanmış olan EtBr solüsyonu ilave edilir. Bu yöntemler ile 25 ng'dan az DNA içeren bantların gözlenmesi zordur. Bu nedenle DNA miktarı az olan DNA bantlarının incelenmesinde direk problama, southern blot ve otoradyografi gibi yöntemler kullanılır³⁸.

Jel elektroforezi ile PCR reaksiyonunun sonucu amplifikasyonunu gerçekleştirdiğimiz bölge pozitif kutba doğru hareket ederek bantları meydana getirir. Bantların büyüklüklerini tahmin etmede kullanılan kontrollerin yanında kesim reaksiyon ürünleri belli olan markerlar kullanılmaktadır. Örneğin pUC 18 plazmid DNA'sının Hae III ile kesiminden büyüklükleri 587 bp ile 11 bp arasında değişen, 11 parça oluşur. Bu şekilde bir marker kullanarak düşük bir yanılma olasılığı ile fragmanların büyüklüğü tahmin edilebilir³⁸.

EK-4. Agaroz Jelin Hazırlanması

Agaroz hazırlanmasında jel kalınlığı dikkate alınarak jel döküm tablasının boyutları ölçülür ve jel hacmi belirlenir. Hazırlanmak istenen yüzde konsantrasyona göre (örn. %1'lik), belirlenen hacim için gerekli olan agaroz tartılır ve erlen içine koyulur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu ilave edilir ve mikrodalga fırında eritilir. Çok kısa süreli bir kaynama yeterlidir. Daha sonra jel üzerine son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde stok EtBr solüsyonundan ilave edilir. Jel sıcaklığı 45-50 °C'ye geldiğinde hazırlanan jel kabına dikkatli bir şekilde, hava kabarcığı oluşturmada dökülür ve yaklaşık 30 dk beklenerek polimerize olması sağlanır. Jel elektroforez tankına alınır ve üzerini kapatacak şekilde 1X TBE tamponu eklenir.

4.1. Yükleme Tamponu

100 ml hazırlamak için;

40 gr Sukroz

0.25 gr Bromfenol mavisi

Belirtilen miktarlarda sukroz ve bromfenol mavisi tartılır, üzerine 100 ml distile su ilave edilerek vorteksle iyice karıştırılır. Daha sonra ependorf tüplere paylaştırılarak 4°C'de saklanır. PCR ürünü DNA solüsyonu ile 1/5 oranında karıştırılır.

4.2. 5X TBE Tamponu

1 lt için;

54 gr Tris baz

27.5 gr Borik asit (pH 8.0)

Hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıdaki değerlere göre oranlanarak alınır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülür, NaOH ile pH 8.0'a ayarlanır ve otoklavlanır.

1 hacim için 5X TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilerek 1X TBE tamponu elde edilir.

4.3. Ethidium Bromid (EtBr =10 mg/ml)

Hazırlanacak hacim uyarınca gereken miktar Ethidium Bromid (EtBr) dikkatli bir şekilde tartılır ve suda iyice karıştırılarak çözülür. Işığa hassas olduğu için renkli bir cam şişede veya alüminyum folyo sarılarak +4 °C’de saklanır. Jele son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

EtBr, floresans bir boyadır ve DNA ve RNA’ya bazları arasından girerek kuvvetlice bağlanır. UV ile parlayarak görüntü verir ve jeldeki nükleik asitlerin yerinin belirlenmesini sağlar.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana'nın Yüreğir ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Adana'da Sarıçam İlkokulunda, Orta Öğrenimini Sunar Nuri Çomu Lisesinde ve lise öğrenimini Adana Erkek Lisesinde tamamladı. 2000 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve buradan 2004 yılında mezun oldu. 2005 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans programını kazandı.