

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**KORONER ARTER HASTALIĞI OLGULARINDA VASKÜLER
ENDOTELYAL GROWTH FAKTÖR (VEGF) POLİMORFİZMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dr. Aylin SOYAĞIR

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Meral TORUN

ANKARA
Şubat 2014

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**KORONER ARTER HASTALIĞI OLGULARINDA VASKÜLER
ENDOTELYAL GROWTH FAKTÖR (VEGF) POLİMORFİZMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dr. Aylin SOYAĞIR

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Meral TORUN

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
02/2011-43 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Şubat 2014

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Biyokimya Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : .././2014

**Prof.Dr. Bolkan ŞİMŞEK
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**

**Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi**

**Ünvanı Adı ve Soyadı
Hacettepe Üniversitesi**

**Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi**

**Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller ve Grafikler	v
Tablolar	vii
Semboller, Kısaltmalar	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Koroner Arter Hastalığı	4
2.1.1. Tanım	4
2.1.2. Epidemiyoloji	4
2.1.3. Koroner Arter Hastalığı Patogenezi	5
2.2. Koroner Arter Hastalığının Patogenezinde Rol Oynayan Faktörler	8
2.2.1. Koroner Arter Hastalığı ve Hipertansiyon	9
2.2.2. Koroner Arter Hastalığı ve Sigara	9
2.2.3. Koroner Arter Hastalığı ve Diyabet	10
2.2.4. Koroner Arter Hastalığı ve Sedanter Yaşam	10
2.2.5. Koroner Arter Hastalığı ve Obezite	11
2.2.6. Koroner Arter Hastalığı ile Yaş, Cinsiyet, Kişilik Yapısı ve Aile Öyküsü	11
2.2.7. Koroner Arter Hastalığı ve Oksidatif Stres	12
2.2.8. Koroner Arter Hastalığı ve Homosistein Artışı	18
2.2.9. Koroner Arter Hastalığı ve Hiperlipidemi	19
2.2.10. Koroner Arter Hastalığı ve Bozulmuş Fibrinolizis	21
2.2.11. Koroner Arter Hastalığı ve ADMA (Asimetrik Dimetilarjinin)	22
2.2.12. Koroner Arter Hastalığı ve Lipoprotein (a)	23
2.3. Koroner Arterlerin Anatomisi	24
2.4. Koroner Anjiyografi	25
2.5. VEGF ve Anjiogenez	25
2.6. Koroner Arter Hastalığı ve VEGF Gen Polimorfizmi	28

2.7. Koroner Arter Hastalığı ve Diğer Kimyasal Mediyatörler	31
2.7.1. Nitrik oksit (NO)	31
2.7.2. Neuregulin (NRG)	32
2.7.3. Paraoksonaz (PON 1)	33
2.7.4. Okside LDL	34
2.7.5. Total Antioksidan Kapasite (TAK)	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Araç ve Gereçler	36
3.2. Hasta ve Kontrol Grubunun Nitelikleri	38
3.2.1. Hasta Dışlanma Kriterleri	38
3.3. Genel Değerlendirme ve Ölçümler	39
3.4. Kan Örneklerinin Toplanması	40
3.5. Kullanılan Yöntemler	40
3.5.1. Kandan DNA İzolasyonu	40
3.5.1.1. Deneysel Prosedür	40
3.5.1.2. İzole Edilen DNA'ların PCR Öncesi Agaroza Jel Elektrophorezi İle Kontrol Amaçlı Görüntülenmesi	43
3.5.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	43
3.5.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gereken Bileşenler	44
3.5.2.2. PCR Amplifikasyon Döngüsü	45
3.5.2.3. PCR için Agaroza Jel Elektrophorezi (İzole Edilen DNA'ların PCR için) ve Uygulama	47
3.5.3. Dna'nın Restriksiyon Enzimleri İle Kesilmesi	48
3.5.4. VEGF Gen Bölgesi Ve Restriksiyon Enzimi	48
3.5.5. Pcr Sonrası Enzim Restriksiyonu İçin Gerekli Malzemeler	48
3.5.5.1. Pcr Programı	49
3.5.5.2. Enzim Kesim Sonuçları	49
3.5.6. VEGF Tayini	51
3.5.6.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	52
3.5.6.2. Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği	52
3.5.7. sNeuregulin1-β1 Tayini	53

3.5.7.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	54
3.5.7.2. Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği	55
3.5.8. Okside LDL Tayini	55
3.5.8.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	56
3.5.8.2. Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği	56
3.5.9. Nitrik Oksit Tayini	57
3.5.9.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	58
3.5.9.2. Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği	60
3.5.10. Paraoksonaz Tayini	60
3.5.10.1.Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği	61
3.5.11. TAK Tayini	61
3.5.11.1. Örneğin Hazırlanması	62
3.5.11.2. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	63
3.5.11.3.Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği	63
3.5.12. Diğer Parametrelerin Tayini	64
3.6. Kullanılan İstatiksel Yöntemler	65
4. BULGULAR	66
5. TARTIŞMA	87
6. SONUÇ	102
7. ÖZET	104
8. SUMMARY	106
9. KAYNAKLAR	108
10. EKLER	127
10.1. Etik Kurul İzni	127
10.2. Teşekkür	129
11. ÖZGEÇMİŞ	130

ŞEKİLLER

Şekil 1. Arter Yapısı	5
Şekil 2. Endotel Disfonksiyonu	7
Şekil 3. Ateroskleroz Gelişimi	7
Şekil 4. Ateroskleroz için Risk Faktörleri	8
Şekil 5. Glutasyon Sentezi ve Siklusu	17
Şekil 6. Aterosklerozda ADMA	23
Şekil 7. Koroner Arterlerin Anatomisi	24
Şekil 8. Koroner Anjiyografi	25
Şekil 9. DNA İzolasyonu	42
Şekil 10. PCR Amplifikasyon Döngüsü	46
Şekil 11. İlk 18 Örneğin PCR ve Kesim Sonrası Görüntüsü	50

GRAFİKLER

Grafik 1. VEGF Kalibrasyon Grafiği	52
Grafik 2. Sneuregulin1-B1 Kalibrasyon Grafiği	54
Grafik 3. Okside LDL Kalibrasyon Grafiği	57
Grafik 4. Nitrik Oksit Kalibrasyon Grafiği	59
Grafik 5. TAK Kalibrasyon Grafiği	64

TABLÖLAR

Tablo 1. Hasta ve kontrol için anket formu	39
Tablo 2. VEGF 2578C/A polimorfizm primerleri	45
Tablo 3. VEGF standartlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri	51
Tablo 4. VEGF düzeylerinin tekrarlanabilirliği	53
Tablo 5. sNeuregulin1- β 1 standartlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri	54
Tablo 6. sNeuregulin1- β 1 düzeylerinin tekrarlanabilirliği	55
Tablo 7. Okside LDL standartlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri	56
Tablo 8. Okside LDL düzeylerinin tekrarlanabilirliği	57
Tablo 9. Nitrik oksit standartlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri	59
Tablo 10. Nitrik oksit düzeylerinin tekrarlanabilirliği	60
Tablo 11. Paraoksonaz aktivitesinin tekrarlanabilirliği	61
Tablo 12. TAK standartlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri	63
Tablo 13. TAK düzeylerinin tekrarlanabilirliği	64
Tablo 14. Hasta ve Kontrol grubunun özellikleri	66
Tablo 15. Çalışma grubunun karakteristik özellikleri	66
Tablo 16. VEGF Genotip dağılımı	67
Tablo 17. Hastalarda tek, iki ve üç damar tıkanıklığına göre genotip sıklığı	67
Tablo 18. Kontrol ve total hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması	68
Tablo 19. CC polimorfizmi olan kontrol grubu ve hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-	

Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması 69

Tablo 20. CA polimorfizmi olan kontrol grubu ve hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK,T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL- Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması 70

Tablo 21. AA polimorfizmi olan kontrol grubu ve hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK,T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması 71

Tablo 22. CC, CA, AA polimorfizmi olan hasta gruplarının serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit Düzeylerinin Karşılaştırılması 72

Tablo 23. Tek damar hasta ve kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK,T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması 72

Tablo 24. İki damar hasta ve kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması 73

Tablo 25. Üç damar hasta ve kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması 74

Tablo 26. Tek damar ve iki damar hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK,T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması 75

Tablo 27. Tek damar ve üç damar hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK,T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması 76

Tablo 28. İki damar ve üç damar hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol,

LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeylerinin karşılaştırılması	77
Tablo 29. Yaşa göre kontrol ve total hasta grubunun serum Paraoksonaz düzeylerinin karşılaştırılması	78
Tablo 30. Kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeyleri arasında korelasyon	79
Tablo 31. Total hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeyleri arasında korelasyon	80
Tablo 32. CC polimorfizmi olan kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeyleri arasında korelasyon	81
Tablo 33. CC polimorfizmi olan hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeyleri arasında korelasyon	82
Tablo 34. CA polimorfizmi olan kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeyleri arasında Korelasyon	83
Tablo 35. CA polimorfizmi olan hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeyleri arasında korelasyon	84
Tablo 36. AA polimorfizmi olan kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeyleri arasında korelasyon	85
Tablo 37. AA polimorfizmi olan hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeyleri arasında korelasyon	86

SEMBOLLER, KISALTMALAR

ADMA	: Asimetrik Dimetil Arjinin
Apo	: Apolipoprotein
ASKH	: Aterosklerotik Koroner Arter Hastalığı
Bç	: Baz Çifti
B6	: Piridoksal Fosfat
B12	: Kobalamin
BH4	: Tetrahidrobiyopterin
CETP	: Kolesterol Ester Transfer Proteini
Cgmp	: Siklik Guanozinmonofosfat
CTGF	: Konnektif Doku Büyüme Faktörü
CX	: Sirkumfleks Koroner Arter
EDRF	: Endotel Kökenli Gevşetici Faktör
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
FFA	: Serbest Yağ Asitleri
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
Flt-1	: VEGF -1 Reseptörü
Flt-4	: VEGF -3 Reseptörü
GSSG	: Glutasyon Disülfid
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HER	: Heregulin
HIF-1	: Hipoksi İndükleyen Faktör 1
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HT	: Hipertansiyon
HYE	: Hipoksi Yanıt Elemanı
Ig	: İmmunglobulin
IGF	: İnsulin-Benzeri Büyüme Faktörü
IL-1	: İnterlökin-1
KAH	: Koroner Arter Hastalığı

Kda	: Kilo-Dalton
KDR	: VEGF -2 Reseptörü
LAD	: Sol Ön İnen Koroner Arter
LCA	: Sol Koroner Arter
LCAT	: Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
Lp	: Lipoprotein
LPL	: Lipoprotein Lipaz
Mrna	: Haberci RNA
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NRG	: Neuregulin
OH	: Hidroksil Radikali
ONOO-	: Peroksinitrit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDG	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PIGF	: Plasental Büyüme Faktörü
PON	: Paraoksonaz
RCA	: Sağ Koroner Arter
RFLP	: Restriksiyon Enzimleri Kullanılarak DNA'nın Farklı Büyüklerdeki Fragmanlara Ayrılması
ROS	: Reaktif Oksijen Ürünleri
RNS	: Reaktif Nitrojen Ürünleri
RTK	: Reseptör Tirozin Kinazlar
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAK	: Total Antioksidan Kapasite
Tampon AL	: Liziz Tamponu
Tampon AW1:	DNA İzolasyonunda Kullanılan Protein Denatürasyon Tamponu
Tampon AW2:	DNA İzolasyonunda Kullanılan DNA Saflaştırma Tamponu

TEKHARF	: Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı Ve Risk Faktörleri
TGF-B	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
T-PA	: Doku Plazminojen Aktivatörü
Trx	: Tiyoredoksin
TSP	: Trombospondin
VCAM	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: VEGF Reseptörü
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
VPF	: Vasküler Permeabilite Faktörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner arter hastalığı (İskemik kalp hastalığı), kalbin miyokard tabakasının kan desteğinin azalması ve oksijenlenmesinin bozulmasıyla meydana gelir. Kalbin kasılmasını sağlayan miyokard tabakasının beslenmesi yani oksijenizasyonu kalbin kendine özel koroner adı verilen atardamarlar sayesinde gerçekleştirilir. Koroner arterlerde daralma ve tıkanıklık en sık olarak ateroskleroza bağlı olarak meydana gelir.¹ Aterosklerozun ardından iskemik kalp hastalığı gelişir. Aterosklerozda kolesterol esterleri arterlerin intima tabakasında birikmeye başlar.² İntima kalınlaşmasını fibröz plak oluşumu izler. Aterosklerotik fibröz plaklar stabil kalıp kalsifiye olabilir veya plak rüptürü gelişebilir ve oklüziv bir trombüs oluşturabilir, iskemi, miyokard infarktüsü, inme ve periferik arter hastalığı gibi farklı komplikasyonlar geliştirebilir.³ Ateroskleroz, çocukluk döneminde başlar ve genç erişkin dönemde koroner kalp hastalığının nedenini oluşturur. Ateroskleroza neden olabilecek yaş, genetik, diyabet, hiperlipidemi, sigara, hipertansiyon obezite, cinsiyet vb gibi risk faktörleri vardır.⁴ Koroner kalp hastalığının en önemli nedeni olan aterosklerozun oluşumunda ve gelişmesinde adı geçen risk faktörlerinin yanı sıra büyüme faktörleri de rol oynamaktadır.⁵

Ateroskleroz ve yara iyileşmesi nötrofil, makrofaj, lenfosit ve fibroblastların yara sahasını işgal ettiği, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), konnektif doku büyüme faktörü (CTGF), transforme edici büyüme faktörü -beta (TGF- β 1, 2 and 3), insulin-benzeri büyüme faktörü (IGF), interlökin-1 (IL-1 a ve b), IL-10 ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α)'yı içeren çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin onarım mekanizmasında görevli olduğu komplike bir süreçtir.⁶

Büyüme faktörlerinden biri vasküler endotelial growth faktör (VEGF)'dir ve VEGF etkisiyle oluşan vasküler endotelial hücrelerin diferansiasyon ve gelişimi kardiyovasküler hastalıklar açısından çok önemlidir. VEGF, vazodilatasyon ve vasküler permeabilite, endotel hücre proliferasyonu ve tüp formasyonunda görev alır.⁷ VEGF, spesifik transmembran reseptörlere bağlanarak vasküler endotel hücreleri üzerinde etki gösterir. Bu bağlanma bir dizi sinyal yolunu aktive ederek vasküler endotel hücrelerin proliferasyonu ve göçü, olgunlaşmamış endotel hücrelerin sağkalımı ve artmış vasküler geçirgenlik ile sonuçlanır. Bu etkiler, vasküler endotelial growth faktörün temel mediyatör gibi görüldüğü anjiyogenezde yani yeni kan damarları gelişiminde önem taşımaktadır.⁸

Aterosklerozlu hastalarda prognoz kan akımının sınırlanma derecesine yani hipoksik-iskemik duruma bağlıdır. VEGF geninin ekspresyonu hipoksi ile indüklenir. Organogenez ve kan damarlarının gelişimi lokal hipoksik çevrenin sitümüle ettiği anjiyogenik maddeler ve anjiyogenik moleküllerin ürünleriyle gelişir.

Primitif anjiyogenik hücrelerin endotel hücrelerine diferansiyasyonu rudimenter tüp ve damarların gelişimine neden olur. Hematopoetik sitemsellerin gelişmekte olan damarlara yerleşmesi vaskulogenez başlatır. Maturasyon ve anjiyogenez bu süreci takip eder. VEGF, vaskulogenezin başlangıcındaki temel moleküldür. VEGF'nin vasküler elemanlar üzerindeki mitojenik etkisi belirgindir ve hipoksiye cevap olarak sentezlenir. VEGF, HIF-1 α tarafından transkripsiyonu gerçekleşen ve hipoksi yanıtında rol alan anjiyogenetik faktördür. HIF-1 (hipoksi indüklenebilir faktör-1) embriyonik vasküler gelişimin hipoksik düzenlenmesi için bir anahtar transkripsiyonel düzenleyicisidir⁹. Hipoksi veya iskemi durumunda VEGF gen ailesinin ekspresyonunu hipoksi indükleyen faktör 1 (HIF-1) indükler ve anjiyogenez aktive olur. HIF-1'in

hipoksi yanıt elemanı olan HYE'ye bağlanması VEGF'nin transkripsiyonuna, yani VEGF mRNA sentezine yol açar. Böylece VEGF proteinin üretimi ve sekresyonu gerçekleşmiş olur.¹⁰ Aterosklerotik koroner arter hastalığında (ASKH) bozulmuş doku perfüzyonu ile VEGF proteini, anjiogenezi indükleyerek kollateral damar gelişimine yol açmaktadır.

VEGF-2578 üzerinde yapılan bir çalışmada VEGF-2578 CC allelini taşıyanlarda VEGF mRNA ekspresyonunun AA allelini taşıyanlara göre daha yüksek olduğu; AA genotipinin ateroskleroz gelişimi için risk faktörü, CC genotipinin ise protektif faktör olduğu saptanmıştır.¹¹ Ayrıca VEGF-2578 AA allelini taşıyanlarda üç damar tutulum sıklığının VEGF-2578 CC allelini taşıyanlara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.¹² Yine VEGF-2578 A allelini taşıyanların VEGF mRNA ekspresyonunun belirgin olarak yüksek olduğu ve bu allelin anjiogenez ve koroner kolateral damar gelişiminde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir.¹³ Gen tiplerinin ve risk faktörlerinin tanımlanmasının, risk altındaki hastaların tedavi ve yönlendirilmesinde kolaylık sağlayacağı ileri sürülmektedir.

Yapılan araştırmalar ışığında, bu çalışmada daha önce Türk popülasyonunda çalışılmamış olan VEGF 2578 polimorfizminin koroner arter hastalığının etiyopatogenezi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca koroner arter hastalığı etiyopatogenezi üzerinde etkisi olduğunu düşünülen serum VEGF, neuregulin, nitrik oksit, okside LDL, paraoksonaz ve total antioksidan kapasite analizlerinin yapılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Koroner Arter Hastalığı

2. 1. 1. Tanım

Koroner arter hastalığı; kalbin kasılma fonksiyonunu yerine getiren miyokard tabakasını besleyen koroner arterlerlerdeki daralma ve tıkanıklıklara bağlı olarak kan temin yetersizliği ile meydana gelen miyokardiyal perfüzyon bozukluğu ile karakterize bir durumdur. Miyokardiyal perfüzyon bozukluğu ya oksijen ihtiyacının artması ya da kan desteğinin azalmasıyla meydana gelir. Koroner arterlerdeki daralma ve tıkanıklığa en sık olarak ateroskleroz, daha sonra ise arteritler, emboli, amiloidoz, konjenital koroner damar anomalileri, radyasyon, arteriovenöz malformasyonlar yol açar.⁸

2. 1. 2. Epidemiyoloji

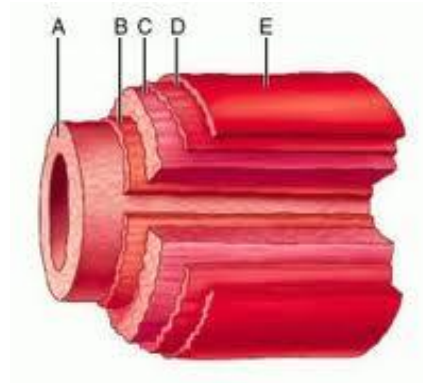
Ülkemizde tüm ölüm nedenleri arasında koroner arter hastalığı ilk sırada yer almaktadır. Türkiye’de koroner arter hastalığı ile ilgili olarak Türk Kardiyoloji Derneği’nin Sağlık Bakanlığı işbirliğiyle yaptığı en detaylı çalışma TEKHARF (Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri) çalışmasıdır. Bu çalışmaya göre ülkemizde 1,6 milyon kalp hastası bulunmakta ve yılda 130.000 kişi koroner arter hastalığından ölmektedir. TEKHARF çalışmasına göre 45-74 yaş arası erişkinlerde yıllık koroner kalp hastalığı mortalitesini erkeklerde binde 7,4 ve kadınlarda binde 4,1’dir.

Erkeklerde koroner arter hastalığına ait ilk atak 50’li yaşlarda görülürken, kadınlarda hormonal etkilerin rolüyle erkeklere göre 10-15 yıl sonra ortaya çıkar.

Çalışmalar, tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan ölüm oranının 1990 ve 2020 yılları arasında, %28,9'dan %36,3'e yükseleceğini göstermektedir.³

2.1.3. Koroner Arter Hastalığı Patogenezi

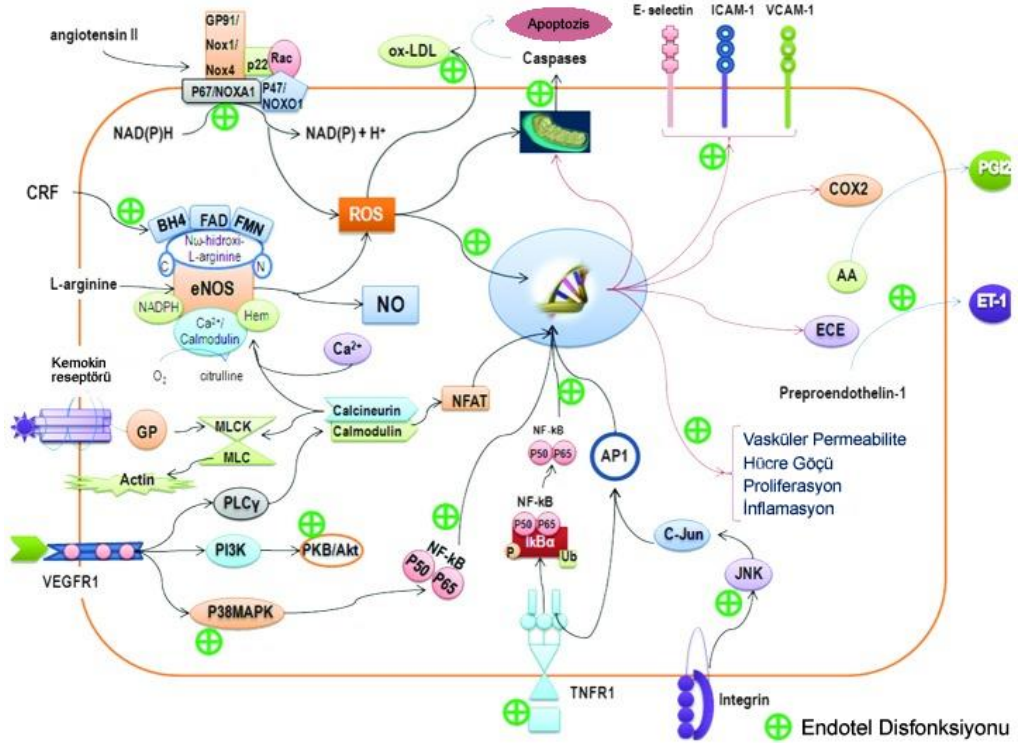
Arter duvarı içten dışa doğru sıralandığında intima, media ve adventisya denilen 3 tabakadan oluşur. İntima tabakası lümeni oluşturan endotel hücrelerinden, media tabakası düz kas hücrelerinden, adventisya tabakası ise bağ dokusu hücrelerinden oluşur (Şekil 1).



Şekil 1. Arter yapısı (A: İntima tabakası B: İç elastik tabaka C: Media tabakası D: Dış elastik tabaka E: Dış tabaka)

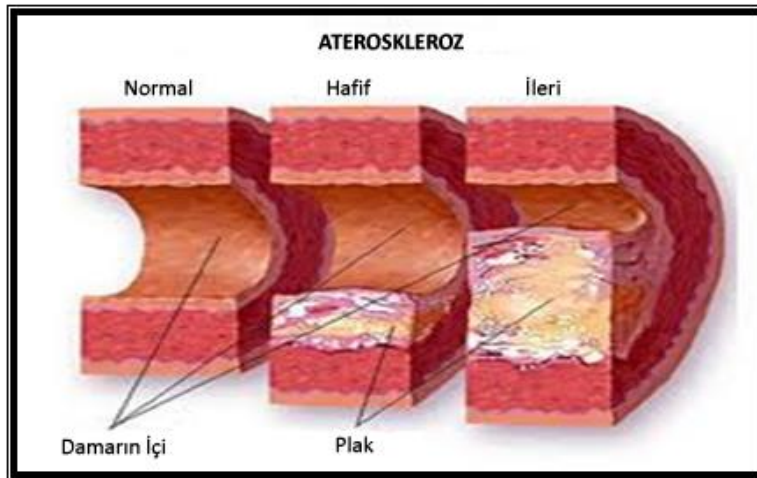
Normal endotel damar sağlığı için anahtar rol oynar, ancak endotel disfonksiyonu ile vazospazm, vazokonstriksiyon, aşırı tromboz veya anormal damar proliferasyonu ateroskleroz ve hipertansiyon gibi hastalıklara yol açar. Ateroskleroz, hasar cevabı hipotezine göre sigara, homosistein artışı, stres, hiperlipidemi, diyabet, viral enfeksiyon ve immunolojik faktörlerin etkisiyle intima tabakasındaki endotelial disfonksiyonla başlar. Endotel disfonksiyonu, vasküler inflamasyon, lipid, kolesterol, kalsiyum ve hücre debrislerinin intima tabakasında birikimi

sonucu plak oluşumu, akut ve kronik luminal obstrüksiyon, kan akımı anormallikleri, hedef organa giden oksijen desteğinin azalması ile meydana gelir (Şekil 2). Vasküler endotel hücrelerin diferansiasyon ve gelişimi kardiyovasküler hastalıklar açısından çok önemlidir. Çünkü KAH'da kollateral damar gelişimi ve anjiogenez miyokardı iskemiyeye karşı korumaktadır. Seçici geçirgen özelliği olan endotel tabakasının disfonksiyone olmasıyla beraber permeabilite artışı olur.¹⁴ Mononükleer lökositler (monosit/makrofaj) ve T hücreleri hasarın olduğu intima tabakasına göç ederek VCAM-1'in (hücre içi adezyon molekülü) ekspresyonunu indükleyerek adezyon artışı yapar ve endotel yatağının yapısını değiştirir. Aktive lökositler ve düz kas hücre proliferasyonu inflamatuvar mekanizmayı tetikleyerek kemotaktik sitokinlerin salınımını artırır. Kronik inflamatuvar yanıtın ardından bölgeye LDL akümüasyonu ve okside LDL oluşumunu monosit hücrelerinin makrofaj ve köpük hücrelerine transformasyonu izler.¹⁵ Yüksek kolesterol düzeyleri disfonksiyone olmuş endotelden serbest radikallerin salınmasına neden olur. NO yapımı bozulur, vazodilatasyon azalır. Düz kas hücrelerinin media tabakasından intima tabakasına göçü ve düz kas hücrelerinin proliferasyonundan sonra lipit yüklü makrofajların endotele akümüasyonunda artış olur. Köpük hücresi oluşumunu fibröz plak oluşumu takip edebilir ve plak kalsifikasyonu ve ateroskleroz gelişimi (Şekil 3) ardından plak rüptürü meydana gelebilir.⁶



Şekil 2. Endotel Disfonksiyonu

Bu durum kan akımının kesintiye uğradığı dallanma noktalarında kan akımının yavaşlamasıyla daha da kolaylaşır ve bu noktalarda endotel disfonksiyonunun tetiklediği platelet adezyonu ve platelet kaynaklı büyüme faktörlerin salınımı trombotik eğilimi ve emboli gelişimini artırır.⁴

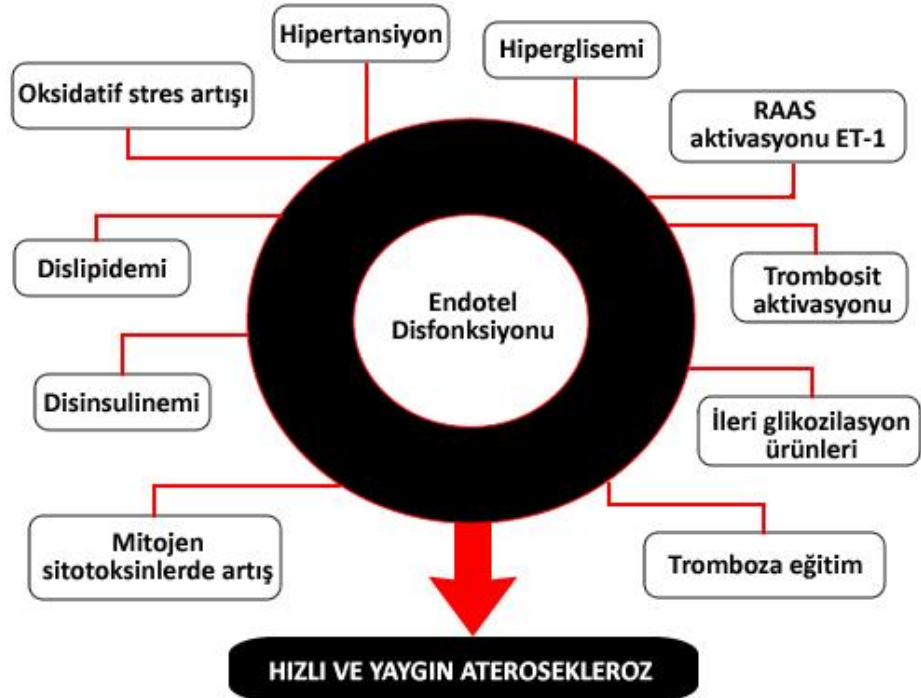


Şekil 3. Ateroskleroz Gelişimi

2.2. Koroner Arter Hastalığının Patogenezinde Rol Oynayan Faktörler

1. Hipertansiyon
2. Sigara
3. Diyabet
4. Sedanter yaşam
5. Obezite
6. Yaş, cinsiyet, kişilik yapısı ve aile öyküsü
7. Oksidatif stres
8. Homosistein artışı
9. Hiperlipidemi
10. Bozulmuş fibrinolizis
11. ADMA (Asimetrik Dimetil Arjinin)
12. Lipoprotein (a)

Ateroskleroz için Risk Faktörleri Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4. Ateroskleroz için Risk Faktörleri

2.2.1. Koroner Arter Hastalığı ve Hipertansiyon

Hipertansiyon (HT), hem kadınlarda hemde erkeklerde koroner arter hastalığı için önemli bir risk faktörüdür. Hipertansiyonu olan kadınlar basıncı normal olan kadınlarla karşılaştırıldığında koroner arter hastalığı riskinin 4 kat, hipertansiyonu olan erkeklerle karşılaştırıldığında koroner arter hastalığı riskinin 3 kat arttığı tespit edilmiştir. HT endotel disfonksiyonuna neden olur, damar permeabilitesini arttırarak hasar görmüş intimaya monosit ve LDL kolesterolün adezyonunu sağlar.¹⁶

2.2.2. Koroner Arter Hastalığı ve Sigara

Sigara ateroskleroz için modifiye edilebilen bir risk faktörüdür. Sigara tüketimi de hem kadınlarda hemde erkeklerde koroner arter hastalığı için önemli bir risk faktörüdür.

Sigara endotel disfonksiyonuna yol açarak endotel bağımlı periferik ve koroner vazodilatasyonu bozar. HDL kolesterolü düşürür, serum CRP (C-reaktif protein) düzeyini ise yükseltir. Sigara, fibrinojen düzeyini arttırarak ve kanın viskozitesini arttırarak (sekonder polisitemi) koagülasyonu indükler, oksijen taşınımını azaltarak (karbon monoksit artar) koroner vazokonstriksiyon ve nikotine bağımlı hemodinamik etkilerle kalp hızı ve kan basıncını arttırarak akut kardiyak olaylara katkıda bulunur.¹⁷ Sigara içenlerde lipit peroksidasyonu artar ve sigara içenlerde okside LDL endotel bağımlı vazodilatasyonun potent inhibitörüdür. Sigara içenlerde serum vitamin E, C, β karoten seviyeleri düşüktür.³ Sigara hem abdominal aorta hem de sağ koroner arter ve sol ön inen koroner arterinde (LAD) lezyonlara neden olur.¹⁸ Özellikle oral kontraseptif kullanan ve sigara tüketimi olan kadınlarda koroner arter hastalığı riski 10 kat artmıştır.¹⁶

Günde bir paket sigara içilmesi kalp krizi riskini 3-5 kat artırmaktadır. Sigara içiminin kardiyovasküler hastalıklar açısından lipit profiline negatif etkileri bulunmaktadır. Bu etkileri HDL kolesterolü düşürmek, LDL, total kolesterol ve trigliseriti artırmak suretiyle gerçekleşmektedir. Ancak sigaranın bırakılması kardiyoprotektif özelliği olan HDL kolesterolün en az 17 gün içinde normal değerlerine dönmesine neden olmaktadır.¹⁹ Sigara içmeyi bırakanlarda sigaranın indüklediği endotel disfonksiyon geri dönebilmektedir ve bu bir anlamda aterosklerozun değişik modifikasyonlarının önlenmesini veya gecikmesini sağlayarak koroner arter hastalığını sınırlandırmaktadır.¹³

2.2.3. Koroner Arter Hastalığı ve Diyabet

Tip 2 diyabeti olanlardaki insülin rezistansı endotelial disfonksiyon, aterosklerotik dislipidemi, inflamasyon ve bozulmuş fibrinolizisi içeren metabolik ve biyokimyasal anormalliklerle ilişkilidir.²⁰

Hiperglisemide yapılan postmortem çalışmalar abdominal aorta ve koroner arterlerde yağlı çizgilenme ve aterosklerotik lezyonlarda artış olduğunu göstermiştir.¹⁶ Diyabeti bulunan kişilerde koroner arter hastalığı riski yaklaşık 4 kat artmaktadır. İnsülin eksikliği vücuttaki yağların metabolize olamaması ve dolaşımdaki lipit miktarının artışı ile sonuçlanır. Diyabette mortalitenin üçte ikisini koroner arter hastalığına bağlı ölümler oluşturmaktadır.¹⁶

2.2.4. Koroner Arter Hastalığı ve Sedanter Yaşam

Yapılan araştırmalar günlük aktiviteleri kısıtlı olan ve günün büyük bir kısmını oturarak geçiren insanlarda koroner arter hastalığı riskinin yürüyüş, koşu, ağır egzersiz yapanlara göre artmış olduğunu

göstermektedir. Hergün yapılan ılımlı egzersiz kardiyovasküler hastalıkları % 30 oranında azaltır.¹⁸

2.2.5. Koroner Arter Hastalığı ve Obezite

Obez olanlarda vücut kitlesi arttığı için kardiyak outputun artırılması gerekir. Kardiyak outputtaki bu artış vücuttaki daha geniş kan volümü nedeniyle artmış venöz dönüşü gerektirir. Kardiyak debi artışı kardiyak oksijen tüketimi dolayısıyla artmış koroner perfüzyon ihtiyacını da beraberinde getirir.²¹ Obez kişilerde hipertansiyon, diyabet ve hiperlipidemi beraberliği daha fazladır ve endotelyal disfonksiyonu artırır. Obez olanlarda oksidatif strese bağlı ROS ürünleri yükselmiştir, çünkü miyokardın mekanik ve metabolik iş yükünün artmasına bağlı olarak mitokondriyal respirasyon artar dolayısı ile süperoksit ve hidrojen peroksit gibi ROS ürünlerinin artışı ile miyokardın oksijen tüketimi artmaktadır.²²

Metabolik sendromun (insülin rezistansı, hipertansiyon, dislipidemi, santral obezite) bir komponenti olan obezitede kardiyovasküler risklere bağlı mortalitede artış söz konusudur.²¹

2.2.6. Koroner Arter Hastalığı ile Yaş, Cinsiyet, Kişilik Yapısı ve Aile Öyküsü

İleri yaş (erkeklerde 55 kadınlarda 65 yaşın üzerinde), erkek cinsiyet (kadın cinsiyete göre 4-5 kat artan risk) ve koroner arter hastalığı açısından aile öyküsü pozitif olanlarda (1. derece yakınlarında) koroner arter hastalığı olan veya erken yaşta koroner arter hastalığına yakalanma öyküsü bulunanların aile bireylerinde koroner arter hastalığı riski artar. Yine genç yaşta miyokard infarktüsü geçirenlerde klasik risk faktörlerinin olmaması akla genetik yatkınlığı getirmektedir.¹³

Menapozdan sonra kadınlarda da koroner ateroskleroz erkeklerdeki gibi kardiyak semptomlara sebep olur ve kadın ölümlerinde birinci sırada yer alır. Oral kontraseptifler içerdikleri özellikle östrojen hormonu etkisiyle koagülasyona eğilimi attırdıkları için tromboembolik ve aterosklerotik hastalık eğilimini yükseltir.¹⁹

Depresif veya stresli kişilik yapısı koroner arter hastalığına yakalanma riskini 2-3 kat artırır.¹⁶

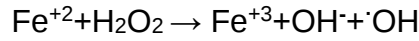
2.2.7. Koroner Arter Hastalığı ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres reaktif oksijen radikallerinin aşırı üretimi ve/veya metabolizmanın antioksidan defans cevabındaki azalmayla karakterize bir durumdur.²³ Oksidatif stres doku inflamasyonu, DNA hasarı, protein değişiklikleri, kas ağrısı ve yorgunluğuna neden olan lipid peroksidasyonu ile ilişkilidir.²⁴ ROS homeostazi tüm aerobik hücreler için kritik öneme sahiptir. Çünkü fazla oksijen toksisiteye, az oksijen ise metabolizmanın bozulmasına neden olur.²⁵

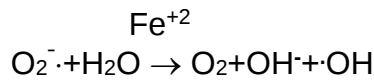
Hayati öneme sahip O₂'nin bir elektron alarak indirgenmesi elektron yapısının değişmesine ve serbest radikal oluşumuna neden olur. Bu reaktif molekül dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron içerir. Dış yörüngesini tamamlamak için başka molekülden elektron alarak zararlı moleküllerin oluşumuna neden olur. Reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) kontrolü gen regülasyonu, fizyolojik ve biyolojik mekanizmaların kombinasyonu ile yapılır, ancak kontrolün bozulmasıyla hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabet, koroner kalp hastalığı, akciğer hastalıkları, müsküler atrofi, romatoid artirit gibi hastalıklar meydana gelir.²⁵ ROS ve RNS (reaktif nitrojen ürünleri) koroner arter hastalığı dahil bir çok kalp hastalığı gelişiminde önemli bir role sahiptir.

Oksidatif fosforilasyonla moleküler oksijenin %1-2'si ROS'a çevrilir ve sırasıyla 1, 2, 3 elektron redüksiyonuyla süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) meydana gelir.²³ H_2O_2 aslında serbest radikal değildir, ancak Fenton ve Haber Weiss reaksiyonlarıyla $OH^{\cdot}$ radikali oluşturup lipid peroksidasyonuna neden olur.

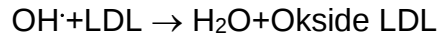
Fenton reaksiyonu



Haber-Weiss reaksiyonu



LDL peroksidasyonu



NADPH Oksidaz, vasküler endotel hücre membranı, damar düz kas hücreleri ve fibroblast hücrelerinde bulunur. NADPH Oksidaz, miyokardiyal kapillerlerde belirli bir basınç altında HIF-1 aracılı VEGF salınımını indükler.²⁶ VEGF ekspresyonu, anjiotensin II'nin indüklediği hipertansiyonda, diyabette ve hiperlipidemideki aterosklerotik arterlerde NADPH Oksidaz etkisi ile artar. Bu enzimin düzensiz çalışması halinde NADPH Oksidaz derivativesi ROS (süperoksit) kaynaklı hipertansiyon ve ateroenez oluştuğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.²⁷

Ksantin Oksidaz, ksantin dehidrojenazın proteolizi ile meydana gelir ve vasküler hastalıktaki başka bir ROS kaynağıdır. İnhibisyonu ile süperoksit üretimi azalırken damarlarda asetilkolin salınımı ile endotel bağımlı vasküler relaksasyon meydana gelir.²⁷ Ksantin oksidaz

kaynaklı ROS, koroner arter hastalarında NO'nun biyoyararlanımını azaltır ve ksantin oksidaz aktivasyonunun indüklenmesi süperoksit oluşumu ile endotel disfonksiyonuna neden olur.²⁶

Sitokrom P450 metabolizması, karaciğer mikrozomlarındaki etanol, steroid ve fenobarbital gibi ilaçların çözünebilir hale getirilip böbrek yoluyla itrah edilerek detoksifiye edilmesini sağlar. Ayrıca bu sistem steroid sentezinde görev alır ve fosfotidilkolin gibi lipitler yine bu sistemin bir parçasını oluştururlar.²⁷

Peroksizomlar, moleküler oksijenin peroksizomlarda kimyasalların etkisiyle veya spontan olarak ya da hidrojen peroksitin dismutasyonu ile süperoksit oluştururlar.²⁸

İnflamatuvar hücrelerin aktivasyonu, inflamatuvar hücreler ve onların ürettikleri mediyatörler (sitokin ve kemokinler) süperoksit ve hidrojen peroksit oluşumu ile endojen ROS'u oluştururlar. İnflamasyonun indüklediği oksidatif strese inflamatuvar situmulusla sitokinler (TNF, IL-1, IL-6) ve kemokinler (IL-8, kemokin reseptör 4 (CXCR4) ile spesifik mikroRNA'nın ekspresyonunu değiştirerek ROS aracılı karsinogenezi başlatır.²⁸

O_2 (oksijen)

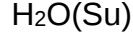
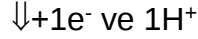
$\downarrow +1e^-$

$O_2^{\cdot -}$ (süperoksit)

$\downarrow +1e^-$ ve $2H^+$

H_2O_2 (hidrojen peroksit)

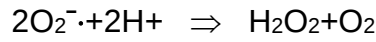
$\downarrow +1e^-$ ve $1H^+$



Nitrik Oksit ($\text{NO}\cdot$), aterojezeze karşı vasküler homeostazis regülasyonunu sağlayan L-Arjinin'den L-Sitrülin dönüşümü sırasında meydana gelen dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron içeren yüksüz bir reaktif moleküldür.²⁹ Reaksiyonu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi katalizler. Kofaktör olarak tetrahidrobiopterin (BH_4) kullanılır. Kendi sentezini kontrol edebilir ve yüksüz olduğu için dokulara difüzyonu hızlıdır. NOS kaynakladığı dokuya göre endotelial, nöral ve indüklenabilir olmak üzere üç gruba ayrılır. Endotelial kökenli NO 'nun kardiyovasküler sistem üzerine etkisi belirgindir. Kan damar duvarlarında relaksasyon ve vasküler tonüs regülasyonu yapar ve başlangıçta endotel kökenli gevşetici faktör (EDRF) olarak adlandırılmıştır. Antitrombotik, antiaterosklerotik faktör olarak trombosit fonksiyonlarını inhibe eder, lökositin vasküler duvara adezyonunu ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu önler.²⁷ BH_4 eksikliğinde nitrik oksit sentaz enzimi NO yerine $\text{O}_2^{\cdot-}$ üreten bir kaynağa dönüşür. Vasküler endoteldeki eNOS bir ROS kaynağı olarak aterojezeze indükler.²⁹ Nitrik oksit difüzyonla vasküler düz kas hücrelerine geçer, guanil siklazı stimüle ederek cGMP sentezini artırır. Artan cGMP vasküler düz kas relaksasyonuna ve vazodilatasyonuna neden olur.³⁰

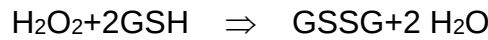
Vasküler tonüs regülasyonu $\text{NO}\cdot$ ile $\text{O}_2^{\cdot-}$ arasındaki dengenin sürdürülmesiyle olur. $\text{NO}\cdot$ ile $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'in reaksiyona girmesiyle peroksinitrit (ONOO^-) oluşur ve ONOO^- antioksidan enzimleri ve regülatörler reseptörleri inaktive eder.³¹ NO 'nun fazla üretimi aterosklerotik hastalıklar dahil pek çok hastalığın oluşumuna neden olur. Okside LDL, endotelial NO üretimini antagonize eder ve L-Arjinin uptake'i düşer ve ADMA seviyeleri yükselerek NO 'nun biyoyararlanımını azaltır.³¹

Bu radikallerin zararlı etkilerini önlemede katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi ya yeni serbest radikal oluşumunu önleyenler, E vitamini, C vitamini, β karoten gibi oluşan yeni serbest radikalleri ortamdan uzaklaştıranlar ya da metiyonin sülfoksit redüktaz gibi serbest radikallerin oluşturduğu hasarı onaran antioksidanlar görev alır. Ayrıca melatonin, albumin, ürat, seruloplazmin, transferrin, bilirubin, sistein, ferritin, desferroksamin, miyogloblin, selenyum, hemoksijenaz, haptoglobulin gibi antioksidanlar da mevcuttur. Süperoksit dismutaz, antioksidan olarak tanımlanan ilk enzimdir. Çinko, mangan ve ekstrasellüler olmak üzere 3 tipi mevcuttur ve hepsi süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler.²⁸



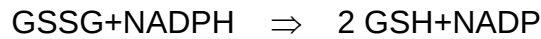
Süperoksit dismutaz

Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksiti GSH'ı substrat olarak kullanarak GSSG'e dönüştürür (Şekil 5). GSH, ROS ve serbest radikallerin DNA hasarına karşı hücreleri koruyan bir tripeptittir. Eksikliğinde miyokardiyal iskemiye yatkınlık artar.²⁷

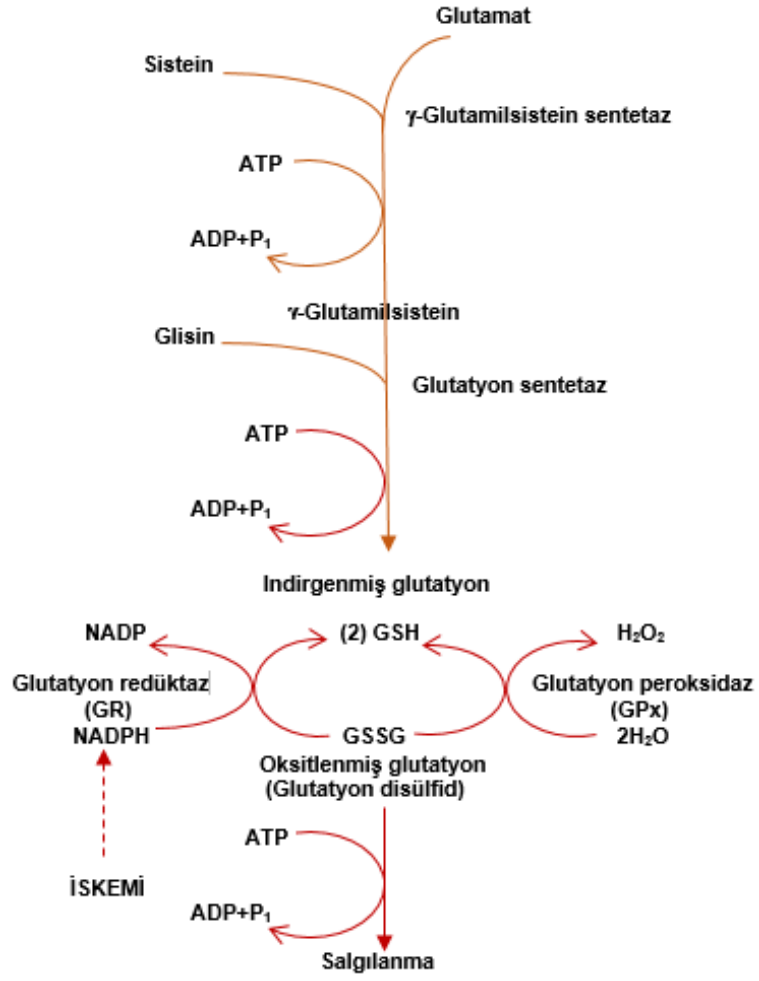


Glutatyon peroksidaz

GSH Redüktaz enzimi, okside haldeki GSSG'yi tekrar GSH'a indirger.

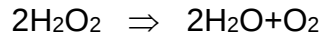


GSH Redüktaz



Şekil 5. Glutatyon Sentezi ve Siklusu

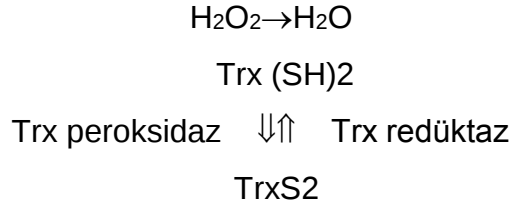
Katalaz, peroksisomlarda bulunur. H_2O_2 'yi H_2O 'ya dönüştürerek detoksifiye eder. H_2O_2 'den $OH\cdot$ oluşumunu önler. Katalaz kardiyoprotektif etkiye sahiptir ve ateroskleroz gelişimini geciktirir.



Katalaz

Tiyoredoksin redüktaz; antioksidan etkisi bulunan, DNA sentezinde görevli, tiyoredoksini indirgeyen bir flavoproteindir.³² Hipoksi durumlarında HIF-1 aktivitesini yükseltirken inaktive olduğu durumlarda

HIF-1 aktivitesi düşer.³³ Antioksidan etkisi için endojen -SH gruplarını kullanır. Ateroskleroz gelişimine neden olan okside LDL'ye karşı glutatyon sistemiyle beraber çalışarak defans oluşturur.



2.2.8. Koroner Arter Hastalığı ve Homosistein Artışı

Organizmadaki en önemli metil grubu vericisi olarak bilinen metiyoninin sisteine dönüşümü sırasında ara metabolit olarak homosistein oluşur. Homosisteinin sisteine dönüşümü piridoksal fosfatın (B6) kofaktör olarak kullanıldığı sistatyonin β sentaz enzimi aracılığıyla olur. Homosisteinin metiyonine remetilasyonu kobalaminin (B12) kofaktör olarak kullanıldığı metiyonin sentaz (Metiltetrahidrofolat homosistein metiltransferaz) ve betain homosistein metil-transferazın katalizlediği reaksiyonla oluşur. Döngüde yer alan enzimlerin defektleri, kofaktör eksiklikleri homosistein düzeyini yükseltir. Yapılan çalışmalar homosisteinin koroner arter hastalıklara, tromboembolik olaylara neden olduğunu göstermiştir. Homosistein endotel üzerine direkt toksik etki gösterir. Pıhtılaşma faktörlerini arttırarak, trombosit adezyon ve agregasyonunu hızlandırarak, heparini inhibe ederek, protombin düzeyini arttırarak koagülasyona eğilimi arttırır. Homosistein düzeyinin yüksekliği serbest radikal oluşumuna sebep olan oksidatif stresi tetikleyerek endotel hasarına yol açar.³⁴ Endotel hasarı NO ekspresyonunu azaltarak aterosklerotik damar hastalıkları açısından risk oluşturur.³⁵ Homosistein düzeyinin yüksekliği lipit peroksidasyonunu arttırır. Okside-LDL'nin bozulmuş endotel duvarındaki intimal makrofajlarca alınıp köpük

hücrelerine dönüşümüyle lipit çekirdekten aterosklerotik plak oluşumu ve yine homosistein düzeyi yüksekliğinin neden olduğu bozulmuş koagülan mekanizması, trombotik ve atereosklerotik damar hastalıklarına zemin hazırlar.³⁴

2.2.9. Koroner Arter Hastalığı ve Hiperlipidemi

Kan lipiti yüksekliğine hiperlipidemi denir. Plazma lipitleri, serbest yağ asitleri, kolesterol, kolesterol esterleri, fosfolipit ve triaçilgliserolden oluşur. Lipitler suda çözünmezler.

Lipitler kanda taşınmaları için özel taşıyıcı proteinler olan apolipoproteinler ile birleşerek lipoproteinleri oluştururlar. Bu sayede suda çözünmeleri ve kanda taşınmaları mümkün olur. Lipoproteinler lipitlerin ince barsak ve karaciğerden kana, kandan doku ve organlara taşınımında görev alırlar. Kolesterol dolaşımında büyük oranda plazma lipoproteinlerinde kolesterol esterleri şeklinde depo edilir ve bunun kontrolü lesitin kolesterol açıltransferaz (LCAT) ve kolesteril ester transfer proteini (CETP) ile yapılır. LCAT, HDL'de serbest kolesterolün ester kolesterole dönüşümünü kataliz eder (apoprotein A-I kofaktör) ve CETP, ester kolesterolün LDL ve VLDL'ye transportunu kolaylaştırır.³⁶ Lipoproteinlerdeki yağ asitleri adipoz dokuda triaçilgliserol olarak depolanır. Serbest yağ asitleri (FFA) hormona duyarlı lipaz vasıtasıyla lipolizle meydana gelir. Açlıkta trigliserit metabolizmasının anahtar enzimi olan lipoprotein lipaz (LPL) sitümüle olur ve şilomikron ve VLDL'deki triaçilgliserollerin parçalanmasına yol açar. Hormona duyarlı lipaz triaçilgliserollerin yağ asiti ve gliserole çevrilmesini başlatır ve organizmanın yakıt gereksinimini karşılamış olur.³⁷ İnsülin eksikliği veya insülin direnci vakalarında hormona duyarlı lipaz artar bu durumda daha fazla sayıda yağ asidi ve gliserol VLDL yapımına katılarak hiperlipidemiye neden olur.³⁸ Hepatik lipaz HDL partikülü yüzeyindeki

trیاçilgliserol ve fosfolipitleri hidrolize eder. Artmış hepatic lipaz aktivitesi HDL partikül yüzeyindeki triaçil gliserol ve fosfolipitleri hidrolize ederek HDL çapını küçültür ve seviyesini düşürür. Lipoproteinler elektroforetik yöntemle ayrılmasına göre VLDL (pre - β lipoprotein), LDL (β lipoprotein), HDL (α lipoprotein) ve şilomikronlar diye 4 gruba ayrılır. Şilomikron trigliserit yönünden zengin en düşük dansiteli en büyük lipoproteindir. Şilomikronlar diyetle alınan trigliseritlerin ince barsaktan dokulara taşınmasında; VLDL endojen trigliseritlerin ve kolesterolün karaciğere ekstrahepatik dokulara taşınmasında; LDL kolesterol ve esterlerinin ekstrahepatik dokulara taşınmasında; HDL ise dolaşımdaki kolesterolün karaciğere taşınmasında görev alır. HDL kolesterol düşüklüğü ve LDL kolesterol yüksekliği koroner arter hastalığı için risk indikatörüdür.³⁷ Total kolesterolün 200 mg/dl'nin üstünde olması, LDL kolesterolün 130 mg/dl'nin üstünde ve HDL kolesterolün 45 mg/dl'nin altında olması atereosklerotik damar hastalıkları açısından risk faktörüdür. Koroner arter hastalığı patogeneğinde en önemli basamak LDL'nin oksidasyonu, sitokinlerin salınımının stimülasyonu ve nitrik oksit inhibisyonu yoluyla endotelial hasar oluşmasıdır.³⁹ Aterojenez gözden geçirildiğinde hücre yüzeyindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonu ile monositlerin endotel hücrelerine adezyonu ve LDL'nin intima girişine başlayan olaylar zincirini, makrofajların okside-LDL'lerle köpük hücrelerine dönüşümü, büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımıyla düz kas proliferasyonu, yağlı çizgilenme ve ardından aterosklerotik plak gelişimi takip eder.⁴⁰ Düşük HDL kolesterol düzeyleri erken koroner ateroskleroz açısından yüksek risk taşımaktadır. Yüksek HDL kolesterol düzeyleri LDL'nin oksidasyonunu önleyerek ateroskleroz oluşumuna engel olur.

HDL, köpük hücrelerinden kolesterol sızmasını önleyerek aterojenezini inhibe eder.⁴⁰ Apo A1, HDL kolesterolün majör proteindir ve LCAT enziminin aktivasyonunda dolayısıyla dolaşımdaki serbest kolesterolün karaciğere taşınmasında ve kolesterolün esterleşmesinde

görev alır. Düşük HDL kolesterol düzeyi, düşük LCAT hızı ve/veya düşük Apo A1 düzeyi kolesterol esterifikasyonunu azaltır ve ters kolesterol taşınım hızını düşürür, trigliserit seviyesini yükseltir. Dolayısı ile aterojenezi hızlandırır.

2.2.10. Koroner Arter Hastalığı ve Bozulmuş Fibrinolizis

Fizyolojik olarak vasküler yapıların içindeki koagülasyonun önlenerek normal kan akımı ve akışkanlığının sağlanması ve vasküler endotel hasarının tamiri, hasar bölgesinde lokalize hemostatik tıkaçla kanamanın önlenmesi, patolojik olarak ise damar içinde meydana gelen ve kan akışını kısıtlayan fibrinin eritilmesi gerekir. Hemostazın sağlanması için trombositler, endotel hücreleri, von Willebrand faktör, doku faktörleri, fibrinolitik sistem elemanları ve doğal antikoagülanlar gereklidir.

Sağlam endotel yapısının hasarıyla bölgeye trombositlerin giderek tıkaç oluşturmasını, koagülasyon sisteminin aktivasyonu ve önce tıbahtın daha sonra ise pıhtıyı sağlam hale getiren fibrin oluşumu izler. Fibrinojen karaciğerde sentez edilir ve kanın pıhtılaşmasında görev alır. Fibrinojen normalde inaktiftir ve damar endoteli zarar gördüğünde iyonize kalsiyumla birleşerek aktif fibrine dönüşür. Oluşan hemostatik tıkaç dışarıya kan sızmasını önler. Ancak oluşan fibrinin lokalize kalarak hasar yeriyile sınırlı kalması için lokal fibrinolitik sistemin devreye girmesi gerekir.

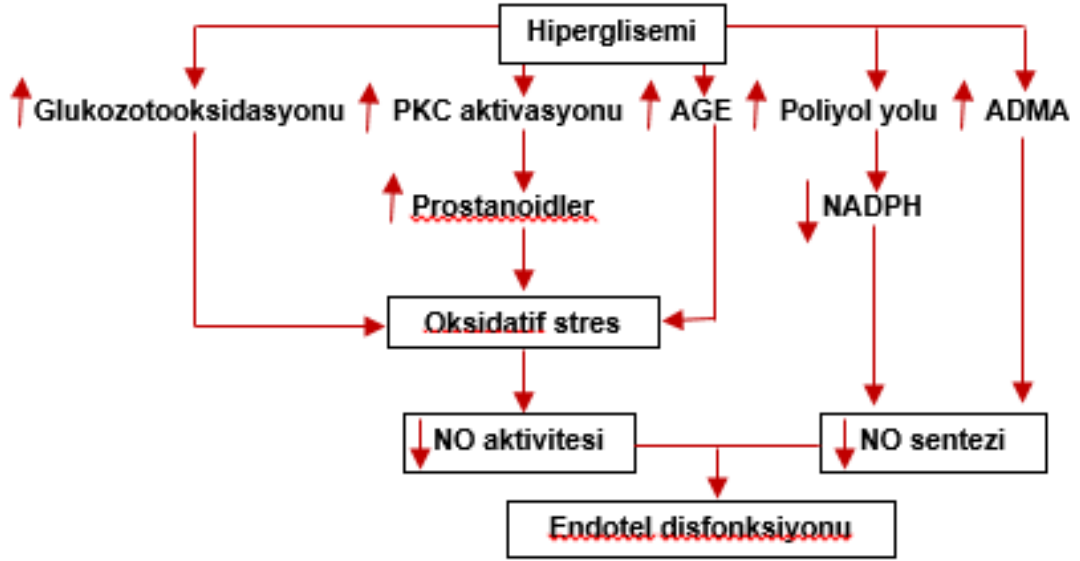
Plazminojen plazminojen aktivatörleriyle (t-PA ve urokinaz) plazmine (fibrinolizin) dönüşür. Plazmin, pıhtının lokalize kalmasını ve fibrin ağınını eriterek yaranın iyileşmesini sağlar. Ateroskleroz gelişiminde fibrinojen, fibrin oluşumunu artırarak kanın viskozitesini artırır ve hasar görmüş damar duvarına LDL partiküllerinin ve pıhtılaşma faktörlerinin bağlanmasını sağlar.

Ateromatöz lezyonda prokoagulan, proagregan ve antifibrinolitik aktivite artışı olur. Normal intimada fibrin 1 ile birlikte fibrinojen de bulunur ve fibrinolitik sistem dengededir. Ateroskleroz progresyonunda ise trombüs gelişimine neden olan fibrin 2 düzeyi artarken, fibrinojen konsantrasyonu düşer.⁴¹

2.2.11. Koroner Arter Hastalığı ve ADMA (Asimetrik Dimetilarjinin)

NO aracılı vazodilatasyonun bozulmasının neden olduğu endotel disfonksiyonu aterosklerozun gelişimdeki ilk basamaklardan biridir.⁴²

ADMA, kardiyovasküler mortaliteye neden olan ateroskleroz gelişimindeki risk faktörlerindendir.⁴³ ADMA, NO sentazın endojen inhibitörüdür ve ADMA yoluyla endotelial NO sentezinin inhibisyonu direkt olarak endotel disfonksiyonu, hipertansiyon ve kardiyak fonksiyonlarda depresyona neden olur.⁴⁴ ADMA'nın endojen NO sentaz inhibisyonu NO ürünlerinin azalmasına ve endotel bağımlı vazodilatasyonun inhibe olmasıyla koroner endotelial disfonksiyona ve koroner vazospazma yol açar (Şekil 6).⁴²



Şekil 6. Aterosklerozda ADMA

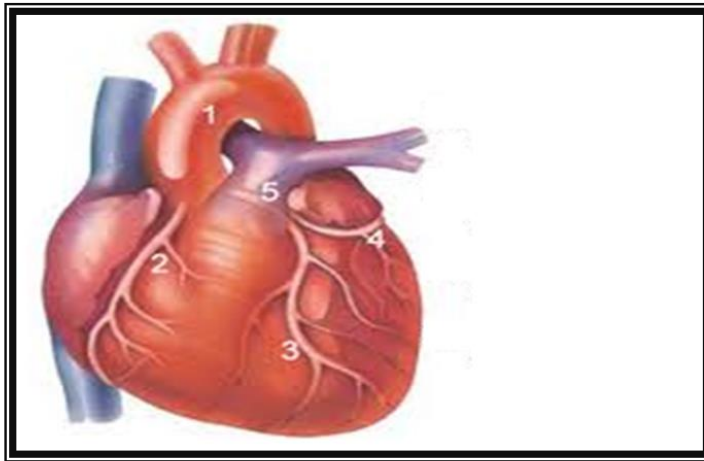
2.2.12. Koroner Arter Hastalığı ve Lipoprotein (a)

Lipoprotein (a) ya da Lp (a), apolipoprotein (a) diye bilinen plazminojene benzer bir glikoprotein LDL'ye kovalent olarak bağlanmasından oluşan bir kompleks makromoleküldür.⁴¹ Lipoprotein (a) 1963 yılında Berg tarafından keşfedilmiş olup, yapılan çalışmalar yüksek lipoprotein (a) düzeylerinin iskemik kalp hastalığı riskini arttırdığını göstermiştir.⁴⁵ Lipoprotein (a), Plazminojene yapısal benzerliği nedeniyle yarışmalı şekilde fibrinolizisi engeller. t-PA tarafından yapılan plazminojenin aktivasyonunu (plazminojenin plazmine dönüşümünü önleyerek) bozarak fibrinolitik sistemi inhibe eder.

Lipoprotein (a), trombüs oluşumunu ve oksidasyonu artırır. LDL gibi makrofajlara bağlanıp köpük hücre oluşumuna neden olur ve TGF- β 'yı inhibe ederek aterosklerotik plak gelişimine katkıda bulunur.⁴⁶

2.3. Koroner Arterlerin Anatomisi

Kalbi temel olarak LAD, sirkumfleks arter (CX) ve sağ koroner koroner (RCA) isimli 3 atardamar besler. Aortadan sağ ve sol valsalva sinüsünden doğan iki arter kalbi çevreleyen dallara ayrılarak miyokardın oksijenizasyonunu sağlar.⁴⁷ Bu arterler sağ (RCA) ve sol koroner (LCA) arterlerdir. Sol ana koroner arter çıkan aortanın sol valsalva sinüsünden doğar. Aortadan çıktıktan yaklaşık 2 cm sonra pulmoner turunkusun arkasından geçer ve burada 2 dala ayrılır: LAD ve CX. LAD, sol ventrükülün ön yüzünde seyrederek ve sol ventrikül ve interventriküler septumun ön kısmını kanlandırır, diagonal ve septal dalları vardır. CX, kalbin arkasında seyrederek ve obtus dalı vardır ve sol atrium, sol ventrikülün yan ve arkasını besler (Şekil 7). RCA, ortanın sağ valsalva sinüsünden doğar. Sağa ve aşağıya doğru ilerler ve interventriküler septumun arka yüzünü ve sağ ventrikülü kanlandırır. Akut marjin, sol ventrikül, sinüs düğümü arteri dalları vardır ve bazen posterior descending dalını da verir.⁴⁷

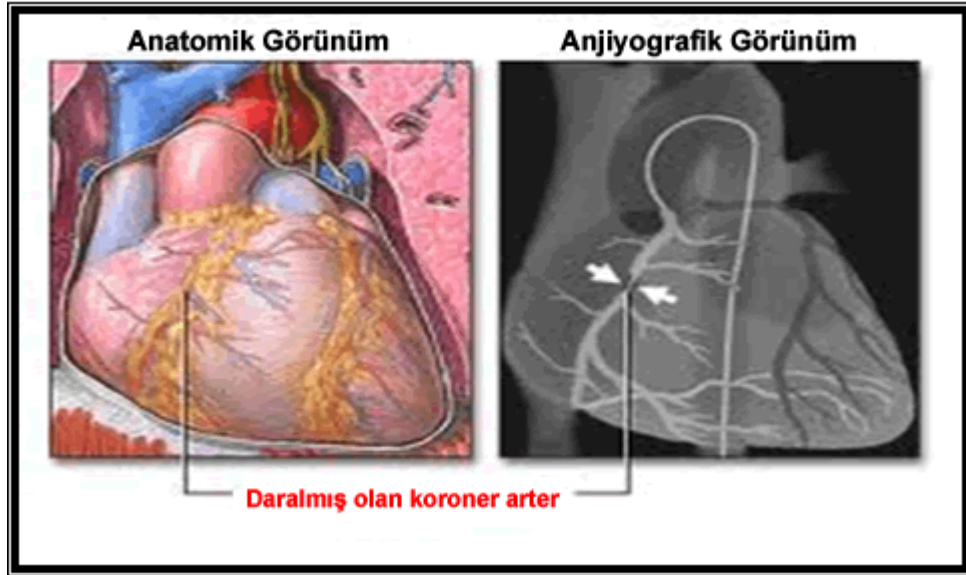


1. Aorta
2. Sağ koroner arter
3. Sol ön inen koroner arter
4. Sirkumflex koroner arter
5. Sol ana koroner arter

Şekil 7. Koroner Arterlerin Anatomisi

2.4. Koroner Anjiyografi

Koroner arterlerdeki darlık ve tıkanıklıkları ve sol ventrikülün kasılma gücü ve duvar hareketlerini tespit etmeye yarayan kol veya kasık bölgesindeki atardamara yerleştirilen kateterin kalp damarlarına kadar ilerletilip radyasyon içeren kontrast maddenin enjeksiyonu ile koroner arter hastalarındaki koroner damarların bir, iki veya üç damar tıkanıklık durumlarına göre görüntülenerek değerlendirilmesi yöntemidir (Şekil 8).⁴⁷



Şekil 8. Koroner Anjiyografi

2.5. VEGF ve Anjiojenez

VEGF, homodimerik yapıda 34-46 kDa ağırlığında heparin bağlayan bir glikoproteindir. VEGF geni 6. kromozomun kısa kolundadır ve 8 ekson, 7 intronu bulunan 14 kb'lık kodlama bölgesi içerir.

VEGF ilk olarak 1983 yılında Senger ve arkadaşları tarafından tümör asit sıvısından üretilerek güçlü vasküler permeabilite

faktörü (VPF) olarak tanımlandı. VEGF megakaryositlerden kaynaklanır ve trombositlerin α granüllerinde depo edilir.⁴⁸ VEGF endotel hücresine özgüdür ve VEGF reseptörleri tirozin kinaz yapısındadır.

VEGF sistin bağımlı süperaillesine ait bir sinyal proteindir ve anjiojenezin anahtar molekülüdür. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve PlGF (plasental büyüme faktörü) vasküler endotelial büyüme faktörleri süper ailesinin üyesidirler.

VEGF-A anjiojenez, endotel hücre mitozu, endotel hücre göçü, kan damarı lümeninin oluşumu, fenestrasyon gelişimi, vazodilatasyon makrofaj ve granülosit kemotaksisi ve indirekt olarak NO salınımını sağlar. VEGF-B, Embriyonik anjiojenezde, VEGF-C lenfanjiojenezde, VEGF-D akciğer bronşiollelerini çevreleyen lenfatiklerin gelişiminde görev alır. VEGF-E güçlü bir mitojen ve permeabilite artırıcı faktördür. VEGF-F, VEGF-A'dan daha az olarak anjiojenez, vasküler permeabilite artırıcıdır ve PlGF vaskulogenezde önemlidir, yine iskemi, inflamasyon ve kanser anjiojenezinde gereklidir. Etkilerini transmembran tirozin kinaz reseptörlerinin aktivasyonlarıyla gösterirler. Reseptör tirozin kinazlar (RTK), 1300 kadar aminoasitten oluşur ve iki kısım içerirler. İlk kısım, tirozin kinazın etkinliğinin olduğu intrasellüler kısım, ikinci kısım ise, membran köprüleri ve ligand bağlama bölgeleri içeren 7 adet Ig benzeri yapı içeren ekstrasellüler kısımdır.⁴⁹

VEGF reseptörü özgül liganda bağlandığında dimerizasyon meydana gelir ve bu da hücre içi sinyal yolu iletimi için birkaç proteini fosforile ederek ikincil habercilerin oluşmasına katkıda bulunarak, mesajın hücre içinde taşınmasını sağlar.⁵⁰ Bu reseptörler; VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3 (Flt-4)'dir. Flt-1 (VEGFR-1) ve KDR (VEGFR-2) aktivasyonu embriyonik gelişimden sorumlu iken KDR aktivasyonu

yetişkinlerde anjiojenez için gerekli vasküler permeabilite artışı ve endotel hücre göçünden sorumludur. Flt-4 (VEGFR-3) aktivasyonu lenfanjiojenezle ilişkilidir.⁵¹

VEGFR1'nin inaktivasyonu apoptozu durdurarak endotel hücre sayısını artırır ve damar lümeni tamamen obstrüksiyona uğrar. VEGF R2'nin inaktivasyonu embriyoda endotel hücre eksikliğiyle embriyonun ölümüne neden olur. VEGFR3 her ne kadar lenfatiklerle ilişkili ise de inaktivasyonu anormal damar gelişimi ve kardiyak yetmezlikle sonuçlanır. VEGFR-2 (KDR) aktivasyonu koroner arter hastalığındaki anjiojenez ve vasküler tamirde kritik rol oynar.⁵²

VEGF, endotel hücreleri üzerinde permeabilite artırıcı etkisinin yanında proliferasyon, migrasyon ve anjiojenez (yeni kan damarlarının gelişimi) etkileri de bulunmaktadır. VEGF'nin endotel hücreleri üzerine direkt mitojenik etkisi endotelial prokoagülan aktivite artışı, protein ekstravazasyonu ve kan damarı hiperpermeabilitesine neden olur.⁵³ Anjiojenez vasküler permeabilite artışı ve vazodilatasyonla başlar. VEGF anjiojenez esnasında endotel hücrelerinin apoptozunu önler.⁵⁴ Yeni damar gelişimiyle ilgili olan bu sinyal molekülünün yokluğu endotel hücrelerinin apoptozuyla sonuçlanır. VEGF, pıhtılaşma kaskatını tetikler ve endotel hücrelerinin gelişimi için fibrin yapıda bir çevre oluşturur.⁵⁵

Anjiojenez, embriyogenezde organ gelişimi ve diferansiyasyonu için vasküler desteğin sağlanmasında olduğu gibi postnatal dönemdeki yara iyileşmesi, doku ve organ rejenerasyonu, endometrium ve korpus luteum rejenerasyonu gibi fizyolojik süreçlerde de gereklidir. Patolojik olarak ise tümör gelişimi ve metastazında, kronik inflamatuvar hastalıklarda meydana gelir.⁵⁶

2.6. Koroner Arter Hastalığı ve VEGF Gen Polimorfizmi

Gen, DNA üzerinde bulunan kalıttan sorumlu bölgedir. Modern genetik biliminin gelişmeye başlaması, 1856 yılında botanik profesörü olan Gregor Johann Mendel'in kalıtımla ilgili çalışmalarıyla olmuştur. Bir organizmada bulunan genetik materyalin tamamı olarak nitelediğimiz genomun %1-2'lik kısmı kodlanmaktadır ve bir insan genomunda yaklaşık 1,5 milyon adet tek nükleotidlik polimorfizm olduğu tespit edilmiştir. Anjiojenezi düzenleyen genlerdeki genetik çeşitlilik anjiojenezle ilişkili kanser, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, artirit, psöriyazis, diyabetik retinopati gibi hastalıklara yatkınlığın artışı ile bağlantılıdır.⁵⁷ Anjiojenez kollateral damar gelişiminde rol oynar ve VEGF koroner kollateral gelişimindeki majör vasküler mediyatördür.⁵⁸ Ciddi iskemi varlığında yeterli kollateral akım gelişebilir.⁵⁹ Anjiojenik sitokinler içinde bulunan VEGF hipoksik-iskemik durumda hipoksik hücrelerden yayılır ve endotelial hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak endotelial hücre bölünmesi ve anjiojenezi aktive eder.⁶⁰ Hipoksi, düşük oksijen düzeyleri için tanımlanmış bir durumdur ve normal embriyonik dönemde doğal olarak meydana gelen bir olgudur. Organogenez ve anjiojenez, lokal hipoksik çevrenin sitümülasyonu ile gelişir. Hipoksi durumunda VEGF ekspresyonu, hipoksi indükleyen faktör 1 α (HIF-1 α)'nın stabilize olmasıyla stimüle olur.⁶⁰

Düşük oksijen basıncı ile hipoksi indükleyen faktör 1 (HIF-1) indüklenir. HIF-1'in hipoksi yanıt elemanı HRE'ye bağlanması VEGF'nin transkripsiyonuna neden olur ve VEGF mRNA sentezine yol açar. HRE, VEGF artışı ile ilgili HIF-1 için bağlanma yeri içeren bir gen bölgesidir.

VEGF'nin hipoksik regülasyonu posttranskripsiyonel mRNA'nın stabilize olması ile meydana gelir. VEGF ekspresyonu diğer

büyüme faktörleri (TNF- α , TNF- β , EGF, PDGF, IGF-1, IL-1 α , IL-1 β , FGF, IL-6 ve IL-8) ve sitokinlerle ayrıca bir takım fizik güçler ve stresle de indüklenebilir.⁶¹ Anjiojenezi düzenleyen çok sayıda gen vardır ve polimorfizm ile ilgili en çok araştırılanı VEGF'dir.⁵⁷ Anjiojenik situmulus varolan damarlarda endotel hücrelerini ve heparanazı aktive ederek anjiojenik yolun VEGF, FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) gibi büyüme faktörlerini, anjiojenik kemokinleri, IL-8 reseptörleri ve kollajen-1 yapımını upregüle ederken anjiojenik yolun trombospondin (TSP), anjiostatik kemokinler, kollajen 4 ve 5 yapımını downregüle eder. Prokoagülan aktivite artışı matriks metalloproteazlarının sekrete edilmesiyle bazal membran ve ekstrasellüler matriksi degrade eder ve endotel hücreleri kapiller tomurcuklanma bölgesine göç etmeye başlar. Kapiller tomurcuklanma alanında lümen gelişerek bazal membran yeniden şekillenir. 2 kapiller tomurcuklanma kapiller düğümle birleşir ve ikinci jenerasyon kapiller tomurcuklanma da şekillenme başlar.⁵³ Koroner kolateraller, koroner arterlerin yapısından gelişen, koroner arterleri birbirlerine bağlayan, fonksiyonel olmayan ancak ciddi iskemi durumunda miyokardın perfüzyonunun devamlılığını sağlayan rudimanter damar ağıdır. Oluşan rudimanter damarlar uyarı etkisiyle özelleşip normal damarsal yapı halini alır. Basınç gradiyentinin artışı ile rudimanter damarlara kan akımı artar. Yaklaşık altı ay içinde bu ilkel yapılar olgun kolaterallere dönüşür.⁶² Bu gelişim inflamasyona uğrayan genlerin sayısı, lipid metabolizması, koagülasyon, vasküler tonusun regülasyonu gibi faktörler nedeniyle kişiden kişiye farklılık gösterebilir.

Koroner kolateral dolaşım kalpte iskeminin oluşturabileceği hasarları önlemeye yönelik kritik öneme sahip adaptasyon mekanizmasıdır.⁶³ Koroner kolateral dolaşım aterosklerotik vasküler hastalıklarda doğal kaçış mekanizmasıdır.⁶⁴ Çünkü KAH'da kolateral damar gelişimi ve anjiojenez ejeksiyon fraksiyonunun korunması, enfarkt sahasının sınırlanması, antiaritmik, antiiskemik etkileri, serbest duvar ve

septum rüptürü ve anevrizma gelişimini azaltmaları yönünden miyokardı korumaktadır.⁶⁵ KAH'da kollateral damar gelişimi ve anjiyenez kalp krizini ve kardiyovasküler mortalite sıklığını azaltmaktadır.⁶⁴ özellikle bazı hastalarda akut okluzyonda iskemi belirtileri olmadan yeterli koroner kollateral akım sağlanabilmektedir.⁶³ Kardiyak VEGF konsantrasyonu koroner kollateral gelişimiyle ilişkilidir.⁵⁸ Kalp krizi geçiren kişilerde VEGF düzeyinin kriz geçirmeyenlere göre yüksek bulunması iskemik kalp hastalıklarında VEGF uygulanımını yeni tedavi yaklaşımı olarak gündeme getirmiştir. VEGF, NO sentezini arttırıp vazodilatasyonu indükler, böylece yeni kan damarları oluşumu ve vazodilatasyonla perfüzyonu arttırarak antiaterojenik etki göstermiş olur. Tavşanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, VEGF izoformunun internal iliak artere uygulanımı sonrasında (aynı taraf arka extremitede şiddetli iskemi oluşturularak) yapılan anjiyografide, ana damarın distal noktasından kollateral damarın progresif lineer tarzda geliştiği, anjiyenez ve doku perfüzyonunun arttığı gösterilmiştir.⁶⁶

Genetik polimorfizmler, hastalıklara karşı duyarlılıkta kişisel farklılıkları belirlememizi sağlar. Genetik çeşitliliğin iki boyutu mevcuttur; Gen fonksiyonunda tamama yakın bozulmayı içeren, fenotipik özellik gösteren mutasyonlar ve diğeri ise fenotipik özellik göstermeyen gen fonksiyonunda incelik isteyen köşk değişikliklere neden olan polimorfizmlerdir.⁵⁷ Gen polimorfizmleri bir hastalık riskini arttırıp azaltırken, bazı polimorfik alleller ise yalnızca çevresel bir faktörün etkisi altındayken riski etkileyebilmektedir. Hastalık gelişiminde genlerin ve varyasyonlarının, çevresel risk faktörleriyle birlikte etkisi, tek tek göstermiş oldukları etkinin toplamından daha fazla olabilmektedir.⁶⁷ HIF-1  , VEGF'nin fonksiyonel polimorfizmlerinin ekspresyonunu yapar ve artmış VEGF düzeyleri kollateral formasyonu gelişimini direkt olarak uyarır.⁵⁸ Uygun genlerin regülasyonu ve diğer biyolojik pro  eslerle oluşan fonksiyonel polimorfizm aterosklerotik plak gelişimi ile ilişkilidir.⁶⁸ VEGF

geni, en az 25 çeşit polimorfizm içeren yüksek polimorfizme sahip bir gendir.⁵⁷ VEGF'nin çeşitli pozisyonlarındaki fonksiyonel polimorfizmlerinin aterosklerotik hastalık, kronik kalp yetmezliği ve koroner kolateral gelişimine katkıda bulunabileceğini destekleyen hipotezler bulunmaktadır.⁵⁸ Bu durumda VEGF'nin fonksiyonel polimorfizmleri koroner arter hastalığındaki iskeminin tetiklediği anjiojenez için genetik bir regülatör ya da moleküler biyokimya için bir belirteç olabilir.

2.7. Koroner Arter Hastalığı ve Diğer Kimyasal Mediyatörler

2.7.1. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit (NO), vasküler endotelde endotelial nitrik oksit sentetaz (eNOS) enzimi tarafından L-argininden sentezlenen vazoaaktif bir maddedir ve vasküler düz kas gevşetici etkisi ile endotel bağımlı vazodilatasyonun ana mediyatörüdür.⁶⁹ Nitrik oksitin nörotransmisyon, immun defans, programlı hücre ölümü olan apoptoz ve hücre motilitesi gibi biyolojik süreçlerde rolü vardır. Bazal NO salınımının bazal vasküler tonüsün sağlanmasındaki ve kan basıncının düzenlenmesindeki rolü çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.⁷⁰

Vazodilatasyon sağlanmasında NO anahtar rol oynamaktadır. Nitrik oksidin vasküler endotelde ateroskleroz gelişimini önleyici çeşitli etkilerinin olduğu gösterilmiştir.⁷¹ Trombosit ve lökositlerin endotele yapışmasını önlerken, vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu azaltır; LDL oksidasyonunu kısıtlayarak LDL'nin aterojenik LDL'ye dönüşümünü engeller.⁷² Endotelial nitrik oksit sentetaz enziminin kronik inhibisyonunun ateroskleroza hızlandırdığı ve kan basıncında yükselmeye neden olduğu hayvan deneyleriyle ortaya

konmuştur.⁷¹ Vazospastik anginalı hastaların koroner arterlerinde NO aktivitesinin düşük olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, azalmış NO salınımının ateroskleroz gelişimi üzerindeki etkisini desteklemektedir.

2.7.2. Neuregulin (NRG)

Neuregulinler, EGF ailesi ile ilişkili proteinlerdir. Memelilerde neuregulin ailesi üyeleri 4 gen grubunun ürünleridir.⁷³ Sırasıyla NRG1, NRG2, NRG3 ve NRG4'tür. Neuregulinler insanda NRG1 geni tarafından kodlanan 44-kD ağırlığında bir glikoproteindir ve kalp ve sinir sisteminin normal gelişimi için gereklidir. ErbB2 ve ErbB4 reseptörlerinin varlığı neonatal ve adult fare ventriküllerinde gösterilmiştir. Bu reseptörlerin ligandları heregulin/neuregulin ve EGF içerir ve hepside mitojeniktir. Apoptoz inhibe edildiğinde kardiyak miyosit proliferasyonu ve hipertrofi başlar. ErbB2/ErbB3/heregulin eksikliği olan farelerde intra uterin ölüm, kardiyak trabekül eksikliği ve endokardiyal yastık defektleri meydana gelir.⁷⁴

HER2'nin kardiyoprotektif olan sinyal yolları NFκ-B içerir ve bu kardiyak peptif büyüme faktörlerinin regülasyonunu sağlar.⁷⁵ Prensipten olarak kardiyak miyositlerinde olan HER2 reseptör ligandları apoptoza karşı koruyucudur. İskemi, yüksek tansiyon ve oksidatif stres ile HER2 reseptörlerinin blokajı apoptoza yol açar. Anjiyogenezin yanı sıra hücre büyümesinde, farklılaşmasında, proliferasyonda, apoptozda ve metabolizmada etkili olan moleküllerden biridir.⁷⁶ NRG1, Human epidermal growth (HER) reseptör ailesini aktive eder (HER2/HER3) ve EGFR'lerin (Epidermal büyüme faktörü reseptörü) ekspresyonları barsak, beyin, prostat ve kardiyak doku üzerinde etkilidir.⁷⁷ Stres ve egzersiz ile aktive olmaktadır. Yetişkin kalbinde a ve b izoformları bulunmaktadır. Hedhli ve

arkadaşları endotelyal neuregulinin kalbi iskemik hasara karşı korumada önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir.⁷⁶

2.7.3. Paraoksonaz (PON 1)

PON1, molekül ağırlığı 44 kDa olan 354 amino asitli, aktivitesi için kalsiyum (Ca^{+2}) gerekli olan bir glikoproteindir.⁷⁸ PON1, Karaciğerde sentezlenir, organofosfatların, arilesterlerin, okside fosfolipidlerin ve lipid peroksitlerin hidrolizinde görev alan bir serum esterazıdır.⁷⁹ İnsan serumunda, HDL'nin Apo A1 ve klasterin içeren özel bir bölümüne bağlı bulunan PON1'in, HDL'yi oksidasyondan koruduğu ve LDL'nin oksidatif modifikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.⁸⁰ Plazmadaki PON1, HDL'nin apo A1 aracılığıyla kolesterol toplanması esnasında N terminali aracılığıyla endotel, interstisyum ve düz kas fosfolipidlerine difüze olarak LDL birikim ve oksidan hasar bölgelerine girer.⁷⁸ PON1 hem LDL hem de HDL'yi oksidasyondan korur, ancak okside-LDL tarafından bu koruyuculuk kapasitesi azaltılmaktadır.⁸¹ Arter duvarında LDL'nin oksidasyonu ateroskleroz lezyon gelişiminde önemli bir basamak olup PON1, bu okside LDL'deki aktif lipitleri yıkarak, arter duvar hücrelerindeki inflamatuvar cevabı önlemektedir.⁷⁹ HDL yalnızca ateroskleroza karşı değil aynı zamanda inflamasyonun indüklediği organ hasarına karşı da koruyucudur.⁸² HDL arter duvarındaki köpük hücrelerini azaltan bir antioksidandır.

Antioksidan özelliği olan bu enzimin düzeyi sigara içimi, kronik böbrek yetmezliğinde, ateroskleroz ve menapozda düşmektedir. Düşük serum PON1 düzeyleri artmış koroner arter hastalığı ile ilişkilidir.

2.7.4. Okside LDL

LDL'nin serbest radikallerle etkileşimi sonucu okside LDL oluşur. LDL'nin oksidatif modifikasyonunu intima hasarıyla infiltrasyonu ve ardından makrofaj hücrelerinin bu bölgeye göçü izler. Makrofajlar okside olmuş LDL'lerle etkileşime girerek köpük hücrelerini ardından ise yağlı çizgilenmeyi meydana getirir. Bunlar zamanla arterde tıkanmaya ve ateroskleroza neden olur. Yapılan vaka kontrol çalışmaları, kalp krizi geçirmiş ve koroner aterosklerozlu veya bozulmuş endotel fonksiyonu olan koroner arter hastalarında okside LDL'ye karşı Ig G titrelerinin yüksek olduğunu göstermiştir.⁸³ Aterosklerotik lezyonların meydana geldiği endotelial hücrelerinde, düz kas hücrelerinde, makrofajlarda ve lenfositlerde LDL okside olabilme özelliğine sahiptir. İlk çalışmalarda okside LDL'nin makrofajlarda kolesterol toplanmasına neden olarak proaterojenik özellik gösterdiği bildirilmiş ve aterojenik oluşumda LDL oksidasyonun önemli bir basamak oluşturduğu hipotezi kurulmuştur.⁸⁴ Okside LDL'nin makrofajlardan makrofaj koloni stimulan faktör ve monosit kemoatraktan protein-1 serbestleşmesini stimüle ettiği ve bu maddelerin monositlerin toplanmasına neden olarak yağlı çizgi oluşumunu kolaylaştırdığı tespit edilmiştir.⁸⁵ Okside LDL endotel hücrelerinde apoptoz ve erken yaşlanmaya neden olarak ateroskleroza hızlandırmaktadır.⁸⁶

2.7.5. Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Antioksidanlar, hücreleri serbest oksijen radikallerinin etkisinden korur. TAK, serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur ve TAK ile radikale karşı antioksidanların verdiği yanıt tayin edilmektedir.

A, C, E vitaminleri, glutatyon, katalaz, flavonoidler, koenzim Q, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan moleküller serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek oksidatif reaksiyonları yavaşlatır veya durdururlar. Fizyolojik şartlarda hücreler, oksidatif hasara karşı enzimatik süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzimleri olarak ve enzimatik olmayan vitaminler ile antioksidan aktivite gösterirler. Ancak, ROS ürünleri arttığı zaman oksidan ve antioksidan faktörler arasındaki denge oksidatif şartlar lehine bozularak TAK'i belirgin şekilde azaltır, oksidatif stres markırlarını yükseltir.⁸⁶ Oksidatif stres, iskemi-reperfüzyon hasarı, anemi, artrit, enflamasyon, nörodejenerasyon, parkinson, yaşlanma, Alzheimer, demans, diyabet, romatoid artirit ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimine neden olur. Serbest radikaller aracılığıyla lipoproteinlerin oksidatif hasarı, bunların vasküler duvara alımlarında olumsuz nitelikteki bir takım olaylara neden olabilmektedir.⁸⁷ Bu nedenle lipoproteinlerin oksidasyona duyarlılığında etkili olan faktörler ve bunların koroner arter hastalığının gelişimi ile ilişkisi önemli bir araştırma konusudur. Özellikle bu faktörler içerisinde E vitamini ve β -karoten gibi antioksidan vitaminlerin lipoprotein içeriği yer almaktadır.⁸⁸ C vitamini, E vitamininin tekrar kullanılabilir olmasını sağlaması açısından, büyük miktarlarda bulunan ürik asit ise serbest radikallere karşı koruyucu olması sebebiyle önemli diğer antioksidan moleküllerdir.⁸⁹ Oksidatif stres altında HDL'nin oksidasyonu da artar ve antiaterojenik etkisi kaybolur, hatta zararlı hale dönüşerek proaterojenik özellik kazanabilir.⁹⁰

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Araç ve Gereçler

- Tampon AL (Liziz tamponu),
- Proteinaz K,
- Etanol (96%-100%),
- Tampon AW1 (sitotrop tuzu içerir),
- Tampon AW2 (sodyum azit içerir),
- 1X TBE (12 g Tris, 6 g Borat, 4 mL 0,5 μ EDTA, pH 8),
- Agaroza,
- Etidyum bromür,
- DNA jel yükleme tamponu,
- DNA standartı,
- BSA,
- Buffer,
- Bgl II restriksiyon enzimi (The ENZYME Company–BIORON),
- Potasyum dihidrojen fosfat dihidrat (Riedel-deHaën),
- Disodyum hidrojen fosfat 12 hidrat (Merck),
- Sodyum klorür (Pancreac),
- Potasyum klorür (Sigma),
- Potasyum persülfat (Aldrich),
- 6-hidroksi-2, 5, 7, 8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Trolox) (Aldrich),
- 2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS) (Sigma),
- Pipet uçları (steril),
- 1.5 mL mikrosantrifüj tüpleri,
- 2 mL toplama tüpleri,
- DNeasy mini-kolon,

- Mikrosantrifüj,
- Su banyosu,
- Mikrodalga fırın,
- Güç kaynağı,
- UV-transilüminatör (GENE Genius imaging system cihazında),
- Spektrofotometre (Spectronic-Genesys 2PC),
- ELISA okuyucu (Versemex),
- Derin Dondurucu (Jouan WX 530),
- Etüv (Heraeus),
- Santrifüj (Jouan MR 18 22),
- Vorteks (Firlabo 1640),
- Mikropipet (Socorex 100-1000µL, Biohit 10-100 µL),
- Santrifüj tüpü,
- Mezür,
- Balon joje,
- Ependorf tüp,
- Cam tüp,
- Portüp,
- Spatül,
- Erlen,
- Eldiven,
- İnsan tam kanından izole edilen genomik DNA örnekleri,
- Pipet.

3.2. Hasta ve Kontrol Grubunun Nitelikleri

Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Hastanesi Göğüs ve Kalp Damar Cerrahisi Kliniği'nde 1 Ekim 2011 ile 1 Mayıs 2012 tarihleri arasında koroner anjiyografi ile koroner arterlerinde darlık tespit edilip ameliyat kararı verilen 123 hasta çalışmaya dahil edildi. Hasta grubun kan örnekleri operasyon öncesi alınmıştır.

Koroner arter hastalığı teşhisi konulmuş ve ameliyat kararı verilen 123 birey hasta grubunu; 28 sağlıklı birey ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Hasta ve kontrol grubuna uygulanan anket formu Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tüm hastalar çalışma hakkında bilgilendirilerek, çalışmaya dahil edildiklerine dair yazılı bilgilendirilmiş onamları alındı. Çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındı (Karar no: 312, 12.10.2011).

3.2.1. Hasta Dışlanma Kriterleri

1. 18 yaşından küçükler.
2. Koroner ateroskleroz dışında diğer kardiyak hastalığı (kapak, tümör, anomali vs. hastalığı) olanlar.
3. Koroner ateroskleroz dışında artirit, psöriyazis, kanser hastalığı olanlar.

3.3. Genel Değerlendirme ve Ölçümler

Çalışmaya 123 koroner arter hastası ve 28 gönüllü sağlıklı kontrol alındı. Onam formu imzalandıktan sonra dışlanma kriteri taşımayan hastalar aterosklerotik kalp hastalığı açısından taşıdıkları yaş, sigara, diyabet, hipertansiyon, cinsiyet gibi risk faktörleri sorgulanarak anamnezleri alındı, fizik muayeneleri yapıldı ve anket formları dolduruldu (Tablo 1). Hasta ve kontrol grubu için VEGF C/A polimorfizmi allel dağılımına göre gruplandırıldı.

Tablo 1. Hasta ve kontrol için anket formu.

Adı-Soyadı:
Cinsiyet:
Yaş:
Boy:
Vücut Kütle indeksi (VKİ) (kg/m ²):
İlaç Kullanımı: Evet () Hayır ()
Tanısı konulmuş diğer hastalık / hastalıklar:
Ameliyat:
Soygeçmiş:
Sigara kullanımı:
İçmeyen () İçen ()

3.4. Kan Örneklerinin Toplanması

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerden alınan kan örneklerinin bir kısmı 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılarak serum örnekleri elde edildi. VEGF, NO, Neuregulin, Okside-LDL, Paraoksonaz (PON1) ve TAK ölçümleri için ayrılan serum örnekleri -20°C'de dondurularak çalışılacak güne kadar saklandı. Çalışma grubundan alınan kan örneklerinin diğer kısmı K₃EDTA'lı tüplere toplanarak DNA izolasyonu için kullanıldı. Lipit ölçümleri Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında yapıldı.

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Kandan DNA İzolasyonu

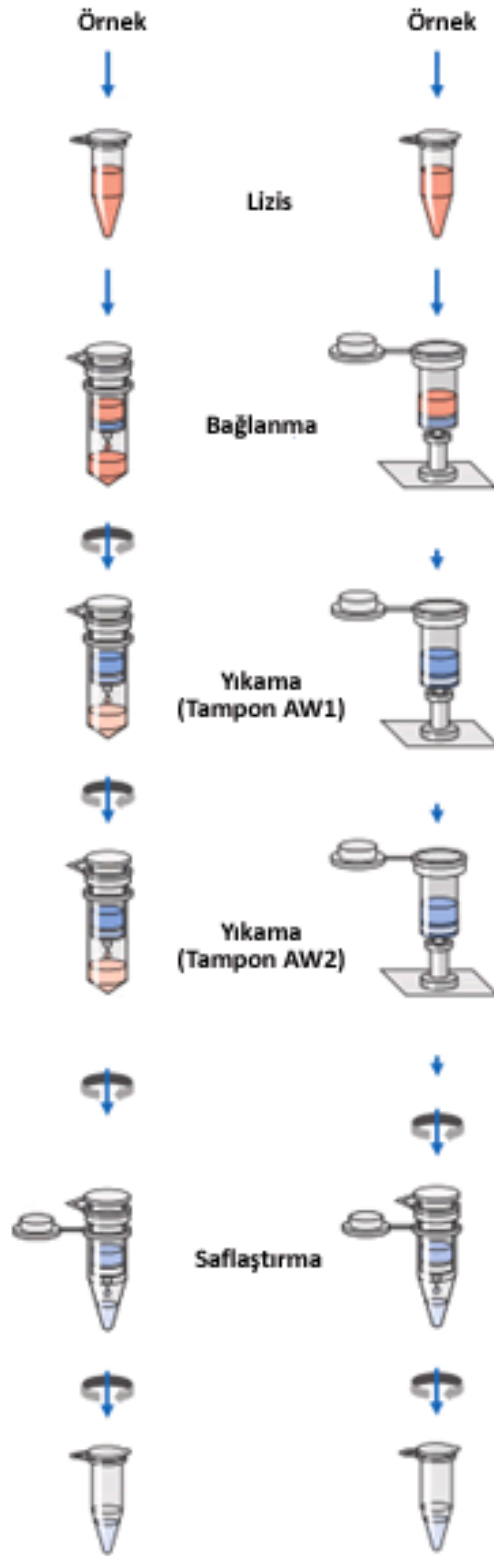
12 saatlik açlık sonrası koroner arter hastalarından ve sağlıklı kontrollerden alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu (QIAamp DNA Micro Kit) aşağıdaki deneysel prosedür ile yapıldı (Şekil 9).

3.5.1.1. Deneysel Prosedür

1. Pipetle 20 µL proteinaz K 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
2. 200 µL kan örneği mikrosantrifüj tüpüne ilave edildi.
3. 200 µL Buffer AL örneğe ilave edildi ve 15 saniye vorteksle karıştırıldı.
4. 56°C'de 10 dakika kuru ısıtıcıda (Major science DRY BATH INCUBATOR) inkübe edildi (Lizis sonrası 56°C'de 10 dakikalık

inkübasyonla DNA izolasyonu maksimuma ulaşır, daha uzun süreli inkübasyonun kaliteli DNA üretimine etkisi yoktur).

5. Karışım içindeki damlaları uzaklaştırmak için kısa süreli santrifüj yapıldı.
6. Örneğe 200 µL etanol (96–100%) ilave edildi ve 15 sn. vorteksle karıştırıldı. Daha sonra yine kısa süreli santrifüj yapıldı.
7. Bütün içerik mini kolon içeren tüpe pipetle aktarıldı ve 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Filtrat içeren tüp atıldı ve yerine mini kolon içeren tüp temiz tüplere yerleştirildi.
8. 500 µL AW1 tamponu pipetlenerek mini kolon içeren tüpe ilave edilerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtrat içeren tüp atıldı.
9. 500 µL AW2 tamponu pipetlenerek mini kolon içeren tüpe ilave edilerek 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Filtrat içeren tüp atıldı.
10. Mini kolon içeren tüp mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve 1 dakika santrifüj edildi. Filtrat içeren tüp atıldı.
11. 200 µL AE tamponu pipetlenerek mini kolon içeren tüpe ilave edilerek 1 dakika bekletildi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtrat içeren tüp atıldı (200 µL insan kan örneğinden 6 µg DNA izole edilir ve AE tamponu ilavesiyle -20°C'de uzun yıllar saklanabilir).



Şekil 9. DNA İzolasyonu

3.5.1.2. İzole Edilen DNA'ların PCR Öncesi Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Amaçlı Görüntülenmesi

% 1'lik agaroz jel için 1 g agaroz 100 mL 1X TBE içerisine konuldu. Mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyene kadar kaynatıldı ve soğutuldu ve içine 6 µL etidyum bromür eklendi (Floresan işaretlemede kullanılır, DNA'ya bağlanır ve DNA'yı UV ışık altında görünür hale getirir. Aynı zamanda DNA onarım mekanizmasını bozarak mutajenik, teratojenik ve kanserojen etkisi vardır, çalışırken çeker ocak ortamında çalışılması gerekir). Hava kabarcıklarının oluşmamasına dikkat ederek karıştırıldı. Jel tarakları elektroforez tankına (owl marka) yerleştirildi ve daha sonra jel döküldü. Hava kabarcığı oluşmuş ise pipet ucu ile ortamdan uzaklaştırıldı. Tamamen donduktan sonra taraklar kuyucukların bozulmamasına özen gösterilerek çıkartıldı ve üzerine 1X TBE bulunan tampon çözeltisi tanka aktarıldı. İzole edilen genomik DNA örneklerinden 10µL alınarak 5 µL jel yükleme boyası (%0.05 Bromofenol mavisi, %15 Ficol 400, %10 Gliserol ve 1X TBE tamponu ile 1 mL olacak şekilde karıştırıldı) eklendi, pipet yardımıyla iyice karıştırıldı ve jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi.

Elektrotlar yerleştirildikten sonra voltaj 80 V olarak ayarlandı (500 miliamper ve oda sıcaklığında). 1 saat yürütüldükten sonra jel transiluminatörde UV ışığı altında gözlemlendi.

3.5.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Tıp ve biyoloji alanında büyük bir gelişme olan DNA'nın yapısının 1953 yılında Watson-Crick tarafından keşfi, 1985 yılında Kary Mullis'in PCR'ı bulması tıp ve biyolojinin moleküler düzeyde gelişimine büyük katkı sağlamıştır. PCR, DNA'nın istenen bir bölgesinin in vitro şartlarda belirli ısı düzenlemeleriyle enzimatik olarak çoğaltılması

yöntemidir. Bu sayede bir genin saatler içinde binlerce kopyası elde edilmektedir.

3.5.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Gereken Bileşenler

- 5 µL 5X Flexi (promega) PCR amplifikasyon tamponu,
- 25 mM (1,2 µL) $MgCl_2$ (Mutlaka vortekslenir, yoksa karışımın dibine çöker. Görevi serbest haldeki dNTP'ler ile bir araya gelerek Taq DNA polimerazın tanıyacağı bileşikler oluşturur),
- 1 µL dNTP (deoksiribonukleotid trifosfat: Taq DNA polimeraz, DNA tamamlayıcı dizisinin sentezi için dNTP gereklidir),
- 2 adet primer [10 pmol (2 µL) Primer Forward; 10 pmol (2 µL) Primer Reverse] (Tablo 2). Ayrılan DNA iplikçiklerinde çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin her iki ucuna spesifik (her 2 ucun nükleotid dizisini içeren 2 primer) DNA uç bölgelerine komplementer özellikteki oligonükleotidler,
- 4 µL genomik DNA örnekleri,
- 1 ünite (0,6 µL) Taq DNA polimeraz (Bu enzim, dNTP'leri kullanır ve tamamlayıcı DNA iplikciğini meydana getirecek sentez reaksiyonunu katalizler ve yüksek ısıya dayanıklıdır. En son olarak karışıma eklenir. Buharlaşmayı önlemek için mineral oil karışıma ilave edilir), toplam hacim 25 µL.

Tablo 2: VEGF 2578C/A polimorfizm primerleri

Primer F: 5'-CTCCACCAAACCACAGCAAC -3'
Primer R: 5'-GGCTACTTCTCCAGGCTCAC -3'

Aldığımız kan örneklerinden izole ettiğimiz DNA'lar polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı.

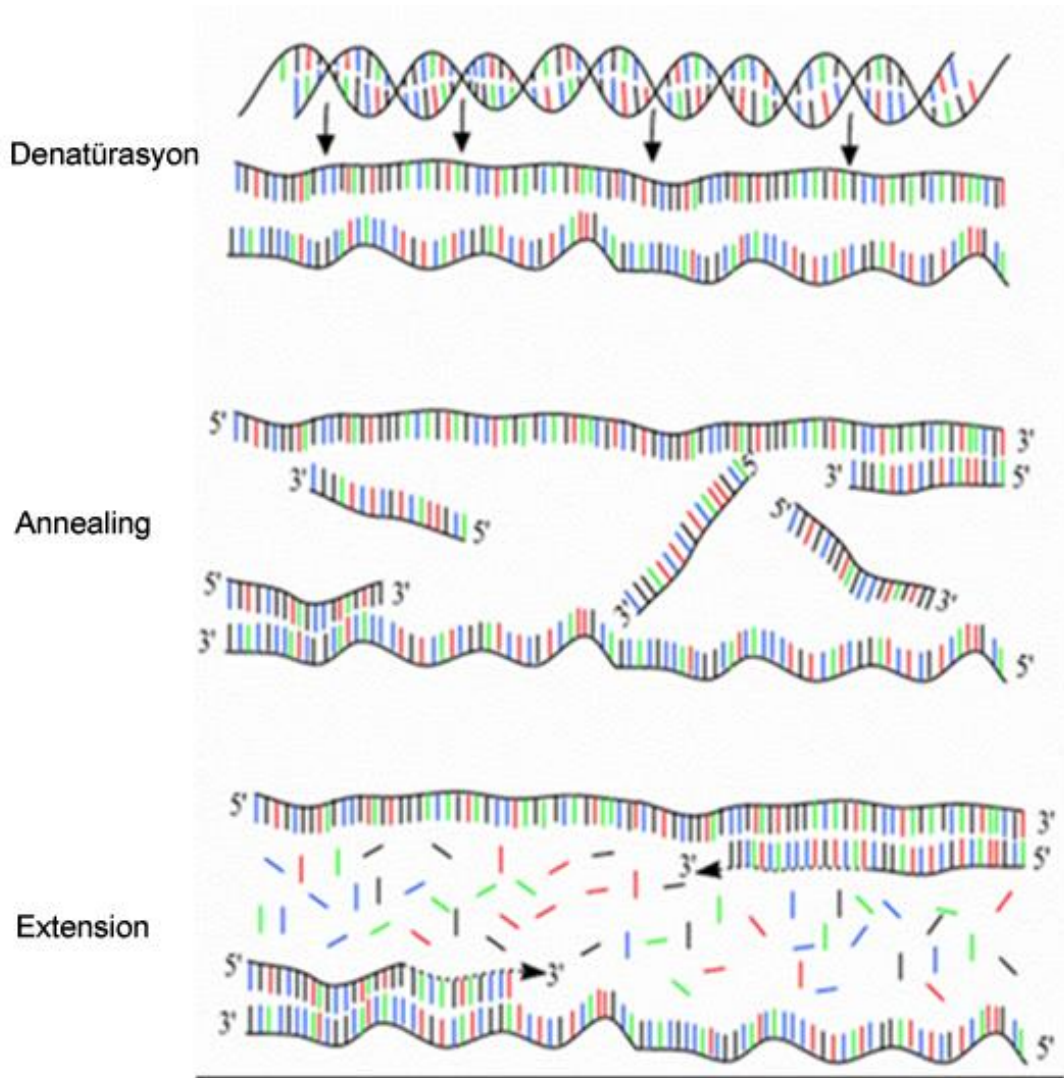
3.5.2.2. PCR Amplifikasyon Döngüsü

PCR Amplifikasyon Döngüsü, denatürasyon (2 aşama), annealing ve extension (2 aşama) olmak üzere beş aşamadan oluşmaktadır (Şekil 10);

1. PCR ürünlerinin 94°C'de 3 dakika bekletilmesi,
2. Denatürasyon: 94°C'de 1 dakika kalıp DNA zincirinin çift sarmal yapısının ısı etkisiyle ayrılması,
3. Annealing: 68°C'de 1dakika 45 saniye. Primerlerin, ayrılan DNA iplikçiklerinde kendine uygun baz dizlerine karşılık gelen bölgeye yapışması,
4. Extension: Önce 72°C'de 1 dakika,
5. 72°C'de 10 dakika. DNA zinciri üzerine yapışan primerlerin Taq DNA polimeraz enzimi ile uzatılması.

Döngü sayısı 2. 3. ve 4. basamaklar için 20 siklus (Ortalama 20-40 siklustur, döngü sayısı çoğaltılacak DNA miktarını belirler). PCR amplifikasyon döngüsü yaklaşık 3,5 saat sürdü.

PCR örneklerinden 10 μ L alınarak poliakrilamit jel elektroforezi ile görüntülendi.



Şekil 10. PCR Amplifikasyon Döngüsü

3.5.2.3. PCR için Agaroz Jel Elektroforezi ve Uygulama (İzole Edilen DNA'ların PCR için)

% 2'lik agaroz jel için 2 g agaroz 100 mL 1X TBE içerisine konuldu. Mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyene kadar kaynatıldı ve soğutuldu ve içine 6 µL etidyum bromür eklendi. Jel tarakları elektroforez tankına (owl marka) yerleştirildi ve yaklaşık 5 mm kalınlığında bir jel döküldü. Tamamen donduktan sonra taraklar kuyucukların bozulmamasına özen gösterilerek çıkartıldı ve üzerine 1X TBE bulunan tampon çözeltisi tanka aktarıldı. Jeldeki ilk kuyucuğa molekül ağırlık standartı olan DNA standartı yüklendi. İzole edilen genomik DNA örneklerinden 10 µL alınarak 5 µL jel yükleme tamponu (%0.05 Bromofenol mavisi, %15 Ficoll 400, %10 Gliserol ve 1X TBE tamponu ile 1 mL olacak şekilde karıştırıldı) eklendi, pipet yardımıyla iyice karıştırıldı ve jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi.

Elektrotlar yerleştirildikten sonra voltaj 80 V olarak ayarlandı (500 miliamper ve oda sıcaklığında). 20 dakikalık elektroforez işleminden sonra GENE Genius imaging system cihazında PCR amplifikasyonu görüntülendi.

Elektrotların yerleşmesinde kuyucukların olduğu tarafa negatif elektrot, hazırlanan jelin alt kısmına ise pozitif elektrot gelecek şekilde yerleştirildi. Elektroforez işlemi nükleotidlerin molekül ağırlıklarına göre jelin sonuna kadar yürütülebilir. Elektroforez sırasında yürütme durdurulabilir ve jel transiluminatörde UV ışığı altında gözlemlenir ve daha ne kadar süre devam edileceğine karar verilebilir. Jel transilüminatörde UV ışığı altında gözlemlendi ve yorumlandı.⁹¹

3.5.3. DNA'nın Restriksiyon Enzimleri Ile Kesilmesi

Bundan sonraki aşama, PCR ürününün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi ve elektroforez ile kesilen fragmanların ayrımı ve görüntülenmesidir. Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması RFLP (PCR Ürününün Enzimle Kesilmesi) olarak adlandırılmaktadır. Çalışmamızda RFLP yöntemi kullanıldı.

Polimorfizm çalışmalarında restriksiyon enzimi, bireylerin taşıdığı polimorfik duruma bağlı olarak DNA'yı fragmanlara ayırır. DNA'daki 5-10 baz uzunluğundaki polimorfik nükleotid dizisini tanır, bu noktada kesim yapar ve DNA'yı değişik miktar ve uzunlukta parçalara ayırır. Bireylerde PCR ile polimorfizm içeren DNA bölgeleri çoğaltıldıktan sonra polimorfizm içeren diziyi tanıyan bir restriksiyon enzimi ile PCR ürünü kesilir.

3.5.4. VEGF Gen Bölgesi ve Restriksiyon Enzimi

VEGF (2578C/A) polimorfizmi

Bgl II restriksiyon enzimi

3.5.5. PCR Sonrası Enzim Restriksiyonu İçin Gerekli Malzemeler

- Restriksiyon enzim buffer'ı 2,5 µL,
- Bgl II restriksiyon enzimi (The ENZYME Company BIORON) 2 µL,

- PCR ürünü
- 13 µL,
- BSA 2,5 µL (BSA enzim aktivitesini arttırmak için kullanıldı),
- Saf su 5,8 µL,

Toplam hacim 25,8 µL.

3.5.5.1. PCR Programı

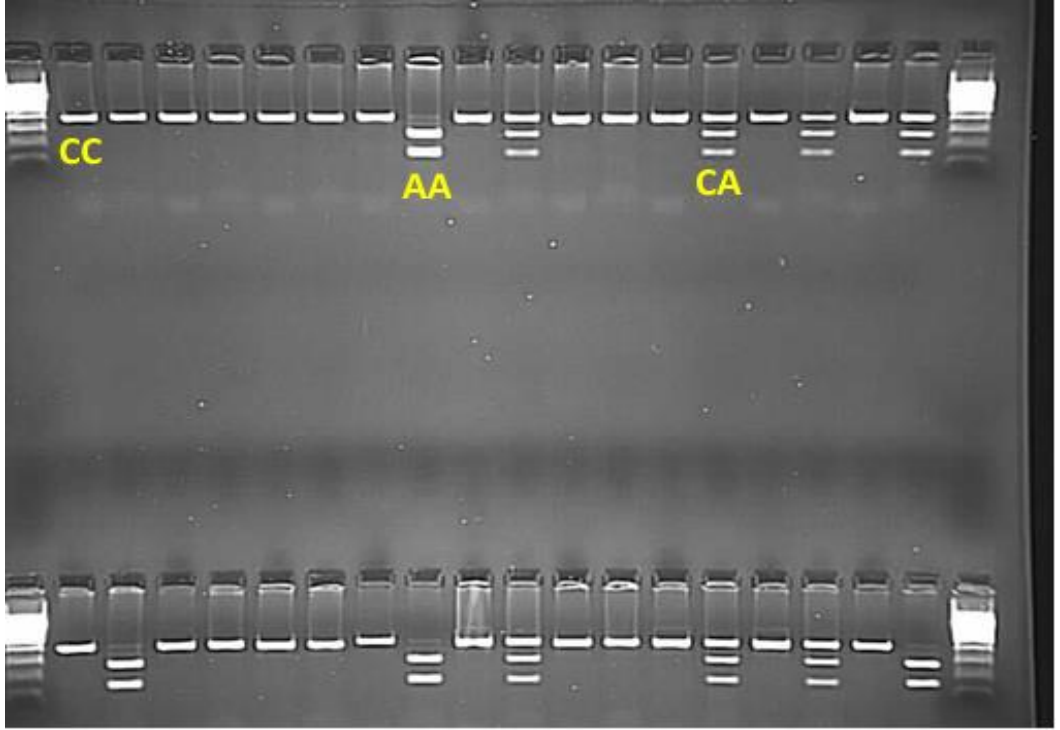
Restriksiyon enzimi ile kesim PCR programı;

- 37°C'de 16 saat,
- 70°C'de 20 dakika,
- 10°C'de reaksiyon bitene kadar.

3.5.5.2. Enzim Kesim Sonuçları

VEGF geninin 2578. baz çiftinde görülen C/A baz değişimi, bir enzim kesim bölgesi oluşturur. Normal tipte kesim görülmez ve 400 bp'lik bölgede tek fragment oluşur (CC). Homozigot varyant tipte bir bölgede kesim gerçekleşir, 250 ve 150 bp'lik iki fragment oluşur (AA). Heterozigot varyant tipte ise her iki allel de görülür ve 400, 250 ve 150 bp'lik bölgede üç fragment gözlenir (CA). Bizim yaptığımız PCR sonucu elde edilen bant boyu 400 baz çifti büyüklüğünde idi. Bgl II restriksiyon enzimi ile kesim yapıldığında elde edilen bant büyüklükleri ise 400, 250 ve 150 baz çifti olarak tespit edildi.

Kesim sonrası oluşan bantlar % 2'lik agaroz jelde yşrştşldş (100 Voltta 30 dakika). Bant profili değerlendirildi. PCR sonucu elde edilen bant boyu 400 baz çifti břyřklřęřnde elde edildi. Bgl II restriksiyon enzimi ile kesim yapıldığında elde edilen bant bşyşklşkleri ise 400, 250 ve 150 baz çifti (bç) olarak tespit edildi. Toplam şrşn břyřklřęř 150+250= 400 bç. İlk 18 şrneğin PCR ve kesim sonrası gşrşntşsş şekil 11'de verilmiştir.



şekil 11. İlk 18 şrneğin PCR ve Kesim Sonrası Gşrşntşsş.

3.5.6. VEGF Tayini

Serum VEGF düzeyleri Quantikine kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle tayin edildi. İlk olarak her bir kuyucuğa 100 µL Assay dilüent RDW1 eklendi. Daha sonra tüm kuyucuklara 200 µL standart/kontrol/örnek ilave edilerek plağın üstü kapatıldı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla yıkandı. Her kuyucuğa 200 µL VEGF konjugatı ilave edildi. 2 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldıktan sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 200 µL substrat solüsyonu eklendi ve alüminyum folyoyle kapatılarak 25 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyon 50 µL stop solüsyonu eklenerek sonlandırıldı. ELISA okuyucuda 450 nm’de absorbanslar ölçüldü. Konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans değerlerinden kalibrasyon grafiği elde edildi. Absorbansı bilinmeyen numunelerin konsantrasyonları bu kalibrasyon grafiğinden belirlendi.

Tablo 3. VEGF standartlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri.

Konsantrasyon (pg/mL)	Absorbans
31,2	0,14
62,5	0,17
125	0,28
250	0,44
500	0,70
1000	1,26
2000	2,59

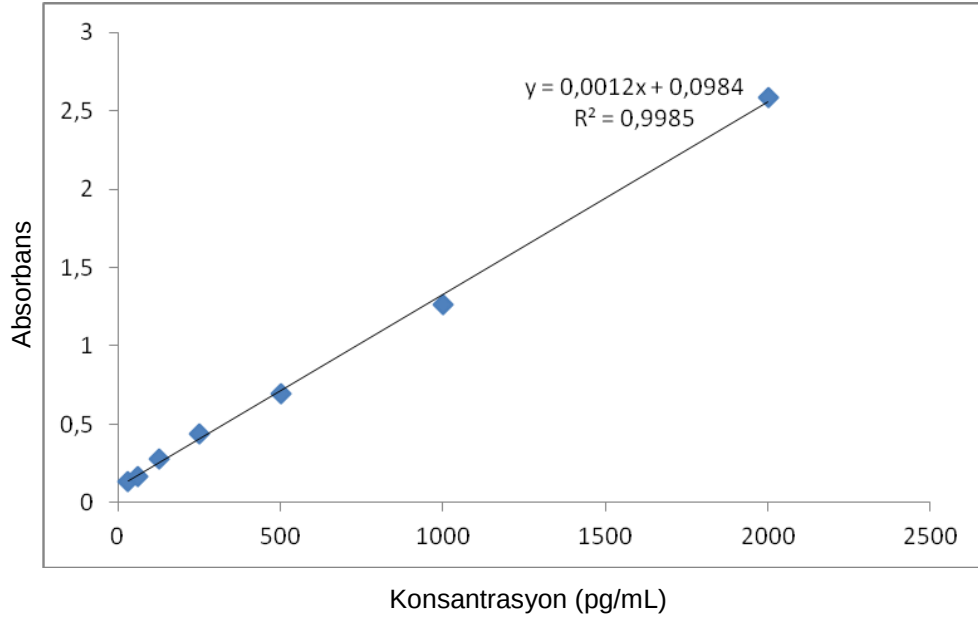
3.5.6.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

VEGF kitinde bulunan 1-2000 pg/mL konsantrasyon aralığındaki 7 standart solüsyon kit prosedürüne uygun olarak kuyucuklara uygulandı (Tablo 3). Konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleriyle oluşturulan kalibrasyon grafiği Grafik 1’de gösterilmiştir.

3.5.6.2.Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği

Kullanılan yöntemin uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla gün içinde üçer kez olmak üzere 3 farklı örnekle çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4’de gösterilmiştir.

Grafik 1. VEGF kalibrasyon grafiği



Tablo 4. VEGF düzeylerinin tekrarlanabilirliği

	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3
1. Ölçüm	523,83	185,73	379,25
2. Ölçüm	466,63	170,69	354,88
3. Ölçüm	498,11	182,92	390,00
Ortalama	496,19	179,78	374,71
Standart sapma	25,65	8,00	18,00
Varyasyon katsayısı	5,77	4,45	4,80

3.5.7. sNeuregulin1- β 1 Tayini

Serum sNeuregulin1- β 1 düzeyleri Aviscera Bioscience kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle tayin edildi. Plağa uygulama yapılmadan önce serum örnekleri 1:10 oranında seyreltilti. İnsan sNeuregulin1- β 1 antitadisi ile kaplanmış kuyucuklara 100 μ L standart/pozitif kontrol/serum örneği eklendi. Daha sonra plağın üstü kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 μ L Detection Antibody solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 2 saat inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar yıkama solüsyonuyla yıkandı. Her bir kuyucuğa Streptavidine-HRP konjugatı ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Kuyucuklar yıkama solüsyonuyla yıkandıktan sonra 100 μ L substrat solüsyonu eklendi. Alüminyum folyoyle kapatılarak, 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyon 100 μ L stop solüsyonu eklenerek sonlandırıldı. ELISA okuyucuda 450 nm'de ölçüldü. Konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbands değerleriyle (Tablo 5) kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Absorbansı bilinmeyen numunelerin konsantrasyonları bu standart kalibrasyon grafiğinden belirlendi.

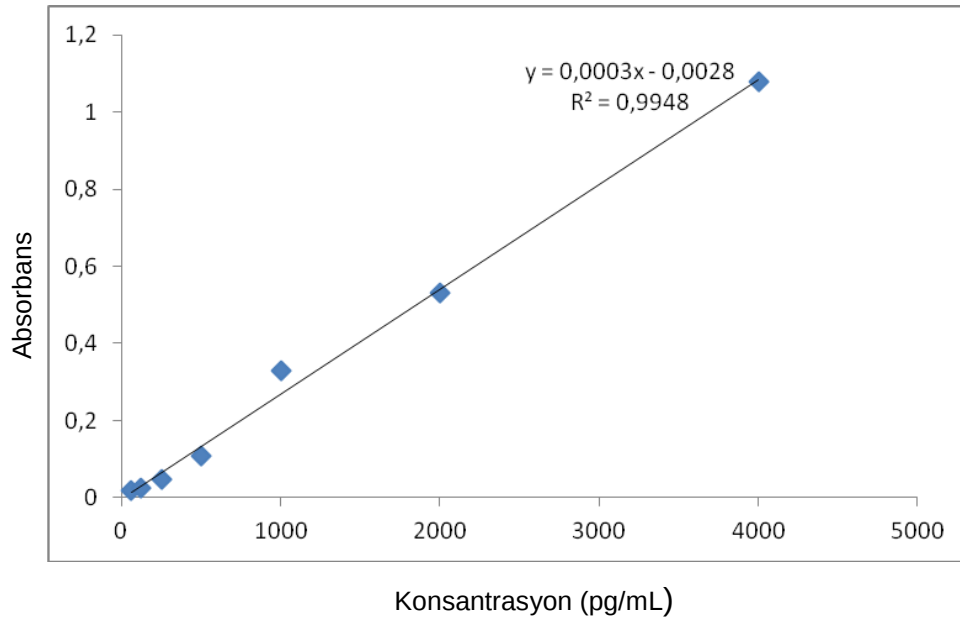
Tablo 5. sNeuregulin1-β1 standartlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri

Konsantrasyon (pg/mL)	Absorbans
62,5	0,019
125	0,025
250	0,047
500	0,108
1000	0,329
2000	0,532
4000	1,079

3.5.7.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

sNeuregulin1-β1 kitinde bulunan 0-4000 pg/mL konsantrasyon aralığındaki 7 standart solüsyon kit prosedürüne uygun olarak kuyucuklara uygulandı. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleriyle oluşturulan kalibrasyon grafiği Grafik 2’de gösterilmiştir.

Grafik 2. sNeuregulin1-β1 kalibrasyon grafiği



3.5.7.2. Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği

Kullanılan yöntemin uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla gün içinde üçer kez olmak üzere 3 farklı örnekle çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 6’de gösterilmiştir.

Tablo 6. sNeuregulin1- β 1 düzeylerinin tekrarlanabilirliği

	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3
1. Ölçüm	5,14	3,82	12,12
2. Ölçüm	5,38	4,10	12,37
3. Ölçüm	5,53	3,77	11,85
Ortalama	5,35	3,90	12,11
Standart sapma	0,20	0,18	0,26
Varyasyon katsayısı	3,74	4,62	2,15

3.5.8. Okside LDL Tayini

Serum okside LDL düzeyleri Immundiagnostik kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle tayin edildi. Plağa uygulama yapılmadan önce serum örnekleri 1:10 oranında seyreltildi. İlk olarak plak yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 μ L standart/kontrol/örnek ilave edilerek plağın üstü kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla yıkandı. Her kuyucuğa 100 μ L konjugat ilave edildi. 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldıktan sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 μ L substrat solüsyonu eklendi ve alüminyum folyoyle kapatılarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyon 100 μ L stop solüsyonu eklenerek sonlandırıldı. ELISA okuyucuda 450 nm’de absorpsanlar ölçüldü. Konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorpsan değerlerinden kalibrasyon grafiği elde edildi. Absorpsanı bilinmeyen numunelerin konsantrasyonları bu kalibrasyon grafiğinden belirlendi.

3.5.8.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

Okside LDL kitinde bulunan 0-250 ng/mL konsantrasyon aralığındaki 5 standart solüsyon kit prosedürüne uygun olarak kuyucuklara uygulandı (Tablo 7). Konsantrasyona karşılık gelen absorbens değerleriyle oluşturulan kalibrasyon grafiği Grafik 3'de gösterilmiştir.

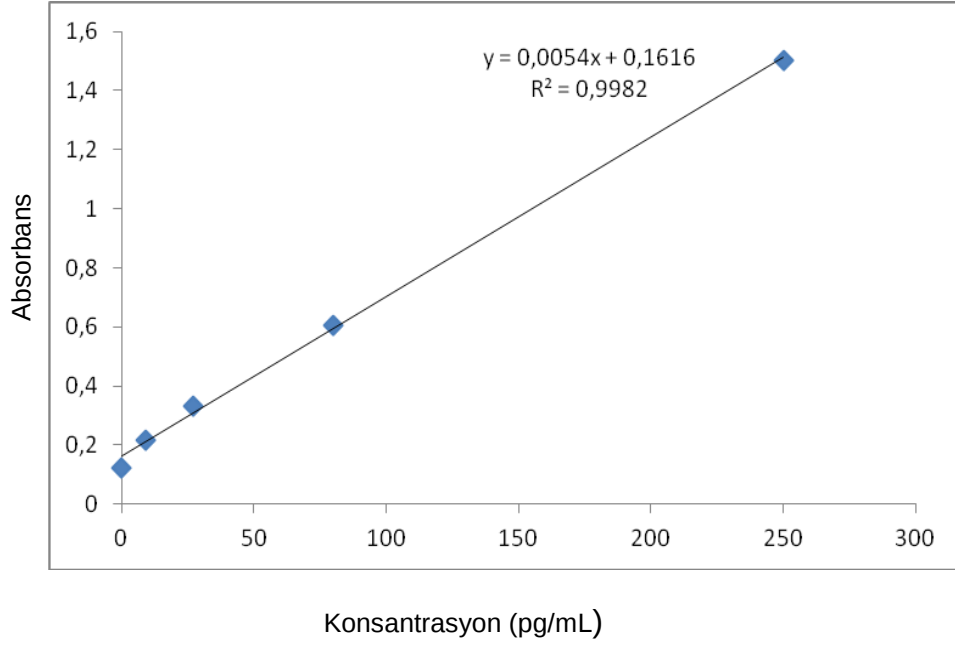
Tablo 7. Okside LDL standartlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbens değerleri

Konsantrasyon (ng/mL)	Absorbans
0	0,12
9	0,22
27	0,33
80	0,61
250	1,50

3.5.8.2. Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği

Kullanılan yöntemin uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla gün içinde üçer kez olmak üzere 3 farklı örnekle çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 8'de gösterilmiştir.

Grafik 3. Okside LDL kalibrasyon grafiği



Tablo 8. Okside LDL düzeylerinin tekrarlanabilirliği

	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3
1. Ölçüm	176,63	139,91	231,11
2. Ölçüm	162,89	155,45	225,86
3. Ölçüm	181,44	147,89	222,42
Ortalama	173,65	147,75	226,46
Standart sapma	9,63	7,77	4,38
Varyasyon katsayısı	5,55	5,26	1,90

3.5.9. Nitrik Oksit Tayini

Serum nitrik oksit düzeyleri Oxford Biomedical Research kiti kullanılarak tayin edildi. Kit, metalik kadmiyum tarafından nitratı nitrite dönüştürerek örneğin total nitrik oksit düzeylerinin ölçümüne olanak sağlar. Kadmiyum boncuklar kullanılmadan önce ependorf tüpler içerisinde sırasıyla H₂O, 0.1 M HCl ve 0.1 M NH₄OH, pH 9.6 ile yıkandı. Öncelikle serumların proteinlerinden uzaklaştırılması için her bir örnek (10 µL)

deiyonize su ile 190 µL'ye tamamlandı ve sonra üzerine %30 (m/v) ZnSO₄ çözeltisinden 10 µL ilave edildi. Böylece toplam hacim 200 µL oldu. Örnekler vortekslendi, oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi ve 4000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar, her biri içinde 0.5 gram kuru granüle kadmiyum içeren ependorf tüplere alındı ve çalkalayıcı ile bir gece oda sıcaklığında bekletildi. Ertesi sabah örnekler temiz ependorf tüplere alınarak tekrar santrifüj edildi ve süpernatantlar nitrit analizi için kullanıldı. 20 µL süpernatant üzerine 80 µL deiyonize su ilave edildi. Üzerine 50 µL Reajan 1 eklenerek tüp çalkalandı. Daha sonra 50 µL Reajan 2 eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika tüp çalkalandı. ELISA okuyucuda 540 nm'de absorbanslar ölçüldü. Konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans değerlerinden kalibrasyon grafiği elde edildi. Absorbansı bilinmeyen numunelerin konsantrasyonları bu kalibrasyon grafiğinden belirlendi.

3.5.9.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

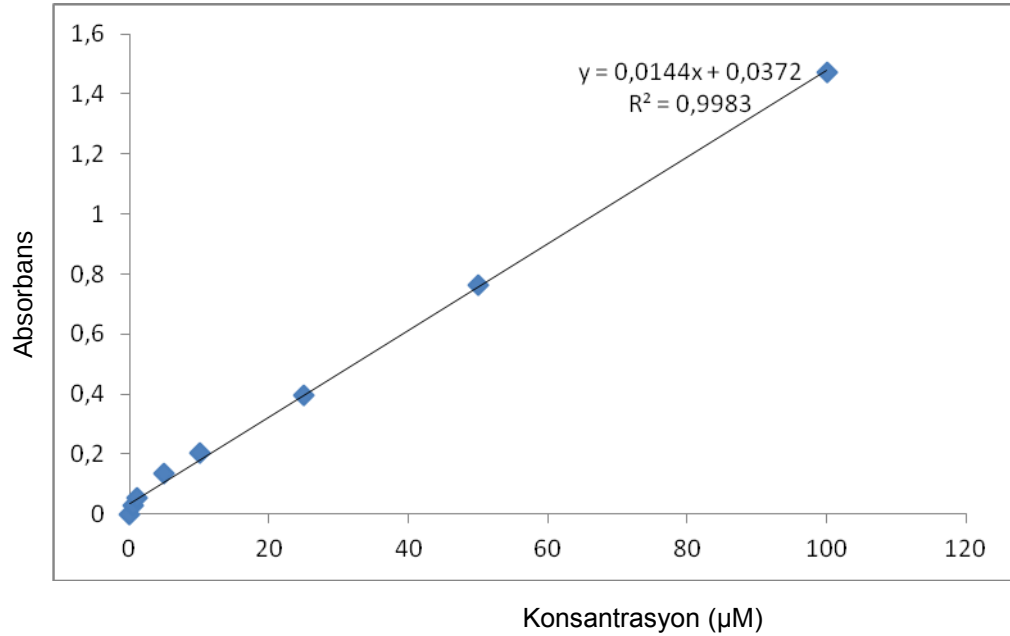
Stok çözelti olarak 500 µM nitrit çözeltisi kullanıldı. Stok çözeltiden bir tüpe 1 mL alınarak üzerine 4 mL deiyonize ilave edildi ve 100 µM'lık standart çözelti (Standart 1) hazırlandı. Standart 1'den 1 mL alınarak üzerine 1 mL deiyonize su ilave edildi ve 50 µM'lık standart çözelti (Standart 2) hazırlandı. Standart 2'den 1 mL alınarak üzerine 1 mL deiyonize su ilave edildi ve 25 µM'lık standart çözelti (Standart 3) hazırlandı. Standart 3'den 1 mL alınarak üzerine 1.5 mL deiyonize su ilave edildi ve 10 µM'lık standart çözelti (Standart 4) hazırlandı. Standart 4'den 1 mL alınarak üzerine 1 mL deiyonize su ilave edildi ve 5 µM'lık standart çözelti (Standart 5) hazırlandı. Standart 5'den 1 mL alınarak üzerine 4 mL deiyonize su ilave edildi ve 1 µM'lık standart çözelti (Standart 6) hazırlandı. Son olarak Standart 6'den 1 mL alınarak üzerine 1 mL deiyonize su ilave edildi ve 0.5 µM'lık standart çözelti (Standart 7) hazırlandı. 0.5-100 µM konsantrasyon aralığındaki 7 standart nitrit çözeltisi

kullanılarak uygulanan deney prosedürü sonucunda okunan absorbans değerleri Tablo 9’da verilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleriyle oluşturulan kalibrasyon grafiği Grafik 4’de gösterilmiştir.

Tablo 9. Nitrik oksit standartlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri

Konsantrasyon (µM)	Absorbans
0	0
0,5	0,03
1,0	0,05
5,0	0,14
10,0	0,21
25,0	0,40
50,0	0,77
100,0	1,48

Grafik 4. Nitrik oksit kalibrasyon grafiği



3.5.9.2. Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği

Kullanılan yöntemin uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla gün içinde üçer kez olmak üzere 3 farklı örnekle çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Nitrik oksit düzeylerinin tekrarlanabilirliği

	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3
1. Ölçüm	15,14	44,58	30,00
2. Ölçüm	15,65	45,16	32,63
3. Ölçüm	16,72	41,98	29,84
Ortalama	15,64	43,91	30,82
Standart sapma	0,49	1,69	1,57
Varyasyon katsayısı	3,13	3,85	5,09

3.5.10. Paraoksonaz Tayini

Serum paraoksonaz aktivitesi Rel Assay Diagnostics Manuel Ölçüm kiti kullanılarak tayin edildi. Paraoksonaz ölçümü, substrat olarak kullanılan paraoksonun 37 °C'de 412 nm dalga boyunda enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Paraoksonaz aktivite ölçüm metodu için iki reaktif kullanıldı. Reaktif 1, Tris tamponu olup aynı zamanda paraoksonaz enziminin kofaktörü olan kalsiyum iyonunu içermektedir. Reaktif 2 ise substrat solüsyonudur. 25 µL serum örneği üzerine 500 µL Reajan 1 eklendi. Ardından bu karışıma 25 µL Reajan 2 eklenerek vortekslendi. Paraoksondan oluşan p-nitrofenolün absorbansındaki doğrusal artış kinetik olarak izlendi. Paraoksonun enzimatik olmayan hidroliz değeri total hidroliz değerinden çıkarıldı. Paraoksonaz aktivitesi U/L olarak hesaplandı.

Aşağıdaki formülle serum örneklerinin paraoksonaz aktiviteleri hesaplandı.

$$\text{Paraoksonaz aktivitesi (U/L)} = (\Delta\text{Abs Örnek} - \Delta\text{Abs Deiyonize su}) \times 647$$

$$\Delta\text{Abs Örnek} = (\text{Örneğin 150. saniyedeki absorbens değeri} - \text{Örneğin 30. saniyedeki absorbens değeri})$$

$$\Delta\text{Abs Deiyonize su} = (\text{Suyun 150. saniyedeki absorbens değeri} - \text{Suyun 30. saniyedeki absorbens değeri})$$

3.5.10.1. Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği

Kullanılan yöntemin uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla gün içinde üçer kez olmak üzere 3 farklı örnekle çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 11’da gösterilmiştir.

Tablo 11. Paraoksonaz aktivitesinin tekrarlanabilirliği

	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3
1. Ölçüm	176,63	93,00	37,05
2. Ölçüm	161,78	88,31	41,00
3. Ölçüm	179,44	94,36	37,82
Ortalama	172,62	91,89	38,92
Standart sapma	9,49	3,17	1,98
Varyasyon katsayısı	5,50	3,45	5,08

3.5.11. TAK Tayini

Serumda total antioksidan Re ve arkadaşları tarafından modifiye edilen ABTS katyon radikalının dekolorizasyonu yöntemine göre

yapıldı.⁹² Total antioksidan ölçüm metodunda, oluşturulan radikalin serumda bulunan antioksidanlar tarafından baskılanması spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Absorbans ölçümleri 6. dakikada 30 °C de 734 nm de yapıldı. Ölçümlerde kör olarak fosfat tampon çözeltisi kullanıldı.

3.5.11.1. Örneğin Hazırlanması

Fosfat Tamponunun Hazırlanması:

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄.12H₂O, 0.24 g KH₂PO₄ tartılarak 1L distile suda çözüldü. Fosfat tamponun pH'ı 7.4'e ayarlandı.

ABTS Katyon Radikalinin Hazırlanması:

0.0384 g ABTS tartılarak 10 mL distile suda çözüldü ve 7 mM ABTS çözeltisi elde edildi. 0.0099 g potasyum persülfat tartılarak 5 mL distile suda çözüldü ve 2.45 mM çözelti elde edildi. ABTS çözeltisi ile potasyum persülfat çözeltisi 2:1 oranında karıştırılarak bir gece boyunca karanlıkta oda sıcaklığında bekletilerek ABTS radikali elde edildi. ABTS radikali 0.70(±0.02) olacak şekilde pH 7.4 fosfat tampon çözeltisi ile 1:3 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Absorbansı 0.70(±0.02) olacak şekilde ayarlanmış 1 mL ABTS radikal çözeltisine 10 µL serum ilave edildi ve 6. dakikada absorbans değeri okundu. Elde edilen sonuçlardan hareketle % inhibisyon aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - [(Absorbans_{\text{örnek}} / Absorbans_{ABTS^{+}}) \times 100]$$

3.5.11.2. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

0.0063 g Trolox 10 mL fosfat tamponu içinde çözülerek 2.5 mM stok çözelti elde edildi. 0.5 – 2.25 mM konsantrasyon aralığında 8 standart çözelti hazırlandı. Absorbansı ayarlanmış 1 mL ABTS radikal çözeltisine 10 µL standart çözelti ilave edildi ve karıştırıldı. 6. dakikada çözeltinin absorbansı okundu. Standartlar için ölçülen absorbans değerlerinden hareketle hesaplanan % inhibisyon değerleri Tablo 12’de gösterilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen % inhibisyon değerleri ile oluşturulan kalibrasyon grafiği Grafik 5’de gösterilmiştir.

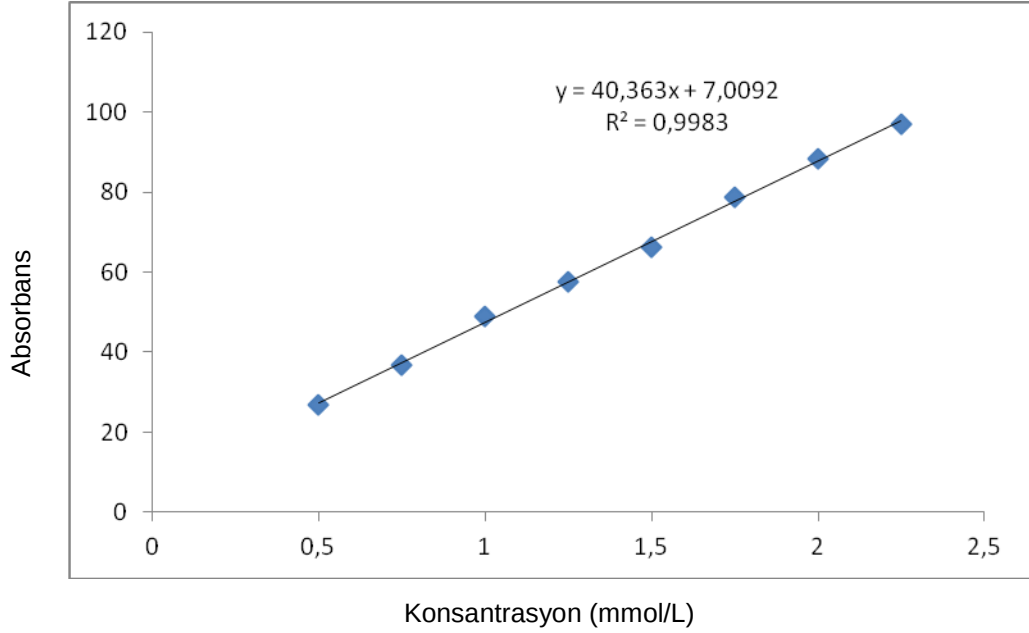
Tablo 12. TAK standartlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri

Konsantrasyon (mmol/L)	% İnhibisyon
0,50	26,77
0,75	36,70
1,00	48,91
1,25	57,43
1,50	66,25
1,75	78,68
2,00	88,46
2,25	96,87

3.5.11.3. Yöntemin Gün İçi Tekrarlanabilirliği

Kullanılan yöntemin uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla gün içinde üçer kez olmak üzere 3 farklı örnekle çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 13’de gösterilmiştir.

Grafik 5. TAK kalibrasyon grafiği



Tablo 13. TAK düzeylerinin tekrarlanabilirliği

	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3
1. Ölçüm	1,78	1,45	1,72
2. Ölçüm	1,73	1,51	1,57
3. Ölçüm	1,77	1,46	1,69
Ortalama	1,76	1,47	1,66
Standart sapma	0,03	0,03	0,08
Varyasyon katsayısı	1,71	2,04	4,82

3.5.12. Diğer Parametrelerin Tayini

Total kolesterol, trigliserit, HDL kolesterol, LDL kolesterol, VLDL kolesterol ölçümleri Roche Cobalt Integra 6000 otoanalizöründe yapılmıştır. Kolesterol, kolesterol esterase ve kolesterol oksidaz kullanılarak enzimatik olarak tayin edildi. Trigliserit gliserol/fosfat/oksidaz/peroksidaz

reaksiyonuyla ölçüldü. HDL kolesterol, polietilen glikol ile presipite edildikten sonra kolesterol esteraz/oksidaz/peroksidaz reaksiyonuyla tayin edildi. LDL kolesterol Friedewald formülü ile hesaplandı.

3.6. Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Çalışma sonucu elde edilen veriler ortalama (standart hata) olarak ifade edilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için SPSS version 10,0 programı kullanılmıştır. Parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması chi-square, student-t testi (iki grup arasında) ve tek yönlü varyans analizi olan Anova testi (üç farklı grup arasında) kullanılarak yapılmıştır. Normal dağılım gösteren grup ortalamaları arasındaki farklılık varyans analizi ile incelendi. Parametreler arasındaki korelasyonların incelenmesinde pearson korelasyon testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Hastanesi Göğüs ve Kalp Damar Cerrahisi Kliniğinde koroner arterlerinde darlık tespit eden 123 hasta ile 28 sağlıklı birey çalışma grubunu oluşturmuştur. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri Tablo 14’de, karakteristik özellikleri Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 14. Hasta ve Kontrol grubunun özellikleri

		Hasta Grubu (n=123)	Kontrol Grubu (n=28)
Yaş Ortalaması (Yıl)		59,1545±0.83	56,1071±1,53
Yaş	40-60	58	20
	≥60	65	8
Kuatelet İndeksi (kg/m ²)	20-25	19	9
	25-29	83	13
	≥30	21	6
Sigara içme alışkanlığı	Sigara içmeyen	67	16
	Sigara İçen	56	12
İlaç kullanma durumu	İlaç kullanan	75	17
	İlaç kullanmayan	48	11

Tablo 15. Çalışma grubunun karakteristik özellikleri

	Hasta grubu n:123	Kontrol grubu n:28	p değeri
Yaş	59,1545±0,83	56,1071±1.53	0,109
Kuatelet indeksi	28,5490±0,28	27,3689±0,66	0,074
Erkek	93(%75,6)	19(%67,9)	0,398
Kadın	30(%24,4)	9(%32,1)	
*Hipertansiyon	34(%75,6)	11(%24,4)	0,206
**Diyabet	17(%89,5)	2(%10,5)	
Aile öyküsü	54(%43,9)	15(%53,6)	0,354
Sigara	56(%45,5)	12(%42,9)	0,798

* Koroner arter hastalığı olanlar ile kontrollerin hipertansiyon %’si verilmiştir.

** Koroner arter hastalığı olanlar ile kontrollerin diyabet %’si verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre yaş, kuatelet indeksi, erkek- kadın cinsiyet, hipertansiyon, diyabet, aile öyküsü ve sigara kullanımı yönünden hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 15).

Tablo 16. VEGF Genotip dağılımı

	Hasta (n=123)	Kontrol (n=28)	X ² test
CC	83(%67,5)	19(%67,9)	X ² =0,281 P=0,869
CA	14(%11,4)	4(%14,3)	
AA	26(%21,1)	5(%17,9)	

VEGF 2578 C/A geninde hastalarda C homozigotların oranı %67,5 iken, A homozigotların oranı %21,1 ve CA heterozigotların oranı %11,4'tür. Kontrollerde C homozigotların oranı %67,9 iken, A homozigotların oranı %17,9 ve CA heterozigotların oranı %14,3'tür. Bu sonuçlara göre genotip dağılımında hasta ve kontrol grupları arasında yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$) (Tablo 16).

Tablo 17. Hastalarda tek, iki ve üç damar tıkanıklığına göre genotip sıklığı

Polimorfizm VEGF 2578	TEK DAMAR HASTALIĞI N(%)	İKİ DAMAR HASTALIĞI N(%)	ÜÇ DAMAR HASTALIĞI N(%)	
CC	9(%10,8)	23(%27,7)	51(%61,4)	p=0,602
CA	0(%0,0)	6(%42,9)	8(%57,1)	
AA	2(%7,7)	9(%34,6)	15(57,7)	

Yapılan analizde hastalar arasında tek, iki veya üç damar tıkanıklığına göre VEGF 2578 polimorfizm alt gruplarında genotip sıklığı dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$) (Tablo 17).

Tablo 18. Kontrol ve total hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması

	Total hasta (n=123) X±SE	Kontrol (n=28) X±SE		
VEGF (pg/mL)	558.37±34.56	335.33±42.17	t=4.09	P=0,000**
Neuregulin (pg/mL)	6.64±0.30	10.42±0.53	t=-5.55	P=0,000**
Okside LDL (ng/mL)	174.79±16.58	101.04±19.73	t=2.86	P=0,006**
Nitrik oksit (µM)	26.01±1.44	18.77±0.74	t=4.47	P=0,000**
Paraoksonaz (U/L)	90.47±7.94	47.66±7.47	t=2.51	P=0,013*
TAK (mmol/L)	1.71±0.01	1.70±0.02	t=0,506	P=0,613
T-Kolesterol (mg/dL)	208.71±15.35	209.93±8.57	t=0,038	P=0,970
LDL-Kolesterol (mg/dL)	124.15±3.97	140.29±5.49	t=1,845	P=0,067
HDL-Kolesterol (mg/dL)	39.41±0.92	40.07±2.21	t=-0,304	P=0,762
Trigliserit (mg/dL)	158.79±6.63	183.14±14.87	t=-1,562	P=0,120

*: p<0,05 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

** : p<0,01 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

Hasta grubu ile kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK ve lipid düzeyleri karşılaştırıldığında; total hasta grubunun serum VEGF, okside LDL, Nitrik oksit ve Paraoksonaz düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,000, p=0,006, p=0,000 ve p=0,013). Bununla birlikte serum Neuregulin düzeyleri anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p=0,000). Hasta grubu ile kontrol grubu arasında serum TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 18).

Tablo 19. CC polimorfizmi olan kontrol grubu ve hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması

	CC Hasta (n=83) X±SE	CC Kontrol (n=19) X±SE	t	P
VEGF (pg/mL)	558.81±45,83	333,99±54,12	2,26	0,026*
Neuregulin (pg/mL)	6,62±0,33	9.90±0,60	-4,358	0,000**
Okside LDL(ng/mL)	160,42±19,09	126,71±26,98	0,803	0,424
Nitrik oksit (µM)	23,93±1,32	19,20±0,97	2,896	0,005**
Paraoksonaz (U/L)	93,35±11,27	49,88±10,53	1,8	0,075
TAK (mmol/L)	1,71±0,12	1,69±0,21	0,853	0,396
T-Kolesterol (mg/dL)	193,28±5,40	217,84±11,77	-1,948	0,054
LDL-Kolesterol (mg/dL)	122,69±4,68	146,16±7,40	-2,252	0,027*
HDL-Kolesterol (mg/dL)	39,72±1,12	40,74±2,79	-0,377	0,707
Trigliserit (mg/dL)	159,76±8,29	187,63±19,53	-1,416	0,16

*: p<0,05 olduğundan gruplar arası fark önemlidir

** : p<0,01 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

CC polimorfizmi olan hasta grubu ile kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK ve lipit düzeyleri karşılaştırıldığında; hasta grubun serum VEGF ve Nitrik oksit düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,026, p=0,005). Bununla birlikte serum Neuregulin ve LDL-Kolesterol düzeyleri anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (sırasıyla p=0,000, p=0,027). CC polimorfizmi olan kontrol grubu ve hasta grubu arasında serum Okside LDL, paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 19).

Tablo 20. CA polimorfizmi olan kontrol grubu ve hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması

	CA hasta (n=14) X±SE	CA Kontrol (n=4) X±SE	t	p
VEGF (pg/mL)	653,17±75,54	283,99±58,69	2,506	0,023*
Neuregulin (pg/mL)	6,96±1,13	11,95±0,80	-2,268	0,038*
Okside LDL (ng/mL)	242,74±66,86	49,52±17,91	2,792	0,014*
Nitrik oksit (µM)	31,92±4,88	19,52±0,64	2,519	0,025*
Paraoksonaz (U/L)	88,50±9,88	52,52±14,62	1,781	0,094
TAK (mmol/L)	1,68±0,02	1,74±0,02	-1,388	0,184
T-Kolesterol (mg/dL)	184,50±12,81	204,75±12,33	-0,802	0,434
LDL-Kolesterol (mg/dL)	116,43±10,64	132,00±7,02	-0,754	0,462
HDL-Kolesterol (mg/dL)	41,36±3,02	31,50±2,90	1,659	0,117
Trigliserit (mg/dL)	148,28±23,59	215,50±39,17	-1,371	0,189

*: p<0,05 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

** : p<0,01 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

CA polimorfizmi olan hasta grubu ve kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK ve lipit düzeyleri karşılaştırıldığında; hasta grubunun serum Neuregulin düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p=0,038). Bununla birlikte hasta grubunun serum VEGF düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,023). Benzer şekilde serum Okside LDL ve Nitrik oksit düzeyleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla, p=0,014, p=0,025). CA polimorfizmi olan kontrol grubu ve hasta grubu arasında serum Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05) (Tablo 20).

Tablo 21. AA polimorfizmi olan kontrol grubu ve hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması

	AA hasta (n=26) X±SE	AA Kontrol (n=5) X±SE	t	p
VEGF (pg/mL)	505,90±60,69	381,50±118,41	0,839	0,408
Neuregulin (pg/mL)	6,62±0,76	11,15±1,73	-2,435	0,021*
Okside LDL (ng/mL)	184,08±33,87	44,74±10,76	3,921	0,001**
Nitrik oksit (µM)	29,47±4,63	16,53±1,70	1,205	0,238
Paraoksonaz (U/L)	82,33±9,66	35,31±6,16	4,104	0,000**
TAK (mmol/L)	1,73±0,02	1,71±0,04	0,217	0,83
T-Kolesterol (mg/dL)	271,00±69,94	184,00±9,12	0,538	0,595
LDL-Kolesterol (mg/dL)	133,00±9,93	124,60±8,11	0,362	0,72
HDL-Kolesterol (mg/dL)	37,37±1,85	44,40±5,20	-1,478	0,15
Trigliserit (mg/dL)	161,35±11,60	140,20±14,98	0,769	0,448

*: p<0,05 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

** : p<0,01 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

AA polimorfizmi olan hasta grubu ve kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK ve lipit düzeyleri karşılaştırıldığında; hasta grubunun serum Neuregulin düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p=0,021). Bununla birlikte serum Okside LDL ve Paraoksonaz düzeyleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,001, p=0,000). AA polimorfizmi olan kontrol grubu ve hasta grubu arasında serum VEGF, Nitrik oksit, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 21).

Tablo 22. CC, CA, AA polimorfizmi olan hasta gruplarının serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrikoksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit Düzeylerinin Karşılaştırılması

	CC hasta (n=83) X±SE	CA hasta (n=14) X±SE	AA hasta (n=26) X±SE	p
VEGF (pg/mL)	558,81±45,83	653,17±75,54	505,9±60,69	0,515
Neuregulin (pg/mL)	6,63±0,33	6,97±1,13	6,52±0,76	0,924
Okside LL (ng/mL)	160,42±19,08	242,74±66,86	184,08±33,87	0,291
Nitrik oksit (µM)	23,93±1,31	31,92±4,88	29,47±4,63	0,104
Paraoksonaz (U/L)	93,35±11,27	88,50±9,88	82,33±9,66	0,855
TAK (mmol/L)	1,71±0,01	1,68±0,02	1,73±0,02	0,410
T-Kolesterol (mg/dL)	193,28±5,40	184,50±12,81	271,00±69,94	0,108
LDL-Kolesterol (mg/dL)	122,68±4,68	116,43±10,64	133,00±9,93	0,460
HDL-Kolesterol (mg/dL)	39,72±1,12	41,36±3,01	37,35±1,85	0,439
Trigliserit (mg/dL)	148,28±23,59	161,35±11,66	158,79±6,63	0,849

CC, CA, AA polimorfizmi olan hasta gruplarının serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri karşılaştırıldığında; hasta grupları arasında ölçülen parametreler yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 22).

Tablo 23. Tek damar hasta ve kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması

	Tek damar (n=11) X±SE	Kontrol (n=28) X±SE	t	p
VEGF (pg/mL)	348,48±67,79	335,33±42,17	-0,165	0,870
Neuregulin (pg/mL)	6,74±1,29	10,42±0,52	3,169	0,003**
Okside LDL (ng/mL)	202,66±69,89	101,04±19,72	-1,399	0,188
Nitrik oksit (µM)	22,07±2,13	18,76±0,74	-1,467	0,167
Paraoksonaz (U/L)	92,55±17,58	47,65±7,47	-2,351	0,034*
TAK (mmol/L)	1,78±0,01	1,70±0,01	-2,664	0,011*
T-Kolesterol (mg/dL)	187,81±12,98	209,93±8,57	1,389	0,173
LDL-Kolesterol (mg/dL)	116,36±10,23	140,28±5,49	2,208	0,034*
HDL-Kolesterol (mg/dL)	43,18±2,20	40,07±2,21	-0,818	0,419
Trigliserit (mg/dL)	132,27±11,63	183,14±14,86	2,695	0,011*

*: p<0,05 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

** : p<0,01 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

Tek damar hasta grubu ve kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK ve lipit düzeyleri karşılaştırıldığında; hasta grubunun serum Neuregulin, LDL-kolesterol ve Trigliserit düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,034$, $p=0,011$). Bununla birlikte serum Paraoksonaz ve TAK düzeyleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0,034$, $p=0,011$). Kontrol grubu ile tek damar hasta grubu arasında serum VEGF, Okside LDL, Nitrik oksit, T-Kolesterol, HDL-Kolesterol düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 23).

Tablo 24. İki damar hasta ve kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrikoksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması

	İki damar (n=38) $\bar{X} \pm SE$	Kontrol (n=28) $\bar{X} \pm SE$	t	p
VEGF (pg/mL)	562,010 $\pm$ 61,28	335,33 $\pm$ 42,17	-2,829	0,006**
Neuregulin (pg/mL)	5,85 $\pm$ 0,42	10,42 $\pm$ 0,52	6,823	0,000**
Okside LDL (ng/mL)	180,98 $\pm$ 28,23	101,042 $\pm$ 19,72	-2,159	0,024*
Nitrik oksit (μ M)	23,23 $\pm$ 2,35	18,76 $\pm$ 0,74	-1,809	0,077
Paraoksonaz (U/L)	83,41 $\pm$ 7,65	47,66 $\pm$ 7,47	-3,255	0,002**
TAK (mmol/L)	1,70 $\pm$ 0,02	1,70 $\pm$ 0,01	0,252	0,802
T-Kolesterol (mg/dL)	240,10 $\pm$ 48,27	209,93 $\pm$ 8,57	-0,531	0,597
LDL-Kolesterol (mg/dL)	121,34 $\pm$ 7,19	140,28 $\pm$ 5,49	2,093	0,040*
HDL-Kolesterol (mg/dL)	39,210 $\pm$ 1,68	40,07 $\pm$ 2,21	0,316	0,753
Trigliserit (mg/dL)	170,23 $\pm$ 12,40	183,14 $\pm$ 14,87	0,670	0,505

*: $p<0,05$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

** : $p<0,01$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

İki damar hasta ve kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK ve lipit düzeyleri karşılaştırıldığında; hasta grubunun serum Neuregulin ve LDL-Kolesterol düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,040$). Bununla birlikte serum

VEGF, Okside LDL ve Paraoksonaz düzeyleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,024$, $p=0,002$). Kontrol grubu ile iki damar hasta grubu arasında serum Nitrik oksit, TAK, T-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 24).

Tablo 25. Üç damar hasta ve kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması

	Üç damar (n=74) $\bar{X} \pm SE$	Kontrol (n=28) $\bar{X} \pm SE$	t	p
VEGF (pg/mL)	587,70 $\pm$ 46,32	335,33 $\pm$ 42,17	-4,028	0,000**
Neuregulin (pg/mL)	7,03 $\pm$ 0,40	10,42 $\pm$ 0,52	5,099	0,000**
Okside LDL (ng/mL)	167,47 $\pm$ 21,30	101,04 $\pm$ 19,72	-2,288	0,025*
Nitrik oksit (μ M)	28,02 $\pm$ 2,02	18,76 $\pm$ 0,74	-4,290	0,000**
Paraoksonaz (U/L)	93,78 $\pm$ 12,36	47,66 $\pm$ 7,47	-2,231	0,028*
TAK (mmol/L)	1,71 $\pm$ 0,01	1,70 $\pm$ 0,01	-0,475	0,636
T-Kolesterol (mg/dL)	195,69 $\pm$ 5,90	209,92 $\pm$ 8,57	1,300	0,197
LDL-Kolesterol (mg/dL)	126,76 $\pm$ 5,29	140,28 $\pm$ 5,49	1,462	0,147
HDL-Kolesterol (mg/dL)	38,94 $\pm$ 1,21	40,07 $\pm$ 2,21	0,470	0,639
Trigliserit (mg/dL)	156,85 $\pm$ 8,76	183,14 $\pm$ 14,87	1,553	0,124

*: $p<0,05$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

** : $p<0,01$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

Kontrol grubu ve üç damar hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK ve lipit düzeyleri karşılaştırıldığında; hasta grubunun serum Neuregulin düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p=0,000$). Bununla birlikte serum VEGF, Okside LDL, Nitrik oksit ve Paraoksonaz düzeyleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,025$, $p=0,000$, $p=0,028$). 3 damar hasta grubu ile kontrol grubu arasında serum TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 25).

Tablo 26. Tek damar ve iki damar hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrikoksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması

	Tek damar (n=11) X±SE	İki damar (n=38) X±SE	t	p
VEGF (pg/mL)	348,48±67,79	562,00±61,28	-1,778	0,082
Neuregulin (pg/mL)	6,74±1,29	5,85±0,42	0,855	0,397
Okside LDL (ng/mL)	202,66±69,89	180,98±28,22	0,337	0,738
Nitrik oksit (µM)	22,07±2,12	22,23±2,35	-0,255	0,800
Paraoksonaz (U/L)	92,56±17,58	83,41±7,65	0,537	0,594
TAK (mmol/L)	1,78±0,01	1,70±0,01	2,227	0,031*
T-Kolesterol (mg/dL)	187,82±12,98	240,10±48,27	-0,577	0,567
LDL-Kolesterol (mg/dL)	116,36±10,22	121,34±7,19	-0,343	0,733
HDL-Kolesterol (mg/dL)	43,18±2,20	39,21±1,68	1,187	0,241
Trigliserit (mg/dL)	132,27±11,63	170,23±12,40	-1,582	0,032*

*: p<0,05 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

**: p<0,01 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

Tek damar ve iki damar hasta gruplarının serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK ve lipit düzeyleri karşılaştırıldığında; Tek damar grubunun serum TAK düzeyleri iki damar hasta grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek, serum Trigliserit düzeyleri ise anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (sırasıyla p=0,031, p=0,032). İki hasta grubu arasında serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 26).

Tablo 27. Tek damar ve üç damar hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrikoksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması

	Tek damar (n=11) X±SE	Üç damar (n=74) X±SE	t	p
VEGF (pg/mL)	348,48±67,79	587,70±46,32	-1,939	0,056
Neuregulin (pg/mL)	6,74±1,29	7,03±0,40	-0,250	0,803
Okside LDL (ng/mL)	202,66±69,89	167,47±21,30	0,574	0,568
Nitrik oksit (µM)	22,07±2,13	28,02±2,02	-1,114	0,268
Paraoksonaz (U/L)	92,56±17,58	93,78±12,36	-0,037	0,970
TAK (mmol/L)	1,77±0,01	1,71±0,01	3,667	0,001**
T-Kolesterol (mg/dL)	187,81±12,98	195,69±5,90	-0,488	0,627
LDL-Kolesterol (mg/dL)	116,36±10,22	126,76±5,29	-0,726	0,470
HDL-Kolesterol (mg/dL)	43,18±2,02	38,94±1,21	1,297	0,198
Trigliserit (mg/dL)	132,27±11,63	156,85±8,76	-1,057	0,294

*: p<0,05 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

** : p<0,01 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

Tek damar ve üç damar hasta gruplarının serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK ve lipit düzeyleri karşılaştırıldığında; Tek damar grubunun serum TAK düzeyleri üç damar hasta grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,001). İki hasta grubu arasında serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 27).

Tablo 28. İki damar ve üç damar hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması

	İki damar (n=38) X±SE	Üç damar (n=74) X±SE	t	p
VEGF (pg/mL)	562,00±61,28	587,70±46,32	-0,329	0,743
Neuregulin (pg/mL)	5,85±0,42	7,03±0,40	-2,015	0,047*
Okside LDL (ng/mL)	167,47±21,30	180,98±28,22	0,376	0,708
Nitrik oksit (µM)	23,23±2,35	28,02±2,02	-1,454	0,149
Paraoksonaz (U/L)	83,41±7,65	93,76±12,36	-0,572	0,568
TAK (mmol/L)	1,70±0,01	1,71±0,01	-0,796	0,428
T-Kolesterol (mg/dL)	240,10±48,27	195,69±5,90	0,913	0,367
LDL-Kolesterol (mg/dL)	121,34±7,19	126,76±5,29	-0,601	0,549
HDL-Kolesterol (mg/dL)	39,21±1,68	38,94±1,21	0,127	0,899
Trigliserit (mg/dL)	173,23±12,40	156,85±8,76	0,886	0,378

*: p<0,05 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

** : p<0,01 olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

İki damar ve üç damar hasta gruplarının serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK ve lipit düzeyleri karşılaştırıldığında; İki damar grubunun serum Neuregulin düzeyleri üç damar hasta grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p=0,047). İki hasta grubu arasında serum VEGF, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 28).

Hasta ve kontrol grubu kendi içinde yaş, kuetelet indeksi, cinsiyet, sigara kullanımı, aile öyküsü ve diğer hastalık varlığı yönünden karşılaştırıldığında; VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit ve TAK düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Yaşa göre kontrol grubu ve total hasta grubu kendi içinde serum Paraoksonaz düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; kontrollerde <60 yaş grubunda ≥60 yaş grubuna göre serum Paraoksonaz düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 29).

Tablo 29. Yaşa göre kontrol ve total hasta grubunun serum Paraoksonaz düzeylerinin karşılaştırılması

Paraoksonaz (U/L)		Kontrol		Total Hasta	
		n	X±SE	n	X±SE
Yaş	<60	20	55,22±9,94	58	90,28±8,08
	≥60	8	28,74±3,27	65	90,64±13,24
		t=2,529 p=0,019*		t=-0,023 p=0,982	

*: $p<0,05$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

Tablo 30. Kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon

	VEGF (pg/mL)	Neuregulin (pg/mL)	Okside LDL (ng/mL)	Nitrik oksit (μ M)	Paraoksonaz (U/L)	TAK (mmol/L)	T-K (mg/dL)	LDL-K (mg/dL)	HDL-K (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)
VEGF (pg/mL)	1	0,130	0,024	0,011	-0,067	-0,216	-0,005	-0,067	-0,080	0,250
Neuregulin (pg/mL)	0,130	1	-0,122	-0,016	0,164	-0,077	0,120	0,138	-0,153	0,120
Okside LDL (ng/mL)	0,024	-0,122	1	-0,043	-0,133	-0,158	0,084	0,127	0,027	0,087
Nitrik oksit (μ M)	0,011	-0,016	-0,043	1	-0,113	0,112	0,344	0,292	-0,319	0,244
Paraoksonaz (U/L)	-0,067	0,164	-0,133	-0,113	1	-0,272	0,097	0,159	0,577**	-0,082
TAK (mmol/L)	-0,216	-0,077	-0,158	0,112	-0,272	1	-0,199	-0,177	-0,136	-0,512**
T-K (mg/dL)	-0,005	0,120	0,084	0,344	0,097	-0,199	1	0,871**	0,032	0,704*
LDL-K (mg/dL)	-0,067	0,138	0,127	0,292	0,159	-0,177	0,871**	1	0,112	0,503**
HDL-K (mg/dL)	-0,80	-0,153	0,027	-0,319	0,577*	-0,136	0,032	0,112	1	-0,391*
Trigliserit (mg/dL)	0,250	0,120	0,087	0,244	-0,082	-0,512*	0,704*	0,503*	-0,391*	1

*: $p < 0,05$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

** : $p < 0,01$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

Kontrol grubunda serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon yapıldığında; Paraoksonaz düzeyleri ile HDL-kolesterol düzeyleri ($r=0.577$) ($p < 0.01$), T-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=0.704$) ($p < 0.01$), LDL-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri arasında ($r=0.503$) ve T-kolesterol düzeyleri ile LDL-kolesterol düzeyleri ($r=0.871$) ($p < 0.01$) arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur (Tablo 89). Bununla birlikte, TAK düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=-0.512$) ($p < 0.01$), HDL-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=-0.391$) ($p < 0.05$) arasında negatif korelasyon bulunmuştur (Tablo 30).

Tablo 31. Total hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon

	VEGF (pg/mL)	Neuregulin (pg/mL)	Okside LDL (ng/mL)	Nitrik oksit (μ M)	Paraoksonaz (U/L)	TAK (mmol/L)	T-K (mg/dL)	LDL-K (mg/dL)	HDL-K (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)
VEGF (pg/mL)	1	-0,083	0,002	0,108	-0,162	-0,187*	-0,088	0,000	-0,207*	0,231*
Neuregulin (pg/mL)	-0,083	1	-0,198*	-0,071	-0,019	0,015	-0,022	0,087	-0,010	0,027
Okside LDL (ng/mL)	0,002	-0,198*	1	0,121	0,017	-0,089	-0,026	-0,042	0,070	-0,031
Nitrik oksit (μ M)	0,108	-0,071	0,121	1	-0,016	-0,094	0,091	0,055	0,078	-0,022
Paraoksonaz (U/L)	-0,162	-0,019	0,017	-0,016	1	0,076	0,045	0,082	-0,094	0,018
TAK (mmol/L)	-0,187*	0,015	-0,089	-0,094	0,076	1	0,051	-0,130	0,096	-0,193*
T-K (mg/dL)	-0,088	-0,022	-0,026	0,091	0,045	0,051	1	0,374**	-0,103	0,360**
LDL-K (mg/dL)	0,000	0,087	-0,042	0,055	0,082	-0,130	0,374**	1	-0,150	0,418**
HDL-K (mg/dL)	-0,207*	-0,010	0,070	0,078	-0,094	0,096	-0,103	-0,150	1	-0,369**
Trigliserit (mg/dL)	0,231*	0,027	-0,031	-0,022	0,018	-0,193*	0,360**	0,418**	-0,369**	1

*: $p < 0,05$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

**: $p < 0,01$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

Total hasta grubunda serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon yapıldığında; T-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=0.360$) ($p < 0.01$), LDL-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri arasında ($r=0.418$) ($p < 0.01$) ve T-kolesterol düzeyleri ile LDL-kolesterol düzeyleri ($r=0.374$) ($p < 0.01$) arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur. Bununla birlikte, serum VEGF ve HDL-Kolesterol düzeyleri ($r=-0,207$) ($p < 0.05$), TAK düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=-0.193$) ($p < 0.05$), HDL-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=-0.369$) ($p < 0.01$) arasında negatif korelasyonlar

bulunmuştur. Serum VEGF ile Trigliserit arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0.231$) ($p<0.05$) (Tablo 31).

Tablo 32. CC polimorfizmi olan kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon

	VEGF (pg/mL)	Neuregulin (pg/mL)	Okside LDL (ng/mL)	Nitrik oksit (μ M)	Paraoksonaz (U/L)	TAK (mmol/L)	T-K (mg/dL)	LDL-K (mg/dL)	HDL-K (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)
VEGF (pg/mL)	1	0,192	0,050	0,006	-0,045	-0,321	0,030	-0,037	-0,233	0,431
Neuregulin (pg/mL)	0,192	1	0,042	-0,095	0,273	0,050	0,361	0,408	-0,035	0,156
Okside LDL (ng/mL)	0,050	0,042	1	-0,095	-0,182	-0,108	-0,039	0,028	-0,003	0,024
Nitrik oksit (μ M)	0,006	-0,095	-0,095	1	-0,151	0,080	0,346	0,254	-0,259	0,274
Paraoksonaz (U/L)	-0,045	0,273	-0,182	-0,151	1	-0,361	0,038	0,101	0,729**	-0,150
TAK (mmol/L)	-0,321	0,050	-0,108	0,080	-0,361	1	-0,244	-0,284	-0,162	-0,550*
T-K (mg/dL)	0,030	0,361	-0,039	0,346	0,038	-0,244	1	0,891**	0,029	0,762**
LDL-K (mg/dL)	-0,037	0,408	0,028	0,254	0,101	-0,284	0,891**	1	0,070	0,645**
HDL-K (mg/dL)	-0,233	-0,035	-0,003	-0,259	0,729**	-0,162	0,029	0,070	1	-0,310
Trigliserit (mg/dL)	0,431	0,156	0,024	0,274	-0,150	-0,550*	0,762**	0,645*	-0,310	1

*: $p<0,05$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

** : $p<0,01$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

CC polimorfizmi olan kontrol grubunda serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon yapıldığında; T-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=0.762$) ($p<0.01$), LDL-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=0.645$) ($p<0,01$), Paraoksonaz düzeyleri ile HDL-Kolesterol düzeyleri ($r=0.729$) ($p<0,05$) ve T-kolesterol düzeyleri ile LDL-kolesterol düzeyleri ($r=0.891$) ($p<0.01$) arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur (Tablo 32).

Bununla birlikte, TAK düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=-0.550$) ($p<0.05$) arasında negatif korelasyon bulunmuştur (Tablo 32).

Tablo 33. CC polimorfizmi olan hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon

	VEGF (pg/mL)	Neuregulin (pg/mL)	Okside LDL (ng/mL)	Nitrik oksit (μ M)	Paraoksonaz (U/L)	TAK (mmol/L)	T-K (mg/dL)	LDL-K (mg/dL)	HDL-K (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)
VEGF (pg/mL)	1	-0,148	0,065	0,240*	-0,138	-0,221*	0,101	0,051	-0,253*	0,363**
Neuregulin (pg/mL)	-0,148	1	-0,228*	-0,183	-0,010	0,062	0,135	0,167	-0,042	0,042
Okside LDL (ng/mL)	0,065	-0,228*	1	0,045	0,003	-0,004	-0,014	0,012	-0,005	-0,114
Nitrik oksit (μ M)	0,240*	-0,183	0,045	1	-0,012	0,017	-0,091	-0,016	0,067	-0,106
Paraoksonaz (U/L)	-0,138	-0,010	0,003	-0,012	1	0,058	0,049	0,087	-0,101	-0,020
TAK (mmol/L)	-0,221*	0,062	-0,004	0,017	0,058	1	-0,221*	-0,208	0,191	-0,246*
T-K (mg/dL)	0,101	0,135	-0,014	-0,091	0,049	-0,221*	1	0,946**	-0,125	0,626**
LDL-K (mg/dL)	0,051	0,167	0,012	-0,016	0,087	-0,208	0,946**	1	-0,214	0,451**
HDL-K (mg/dL)	-0,253*	-0,042	-0,005	0,067	-0,101	0,191	-0,125	-0,214	1	-0,432**
Trigliserit (mg/dL)	0,363**	0,042	-0,114	-0,106	-0,020	-0,246*	0,626**	0,451**	-0,432**	1

*: $p<0,05$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

** : $p<0,01$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

CC polimorfizmi olan hasta grubunda serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon yapıldığında; VEGF düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=0.363$) ($p<0,01$), VEGF düzeyleri ile Nitrik oksit düzeyleri ($r=0.240$) ($p<0,05$), T-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=0.626$) ($p<0.01$), LDL-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=0.451$) ($p<0,01$) ve T-

kolesterol düzeyleri ile LDL-kolesterol düzeyleri ($r=0.946$) ($p<0.01$) arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur (Tablo 33). Bununla birlikte, VEGF düzeyleri ile HDL-kolesterol düzeyleri ($r=-0,253$) ($p<0,05$), Neuregulin düzeyleri ile Okside LDL düzeyleri ($r=-0.228$) ($p<0.05$), TAK düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=-0.246$) ($p<0.05$), HDL-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=-0.432$) ($p<0.01$) arasında negatif korelasyonlar bulunmuştur (Tablo 33).

Tablo 34. CA polimorfizmi olan kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon

	VEGF (pg/mL)	Neuregulin (pg/mL)	Okside LDL (ng/mL)	Nitrik oksit (μ M)	Paraoksonaz (U/L)	TAK (mmol/L)	T-K (mg/dL)	LDL-K (mg/dL)	HDL-K (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)
VEGF (pg/mL)	1	-,0905	0,531	0,086	-0,882	0,108	-0,351	-0,864	-0,392	0,090
Neuregulin (pg/mL)	-0,905	1	-0,825	0,249	0,660	0,270	0,009	0,995**	0,743	-0,505
Okside LDL (ng/mL)	0,531	-0,825	1	-0,416	-0,292	-0,518	0,548	-0,850	-0,918	0,862
Nitrik oksit (μ M)	0,086	0,249	-0,416	1	-0,542	0,985**	-0,207	0,345	0,740	-0,733
Paraoksonaz (U/L)	-0,882	0,660	-,0292	-542	1	0,543	0,341	0,581	0,010	0,232
TAK (mmol/L)	0,108	0,270	-0,518	0,985*	-0,543	1	-0,369	0,366	0,803	-0,832
T-K (mg/dL)	-0,351	0,009	0,548	-0,207	0,341	-0,369	1	-0,025	-0,453	0,710
LDL-K (mg/dL)	-0,864	0,995**	-0,850	0,345	0,581	0,366	-0,025	1	0,802	-0,573
HDL-K (mg/dL)	-0,392	0,743	-0,918	0,740	0,010	0,803	-0,453	0,802	1	-0,939
Trigliserit (mg/dL)	0,090	-0,505	0,862	-0,733	0,232	-0,832	0,710	-0,573	-0,939	1

*: $p<0,05$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

**.: $p<0,01$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

CA polimorfizmi olan kontrol grubunda serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol,

LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeyleri arasında korelasyon yapıldığında; Neuregulin düzeyleri ile LDL-kolesterol düzeyleri ($r=0.995$) ($p<0.01$) arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (Tablo 34).

Tablo 35. CA polimorfizmi olan hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeyleri arasında korelasyon

	VEGF (pg/mL)	Neuregulin (pg/mL)	Okside LDL (ng/mL)	Nitrik oksit (μ M)	Paraoksonaz (U/L)	TAK (mmol/L)	T-K (mg/dL)	LDL-K (mg/dL)	HDL-K (mg/dL)	Triglicerit (mg/dL)
VEGF (pg/mL)	1	-0,487	-0,357	-0,158	-0,610*	-0,029	0,119	0,149	-0,212	0,024
Neuregulin (pg/mL)	-0,487	1	-0,080	0,368	0,304	-0,008	-0,200	-0,302	0,008	0,037
Okside LDL (ng/mL)	-0,357	-0,080	1	0,149	0,246	-0,172	0,206	0,151	0,069	0,571*
Nitrik oksit (μ M)	-0,158	0,368	0,149	1	0,040	-0,393	0,271	0,127	0,135	0,489
Paraoksonaz (U/L)	-0,610*	0,304	0,246	0,040	1	-0,135	-0,159	-0,292	-0,176	0,183
TAK (mmol/L)	-0,029	-0,008	-0,172	-0,393	-0,135	1	-0,720*	-0,582*	-0,048	-0,558*
T-K (mg/dL)	0,119	-0,200	0,206	0,271	-0,159	-0,720**	1	0,929**	0,212	0,587*
LDL-K (mg/dL)	0,149	-0,302	0,151	0,127	-0,292	-0,582*	0,929**	1	0,092	0,431
HDL-K (mg/dL)	-0,212	0,008	0,069	0,135	-0,176	-0,048	0,212	0,092	1	-0,290
Triglicerit (mg/dL)	0,024	0,037	0,571*	0,489	0,183	-0,558*	0,587*	0,431	-0,290	1

*: $p<0,05$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

***: $p<0,01$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

CA polimorfizmi olan hasta grubunda serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Triglicerit düzeyleri arasında korelasyon yapıldığında; Okside LDL düzeyleri ile Triglicerit düzeyleri ($r=0.571$) ($p<0,05$), T-kolesterol düzeyleri ile LDL-kolesterol düzeyleri ($r=0.929$) ($p<0,01$), T-kolesterol düzeyleri ile Triglicerit düzeyleri ($r=0.587$) ($p<0,05$) arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur (Tablo 35). Bununla

birlikte, TAK düzeyleri ile T-kolesterol düzeyleri ($r=-0,720$) ($p<0,01$), TAK düzeyleri ile LDL-kolesterol düzeyleri ($r=-0.582$) ($p<0.05$), TAK düzeyleri ile HDL-kolesterol düzeyleri ($r=-0.048$) ($p<0.05$), TAK düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=-0.558$) ($p<0.05$) arasında negatif korelasyonlar bulunmuştur (Tablo 35).

Tablo 36. AA polimorfizmi olan kontrol grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon

	VEGF (pg/mL)	Neuregulin (pg/mL)	Okside LDL (ng/mL)	Nitrik oksit (μ M)	Paraoksonaz (U/L)	TAK (mmol/L)	T-K (mg/dL)	LDL-K (mg/dL)	HDL-K (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)
VEGF (pg/mL)	1	0,166	-0,530	0,195	0,395	0,097	0,018	-0,010	0,363	-0,659
Neuregulin (pg/mL)	0,166	1	-0,746	0,348	-0,743	-0,702	-0,830	-0,787	-0,508	0,531
Okside LDL (ng/mL)	-0,530	-0,746	1	-0,669	0,225	0,081	0,648	0,465	0,574	0,054
Nitrik oksit (μ M)	0,195	0,348	-0,669	1	-0,265	0,276	-0,067	0,211	-0,581	-0,273
Paraoksonaz (U/L)	0,395	-0,743	0,225	-0,265	1	0,763	0,483	0,471	0,444	-0,753
TAK (mmol/L)	0,097	-0,702	0,081	0,276	0,763	1	0,522	0,704	-0,037	-0,730
T-K (mg/dL)	0,018	-0,830	0,648	-0,067	0,483	0,522	1	0,944*	0,645	-0,651
LDL-K (mg/dL)	-0,010	-0,787	0,465	0,211	0,471	0,704	0,944*	1	0,378	-0,707
HDL-K (mg/dL)	0,363	-0,508	0,574	-0,581	0,444	-0,037	0,645	0,378	1	-0,431
Trigliserit (mg/dL)	-0,659	0,531	0,054	-0,273	-0,753	-0,730	-0,651	-0,707	-0,431	1

*: $p<0,05$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

AA polimorfizmi olan kontrol grubunda serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon yapıldığında; T-kolesterol düzeyleri ile LDL-kolesterol düzeyleri ($r=0.944$) ($p<0.05$) arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (Tablo 36).

Tablo 37. AA polimorfizmi olan hasta grubunun serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve trigliserit düzeyleri arasında korelasyon

	VEGF (pg/mL)	Neuregulin (pg/mL)	Okside LDL (ng/mL)	Nitrik oksit (μ M)	Paraoksonaz (U/L)	TAK (mmol/L)	T-K (mg/dL)	LDL-K (mg/dL)	HDL-K (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)
VEGF (pg/mL)	1	0,312	-0,090	-0,056	-0,278	-0,047	-0,281	-0,189	-0,092	-0,296
Neuregulin (pg/mL)	0,312	1	-0,249	-0,133	-0,216	-0,069	-0,069	0,103	0,050	-0,019
Okside LDL (ng/mL)	-0,090	-0,249	1	0,176	0,031	-0,273	-0,086	-0,294	0,322	-0,316
Nitrik oksit (μ M)	-0,056	-0,133	0,176	1	-0,019	-0,188	0,121	0,127	0,106	-0,135
Paraoksonaz (U/L)	-0,278	-0,216	0,031	-0,019	1	0,287	0,188	0,245	-0,093	0,272
TAK (mmol/L)	-0,047	-0,069	-0,273	-0,188	0,287	1	0,202	0,139	-0,083	0,135
T-K (mg/dL)	-0,281	-0,069	-0,086	0,121	0,188	0,202	1	0,304	-0,162	0,605**
LDL-K (mg/dL)	-0,189	0,103	-0,294	0,127	0,245	0,139	0,304	1	-0,032	0,328
HDL-K (mg/dL)	-0,092	0,050	0,322	0,106	-0,093	-0,083	-0,162	-0,032	1	-0,152
Trigliserit (mg/dL)	-0,296	-0,019	-0,316	-0,135	0,272	0,135	0,605**	0,328	-0,152	1

** $p < 0,01$ olduğundan gruplar arası fark önemlidir.

AA polimorfizmi olan hasta grubunda serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, Paraoksonaz, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında korelasyon yapıldığında; T-kolesterol düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri ($r=0.605$) ($p < 0.01$) arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (Tablo 37).

5. TARTIŞMA

Koroner kalp hastalığı (KKH), ya da bilinen adıyla koroner arter hastalığı, kalpteki kan damarlarının oksijen ve kan desteğinin azalmasıdır. KKH, kolesterol plaklarının arter duvarlarına akümüasyonu ile oluşturduğu ateroskleroz nedeniyle meydana gelir. Kalp kaslarına giden kan akımının obstrüksiyonu anjina pectoris denilen göğüs ağrısına, kalp krizine ve diğer semptomlara neden olur.

Koroner arter hastalığı (KAH), koroner arterlerin duvarlarındaki aterosklerotik değişikliklerdir. Ateroskleroz büyük ve orta büyüklükteki arterleri tutan bir hastalıktır. Endotel disfonksiyonu, vasküler inflamasyon, lipit, kolesterol, kalsiyum ve hücre debrislerinin intima tabakasında birikimi sonucu plak oluşumu, akut ve kronik luminal obstrüksiyon, kan akımı anormallikleri, hedef organa giden oksijen desteğinin azalması ile meydana gelir. Vasküler endotelial hücrelerin diferansiyasyon ve gelişimi kardiyovasküler hastalıklar açısından çok önemlidir. Çünkü KAH'da koleteral damar gelişimi ve anjiyogenez miyokard iskemiyeye karşı korumaktadır. Yapılan çalışmalar anjiyogenez sitümüle eden pek çok faktörün olduğunu göstermiştir. Bunlar VEGF, nitrik oksit sentaz (NOS), epidermal büyüme faktörü (EGF), Angiopoetin1 ve 2, eritropoetin (EPO), e-kaderin, TNF- α , TGF α , trombosit kaynaklı büyüme faktörleri ve doku faktörleridir. Aterosklerozlu hastalarda prognoz kan akımının sınırlanma derecesine (hipoksik-iskemik durum), vasküler yatağa ve sistemik hastalığın yüküne bağlıdır. Hipoksi aterom plağında anjiyogeneze yol açar ve bunda büyüme faktörlerinin etkisi vardır.⁹³

VEGF, vasküler permeabilite artışı yapan ve endotel için mitojenik etki gösteren bir büyüme faktörüdür ve anjiyogeneze aldığı moleküler rol ile aterosklerozda adından söz edilen bir moleküldür.⁹⁴

Vasküler endotelyal hücrelerin diferansiyasyon ve gelişimi kardiyovasküler hastalıklar açısından çok önemlidir. Çünkü KAH'da kolateral damar gelişimi ve anjiyogenez miyokardı iskekiye karşı korumaktadır. VEGF, damar duvarında bulunan endotel hücre proliferasyonunu başlatmasına ve anjiyogenez sitümüle ettiği bilinmesine rağmen, aterosklerozdaki rolü açık değildir. Aterosklerotik plak gelişimini önleyici faktör olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. Vasküler permeabilite faktörü olarak da bilinen VPF, fetüs ve yetişkinlerde vaskülogenezde ve anjiyogenezde rol alır.⁹⁵ VEGF fizyolojik olarak embriyogenezde; patolojik olarak ise aterosklerozda, tümör gelişimi ve oküler neovaskülerizasyonda, inflamatuvar hastalıklarda yeni damar gelişimi rolünü üstlenir.⁹⁶ VEGF aterosklerozda bozulmuş doku perfüzyonu ile VEGF proteini, neovaskülerizasyonu indükleyerek kolateral damar gelişimine yol açmaktadır. VEGF, HIF-1 α tarafından transkripsiyonu gerçekleşen ve hipoksi yanıtında rol alan anjiyogenetik faktördür. Hipoksi veya iskeki durumunda VEGF gen ailesinin ekspresyonunu hipoksi indükleyen faktör 1 (HIF-1) indükler ve anjiyogenez aktive olur.⁹⁷

Koroner kolateral gelişimi koroner arter hastalarında miyokardı koruyabilir ve iskekiyi sınırlandırabilir.⁹⁸ İnfarkt sahasında koroner kolaterallerin varlığı koroner reperfüzyon sağlanana kadar kan akımını gerçekleştirebilir.⁹⁹

Yapılan araştırmalar özellikle ileri yaşlarda kardiyovasküler hastalıklardaki anjiyogenez regülasyonunda VEGF'nin önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Bu durum koroner arter hastalığında VEGF'nin diagnostik ve prognostik bir belirteç olup olamayacağı konusundaki çalışmaları gündeme getirmiştir.

Kimura ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, hastaneye ayaktan başvuran 443 hastanın serum VEGF konsantrasyonları incelendiğinde, sigara kullananlarda serum VEGF konsantrasyonlarının kullanmayanlara göre yüksek olduğu tespit edilmiş; erkek cinsiyette ve aynı zamanda yine sigara kullananlarda serum VEGF konsantrasyonları yüksek olarak bulunmuş, serum VEGF konsantrasyonlarının aterosklerozun risk faktörleriyle sıkı ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.¹⁰⁰

Howell ve arkadaşlarının 984 vakada VEGF-2578 üzerinde yaptığı bir çalışmada VEGF-2578 CC allelini taşıyanlarda VEGF mRNA ekspresyonunun AA allelini taşıyanlara göre daha yüksek olduğu; AA genotipinin ateroskleroz gelişimi için risk faktörü, CC genotipinin ise protektif faktör olduğu saptanmıştır.¹¹

Bizim yaptığımız çalışmada hasta serum VEGF konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak sigara kullanımına, cinsiyete, kuatelet indeksine, aile öyküsüne, diğer hastalık varlığına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklarda gelişen iskemi; hipoksik-iskemik durumda hipoksik hücrelerden yayılan ve endotelial hücrelerdeki reseptörlere bağlanan VEGF anjiojenezi aktive eder ve VEGF ekspresyonu artar. Bizim yaptığımız çalışmada, koroner arter hastalarında artmış serum VEGF düzeylerinin iskeminin indüklediği duruma bağlı olarak meydana geldiği düşünülebilir.

Konopka ve arkadaşları 104 akut koroner sendromu olan (miyokard enfarktüsü geçirmemiş) hastada yaptıkları çalışmada normal popülasyona göre serum VEGF konsantrasyonlarının yüksek olduğunu

tespit etmişler ve her tekrarlı iskemi epizodunun neovaskülarizasyonu sitümüle ettiğini, serum VEGF konsantrasyonunun miyokardiyal hasarın markeri olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.⁹⁶

Anjiojenez ve koroner kolateral damar gelişiminde önemli rol oynar. VEGF'nin, koroner kolateral gelişimi olan hastalarda, VEGF-2578 A allelini taşıyanların VEGF mRNA ekspresyonunun belirgin olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir.¹⁰¹

Van Der Meer ve arkadaşlarının 596 koroner arter hastasında yaptığı çalışmada VEGF 405 ve VEGF 460 polimorfizmi araştırıldığında; VEGF 405 CC genotipini taşıyanlar ile kronik kalp yetmezliğindeki hasar arasında ilişki bulunmuştur. Bu hastalarda VEGF plazma düzeyleri daha düşük olarak saptanmıştır.¹⁰²

Lin ve arkadaşlarının 393 koroner arter hastasında VEGF +405CG ve -2578CA polimorfizmleri ile yaptığı çalışmada ise, VEGF-2578 A allelini taşıyanların VEGF mRNA ekspresyonunun belirgin olarak yüksek olduğu ve bu allelin anjiojenez ve koroner kolateral damar gelişiminde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Gen tiplerinin ve risk faktörlerinin tanımlanmasının, risk altındaki hastaların tedavi ve yönlendirilmesinde kolaylık sağlanacağı sonucuna varılmıştır.¹³

Bizim yaptığımız çalışmada VEGF 2578 C/A geninde hastalarda C homozigotların oranı %67,5 iken, A homozigotların oranı %21,1 ve CA heterozigotların oranı %11,4'tür. Kontrollerde C homozigotların oranı %67,9 iken, A homozigotların oranı %17,9 ve CA heterozigotların oranı %14,3'tür. Bu sonuçlara göre genotip dağılımında hasta ve kontrol grupları arasında yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Buna göre, VEGF-2578CA polimorfizminin

koroner arter hastalığı ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Yine hasta grubunda tek, iki veya üç damar tıkanıklığına göre genotip sıklığı dağılımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. CC polimorfizmi olan kontrol grubunun serum VEGF düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunurken, CC, CA, AA polimorfizmi olan hasta gruplarının serum VEGF düzeylerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlılık görülmemiştir. Kontrol ve iki damar hasta grubunun karşılaştırılmasında kontrol grubunun serum VEGF düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük iken, yine kontrol ve üç damar hasta grubunun serum VEGF düzeylerinin karşılaştırılması da istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Hasta grubunun serum VEGF düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca total hasta grubunun serum VEGF ve HDL-Kolesterol düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur.

Neuregulin (NRG1), sinir sistemi ve kalbin normal gelişimi için gereklidir. Endokardiyal kaynaklı Neurogulin-1 ve miyokardiyal ErbB reseptörleri normal kardiyak gelişim için gereklidir.¹⁰³ NRG1- β 1,adult kalbinde β adrenerjik reseptör aktivasyonu yapar. ErbB2 ve ErbB4 reseptörlerinin varlığı neonatal ve yetişkin fare ventriküllerinde gösterilmiştir. Bu reseptörlerin ligandları heregulin/neuregulin ve EGF içerir ve hepside mitojeniktir. Apoptoz inhibe edildiğinde kardiyak miyosit proliferasyonu ve hipertrofi başlar. ErbB2/ErbB3/heregulin eksikliği olan farelerde intra uterin ölüm, kardiyak trabekül eksikliği ve endokardiyal yastık defektleri meydana gelir. HER2'nin kardiyoprotektif olan sinyal yolları NF κ -B içerir ve bu kardiyak peptif büyüme faktörlerinin regülasyonunu sağlar. Prensipte olarak kardiyak miyositlerinde olan HER2 reseptör ligandları apoptoza karşı koruyucudur. İskemi, yüksek tansiyon ve oksidatif stres ile HER2 reseptörlerinin blokajı apoptoza yol açmaktadır.

NRG'ler epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi (EGFR), reseptör tirozin kinazları (ErbB2, ErbB2, ErbB4) aktive eden NRG-1'den 4 kadar olan genlerle kodlanır.¹⁰⁴ NRG1 tarafından ErbB2 ve ErbB4 reseptörlerinin uyarılması miyokardiyal trabekülasyon ve koroner mikrovasküler gelişim için önemlidir.¹⁰⁵ Bozulmuş NRG1-erbB2 sinyali kardiyomiyopatiye neden olur ve HER2 kardiyak gelişim için çok önemli role sahiptir.¹⁰⁶

Posh ve arkadaşları 765 hasta ve kontrol arasında yaptığı çalışma sonucunda plazma HER2 düzeylerinin kardiyak kontraktilite ve sol ventrikül duvar kalınlığı ile ilişkili bir durumu yansıtmadığı ve bu nedenle HER2 düzeylerinin kalp hastalıkları için yararlı bir biyomarker olamayacağı sonucuna varmışlardır.¹⁰³

Geisberg ve arkadaşlarının 20'si anjiyografik olarak normal koroneri olan diğer 40'ı ise koroner arter hastası olan 60 kişiyle yaptığı çalışmada hem serum hem de plazma Neuregulin düzeyleri ile aterosklerozun anjiyografik şiddetinin ters orantılı olarak korelasyonu bulunduğu tespit edilmiş ve özellikle plazma Neurogulin düzeylerinin 2 kat daha yüksek olduğu durumlarda ve koroner aterosklerozda biyobelirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.⁷⁶

Bizim yaptığımız çalışmada hasta grubunun serum NRG1 konsantrasyonları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Ancak sigara kullanımına, cinsiyete, kuatelet indeksine, aile öyküsüne, diğer hastalık varlığına göre ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. CC, AA, CA polimorfizmi olan hasta grubunun serum NRG1 düzeyleri CC, AA, CA polimorfizmi olan kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. CC, CA, AA polimorfizmi olan hasta gruplarında kendi içinde

serum NRG1 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Tek damar hasta ve kontrol grubunun; iki damar hasta ve kontrol grubunun; üç damar hasta ve kontrol grubunun serum Neuregulin düzeyleri karşılaştırılmasında hasta grubun serum Neuregulin düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Üç damar hasta grubunun serum Neuregulin düzeyleri iki damar hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca CC polimorfizmi olan hasta grubunun serum Neuregulin düzeyleri ile Okside LDL düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Neuregulin iskemi durumunda anjiyogenez sitümüle eder ve kalbi iskemik hasara karşı korumada önemli bir rol oynar. Bizim yaptığımız çalışmada koroner arter hastalarının serum NRG1 konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre düşük bulunması, bu hastalarda koroner arter hastalığının bir inflamasyon olduğu düşünülerek sitokinlerin etkisiyle NRG1 ekspresyonunun bozulmasıyla açıklanabilir.

LDL'nin serbest radikallerle etkileşimi sonucu okside LDL oluşur. Okside LDL, endotel disfonksiyonunu indükleyici etki gösterir. LDL'nin oksidatif modifikasyonunu intima hasarıyla infiltrasyonu ve ardından makrofaj hücrelerinin bu bölgeye göçü izler.¹⁰⁷ Majör proaterojenik molekül olan Okside LDL, endotel disfonksiyonu ve aterojenezin klavuzluğunda vasküler endotel hücrelerindeki LDL hücrelerinin oksidatif modifikasyonu ile meydana gelir.¹⁰⁸ Makrofajlar okside olmuş LDL'lerle etkileşime girerek köpük hücrelerini ardından ise yağlı çizgilenmeyi meydana getirir. Bunlar zamanla arterde tıkanmaya ve ateroskleroza neden olur.¹⁰⁵

Ueda ve arkadaşlarının 135 akut miyokard enfarktüsü geçirmiş, stabil, anstabil anginası olan hasta ile 46 kontrol ile yaptığı çalışmada plazma Okside LDL düzeyleri akut miyokard enfarktüsü

hastalarda stabil, anstabil anginası olan hasta ile kontrol grubuna göre belirgin düzeyde yüksek bulunmuştur.¹⁰⁹

Bing ve arkadaşlarının 60 koroner arter hastası ve 50 kontrol ile yaptıkları çalışmada, kontrol grubuna kıyasla koroner arter hastalarında Okside LDL düzeyleri belirgin şekilde yüksek olarak tespit edilmiş ve sonuçta Okside LDL'nin aterosklerozun patogenezinin açıklık getirebileceği ve gelecekteki çalışmaları destekleyebileceği düşünülmüştür.¹¹⁰

Bizim yaptığımız çalışmada hasta ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırmada, total hasta grubunun serum Okside LDL düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. CA ve AA polimorfizmi olan hasta grubunun serum Okside LDL düzeyleri kontrol grubunun değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. İki damar hasta ve kontrol grubunun; üç damar hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılmasında hasta grubunun serum Okside LDL düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. CA polimorfizmi olan hasta grubunun serum Okside LDL ve trigliserit düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.

Bing ve arkadaşlarının ve Ueda ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda olduğu gibi bizim yaptığımız çalışmada da koroner arter hastalarında serum Okside LDL düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu durumda, artan süperoksit radikali üretimine bağlı olarak yükselen Okside LDL düzeylerinin aterosklerozun patogenezinin rol aldığı söylenebilir.

Sağlıklı koroner arterlerde asetilkolin etkisi ile endotelial nitrik oksit salınımı koroner vazodilatasyon olurken aterosklerotik arterlerde vasokonstriksiyon olur. KAH'da endojen nitrik oksit aktivitesinde

eksiklik mevcuttur ve koroner arter vazospazmı olur.¹¹¹ Nitrik oksit endotel hücre kaynaklı endojen damar genişleticidir.¹¹² Nitrik oksit, NOS adı verilen enzim aracılığıyla L-argininden sentezlenen vazodilatördür.¹¹³ Nitrik oksit difüzyonla vasküler düz kas hücrelerine geçer, guanil siklazı stimüle ederek cGMP sentezini artırır. Nitrik oksit vasküler endotele lökosit ve trombosit adezyonunu azaltıp okside LDL miktarını düşürerek ateroskleroz gelişimini önleyici etki gösterir.

Nitrik oksit sentezinin inhibe edilmesi hem normal koroner arter hem de hasta koronerlerin çapının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir.¹¹⁴ İyi oksijenlenen miyokardın NO bazal seviyeleri normal iken iskemi durumunda artmış oksijen ihtiyacıyla ilişkili olarak sekresyonu artmaktadır.¹¹⁵

Node ve arkadaşlarının 15 koroner arter hastalığı olan ve 17 koroner arter hastalığı olmayan sağlıklı kontrollerle yaptığı çalışmada, egzersizin indüklediği NO seviyeleri artmış olmasına rağmen, iki grup arasında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Bu çalışmada artmış NO seviyelerinin koroner arter hastalarında nasıl bir regülasyonu sağladığı da açıklanamamıştır. Bu duruma humoral ve kimyasal faktörlerin neden olabileceği sonucuna varılmıştır.¹¹⁶

Förstermann ve arkadaşlarının 14-25 yaş arası son dönem kardiyomiyopatisi olan ve 6 aterosklerotik olmayan hasta ve 42-55 yaş arası koroner by-pass'lı 11 aterosklerotik hastayla yaptığı, nitrik oksit kaynaklı vazodilatasyonun koroner vazospazm ve iskemi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada nitrik oksit kaynaklı vazodilatasyonun aterosklerotik damarlarda relaksasyon yaptığı ve aterosklerozda bu mekanizmanın bozulmasının iskemi ve vazospazma yol açtığı sonucuna varılmıştır.¹¹⁷

Bizim yaptığımız çalışmada hasta ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırmada, serum Nitrik oksit düzeyleri total hasta grubunda kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. CC ve CA polimorfizmi olan hasta grubu ve kontrol grubu serum Nitrik oksit düzeyleri karşılaştırılmasında, hasta grubunun serum Nitrik oksit düzeyleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Üç damar hasta ve kontrol grubu karşılaştırmasında hasta grubunun serum Nitrik oksit düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. CC polimorfizmi olan hasta grubunun serum VEGF ile Nitrik oksit düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada serum Nitrik oksit düzeylerinin koroner arter hastalarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunması, bu hastalarda artan serbest radikal üretimi ile nitrik oksidin endotel için zararlı olan metabolitlerine okside olması veya artan Okside LDL düzeylerinin nitrik oksidin sentezini indüklemesi sebebi ile olabilir.

PON1, antioksidan etkisi olduğu bilinen HDL kaynaklı plazma enzimidir. PON1 43 kDa ağırlığında Ca^{2+} bağımlı, 354 aminoasitlik glikoproteindir.¹¹⁸ Paraoksonaz (PON1), karaciğerde sentez edilir ve HDL kolesterol üzerinde serumda sirküle olur.¹¹⁹ Paraoksonaz, HDL'nin subfraksiyonu olan bir enzimdir ve apoA-1 içerir. LDL'nin oksidasyonunu inhibe ederek antiaterojenik etki gösterir.¹²⁰ HDL kolesterol aterojenezde daha önemli bir göreve sahiptir. Düşük HDL konsantrasyonu koroner kalp hastalığı yönünden yüksek riske sahiptir. HDL yalnızca ateroskleroza karşı değil, aynı zamanda inflamasyonun indüklediği organ hasarına karşı da koruyucudur. HDL arter duvarındaki köpük hücrelerini azaltan bir antioksidandır. Ayrıca PON1, makrofajları bağlayarak antiaterojenik etkiye ayrıca bir katkıda bulunur. Bu nedenle ileride kardiyoprotektif etkisinden dolayı tedavi amaçlıda kullanılabilir.¹²¹ PON1, paroksonaz ve arilesteraz aktivitesine sahip bir ester hidrolazdır. PON1, tarım ilacı olarak kullanılan

parationun toksik metaboliti parokson adlı organofosfatı hidrolize eder. Fenilasetat arilesteraz aktivitesi ölçümünde sık kullanılan bir substrattır.¹²²

Gupta ve arkadaşları, koroner arter hastalığı olmayan Tip 2 diyabetli 250 hasta ile koroner arter hastalığı olan Tip 2 diyabetli 300 hastayı karşılaştırdıklarında, serum PON1 aktivitesinin ikinci grupta belirgin olarak düşük olduğunu tespit etmişlerdir. PON1 aktivitesinin düşüklüğünün önemli olabileceğini ve koroner arter hastalığı için diyabetten bağımsız olarak ayrı bir belirteç olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.¹¹⁹

Azarsız ve arkadaşları anjiyografiyle hastalığı tespit edilmiş 101 tipik angina pectorisli hasta ile 24 sağlıklı gönüllüde yaptığı çalışmada, koroner arter hastalığı olanlarda artmış oksidatif stres ve LDL oksidasyonu nedeniyle serum PON1 aktivitesinin düşük olduğunu ve aterosklerozun derecesini belirlemede önemli olabileceğini ileri sürmüşlerdir.¹²³

Yıldız ve arkadaşlarının tipik anjina nedeniyle hastaneye başvuran ve koroner arter hastalığı şüphesiyle elektif anjiyografi yapılan ve sonuçları normal olan 134 hastada yaptığı, serum PON1 aktivite çalışmasında; yavaş koroner arter akımı tespit edilen hastalarda PON1 aktivitesinin düşüklüğü tespit edilmiştir. Bozulmuş koroner akımın mekanizması bilinmese de PON1 aktivitesinin düşüklüğünün yavaş koroner arter akımın yeni biyobelirteci olabileceği, koroner arter akımın regülasyonu için serum PON1 aktivitesinin fizyopatolojik rolünün daha fazla çalışma yapılmasına ihtitacı olduğu sonucuna varılmıştır.¹²⁴

Kotur-Stevuljevic ve arkadaşları tarafından 165 koroner arter hastası ve 105 sağlıklı gönüllü arasında yapılan çalışmada serum PON1 aktivitesinin KAH'lıları olanlarda düşük olduğu izlenmiştir.¹²⁵

Bizim yaptığımız çalışmada hasta ve kontrol grupları arasında serum Paraoksonaz düzeyleri karşılaştırılmasında, total hasta grubunun serum Paraoksonaz düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. AA polimorfizmi olan hasta grubu ve kontrol grubunun karşılaştırılmasında, hasta grubunun serum Paraoksonaz düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Tek damar hasta ve kontrol grubunun; İki damar hasta ve kontrol grubunun ve yine üç damar hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılmasında hasta grubunun serum Paraoksonaz düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Yaşa göre total hasta ve kontrol grubunun kendi içinde serum Paraoksonaz düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; kontrollerde <60 yaş grubunda ≥60 yaş grubuna göre serum Paraoksonaz düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Kontrol grubunun serum Paraoksonaz ve HDL-Kolesterol düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Aynı şekilde CC polimorfizmi olan kontrol grubunun yine serum Paraoksonaz ve HDL-Kolesterol düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada, koroner arter hastalarında Paraoksonaz düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek bulunması, LDL'nin lipit oksidasyonunu azaltmak üzere aktivasyonunun artması ve aterosklerozdan korunma mekanizmasına dahil olması ile yorumlanabilir.

TAK, serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur. Bu radikale karşı antioksidanların verdiği yanıt tayin edilir. Antioksidanlar, hücreleri serbest oksijen radikallerinin etkisinden korur.¹²⁶ A, C, E vitaminleri, glutatyon, katalaz, flavonoidler, koenzim Q ve α-lipoik asit, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan moleküller serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek oksidatif reaksiyonları yavaşlatır veya durdururlar.¹²⁷ Oksidatif stres, iskemi-reperfüzyon hasarı, anemi, artrit, enflamasyon, nörodejenerasyon, parkinson, yaşlanma ve Alzheimer demans, diyabet, romatoid artirit ve

nörodejeneratif hastalıkların gelişimine neden olur.¹²⁸ Kardiyovasküler hastalık gelişiminde antioksidan defans ile prooksidanlar arasında dengesizlik meydana gelir. Süperoksit anyonları gibi reaktif oksijen ürünlerinin artışı ve koruyucu süperoksit dismutazın azalması gibi faktörler bu dengesizlik sürecine katkıda bulunmaktadır.¹²⁹

Delimaris ve arkadaşları 40'ı erkek, 7'si kadından oluşan 47 anevrizmal veya arteriyel oklüziv hastalığı olanlar ve 37'si erkek, 12'si kadından oluşan 49 sağlıklı gönüllü arasında yapılan çalışmada, hasta grubunda TAK'ın ılımlı şekilde azaldığını tespit etmişlerdir. Hastalığın gelişiminde antioksidan/oksidan dengesizliği dışında diğer faktörlerin de etkili olabileceği ve klinik değerlendirmelerle birlikte ele alınması gerektiği sonucuna varmışlardır.¹³⁰

Kotur-Stevuljevic ve arkadaşlarının 84'ü kadın ve 113'ü erkekten oluşan 197 kontrol grubu ile 66'sı kadın ve 112'si erkekten oluşan 188 koroner arter hastası arasında yapılan çalışmada, oksidatif stresin koroner arter hastalığında arttığı, fakat hastalığın şiddeti ile direkt bağlantılı olmadığı, ancak çalışmalarının ateroskleroza karşı antioksidan ve antiinflamatuvar tedaviyi desteklemesi açısından önemli olabileceği sonucuna varmışlardır.¹²⁵

Demirbağ ve arkadaşlarının 53 koroner arter hastası ve 42 normal koroner arterli kişi arasında yaptığı çalışmada, DNA hasarı olan koroner arter hastalarında TAK seviyesinin normal koroner arterli kişilere oranla düşük olduğu ve bu bulgular ışığında koroner arter hastalarında antioksidan defans düşüklüğünün DNA hasarı meydana getirebileceğini tespit etmişlerdir.¹³¹

Bizim yaptığımız çalışmada tek damar hasta ve kontrol grubu karşılaştırılmasında hasta grubunun serum TAK düzeyleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Tek damar ve iki damar hasta grubunun karşılaştırılmasında tek damar grubunun serum TAK düzeyleri iki damar hasta grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Tek damar ve üç damar hasta grubunun serum TAK karşılaştırılmasında tek damar grubunun serum TAK düzeyleri üç damar hasta grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Kontrol grubunun serum TAK ve Trigliserit düzeyleri arasında; yine aynı şekilde hasta grubunda serum TAK ve Trigliserit düzeyleri arasında negatif korelasyonlar bulunmuştur. CC polimorfizmi olan kontrol grubunda TAK düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri arasında; CC polimorfizmi olan hasta grubunda TAK düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri arasında negatif korelasyonlar bulunmuştur. CA polimorfizmi olan hasta grubunun TAK düzeyleri ile Total kolesterol düzeyleri; TAK düzeyleri ile LDL-kolesterol düzeyleri; TAK düzeyleri ile HDL-kolesterol düzeyleri; TAK düzeyleri ile Trigliserit düzeyleri arasında negatif korelasyonlar bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada tek damar hasta ve kontrol grubu karşılaştırılmasında hasta grubunda artmış antioksidan kapasite düzeyleri bulunmuştur. Bu durum, koroner arter hastalığında artan serbest radikal üretimine bağlı olarak değişen antioksidan savunmayı düşündürmektedir.

Ayrıca lipit profili değerlendirmesinde; CC polimorfizmi olan hasta grubunda kontrol grubuna göre serum LDL-Kolesterol düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,027$). CC, CA, AA polimorfizmi olan hasta grupları arasında serum T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Tek damar hasta grubunda serum LDL-Kolesterol, Trigliserit düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur (sırasıyla

$p<0,034$; $p<0,011$). İki damar hasta grubunda serum LDL-Kolesterol düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,040$). Tek damar ve iki damar hasta grubunun serum Trigliserit düzeyi iki damar hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,032$). Kontrol grubunun serum T-Kolesterol ile LDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında pozitif; LDL-Kolesterol ile Trigliserit düzeyleri arasında pozitif; HDL-Kolesterol ile Trigliserit düzeyleri arasında negatif; Trigliserit ile T-Kolesterol düzeyleri arasında pozitif ve HDL-Kolesterol ile Trigliserit düzeyleri arasında negatif korelasyonlar bulunmuştur. Total hasta grubunun serum Trigliserit düzeyleri ile HDL-Kolesterol düzeyleri arasında istatistiksel olarak negatif korelasyon bulunmuştur. CC polimorfizmi olan kontrol grubunun serum T-Kolesterol ile LDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur. CC polimorfizmi olan hasta grubunun serum LDL-Kolesterol, T-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri arasında pozitif korelasyonlar; HDL-Kolesterol Trigliserit düzeyleri arasında ise negatif korelasyon bulunmuştur. CA polimorfizmi olan hasta grubunun serum LDL-Kolesterol ile T-Kolesterol düzeyleri arasında ve Trigliserit ile T-Kolesterol düzeyleri arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur. AA polimorfizmi olan kontrol grubunun serum T-Kolesterol ile LDL-Kolesterol düzeyleri arasında ve AA polimorfizmi olan hasta grubunun serum T-Kolesterol ile Trigliserit düzeyleri arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur.

6. SONUÇ

- VEGF 2578 C/A geninde, CC, CA ve CC genotip dağılımında hasta ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.
- Hasta grubunda tek, iki veya üç damar tıkanıklığına göre VEGF 2578 C/A polimorfizm alt gruplarında genotip sıklığı dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.
- Hastalarda serum VEGF konsantrasyonlarının kontrol grubunun VEGF değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun yanında CC polimorfizmi olan hasta grubunda serum VEGF düzeylerinin kontrol grubu değerlerine göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür.
- CC, AA, CA polimorfizmi olan kontrol grubunun serum Neuregulin düzeyleri, CC, AA, CA polimorfizmi olan hasta gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Tek damar hasta ve kontrol grubunun; iki damar hasta ve kontrol grubunun; üç damar hasta ve kontrol grubunun serum Neuregulin düzeyleri karşılaştırmasında hasta grubunun serum Neuregulin düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Üç damar hasta grubunun serum Neuregulin düzeyleri iki damar hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
- Hasta ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırmada, total hasta grubunun ve CA, AA polimorfizm alt gruplarının serum Okside LDL düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.
- Hasta ve kontrol grupları arasında serum Nitrik oksit düzeyleri total hasta grubunda kontrol grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Hasta ve kontrol grupları arasında serum Paraoksonaz düzeyleri karşılaştırılmasında total

hasta ve AA polimorfizm alt grubunun serum Paraoksonaz düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Yaşa göre total hasta grubu ve kontrol grubu kendi içinde serum Paraoksonaz düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; kontrollerde <60 yaş grubunda ≥ 60 yaş grubuna göre serum Paraoksonaz düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca Yaşa göre, kuatelet indeksine, cinsiyete, sigara kullanma durumuna, aile hikayesine, diğer hastalık varlığına göre kontrol ve total hasta grubunun kendi içlerinde serum VEGF, Neuregulin, Okside LDL, Nitrik oksit, TAK, T-Kolesterol, LDL-Kolesterol, HDL-Kolesterol ve Trigliserit düzeyleri düzeylerinin karşılaştırılması yapılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

- Tek damar ve iki damar hasta grubunun karşılaştırılmasında tek damar grubunun serum TAK düzeyleri iki damar hasta grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Tek damar ve üç damar hasta grubunun serum TAK düzeyleri karşılaştırılmasında tek damar grubunun serum TAK düzeyleri üç damar hasta grubu düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.
- Yaptığımız çalışma sonucunda Türk popülasyonunda VEGF 2578 gen polimorfizminin koroner arter hastalığı gelişimine katkıda bulunmadığı söylenebilir. Bununla birlikte, polimorfizm yönünden yapılan değerlendirmede bir farklılık gözlenmemesi; hasta ve kontrol sayısının azlığından, çalışılan popülasyonlar arası farklılıktan kaynaklanıyor olabileceği gibi, VEGF'deki farklı polimorfik gen bölgesinin etkisi de söz konusu olabilir. Ancak çalışmamızdaki kısıtlılıklara bağlı olarak elde edilen bu sonuçların genele yayılması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

KORONER ARTER HASTALIĞI OLGULARINDA VASKÜLER ENDOTELYAL GROWTH FAKTÖRÜ (VEGF) POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, koroner arter hastalığı patogenezi üzerinde etkili olan faktörlerin yanı sıra genetik faktörlerin etkisi üzerine odaklanılmaktadır. VEGF kollateral damar gelişimi ve anjiyogeneze çok önemli rol oynar. Kollateral dolaşım miyokard fonksiyonlarını koruyabilir. Anjiyogenezi düzenleyen genlerin polimorfizmi koroner arter hastalığına yakınlıkla ilişkilidir. Bu yüzden VEGF ekspresyonu önemlidir ve koroner arter hastalığından korunmada yararlı olabilir.

Çalışmamızda 123 koroner arter hastasında ve 28 sağlıklı kontrolde PCR yöntemiyle VEGF 2578 gen bölgesinde polimorfizm analizi yapıldı. Ayrıca çalışma grubunda, koroner arter hastalığı ile ilişkili serum VEGF, neuregulin, okside LDL, nitrik oksit, paraoksonaz ve total antioksidan kapasite düzeyleri ölçüldü.

Hasta ve kontroller arasında VEGF 2578 geninde, genotip dağılımına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Hasta grubunda damar tıkanıklığına göre polimorfizm alt gruplarında genotip sıklığı dağılımında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bununla birlikte total hasta grubunda sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum VEGF, okside LDL, nitrik oksit ve paraoksonaz düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. CC polimorfizmi olan hasta grubu ile kontrol grubu arasında serum VEGF düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür. Serum neuregulin düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında total hasta grubunda daha düşük olduğu

görülmüştür. Üç damar tıkanıklığı olan hasta grubunun serum Neuregulin düzeyleri iki damar hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında total hasta grubunun ve CA, AA polimorfizm alt gruplarının serum Okside LDL düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Total hasta ve AA polimorfizm alt grubunun serum Paraoksonaz düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Tek damar tıkanıklığı olan hasta grubunda iki damar ve üç damar tıkanıklığı olan hasta grubuna göre daha yüksek total antioksidan kapasite düzeyleri bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Koroner Arter Hastalığı (KAH), Vasküler Endotelyal Growth Faktör (VEGF), Polimorfizm

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) GENE POLYMORPHISM IN CASES OF CORONARY ARTERY DISEASE

Recently, in addition to other effects, researches focused on effects of genetic factors on the pathogenesis of coronary artery disease. Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a very important role in the development of collateral vessels and angiogenesis. Collateral Circ can protect functions of myocardium. Polymorphism of angiogenesis regulation genes related predisposition of coronary artery disease. Therefore regulation VEGF expression is important and may be used protect from coronary artery disease.

In this study, The VEGF 2578 polymorphism was investigated in 123 patients with coronary artery disease and 28 healthy controls by Polymerase Chain Reaction method. In addition, serum VEGF, neuregulin, oxidized LDL, nitric oxide, paraoxonase and total antioxidant capacity levels were measured in study group.

There was not found any significant difference between patients and controls in VEGF 2578 gene according to genotype distribution. Also, there was not found any statistically significant difference between groups of patient with diseased vessel in VEGF 2578 gene according to genotype distribution. However, an increase were observed in serum VEGF, oxidized LDL, nitric oxide ve paraoxonase levels in total patients compared with healthy controls. There was observed significant difference in serum VEGF levels between patient and control groups with CC polymorphism. Serum neuregulin levels was found lower in total

patients compared to control group. There was found higher serum neuregulin levels in patients with three vessels disease as compared to two vessels group. We found higher oxidized LDL levels in total patients and groups with CA and AA polymorphism compared to control group.

There were found significantly increased paraoxonase levels in total patients and group with AA polymorphism as compared to controls. An increase total antioxidant capacity levels was found in one vessel group of patients compared to two vessels and three vessels.

Key words: Coronary Artery Disease (CAD), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Polimorphism

9. KAYNAKLAR

1. Mehta JL, Saldeen TGP, Rand K. Interactive Role of Infection, Inflammation and Traditional Risk Factors in Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. **J Am Coll Cardiol** 1998; 31: 1211-1225.
2. Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, Ziada KM, Hobbs RE, McCarthy PM, Young JB, Nissen SE. High Prevalence of Coronary Atherosclerosis in Asymptomatic Teenagers and Young Adults **Circ** 2001; 103: 2705-2710.
3. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Lackner K, Schnabel R, Munzel T, Blankenberg S. Inflammation, Atherosclerotic Burden and Cardiovascular Prognosis. **Atherosclerosis** 2007; 195: 126 134.
4. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate With Risk Factors for Coronary Artery Disease. **Circ Res** 2001; 89: 1-7.
5. Stegmann TJ, Hoppert T, Schneider A, Gemeinhardt S, Köcher M, Ibing R, Strupp G. Induction of Myocardial Neoangiogenesis by Human Growth Factors. A New Therapeutic approach in Coronary Heart Disease. **Herz** 2000; 25: 589-99.
6. Kapoor M, Nomiya T, Bruemmer D, Kojima F, Crofford LJ. Growth factors and cytokines: Emphasis on Their Role in Wound Healing and Atherosclerosis. **Curr Anaesth & Critic Care** 2006 17: 13-20.

7. Marín-García J, Goldenthal MJ, Moe GW. Post-genomic Cardiology. **A P** 2007; 11: 317.
8. Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS. Ephrin-B2 Controls VEGF-induced Angiogenesis and Lymphangiogenesis. **Nature** 2010; 465: 483-486.
9. Qi H, Wang P, Liu C, Li M, Wang S, Huang Y, Wang F. Involvement of HIF-1 α in MLCK-dependent Endothelial Barrier Dysfunction in Hypoxia. **Cell Physiol Biochem** 2011; 27: 251-262.
10. Okada K, Osaki M, Araki K, Ishiguro K, Ito H and Ohgi S. Expression of Hypoxia-inducible Factor (HIF-1), VEGF-C and VEGF-D in Non-invasive and Invasive Breast Ductal Carcinomas **Anticancer Res** 2005; 25: 3003-3010.
11. Howell WM, Ali S, Rose-Zerilli MJ, Ye S. VEGF Polymorphisms and Severity of Atherosclerosis. **J Med Genet** 2005; 42: 485-90.
12. Guerzoni A.R, Biselli PM, Godoy MF, Souza DRS, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM. Homocysteine and *MTHFR* and *VEGF* Gene Polymorphisms: Impact on Coronary Artery Disease **Arq Bras Cardiol** 2009; 92: 249-254.
13. Lin TH, Wang CL, Su HM, Hsu P, Juo SH, Voon WC, Shin SJ, Lai WT, Sheu SH. Functional Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms and Diabetes: Effect on Coronary Collaterals in Patients with Significant Coronary Artery Disease **Clin Chim Acta** 2010; 411: 1688-1693.

14. Holvoet P, Collen D. Oxidation of Low Density Lipoproteins in The Pathogenesis of Atherosclerosis **Atherosclerosis** 1998; 137: 33-38.
15. Madan M, Bishayi B, Hoge M, Amar S. Atheroprotective Role of Interleukin-6 in Diet and/or Pathogen-Associated Atherosclerosis Using an ApoE Heterozygote Murine Model **Atherosclerosis** 2008; 197: 504-514.
16. Tan YY, Gast G-CM, Schouw YTV. Gender Differences in Risk Factors for Coronary Heart Disease **Maturitas** 2010; 65: 149-160.
17. Ludvig J, Miner B, Eisenberg MJ. Smoking Cessation in Patients with Coronary Artery Disease **Am Heart J** 2005;149:565-572.
18. McMahan CA, Gidding SS, McGill HC. Coronary Heart Disease Risk Factors and Atherosclerosis In Young People **J Clin Lipidol** 2008; 2: 118-126.
19. Campbell SC, Moffatt RJ, Stamford BA. Smoking and Smoking Cessation-The Relationship Between Cardiovascular Disease and Lipoprotein Metabolism **Atherosclerosis** 2008; 201: 225–235.
20. Carnethon MR, Biggs ML, Barzilay J, Kuller LH, Mozaffarian D, Mukamal K, Smith NL, Siscovick D. Diabetes and Coronary Heart Disease as Risk Factors for Mortality in Older Adults **Am J Med** 2010; 123: 556-565.
21. Chantemele EJB, Step DW. Influence of Obesity and Metabolic Dysfunction on the Endothelial Control in the Coronary Circ. **J Mol Cel Cardiol** 2011; 52: 840–847.

- 22.Amirkhizi F, Siassi F, Djalali M, Foroushanic AR. Evaluation of Oxidative Stress and Totalantioxidant Capacity in Women with General and Abdominal Adiposity **Obes Res & Clin Pract** 2010; 4: 209-216.

- 23.Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative Stress, DNA Methylation and Carcinogenesis **Cancer Lett** 2008; 266: 6–11.

- 24.Pfeiffer JM, Askew EW, Roberts DE, Woods SM, Benson JE, Johnson SC, Freedman MS. Effect of Antioxidant Supplementation on Urine and Blood Markers of Oxidative Stress During Extended Moderate-altitude Training **Wild Environ Med** 1990; 10: 66-74.

- 25.Cortes DF, Sha W, Hower V, Blekherman, G Laubenbacher, R Akman S, Torti SV, Shulaev V. Differential Gene Expression in Normal and Transformed Human Mammary Epithelial Cells in Response to Oxidative Stress **Free Rad Bio Med** 2011; 50: 1565–1574.

- 26.Poljsak B, Milisav I, Lampe T, and Ostan I. Reproductive Benefit of Oxidative Damage: An Oxidative Stress **Oxid Med Cell Longev** 2011; 2011: 1–9.

- 27.Förstermann U. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxid Syntase In Cardiovascular Disease and Its Pharmacological Reversal Nitric Oxid **Circ** 2006; 113: 1708-1714.

- 28.Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: How Are They Linked? **Free Radic Bio Med** 2010; 49: 1603–1616.

29. Demosthenous M, Antoniades C, Tousoulis D, Margaritis M, Marinou K, Stefanadis C. Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Vascular Wall: Mechanisms Regulating its Expression Andenzymatic Function **Artery Res** 2011; 5: 37-49.
30. Schmidtko A, Gao W, König P, Heine S, Motterlini R, Ruth P. cGMP Produced by NO-Sensitive Guanylyl Cyclase Essentially Contributes to Inflammatory and Neuropathic Pain by Using Targets Different from cGMP-Dependent Protein Kinase I. **J Neurosci** 2008; 28: 8568–8576.
31. Osto E, Cosentino F. The Rol Of Oxidative Stress in Endothelial Disfunction and Vascular Inflammation Nitric Oxid: Biology and Pathobiology **Italy AP** 2010; 705: 50.
32. Tandoğan B, Ulusu NN. Tioredoksin Redüktaz **J Biol & Chem** 2011; 39: 87-92.
33. Kietzmann T, Görlach A. Raective Oxygen Species in the Control of HIF Mediated Gene Expression **Semin Cell Dev Biol** 2005; 16: 474-486.
34. Berg M, Stehouwer CDA, Bierdrager E, Rauwerda JA. Plasma Homocysteine and Severity of Atherosclerosis in Young Patients with Lower-Limb Atherosclerotic Disease **Arterioscl Thromb Vasc Biol** 1996; 16: 165-171.
35. Woo KS, Chook P, Lolin YI. Hyperhomocystinemia is A Risk Factor for Endothelial Dysfunctionin Humans. **Circ** 1997; 96: 2542.

- 36.DL Sparks DL, Chatterjee C, Young E, Renwick J, Pandey NR. Lipoprotein Charge and Vascular Lipid Metabolism. **Chem Phys Lipids** 2008; 154: 1–6.
- 37.Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Stanhope KL, Havel PJ, Okazaki M, Ai M, Tanaka A. Postprandial Lipoprotein Metabolism: VLDL vs Chylomicrons **Clin Chim Acta** 2011; 412: 1306–1318.
- 38.Yıldırım kaya M. Özet Biyokimya 1 Ankara: MN Medikal&Nobel; 2003.
- 39.Özkan Y, Koca S. S, Gürsu F, Sonkaya E, Poyrazoğlu OK, Dönder E. Hiperlipemik Hastalarda Atorvastatin Tedavisinin Serum Paraksonaz-1 Düzeyine Etkisi **Fırat Tıp Dergisi** 2004; 9: 123-126.
- 40.Barter PJ, Rye KA. High Density Lipoproteins and Coronary Heart Disease **Atherosclerosis** 1996; 121: 1 -12.
- 41.Miller GJ. Lipoproteins and the Haemostatic System in Atherothrombotic Disorders **Baillie Áre's Clin Haematology** 1999; 12: 555-575.
- 42.Eid HMA, Lyberg T, Arnesen H, Seljeflot I. Insulin and Adiponectin Inhibit the TNF-induced ADMA Accumulation in Human Endothelial cells the Role of DDAH **Atherosclerosis** 2007; 194: 1–8.
- 43.Thum T, Tsikas D, Stein S. Suppression of Endothelial Progenitor Cells in Human Coronary Artery Disease by the Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor Asymmetric Dimethylarginine. **J Am Coll Cardiol** 2005; 46: 1693.

44. Maas R, Quitzau K, Schwedhelma E, Spieker L, Rafflenbeul W, Steenpaß A, Luscher TF, Boger RH. Asymmetrical Dimethylarginine (ADMA) and Coronary Endothelial Function in Patients with Coronary Artery Disease and Mild Hypercholesterolemia **Atherosclerosis** 2007; 191: 211–219.
45. Pia R. Kamstrup Lipoprotein (a) and Ischemic Heart Disease-A Causal Association? A Review. **Atherosclerosis** 2010; 211: 15–23.
46. Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC. Activation of Transforming Growth Factor- β is Inhibited in Transgenic Apolipoprotein (a) Mice. **Nature** 1994; 370: 460.
47. Sümbül Z. Koroner Arter Hastalığında CD34, VEGF, Homosistein, Lipoprotein a Düzeylerinin Koroner Kollateral Gelişimi Üzerine Etkileri; Kardiyoloji ABD; Uzmanlık Tezi, Adana, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2010.
48. Wartiovaara U. A Peripheral Blood Platelets Express VEGF-C and VEGF Which are Released During Activation. **Thromb Haemost** 1998; 80: 171-175.
49. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med** 2003; 9: 669-76.
50. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma Growth Inhibited in Vivo by a Dominant-negative Flk-1 Mutant. **Nature** 1994; 367: 576-9.
51. Horta BA, Sodero AC, de Alencastro RB. Investigating the Differential Activation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors **J Mol Graph Model** 2009; 28: 287-96.

52. Wang Y, Zheng Y, Zhang W, Yu H, Lou K, Zhang Y, Qin Q, Zhao B, Yang Y, Hui R. Polymorphisms of KDR Gene are Associated with Coronary Heart Disease 2007 **J Pone**; 50: 760-767.
53. Paul R Colville-Nash and Derek A. Willoughby Growth Factors in Angiogenesis: Current Interest and Therapeutic Potential **Trends Mol Med** 1997; 3: 14-23.
54. Baek JH, Jang JE, Kang CM, Chung HY, Kim ND, Kim KW. Hypoxia-induced VEGF Enhances Tumor Survivability via Suppression of Serum Deprivation-induced Apoptosis. **Oncogene** 2000; 19: 4621-4631.
55. Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, Kholova I, Kauppinen RA, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K, Hertalla YS. VEGF-D Is the Strongest Angiogenic and Lymphangiogenic Effector Among VEGFs Delivered Into Skeletal Muscle via Adenoviruses **Circ Res** 2003; 92: 1098-1106.
56. Nash AD, Baca M, Wright C, Scotney PD. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor-B (VEGF-B) **Pulm Pharmacol Ther** 2006; 19: 61-69.
57. Rogers MS, D'Amato RJ. The Effect of Genetic Diversity on Angiogenesis **Exp Cell Res** 2006; 312: 561-574.
58. Puranik R, Celermajer DS. Smoking and Endothelial Dysfunction **Prog Cardiovasc Dis** 2003; 45: 443-458.
59. Seiler C. The Human Coronary Collateral Circ. **Heart** 2003; 89: 1352-7.

60. Alidoosti M, Ghaedi M, Soleimani A, Bakhtiyari S, Rezvanfard M, Golkhu S, Mohammadtaghvaei N. Study on the Role of Environmental Parameters and HIF-1A Gene Polymorphism in Coronary Collateral Formation Among Patients with Ischemic Heart Disease ***Clin Biochem*** 2011; 44: 1421-1424.
61. Maharaj AS, D'Amore PA. Roles for VEGF in the Adult. ***Microvasc Res*** 2007; 74: 100-113.
62. Çelik T, Çelik M, İyisoy A. Koroner Kolateral Dolaşım ***Arch Turk Sos Cardiol*** 2010; 38: 505-514.
63. Chilian WM, Penn MS, Pung YF, Dong F, Mayorga M, Ohanian V, Logan S, Yin L. Coronary Collateral Growth-Back to the Future ***J Moll Cell Cardiol*** 2012; 52: 905-911.
64. Regieli JJ, Nathoe HM. Koerselman J, Graaf Y, Grobbee DE, Doevendans PA. Coronary Collaterals-insights in Molecular Determinants and Prognostic Relevance ***Int J Cardiol*** 2007; 116: 139–143.
65. Nicolau, JC, Pinto, MA, Nogueira, PR et al. The role of Antegrade and Collateral Flow in Relation to Left Ventricular Function Post-thrombolysis. ***Int J Cardiol*** 1997; 61: 47.
66. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single Intraarterial Bolus of Vascular Endothelial Growth Factor Augments Revascularization in a Rabbit Ischemic Hind Limb Model. ***J Clin Invest*** 1994; 93: 662–670.

- 67.Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık **Marmara Med J** 2008; 21: 282-295.
- 68.Falk E, Shah PK, De Feyter PJ. Burden Ischemic Heart Disease.15. **Manson Publishing Ltd** 15. GBR; 2010.
- 69.Yasue H, Nakagawa H, Itoh T, Harada E, Mizuno Y. Coronary Artery Spasm-clinical Features, Diagnosis, Pathogenesis, and Treatment. **J Cardiol** 2008; 51: 2-17.
- 70.Benarroch EE. Nitric Oxide: A Pleiotropic Signal in the Nervous System **Neurology** 2011; 77: 1568-1576.
- 71.Nausch LWM, Ledoux J, Bonev AD, Nelson MT and Dostmann WR. Differential Patterning of cGMP in Vascular Smooth Muscle Cells Revealed by Single GFP-linked Biosensors. **Proc Natl Acad Sci** 2008; 105: 365-70.
- 72.Ağaçhan B, Yılmaz H, Öztürk O, Ergen HA, İşbir SC. Aterosklerozda Apo. E, Okside-LDL ve Lipid Profili İlişkisinin Araştırılması. **Sağlık Bil Dergisi** 2005; 19: 193-197.
- 73.Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD. Identification of Heregulin, a Specific Activator of erbB. **Sci** 1992; 5060: 1205–1210.
- 74.Negro A, Bhawanjit KB, Kuo-Fen L. Essential Roles of Her2/erbB2 in Cardiac Development and Function *Recent Progress in Hormone. Res* 2004; 59: 1-12.

75. Zhou BP, Hu MCT, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY, Hung MC. *HER-2/neu* Blocks Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis via the Akt/NF- κ B Pathway **J Biol Chem** 2000; 275: 8027-8031.
76. Geisberg CA, Wange G, Safaa RN, Smitha HM, Andersona B, Penga X, Veerkampa B, Zhaoa D, Blakemoreb D, Yub C and Sawyera DB. Circulating Neuregulin-1b Levels Vary According to the Angiographic Severity of Coronary Artery Disease and Ischemia. **Coron Artery Dis** 2011; 22: 8.
77. Nethery DE, Ghosh S, Erzurum SC, Kern JA. Inactivation of Neuregulin-1 by Nitration **Lung Physiol** 2006; 1:292.
78. Tokgözoğlu L, Özer N. Ateroskleroz patogenezi. Özcan N. Koroner Kalp Hastalıkları. 1997 1. Baskı. Ankara. 129-163.
79. Binbaş F, Uzunçan N, Aslanca D, Belten E, Kara B. Hemodializ Hastalarında Serum Paraoksonaz Aktivitelerinin Değerlendirilmesi **Türk Klinik Biyokimya Derg** 2005; 3: 15-21.
80. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F and Pometta D. Identification of a Distinct Human High-density Lipoprotein Subspecies Defined by a Lipoprotein-associated Protein, K-45. Identity of K-45 with Paraoxonase. **Eur J Biochem** 1993; 211: 871-9.
81. Troughton JA, Woodside JV, Yarnell JW. G, Arveiler D, Amouyel P, Ferrière J, Ducimetière P, Patterson CC, Lucif G. Paraoxonase Activity and Coronary Heart Disease Risk in Healthy Middle-aged Males: The PRIME Study, **Atherosclerosis** 2008; 197: 556–563.

82. Rael LT, Bar-Or R, Auman RM, Slone DS, Mains CW, Bar-Or D. Oxidation–Reduction Potential and Paraoxonase–Arylesterase Activity in Trauma Patients **Biochem and Biophysical Res Com** 2007; 361: 561-565.
83. Hulthe J. Antibodies to oxidized LDL in Atherosclerosis Development-clinical and Animal Studies. **Clin Chim Acta** 2004; 348: 1-8.
84. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular Endothelial Growth Factor Enhances Atherosclerotic Plaque Progression. **Nature Med** 2001; 7: 425–429.
85. Morales-Villegas EC, Di Sciascio G, and Briguori C. Statins: Cardiovascular Risk Reduction in Percutaneous Coronary Intervention - Basic and Clinical Evidence of Hyperacute Use of Statins **Int J Hypertens** 2011; 90: 42-47.
86. Hopps E, Noto D, Caimi G, Averna MRA. Novel Component of the Metabolic Syndrome: The Oxidative Stress **Nutr Metab Cardiovasc Dis** 2010; 20: 72-77.
87. Milei J, Forcada P, Fraga CG, Grana DR, Iannelli G, Chiariello M, Tritto I, Ambrosio G. Relationship Between Oxidative Stress, Lipid Peroxidation, and Ultrastructural Damage in Patients with Coronary Artery Disease Undergoing Cardioplegic Arrest/reperfusion **Cardiovasc Res** 2007; 73: 710–719.
88. Bansilal NA, Naeema A, Taher SK, Shahjahan S. Antioxidant Status in Coronary Heart Disease Patients with type 2 Diabetes Mellitus. **J Ayub Med Coll Abbottabad** 2007; 19: 4.

- 89.Knekt P, Ritz J, Pereira MA, O'Reilly EJ, Augustsson K, Fraser GE, Goldbourt U, Heitmann BL, Hallmans G, Liu S, Pietinen P, Spiegelman D, Stevens J, Virtamo J, WillettWC, Rimm EB. Antioxidant Vitamins and Coronary Heart Disease Risk: A Pooled Analysis of 9 Cohorts **Am J Clin Nutr** 2004; 80: 1508-1520.
- 90.Liu ML, James RW, Ylitalo K, Taskinen MR. Associations Between HDL Oxidation and Paraoxonase-1 and Paraoxonase-1 Gene Polymorphisms in Families Affected by Familial Combined Hyperlipidemia. **Nutr Metab Cardiovasc Dis** 2004; 14: 81-87.
- 91.Wang Y, Zheng Y, Zhang W, Yu H, Lou K, Zhang Y, Qin Q, Zhao B, Yang Y, Hui R. Polymorphism of KDR Gene are Associated With Coronary Heart Disease **J Am Coll Cardiol** 2007; 50: 760-7.
- 92.Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Evans CR. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radic Biol Med** 1999; 26: 1231.
93. Pathol AJ. Angiogenesis in Human Coronary Atherosclerotic Plaques **Am J Pathol** 1994; 145: 883-94.
- 94.Luo Z, Fujio Y, Kureishi Y, Rudic RD, Daumerie G, Fulton D, Sessa WC and Walsh K. **J Clin Invest** 2000; 106: 493-499.
- 95.Shiojima I and Walsh K. **Circ Res** 2002; 90: 1243-1250.
- 96.Konopka A, Janas J, Piotrowski W, Stepinska J. Concentration of Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Acute Coronary Syndrome **Cytokine** 2013; 61: 664–669.

97. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress **N Endocr Rev** 2004; 25: 581-611.
98. Cohen M, Rentrop KP. Limitation of Myocardial Ischemia by Collateral Circ. During Sudden Controlled Coronary Artery Occlusion in Human Subjects: Aprospective Study. **Circ** 1986; 74: 469-76.
99. Waldecker B, Waas W, Haberbosch W, Voss R, Wiecha J, Tillmanns H. Prevalence and Significance of Coronary Collateral Circ. in Patients With Acute Myocardial Infarct. **Z Kardiol** 2002; 91: 243–8.
100. Kimura K, Hashiguchi T, Deguchi T, Horinouchi S, Uto T, Oku H, Setoyamac S, Maruyama I, Osame M, Arimura K. Serum VEGF as a Prognostic Factor of Atherosclerosis **Atherosclerosis** 2007; 194: 182–188.
101. Szeto CC, Chow KM, Poon P, Szeto CY, Wong TY, Li PK. Genetic Polymorphism of VEGF: Impact on Longitudinal Change of Peritoneal Transport and Survival of Peritoneal Dialysis Patients. **Kidney Int** 2004; 65: 1947–55.
102. Meer PVD, Boer RAD, White HL, Steege GVD, Hall AS, Voors AA, Veldhuisen DJV. The VEGF 405 CC Promoter Polymorphism is Associated With an Impaired Prognosis in Patients With Chronic HeartFailure: A MERIT-HF Substudy **J Card Fail** 2005; 11: 4.
103. Posch MG, Panek A, Kersten A, Ghadge SK, Geier C, Richter S, Perrot A, Gailani M, Dietz R, Lüftner D, Özcelik C. Plasma HER2 Levels are not Associated with Cardiac Function or Hypertrophy in Control Subjects and Heart Failure Patients **J Ijcard** 2009; 5: 56.

104. Falls DL. Neuregulins: Functions, Forms, and Signaling Strategies. **Exp Cell Res** 2003; 284: 14-30.
105. Sawyer DB, Caggiano A. Neuregulin-1 β for the Treatment of Systolic Heart Failure **J Mol Cell Cardiol** 2011; 51: 501–505.
106. Fuller SJ, Sivarajah K, Sugden PH. ErbB Receptors, Their Ligands, and the Consequences of Their Activation and Inhibition in the Myocardium. **J Mol Cell Cardiol** 2008; 44: 831–854.
107. Ozcelik C, Erdmann B, Pilz B et al. Conditional Mutation of the ErbB2 (HER2) Receptor in Cardiomyocytes Leads to Dilated Cardiomyopathy. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99: 8880–5.
108. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial Adhesion Molecules. **Blood** 1994; 84: 2 068–2101.
109. Zhang WZ, Venardos K, Finch S, Kaye DM. Detrimental Effect of Oxidized LDL on Endothelial Arginine Metabolism and Transportation **Int J Biochem Cell Biol** 2008; 40: 920–928.
110. Uedaa M, Eharab S, Kobayashib Y, Narukoc T, Shiraia N, Haia E, Ikuraa Y, Ohsawaa M, Beckerd AE. Plaque Instability in Human Coronary Atherosclerotic Lesions: Roles of Oxidized LDL and Neutrophils **Int Congr Series** 2004; 1262: 75–78.
111. Bing H, Wang J, Zhang C, and Caia H. Positive Correlation Between in Vivo Oxidized LDL and LDL Immune Complexes H. **Clin Biochem** 2004; 37: 72– 75.

112. Yasue H, Nakagawa H, Itoh T, Harada E, Mizuno Y. Coronary Artery Spasm Clinical Features, Diagnosis, Pathogenesis, and Treatment. **J Cardiol** 2008; 51: 2-17.
113. Hutchinson PJA, Palmer RMJ, Moncada S. Comparative Pharmacology of EDRF and Nitric Oxide on Vascular Strips. **Eur J Pharmacol** 1987; 141: 445–51.
114. Hotta Y, Otsuka-Murakami H, Fujita M, Nakagawa J, Yajima M, Liu W, Ishikawa N, Kawai N, Masumizu T, Kohno M. Protective Role of Nitric Oxide Synthase Against Ischemia–reperfusion Injury in Guinea Pig Myocardial Mitochondria, **Eur J Pharmacol** 1999; 380: 37–48.
115. Tousoulis D, Tentolouris C, Crake T, Toutouzas P, Davies GJ. Basal and Flow-mediated Nitric Oxide Production by Atheromatous Coronary Arteries. **J Am Coll Cardiol** 1997; 29: 1256–62.
116. Shen W, Lundborg M, Wang J et al. Role of EDRF in the Regulation of Regional Blood Flow and Vascular Resistance at Rest and During Exercise Inconscious Dogs **J Appl Physiol** 1994; 77: 165–72.
117. Node AK, Kitakaze M, Sato H, Koretsune Y, Karita M, Kosaka H, Hori M. Increased Release of Nitric Oxide in Ischemic Hearts After Exercise in Patients With Effort **Jacc** 1998; 32: 63–8.
118. Förstermann U, Mügge A, Alheid U, Haverich A and Frölich Selective Attenuation of Endothelium-mediated Vasodilation in Atherosclerotic Human Coronary Arteries **J C Circ Res** 1988; 62: 185-190.

119. Turban S, Fuentes F, Ferlic L et al. A Prospective Study of Paraoxonase Gene Q/R192 Polymorphism and Severity, Progression and Regression of Coronary Atherosclerosis, Plasma Lipid Levels, Clinical Events and Response to Fluvastatin **Atherosclerosis** 2001; 154: 633-640.
120. Gupta N, Binu KBK, Singh S, Maturu NV, Sharma YP, Bhansali A, Gillgren KD. Low Serum PON1 Activity: An Independent Risk Factor for Coronary Artery Disease in North–West Indian Type 2 Diabetics **J Pone** 2012; 498: 13–19.
121. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo Parmo SL et al. Paraoxonase Inhibits High-density Lipoprotein Oxidation and Preserves its Functions. **J Clin Invest** 1998; 101: 1581–1590.
122. Elnoamany FM, Dawood AA, Azmy RM, Elnajjar MM. Paraoxonase 1 Gene (Gln192-Arg) Polymorphism and the Risk of Coronary Artery Disease in Type 2 Diabetes Mellitus. **World J Cardiovasc Dis** 2012; 2: 29-37.
123. Selek S, Alp R, Alp Sİ, Taşkın A. Relationship Between PON1 Phenotype and Headache Duration in Migraine Patients. **Turk J Med Sci** 2011; 41: 77-184.
124. Azarsız E, Kayıkçioğlu M, Payzin S ve Sözmen EY. PON1 Activities and Oxidative Markers of LDL in Patients with Angiographically Proven Coronary Artery Disease **Int J Cardiol** 2003; 91: 43-51.
125. Yildiz A, Gura M, Yilmaz R, Demirbag R, Polat M, Selek S, Celik H, Erel O. Association of Paraoxonase Activity and Coronary Blood Flow **Atherosclerosis** 2008; 197: 257–263.

126. Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Stefanovic A, Vujovic A, Memon L, Kalimanovska-Ostric D. PON1 Status is Influenced by Oxidative Stress and Inflammation in Coronary Heart Disease Patients ***Clin Biochem*** 2008; 41: 1067–1073.

127. Hatem E, Berthouaud V, Dardalhon M, Lagniel G Baudouin-Cornu P, Huang M, Labarre J, Chédin S. Glutathione is Essential to Preserve Nuclear Function and Cell Survival Under Oxidative Stress ***Free Radic Biol Med*** 2014; 67: 103–114.

128. Negi R, Pande D, Karki K, Kumar A, Khanna RS, Khanna HD. Association of Oxidative DNA Damage, Protein Oxidation and Antioxidant Function with Oxidative Stress Induced Cellular Injury in Pre-eclamptic/eclamptic Mothers During Fetal Circ ***Chem Biol Interact*** 2014; 208: 77–83.

129. Rashid K, Sinha K, Sil PC. An Update on Oxidative Stress-mediated Organ Pathophysiology ***Food Chem Toxicol*** 2013; 62: 584–600.

130. Rahsepar AA, Pourghadamyari H, Moohebaty M, Mohammad S, Parizadeh R, Tavallaie S, Paydar R, Dehghani H.F.M, Fazlinezhad A, Amini M, Khorashadizadeh F, Ghayour-Mobarhan M, Ferns GA. Prooxidant–anti-oxidant Balance is not Associated with Extent of Coronary Artery Disease ***Clin Biochem*** 2011; 44: 1304–1308.

131. Serum Oxidizability, Total Antioxidant Status and Albumin Serum Levels in Patients with Aneurysmal or Arterial Occlusive Disease Delimaris I, Georgopoulos S, Kroupis C, Zachari A, Liberi M, Bastounis E, Dionyssiou-Asteriou A. ***Clin Biochem*** 2008; 41: 706–711.

132. Demirbag R, Yilmaz, Kocyigit A. Relationship Between DNA Damage, Total Antioxidant Capacity and Coronary Artery Disease ***Mutat Res*** 2005; 570: 197-203.

10. EKLER

10.1. Etik Kurul İzni



GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
TELEFON	0312 202 69 58
FAKS	0312 202 46 73
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Koroner arter hastalığı olgularında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gen polimorfizmlerinin incelenmesi		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Meral TORUN		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐	
		DIĞER ☐	(Doktora Tezi) ☐	
	İLAC DIŐI ARAŞTIRMA	☒	☐ İLAC DIŐI GİRİŐİMSSEL ☒ İLAC DIŐI GİRİŐİMSSEL OLMAYAN Polimorfizm çalışmaları	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğeri ☐
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğeri ☐
DEĞERLENDİRİLEN DIĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	SİGORTA	☐		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 312	Toplantı tarihi: 12.10.2011
	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Prof.Dr.Meral Torun'un sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, Doktora Tezi olan Polimorfizm klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve "bütçesi dışında" uygun olduğuna G.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliğı Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP) kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliğı direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğuna dair kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
	ETİK KURUL BAŞKANI ÜNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU					
Ünvani/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

Doç Dr Arzu BAKIRTAŞ BAŞKAN YRD.	Çocuk Sağ ve Hast Çocuk Allerji	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	SS
Prof Dr Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.Ü.T.F Fizyoloji A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	g
Prof Dr Fusun BOZKIRLI ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.Ü.T.F Anest. ve Rea. A.D	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof Dr Emin TURKOZ ÜYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.Ü.D.F Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	SS
Prof Dr Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya	G.Ü.E.F. (Ecz. Mes. Bil.) Farmasötik Kimya A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	SS
Prof Dr Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F Halk Sağlığı A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	SS
Prof Dr Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	SS
Prof Dr Öznur L. BOYUNAGA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F Radyoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	SS
Prof Dr Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları Erişkin Nefroloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	SS
Prof Dr Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof Dr Metin YILMAZ ÜYE	Kulak-Burun-Boğaz Hast.	Kulak-Burun-Boğaz Hast. A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	SS
Doç Dr Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp Tarihi A.D	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç Dr Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	SS
Huk. Müş. Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	SS
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Temsilci	Sivil Temsilci	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı

- * :Araştırma ile İlişki
- ** :Toplantıda Bulunma

10.2. Teşekkür

Çalışmamda anlayış, destek ve ilgilerinden dolayı danışmanım Sayın Hocam Prof.Dr. MERAL TORUN'a ve Sayın Hocam Prof.Dr. BOLKAN ŞİMŞEK'e, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Hocam, canım ablam Prof.Dr. AYMELEK GÖNENÇ'e, örneklerin bulunması ve toplanmasındaki yardımlarından dolayı Sayın Doç.Dr. TAYFUN AYBEK'e ve Doç.Dr. ABBAS TANER'e, Sayın Hocam Doç.Dr. CEMAL ATAĞAN'a, Sayın OKAN ÖZBAYRAK'a, çalışmamda yardım ve desteklerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nden Sayın Hocam Prof.Dr. ALİ ERGÜL'e ve Sayın CANAN YÜKSEL'e, tüm gönül dostu sevgili arkadaşlarıma ve zor zamanlarımda bana moral ve yaşam kaynağı olan sevgili tatlı kızlarım CEYDA ve ELVAN'a teşekkür ederim.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Aylin

Soyadı: SOYAĞIR

Doğum Yeri ve Tarihi: Ordu, 27.07.1972

Eğitimi:

2011: Çalışma Bakanlığı İş Yeri Hekimliği Eğitimi

2009: Sağlık Bakanlığı Aile Hekimliği Eğitimi

2006: TTB İş Yeri Hekimliği Eğitimi

1989: Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi

1987: Ankara Kurtuluş Lisesi

1984: Atatürk Ortaokulu

1979: Tınaz İlkokulu

İş Deneyimi:

2012: Ankara Üniversitesi Aile Hekimliği A.B.D. Tandoğan Polikliniği'nde Aile Hekimliği

2007: Ankara Üniversitesi Aile Hekimliği A.B.D. Tandoğan Polikliniği'nde Kurum Hekimliği

2006-2007: Özel Tıbbi Onkoloji Polikliniği'nde Hekimlik

1998-2006: Ankara Güven Hastanesi K.V.C'de Yoğun Bakım ve Servis Hekimliği

1996-1998: Özel Doğuş Tıp Merkezi'nde Sorumlu Hekimlik

Yabancı Dili: İngilizce