

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ENDOTELYAL NİTRİK OKSİD SENTAZ (*eNOS*)  
GEN POLİMORFİZMİ ile  
MİYOKARD İNFARKTÜSÜ (MI) İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Ramazan ÇELİK

**Danışman**  
Prof. Dr. Hasan ACAR

KONYA-2008

Bu tezin hiçbir bölümünde, tamamen veya kısmen başka bir çalışmadan alıntı yapılmadığını ve alınan bilgilerin kaynağının referans gösterildiğini beyan ederim.

Bio. Ramazan ÇELİK

# İÇİNDEKİLER

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. GİRİŞ</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. LİTERATÜR BİLGİ</b> .....  | <b>2</b>  |
| 2.1. Miyokard İnfarktüsü (MI) .....  | 2         |
| 2.2. Nitrik Oksit (NO) ve Özellikleri .....                                    | 4         |
| 2.2.1. NO molekülü .....   | 4         |
| 2.2.2. NO'nun hücrelerde sentezlenmesi .....                                   | 5         |
| 2.2.3. NO'nun genel fonksiyonları .....  | 6         |
| 2.2.3.1. İmmün sistemde NO .....   | 7         |
| 2.2.3.2. Sinir sisteminde NO .....   | 7         |
| 2.2.3.3. NO'nun kardiyovasküler sistemdeki görevleri .....                     | 8         |
| 2.3. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri .....                                 | 10        |
| 2.4. NO ve Miyokard İnfarktüsü .....   | 12        |
| 2.5. <i>eNOS</i> geni .....  | 14        |
| 2.5.1. <i>eNOS</i> gen varyasyonları .....                                     | 14        |
| 2.6. Kardiyovasküler hastalıklar ve moleküler genetik.....                     | 16        |
| 2.7. MI'nın genetik temeli .....   | 17        |
| <b>3. MATERYAL ve METOT</b> .....  | <b>20</b> |
| 3.1. Hasta ve kontrol grubu .....  | 20        |
| 3.2. DNA izolasyonu .....  | 20        |
| 3.3. <i>eNOS</i> geni 4. intronu VNTR (İntron 4a/b) polimorfizmi analizi ..... | 21        |
| 3.4. <i>eNOS</i> geni 7. ekzonundaki Glu298Asp polimorfizm analizi .....       | 23        |
| 3.5. İstatistik analizler .....  | 24        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4. BULGULAR</b> .....   | <b>25</b> |
| 4.1. PZR analizleri ve genotip dağılımları .....   | 26        |
| 4.1.1. <i>eNOS</i> geni intron 4a/b polimorfizmi genotip dağılımı .....  | 26        |
| 4.1.2. <i>eNOS</i> geni ekzon 7 Glu298Asp polimorfizmi genotip dağılımı .....  | 27        |
| 4.2. <i>eNOS</i> geni intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp polimorfik bölgelerin genotip dağılımı ile aile hikayesi, sigara kullanımı, hipertansiyon ve diabet parametrelerinin hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırılması ..... | 28        |
| 4.3. <i>eNOS</i> geni intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp polimorfik bölgelerin genotip dağılımı ile aile hikayesi, sigara kullanımı, hipertansiyon ve diabet parametrelerinin hasta grubunda karşılaştırılması .....                     | 28        |
| 4.4. Hasta ve kontrol grubu bireylerinin intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp genotip dağılımları ile biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması .....  | 29        |
| 4.5. Hasta grubunda intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp genotip dağılımları ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması .....  | 29        |
| 4.6. Hasta grubunda birleştirilmiş genotipler ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması .....   | 32        |
| <b>5. TARTIŞMA</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>6. ÖZET</b> .....   | <b>39</b> |
| <b>7. SUMMARY</b> .....  | <b>40</b> |
| <b>8. LİTERATÜR LİSTESİ</b> .....  | <b>41</b> |
| <b>9. ÖZGEÇMİŞ</b> .....   | <b>47</b> |
| <b>10. TEŞEKKÜR</b> .....  | <b>48</b> |

## ŞEKİL LİSTESİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 2.1.</b> Miyokard infarktüsün şematik görünümü .....   | 3  |
| <b>Şekil 2.2.</b> Nitrik oksit molekülünün şematik görünümü .....   | 5  |
| <b>Şekil 2.3.</b> NO, L-argininden NOS geni tarafından sentezlenen NOS enzimleri ile üretilir ve sonuçta serbest radikal olan NO ve sitrüllin oluşur. Yarılanma ömrü kısadır ve NO <sub>2</sub> ve NO <sub>3</sub> 'e okside olur. NOS ekspresyonu ve aktivitesi transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel mekanizmalarla düzenlenir ..... | 6  |
| <b>Şekil 2.4.</b> Sinir sisteminde NO .....   | 8  |
| <b>Şekil 2.5.</b> NO'un damarlar üzerine olan etkileri .....  | 9  |
| <b>Şekil 2.6.</b> NO'nun arteryal düz kas üzerine etkisi.....   | 10 |
| <b>Şekil 2.7.</b> eNOS, iNOS ve nNOS ile sitokrom p450 redüktaz ve karboksil terminal bölgesindeki NADPH, FAD ve FMN için yaygın bağlanma bölgesinin şematik yapısı ....  | 12 |
| <b>Şekil 2.8.</b> İnsan konstitüf <i>eNOS</i> geninin yapısal organizasyonu .....   | 15 |
| <b>Şekil 2.9.</b> <i>eNOS</i> geni intron/ekzon düzenlenmesi ve bazı polimorfizmlerinin şematik görünümü .....  | 15 |
| <b>Şekil 4.1.</b> <i>eNOS</i> geni 4. introndaki 4a/b polimorfizmi için PZR jel elektroforez görüntüsü .....  | 26 |
| <b>Şekil 4.2.</b> <i>eNOS</i> geni ekzon 7 Glu298Asp polimorfizmi için PZR-RFLP jel elektroforez görüntüsü .....  | 27 |

## TABLO LİSTESİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablo 2.1.</b> NOS enzimlerinin genel özellikleri .....  | 11 |
| <b>Tablo 4.1.</b> Hasta ve kontrol gruplarına ait veriler .....   | 25 |
| <b>Tablo 4.2.</b> Hasta ve kontrol grubunda biyokimyasal parametreler .....   | 25 |
| <b>Tablo 4.3.</b> Hasta ve kontrol grubu bireylerinin intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp polimorfik bölgelerin genotip dağılımları ve allel frekansları ..... | 28 |
| <b>Tablo 4.4.</b> Hasta ve kontrol gruplarında intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp genotipleri ile diğer parametrelerin karşılaştırılması .....                | 30 |
| <b>Tablo 4.5.</b> Hasta grubunda intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp genotipleri ile diğer parametrelerin karşılaştırılması .....                              | 31 |
| <b>Tablo 4.6.</b> Hasta ve kontrol gruplarında intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp birleştirilmiş genotipleri ile diğer parametrelerin karşılaştırılması ..... | 32 |

## 1. GİRİŞ

Halk arasında kalp krizi olarak bilinen miyokard infarktüsü (MI) ülkemizde ve dünyada sıkça karşılaşılan ve ölümlü sonuçlanan hastalıkların başında gelmektedir. MI, bu özelliklerinin yanı sıra toplum sağlığı, gelişmişlik düzeyi bakımında da önemli bir parametredir. Hastalığın ortaya çıkışında çevresel faktörler, bireydeki metabolik olaylar ve genetik mekanizmaların etkili olduğu düşünülmektedir. Çevresel faktörlerin ve hücre metabolik süreçlerin hastalık gelişimine olan etkisi ile birlikte genomda ve özellikle de genlerde meydana gelen değişikliklerin ortaya konulması hastalığın moleküler temelini anlamada oldukça önemlidir. Dolayısıyla MI tablosunun gelişimi ile ilgili olabilecek genlerle ilgili çalışmaların yapılması bu hastalığın tanı ve tedavisinde önemli bir yere sahiptir.

Nitrik oksit (NO) pek çok metabolik süreçte yer alan bir 'mesajcı molekül' olarak nitelendirilmektedir. Nitrik oksit sentaz (NOS)'lar tarafından sentezlenen bu molekülün özellikle endotel hücrelerden salınan formunun MI gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda NO'nun sentezlenmesinden sorumlu olan endotelyal NOS (eNOS) enzimini kodlayan genin dizilim farklılıklarının incelenmesi önemli olabilir. Literatüre göre *eNOS* geninde yaklaşık 20'ye yakın polimorfik bölgenin bulunduğu bilinmektedir.

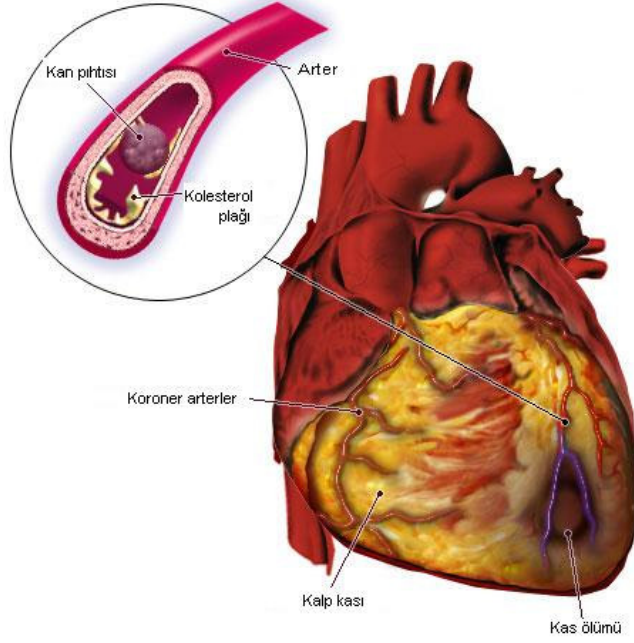
Bu çalışmada MI hastalarında ve sağlıklı kontrol bireylerinde *eNOS* geninin 4. intronundaki 4a/b VNTR (Variable number of tandem repeat – değişen sayıda tandem tekrarlar) polimorfizmi ile 7. ekzondaki Asp298Glu tek baz değişim polimorfizmlerinin PZR-RFLP (polimeraz zincir reaksiyonu- restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) tekniği ile araştırılması, aile hikayesi, hipertansiyon, diyabet, sigara alışkanlığı, total kolesterol, trigliserit, HDL ve LDL seviyeleri ile ilişkili olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. LİTERATÜR BİLGİ

### 2.1. Miyokard infarktüsü

Miyokard infarktüsü (MI), yüksek morbitide ve mortalitesi olan en önemli sağlık problemlerinden biridir (Julian ve Norris 2002, Bleumink ve ark 2004). Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde meydana gelen ölümlerinin yaklaşık %25'lik bölümü MI nedeniyle olmaktadır (Nordlie ve ark 2005, Gök 2002). MI, insan sağlığına etkisinin yanında ciddi boyutlarda mali kayıplara da sebep olmaktadır. Toplum sağlığı açısından önemi ve hem bireysel hem de devletlerin sağlık bütçeleri açısından ciddi ekonomik kayıplara neden olması dolayısıyla başta MI olmak üzere kardiyovasküler hastalıklardan korunma yöntemleri ve tedavisi ile ilgili stratejiler geliştirilmektedir (Jefferson ve Topol 2005, Nordlie ve ark 2005). Sosyal ve psikolojik perspektiflerden de ciddi bir sorun olan MI, toplumda hastalığın görülme sıklığının, klinik uygulamaların ve yapılan tedavilerin bir ölçütü olarak önem taşımaktadır (Boersma ve ark 2003).

MI uzamış iskemi sonrası meydana gelen geri dönüşümsüz kalp kası nekrozudur (Alpert ve ark 2000, Gök 2002, Boersma ve ark 2003). Koroner arterler üzerindeki her kalp atımında meydana gelen miyokard kasılması ve gevşemesi gibi fiziksel baskılar ve oksijen ihtiyacındaki değişiklikler koroner kan akımını düzenlemektedir. Koroner arterlerdeki otopregülasyon mekanizmaları, miyokard oksijen seviyesini belirli düzeylerde tutarlar. Bu koruyucu ve düzenleyici mekanizmalar bozulduğu zaman uzamış iskemi veya miyokard infarktüsü gelişebilmektedir (Şekil 2.1.) (Gök 2002). MI hastalarının yaklaşık %85'inde aterosklerozla daralmış koroner arteri tıkayan trombus (pıhtı) ile kalp krizi geçirilmektedir. Koroner trombuslar; aterosklerotik plak, koroner damar endoteli, trombositler ve damar duvarının dinamik tonusu arasındaki etkileşimlerle meydana gelmektedir. Sonrasında miyokardiyal doku oksijenizasyonunun bozulmasına bağlı olarak şiddetli iskemi kaynaklı hücre ölümü gerçekleşmektedir. Miyokarda doğrudan kan sağlayan damar(lar)ın tıkanması durumunda hücre ölümü hızlı gerçekleşmekte ve infarktüs bölgeleri dışı doğru yayılım göstermektedir. Akut iskemi durumunda aerobik metabolizma yetersiz kalmakta, doku asidozu ortaya çıkmakta ve hücre içi ATP miktarı azalmasına bağlı olarak ATP bağımlı metabolik süreçler hızla bozulmaktadır. Hücre içi kalsiyum (Ca) birikmesi sonrasında ödem ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (Gök 2002, Jefferson ve Topol 2005).



**Şekil 2.1.** Miyokard infarktüsün şematik görünümü (www.medicinener.com).

Günümüzde MI'nın tanısı için genel bir konsensus gerçekleştirilmiş olup üç karakteristik özelliği ile tanımlanmaktadır. Bunlar çeşitli semptomlar (örneğin göğüs ağrıları), enzim artışı ve Q-dalgalarının oluşumunu gösteren tipik elektrokardiyogram (EKG) bulgularıdır. Güncel klinik uygulamalarda; MI tanımlaması sürecinde hassas ve spesifik serolojik belirteçler (markırlar) ve görüntüleme sistemleri kullanılmaktadır. Ayrıca MI tanısı konulmasında Avrupa Kardiyoloji Birliği (European Society of Cardiology – ESC) ve Amerikan Kardiyoloji Komitesi Koleji (American College of Cardiology Committee – ACC)'nin 1999 yılında oluşturdukları konsensus ile kriterler netleştirilmiştir. Bu iki komite tarafından MI tanısı konulması için patoloji, biyokimya, EKG, görüntüleme, klinik özellikler, epidemiyoloji ve halk sağlığından oluşan 7 nokta belirlenmiştir. Bunların dışında da miyokardiyal nekroz alanın büyüklüğü, iskemi süresi ve nekrozun düzelebilmeye kapasitesi gibi parametreler de kullanılmaktadır. Ayrıca miyokardiyal nekroz sonucunda miyositlerin harap olmasına bağlı olarak dolaşıma miyogloblin, kardiak troponin T ve I, kreatin kinaz ve laktat dehidrojenaz gibi farklı proteinler salındığı için, özellikle kardiak troponin ve kreatin kinaz MB (CK-MB); MI tanısı konulmasında son derece önemli biyokimyasal belirteçlerdir (Alpert ve ark 2000, Ferguson ve ark 2002, Boersma ve ark 2003, Jefferson ve Topol 2005, Özdemir ve Cordan 2005). Son teknolojik gelişmeler ile MI daha erken evrelerde tespit edilebilmekte ve kriterlerdeki hassasiyetin artışı ile MI

vakalarında doğru tanı konması sağlanmaktadır (Ferguson ve ark 2002, Boersma ve ark 2003).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, MI sebepleri ateroskleroz sebepleri ile birlikte incelenmektedir. Güncel bulgular da değerlendirildiğinde ateroskleroz risk faktörlerinin yaklaşık %90 oranında MI için de risk oluşturduğu ifade edilmektedir. Bu duruma bağlı olarak ileri yaş, cinsiyet (vakaların erkek olması), sigara kullanımı, obezite, hiperkolesterolemi, koroner kalp hastalıkları ve hipertansiyon belli başlı MI sebepleri olarak belirtilmektedir (Shimasaki ve ark 1998, Lysis 2003, Boersma ve ark 2003, Jefferson ve Topol 2005). Bunlarla birlikte arter iltihabı, travma, metabolik hastalıklar, emboli yapan endokardit gibi durumlar, miyokard oksijen seviyesindeki azalma veya artışlar, hematolojik sebepler ve kokain bağımlılığı gibi başka sebepler de etkili olabilmektedir (Gök 2002, Julian ve Norris 2002, Sonel 2003, Özdemir ve Cordan 2005). MI'nın yüksek görülme oranına rağmen kalp krizinin gelişimi ve patofizyolojisindeki moleküler olaylar ile ilgili mekanizmalar hala tam olarak bilinmemektedir. Metabolik mekanizmalar, çevresel ve çeşitli genlerin MI gelişiminde etkili olduğu bildirilmektedir (Shimasaki ve ark 1998, Lysis 2003, Wang 2005).

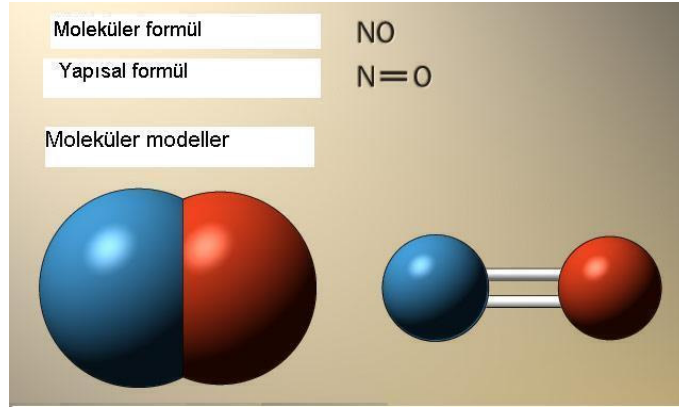
HücreSEL metabolik süreçlerin pek çoğunda görev alan moleküllerden birisi olan NO'nun kalp krizi patogenezindeki rolünün belirlenmesi, hastalığın moleküler mekanizmasının ortaya konması ve hastalığın tedavisine çok önemli katkılar sağlama potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir (Jones ve ark 2003).

## **2.2. Nitrik oksit (NO) ve özellikleri**

### **2.2.1. NO molekülü**

Nitrik oksit (NO), bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşan (**Şekil 2.2.**), paylaşılmamış elektron içeren, pek çok reaksiyonu etkileyen zayıf bir oksidan veya indirgeyici bir bileşen olarak görev yapan, serbest radikal olarak da nitelendirilen, biatomik küçük bir moleküldür (Lowenstein ve ark 1994, Marin ve Rodriguez-Martínez 1997, Geller ve Billiar 1998).

1998 yılında Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro ve Ferid Murad kardiyovasküler sistemde NO'yu bir sinyal molekülü olarak keşfetmişlerdir. NO'nun bu özelliğinin tanımlanmasından sonra, NO'nun vasküler etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış (Barbato ve Tzeng 2004) ve NO/eNOS hücre biyolojisi ve moleküler biyolojide önemli araştırma konularından biri haline gelmiştir (Bogdan 2001).

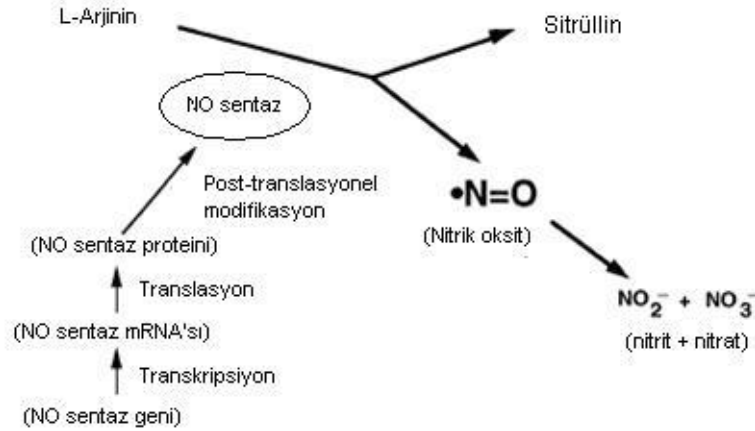


**Şekil 2.2.** Nitrik oksit molekülünün şematik görünümü ([www.deu.edu.tr/DEUWeb/Icerik.php](http://www.deu.edu.tr/DEUWeb/Icerik.php)).

NO, çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik işlemlerde yer alan, organizmanın hemen her yerinde bulunan biyolojik bir mediatördür (Geller ve Billiar 1998, Andries ve ark 1998, Wang ve Wang 2000, Lucas ve ark 2000). NO karakteristik özellikleri sebebi ile ideal mesajcı molekül olarak nitelendirilmektedir. Kimyasal yapısındaki paylaşılmayan elektronu ile yüksek derecede reaktif bir moleküldür (yarılanma ömrü 2-30 saniye) ve sinyal iletimi sonrasında kendiliğinden nitrite dönüşmektedir (Lowenstein ve ark 1994, Lucas ve ark 2000). Hücreler arasında sinyal iletiminde yer alan hormon, nörotransmitter ve büyüme faktörleri gibi moleküllerin çoğu sıklıkla plazma membranı ile bağlantılı olan spesifik protein reseptörleri olarak görev yaparken NO üretildiği hücreden dışarı diffüze olmakta ve spesifik moleküler hedeflerinin bulunduğu, hedef hücrenin içine girerek etkisini göstermektedir (Lowenstein ve ark 1994, Jeremy ve ark 1999, Lucas ve ark 2000).

### 2.2.2. NO'un hücrelerde sentezlenmesi

NO, bir nitrik oksit sentaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile sentezlenmekte ve arginin ile oksijen molekülleri NO ve sitrüllin moleküllerine dönüştürülmektedir (**Şekil 2.3.**). NO sentez mekanizmasının flavin adenin dinükleotid (FAD), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), tetrahidropterin ve heme kofaktörleri arasında elektron transferleri ile gerçekleşmektedir. Reaksiyon sonunda, oksijenden bir oksijen atomunun argininin terminal guanidin nitrojeni ile birleşmesiyle NO oluşmaktadır ( $O + \text{Guanidin} = \text{NO}$ ) (Lowenstein ve ark 1994, Geller ve Billiar 1998, Lucas ve ark 2000, Alderton ve ark 2001).



**Şekil 2.3.** NO, L-argininden NOS geni tarafından sentezlenen NOS enzimleri ile üretilir ve sonuçta serbest radikal olan NO ve sitrüllin oluşur. Yarılanma ömrü kısadır ve NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub>'e okside olur. NOS ekspresyonu ve aktivitesi transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel mekanizmalarla düzenlenir (Geller ve Billiar 1998).

### 2.2.3. NO'nun genel fonksiyonları

NO'nun çok sayıda ve kompleks biyolojik aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Örneğin NO, hayatın başlangıcında çok temel bir rol oynamaktadır. Döllenmeden hemen sonra erkek gametositlerinde bulunan NOS aktivitesi yumurtaların aktivasyonu için gereklidir. Bundan sonraki gelişim işlemlerinde de pek çok fizyolojik reaksiyonun gerçekleşmesinde rol almaktadır (Bogdan 2001).

Tetikleyici, aracı veya efektör olarak pek çok biyolojik reaksiyon ve sinyal transdüksiyon yollarında görev alan NO gerek doğrudan NO ve S-nitrolizasyona kadar spesifik moleküllerle reaksiyona girerek, gerekse reaktif nitrojen oksit türleri ile oksidasyon yoluyla indirekt olarak etkisini göstermektedir. Bu direkt veya indirekt etkiler fizyolojik ve patolojik sonuçlar oluşturmaktadır (Lucas ve ark 2000, Wang ve Wang 2000). Transkripsiyon faktörlerinin, translasyonun, mRNA stabilitesinin, primer (fonksiyonel olarak inaktif olan) gen ürünleri işlemlerinin düzenlenmesinde çeşitli roller oynamaktadır (Bogdan 2001).

NO'nun, vazodilatör, nörotransmitter, antimikrobiyal efektör molekül ve immünomodulator olarak fizyolojik ve patofizyolojik rolleri bulunmaktadır. Bir serbest radikal olan NO'nun etkileri üretildiği dokuya göre değişmektedir. Endotel kaynaklı gevşeme faktörü (Endothelial derived relaxing factor- EDRF)'nin tanımlanmasını takiben makrofaj, endotel hücreler, nöronlar, fibroblastlar, epitelyal hücreler, düz kas hücreleri

kardiyak miyositler ve daha fazla hücre tipinin NO ürettiği belirlenmiştir (Geller ve Billiar 1998, Lucas ve ark 2000). NO'nun en iyi karakterize edilen reseptörü, bir hem grubu olarak bir protein içeren veya bir demir-sülfür kompleksi olarak demirdir. NO guanilat siklazın hem grubundaki demirine bağlandığında enzim bu hücrede aktif hale geçer. Guanilat siklaz sonraki aşamada siklik guanizin mono fosfat (cGMP) üretir ve cGMP aktivitesi diğer hücresel işlemlerde artar. Guanilat siklazın aktivitesinin değişimi ile NO arterler, sinyal nöronlar ve öldürücü hücrelerde salınır (Lowenstein ve ark 1994, Lucas ve ark 2000).

### **2.2.3.1. İmmün sistemde NO**

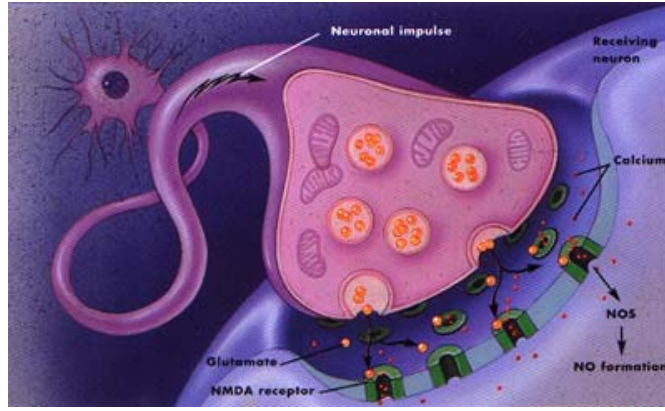
NO'nun immün sistemdeki rolü hakkında deney hayvan modellerinde oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Rat/fare makrofajlarında kolaylıkla indüklenebildiği ancak insan makrofajlarında verimli sonuç elde edilemediği bildirilmektedir (Lowenstein ve ark 1994, Lucas ve ark 2000). İmmün sistemde nonspesifik olarak tüm hücre veya patojenleri bozucu etki göstermektedir. Buna karşılık antikor veya sitotoksik T lenfositler; spesifik patojenleri veya infekte hücreleri ilk tanıyan ve onları tahrip edici ajanlar olarak görev almaktadırlar ve buna bağlı olarak NO fonksiyonlarının geniş bir hücre spektrumunda nonspesifik etkiler gösterdiği ve lenfositlerin kompleks ve spesifik etkileşimleri öncesinde görev alan birincil immün sistem olduğu belirtilmektedir (Lowenstein ve ark 1994, Geller ve Billiar 1998).

Deaminasyon yoluyla DNA üzerindeki etki göstererek hedef hücre harabiyetine neden olabilmesi nedeniyle NO, kanser tedavisinde kullanılabilir. NO'nun otoimmün hastalıklarda, normal hücrelerin yapısını bozduğu da belirtilmektedir (Lowenstein ve ark 1994, Lucas ve ark 2000). NO'nun geniş spektrumlu, nonspesifik fonksiyonlarını farklı dokularda gösterebildiği ve lenfositlerin kompleks ve spesifik etkileşimlerinden önce gelişen primer immün savunma hattı olduğu da belirtilmektedir (Lowenstein ve ark 1994, Lucas ve ark 2000).

### **2.2.3.2. Sinir sisteminde NO**

Beyindeki NO sentezi, belirli nöronal grupların içinde gerçekleşmekte ancak spesifik yolları bilinmemektedir. NO'nun özellikle serebellar nöronlarda bulunması sebebi ile koordinasyon ve denge sağlanmasında görev aldığı belirtilmektedir (Lowenstein ve ark 1994). Salgılanan NO komşu nöronlara bir seri basamakla diffüz olmakta ve daha sonra perisinaptik nöronlarda bulunan glutamatın NMDA (n-metil-d-aspartat) reseptörüne bağlanmaktadır (**Şekil 2.4.**). Bu reseptör nöronal NOS aktivasyonu için gerekli olan

kalmodüline bağlanan kalsiyum kanallarına sahiptir ve cGMP seviyelerinin değişimine neden olmaktadır. Böylece perisinaptik ve postsinaptik nöronlar arasında sinyal iletimi gerçekleşmektedir. NO'nun aşırı salınımının nörotoksik etki gösterdiği de bilinmektedir (Lowenstein ve ark 1994).

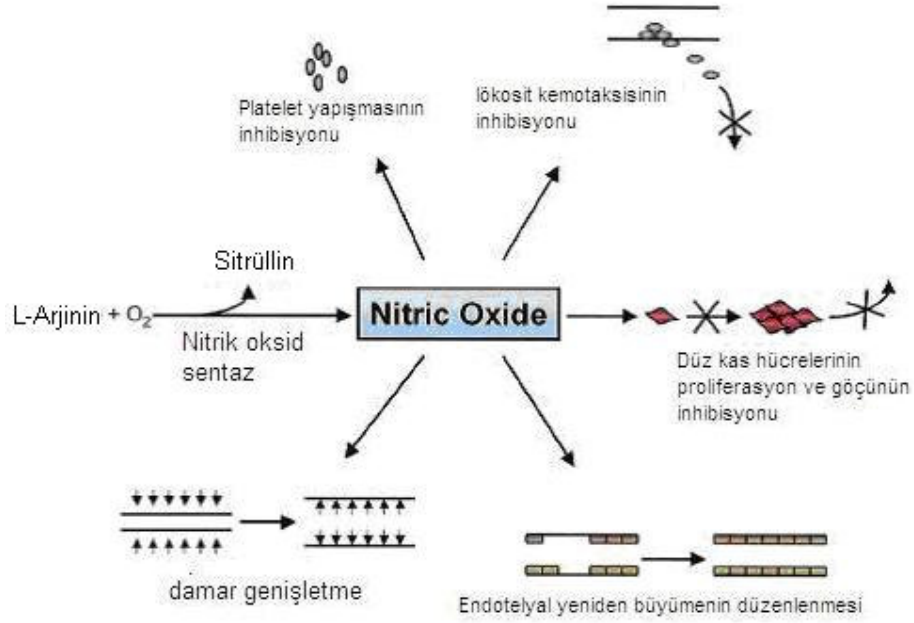


Şekil 2.4. Sinir sisteminde NO (www.sfn.org/index.cfm?pagename=brainBriefings\_nitricOxid)

### 2.2.3.3. NO'nun kardiyovasküler sistemdeki görevleri

NO'nun ilk tanımlanan fonksiyonu vasküler düz kas hücreleri üzerindeki etkisidir (Bogdan 2001). Daha sonra NO'nun tespit edilen kardiyovasküler sistemdeki fonksiyonları; vazomotor tonusun düzenlenmesi, miyokardial kasılmanın modülasyonu, hücre proliferasyonun kontrolü ile platelet aktivasyonu, adezyon ve agregasyonun inhibisyonu şeklinde özetlenebilir (Şekil 2.5.) (Lowenstein ve ark 1994, Marin ve Rodriguez-Martínez 1997, Andrew ve Mayer 1999, Lucas ve ark 2000, Wang ve Wang 2000, Barbato ve Tzeng 2004).

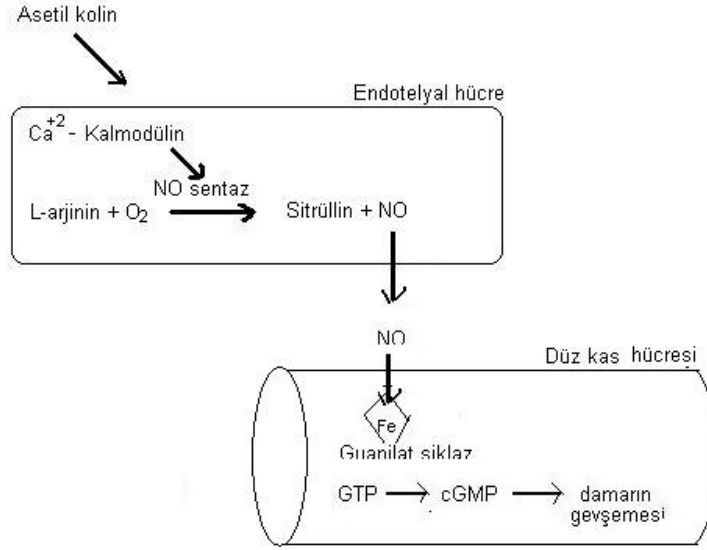
NO dolaşım sisteminin bazı bölgelerinde lokal değişikliklere cevap şeklinde otomatik olarak kan akışımı ve kan basıncını düzenlemektedir. Yine beyin, kalp, akciğer, gastrointestinal sistem ve böbrek kan akımı da bazal NO düzeyleri ile düzenlenmektedir (Napoli ve Ignarro 2001, Marin ve Rodriguez-Martínez 1997).



**Şekil 2.5.** NO'un damarlar üzerine olan etkileri (Barbato ve Tzeng 2004)

NO, vasküler düz kas hücrelerinin direkt olarak gevşemesini sağlayarak kan damarlarının genişlemesine sebep olmaktadır (**Şekil 2.6.**). Asetilkolin molekülleri endotelial hücrelerde kendi reseptörüne bağlandığında intrasellüler kalsiyum (Ca) seviyesinin artışına sebep olmakta, Ca kalmadülin bağlanması gerçekleşmekte ve Ca-kalmodülin kompleksi de eNOS'u aktive ederek NO salınımını sağlamaktadır. Salınan NO endotelial hücreden dışarı, komşu düz kas hücresine diffüz olarak guanilat siklazın hem grubuna bağlanmaktadır. Guanilat siklaz, cGMP gibi ürünleri ve protein kinazların seri reaksiyonlarını aktive ederek düz kas gevşemesini sağlamaktadır. Biyolojik ortamlarda yarılanma ömrünün 2-30 saniye olması sebebi ile daha fazla NO ürünü olmadıkça vazodilatasyon etkisi kendiliğinden kaybolmakta ve tekrar önceki konumuna dönmektedir (Lowenstein ve ark 1994, Lucas ve ark 2000).

NO'nun dolaşım sistemine salınımı otonomik sinir sistemi ile de kontrol edilmektedir. NO sinir uçlarından salgılanır ve damarın dış yüzeyinden düz kas hücresine diffüze olarak vazorelaksiyona neden olur. NO, kardiyovasküler sistemde özellikle kan damarları etrafındaki bölgelerde etkilidir. Kalp üzerindeki düz kas hücrelerine benzer şekilde NO'nun; negatif kronotropik etkisi ve kardiyak kas hücreleri üzerine ise negatif inotropik etkisi vardır (Lowenstein ve ark 1994, Andries ve ark 1998, Lucas ve ark 2000, Li ve Förstermann 2000).



**Şekil 2.6.** NO'nun arterial düz kas üzerine etkisi. Asetil kolin gibi bir mesajcı molekül bir endotel hücredeki asetilkolin reseptörüne bağlanır ve kalsiyumu aktive eder. Kalsiyum kalmoduline bağlanarak arjinin ve oksijeni sitrülin ve NO'ya dönüştüren endotelial NOS'u aktive eder. NO endotelial hücreden dışarı diffüze olur ve komşu düz kas hücresine geçer, hem grubundaki demire bağlanarak guanilat siklazı aktive eder. Siklik guanizin monofosfat (cGMP) nin artışı düz kasın gevşemesine ve böylece vazodilatasyona sebep olur (Lowenstein ve ark 1994).

Başta MI olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar milyonlarca insan üzerinde son derece ciddi sağlık problemlerine neden olmaktadır (Jones ve ark 2003). NO'un damarlar ve dolaşım sistemindeki bu önemli fonksiyonlarının MI etyopatogenezindeki yerinin aydınlatılması hastalığın moleküler patolojisini anlamada, tanı ve tedavi sürecinde çok önemli yere sahip olacaktır.

### 2.3. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri

NOS, (EC 1.14.13.39) ilk kez 1989'da tanımlanmış, 1991 ve 1994 yılları arasında bu enzimin üç izoformu izole edilmiş ve %51-57 arasında homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Bu enzimleri kodlayan genlerin farklı genler olduğu gösterilmiştir ve klonlanmıştır. Daha sonraki yıllarda ise NOS enzimlerinin yapısı, fonksiyonu ve inhibisyonu ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. NOS enziminin izoformlarının, farklı hücre tiplerinde bulunduğu, farklı yerlerde lokalize olduğu, regülasyonları, katalitik özellikleri ve inhibitör duyarlılıklarının değişik olduğu bildirilmiştir (Lamas ve ark 1992, Marin ve Rodriguez-Martínez 1997, Stuehr 1999, Andrew ve Mayer 1999, Li ve Förstermann 2000, Alderton ve ark 2001, Barbatto ve Tzeng 2004).

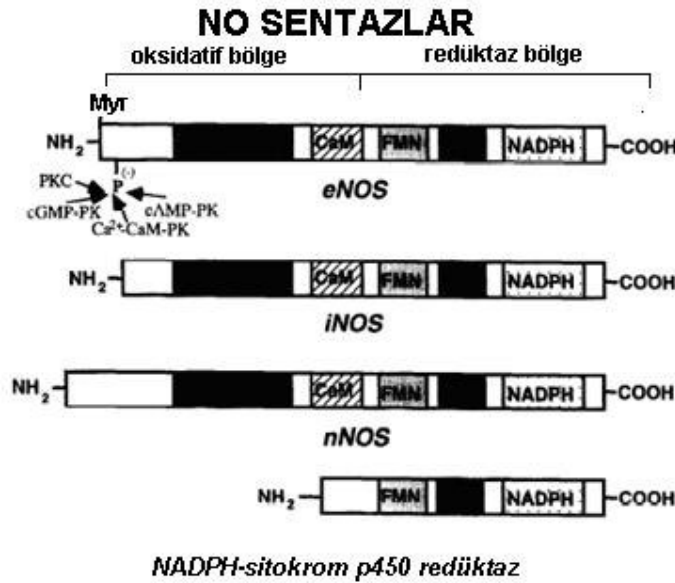
NOS enziminin izoformları; konstitüf veya indüklenebilir olmaları, kalsiyum bağımlı veya bağımsız olmaları, hücresel lokalizasyonları, sitozolik veya partikül halde olmaları ve alt ünitelerinin büyüklükleri gibi çeşitli karakteristik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır (Alderton ve ark 2001). (**Tablo 2.1.**) NOS enziminin izoformları nomenklatürde; ilk kez nöronal dokularda bulunan nöronal NOS (nNOS- Tip I, NOS-I ve NOS-1), pek çok hücre ve dokularda indüklenebilen NOS (iNOS-Tip II, NOS-II ve NOS-2) ve ilk kez vasküler endotelyal hücrelerde bulunan endotelyal NOS (eNOS- Tip III, NOS-III ve NOS-3) olarak isimlendirilmiştir (Stuehr 1999, Alderton ve ark 2001, Barbato ve Tzeng 2004).

**Tablo 2.1.** NOS enzimlerinin genel özellikleri (Geller ve Billiar 1998, Bogdan 2001, Alderton ve ark 2001, Gerritsen 2004).

| Enzim          | Alternatif isimler  | Hücre tipi   | Moleküler ağırlık (kDa) ve amino asit (aa) sayısı | Kromozomal lokalizasyonu | Gen Büyüklüğü ve yapısı           |
|----------------|---|--|---|--------------------------|-----------------------------------|
| <u>1. eNOS</u> | a) Konstitüf NOS, endotelyal tip,<br>b) ecNOS,<br>c) NOS3               | a) endotelyal hücreler   | 133 kDa, 1203 aa                                  | 7q35-7q36                | 21 kb,<br>26 ekzon,<br>25 intron  |
| <u>2. nNOS</u> | a) Konstitüf NOS, nöronal tip,<br>b) ncNOS,<br>c) NOS1,<br>d) Beyin NOS | a) nöronlar,<br>b) iskelet kas hücreleri,<br>c) kardiyak kas hücreleri | 161 kDa, 1434 aa                                  | 12q24-12q24              | 160 kb,<br>29 ekzon,<br>28 intron |
| <u>3. iNOS</u> | a) İndüklenebilir NOS<br>b) NOS2<br>c) makrofaj NOS                     | a) makrofaj<br>b) nötrofil,<br>c) hepatosit                            | 130 kDa, 1153 aa                                  | 17q11.2                  | 37 kb,<br>26 ekzon,<br>25 intron  |

NOS izoformlarının farklı regülasyon mekanizmaları ve aktivitelerin olduğu bilinmektedir (**Şekil 2.7.**). Konstitüf izoformlar nöronal ve endotelyal hücrelerden salınırlar ve sürekli olarak bulunurlar. NOS izoformları, intraselüler kalsiyum seviyesi belli düzeye artana kadar inaktif durumdadır. Kalsiyum bağlayan bir protein olan kalmodülün kalsiyumla birleşerek kalsiyum-kalmodülün kompleksi oluşmakta ve NOS'u aktive etmektedir. Konstitüf NOS izoformları kalsiyum seviyeleri düşene kadar az miktarda NO'yu sentezlemeye devam etmektedirler. NO'nun düşük konsantrasyonlardaki ara

ürünleri sinyali iletiminde rol oynamaktadır. Buna karşılık indüklenebilir NOS izoformları normal şartlarda makrofaj ve hepatositlerde bulunmamakta fakat bu hücreler spesifik bir sitokinle aktive edildiklerinde; bir indüklenebilir NOS enzim ürünü oluşmaktadır. İlk ürün oluşumunu takibeden süreçte daha da artan miktarlarda NO sentezi gerçekleşmektedir. İndüklenebilir NOS transkripsiyonel olarak aynı zamanda sitokin stimülasyonu (Lowenstein ve ark 1994) ve diğer iki izoformun ürünü olan NO miktarı ile (Barbato ve Tzeng 2004) regüle edilmektedir (Lowenstein ve ark 1994).



**Şekil 2.7.** eNOS, iNOS ve nNOS ile sitokrom p450 redüktaz ve karboksil terminal bölgesindeki NADPH, FAD ve FMN için yaygın bağlanma bölgesinin şematik yapısı. NH<sub>2</sub> terminal bölge: kalmudilin (CaM) ve hem/L-arjinin (L-arg) bağlanması için. Protein fosforilasyonu (-) ve myristoilasyon (Myr). Fosforilasyon PKC, Ca, CaM, cGMI, ve cAMP –bağımlı kinaz ile yapılır. İnsanda üç farklı genin üç NOS izozimini kodladığı belirlenmiştir. nNOS 12, iNOS 17 ve eNOS 7 no’lu kromozomunda lokalize oldukları belirlenmiştir (Marin ve Rodriguez-Martínez 1997, Alderton ve ark 2001) (**Tablo2.1.**).

## 2.4. NO ve miyokard infarktüsü

Kalp kas hücrelerinde NO, sadece koroner akımın değil aynı zamanda miyokardiyal performansın düzenlenmesinde rol alır. Yüksek oranlardaki konsantrasyonlarda negatif inotropik etki gösterirken, düşük konsantrasyonda farklı inotropik etkileri olduğu bilinmektedir (Lowenstein ve ark 1994, Marin ve Rodriguez-Martínez 1997, Andries ve ark 1998, Lucas ve ark 2000).

Sinotrial ve atrioventriküler nodlar yoğun bir NOS immünoreaktivitesine sahiptirler. Bu durum NO'nun kalp hızının kontrolünde rolü olduğu fikrini vermektedir. İdiyopatik dilate kardiyomiyopatisi olan hastalarda plazma nitrat düzeyinin yükselmesine sebep olan miyokardiyal iNOS ekspresyon artışı saptanmıştır. Bu durum insan miyokardında NO'nun fizyolojik ve patolojik rolleri olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, bu hastalarda aşırı NO üretiminde de görülen yüksek nöronal vazokonstriktör ürün düzeyleri tespit edilmiştir (Marin ve Rodriguez-Martínez 1997, Jeremy ve ark 1999). Bununla birlikte, iNOS tarafından sentezlenen NO'nun fazla üretimi, direkt negatif inotropik etki göstererek miyokard depresyona sebep olmakta ve vasküler tonusta azalma ile sonuçlanmaktadır (Marin ve Rodriguez-Martínez 1997). Miyokardial depresyon, iskemi sonrası reperfüzyon süreci sırasında görülmektedir. Bu depresyona fazla NO üretiminin neden olduğu ve bu oluşuma sitokinlerin de katıldığı bilinmektedir (Marin ve Rodriguez-Martínez 1997).

Endotelyal NO, aterogenezis ile ilgili genlerin ekspresyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan biri, NO kemoatraktan protein (MCP-1), CD11/CD18 gibi yüzey adezyon molekülleri, vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve intraselüler adezyon molekülü-1'in (ICAM-1) ekspresyonunu azaltarak lökositlerin vasküler endotele adezyonunu ve vasküler duvara göçünü engellemektedir (Li ve Förstermann 2000). NO aynı zamanda endotel geçirgenliğinin azalması ile lipoproteinlerin vasküler duvara bağlanmalarını azaltmakta ve LDL oksidasyonunu inhibe ederek anti-aterojenik özellikler de göstermektedir (Li ve Förstermann 2000, Napoli ve Ignarro 2001).

NO'nun DNA sentezini, mitojenizisi ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür (Li ve Förstermann 2000, Napoli ve Ignarro 2001). Aynı zamanda platelet adezyonunun engellenmesi, düz kas hücrelerinin platelet kaynaklı büyüme faktörlerin etkilerinden korunmasını sağlayarak vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bu şekilde, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve göçlerinin inhibe edilmesi ile NO'nun aterojenezin geç fazlarında da koruma sağladığı düşünülmektedir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmada, eNOS aktivasyonunun inhibe edildiği tavşanlarda, ateroskleroz gelişimi olduğu görülmüştür (Jeremy ve ark 1999, Andrew ve Mayer 1999, Li ve Förstermann 2000, Barbato ve Tzeng 2004, Tai ve ark 2004)

Vasküler NO'nun sentezinin indirgenmesi ve/veya degradasyonunun azalmasının bazı hastalıklarla ilgili olduğu bilinmektedir (Li ve Förstermann 2000).

Hiperkolesterolemi, diabetes mellitus, hipertansiyon ve sigara kullanımı ile ilgili araştırmalarda endotelial fonksiyon bozukluğu gsterilmiştir (Lucas ve ark 2000, Li ve Fstermann 2000). Vasküler NO aktivasyonunun azalması ateroskleroz dolayısıyla MI gelişiminde dikkat çekici bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Li ve Fstermann 2000, Barbato ve Tzeng 2004).

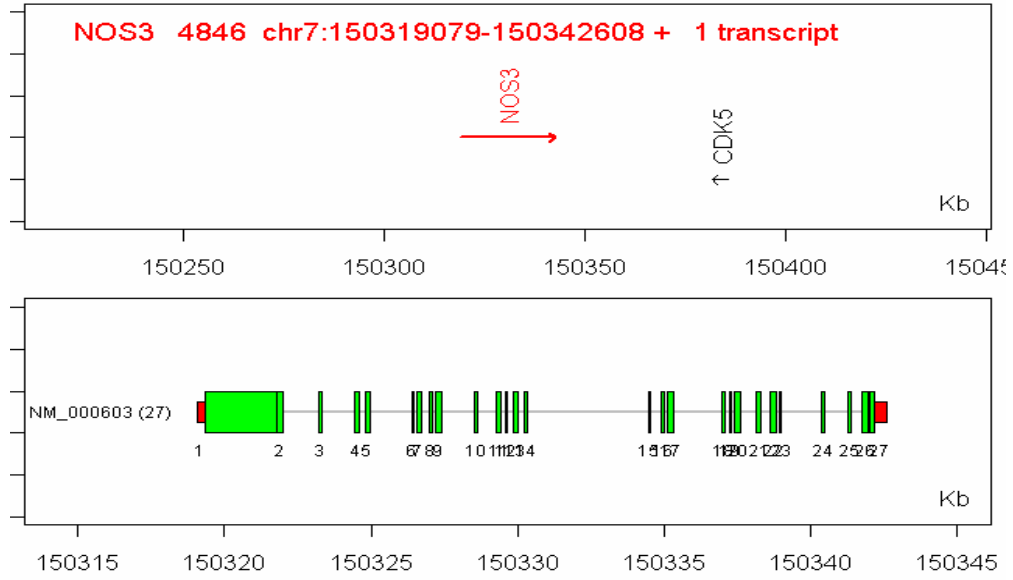
## **2.5. eNOS geni**

İnsan eNOS enzimini kodlayan gene ait genomik klonlar 1992 yılında tespit edilmiştir. *eNOS* geni, genomda yaklaşık 21 kilobaz büyüklüğünde bir gen olup 26 ekzon ve 25 introndan oluşmaktadır (**Şekil 2.8.**). İnsan *eNOS* geninin 7q35-7q36 bölgesinde olduğu tespit edilmiştir (Marsden ve ark 1993, Chan ve ark 2004). Bu gen haploid insan genomunda bir kopya olarak bulunur ve 4052 nükleotidlik bir mRNA kodlamaktadır (Marsden ve ark 1993). Genin 5'- ucu bölgesinin karakterizasyonu *eNOS* promotörünün TATA motifinin bulunmadığı ve proksimal promoter elementlerinin endotelial hücrelerde bulunan konstitüf olarak eksprese edilen gen ile uyumlu olduğunu göstermektedir. *eNOS* geninin cDNA'ları sığır ve insan endotelial hücrelerinden klonlanmış ve 3609 nükleotidlik açık okuma çerçevesine sahip olduğu gsterilmiştir. Bu mRNA 1203 amino asitten oluşan yaklaşık 133kDa moleküler ağırlığında protein kodlamaktadır. 5'-ucu bölgesinde putative AP-1, AP-2, NF-1, ağır metal, akut-faz cevabı shear strees ve sterol düzenleyici sis elementleri içermektedir (Marsden ve ark 1993, Tai ve ark 2004, Chan ve ark 2004). Shear stress in hemodinamik gücünün ve kronik egzersizin eNOS mRNA ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiş olup bu durumun promoter bölgesinde shear strees cevap elementinin düzenleyici rolü olduğunu düşündürmektedir (Geller ve Billiar 1998, Tai ve ark 2004).

eNOS enziminin kimyasal yapısının fosforilasyona uygun olduğu bilinmektedir. nNOS, eNOS bradikinin veya shear strees ile endotel hücre stimülasyonunu takiben fosforile olmaktadır (Marin ve Rodriguez-Martínez 1997).

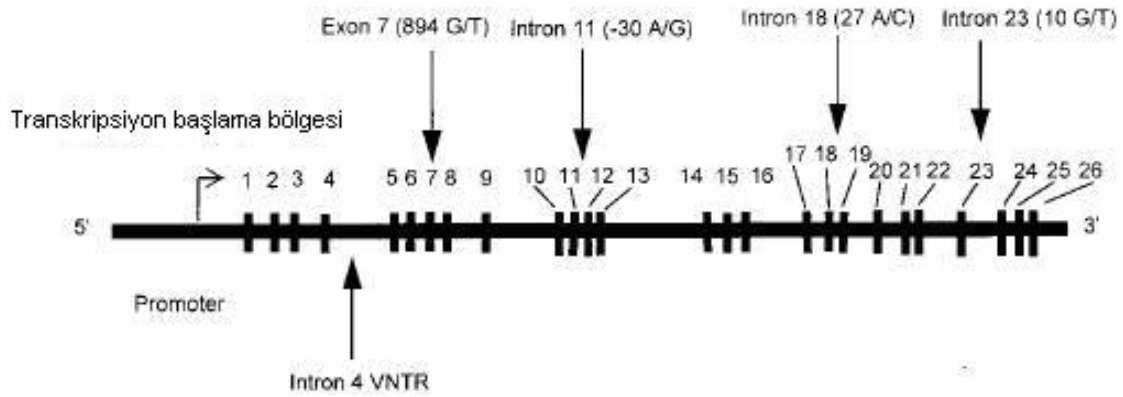
### **2.5.1. eNOS gen varyasyonları**

*eNOS* geninin dizisi belirlendikten sonra DNA dizi çalışmaları ile promotör bölgede, ekzonlarda ve intronlarda pek çok dizi varyasyonları rapor edilmiştir (Wang ve Wang, 2000, Casas ve ark 2004, Gerritsen 2005).



**Şekil 2.8.** İnsan konstitif *eNOS* geninin yapısal organizasyonu (Marsden ve ark 1992)

*eNOS* geninde tespit edilen varyasyonlar (tekrarlayan elementler) potansiyel olarak yüksek oranda polimorfik linkage markırları olarak kullanılmaktadır. Bu markırların multifaktöriyel kardiyovasküler hastalıklarda genetik linkage analizlerinin yapılmasında önemli olabileceği belirtilmiştir (Marsden ve ark 1993, Gerritsen 2005). Bu değişikliklerden bazıları: promotor bölgesinde tek nükleotid polimorfizmler (TNP); -1468 T > A, -922 A > G, -786 T > C dir. Bir konsensus olarak bu baz değişikliklerinden hiçbirinin transkripsiyon faktör bağlanıcı bölgede bulunmadığı ve endotelial hücrelerde sadece 144 bp'lik bir bölgenin promotor aktivitesinin olduğu ve bu bölgenin -3500 ile -3193 bp ları arasında olan kısım olduğu öne sürülmektedir (Casas ve ark 2004, Gerritsen 2005).



**Şekil 2.9.** *eNOS* geni intron/ekzon düzenlenmesi ve bazı polimorfizmlerinin şematik görünümü (Hingorani ve ark 1998, Tanus-Santos ve ark 2001)

*eNOS* genindeki intronlarında yaygın görülen varyasyonlar ise;

- (a) intron 2, IVS2 + 42G > A (G561A);
- (b) intron 11, IVS11 + 174 A > G (A3185G);
- (c) intron 12, IVS12 + 52G > T (G3411T);
- (d) intron 18, IVS18 + 27A > C (A27C);
- (e) intron 22, IVS22 + 15A > G (A6007G);
- (f) intron 23, IVS23 + 11G > T (G6247T) dir.

İntronlarda tandem olarak tekrar eden varyasyonlarda mevcut olup bunlar;

- (a) intron 2 ve 8 (32-bp tekrarı),
- (b) intron 4 (27-bp tekrarı) ve
- (c) intron 13, IVS13 + 81(CA)<sub>17</sub> – 44' dür.

*eNOS* genindeki ekzonlarında yaygın görülen bazı varyasyonlar ise;

(a) ekzon 7: 5557G > T (G894T) (E298D, glutamatın aspartata değişimi ile sonuçlanır),

(b) ekzon 6: 5172C > T (C74T). Bu bir sinonim baz değişimidir ve amino asit değişimi yoktur.

3'-ucu translante edilmeyen bölgede (UTR) dizi değişimi rapor edilmemiş olmasına rağmen bu bölgenin *eNOS* mRNA seviyelerinin belirlenmesinde önemli olduğu bildirilmiştir (Wang ve Wang 2000, Gerritsen 2005).

## **2.6. Kardiyovasküler hastalıklar ve moleküler genetik**

Moleküler biyolojideki yeni gelişmeler, araştırmacıları hastalıkların etyolojisinin ve bu hastalıkların moleküler temelini araştırmaya yönlendirmiştir. Bir hastalığın genetik temelini ve moleküler mekanizmasının anlaşılması ile genetik bilginin çevresel faktörlerle olan etkileşim mekanizmalarını ortaya koyan epigenetik araştırmalar bu hastalıkların tedavisinde ve korunmada izlenecek yolların belirlenmesinde çok büyük öneme sahiptir. Hastalıkların moleküler temelini bir bütün olarak değerlendirilmesi hastalığın ortaya çıkma mekanizmalarını tamamen anlaşılması, burada rol alan genler ve genlerdeki değişikliklerin ortaya konması ile mümkün olmaktadır. Bunun sonucu, doğru tanı konulması, optimum tedavi protokollerinin belirlenerek uygulanması ve hastalıktan

korunma yolları gibi temel kavramların aydınlatılması gerekmektedir. Kardiyovasküler hastalıklarda etyopatogenez sürecinde yer alan 400'den fazla genin olduğu tahmin edilmektedir. Bu genlerdeki değişikliklerin ve etki mekanizmalarının ve de bu genlerin ürünlerinin etkilerinin incelenerek mekanizmaların aydınlatılması önem arz etmektedir (Doevendans ve ark 2001, Hunter 2005).

Kardiyovasküler hastalıkların patolojisinin ve tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde kullanılan biyolojik çalışmalar DNA, RNA ve proteinler arasındaki ilişkilerin ve fonksiyonların araştırılması temeline dayanmaktadır. Her gen bir veya daha fazla protein için kod taşımakta ve fenotipi belirlemeye katkı sağlamaktadır.

DNA yapısındaki varyasyonlar insanlar arasındaki fenotipik farklılıklara neden olmaktadır. Bu genomik değişikliklerin kimi zaman çok büyük farklılıklara sebep olduğu, kimi zaman da yalnızca etkilerinin görüldüğü bilinmektedir. Bireyler arasındaki hastalıklara karşı farklı yatkınlık durumlarının bazı genlerde ortaya çıkan varyasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Bazı gen varyasyonları ile hastalıklara yatkınlık arasındaki ilişki çeşitli hastalıklarda gösterilmiştir (Housman 1995, Doevendans 2001, Nussbaum ve ark 2005, Öztaş ve ark 2005, Wang 2005, Nordlie ve ark 2005).

İnsan genetiği araştırmalarında anahtar rol oynayan polimorfik yapılar genetik markırlar olarak da kullanılmakta ve genetik hastalıkların tanısı, taşıyıcılık tespiti, hastalıklara yatkınlık veya dirençlilik gibi bireyler arasında farklılıklar gösteren pek çok biyolojik süreçte önemli bir yere sahiptirler (Housman 1995, Gelehrter ve ark 1998, Nussbaum ve ark 2005, Puddu ve ark 2005, Gerritsen 2005). Genomun her 1000 baz çiftinde bir tek nükleotid polimorfizminin (TNP) meydana geldiği tahmin edilmekte ve bu değişikliklerin büyük bir kısmı, genomun kodlama yapmayan bölgelerinde gerçekleşmektedir. Bu yüzden genlerdeki TNP'lerden çok az bir kısmı araştırılabilmiştir. TNP'ler kodlama bölgelerinde meydana geliyorsa, genetik kodun değişmesi ve dolayısıyla varyasyonlara sebep olabilmektedirler (Doevendans ve ark 2001, Wang 2005, Nordlie ve ark 2005).

## **2.7. MI'in genetik temeli**

Kardiyovasküler hastalıklar ve MI, genetik ve çevresel faktörler ile bu faktörler arasındaki etkileşimler sonrasında oluştuğuna inanılan kompleks hastalıklar grubu olarak tanımlanmaktadır (Wang 2005, Nordlie ve ark 2005). MI için belirlenen bazı risk faktörleri; aile hikayesi, sigara kullanımı, ileri yaş, erkek cinsiyet, diabet, yüksek sistolik

kan basıncı, angina pectoris hikayesi, ailesel kardiyovasküler hastalıklar veya MI hikayesi, yüksek yağ oranlı beslenme alışkanlığı, enfeksiyon ajanları, obezite ile plazma total kolesterol, LDL ve trigliserid seviyelerinin artışı olarak belirlenmiştir (Broeckel ve ark 2002, Lusi 2003, Wang 2005, Boersma ve ark 2003, Jefferson ve Topol 2005, Nordlie ve ark 2005). Bu faktörlerden aile hikayesi en dikkat çekici bağımsız risk faktörlerinden olarak kabul edilmektedir (Broeckel ve ark 2002, Wang 2005). Ailesinde veya birinci dereceden akrabalarında MI geçirmiş olan bireylerde MI görülme ihtimalinin arttığı bilinmektedir (Lembo ve ark 2001, Lusi 2003, Wang 2005). İkizlerle yapılan çalışmalar, genetik faktörlerin kardiyovasküler hastalıklar ve MI gelişiminde önemli bir yere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Lusi 2003, Nordlie ve ark 2005, Doevendans ve ark 2001, Wang 2005). MI için yatkınlık genlerinin belirlenmesinde en sık kullanılan metod; aday gende vaka-kontrol temelli genetik çalışmalardır (Broeckel ve ark 2002, Bleumink ve ark 2004, Wang 2005). MI'ın ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde çeşitli genlerin katkısının olduğu açıktır. Ancak yapılan çalışmalarda, birçok genin birbirini etkilemesi ve hücre sinyalizasyon şelalelerinde her birinin ürününün diğerini etkilemesi veya etkilenmesi sebebi ile bu hastalık grubunda sadece bir gen veya gen grubunun sorumlu olmadığı görüşü kabul görmektedir. Bu nedenle, genlerdeki TNP'leri saptamak ve hasta (vaka)/kontrol gruplarının genotiplerini belirlemek kolay ve ekonomik görülmektedir. Aday gen çalışmalarından elde edilen sonuçlar popülasyon karışımı, vaka-kontrollerdeki yanlış eşleşmeler, fenotipleme hataları ve çalışma örneklerinin sıklığı gibi diğer değişkenler de göz önüne alınarak yorumlanmaktadır (Bleumink ve ark 2004, Wang 2005, Nordlie ve ark 2005, Hunter 2005). Bu yöntem ile çok sayıda vaka-kontrol ilişki çalışması yapıldıktan sonra bazı genlerin kardiyovasküler hastalıklar veya MI etyopatogenezinde artan ya da azalan bir önem taşıdıkları ifade edilmektedir (Bleumink ve ark 2004, Wang 2005).

Kardiyovasküler hastalıkların patojenezinde rolü olabilecek genlerle ilgili çalışmaların yapılması, hastalığın gelişimi ile ilgili genetik mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlayacaktır (Lembo ve ark 2001). Bu çerçevede birçok hastalıkta olduğu gibi MI'ın da moleküler mekanizmasında rol alabileceği düşünülen birçok gendeki varyasyonlar çalışılmıştır. Anjiyotensin-konvert enzim (ACE) geni, sitokin geni, lipoprotein lipaz geni, apoprotein E-geni, alkol dehidrojenaz geni, kolesterol ester transfer protein (CETP) geni, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geni, interlökin-6 (IL-6) geni, tümör nekrozis faktör (TNF) geni, paraoksanaz (PON) geni gibi çok sayıda aday gen çalışmalarına ait bilgilerin olduğu bu çalışmalarda MI hastalığının ortaya çıkmasında ve gelişiminde NO

molekölü ile bu molekülü sentezinden sorumlu olan *eNOS* enzimini kodlayan gen ile ilgili çalışmalara da önemle yer verilmiştir (Broeckel ve ark 2002, Puddu ve ark 2004, Nordlie ve ark 2005, Wang 2005).

*eNOS* geninde meydana gelen varyasyonların, eNOS enzimi ve eNOS enziminin etkilediği yollarda değişikliklere sebep olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Shimasaki ve ark 1998, Hingorani ve ark 1999, Wang ve Wang 2000, Colombo ve ark 2002, Colombo ve ark 2003, Lembo ve ark 2001, Fatini ve ark 2004, Gerritsen 2005, Puddu ve ark 2005). *eNOS* geninin kodladığı enzim, demir grubu içeren çeşitli kofaktörlere ihtiyaç duyulan bir reaksiyonda NO sentezler ki 7. ekzondaki Glu298Asp varyantı demir bağlanma ve kalsiyum/kalmodülün bağlanma bölgesinin orta kısmında yer alır. İntron 4a/b bölgesi ise demir bağlanma bölgesinden sonraki kısımdadır (Pulkkeinen ve ark 2000). Plazma NO seviyesinin bu iki polimorfizmden etkilendiği buna bağlı olarak, gen üzerindeki bu yerleşimleri ile bu polimorfizmlerin kan basıncı üzerine olan etkisiyle ilgili olabileceği bildirilmiş ve MI ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (Pulkkeinen ve ark 2000, Wang ve Wang 2000, Casas ve ark 2004).

MI ile *eNOS* gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin tespiti hastalığın etyoloji ve patojenezinin anlaşılmasında, büyük öneme sahip olabilir. Buna bağlı olarak, *eNOS* gen polimorfizmi ile MI arasındaki ilişkinin belirlenmesi için yapılan bu çalışma sonrasında, elde edilen bilgilerin değerlendirilmesi ile etiyolojisinde birçok genin ve çevresel faktörlerin rol aldığı bilinen *eNOS* genindeki bu iki polimorfik bölgenin etkisi ortaya çıkarılacak, ayrıca bu polimorfik bölge ile hastaların biyokimyasal değerleri ve aile hikayeleri ile ilişkisi ortaya konacaktır. Bu amaçla çalışmamızda eNOS enzimini kodlayan genin 4. introndaki 4a/b VNTR ve 7. ekzondaki Glu298Asp baz değişim polimorfizmlerinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

### **3. MATERYAL ve METOT**

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Araştırma Laboratuvarı ve Kardiyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil olan tüm bireyler araştırma öncesinde bilgilendirilmiş, yazılı onayları alınmış ve çalışma Meram Tıp Fakültesi Etik Komitesi tarafından onaylanmıştır.

#### **3.1. Hasta ve kontrol grubu**

321 MI hastası ve kontrol grubuna alınan 157 bireyin periferik venöz kan örnekleri alınarak DNA izolasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), restriksiyon enzim kesimi çalışmaları ve biyokimyasal ölçümler gerçekleştirildi.

Hastalarda MI risk faktörleri aşağıdaki kriterler kullanılarak belirlendi:

Kardiyoloji Kliniğine gelen hastalara kan basınçları 140/90 mm/Hg'den yüksek ölçülen bireyler hipertansif olarak kabul edildi ve diğerleri hipertansif olmayanlar olarak gruplandı. Bireylerin diyabet öyküsü alındı ve antidiyabetik tedavi alanlar ile diabetik olduklarını belirtenler hasta olarak kabul edildi, diğerleri diyabetik olmayanlar şeklinde gruplandı. Sigara kullanımı ise hiç içmeyen veya halen kullanmakta olanlar olarak belirtildi. Bireylerin aile hikayelerinde MI varlığı da sorgulandı.

Bireylerin rutin biyokimyasal parametrelerden trigliserit, total kolesterol, high-density lipoprotein (HDL) ve low-density lipoprotein (LDL) seviyeleri biyokimyasal metodlarla belirlendi.

#### **3.2. DNA izolasyonu**

Hasta (MI grubu) ve kontrol grubu bireylerinden steril EDTA'lı tüplere ikişer ml periferik venöz kan örneği alındı. Yoğun tuz konsantrasyonu metodu ve gerektiğinde ticari DNA izolasyon kiti (Biological Industries, Israel) kullanılarak total genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu işlemde;

1. Falcon tüplerinin içerisine 10'ar ml soğuk steril distile su konuldu.
2. Üzerine EDTA'lı tüp içerisindeki periferik kandan 1 ml eklendi ve pipetaj yapılarak homojen bir şekilde karışması sağlandı.
3. 4500 RPM'de 3-5 dakika santrifüj edildi.
4. Oluşan süpernatant dökülerek pelletin falkon tüpün dip kısmında kalması sağlandı.

5. Homojen hale getirilen pelletin üzerine 850 µl “nuclei lysis buffer” eklendi ve pipetaj yapıldı.
6. 37 °C’de 10 dakika bekletildi ve tekrar pipetaj yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.
7. Homojen hale gelmiş olan materyalin üzerine 850 µl kloroform eklendi ve vorteks ile karıştırılıp 1,5 ml’lik ependorf tüplerine aktarıldı.
8. 13000 RPM’de 3 dakika santrifüj edilerek faz oluşumu sağlandı.
9. Üst tabakadaki şeffaf kısım alınarak ayrı bir ependorf içerisindeki 1 ml % 96’lık alkolün üzerine eklendi ve alt üst edildikten sonra DNA yumak halinde gözle görüldü.
10. 12000 RPM’de 4 dakika santrifüj edilerek DNA molekülleri çöktürüldü ve alkol tabakası dikkatlice döküldü.
11. Üzerlerine 200’er µl % 70’lik alkol (etil alkol) eklenip 12000 RPM’de 3 dakika santrifüj edildi.
12. % 70’lik etil alkol dökülerek dip kısımdaki DNA’nın kuruması için ependorf ters çevrildi.
13. Yaklaşık 30 dk bekledikten sonra kurutulan DNA steril distile su (150-300 µl) veya T.E tamponu ile homojen hale getirildi.
14. DNA, PZR analizinde kullanılabilecek kadar -20°C’de depolandı.

### **3.3. eNOS geni 4. intronu VNTR (intron 4a/b) polimorfizmi analizi**

eNOS enzimini kodlayan genin 4. intronunda iki allel belirlenmiştir. Büyük olan “b” alleli 5 adet 27 bp’lik tandem tekrar içermekte ve küçük olan “a” alleli ise 4 tandem tekrarından oluşmaktadır. “b” allelinde 27 bp’lik tekrarın 19. sırasında ilk üç tekrarda A bazı, son iki tekrarda G nükleotidi bulunmaktadır. “a” allelinde ise tekrarın 19. sırasındaki nükleotid ilk iki tekrarda A; son iki tekrar G’dir (Pulkinen ve ark 2000). Bu tandem tekrar polimorfizminin belirlenmesinde direk PZR metodu uygulandı. Kullanılan primerlerden forward primer: 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT-3 ve revers primer: 5'-TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC-3 idi. Bu primerler kullanılarak 20 µl hacimde PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon

- 1,6 µl dATP, dGTP, dTTP ve dCTP (10 pmol)
- 2 µl 10 x PZR tamponu

- 1 µl MgCl<sub>2</sub>
- 1,2 µl 10 pmol primer (eNOS intron 4a/b)
- 11,8 µl dH<sub>2</sub>O
- 0,4 µl DNA Taq polimeraz enzimi (Fermantes, UK)
- 2 µl genomik DNA

içeren karışım ile gerçekleştirildi. PZR reaksiyonu Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cycler'da;

- 94°C'de 3 dakika bir döngü
  - 94°C'de 0,15 dakika,
  - 59°C'de 0,15 dakika,
  - 72°C'de 0,15 dakika,
- } 10 döngü
- 94°C'de 0,15 dakika,
  - 58°C'de 0,15 dakika,
  - 72°C'de 0,15 dakika,
- } 25 döngü
- 72°C'de 3 dakika ve
  - 4°C'de bir döngü
- programı uygulanarak gerçekleştirildi.

Elde edilen PZR ürününü değerlendirmek için %3'lük agaroz (A 5093, Sigma) TAE (Tris, Asetik asit ve EDTA) veya TBE (Tris, Borik asit ve EDTA) solüsyonları ile karıştırılıp kaynatılarak agaroz jel hazırlandı. Agaroz TAE veya TBE içinde eritildikten 50-60°C ye soğutulduktan sonra ethidium bromür (10µg/ml) ilave edildi. Agaroz elektroforez tankına döküldü ve jel donmadan uygun taraklar yerleştirildi. Elde edilen PZR ürünleri yükleme boyası (6 x loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve 45 dakika 120 voltluk elektrik akımı altında yürütüldü. Bant büyüklüklerini belirlemek amacıyla 100 bp'lik DNA ladder kullanıldı. UV illüminator altında jel değerlendirildi. Jelde 420 ile 393 bp büyüklüğündeki bantlar gözlemlendi. Bu bantlardan 420 bp büyüklüğündeki bantlar *eNOS* geni 4. intronu VNTR (4a/b) polimorfizmi için "bb" homozigot olarak değerlendirilirken 420 ve 393 bp büyüklüğündeki bantlar aynı bireyde görüldüğünde *eNOS* geni 4. intron için "ab" heterozigot ve 393 bp büyüklüğündeki bant tek başına görüldüğünde ise *eNOS* geni 4. intron için "aa" homozigot olarak değerlendirildi (**Şekil 4.1.**).

### 3.4. *eNOS* geni 7. ekzonundaki Glu298Asp polimorfizm analizi

*eNOS* geninin 7. ekzondaki G-T baz değişimi bulunmaktadır. Bu polimorfizm analizi için PZR-restriksiyon enzim kesimi metodu kullanılarak elde edilen kesim ürünlerinin uzunluk değişimini bakarak (PZR-RFLP; PZR- restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi) analiz tamamlandı. Bunun için forward: 5'-CAG GAG ACA GTG GGA GGG-3' ve reverse: 5'-CCA GTC AAT CCC TTT GGT GCT CA-3' primerleri kullanılarak polimorfik olabilecek bölge çoğaltıldı Bu bölgenin çoğaltılması için PZR reaksiyonu 20 µl'de gerçekleştirildi. Reaksiyon

- 1,6 µl dATP, dGTP, dTTP ve dCTP (10 mmol)
- 2 µl PZR tamponu (x 10)
- 1 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 1,2 µl 10 pmol primer (*eNOS* ekzon 7)
- 11,8 µl dH<sub>2</sub>O
- 0,4 µl DNA Taq polimeraz enzimi (Fermantes, UK)
- 2 µl genomik DNA

içeren karışım ile gerçekleştirildi. PZR reaksiyonu Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cycler'da;

- 94°C'de 3 dakika bir döngü
  - 94°C'de 0,15 dakika,
  - 60°C'de 0,15 dakika,
  - 72°C'de 0,15 dakika,
- } 10 döngü
- 94°C'de 0,15 dakika,
  - 59°C'de 0,15 dakika,
  - 72°C'de 0,15 dakika,
- } 25 döngü
- 72°C'de 3 dakika ve
  - 4°C'de bir döngü programı uygulanarak yapıldı.

Elde edilen PZR ürününün varlığını tespit etmek için %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. Bunun için, PZR ürünlerinden 5'er µl alınıp yükleme boyası (6 x loading dye) ile

karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve 45 dakika 120 voltluk elektrik akımı altında yürütüldü. Jel UV illüminator altında değerlendirildi. Elde edilen bant büyüklüklerinin doğruluğunu belirlemek için 100 bp'lik DNA ladder kullanıldı. Jel UV illüminator altında değerlendirilerek 243 bp büyüklüğünde bantlar olup olmadığı gözlenerek spesifik PZR ürünün varlığı tespit edildi.

Birinci aşamada 5'er mikrolitresi kullanılan PZR ürünün kalan 15 µl'si restriksiyon enzim kesimi için kullanıldı. *MobI* enzimi ile kesim bölgesi (GATC) içeren PZR ürünün aşağıdaki karışım kullanılarak kesildi. Bunun için;

- 3,5 µl steril dH<sub>2</sub>O
- 2 µl Restriksiyon Enzim Buffer
- 0,5 µl Restriksiyon Enzimi (*Mbo I*) (Fermantes, UK)

içeren karışım hazırlandı. Bu karışımlar 15 µl'lik PZR ürününün içerisine eklendi ve su banyosunda 37°C'de 12–16 saat bekletildi.

İşlem sonrasında tekrar %3'lük agaroz jel hazırlandı. Elde edilen enzim kesimi ürünleri ve 100 bp'lik DNA ladder jele yüklendikten sonra 45 dakika 120 voltluk elektrik akımı uygulandı. UV illüminator kullanılarak jel değerlendirilmesi yapıldı ve fotoğrafları çekildi.

*eNOS* geni 7. ekzonundaki Glu298Asp değişimini (genotip dağılımını) saptamak amacıyla yapılan çalışmanın bu bölümünde elde edilen jel örneklerinde 243, 154 ve 89 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi. Sadece 243 bp büyüklüğünde bant görüldüğünde *eNOS* geni 7. ekzon için "GG" homozigot, 243–154–89 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte aynı bireyin örneğinde görüldüğünde *eNOS* geni 7. ekzon için "GT" heterozigot, 154 ve 89 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde *eNOS* geni 7. ekzon için "TT" homozigot şeklinde değerlendirilerek genotipleme yapıldı (Şekil 4.2.).

### 3.5. İstatistik analizler

Çalışma ve kontrol gruplarından elde edilen veriler SPSS programı kullanılarak istatistiksel analizi yapıldı. Hasta ile kontrol grubunun karşılaştırılması *t*-testi ile, genotip dağılımı  $\chi^2$  testi ile, genotip dağılımı ile biyokimyasal değerlerin karşılaştırılması One Way ANOVA testi ile değerlendirildi. Anlamlılık seviyesi olarak 0,05 değeri kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda, 321 MI hastası ve 157 bireyden oluşan kontrol grubu bireylerden alınan periferik kan örnekleri ile PZR ve PZR-RFLP analizleri yapıldı ve biyokimyasal değerler ölçüldü. Bununla birlikte bireylerden alınan cevaplara göre aile hikayeleri, sigara alışkanlıkları ile hipertansiyon ve diyabet durumları değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubuna ait veriler **Tablo 4.1.**'de verilmektedir.

**Tablo 4.1.** Hasta ve kontrol gruplarına ait veriler.

|  | <b>MI hastaları</b><br>(ortalama $\pm$ SS)                                      | <b>Kontrol bireyleri</b><br>(ortalama $\pm$ SS) |
|--|---|---|
| <b>Birey sayısı (n)</b>                  | 321   | 157   |
| <b>Yaş</b>                               | 62,44 ( $\pm$ 11,338)   | 49,29 ( $\pm$ 8,890)                            |
| <b>Cinsiyet (Erkek / Kadın)</b>          | 194 / 127   | 102 / 55  |
| <b>Aile hikayesi (Evet / Hayır)</b>      | 70 / 251  | 32 / 125  |
| <b>Sigara alışkanlığı (Evet / Hayır)</b> | 103 / 218   | 47 / 110  |
| <b>Hipertansiyon (Evet / Hayır)</b>      | 147 / 174   | 31 / 126  |
| <b>Diabetes mellitus (Evet / Hayır)</b>  | 83 / 238  | 9 / 148   |
| <b>Kolesterol Seviyesi (mg/dl)</b>       | 181,05 ( $\pm$ 47,002)  | 194,20 ( $\pm$ 42,694)                          |
| <b>Trigliserit Seviyesi (mg/dl)</b>      | 140,131 ( $\pm$ 113,087)  | 152,83 ( $\pm$ 97,971)                          |
| <b>HDL Seviyesi (mg/dl)</b>              | 40,67 ( $\pm$ 13,175)   | 45,41 ( $\pm$ 12,625)                           |
| <b>LDL Seviyesi (mg/dl)</b>              | 116,16 ( $\pm$ 38,955)  | 120,12 ( $\pm$ 32,557)                          |
| <b>Kısaltmalar</b>                       | SS: standart sapma, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein |   |

Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen biyokimyasal parametreler t-testi ile değerlendirildi. Hasta grubunda total kolesterol (**p=0,003**) ve HDL (**p=0,000**) seviyelerini kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulundu, diğer parametreler bakımından ise hasta ve kontrol grubu arasında fark görülmedi (**Tablo 4.2.**).

**Tablo 4.2.** Hasta ve kontrol grubunda biyokimyasal parametreler.

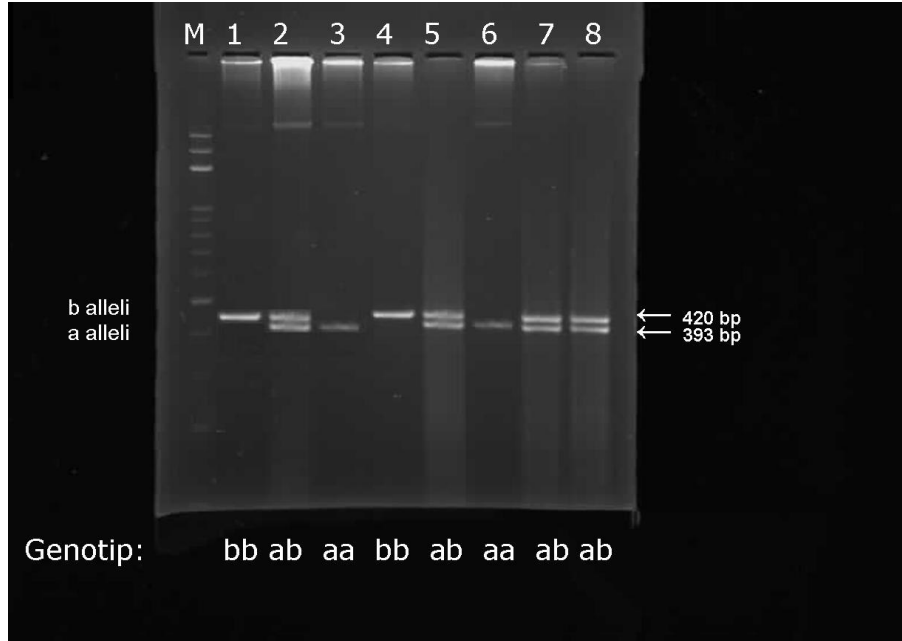
|                         | <b>Grup</b>    | <b>Birey sayısı (n)</b> | <b>Ortalama</b> | <b>Standart sapma</b> | <b>t değeri</b> | <b>Serbestlik Derecesi</b> | <b>p değeri</b> |
|-------------------------|----------------|-------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| <b>TOTAL KOLESTEROL</b> | <b>MI</b>      | 321                     | 181,05          | 47,002                | 2,96            | 476                        | <b>0,003</b>    |
|                         | <b>Kontrol</b> | 157                     | 194,2           | 42,694                |                 |                            |                 |
| <b>TRİGLİSERİT</b>      | <b>MI</b>      | 321                     | 140,13          | 113,087               | 1,203           | 476                        | 0,230           |
|                         | <b>Kontrol</b> | 157                     | 152,83          | 97,971                |                 |                            |                 |
| <b>HDL</b>              | <b>MI</b>      | 321                     | 40,67           | 13,175                | 3,743           | 476                        | <b>0,000</b>    |
|                         | <b>Kontrol</b> | 157                     | 45,41           | 12,625                |                 |                            |                 |
| <b>LDL</b>              | <b>MI</b>      | 321                     | 116,16          | 38,955                | 1,083           | 466                        | 0,279           |
|                         | <b>Kontrol</b> | 157                     | 120,12          | 32,557                |                 |                            |                 |

#### 4.1. PZR analizleri ve genotip dağılımları

Çalışmamızda MI hastaları ve kontrol grubu bireylerinden alınan kan örneklerinden *eNOS* geninin genotipik dağılımı ile hastalık arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla mevcut çalışma gerçekleştirildi. *eNOS* enzimini kodlayan genin 4. intronu ve 7. ekzonundaki polimorfik yapıları hasta ve kontrol grubunda dağılımı analiz edildi.

##### 4.1.1. *eNOS* geni intron 4a/b genotip dağılımı

Çalışmada PZR analizlerine göre MI hastalarının 221'nin (%68,847) bb homozigot, 92'sinin (%28,660) ab heterozigot, ve 8'nin (%2,493) aa homozigot genotipe sahip olduğu, kontrol grubu bireylerinin ise 112'sinin (%77,707) bb, 35'inin (%22,293) ab genotipe sahip olduğu ve aa genotipinde olduğu belirlendi (**Şekil 4.1.**) Allel frekansları hasta grubunda b alleli için %83,177, a alleli için %16,823; kontrol grubunda b alleli için %88,854, a alleli için %11,146 olduğu tespit edildi. Hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımı ve allel frekansları **Tablo 4.2**'de verilmektedir. Yapılan ki-kare analizine göre hasta grubunda aa genotip sıklığının kontrollere göre yüksek olduğu belirlendi (**p=0,036**).



**Şekil 4.1.** *eNOS* geni 4. introndaki 4a/b polimorfizmi için PZR jel elektroforez görüntüsü.

M: 100 bp ladder, bb homozigot, ab heterozigot, aa homozigot, bp: baz çifti.

#### 4.1.2. *eNOS* geni 7. Ekzondaki Glu298Asp polimorfizmi genotip dağılımı

Yapılan PZR-RFLP analiz sonuçlarına göre MI hastalarının 189'unun (%58,879) GG, 112'sinin (%34,891) GT heterozigot, ve 20'sinin (%6,230) TT homozigot genotipe sahip olduğu, kontrol grubu bireylerinin ise 96'sının (%61,146) GG, 51'inin (%32,485) GT ve 10'nun (%6,369) TT genotipe sahip olduğu belirlendi. (Şekil 4.2.). Allel frekansları hasta grubunda G alleli için %76,324, T alleli için %23,676; kontrol grubunda G alleli için %77,389, T alleli için %22,611 olarak belirlendi. Genotip dağılımının hasta ve kontrol grubundaki değerleri ile allel frekansları **Tablo 4.2.**'de verilmektedir. Yapılan ki-kare analizinde ise hasta grubu ile kontrol grubu arasında *eNOS* geni 7.ekzondaki Glu298Asp polimorfizmi için genotip dağılımı ve allel frekansı bakımından fark olmadığı tespit edildi ( $P>0,05$ ).



**Şekil 4.2.** *eNOS* geni 7. ekzondaki Glu298Asp polimorfizmi için PZR-RFLP jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp ladder, GG homozigot, GT heterozigot, TT homozigot, bp: baz çifti

**Tablo 4.3.** Hasta ve kontrol grubu bireylerinin intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp polimorfik bölgelerin genotip dağılımları ve allel frekansları.

|                | Genotip Dağılımı   |                |                 |                |        |   |                 |               |                |        |        |
|----------------|--|----------------|-----------------|----------------|--------|---|-----------------|---------------|----------------|--------|--------|
|                | İntron 4a/b  |                |                 |                |        | Ekzon 7 Glu298Asp   |                 |               |                |        |        |
|                | *aa  | ab             | bb              | Allel frekansı |        | GG  | GT              | TT            | Allel frekansı |        | Toplam |
|                | n (%)  | n (%)          | n (%)           | a %            | b %    | N (%)   | n (%)           | n (%)         | G %            | T %    |        |
| <b>MI</b>      | 8<br>(2,493)   | 92<br>(28,660) | 221<br>(68,847) | 16,823         | 83,177 | 189<br>(58,879)   | 112<br>(34,891) | 20<br>(6,230) | 76,324         | 23,676 | 321    |
| <b>Kontrol</b> | 0<br>(0)   | 35<br>(22,293) | 122<br>(77,707) | 11,146         | 88,854 | 96<br>(61,146)  | 51<br>(32,485)  | 10<br>(6,369) | 77,389         | 22,611 | 157    |
| <b>Toplam</b>  | 8  | 127            | 343             |                |        | 285   | 163             | 30            |                |        | 478    |
|                | Ki-kare: 6,675 SD: 2 P: <b>0,036</b><br>n: birey sayısı, SD: Serbestlik derecesi |                |                 |                |        | Ki-kare: 0,273 SD: 2 P: 0,872<br>n: birey sayısı, SD: Serbestlik derecesi |                 |               |                |        |        |

#### 4.2. *eNOS* geni intron 4a/b ve Ekzon 7 Glu298Asp polimorfik bölgelerinin genotip dağılımı ile aile hikayesi, sigara kullanımı, hipertansiyon ve diyabet parametrelerinin hasta ve kontrol grupları arasındaki ilişkinin karşılaştırılması

*eNOS* geninin 4. intronundaki 27 bp'lik tekrar polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda bireylerde karşılaştırılması yapıldığında aile hikayesinde MI hikayesi olan bireylerde ab genotipine sahip olma durumunun anlamlı olduğu belirlendi ( $p=0,045$ ) (**Tablo 4.4.**). Bununla birlikte sigara kullananlarda ab genotipine sahip bireylerde ise sınırda bir anlamlılık olduğu belirlendi ( $p=0,055$ ) (**Tablo 4.4.**). Hipertansiyon ve diyabet ile ilgili olarak ise intron 4a/b polimorfizmleri ile hasta ve kontrol grubu arasında fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ) (**Tablo 4.4.**).

*eNOS* enzimini kodlayan gen bölgesinin 7. ekzonundaki G>T baz değişim polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki bireylerde karşılaştırılması yapıldığında diyabetik bireylerde GG genotipine sahip olmanın anlamlı olduğu belirlendi ( $p=0,027$ ) (**Tablo 4.4.**). Aile hikayesi, sigara kullanımı ve hipertansiyon ile ilgili olarak hasta ve kontrol grubu arasında fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ) (**Tablo 4.4.**).

#### **4.3. *eNOS* geni intron 4a/b ve Ekzon 7 Glu298Asp polimorfik bölgelerinin genotip dağılımı ile aile hikayesi, sigara kullanımı, hipertansiyon ve diyabet parametrelerinin hasta grubunda karşılaştırılması**

*eNOS* geninin 4. intronundaki 4a/b polimorfizminin hasta grubundaki bireyler arasında karşılaştırılması yapıldığında, aile hikayesinde MI öyküsü olan bireylerin ab genotipine sahip olması ile ilişkili olduğu belirlendi (**p=0,018**) (**Tablo 4.5.**). Bununla birlikte sigara kullananlar ile ab genotip dağılımı arasında anlamlı ilişki olduğu belirlendi (**p=0,003**) (**Tablo 4.5.**). Hipertansiyon ve diyabet ile ilgili olarak intron 4a/b polimorfizmleri ile ilgili olarak hasta grubu bireyleri arasında fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ) (**Tablo 4.5.**).

*eNOS* enzimini kodlayan gen bölgesinin 7. ekzonundaki Glu298Asp polimorfizminin hasta grubundaki bireyler arasında karşılaştırılması yapıldığında diabetik bireylerde GT genotip sıklığının anlamlı olduğu belirlendi (**p=0,030**) (**Tablo 4.5.**). Aile hikayesi, sigara kullanımı ve hipertansiyon ile ilgili olarak ekzon 7 Glu298Asp polimorfizmi ile ilgili olarak hasta grubu bireyleri arasında fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ) (**Tablo 4.5.**).

#### **4.4. Hasta ve kontrol grubu bireylerinin *eNOS* geni intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp genotip dağılımları ile biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması**

Hasta grubu ve kontrol bireylerinin genotip dağılımları ile biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması sonucunda hem intron 4a/b hem de ekzon 7 Glu298Asp genotip dağılımları ile biyokimyasal parametreler arasında herhangi anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ) (**Tablo 4.4.**).

#### **4.5. Hasta grubunda *eNOS* geni intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp genotip dağılımları ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması**

Hasta grubunun hem intron 4 hem de ekzon 7 polimorfik bölgelerinin genotip dağılımları ile total kolesterol, trigliserit, HDL ve LDL seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiki açıdan fark olmadığı gözlemlendi ( $p>0,05$ ) (**Tablo 4.5.**)

**Tablo 4.4.** Hasta ve kontrol gruplarında intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp genotipleri ile diğer parametrelerin karşılaştırılması.

| MI risk Faktörleri ve Biyokimyasal Değerler |                  | Genotip Dağılımı                     |                    |                     |                                      |                    |                    |
|---|------------------|--------------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|
|   |                  | İntron 4a/b                          |                    |                     | Ekzon 7 Glu298Asp                    |                    |                    |
|   |                  | aa<br>n (%)                          | ab<br>n (%)        | bb<br>n (%)         | GG<br>n (%)                          | GT<br>n (%)        | TT<br>n (%)        |
| Aile Hikayesi                               | yok              | 5<br>(62,50)                         | 109<br>(85,80)     | 262<br>(76,40)      | 224 (78,60)                          | 127 (77,90)        | 25<br>(83,30)      |
|   | var              | 3<br>(37,50)                         | 18<br>(14,20)      | 81<br>(23,60)       | 61<br>(21,40)                        | 36<br>(22,10)      | 5<br>(16,70)       |
|   |                  | Ki-kare: 6,189 SD: 2 P: <b>0,045</b> |                    |                     | Ki-kare: ,445 SD: 2 P: 0,8           |                    |                    |
| Sigara Kullanımı                            | yok              | 4<br>(50,00)                         | 97<br>(76,40)      | 227<br>(66,20)      | 199 (69,80)                          | 109 (66,90)        | 20<br>(66,70)      |
|   | var              | 4<br>(50,00)                         | 30<br>(23,60)      | 116<br>(33,80)      | 86<br>(30,20)                        | 54<br>(33,10)      | 10<br>(33,30)      |
|   |                  | Ki-kare: 5,785 SD: 2 P: <b>0,055</b> |                    |                     | Ki-kare: 0,477 SD: 2 P: 0,788        |                    |                    |
| Hipertansiyon                               | yok              | 7<br>(87,50)                         | 74<br>(58,30)      | 219<br>(63,80)      | 179 (62,80)                          | 101 (62,00)        | 20<br>(66,70)      |
|   | var              | 1<br>(12,50)                         | 53<br>(41,70)      | 124<br>(36,20)      | 106 (37,20)                          | 62<br>(38,00)      | 10<br>(33,30)      |
|   |                  | Ki-kare: 3,366 SD: 2 P: 0,186        |                    |                     | Ki-kare: 0,240 SD: 2 P: 0,887        |                    |                    |
| Diabet                                      | yok              | 6<br>(75,00)                         | 102<br>(80,30)     | 278<br>(81,00)      | 219 (76,80)                          | 140 (85,90)        | 27<br>(90,00)      |
|   | var              | 2<br>(25,00)                         | 25<br>(19,70)      | 65<br>(19,00)       | 66<br>(23,20)                        | 23<br>(14,10)      | 3<br>(10,00)       |
|   |                  | Ki-kare: 0,205 SD: 2 P: 0,902        |                    |                     | Ki-kare: 7,222 SD: 2 P: <b>0,027</b> |                    |                    |
| Total kolesterol                            | Birey(n)         | 8                                    | 127                | 343                 | 285                                  | 163                | 30                 |
|   | ortalama<br>± SS | 173,63<br>± 48,638                   | 186,32<br>± 48,681 | 185,29<br>± 45,02   | 182,65<br>± 47,88                    | 188,65<br>± 42,396 | 193,43<br>± 46,04  |
|   |                  | F: 0,288 SD:2 p: 0,750               |                    |                     | F: 1,377 SD:2 p: 0,253               |                    |                    |
| Trigliserit                                 | Birey(n)         | 8                                    | 127                | 343                 | 285                                  | 163                | 30                 |
|   | ortalama<br>± SS | 106,5<br>± 53,176                    | 138,28<br>± 87,567 | 147,41<br>± 115,993 | 147,31<br>± 117,926                  | 144,39<br>± 98,665 | 115,23<br>± 42,446 |
|   |                  | F: 0,822 SD:2 p: 0,440               |                    |                     | F: 1,189 SD:2 p: 0,305               |                    |                    |
| HDL   | Birey(n)         | 8                                    | 127                | 343                 | 285                                  | 163                | 30                 |
|   | ortalama<br>± SS | 40,25<br>± 11,424                    | 43,52<br>± 11,946  | 41,79<br>± 13,634   | 41,85<br>± 11,608                    | 43,04<br>± 15,798  | 41,37<br>± 11,616  |
|   |                  | F: 0,887 SD:2 p: 0,412               |                    |                     | F: 0,493 SD:2 p: 0,611               |                    |                    |
| LDL   | Birey(n)         | 8                                    | 127                | 343                 | 285                                  | 163                | 30                 |
|   | ortalama<br>± SS | 111,75<br>± 42,651                   | 118,76<br>± 35,485 | 117,07<br>± 37,554  | 116,08<br>± 37,933                   | 118,16<br>± 35,534 | 126,61<br>± 35,929 |
|   |                  | F: 0,192 SD:2 p: 0,825               |                    |                     | F: 1,111 SD:2 p: 0,39                |                    |                    |

**Tablo 4.5.** Hasta grubunda intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp genotipleri ile diğer parametrelerin karşılaştırılması.

| MI risk Faktörleri ve Biyokimyasal Değerler |                  | Genotip Dağılımı                      |                   |                    |                                      |                   |                   |
|---|------------------|---------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|
|   |                  | İntron 4a/b                           |                   |                    | Ekzon 7 Glu298Asp                    |                   |                   |
|   |                  | aa<br>n (%)                           | ab<br>n (%)       | bb<br>n (%)        | GG<br>n (%)                          | GT<br>n (%)       | TT<br>n (%)       |
| Aile Hikayesi                               | yok              | 5<br>(62,50)                          | 81<br>(88,00)     | 165<br>(74,70)     | 148<br>(78,30)                       | 85<br>(75,90)     | 18<br>(90,00)     |
|   | var              | 3<br>(37,50)                          | 11<br>(12,00)     | 56<br>(25,30)      | 41<br>(21,70)                        | 27<br>(24,10)     | 2<br>(10,00)      |
|   |                  | Ki-kare: 8,008 SD: 2 P: <b>0,018</b>  |                   |                    | Ki-kare: 7,222 SD: 2 P: <b>0,027</b> |                   |                   |
| Sigara Kullanımı                            | yok              | 4<br>(50,00)                          | 75<br>(81,50)     | 139<br>(62,90)     | 135 (71,40)                          | 68<br>(60,70)     | 15<br>(75,00)     |
|   | var              | 4<br>(50,00)                          | 17<br>(18,50)     | 82<br>(37,10)      | 54<br>(28,60)                        | 44<br>(39,30)     | 5<br>(25,00)      |
|   |                  | Ki-kare: 11,550 SD: 2 P: <b>0,003</b> |                   |                    | Ki-kare: 4,196 SD: 2 P: 0,123        |                   |                   |
| Hipertansiyon                               | yok              | 7<br>(87,50)                          | 45<br>(48,90)     | 122<br>(55,20)     | 101 (53,40)                          | 60<br>(53,60)     | 13<br>(65,00)     |
|   | var              | 1<br>(12,50)                          | 47<br>(51,10)     | 99<br>(44,80)      | 88<br>(46,60)                        | 52<br>(46,40)     | 7<br>(35,00)      |
|   |                  | Ki-kare: 4,699 SD: 2 P: 0,095         |                   |                    | Ki-kare: 1,002 SD: 2 P: 0,606        |                   |                   |
| Diabet                                      | yok              | 6<br>(75,00)                          | 68<br>(73,90)     | 164<br>(74,20)     | 130 (68,80)                          | 91<br>(81,30)     | 17<br>(85,00)     |
|   | var              | 2<br>(25,00)                          | 24<br>(26,10)     | 57<br>(25,80)      | 59<br>(31,20)                        | 21<br>(18,80)     | 3<br>(15,00)      |
|   |                  | Ki-kare: 0,006 SD: 2 P: 0,997         |                   |                    | Ki-kare: 7,013 SD: 2 P: <b>0,03</b>  |                   |                   |
| Total kolesterol                            | Birey(n)         | 8                                     | 92                | 221                | 189                                  | 112               | 20                |
|   | ortalama<br>± SS | 173,63<br>±48,638                     | 181,5<br>±48,997  | 181,13<br>±46,293  | 178,65<br>±50,031                    | 184,27<br>±41,813 | 185,75<br>±45,655 |
|   |                  | F: 0,104 SD:2 p: 0,9                  |                   |                    | F: 0,608 SD:2 p:0,545                |                   |                   |
| Trigliserit                                 | Birey(n)         | 8                                     | 92                | 221                | 189                                  | 112               | 20                |
|   | ortalama<br>± SS | 106,5<br>±53,176                      | 130,51<br>±65,334 | 145,35<br>±128,991 | 146,37<br>±134,928                   | 134,62<br>±74,657 | 112,05<br>±35,886 |
|   |                  | F: 0,922 SD:2 p: 0,399                |                   |                    | F: 1,038 SD:2 p: 0,355               |                   |                   |
| HDL   | Birey(n)         | 8                                     | 92                | 221                | 189                                  | 112               | 20                |
|   | ortalama<br>± SS | 40,25<br>±11,424                      | 41,54<br>±9,955   | 40,32<br>±14,384   | 40,11<br>±11,141                     | 40,11<br>±11,141  | 39,55<br>±11,005  |
|   |                  | F: 0,282 SD:2 p: 0,754                |                   |                    | F: 0,662 SD:2 p: 0,517               |                   |                   |
| LDL   | Birey(n)         | 8                                     | 92                | 221                | 189                                  | 112               | 20                |
|   | ortalama<br>± SS | 111,75<br>±42,651                     | 116,59<br>±37,204 | 116,14<br>±39,714  | 114,92<br>±40,592                    | 117,55<br>±36,98  | 120,05<br>±34,947 |
|   |                  | F: 0,057 SD:2 p: 0,945                |                   |                    | F: 0,262 SD:2 p: 0,769               |                   |                   |

#### 4.6. Hasta grubunda birleştirilmiş genotipler ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

*eNOS* geni intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp polimorfik bölgelerinin genotipik yapılarının aynı bireyde bir araya gelme ihtimali göz önüne alınarak birleştirilmiş genotipler oluşturuldu (**Tablo 4.6.**). Bir bireyde intron 4 bölgesinde bb; ekzon 7 bölgesinde GG bulunması referans alınarak yapılan istatistiki değerlendirmede; bir bireyde aynı genotipe sahip olma (bb+GG, aa+GT, ab+GT, ab+TT) ve biyokimyasal değerler bakımından istatistik açıdan fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.6.** Hasta ve kontrol gruplarında intron 4a/b ve ekzon 7 Glu298Asp birleştirilmiş genotipleri ile diğer parametrelerin karşılaştırılması.

|                         | Grup   | Birey sayısı (n) | Ortalama | Standart sapma | Serbestlik Derecesi | F değeri | p değeri |
|-------------------------|--------|------------------|----------|----------------|---------------------|----------|----------|
| <b>Total kolesterol</b> | bb+GG  | 113              | 180,06   | 50,977         | 136                 | 0,678    | 0,567    |
|                         | aa+GT  | 1                | 185,00   | .              |                     |          |          |
|                         | ab+GT  | 22               | 193,64   | 48,564         |                     |          |          |
|                         | ab+TT  | 1                | 225,00   | .              |                     |          |          |
|                         | Toplam | 137              | 182,61   | 50,423         |                     |          |          |
| <b>Trigliserit</b>      | bb+GG  | 113              | 159,42   | 166,161        | 136                 | 0,218    | 0,884    |
|                         | aa+GT  | 1                | 94,00    | .              |                     |          |          |
|                         | ab+GT  | 22               | 133,95   | 77,553         |                     |          |          |
|                         | ab+TT  | 1                | 168,00   | .              |                     |          |          |
|                         | Toplam | 137              | 154,91   | 154,215        |                     |          |          |
| <b>HDL</b>              | bb+GG  | 113              | 39,80    | 11,805         | 136                 | 1,070    | 0,364    |
|                         | aa+GT  | 1                | 38,00    | .              |                     |          |          |
|                         | ab+GT  | 22               | 44,55    | 9,669          |                     |          |          |
|                         | ab+TT  | 1                | 42,00    | .              |                     |          |          |
|                         | Toplam | 137              | 40,56    | 11,503         |                     |          |          |
| <b>LDL</b>              | bb+GG  | 113              | 115,92   | 43,566         | 136                 | 0,725    | 0,539    |
|                         | aa+GT  | 1                | 128,00   | .              |                     |          |          |
|                         | ab+GT  | 22               | 126,95   | 41,733         |                     |          |          |
|                         | ab+TT  | 1                | 76,00    | .              |                     |          |          |
|                         | Toplam | 137              | 117,51   | 43,144         |                     |          |          |

## 5. TARTIŞMA

Halk arasında kalp krizi adıyla bilinen miyokard infarktüsü (MI), yüksek morbitide ve mortalitesi olan en önemli sağlık problemlerinden biridir (Bleumink ve ark 2005, Julian ve Norris 2002). Bugüne kadar yapılan etiyolojik çalışmalarda MI, ateroskleroz sebepler ile birlikte incelenmektedir. Güncel bulgular da değerlendirildiğinde ateroskleroz risk faktörlerinin yaklaşık %90 oranında MI için de risk faktörleri olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte aile hikayesi, ileri yaş, cinsiyetin erkek olması, sigara kullanımı, obezite, hiperkolesterolemi, koroner kalp hastalıkları ve hipertansiyon belli başlı MI sebepleri olarak belirtilmektedir (Boersma ve ark 2003, Jefferson ve Topol 2005). MI ile ilgili pek çok çalışma yapılmasına rağmen, kalp krizinin gelişimi ve patofizyolojisi ile ilgili mekanizmalar hala tam olarak bilinmemektedir.

Hücredeki metabolik olayların pek çoğunda görev alan moleküllerden birisi olan NO'nun kalp krizindeki rolünün belirlenmesi, hastalığın patogenezinde önemli yere sahiptir (Jones ve ark 2003, Barbato ve Tzeng 2004). NO'nun kardiyovasküler sistemde karıştığı farklı fonksiyonlar; vazomotor tonun düzenlenmesi, miyokardial kasılmanın modülasyonu, hücre proliferasyonun kontrolü ile platelet aktivasyon, adezyon ve agregasyonun inhibisyonu şeklinde özetlenebilir (Lowenstein ve ark 1994, Marin ve Rodriguez-Martínez 1997, Wang ve Wang 2000, Barbato ve Tzeng 2004). Bu molekülün kardiyovasküler sistemde sentezlenmesinden sorumlu olan eNOS enzimini kodlayan gen bölgesindeki polimorfizmlerin hastalık gelişiminde etkili olabileceği bildirilmiştir (Shimasaki ve ark 1998, Hingorani ve ark 1999, Wang ve Wang 2000, Colombo ve ark 2002, Colombo ve ark 2003, Lembo ve ark 2001, Fatini ve ark 2004, Gerritsen 2005, Puddu ve ark 2005).

Wang ve Wang (2000)'ın yaptıkları çalışmada, farklı etnik gruplarda vasküler hastalıklardaki *eNOS* gen polimorfizmlerini inceleyen çalışmaları derlemişler ve intron 4a/b polimorfizmi ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişkiyi inceleyen 11 çalışmadan beşinde ilişkili bulunurken altısında ilişki olmadığı rapor edilmiştir. Casas ve ark (2004)'nın yaptıkları *meta-analizde* homozigotluğu esas almışlar ve 26 araştırma makalesini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada intron 4a alleleline sahip olmanın %31 oranında iskemik kalp hastalıklarında risk artışına sebep olduğunu bildirmişlerdir. Fatini ve ark (2003) yaptıkları çalışmada 4. introndaki polimorfizm bakımından a/a genotipine sahip olmanın akut MI için bir yatkınlık faktörü olduğu rapor etmişlerdir. Kunnas ve ark (2002) orta yaş bireylerde MI hastalarında yaptıkları çalışmada 4. introndaki 4a/b polimorfizmi

incelendiğinde a alleleline sahip olan bireylerde daha az görüldüğünü rapor etmişlerdir. Buna karşın, Japon populasyonunda yapılan bir çalışmada ise intron 4a/b polimorfizmi incelendiğinde hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiki olarak fark bulunmadığı bildirilmiştir (Hibi ve ark 1998). Benzer şekilde, Lembo ve ark (2001) MI ve 4a/b polimorfizmi arasında ilişki olmadığını rapor etmişlerdir. Bu bulgular, diğer toplumlarda *eNOS* genin intron 4a/b ile MI arasında çelişkili sonuçlar olduğunu göstermektedir.

*eNOS* geninin intron 4a/b polimorfizmi ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalarda Çine ve ark (2002) 207 MI hastası ve 306 kontrol bireyine ait örnekleri kullandıkları çalışmada, intron 4a/b genotiplendirmesinde aa genotipinin MI hasta grubunda kontrollere göre daha yüksek oranda olduğunu bildirmişlerdir. Matvar ve ark (2005) Akdeniz bölgemizde 266 koroner arter hastasında intron 4a/b polimorfizmini incelemişler ve a alleleline sahip olmanın risk faktörü olabileceğini bildirmişlerdir. Buna karşılık, Olcay ve ark (2006) 110 hipertansiyonlu hastada intron 4a/b polimorfizmini incelemişler ancak istatistiki bir anlamlılık olmadığını rapor etmişlerdir ( $\chi^2=4,59$ ,  $p=0,10$ ).

Mevcut çalışmamızda ise 321 MI hastası ve 157 kontrol grubuna ait PZR analizlerine göre MI hastalarının *eNOS* geninin intron 4a/b polimorfizmi bakımından 221'nin (%68,847) bb homozigot, 92'sinin (%28,660) ab heterozigot, ve 8'nin (%2,493) aa homozigot genotipe sahip olduğu, kontrol grubu bireylerinin ise 112'sinin (%77,707) bb, 35'inin (%22,293) ab genotipine sahip olduğu ve aa genotipinin bulunmadığı tespit edildi. Yapılan ki-kare analizine göre hasta grubunda aa genotip sıklığının kontrollere göre daha yüksek olduğu belirlendi ( $\chi^2= 6,575$ ,  $p=0,036$ ). Allel frekansları hasta grubunda b alleli için %83,177, a alleli için %16,823; kontrol grubunda b alleli için %88,854, a alleli için %11,146 olduğu tespit edildi.

En yaygın görülen *eNOS* genindeki polimorfik bölgelerden bir diğeri ise, ekzon 7 Glu298Asp polimorfizmidir. Bu polimorfizm ile ilgili farklı populasyonlarda çalışmalar yapılmıştır. Hibi ve ark (1998)'nin yaptıkları çalışma MI için Glu298Asp polimorfizminin risk oluşturduğunu belirten ilk çalışmadır. Bu araştırmacıların çalışmasında Glu-Asp298 genotipinin MI hastalığına yatkınlıkla ilgili olabileceği bildirilmişler ve TT homozigot olanların sıklığının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı şekilde Shimasaki ve ark (1998) ise Japon toplumunda Glu298Asp polimorfizminin MI için bağımsız bir risk faktörü olduğunu ve T allelinin görülme sıklığının hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Wang ve Wang (2000)'ın yaptıkları

derlemede ekzon 7'deki farklı polimorfik bölgeler ile yapılan çalışmaların üçünde polimorfik genotip dağılımı ile MI arasında ilişki bulunduğu rapor edilmiştir. Çevresel etkenlerin önemine vurgu yapılan bu çalışmada sigara kullanımını etkisinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Casas ve ark (2004)'nın homozigotluğu esas aldıkları ve 26 araştırma makalesini değerlendirdikleri çalışmada, ekzon 7 298Asp alleleline sahip olmanın %34 oranında iskemik kalp hastalıklarında risk artışına sebep olduğunu bildirilmişlerdir. Hingorani ve ark (1999) İngiliz toplumunda hasta ve kontrol grubunda koroner arter hastalıklarla 7. ekzondaki Glu298Asp polimorfizmi ilişkisini incelemişler ve iki grup olarak aldıkları hasta gruplarından *eNOS* genindeki Glu298Asp değişiminin koroner arter hastalıkları riski bakımından güçlü bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda TT genotipine sahip bireyleri GG homozigot bireylere oranla istatistiki olarak 4 kat daha fazla daha riske sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Lembo ve ark (2001)'nin yaptıkları çalışmada, 7. ekzondaki G-T baz değişimi ile ortaya çıkan Glu>Asp amino asit değişiminin karotid arterdeki aterosklerotik plak oluşumu ile ilişkili olduğunu ve bu polimorfizmin MI için risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir. Colombo ve ark (2003), İtalyan popülasyonunda koroner arter hastalıklarında 7. ekzondaki Glu298Asp polimorfizm ilişkisini inceledikleri çalışmada Glu298Asp polimorfizminin koroner arter hastalarda anlamlı olarak ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Antoniadis ve ark (2005) 228 MI hastası ve 519 kontrol bireyinden oluşan çalışma grubunda yaptıkları çalışmada TT genotipine sahip hasta grubunda (%14) kontrol grubu (%9.1)'na göre anlamlı olarak farklı olduğunu bildirmişlerdir. Antoniadis ve ark (2006)'nın yaptıkları çalışmada erken yaşlarda MI geçirmiş bireylerde ekzon 7 Glu298Asp değişimi ve çeşitli serum değerlerini incelenmiş; ekzon 7 Glu298Asp değişiminin MI gelişiminde etken olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşılık, Cai ve ark (1999) beyaz Avustralyalı bireylerde yaptıkları çalışmada MI, koroner arter hastalıkları ve Glu298Asp polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır.

Ülkemizdeki Glu298Asp baz değişim polimorfizmi ile ilgili çalışmalarda Afrasyap ve Öztürk (2004) 250 koroner arter hastasında yaptıkları çalışmada NO seviyeleri ve 7. ekzondaki Glu298Asp polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarında herhangi bir anlamlılık olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Berdeli ve ark (2005) 115 premature koroner arter hastalığı olan bireyde *eNOS* geninin Glu298Asp baz değişim polimorfizmi bakımından incelendiğinde hasta ve kontrol grubu bireyleri arasında anlamlı fark olmadığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda 321 MI hastası ve 157 sağlıklı kontrol bireyinde yapılan PZR-RFLP analiz sonuçlarına göre, *eNOS* geni Glu298Asp baz değişim polimorfizmi bakımından MI hastalarının 189'unun (%58,879) GG homozigot, 112'sinin (%34,891) GT heterozigot, ve 20'sinin (%6,230) TT homozigot genotipe sahip olduğu, kontrol grubu bireylerinin ise 96'sının (%61,146) GG, 51'inin (%32,485) GT ve 10'nun (%6,369) TT genotipine sahip olduğu tespit edildi Yapılan ki-kare analizinde ise hasta grubu ile kontrol grubu arasında *eNOS* geni 7.ekzondaki Glu298Asp polimorfizmi için genotip dağılımı ve allel frekansı bakımından fark olmadığı tespit edildi ( $P>0,05$ ). Mevcut gen bölgesindeki allel frekansları hasta grubunda G alleli için %76,324, T alleli için %23,676; kontrol grubunda G alleli için %77,389, T alleli için %22,611 olarak belirlendi.

Hibi ve ark (1998)'nin yaptıkları çalışmada kolesterol ve HDL değerlerinin hasta grubunda daha yüksek değerlerde olduğunu, aynı zamanda diyabetik ve hipertansif bireylerde, bunlarla birlikte sigara kullanan bireylerin hasta grubunda kontrollere göre daha yüksek oranda olduğunu rapor etmişlerdir. Shimasaki ve ark (1998) nin çalışmasında hipertansiyon, cinsiyet, diyabet, kolesterol yüksekliği ve sigara kullanımının önemli derecede etken olduğu bildirilmiştir. Colombo ve ark (2003) koroner arter hastalıklarında İtalyan populasyonunda hasta ve kontrol grubunda gerçekleştirdikleri çalışmada aterojenik risk faktörleri olarak yaş, cinsiyet, diyabet, sigara kullanımı ve aile hikayesinin hasta grubunda kontrollere göre daha yüksek oranda görüldüğünü tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Berdeli ve ark (2005) risk faktörlerinin hasta bireylerde kontrollere göre farklı olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarından elde edilen biyokimyasal parametreler t-testi ile değerlendirildi. Hasta grubunda total kolesterol ( $p=0,003$ ) ve HDL ( $p=0,000$ ) seviyelerini kontrol grubuna göre daha yüksek bulunduğu diğer parametreler bakımından hasta ve kontrol grubu arasında fark görülmediği belirlendi. Elde edilen bulguların literatür ile uyumlu olduğu gözlemlendi

İntron 4a/b genotip dağılımı ile MI için risk faktörlerinin karşılaştırmalarının yapıldığı Hibi ve ark (1998) çalışmasında intron 4a/b polimorfizmi ile sigara kullanımı, diyabet, hipertansiyon, biyokimyasal parametreler gibi risk faktörleri arasında fark olmadığını bildirilmiştir.

Colombo ve ark (2003) ekzon 7 Glu298Asp polimorfizmi genotip dağılımı ile hipertansiyon, diyabet ve aile hikayesi arasında ilişki olmadığını rapor etmişlerdir. Buna

karşılık, Antoniadou ve ark (2005) Glu298Asp polimorfizmi ile ilgili çalışmalarında yaş, cinsiyet, aile hikayesi ve sigara kullanımı, biyokimyasal değerler ile TT genotipine sahip olma arasında ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Hibi ve ark (1998) ekzon 7 Glu298Asp polimorfizmi ile risk faktörleri arasında fark olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde ülkemizden Olcay ve ark (2006) yaptıkları çalışmada da fark olmadığı rapor edilmiştir.

Mevcut çalışmamızda ise hasta ve kontrol grubunda aile hikayesinde MI hikayesi olan bireylerde ( $p=0,045$ ) ve sigara kullananlarda ( $p=0,055$ ) ab genotipine sahip olma durumunun daha düşük oranda oldukları aynı zamanda diyabetik bireylerde GG genotip dağılımının daha yüksek olduğu ve aralarında anlamlı ilişki olduğu belirlendi ( $p=0,027$ ).

Yoon ve ark (2000) nın plazma NO seviyesi *eNOS* gen polimorfizmlerinin arasındaki ilişkinin koroner arter hastalıklarındaki durumu ile ilgili yaptıkları çalışmada ise intron 4a/b ve Glu298Asp değişimlerini incelemişlerdir. Çalışmada koroner arter hastalığı olan bireyler hipertansif ve normotansif olarak iki grupta incelenmiş ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırmışlar ve NO plazma seviyeleri koroner arter hastalığı olan bireylerde kontrollere göre daha yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir. Ayrıca koroner arter hastalarında G allelinin kontrollere oranla daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir ( $p=0,002$ ). Genotip dağılımları ile NO seviyeleri karşılaştırıldığında ise iki polimorfik bölge bakımından da istatistiki fark gözlemlenmiştir.

Bu çalışmalar dışında sağlıklı bireylerden oluşan gruplardaki NO seviyeleri ve *eNOS* gen polimorfizmleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Srivastava ve ark (2005) tarafından yapılan çalışmada Hindistanlı bireylerde Glu298Asp polimorfizmi ile NO seviyeleri arasında ilişki olmadığı bildirilmiştir. Buna karşılık, Metzger ve ark (2005) ise Brezilyalı sağlıklı bireylerde NO seviyeleri ve *eNOS* gen polimorfizmi arasında ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Literatürdeki *eNOS* gen polimorfizmi ve NO seviyesi arasındaki ilişkiyi inceleyen bu araştırmalarda da benzerlik bulunmamaktadır. Bu durum; coğrafik farklılık, çevresel faktörler veyahut NO analizinde kullanılan yöntemlerdeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Çünkü NO'nun yarı ömrü oldukça kısa bir moleküldür.

Literatürdeki ve mevcut çalışmadaki bu bilgiler ışığında MI gelişiminde *eNOS* geninde bulunan polimorfizmlerin etkili olduğuna dair çalışmaların yanı sıra etkili olmadığını savunan çalışmalar da bulunmaktadır. Bununla birlikte *eNOS* enzimi arteriyal duvarların fizyolojik entegrasyonu için önemli bir enzim olduğu (Napoli ve Ignarro 2001) ve aterosklerozun patolojik gelişiminde etkili olduğu bilinmekle birlikte çevresel

faktörlerin de etkili olduğu vurgulanmaktadır (Lowenstein ve ark 1994, Lucas ve ark 2000, Napoli ve Ignarro 2001). Bu nedenle, literatürdeki polimorfik genotip dağılımı ve hastalık ve biyokimyasal değerler arasındaki bu çelişkili bulgular, bu genlerin her birinin tek başına fonksiyonel olmasından ziyade farklı genlerin ve çevresel faktörlerin de bu etkiye katılabileceği fikrini vermektedir. Bu nedenle, bu polimorfik bölgelerin fonksiyonel etkilerini ortaya koymak için daha homojen hasta gruplarında çalışılıp polimorfik bölgelerin fonksiyonlarını belirleme çalışmaları yapılması gerekmektedir.

## 6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA 2007

Ramazan ÇELİK

### **Endotelial Nitrik Oksid Sentaz (*eNOS*) Gen Polimorfizmi ile Miyokard İnfarktüs (MI) İlişkisinin İncelenmesi**

Miyokard İnfarktüs (MI) dünyada en sık görülen ve ölümlerle sonuçlanan hastalıkların başında gelmektedir. Bu hastalığın ortaya çıkmasında çevresel faktörlerin ve hücre seviyesinde meydana gelen metabolik olayların etkisinin olabileceği öne sürülmüş ve bununla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Nitrik oksid (NO) birçok reaksiyonda yer alan bir moleküldür. NO üç izoformu olan nitrik oksid sentaz (NOS)'lar tarafından sentezlenir. Bu izoformlardan endotel hücrelerden konstitüf olarak sentezlenen formu olan endotelial NOS (eNOS) enzimi kardiyovasküler sistemde önemli rollere sahiptir. eNOS enzimini kodlayan gen bölgesinde çeşitli polimorfizmler tespit edilmiştir. Çalışmamızda *eNOS* geninin 4. introndaki 4a/b VNTR değişimi ve 7. ekzondaki Glu298Asp değişimine sebep olan tek baz değişim polimorfizmlerinin MI ile ilişkisini; aile hikayesi, sigara kullanımı, diyabet, hipertansiyon durumları ile HDL, LDL, trigliserit ve kolesterol seviyeleri ile karşılaştırarak vaka-kontrol çalışması ile ortaya koymayı hedeflendi. 321 MI hastası ve 157 sağlıklı kontrol bireyinden alınan periferik venöz kan örnekleri PZR ve PZR-RFLP çalışmalarında ve biyokimyasal parametreleri belirlenmesinde kullanıldı. *eNOS* geni intron 4a/b genotip dağılımları karşılaştırıldığında hasta grubunda aa genotip sıklığının kontrollere göre daha yüksek olduğu belirlendi ( $\chi^2=6,65$ ,  $p=0,036$ ). Buna karşılık, 7. ekzondaki Glu298Asp polimorfizmi için genotip dağılımı ve allel frekansı bakımından fark olmadığı tespit edildi ( $\chi^2=0,273$ ,  $p=0,872$ ). Hasta ve kontrol grubunda ailesinde MI hikayesi olan bireylerde ( $p=0,045$ ) ve sigara kullananlarda ( $p=0,055$ ) istatistiki açıdan anlamlı fark gözlenmiş olup, ab genotipine sahip olma durumunun daha düşük oranda oldukları belirlendi. Diyabetik bireylerde GG genotip dağılımının daha yüksek olduğu belirlendi ( $p=0,027$ ). Hasta grubunda total kolesterol ( $p=0,003$ ) ve HDL ( $p=0,000$ ) seviyelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek bulunduğu diğer parametreler bakımından hasta ve kontrol grubu arasında fark bulunmadığı tespit edildi. Genotip dağılımları ile biyokimyasal parametreler karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmedi. MI gelişiminde *eNOS* genindeki polimorfizmlerin etkili olabileceği veya risk faktörü oluşturabileceği görülmektedir. *eNOS* genindeki fonksiyonel DNA varyantlarının *eNOS* gen ekspresyonunu ve enzim aktivitesini değiştirip değiştirmediği ve buna çevresel faktörlerin etkisinin belirlenmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

## 7. SUMMARY

Selcuk University  
Health Science Institute  
Department of Medical Genetics

Master thesis / KONYA 2007

Ramazan ÇELİK

### **Analysis of Relation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (*eNOS*) Gene Polymorphism with Myocardial Infarction (MI)**

Myocardial Infarction (MI) is the one of the most common and cause of death on the worldwide. A number of investigations showed that the enviromental factors and intracellular metabolic events effect arising of this disease. Nitric oxide (NO) is one of molecules that plays several reactions in the metabolic pathways. NO is synthesised by nitric oxide synthases (NOS)s that have three isoforms. Endothelial NOS (eNOS) which constitutively synthesized from endothelial cells has important roles in the cardiovascular system. Various polymorphisms were indentified in the gene region that on coding and non-coding *eNOS* gene. In the present study, we aimed to carry out MI risk factors of the frequencies of the intron 4a/b VNTR polymorphism and missense Glu298Asp variant by comparing the results from the patient group to the control group. Also, the other parameters were evaluated, including family history, hypertension, diabetes mellitus, smoking, and lipid levels (total cholesterol, triglycerides, low-density lipoprotein, high-density lipoprotein) between the MI patients and the control groups by a case-control study. DNA was extracted from peripheral blood for PCR and PCR-RFLP analysis. The peripheral blood was collected from 321 patients with MI and 127 healthy controls for biochemical parameters. When compared the *eNOS* gene intron 4a/b genotype frequencies; aa genotype was significantly higher in MI patients than in the controls ( $\chi^2=6,65$ ,  $p=0,036$ ). However we did not find any significant differences between MI and Glu298Asp polymorphism and allele frequencies in patients and control group ( $\chi^2=0,273$ ,  $p=0,872$ ). In MI patients and control groups, there were an association between ab genotypes and the family history of MI ( $p=0,045$ ) and smoking habits ( $p=0,055$ ). GG genotype distribution was found higher in diabetic patients than in controls ( $p=0,027$ ). In MI patients, the total cholesterol ( $p=0,003$ ) and HDL ( $p=0,000$ ) levels were higher than in controls. However, there were no significant differences between genotype frequencies of patient group and biochemical parameters. In the development of MI, *eNOS* gene polymorphisms may be effective or recognized as a risk factors. Functional DNA variants in the eNOS gene can lead to changes in eNOS expression and enzyme activity, and this situation may be effected by the paralel with environmental factors. Therefore the further study will be needed to carry out the interactions of genetics and environmental factors.

## 8. LİTERATÜR LİSTESİ

- Afrasyap L and Ozturk G (2004)** *NO level and endothelial NO synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in the patients with coronary artery disease from the Turkish population*, Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 36(10):661-666
- Alderton WK, Cooper CE and Knowles RG (2001)** *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*, Biochem J., 1;357(Pt 3):593-615.
- Alpert JS, Thygesen K, Antman E and Bassand JP (2000)**. *Myocardial infarction redefined—a consensus document of the joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 36:959– 969.
- Andrew PJ and Mayer B (1999)** *Enzymatic function of nitric oxide synthases*, Cardiovasc Res., 15;43(3):521-531.
- Andries LJ, Brutsaert DL and Sys SU (1998)** *Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium*, Circ Res., 9;82(2):195-203.
- Antoniades C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Pitsavos C, Chrysochoou C, Panagiotakos D et al (2005)** *Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction*, J Am Coll Cardiol., 20;46(6):1101-1109.
- Antoniades C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Pitsavos C, Toutouza M, Tentolouris C et al (2006)** *Genetic polymorphisms G894T on the eNOS gene is associated with endothelial function and vWF levels in premature myocardial infarction survivors*, Int J Cardiol., 8;107(1):95-100.
- Barbato JE and Tzeng E (2004)** *Nitric oxide and arterial disease*, J Vasc Surg., 40(1):187-193.
- Berdeli A, Sekuri C, Sirri Cam F, Ercan E, Sagcan A, Tengiz I et al (2005)** *Association between the eNOS (Glu298Asp) and the RAS genes polymorphisms and premature coronary artery disease in a Turkish population*, Clin Chim Acta., 351(1-2):87-94
- Bleumink GS, Schut AF, Sturkenboom MC, Deckers JW, van Duijn CM, and Stricker BH (2004)** *Genetic polymorphisms and heart failure*, Genet Med., 6(6):465-474.

- Boersma E, Mercado N, Poldermans D, Gardien M, Vos J, and Simoons ML (2003)** *Acute myocardial infarction*, Lancet., 8;361(9360):847-858.
- Bogdan C (2001)** *Nitric oxide and the regulation of gene expression*, Trends Cell Biol., 11(2):66-75
- Broeckel U, Hengstenberg C, Mayer B, Holmer S, Martin LJ, Comuzzie AG et al (2002)** *A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors*, Nat Genet., 30(2):210-214.
- Cai H, Wilcken DE and Wang XL (1999)** *The Glu-298-->Asp (894G-->T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease*, J Mol Med., 77(6):511-514.
- Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, and Hingorani AD(2004)** *Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects*, Circulation, 23;109(11):1359-1365.
- Chan Y, Fish EJ, D'Abreo C, Lin S et al (2004)** *The Cell-specific Expression of Endothelial Nitric-oxide Synthase a role for DNA methylation*, The Journal of Biological Chemistry, 279 (33) 35087–35100.
- Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S et al (2002)** *Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease*, Heart, 87(6):525-528.
- Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, and Masetti S (2003)** *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease*, Clin Chem., 49(3):389-395.
- Çine N, Hatemi AC and Erginel-Unaltuna N (2002)** *Association of a polymorphism of the ecNOS gene with myocardial infarction in a subgroup of Turkish MI patients*, Clin Genet, 61: 66–70
- Doevendans PA, Jukema W, Spiering W, Defesche JC and Kastelein JJ (2001)** *Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis*, Int J Cardiol., 80(2-3):161-172.
- Fatini C, Sofi F, Gensini F, Sticchi E et al (2004)**. *Influence of eNOS gene polymorphism on carotid atherosclerosis*, Eur J Vasc Endovasc Surg 2004; 27: 540–544.

- Ferguson JL, Beckett GJ, Stoddart M, Walker SW, Fox KA (2002)** *Myocardial infarction redefined: the new ACC/ESC definition, based on cardiac troponin, increases the apparent incidence of infarction*, Heart., 88(4):343-347.
- Gelehrter TD, Collins FS and Ginsburg D (1998)** *Principles of Medical Genetics*, 2nd ed., pp 43-61, Williams&Wilkins, the USA.
- Geller DA and Billiar TR (1998)** *Molecular biology of nitric oxide synthases*, Cancer Metastasis Rev, 17(1):7-23.
- Gerritsen ME (2005)** *Genetic variations in vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase and their contributions to human disease*, Microcirculation, 12(1):129-140.
- Gök H (2002)** “Akut miyokard infarktüsü”, Klinik Kardiyoloji, pp 273-277, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T et al (1998)** *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction*, Hypertension, 32(3):521-526.
- Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A et al (1999)** *A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK*, Circulation, 5;100(14):1515-1520.
- Housman D (1995)** *Molecular Medicine Human DNA Polymorphism*, The New England Journal of Medicine, 332(5):318-320.
- Hunter DJ (2005)** *Gene–environment interactions in human diseases*, Nature reviews, 6:287-298
- Jefferson BK and Topol EJ (2005)** *Molecular mechanisms of myocardial infarction*, Curr Probl Cardiol., 30(7):333-374.
- Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM and Newby AC (1999)** *Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells*, Cardiovasc Res., 15;43(3):580-594.
- Jones SP, Greer JJ, van Haperen R, Duncker DJ, de Crom R, Lefer DJ (2003)** *Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice*, Proc Natl Acad Sci USA, 15;100(8):4891-4896.

- Julian DG and Norris RM (2002)** *Myocardial infarction: is evidence-based medicine the best?*, Lancet, 27;359(9316):1515-1516.
- Kunnas TA, Ilveskoski E, Niskakangas T, Laippala P, Kajander OA, Mikkelsen J et al (2002)** *Association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with risk of coronary artery disease and myocardial infarction in middle-aged men*, J Mol Med., 80(9):605-609
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T (1992)** *Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform*, Proc Natl Acad Sci USA, 15;89(14):6348-6352.
- Lembo G, De Luca N, Battagli C, Iovino G, Aretini A, Musicco M et al (2001)** *A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis*, Stroke, 32(3):735-740.
- Li H and Förstermann U (2000)** *Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease*, J Pathol, 190: 244-254.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL and Snyder SH (1994)** *Nitric Oxide: A Physiologic Messenger*, Ann Intern Med,120:227-237
- Lucas L, Soriano FG and Szabó C (2000)** *Biology of nitric oxide signaling*, Crit Care Med., 28(4 Suppl):N37-N52.
- Lusis AJ (2003)** *Genetic factors in cardiovascular disease. 10 questions*, Trends Cardiovasc Med., 13(8):309-316
- Marin J and Rodríguez-Martínez MA (1997)** *Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions*, Pharmacol Ther., 75(2):111-134.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM et al (1993)** *Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene*, J Biol Chem., 15;268(23):17478-17488.
- Matvar S, Attila G, Acartürk E, Akpınar O, İnal T (2005) (abstract)** *eNOS gene intron 4a/b VNTR polymorphism is a risk faktor for coronary artery disease in Southern Turkey*, Clin Chim Acta, 354 (1-2) 153-158

- Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagasaki S et al (2005)** *Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men*, Pharmacogenetics and Genomics, 15;565-570.
- Napoli C and Ignarro LJ (2001)** *Nitric oxide and atherosclerosis*, Nitric Oxide., 5(2):88-97.
- Nordlie MA, Wold LE and Kloner RA (2005)** *Genetic contributors toward increased risk for ischemic heart disease*, J Mol Cell Cardiol., 39(4):667-679.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF and Boerkoel CF (2005)** “*İnsanlarda Genetik Varyasyon: Mutasyon ve Polimorfizm*”, Thompson & Thompson Tıbbi Genetik, 6. Baskı, pp 79-89, Güneş Kitabevi, İstanbul.
- Olcay A, Ekmekci CG, Ozbek U, Sezer M, Barcin C, Arslan E et al (2006)** *Negative association of endothelial nitric oxide gene polymorphism with hypertension in Turkish patients: effect of eNOS polymorphism on left ventricular hypertrophy*, Cardiovasc Ultrasound., 21;4:33
- Özdemir B and Cordan J (2005)** “*Akut miyokard infarktüsü*”, Kardiyoloji, Ed. Cordan L et al, pp 295-299, Uludağ Üvn. Basımevi, Bursa.
- Öztaş S, Gül D, Tatar A (2005)** *İnsan Genomu: Genler ve DNA*, Türkiye Klinikleri J PEDIATR SCI, 1(2):18-23.
- Puddu P, Cravero E, Puddu GM and Muscari A (2005)** *Genes and atherosclerosis: at the origin of the predisposition*, Int J Clin Pract. 59(4):462-472.
- Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Vauhkonen I, Laakso M (2000)** *Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease*, J Mol Med., 78(7):372-379.
- Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H et al (1998)** *Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction*, J Am Coll Cardiol., 31(7):1506-1510.
- Sonel A (2003)** “*Miyokard infarktüsü*”, Kardiyoloji, pp 558-552, Semih Ofset, Ankara.

- Srivastava K, Biswas UK, Narang R, Varghese JJ, Das N (2005)** *Prevalence of eNOS Glu298Asp polymorphism in healthy volunteers from a region of Northern India, Community Genet., 8(3):180-183.*
- Stuehr DJ (1999)** *Mammalian nitric oxide synthases, Biochimica et Biophysica Acta, 1411; 217-230.*
- Tai SC, Robb GB and Marsden PA (2004)** *Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel, Arterioscler Thromb Vasc Biol., 24(3):405-412.*
- Tanus-Santos JE, Desai M and Flockhart DA (2001)** *Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants, Pharmacogenetics, 11(8):719-725.*
- Wang Q (2005)** *Molecular genetics of coronary artery disease. Curr Opin Cardiol., 20(3):182-188.*
- Wang XL and Wang J (2000)** *Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Sequence Variations and Vascular Disease, Molecular Genetics and Metabolism 70, 241–251.*
- Yoon Y, Song J, Hong SH and Kim JQ (2000)** *Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease, Clin Chem., 46(10):1626-1630.*

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Konya'nın değişik ilçelerinde tamamladı. 2001 yılında S.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenciliği devam etmektedir.

## 10. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen, tezimin değerlendirilmesinde yardımcı olan sayın Doç. Dr. Tülin ÇORA'ya tezimin deney materyalinin toplanmasında ve gerekli bilgilerin temininde yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Mehmet TOKAÇ'a, istatistiksel analizler yapılmasında yardımcı olan sayın Prof. Dr. Said BODUR'a, ayrıca tüm tahsil hayatım boyunca maddi ve manevi katkılarıyla bana her zaman destek olan aileme, en içten teşekkürlerimi sunarım.