

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KORONER ARTER HASTALARINDA MDR-1 GEN
POLİMORFİZMİ VE TROMBOSİT AKTİVE EDİCİ
FAKTÖR (PAF) DÜZEYLERİNİN HASTALIKLA OLAN
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

GÜLSEL AYAZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. TURGUT ULUTİN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

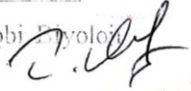
İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Gülsel AYAZ tarafından hazırlanan Koroner Arter Hastalarında MDR-1 Gen Polimorfizmi ve Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF) Düzeylerinin Hastalıkla Olan İlişkisinin Araştırılması başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

13 / 12 / 2011

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Turgut ULUTİN (Tez Danışmanı) İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. Gönül KANIGÜR İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Mehmet GÜVEN İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
4.Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
5.Prof. Dr. Barış İLERİGELEN İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gülşel AYAZ



İTHAF

Sevgili eşim, biricik kızım ve canım oğluma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca verdiği desteğin yanısıra bilgi birikimi ve tecrübelerinden daima yararlandığım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanımız aynı zamanda danışman hocam sayın Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e;

Tezimin planlanma ve yürütülme aşamalarında göstermiş olduğu özverili ilgi ve katkılarından dolayı değerli hocam sayın Prof. Dr. Gönül KANIGÜR'e,

Tezimin laboratuvar aşamasının en kritik noktalarında derin bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sayın Prof. Dr. Mehmet GÜVEN ve asistanı doktora öğrencisi Bahadır BATAR'a,

Tez çalışmamın başından sonuna kadar bilgileriyle ilgi ve desteğini sürekli yanımda hissettiğim sayın hocam Prof. Dr. İlhan ONARAN ve sayın Dr. Çiğdem Bayram GÜREL'e

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca yetişmemde emeği olan İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalımızın tüm saygıdeğer öğretim üyelerine ve kıdemlilerime,

Çalışmamıza engin bilgi ve deneyimleriyle klinik destek sağlayan İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Barış İLERİGELEN ve sayın Doç. Dr. Bilgehan KARADAĞ'a,

Çalışmamızın verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde büyük katkılarından dolayı İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Ahmet DİRİCAN'a

Tez çalışmam boyunca sınırsız desteğiyle her an yanımda olan sevgili eşim Yalçın AYAZ'a, varlıklarıyla bana sonsuz mutluluk ve enerji veren kızım Ece ile oğlum Enes'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-7883/05072010

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ATP-Bağlayıcı Kaset Taşıyıcıları	3
2.1.1. ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcıları ve Genel Özellikleri	3
2.1.2. ABCB1 (MDR-1) Geni	8
2.1.3. ABCB1 (MDR-1) gen ürünü;P-glikoprotein	9
2.1.4. ABCB1 (MDR-1) Gen Polimorfizimleri	10
2.2. Koroner Arter Hastalığı	13
2.2.1. Tarihçe	13
2.2.2. Aterosklerozun İnsidansı ve Prevalansı	13
2.2.3. Türkiye’de Ateroskleroza Bağlı Olayların İnsidans ve Prevalansı	14
2.3. Tanımlar	14
2.3.1. Normal Arter Duvarı	14
2.3.2. Ateroskleroz	15
2.4. Aterogeneizde Rol Oynayan Hücreler	17
2.4.1. Endotel Hücresi.....	17
2.4.2. Trombositler.....	19
2.4.2.1. Hemostaz, Aterogeneiz ve Tromboz Oluşumu	23
2.5. Trombosit Aktive Edici Faktör	32

2.5.1. Trombosit Aktive Edici Faktör'ün Moleküler Heterojenitesi ve Fonksiyonel Sonuçları	34
2.5.2. Trombosit Aktive Edici Faktörün Metabolizması	35
2.5.2.1. PAF'ın Biyosentetik Yolları	35
2.5.2.2. PAF Katabolizması	37
2.5.2.3. Trombosit Aktive Edici Faktör Reseptörleri ve Sinyal Transdüksiyonu	37
2.5.3. Trombosit Aktive Edici Faktöre Karşı Kardiyovasküler Yanıtlar	41
2.5.3.1. PAF'ın Hemodinamik Etkisi	41
2.5.3.2. PAF'ın Endotelyal Hücre Üzerine Etkisi.....	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1. Gereçler.....	45
3.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu	45
3.1.2. Kimyasal Maddeler	46
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Tamponlar ve Jel Sistemleri.....	47
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	49
3.2. Yöntemler	50
3.2.1. Elisa Yöntemi.....	50
3.2.2. Trombosit Agregasyon Yöntemi.....	51
3.2.3. DNA İzolasyonu	52
3.2.4. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	53
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	55
3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP).....	56
3.2.7. RFLP Analiz Sonuçları	58
3.3. İstatistiksel Analizler	61
4. BULGULAR.....	63
5. TARTIŞMA	85
KAYNAKLAR	95
FORMLAR	120
ETİK KURUL KARARI	122
TEZ BAŞLIK DEĞİŞİMİ.....	123
ÖZGEÇMİŞ	124

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. ABC Taşıyıcılarının Alt Gruplarının sınıflandırılması.....	5
Tablo 2.2. ABC Taşıyıcılarının Özellikleri ve Taşıdıkları Substratlar	6
Tablo 2.3. MDR-1'in en sık görülen ekzonik polimorfizmleri.....	12
Tablo 2.4. Trombosit alfa Granül Proteinleri	21
Tablo 2.5. Trombosit Reseptör ve Ligandları.....	31
Tablo 3.1. Kullanılan Primer Dizileri	54
Tablo 3. 2. MDRI (C3435T ve G2677T/A) polimorfizmi için PZR koşulları.....	54
Tablo 3. 3. MDRI (C3435T ve G2677T/A) polimorfizmi için PZR programları.....	55
Tablo 4. 1. KAH - Kontrol Grupları Genel Bilgileri	63
Tablo 4.1. a.Asetilsalisilik Asit (ASA) kullanmayan KAH - Kontrol Gruplarının Genel Bilgileri	63
Tablo 4. 2. KAH ve Kontrol Gruplarının Kan Parametre Değerlerine Göre Karşılaştırılması	64
Tablo 4.2. a. ASA kullanmayan KAH-Kontrol gruplarında tüm kan parametrelerinin karşılaştırılması.....	65
Tablo 4. 3. KAH ve Kontrol gruplarında PAF (pg/mL), Trombosit agregasyon Eğim (Ω) ve Trombosit agregasyon %Amplitüd değerlerinin karşılaştırılması	66
Tablo 4.3. a. ASA kullanmayan KAH-Kontrol gruplarında PAF(pg/ml), Trombosit agregasyon EĞİM(Ω) ve Trombosit agregasyon %AMPLİTÜD değerlerinin karşılaştırılması.....	67
Tablo 4. 4. KAH ve Kontrol gruplarında hastalık şiddetine göre PAF (pg/mL), Trombosit agregasyon EĞİM(Ω), Trombosit agregasyon % AMPLİTÜD değerlerinin karşılaştırılması.....	69
Tablo 4.4. a. ASA Kullanmayan(Ø) KAH ve Kontrol Gruplarında Hastalık Şiddetine Göre, PAF (pg/mL),), Trombosit agregasyon EĞİM(Ω) ve Trombosit agregasyon % AMPLİTÜD Değerlerinin Karşılaştırılması	70
Tablo 4. 5. KAH ve kontrol gruplarında C3435T ve G2677T/A polimorfizmleri için genotip ve allel frekans dağılımları	71
Tablo 4. 6. KAH- Kontrol gruplarında PAF değerlerinin, C3435T ve G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılması.....	72
Tablo 4.6. a. ASA kullanmayan KAH- Kontrol gruplarında PAF değerlerinin, C3435T ve G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılması.....	73

Tablo 4. 7. Hastalık şiddetine göre KAH - Kontrol grupları arasında ,PAF düzeylerinin, C3435T ve G2677A/T genotipleri ile değerlendirilmesi.....	75
Tablo 4.7. a. ASA Kullanmayan KAH ve Kontrol Gruplarında, PAF(pg/mL) Düzeylerinin, Hastalık Şiddetine ve C3435T - G2677A/T Genotiplerine Göre Değerlendirilmesi.....	77
Tablo 4. 8. C3435T ve G2677A/T Polimorfizmlerinin Haplotip Analiz Sonuçları (A alleli çıkartılarak yapılmıştır).....	79
Tablo 4. 9. C3435T ve G2677A/T Polimorfizmlerinin Haplotip Analiz Sonuçları (A alleli, GT genotipi taşıyan bireylere dahil edilmiştir	81
Tablo 4. 10. C3435T ve G2677A/T Polimorfizmlerinin MİDAS Haplotip Analiz Sonuçları	82
Tablo 4. 11. KAH-Kontrol Gruplarında C3435T ve G2677A/T Haplotiplerine Göre PAF(pg/ml) Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	83

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. ATP ile çalışan pompalar	4
Şekil 2.2. A; ABCB-1, B;ABCC-1, C;ABCG-2'nin transmembran ve nükleotid bağlayıcı bölgelerini gösteren şema.....	7
Şekil 2.3. MDR 1 geninin 7. kromozomdaki yerleşimini gösteren idyogram.....	8
Şekil 2.4. P-glikoproteininin hipotetik modeli.....	9
Şekil 2.5. P-gp ve bilinen SNP leriden bazılarının protein yapısıyla ilişkisini gösteren temsili resim.....	11
Şekil 2.6. Normal arter duvarının yapısı.....	15
Şekil 2.7. Ateroskleroz Gelişimi.....	16
Şekil 2.8. Trombositin İç Yapısı.....	20
Şekil 2.9. Adezyon moleküllerinin inhibisyonu	24
Şekil 2.10. Lipid kor oluşumu	25
Şekil 2.11. ABC proteinlerinin taşıdıkları substratlar ve bağlandıkları reseptörler.....	33
Şekil 2.12. PAF'ın Biyosentetik Yolları.....	36
Şekil 2.13. PAF reseptörleri ve sinyal yolağını gösteren şema	41
Şekil 2.14. PAF'ın Endotelyal Hücre Üzerine Etkisini Gösteren Şema	44
Şekil 3. 1. MDR1 C3435T polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüsü	58
Şekil 3. 2. MDR-1 G2677T/A polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüsü	59
Şekil 3. 3. MDR-1 C2677T/A polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüsü.....	60
Şekil 3. 4. MDR-1 C2677T/A polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüsü.....	61
Şekil 4. 1. C3435T ve G2677A/T Polimorfizmlerinin Haplotip Analiz Sonuçları (A alleli çıkartılarak yapılmıştır).	79
Şekil 4. 2. C3435T ve G2677A/T Polimorfizmlerinin Haplotip Analiz Sonuçları (A alleli, GT genotipi taşıyan bireylere dahil edilmiştir).....	81
Şekil 4. 3. KAH-Kontrol Gruplarında C3435T ve G2677A/T Haplotiplerine Göre Plazma PAF (pg/ml) Düzeylerinin Karşılaştırılması	84

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KA	Koroner arter
KAH	Koroner arter hastalığı
PAF	Trombosit aktive edici faktör
ABC	ATP bağlayıcı kaset
MDR-1	Çoklu ilaç dirençliliği-1
kDA	Kilo Dalton
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EtBr	Etidyum bromür
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ATP	Adenozin tri fosfat
GTP	Guanizin tri fosfat
ADP	Adenozin di fosfat
GDP	Guanizin di fosfat
RPM	Revolution per minute
TZP	Trombositten zengin plazma
TFP	Trombositten fakir plazma
RE	Restriksiyon enzimi
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
P-gp	P-glikoproteini
HRP	Horseradish peroksidaz
TMB	3,3',5,5' tetramethyl-benzidine
TMD	Trans membran bölge
NBD	Nükleotid bağlayıcı bölge
bp	baz çifti
ASA	Asetilsalisilik Asit
AA	Araşidonik Asit
PLA2	Fosfolipaz A2

PLC	Fosfolipaz C
DAG	Diaçil gliserol
TXA-2	Tromboksan A2
PG	Prostoglandin
PGI2	Prostosiklin
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitör1
AT-3	Antitrombin-3
GP	Glikoprotein
vWF	von Willebrand Faktör
Tpa	Doku plazminojen aktivatör
DIC	Yaygın damar içi pıhtılaşma
MAP	Ortalama bazal arteriyel basınç
NFk- β	Nükleer faktör kappa beta
TPR	Total periferik rezistans
LVSP	Sol ventriküler sistolik basınç
MAPK	Mitojen aktive eden protein kinaz
OD	Optik dansite

ÖZET

AYAZ, G. Koroner Arter Hastalarında MDR-1 Gen Polimorfizmi ve Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF) Düzeylerinin Hastalıkla Olan İlişkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.2011.

Proinflamatuvar bir mediatör olan Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF), trombosit aktivasyon ve agregasyonunda rol alır. Koroner Arter Hastalığında (KAH) serum PAF düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. ATP Bağlayıcı Kaset (ABC) taşıyıcı ailesinin bir üyesi olan ve birçok bileşik ile ksenobiyotiği, hücre dışına taşıyan Çoklu İlaç Dirençliliği-1 (MDR-1) proteini aynı zamanda PAF'ında hücre dışına taşınmasını sağlar. MDR-1 geninde bugüne kadar birçok Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP) bildirilmiştir. Amino asit değişimine yol açmayan Ekson 26'daki C3435T polimorfizminin, MDR-1'in substratlarına karşı olan afinitesini etkilediği bildirilmiştir. Ekson 21'deki G2677A/T polimorfizmi amino asit değişimine yol açarak proteinin yapısını ve fonksiyonunu değiştirir. Bu polimorfizmler ile PAF'ın taşınma hızı arasındaki ilişkinin ne olduğu bilinmemektedir.

Çalışmadaki amacımız, KAH olgularında yüksek olduğu bildirilen PAF düzeyleri ile MDR-1 C3435T ve G2677A/T polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Anjio olan 198 kişi çalışmaya dahil edildi. Anjio sonucuna göre damar tıkanıklığı olmayan 85 kişi kontrol grubu olarak, 113 kişi ise (1 damar=43, 2 damar=36, 3 damar=34) hasta grubu olarak ayrıldı. Genotipleme PCR-RFLP yöntemleri ile, plazma PAF düzeyleri ise ELİSA yöntemi ile tespit edildi. Kan örneklerinde aynı zamanda ADP uyararı verilerek trombosit fonksiyonları değerlendirildi.

MDR-1 C3435T ve G2677A/T polimorfizmleri açısından hasta ve kontrol grupları arasında herhangi bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Yüzde agregasyon düzeyleri ile hastalık şiddeti arasında bir ilişki bulunmamakla birlikte ($p>0.05$), plazma PAF düzeyleri ile hastalık şiddeti arasında ilişki bulundu ($p<0.05$). Hasta ve kontrol gruplarının PAF ve agregasyon düzeylerinin C3435T ve G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılmasında bazı gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulundu. (ANOVA, $p<0.05$). Sonuçlarımız, C3435T ve G2677A/T polimorfizminin plazma PAF ve agregasyon düzeyleri üzerine etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak farklı

gruplarda, MDR-1 geninin 2 polimorfik bölgesinin (C3435T ve G2677A/T) genotiplerine göre PAF düzeyleri ve trombosit agregasyon parametreleri değerlendirildiğinde; benzerlikler ve farklıklar mevcuttur. Bu değişkenliğin sebebinin genotiplerden kaynaklanıp kaynaklanmadığını tam olarak açıklayabilmek için denek sayısı arttırılarak değerlendirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF), Çoklu İlaç Dirençliliği-1 (MDR-1), Koroner Arter Hastalığı (KAH), Triallelik polimorfizm G2677A/T, Haplotip. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-7883/05072010

ABSTRACT

AYAZ, G. Association of MDR-1 Gene Polymorphism and Platelet Activating Factor (PAF) Levels in Patients with Coronary Artery Disease

İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology
.Master İstanbul. 2011.

Platelet activating factor (PAF) is a proinflammatory mediator which plays major roles in activation and aggregation of platelets. High levels of PAF has been shown to be related to coronary artery disease (CAD). MDR-1 protein, which is a member of ABC transporters family, takes place in transport of several proteins and xenobiotics as well as PAF. Several SNPs have been reported in MDR-1 gene so far. C3435T polymorphism in Ekson 26, which do not cause an amino acid change, have been reported to effect the affinity of MDR-1 to its substrates. G2677A/T polymorphism in Ekson 21 alters protein functions and structure as a result of amino acid change. Association of these polymorphisms with PAF transport rate is not known.

Our goal in this study was to investigate the correlation of plasma PAF levels (which is known to be high in patients with CAD) with MDR-1 C3435T and G2677A/T polymorphisms. Study population was composed of 198 patients undergoing coronary angiography. Patients with normal coronary arteries (n=85) formed the control group and patients coronary artery disease (n=113) formed the study group. Patients with CAD were further divided into 3 groups according to the number of vessels involved (one vessel disease=43, two vessels disease=36 and three vessel disease =34). PCR-RFLP and ELISA was used for genotyping and plasma PAF level measurement. Percentage platelet aggregation was also studied by ADP stimulation of blood samples.

MDR-1 C3435T and G2677A/T polymorphisms revealed no difference between patient and control groups ($p>0.05$). Extent of CAD according to the number of involved vessels was not associated with the percentage aggregation levels ($p>0.05$), however plasma PAF levels was found to be correlated with the extension of disease ($p<0.05$). Patient and control groups PAF and aggregation levels showed significant differences with regard to C3435T and G2677A/T genotypes ($p<0.05$). Ours findings suggest that C3435T and G2677A/T polymorphisms may be associated with plasma

PAF and aggregation levels however similarities and differences are found when PAF levels and platelet aggregation parameters were evaluated according to MDR-1 genes 2 polymorphic regional genotypes (C3435T ve G2677A/T) in different groups. More patients are required to demonstrate the role of genotypes in this differentiation.

Key Words: Platelet Activating Factor (PAF), Multi Drug Resistance-1(MDR-1), Coronary Artery Disease (CAD),Triallelic polymorphism G2677A/T, Haplotype.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University.
Project No. T-7883/05072010

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner Arter Hastalığı (KAH) kalp kasını besleyen koroner arterlerin tıkanıklığına verilen addır ve nedeni “ateroskleroz” denilen damar sertliğidir. KAH günümüzde en sık görülen önemli sağlık sorunlarından biridir. Bu hastalığın en önemli özelliği ileri evrelerde miyokard enfarktüsüne yol açabilmesidir.

KAH olgularında hasarlanmış endotel ve inflamasyonda rol alan hücrelerin varlığı bu hastalıkta trombotik ve inflamatuvar bir sürecin yaşandığını gösterir (1,2, 3). İnflamasyonda rol alan hücrelerin inflamasyon sahasına çağırılmasında proinflamatuvar araçlar rol oynar (4). Membran lipidlerinden türeyen fosfolipid yapısındaki Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF) memelilerde bulunan çok yönlü ve en etkili proinflamatuvar araçtır (5). Özellikle hasarlanmış endotel membranından ve inflamasyonda rol alan aktive olmuş hücrelerden salınan PAF aynı zamanda trombositlerin aktive olmasına yol açar (6,7). Literatürlerde KAH olgularında plazma PAF düzeylerinin yükseldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (8,9,10,11).

Hücre içinde bulunan veya sentezlenen fosfolipidler, aminoasitler, peptidler, iyonlar, polisakkaritler, organik anyonlar, safra asitleri, ilaçlar ve diğer ksenobiyotikler’in hücre dışına taşınmasında bir takım makromoleküller rol oynar (12). Bu makromoleküller arasında ATP Bağlayıcı Kaset (ABC) taşıyıcı proteinleri geniş ve önemli bir yer tutar. Günümüze kadar ABCA-ABCG’ye kadar 7 alt grup ve 49 üyesi tespit edilen ABC taşıyıcıları içerisinde ilk keşfedilen ABCB-1 (MDR-1 veya p-glikoprotein) dir. MDR-1 proteininin spesifik bir çok substratı bulunmaktadır (13). Fosfolipid yapısındaki PAF MDR-1’in doğal substratlarından biridir (14).

MDR-1 proteini, MDR-1 geninin ürünüdür. MDR-1 geni 7. kromozomun q21-21.1 bölgesinde yerleşim gösterir (15). Normal organizmada MDR-1 proteini, hücre içindeki konjugatlara ek olarak çeşitli kimyasalları ve ilaçları hücre dışına atan, ATP’ye bağımlı olarak çalışan, hücreyi oksidatif stresin zararlı etkilerinden koruyan transmembran bir proteindir (16). MDR-1 geninde de oluşacak herhangi bir mutasyon veya polimorfizm, bu yolla taşınan maddelerin plazmadaki konsantrasyonlarına etki edebilir (17,18,19,20). Bugüne kadar MDR-1 geninde çoğu tek nükleotid polimorfizm (SNP) olmak üzere 105 varyant tespit edilmiştir (21). MDR-1 geninde en sık görülen polimorfizmler; ekzon12 de C1236T, ekzon 21 de G2677T/A ve ekzon 26 da bulunan C3435T polimorfizimleridir (18, 21).

G2677T polimorfizmi 893. pozisyonadaki Alanin aminoasidinin yerine Serin aminoasidi (Ala893Ser), G2677A polimorfizmi ise aynı pozisyonadaki Alanin aminoasidi yerine Treonin aminoasidi (Ala893 Thr) dönüşümüne yol açar. Bu polimorfizmler MDR1 proteininin aminoasit dizisini değiştirirler. Böylece MDR-1 proteinin yapısı değişir (18).

C1236T ve C3435T polimorfizmleri ise aminoasit değişimine yol açmadıkları için sessiz polimorfizmler olarak isimlendirilirler. Bu sessiz polimorfizmler içerisinde C3435T oldukça önemlidir. Çünkü MDR1 proteininin aminoasit dizisini (yapısı) değiştirmemesine rağmen, bu bölgedeki polimorfizm katlanmayı ve proteinin üç boyutlu yapısını değiştirdiği için proteinin fonksiyonu üzerine direk olarak etki eder (22). Her iki polimorfizm birlikte değerlendirildiğinde MDR-1 proteininin fonksiyonu üzerine etkili olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçları çelişkili olmakla birlikte, ilgili polimorfizmlerin çeşitli substratların hücre içi veya dışı konsantrasyonlarını etkilediği gösterilmiştir (23, 24).

Koroner Arter Hastalarında yapılan çalışmalarda PAF seviyelerinin anlamlı oranda yükseldiği gösterilmiştir ancak bu hastalarda henüz MDR-1 polimorfizminin PAF düzeyleri ile ilişkisini ortaya koyan herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamaktadır.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda projemizde, Koroner Arter Hastalığında MDR-1 geninin en sık bildirilen ve birlikte kalıtımla oranları yüksek olan iki polimorfik bölgesini (ekzon 21 G2677T/A ve ekzon 26 C3435T) PCR- RFLP yöntemleri ile inceleyip, plazma PAF seviyelerini ise ELİSA yöntemi ile tespit ettik. Aynı zamanda hasta ve kontrol gruplarında trombosit fonksiyonlarını değerlendirebilmek için lumiagregometre cihazında trombosit fonksiyonlarını çalıştık.

Amacımız Koroner Arter Hastalığında, risk faktörü olduğu bilinen parametrelerin dışında henüz literatürde olmayan PAF, trombosit agregasyonu ve MDR-1 polimorfizmi ilişkilerinin neler olup olmadığını ortaya çıkararak literatür bilgisine katkıda bulunmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ATP-Bağlayıcı Kaset Taşıyıcıları

2.1.1. ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcıları ve Genel Özellikleri

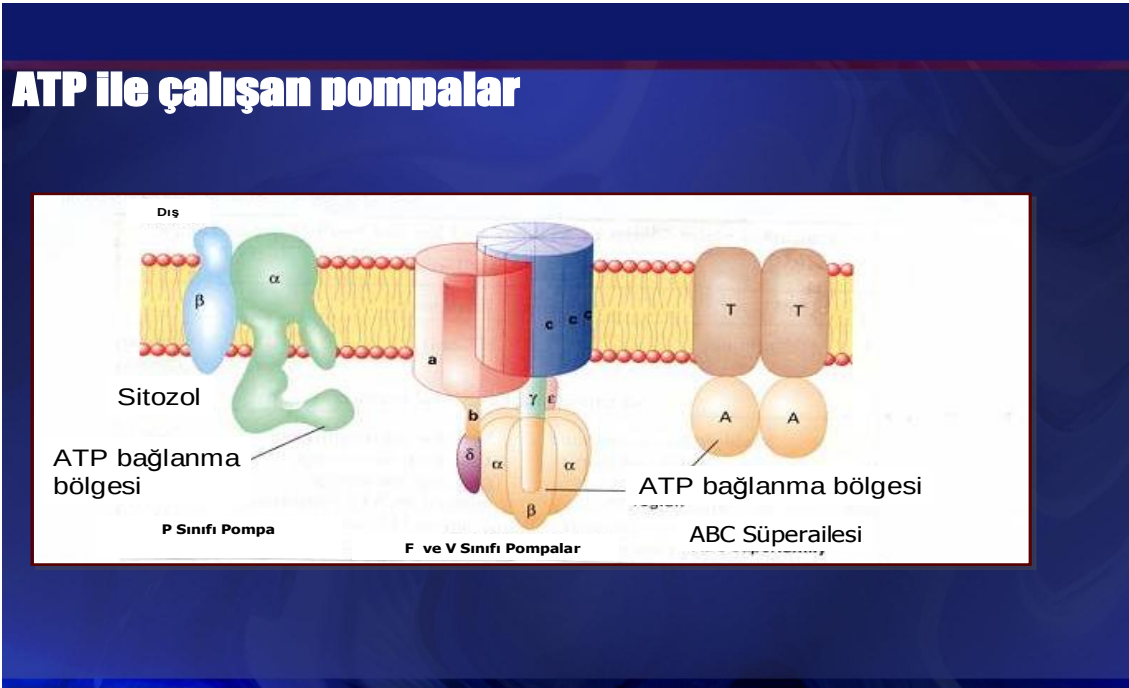
Hücrede moleküllerin bir yerden başka bir yere taşınması birtakım taşıyıcı proteinler aracılığıyla gerçekleşir (12). Bu taşıyıcı proteinlerden bir kısmı ATP ile enerji harcayarak çalışır. P tipi, F tipi, V tipi ve ATP-bağlayıcı kaset (ABC) tipi taşıyıcı proteinler enerji ile çalışan proteinlerdir (Şekil 2-1). Bu taşıyıcılar birer pompa görevi görürler, her bir pompa kendisine spesifik ürünleri taşır. Örneğin V tipi ATP pompası lizozomların yüksek asiditelerini sağlamak için lizozomal vakuoler zarlar arasındaki proton pompası olarak görev yaparlar. P tipi ATP pompası Na-K, Ca ve hidrojen pompası olarak görev yapar.

ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı proteinleri ise içerdikleri alt gruplara bağlı olarak çeşitli kimyasalların, hücre dışına taşınmasını sağlar.

ABC taşıyıcı ailesi çok geniş bir ailedir ve hücre membranında bulunur. İntegral membran proteinleri sınıfında yer alır. ABC taşıyıcıları ATP harcayarak fosfolipidlerin, iyonların, peptidlerin, steroidlerin, polisakkaridlerin aminoasitlerin, organik anyonların, safra asitlerinin, ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin hücre dışına taşınmasında görev yaparlar (12). ABC taşıyıcı ailesi kendi arasında ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG olmak üzere toplam 7 alt gruba ayrılır (Tablo 2-1) (25). Bu gruplar içerisinde ABCE ve ABCF transmembran bölgesine sahip değildirler. Genel olarak protein sentez ve ekspresyonunu düzenlerler. ABCB1 (MDR1) nötral ve organik hidrofobik bileşikler taşıırken, ABCC-1 (MRP1) ve ABCG2 hidrofobik maddelerin yanında ilaç konjugatları gibi büyük anyonik bileşikler taşıır.

ABC taşıyıcı protein ailesi üyeleri en az 1 ATP bağlayıcı bölge (Nükleotid Bağlayıcı Bölge) NBD ve en az bir transmembran bölge (TM) içermektedirler. Nükleotid bağlayıcı bölge üç korunmuş motif içerir; Walker A (WA), Walker B (WB) ve LSGGQ (C motifi). WA ve WB motiflerinin ATPaz aktiviteleri vardır. ABC taşıyıcılarının aktivitesi iki NBD ile ATP arasındaki kooperatif ilişkiye bağlıdır. Bir NBD'den WA ve WB motifleri tarafından oluşturulmuş iki aktif bölge arasında ATP sandviç yapısı ile belirlenir. Şekil 2-2 (25).

ABC taşıyıcıları ilk kez 1976 yılında bazı kanser hastalarının ilaca direnç göstermesi sonucu keşfedilmiştir. ABC taşıyıcı ailesinden ilk olarak MDR-1(ABCB-1) proteini tanımlanmıştır. Kanser hastalarında tedavi protokolü olarak birden fazla farklı kemoteropatik ilaç aynı anda uygulanmasına rağmen kimi hastalarda ilaca yanıt alınamamıştır. Bu ilaç dirençliliğinin araştırılması sonucunda "Çoklu İlaç Dirençliliği" (Multi Drug Rezistance) proteini olarak adlandırılan MDR-1 proteini bulunmuştur. 1976 yılında Juliano and Ling, Çin hamster over hücrelerinde kolşisine dirençli olarak saptananların plazma membranlarından oldukça büyük bir glikoprotein elde ettiler. Bu hücrelerin membran geçirgenliklerinin normale göre değişmiş olduğunu buldular. Bundan dolayı keşfettikleri bu glikoproteine permeabilite kelimesinden dolayı P-glikoprotein adını verdiler. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu glikoproteinin sadece kanserli dokularda değil tüm dokularda bulunduğu immunohistokimyasal olarak gösterildi. Tablo 2-2'de ABC taşıyıcıları bulundukları dokular ve taşıdıkları substratlar gösterilmiştir (25).



Şekil 2.1. ATP ile çalışan pompalar

ABC TAŞIYICI AİLESİ

Tablo 2.1. ABC Taşıyıcılarının Alt Gruplarının sınıflandırılması

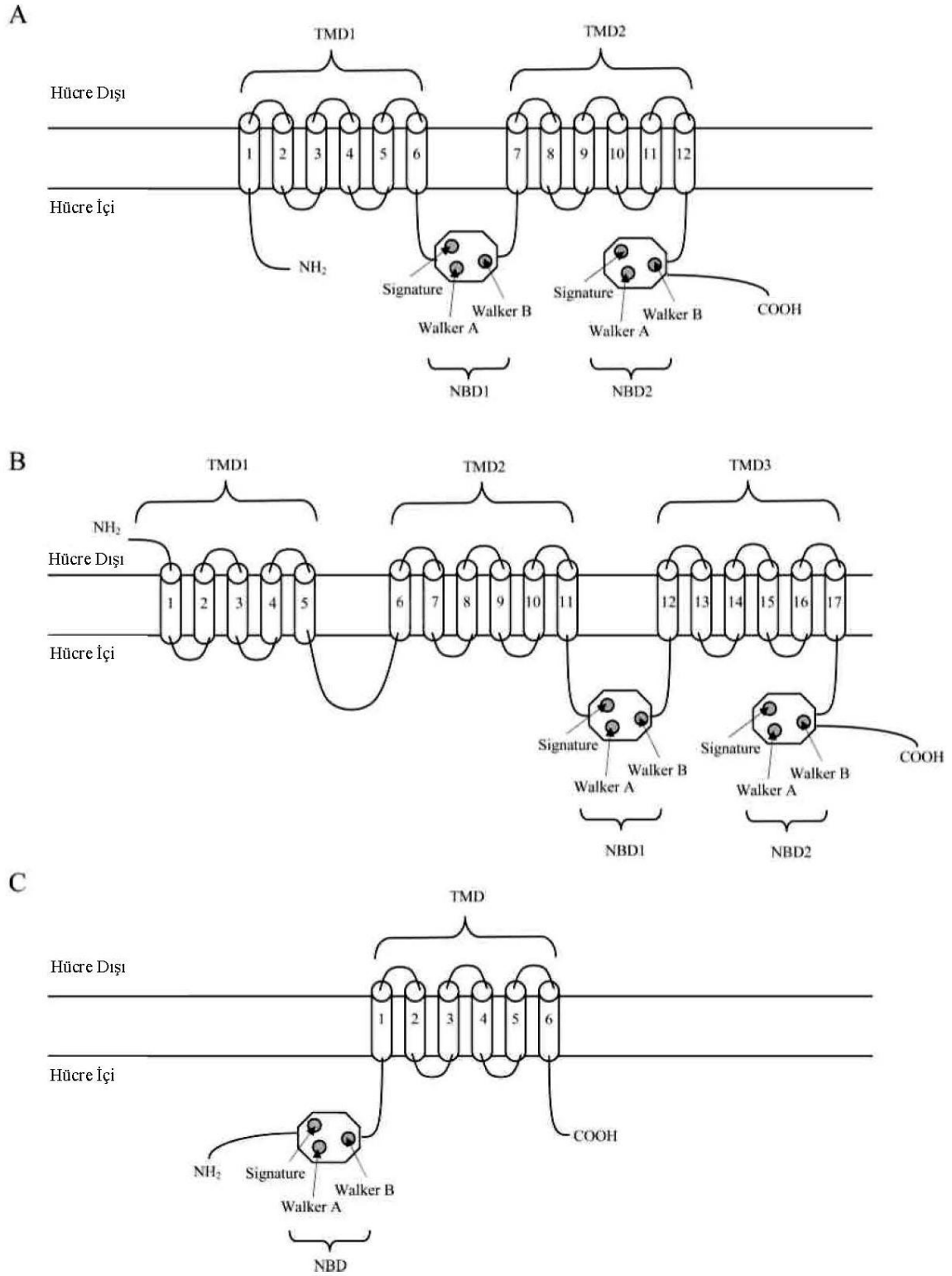
ABC1 (Altgrup A)	MDR / TAP (Altgrup B)	MRP / CFTR (Altgrup C)	ALD (Altgrup D)	OABP (Altgrup E)	GCN20 (Altgrup F)	Beyaz (Altgrup G)
ABCA1	ABCB1 (MDR-1 ve P-GP)	ABCC1 (MRP1)	ABCD1 (ALDP)	ABCE1 (OABP)	ABCF1	ABCG1
ABCA2	ABCB2 (TAP1)	ABCC2 (MRP2 veya cMOAT)	ABCD2 (ALDR)		ABCF2	ABCG2 (BCRP)
ABCA3	ABCB3 (TAP2)	ABCC3 (MRP3)	ABCD3		ABCF3	ABCG4
ABCA4	ABCB4 (MDR3)	ABCC4 (MRP4)	ABCD4			ABCG5
ABCA5	ABCB5	ABCC5 (MRP5)				ABCG8
ABCA6	ABCB6	ABCC6 (MRP6)				
ABCA7	ABCB7	ABCC7 (CFTR)				
ABCA8	ABCB8	ABCC8 (SUR1)				
ABCA9	ABCB9	ABCC9 (SUR2)				
ABCA10	ABCB10	ABCC10 (MRP7)				
ABCA12	ABCB11 (BSEP veya SPGP)	ABCC11 (MRP8)				
ABCA13		ABCC12 (MRP9)				
		ABCC13				

- cMOAT, kanalikül multispecific organik anyon taşıyıcı; ALD adrenolökodistrofileri; ALDR, adrenolökodistrofi ilgili; ALDP, adrenolökodistrofileri protein; OABP, organik anyon bağlayıcı taşıyıcı; SPGP, kardeş P-glikoprotein
- Lucie Couture ve ark.Pharmacological Reviews. Vol 58: 244-258, 2006 (Ref: 25)

Tablo 2.2. ABC Taşıyıcılarının Özellikleri ve Taşıdıkları Substratlar

ABC Transporter	Trans membran Alanlar sayısı	İfade Edildiği Ana Dokular	Apikal veya bazolateral Membran Yerleşimi	Substratlar <i>a</i>	Referanslar
ABCB1 (MDR-1 ve P-gp)	2	Karaciğer, böbrek, bağırsak, beyin, testis, adrenal bez, rahim, yumurtalık	Tepe	Kinidin, verapamil, celiprolol, talinolol, digoksin, daunorubisin, doksorubisin, vinblastin, etoposid, metotreksat, mitoksantron, paklitaksel, topotekan, indinavir, nelfinavir, ritonavir, sakonavir	Kartner et al. (1983), Ueda ve ark. (1987), Pastan ve ark. (1988), de Lannoy ve Silverman (1992), Hendricks ve ark. (1992), Peters ve Roelofs (1992), Karlsson ve ark. (1993), de Graaf ve ark. (1996), Sparreboom ve ark. (1997), Kim ve ark. (1998), Gramatte ve Oertel (1999), Verschraagen ve ark. (1999), Jones ve ark. (2001)
ABCB4 (MDR3)	2	Karaciğer	Tepe	Vinblastine, paklitaksel, digoksin	Smith ve ark. (2000)
ABCB11 (BSEP veya SPGP)	2	Karaciğer, bağırsak	Tepe	Vinblastin, siklosporin, rifampisin	Török ve ark. (1999), Lecureur ve ark. (2000), Stieger ve ark. (2000)
ABCC1 (MRP1)	3	Bağırsak, beyin, böbrek, akciğer, testis	Bazolateral	Doksorubisin, daunorubisin, vinblastin, vinkristin, etoposid, metotreksat, paklitaksel, grepafloxacin	Cole ve ark. (1992, 1994), Flens ve ark. (1996), Sharp ve ark. (1998), Hooijer ve ark. (1999), Evers ve ark. (2000), Tamai ve ark. (2000), Cherrington ve ark. (2002)
ABCC2 (MRP2 veya cMOAT)	3	Karaciğer, bağırsak, böbrek	Tepe	Sisplatin, doksorubisin, etoposid, vinkristin, metotreksat, indinavir, ritonavir, sakonavir, adefovir, sifodovir	Schaub ve ark. (1997), Cui ve ark. (1999), Hooijberg ve ark. (1999), Kawabe ve ark. (1999), Fromm ve ark. (2000), Miller (2001), Huisman ve ark. (2002)
ABCC3 (MRP3)	3	Bağırsak, böbrek, karaciğer, pankreas, plasenta, kolon	Bazolateral	Daunorubisin, doksorubisin, vinkristin, etoposid, teniposide, metotreksat	Kool ve ark. (1997), Belinsky ve ark. (1998), Kool ve ark. (1999), vd Zeng. (1999), St-Pierre ve ark. (2000), Zelcer ve ark. (2001)
ABCC4 (MRP4)	2	Prostat, akciğer, böbreküstü bezi, yumurtalık, testis	Bazolateral ve apikal (hücre tipine bağlı olarak)	Metotreksat, adefovir	Lee ve ark. (1998), Schuetz ve ark. (1999), Lee ve ark. (2000), Chen ve ark. (2002)
ABCC5 (MRP5)	2	İskelet, kas, kalp, beyin	Bazolateral	Adefovir	Kool ve ark. (1997), Belinsky ve ark. (1998), ve ark Wijnholds (2000), Haimeur ve ark. (2004)
ABCC6 (MRP6)	3	Böbrek, karaciğer	Bazolateral	Sisplatin, doksorubisin, etoposid, daunorubisin,	Belinsky ve Kruh (1999), Bergen ve ark. (2000), Belinsky ve ark. (2002)
ABCC10 (MRP7)	3	Kalp, iskelet, kas, dalak, karaciğer	Belirlenmemiştir	Doksorubisin, vinblastin, vinkristin, paklitaksel, dosetaksel	Kao et al. (2002), Orr ve ark. (2003), Hopper-Borge ve ark. (2004)
ABCC11 (MRP8)	2	Meme, testis	Belirlenmemiştir	Pürin ve pirimidin nükleotid analogları	Bera et al. (2001)
ABCC12 (MRP9)	2	Meme, testis, beyin, yumurtalık, iskelet kası	Belirlenmemiştir	Belirlenmemiştir	Bera et al. (2002)
ABCG2 (BCRP)	1	Plasenta, beyin	Tepe	Daunorubisin, doksorubisin, etoposid, teniposide, metotreksat, mitoksantron, topotekan	Doyle ve ark. (1998), Maliepaard ve ark. (1999, 2001), Volk ve ark. (2002), Allen ve ark. (2003), Volk ve Schneider (2003), Wang ve ark. (2003), Aronica ve ark. (2005)
ABCA8	Belirlenmemiştir	Kalp, iskelet kası, karaciğer	Belirlenmemiştir	Doksorubisin, digoksin	Tsuruoka et al. (2002)

- cMOAT, kanalikül multispecific organik anyon taşıyıcı; BSEP, safra tuzu atım pompası; TAP, taşıyıcı antijen işleme ile ilişkili; CFTR, kistik fibroz transmembran kondüktans regülatörü
- Lucie Couture ve ark. Pharmacological Reviews. Vol 58: 244-258, 2006 (Ref: 25)



Şekil 2.2. A; ABCB-1, B;ABCC-1, C;ABCG-2'nin transmembran ve nükleotid bağlayıcı bölgelerini gösteren şema

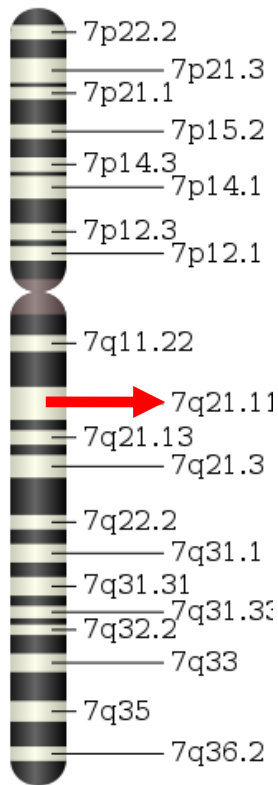
2.1.2. ABCB1 (MDR-1) Geni

ABCB1 geni diğerk bir adıyla MDR-1 (P-gp), 7.kromozomun q21.1bölgesinde yerleşim gösterir. 200 kilobaz (kb) uzunluğunda olup 28 eksona sahiptir (şekil 2-3). MDR 1 geni 4,5 kb'lık bir mRNA' yi kodlar ve P-gp (gp 170) oluşur. Genin kodlayan bölgesi tamamının sadece %5 kadarlık kısmını oluşturur (15).

MDR 1 genini ilk klonlayan 1985 yılında Riordan olmuştur (13).

MDR1 geninin en fazla eksprese edildiği yerler sırasıyla adrenal bez ve böbrektir. Bu organları akciğer, karaciğer, alt jejunum, kolon, rektum ve diğerk dokular izler. Aynı zamanda adrenal bez ve kolon tümörlerinin çoğunda gen ekspresyonunun olduğu gözlenmiştir (26).

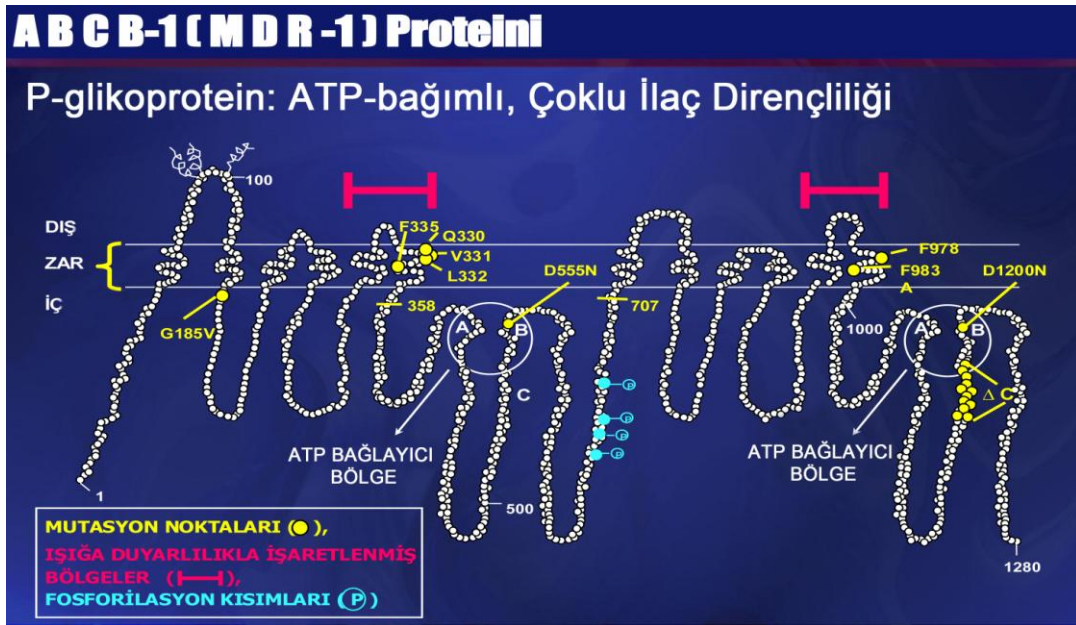
Immunohistokimyasal olarak MDR1 ekspresyonunun tümör dokusunda gösterilmesi tedaviye yanıtın öngörülmesine olanak tanıyacağına ilişkin yayınlar bulunmaktadır (13,27,28,29)



Şekil 2.3. MDR 1 geninin 7. kromozomdaki yerleşimini gösteren idyogram.

2.1.3. ABCB1 (MDR-1) gen ürünü;P-glikoprotein

ABCB taşıyıcı ailesi üyesi olan P-glikoprotein (P-gp), 170 kDA büyüklüğünde ve 1280 aminoasitten oluşmuş olup memelilerde tek zincirli protein yapısındadır (Şekil 2-4). P-gp'nin iki transmembran bölgesi ve iki ATP bağlayıcı bölgesi bulunmaktadır (20). Bu glikolize membran proteini ilaç direncini, geçirgenliği değiştirerek oluşturduğundan "permeability" geçirgenlik kelimesinin kısaltması olan P ile isimlendirilerek P-glikoprotein olarak adlandırılmıştır (30,31). P-gp hepatositlerde safra kanalı endotel hücrelerinde, böbreklerde proksimal tübüllerin apikal yüzeylerinde, barsak epitel hücrelerinde, beyin ve testisteki kapiller endotelyal hücrelerde bulunmaktadır. Bazı hastalıklarda ilaç direncine neden olduğu gibi toksik ksenobiyotiklerin safra, idrar ve barsak lümenine atılmalarında; beyin ve testiste birikmelerinin önlenmesinde katkısı olduğu bilinmektedir (32,24,33).



Şekil 2.4. P-glikoproteininin hipotetik modeli

Richert, N.D., Aldwin, L., Nitecki, D., ve ark.(1988): Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells. Biochemistry, 27(20):7607- 13. (Ref: 20)

2.1.4. ABCB1 (MDR-1) Gen Polimorfizmleri

MDR1 geninin kodlanan bölgesinde 60'ın üzerinde tek nükleotid polimorfizm tespit edilmiştir. Kodlanan, bölgelerde bulunan 28 adet varyantın 10'u aminoasit değişimine yol açarken bunlar arasından sadece 4'ü %1'den daha fazla sıklıkta görülürler ve polimorfizm olarak kabul edilirler (21) .

P-gp ile taşınan ilaçların klinik etkinliğinin MDR1 genotipi ile ilişkilendirildiği yayınlar bulunmaktadır. Taşıyıcı proteinlerle ilgili genlerin ekspresyon ve polimorfizmlerine yönelik çalışmalar çoğunlukla MDR1 (ABCB1) ve MRP1 (ABCC1) üzerine yapılmıştır. Polimorfizm çalışmalarının çoğu etnik farklılıklar, küçük ölçekli çalışma grubu ya da kullanılan yöntemlerin farklılık göstermesi nedeniyle çelişkili sonuçlar doğurmuştur.

Çeşitli ırklarda yapılan populasyon çalışmalarında MDR1 geni üzerinde saptanan polimorfizmler arasında en iyi bilinenleri ekzon 12 de C1236T (Gly412Gly), ekson 21 de C2677T/A (Ala893Ser/Thr) ve ekson 26 da bulunan C3435T (Ile145Ile) polimorfizmleridir. C1236T (Gly412Gly) ve C3435T (Ile145Ile) sessiz polimorfizmler olup ve aminosit değişimine yol açmazken, G2677T polimorfizmi 893. pozisyondaki Alanin aminoasidinin Serin aminoasidine dönüşümüne (Ala893Ser), G2677A polimorfizmi ise aynı pozisyondaki Alanin aminoasidinin Treonin aminoasidine (Ala893Thr) dönüşümüne yol açar (18,21,34).

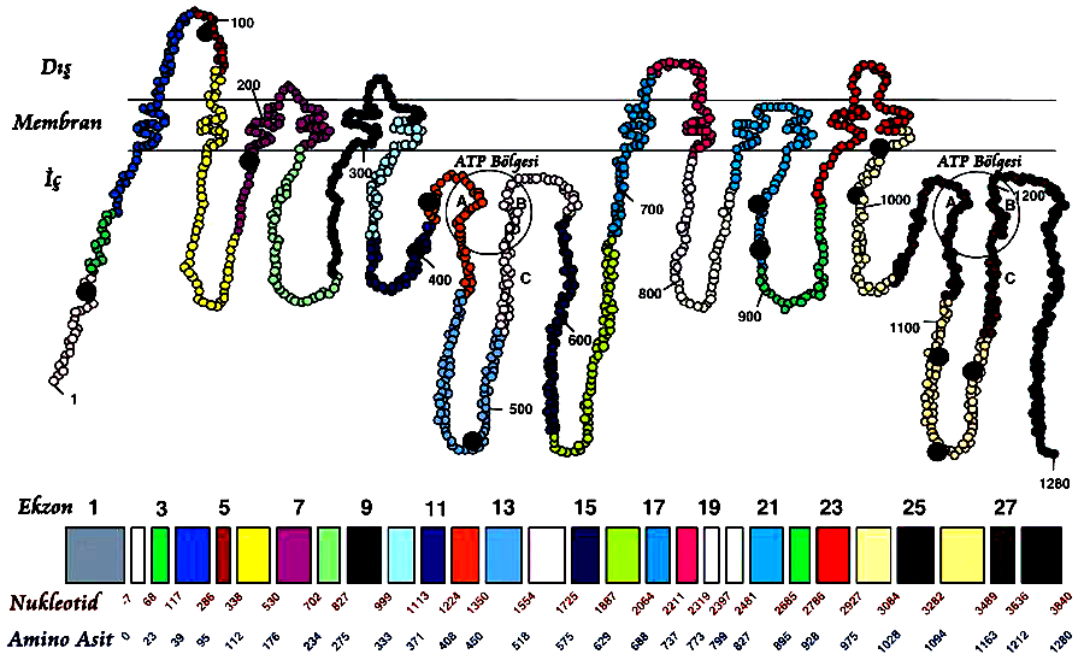
MDR1 geninin ekspresyonundaki artışın P-gp düzeyinin hücre içinde yükselmesine ve dolayısıyla ilaç miktarının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (17,18,19,20).

Doku düzeyinde yapılan çalışmalar, Ekson 26'daki C3435T homozigot değişiminde bireylerin belirgin olarak barsaklardaki MDR1 ekspresyonunu azaltarak ilaç seviyesini artırdığını (23) ve beyin dokusunda ise tedaviye dirençli epilepsi hastalarında taşıyıcı proteinlerin gen ekspresyonundaki aşırı artışını kanıtlamıştır (24).

Bu polimorfizmin P-gp aktivitesine etkisini gösteren çalışmalar da yapılmıştır. Yabani tip ve polimorfik P-gp'ni taşıyan hücrelerde mRNA miktarları benzer olmasına rağmen polimorfik proteinin konformasyonu diğerinden farklıdır. Bu durum sessiz

polimorfizmin mRNA ekspresyonunu ve dolayısıyla P-gp miktarını değiştirmediği ancak kotranslasyonel katlanmaların zamanlamasını ve P-gp nin membrana girişini ve böylece taşıdığı substratın şeklini ve etkileşim bölgelerini değiştirdiği söylenmiştir (22) (şekil 2-5).

MDR-1 proteini özellikle ilaçların emilim dağılım ve atılım süreçlerinde önemli rol oynarlar. Hücre içi substratlarına karşı olan afinitesi genetik polimorfizme göre değişebilir. Belki de bu şekilde toplumlar arası ve bireyler arası farklılığın sebebi açıklanabilir. MDR-1 hemen hemen bütün dokularda eksprese edilir. İmmunohistokimyasal olarak kardiyak dokularda da MDR-1 ekspresyonu gösterilmiş, polimorfizm çalışmaları yapılmıştır (25).



şekil 2.5. P-gp ve bilinen SNP leriden bazılarının protein yapısıyla ilişkisini gösteren temsili resim

Kimchi- Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I.-W., ve ark. (2007): A 'silent' polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. Science 315: 525-528. (Ref: 22)

Tablo 2.3. MDR-1'in en sık görülen ekzonik polimorfizmleri

<i>Ekson numarası</i>	<i>Polimorfik nükleotid</i>	<i>Aminoasit değişikliği</i>	<i>Referans</i>
1	-145	—	Ito <i>et al.</i> (2001)
1	-129	—	Hoffmeyer <i>et al.</i> (2000); Tanabe <i>et al.</i> (2001)
2	61	N21D	Cascorbi <i>et al.</i> (2001); Decleves <i>et al.</i> (2000); Hoffmeyer <i>et al.</i> (2000); Kim <i>et al.</i> (2001)
5	307	F103L	Hoffmeyer <i>et al.</i> (2000)
7	548	N183S	Kim <i>et al.</i> (2001)
10	1107	G369P	Hoffmeyer <i>et al.</i> (2000)
11	1199	S400N	Cascorbi <i>et al.</i> (2001); Hoffmeyer <i>et al.</i> (2000); Kim <i>et al.</i> (2001)
12	1236	Wobble	Cascorbi <i>et al.</i> (2001); Hoffmeyer <i>et al.</i> (2000); Kim <i>et al.</i> (2001); Kioka <i>et al.</i> (1989)
13	1474	R492C	Kim <i>et al.</i> (2001)
21	2650	Wobble	Kim <i>et al.</i> (2001)
21	2677	893A, S, or T	Cascorbi <i>et al.</i> (2001); Kim <i>et al.</i> (2001); Kioka <i>et al.</i> (1989); Mickley <i>et al.</i> (1998)
24	2956	M986V	Tanabe <i>et al.</i> (2001)
24	2995	A999T	Mickley <i>et al.</i> (1998)
26	3320	Q1107P	Cascorbi <i>et al.</i> (2001)
26	3396	Wobble	Hoffmeyer <i>et al.</i> (2000)
26	3421	S1141T	Kim <i>et al.</i> (2001)
26 ^a	3435	Wobble	Hoffmeyer <i>et al.</i> (2000); Kim <i>et al.</i> (2001); Kioka <i>et al.</i> (1989)
28	4030	—	Tanabe <i>et al.</i> (2001)
28	4036	—	Kioka <i>et al.</i> (1989); Tanabe <i>et al.</i> (2001)

Ambudkar SV.,Kimchi-Sarfaty C.,Sauna ZE.,ve ark. (2003): P-glycoprotein: from genomics to mechanism.Oncogene. 2003 Oct 20;22(47):7468-85 (ref:18)

2.2. Koroner Arter Hastalığı

2.2.1. Tarihçe

Koroner Arter Hastalığı (KAH) dünyada çok yaygın olarak görülen kalbi besleyen ana arterlerin tıkanıklığı ile karakterize bir hastalıktır.

Tarihçesine bakıldığında, II. Charles tarafından 1661'de Clarendon Lordluğu verilen Edward Hydes'in biyografisinde angina pectorisin ilk tanımlarından biriyle karşılaşılır.

100 yıl sonra William Heberden, 1768 yılında verdiği bir konferansta Edward Hydes'in bulduğu tabloya angino pectoris adını verdi ve semptomlarını tanımladı.

John Fothergill ve John Hunters'ın yazılarında 18. yüzyıl sonu ile 19. yüzyıl başlarında yaşlılarda koroner bozukluklar teşhis edildiğini kanıtlayan açıklamalar mevcuttur.

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

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

1977 yılında koroner angioplasti yapılmıştır.

Koroner arter hastalığı ile ilgili olarak halen pek çok araştırma yapılmakta olup, yeni koruyucu ve tedavi edici etkinliklerle ilgili çalışmalar sunulmaktadır (35).

2.2.2. Aterosklerozun İnsidansı ve Prevalansı

Her yıl yaklaşık 4 milyon Avrupalı kardiyovasküler hastalıklar ve onun komplikasyonları (Koroner arter hastalıkları, miyokard infarktüsü, stroke, venöz tromboz, vb) yüzünden ölmektedir. Spontan gelişen ölüm olaylarının %46'sından fazlası kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilidir (36).

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

olgu; İtalya 150 olgu; İngiltere 250 olgu/100.000 populasyon/yılda) göre insidansı daha fazladır.

2.2.3. Türkiye’de Ateroskleroza Bağlı Olayların İnsidans ve Prevalansı

Ülkemizde epidemiyolojik verilere göre, Türkiye genelinde erişkinlerde, aterosklerotik kalp hastalığı prevalansı %3.8’dir (erkeklerde %4.1, kadınlarda %3.5’dir). Aterosklerotik kalp hastalığı prevalansı %2 veya altında iken 50-59 yaşlarında %8 sıklığındadır. “Türk Erişkinlerde Kalp Hastalığı Risk Faktörleri” (TEKHARF) çalışmasının sonuçlarına göre aterosklerotik kalp hastalıklarında hipertansiyon 3.2 kat, yüksek kolesterol veya diyabet normallerden 2 kat daha fazla sıklıktadır (37). Hipertansiyon 50 yaş üzeri erkeklerin %7.8’inde, kadınların %14’ünde mevcuttur. Önemli risk faktörlerinden olan diyabetin erkeklerde %2.5’lik prevalansına karşın kadınlarda %4’tür. Bir başka risk faktörü olan obezite, ülkemizde erkeklerde %9 civarında iken, kadınlarda %30 gibi yüksek rakamlara çıkmaktadır. Sigara içimi ise erkeklerde %59-60’lı rakamlara çıkmakta ise de kadınlarda %19 dolayındadır. Ülkemizde kalp-damar hastalıkları nedeniyle ölüm oranı %45 civarında olup tüm vakaları içerisinde ilk sırayı almaktadır. Bu ölümlerin önemli bir bölümü 41-58 yaş grubu arasında olmaktadır (38).

2.3. Tanımlar

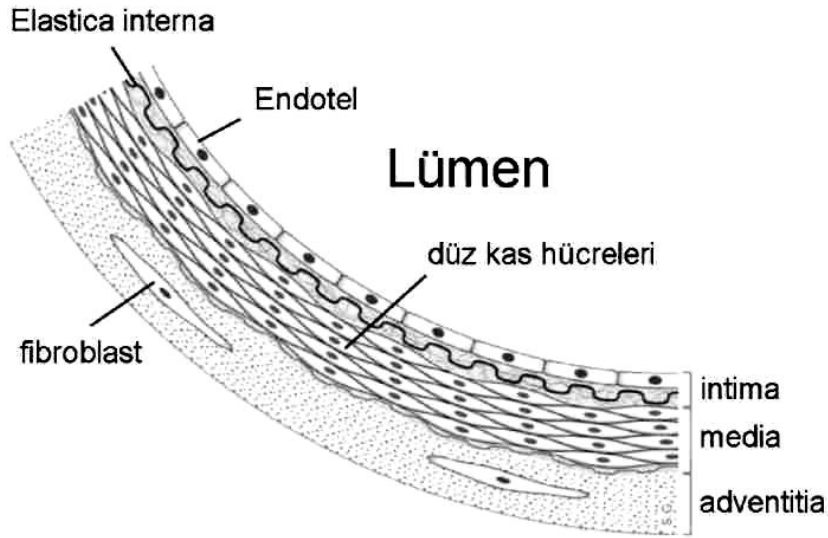
2.3.1. Normal Arter Duvarı

Aterosklerotik sürecin daha kolay anlaşılması için normal duvar damar yapısının bilinmesinde yarar vardır. Normal arter duvarı 3 tabakadan oluşur. En iç, bir başka deyiş ile lümeni çevreleyen tabaka intima’dır. Tek sıra biçiminde dizilmiş endotel hücreleri, bunları destekleyen subendotelyal matriks ve bazal membran intimayı oluşturur. Diğer memelilerden farklı olarak, insan intimasında az sayıda düz kas hücresi de bulunmaktadır. İntima tabakası, medya tabakasından internal elastik membran ile ayrılır. Bu tabakayı oluşturan ve yukarıda sıralanan temel öğeler arter yatağının her kesiminde aynı olsa da, intima kalınlığı yerel farklılıklar gösterir (39). Farklılığın düzeyini, kan akımının damar duvarında oluşturduğu mekanik güçler belirler. Farklılaşmadaki amaç, kan akımını yatağın her bölümünde en iyi düzeyde tutmaktır. İntima kalınlığının en fazla olduğu bölgeler, yukarıda söylenen nedenden de anlaşılacağı gibi, arterlerin dallanarak ayrılma yerleri ve yan dalların ağız kesimleridir. Akımın fiziksel etkisi ile intimada tek tek bulunan düz kas

hücreleri uyarılırlar ve bu bölgeyi kalınlaştıran proteoglikan üretirler. Kalınlaşmış kesimlerde, bebeklik yaşlarından başlayarak az da olsa makrofajlar da belirmeye başlar. Unutulmaması gereken bir nokta, kan akımına uyum nedeniyle oluşan bu kalınlaşmanın, damar lümenini kesinlikle daraltmadığıdır. Ancak dikkat çekici özellik, aterosklerozun daha çok bu bölgelere yerleşiyor olmasıdır. Fakat arter yatağının birçok yerinde var olan intima kalınlaşmalarının hepsinin aterosklerotik lezyonlara dönüşmemesi nedeniyle, bunları, aterosklerozun ön değişiklikleri olarak kabul etmek yerine, ateroskleroza yatkın bölgeler olarak tanımlamak daha doğru olur. Bu yaklaşım ile bakıldığında arter yatağı, yatkınlık derecesine göre üçe ayrılabilir (39).

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

En dış tabaka ise adventisya'dır. Gevşek bir bağ dokusu yapısındaki bu tabaka, boyuna dizilmiş kollajen liflerden, vaza vazorumlardan (büyük damarları besleyen damarlar) ve sinir uçlarından oluşur (39). (Şekil 2-6).



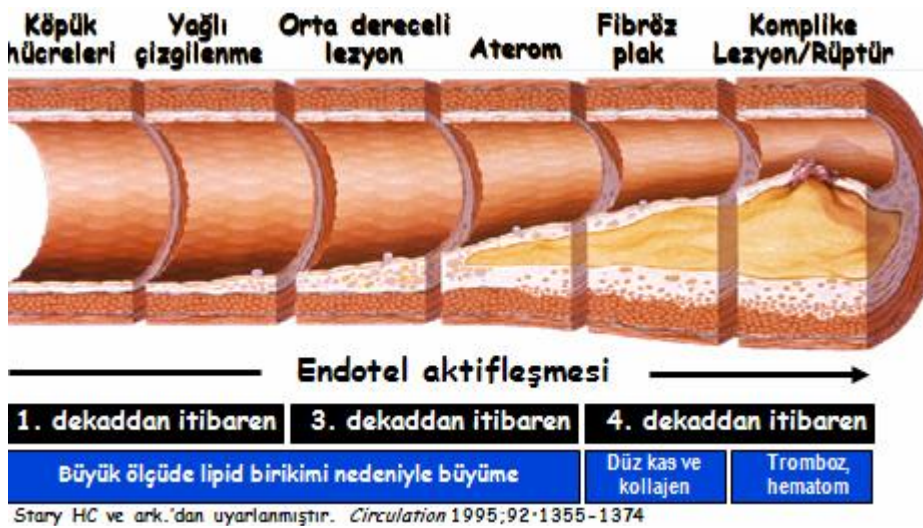
Şekil 2.6. Normal arter duvarının yapısı

2.3.2. Ateroskleroz

Ateroskleroz, kan kolesterol düzeyi yüksekliğine bağlı, damarın iç duvarında plağın ve kan akımını engelleyici darlığın oluşmasıdır. Ateroskleroz, büyük ve orta boyuttaki arterlerin, temel olarak intima tabakasına yerleşen, kesintisiz bir süreçtir.

Genel tanımı bu olmakla birlikte, bütün arter yatağı, aterosklerozdan eşit düzeyde etkilenmez. Kan akımını engelleyecek boyutlara ulaştığında klinik bulgular vermeye başlayan bu sürecin nedeni henüz bilinmemektedir (36).

Günümüzde önceden inanıldığına aksine, damar yatağının, kanı, kalpten dokulara ileten bir boru sisteminden daha çok, biyolojik olarak etkin, çeşitli işlevleri olan bir yapı olduğu bilinmektedir. Yakın zamana kadar kabul edilen bir başka kavram da aterom plağının sadece yağ, kireç ve fibroz dokudan oluştuğuydu. Bu yapının zaman içinde yavaş yavaş büyüdüğü, kritik bir düzeye ulaşınca klinik bozukluklara neden olduğu ve lümeni tam tıkayınca da akut değişiklikler oluşturduğuna inanılırdı. Ancak son yıllarda moleküler biyoloji ve hücre biliminde elde edilen çarpıcı gelişmeler ile durumun böyle olmadığı anlaşıldı. Artık aterom plağının dinamik ve yaşayan bir oluşum olduğu bilinmektedir. Damar duvarının yapısında bulunan hücreler, buraya göç eden kan hücreleri ve bunların salgıladıkları çeşitli maddeler, infeksiyon ajanları ve bütün bu sıralananların birbirleriyle etkileşimi, aterom plağına dinamik bir özellik verir. İşte o nedenledir ki, koroner aterosklerozun gidişinin belirlenmesinde sadece aterom plağının anatomik özelliklerinin, bir başka deyiş ile lümeni ne kadar daralttığının bilinmesi ile yetinilmemekte, plağın ne kadar dinamik olduğunun da öğrenilmesine çalışılmaktadır (35) (Şekil 2-7).



Şekil 2.7. Ateroskleroz Gelişimi. Duyarlı plağın rüptürü (%75) veya erozyonu (%25) sonucu Akut Koroner Sendrom gelişir. Bu plakların; lipid içeriği fazla, düz kas hücresi az, makrofaj içeriği fazla, fibröz kapsülü ince ve doku faktörü içeriği yüksektir. Plaklar aktif (proteolitik enzimlerle) veya pasif olarak (fibröz kapsülün en güçsüz noktasından-omuz bölgesi) yırtılırlar kapsülü ince ve doku faktörü içeriği yüksektir. Plaklar aktif (proteolitik enzimlerle) veya pasif olarak (fibröz kapsülün en güçsüz noktasından-omuz bölgesi) yırtılırlar

2.4. Aterogeneizde Rol Oynayan Hücreler

2.4.1. Endotel Hücresi

Kan damarlarının çeperi pek çok önemli biyolojik fonksiyona sahip olan endotel hücrelerinin ince bir tabakasından oluşmuştur. 10-15 μm genişliğinde, 20-25 μm uzunluğunda olan endotel hücreleri; uzamış nükleusları ile kan damarlarının iç yüzeyinin uzun eksenini boyunca sıralanarak tek katlı bir tabaka oluşturan poligonal hücrelerdir. Bu sayede damar endoteli; nontrombojenik bir iç yüzey oluşturduğu gibi, vücudun değişik dokuları ile alışveriş halinde bulunan kan arasında seçici bir geçirgenlik işlevini de üstlenir. Normal koşullarda endotel yüzeyinin sağlam olması ve kanın sürekli akım halinde bulunması, pıhtılaşma sisteminin ve trombositlerin kendiliğinden aktive olmalarını engeller. Fakat travma ve bazı damar hastalıklarında bu yüzeyin bozulmasıyla birlikte koagülasyon sistemi ve trombositleri aktive eden değişiklikler gözlenmektedir (40).

Damar endotel hücrelerinin dış membranı antitrombotik özelliklerden sorumludur. 50-60 angstrom kalınlığında glikokaliks denilen bu proteoglikan tabaka; heparan sülfat, dermatan sülfat ve heparin içerdiğinden dolayı damar endotelinin kana bakan yüzeyinde kaygan bir zemin oluşturur. Heparan sülfat, doğal bir antikoagülan olan Antitrombin III (AT-III) plazma proteinini üretir. AT-III antikoagülan etkisini fibrinojeni fibrine dönüştürmekten sorumlu enzim olan trombin ve Faktör XIIa, FXIa, FXa, FIXa gibi bazı pıhtılaşma faktörlerini inhibe ederek gösterir (41)

Dış membran ayrıca bazı reseptörleri içerir. Trombomodulin böyle bir membran reseptörüdür ve trombinle etkileşerek kuvvetli bir pıhtılaşma inhibitörü olan protein C'nin aktivasyonunu hızlandırır. Aktif protein C; FV ve FVIII'i inaktive ederek ve plazminojen aktivatörlerinin konsantrasyonunu artırır ve trombozu kontrol altına alır.

Endotel hücrelerinden sentezlenen protein S de aktif protein C'nin antikoagülan aktivitesinde kofaktör olarak görev alır.

Ayrıca aktif protein C, damar endotelini uyarak Doku plazminojen aktivatörünün (t-PA) salgılanmasını sağlar. T-PA, plazminojenin plazmine dönüşmesinde kritik bir maddedir. Plazmin ise fibrinin parçalanmasından sorumlu olan proteolitik bir enzimdir. Plazminojenin plazmine dönüşümünde gerekli olan diğer bir

aktivatör ise, endotel hücreleri ve böbrek hücrelerinde sentezlenen ürokinazdır. T-PA'nın inaktivasyonu ise, yine endotel hücrelerinde sentezlenen ve ürokinazı da nötralize eden plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) tarafından gerçekleştirilir (42,43)

Damar endotel hücreleri, kuvvetli bir trombosit antiagreganı ve vazodilatör olan prostosiklini (PGI₂) de sentezler ve salgırlar. Prostasiklin, trombosit aktivasyonunu inhibe eder ve kan damarının çapını arttırarak vazodilasyonu uyarır. Bunu, trombosit zarında bulunan reseptörlere bağlanarak adenilat siklazı uyarıp trombosit cAMP düzeylerini yükselterek yaparlar. Bu yükselme trombositlerin agregasyonunu, şekil değişikliğini, kollajen ve von Willebrand faktörüne bağlanmasını yani trombus oluşumunu engelleyici bir rol üstlenir. Damar endotel hücreleri, faktör VIII'i (FVIII) de kısmen sentezler. Dolaşan FVIII molekülü; bimoleküler bir kompleks yapı olup, prokoagülan özelliği vardır ve von Willebrand faktör (vWF) adını alır. Aktif trombositlerin membranı üzerinde özgün bir reseptörle etkileşerek, bunların subendotel bileşenlerine ve kollajene adezyonunu kolaylaştıran von Willebrand faktörü hemostazda kritik rol oynar (44).

Endotel hücreleri ayrıca, hemostazda önemli diğer maddeleri de üretirler. Bunlar arasında, travma sonrası hasarlı subendotel ile trombositlerin etkileşiminde önemli olan kollajen tip IV gibi kollajen molekülleri sayılabilir.

Endotelde meydana gelecek bir hasar sonucu; nontrombojenik yüzeyin ortadan kalkmasıyla birlikte ortaya çıkan subendoteldeki kollajen lifleri, trombosit adezyonuna ve agregasyonuna neden olur.

Aktive olmuş trombositlerden salınan ADP ve tromboksan, çevredeki diğer trombositleri de aktive ederek trombosit tıkaçının büyümesini sağlar. Ayrıca subendoteldeki kollajen liflerinin aktive ettiği faktör XII, trombosit yüzeyinde aktive olan faktör XI ve haraplanmış endotel hücrelerinden salınan bir doku faktörü; koagülasyon mekanizmasını başlatır. Fibronektin gibi nonkollajen tipte proteinler de hücre aglutinasyonu, agregasyonu ve adezyonunda rol oynarlar.

2.4.2. Trombositler

Trombositler hemostaz, tromboz ve koagulasyonda önemli rol oynar. Bu küçük hücreler sünger şeklinde tanımlanabilir ve hemorajiyi önlemek için kompleks biokimyasal ve moleküler aktiviteleri olduğu bilinmektedir (45).

İlk kez 1860'da Zimmerman, 1865'de Manschultz tarafından tanımlanmış ve kanın pıhtılaşmasındaki rolü 1878'de Zimmerman ve Haryan tarafından ortaya konmuştur. İlk önceleri cansız hücre parçaları olarak tanınmasına rağmen, aktif hücreler olduğu ve megakaryositler tarafından yapıldığı ilk kez 1882'de Bizzazereo tarafından tanımlanmıştır (46).

Trombositler ışığı kıran, küçük, çekirdeksiz, ovoid ya da yuvarlak hücrelerdir. Soluk gri-mavi sitoplazmaları homojen dağılmış mor-kırmızı granüller içerir. Trombosit agregasyonundan sonra bu granüller hücrenin ortasında konsantre olurlar. Hücre zarının altında şekli sağlayan mikrotubulus şeridi vardır.

Dolaşan trombositlerin hacimleri heterojendir (47). Dolaşan trombositlerin hacmi $7.06 \pm 4.85 \mu\text{m}^3$ (femtolitire), çapı $3.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (ortalama $\pm$ SD) ve kalınlığı $0.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$ dir (48). Anormal küçük ve büyük trombositler sadece bazı hastalık durumlarında olmasına rağmen trombosit hacmi kişiden kişiye değişir. Kandaki normal konsantrasyonları 150.000–450.000'dir (49).

Elektron mikroskobu ile incelendiğinde dolaşan trombositler düzgün konturlu yassı diskler şeklinde görünür. Trombositler çekirdeksiz olmasına rağmen, elektron mikroskopisi normal hemostazı sürdürmede önemli olan organelleri içeren sitoplazmayı gösterir (50).

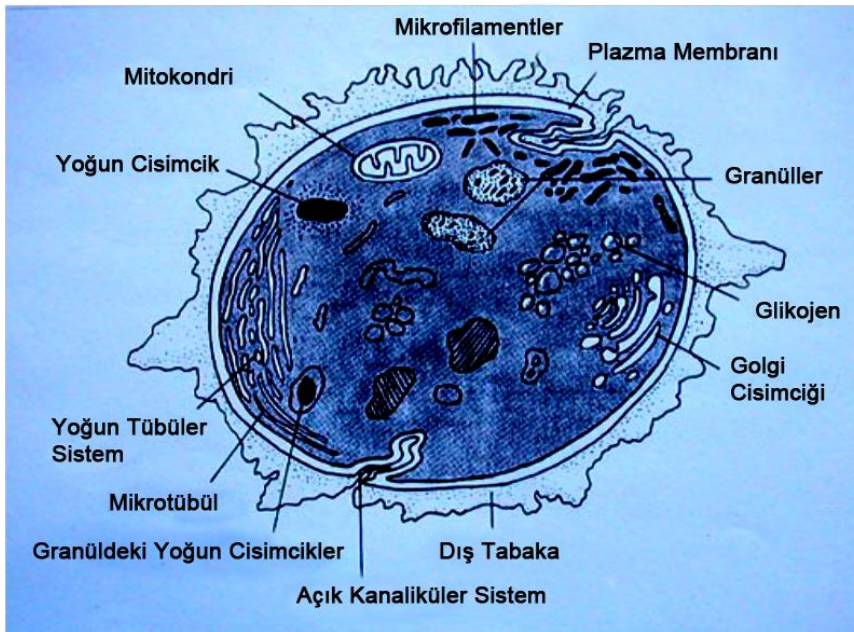
Elektron mikroskobik olarak 3 bölgeye ayrılırlar:

1. Periferik bölge
2. Sol jel bölgesi
3. Organel bölgesi

1.Periferik Bölge : Trombosit membranı yaklaşık 7.5 nm kalınlığında ve 3 katlı bir yapıya sahiptir. Membranın dış yüzü kabarık ve düzensiz bir yüzey örtüsü olan glikokaliks ile kaplıdır. Bu katman çeşitli protein, glikoprotein, glikolipit ve mukopolisakkaritten oluşmuştur. Glikokaliks protein ve lipidlerin üzerindeki sialik asit kalıntılarından dolayı negatif bir yüzey elektriğine sahiptir.

Bu negatif elektrik dolaşan trombositlerin birbirine bağlanmasını azaltır (51). Trombosit zarı da diğer hücre zarları gibi ufak poluslar ve reseptörler içerir. Madde alışverişi genellikle fagositoz yolu ile sağlanır. Zarın hemen altında, derindeki yapılarla zarı birbirine tutturarak hücre biçimini sağlayan ince mikrotubuluslar bulunur (52).

2.Sol jel bölgesi: Elektron mikroskopik incelemelerle yapısı ve görevi daha iyi anlaşılan mikrofilamentlerden oluşmuşlardır. Bu tubuler sistem aktomyozin içerir ve belli koşullarda reversibl depolimerizasyonla mikrofilamentlere ayrılır. Mikrotubulus sisteminin trombosit fagositozuna katıldığı belirtilir. Ayrıca trombositlerin depolama ve salgılama fonksiyonunda da rol aldığı düşünülmektedir (53).



Şekil 2.8. Trombositin İç Yapısı (Greer J.P 2008)

3.Organel Bölgesi: Trombositlerin gerçek anlamda çekirdeği yoktur.

Ancak genellikle hücrenin ortasında toplanan granüller çekirdek izlenimi verebilir. Bu bölgeye organel ya da granülomer denir (53). Mitokondri, golgi cihazı, granüller, glikojen tanecikleri ve vakuollerden oluşur. Trombositler dört ayrı granül içerirler. Bunlar alfa granüller, yoğun cisimler, lizozomlar ve mikroperoksizomlardır. Granüller içinde en sık rastlanan alfa granüllerdir. Bu oval vesiküler yapıların çapları 300–500 nm'dir. Bunlar trombositte spesifik Trombosit Faktör-4, Betatromboglobulin, Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, Trombospondin de dahil olmak üzere 20 nin üzerinde protein içerir. Alfa granüllerin membranında trombosit zarında olduğu gibi glikoprotein IIb ve IIIa da bulunur.

Yoğun cisimler yaklaşık 200-300 nm çapında, boğa gözü görüntüsünde karanlık bir sahadır. Yoğun cisimlerin içeriği adenin nükleotidler (ATP, ADP), Ppi, kalsiyum, magnezyum ve serotoninidir (54). Ek olarak GTP ve GDP de içerirler (55). Agregasyon sırasında buradan salınan ADP ve serotonin sekonder agregasyonu sağlayan önemli mediatörlerdir (56,57).

Lizozomlar 175-200 nm çapında küçük vesiküllerdir. Lizozomlar asit hidrolaz enzimi içeren tek trombosit granülleridir. Bunun dışında Betaheksoaminidaz, Beta gliserofosfataz içerirler (58,59). Lizozomal membran glikoprotein (LIMP-CD63) ve lizozomla ilişkili membran protein 1 ve 2 (LAMP1 ve LAMP 2) aktivasyon sonrasında plazma membranına eksprese olur (60,61,62). Hemostatik cevaptan çok trombüs lizisinde rolü olduğu düşünülmektedir (63).

Mikroperoksizomlar trombositlerde daha az bulunan küçük granüllerdir.

Diğer trombosit organelleri küçük mitokondri, glikojen granülleri, yağ doku inklüzyonları, ferritin granüllerinden (siderozomlar) ibarettir. Trombosit ribozomlarını ise mikroskopik olarak saptamak zordur (64-65). Bir zamanlar bir artefakt olabileceği düşünülmüştür. Trombositler hareketsiz partiküllerdir ve 90'dan fazla enzim içerirler. Bu hücreler sentez kapasitesine, büzüşme ve stimüle edildiğinde biyolojik olarak aktif maddeler salgılama yeteneğine sahip, metabolik donanımları olan hücrelerdir.

Trombositler, kas gibi metabolik olarak büyük miktarda enerjiyi hızla harcamaya adapte olmuştur. Trombosit için başlıca enerji kaynağı glikozdur. Glikoz plazmadan hızla alınır.

Tablo 2.4. Trombosit alfa Granül Proteinleri

Protein	Lokalizasyon
Albumin	Granül
Beta Amiloid Prekürsör Protein	Granül
Beta tromboglobulin	Granül-nucleoid
Clusterin	Granül
Faktör V	Granül
Fibrinojen	Granül-Matrix
Fibronectin	Granül
IgG	Granül
Multimerin	Granül-Matrix
Platelet-derived growth faktör	Granül
Platelet faktör 4	Granül-nucleoid
Trombospondin	Granül
von Willebrand Faktör	Granül-tubuler
Tpa -like plasminojen aktivatör	Granül
Transforming growth Faktör -Beta1	Granül
Vitronectin	Granül
GMP-33	Membran
GP Ib,IX	Membran
GP Iib/IIIa	Membran
GP IV (CD36)	Membran
GP V	Membran
P-selectin	Membran
Osteonectin	Membran
CD9	Membran
PECAM -1	Membran
Rap Ib	Membran

Trombositler megakaryositlerden meydana gelirler. Megakaryositlerin en fazla bulunduğu yer kemik iliğidir. Bunun yanında akciğer ve dalakta da yer alırlar. Megakaryosit trombosit haline geldikten sonra çekirdeği makrofajlar tarafından fagositoz yolu ile ortadan kaldırılır. Trombositlerin %85-90'ı kemik iliğinde, %10-15 kadarı akciğerlerde yapılır (66).

Periferik kana geçen trombositlerin dolaşımdaki ömrü 8-12 gün kadardır.

Sonunda RES tarafından karaciğer ve dalakta yıkılırlar. Vücutta ihtiyaç olduğu zaman megakaryosit serisi uyarılarak üretilirler (67). Trombositlerin 1/3'ü dalakta depolanır. Trombositleri yapım için uyarılmasından sonra yapılma süresi 3-7 gün kadardır. 8-12 günlük bir ömrü olan trombositin döngüsü 12-16 gün olarak kabul edilir. Normal koşullarda periferde trombosit sayısı ve trombosit kitlesi sabit tutulur (68,69).

Trombosit biokimyasında total nükleotidin 2/3'ü ADP granüllerde aktif halde depolanır. Agregasyon sırasında bu granüllerden sağlanan ADP primer agregasyonu sağlar.

Trombositleri aktive eden maddeler şunlardır:

1.Primer agregasyon ajanları

- ✓ ADP
- ✓ Epinefrin ve norepinefrin
- ✓ Serotonin
- ✓ Serbest oksijen ve hidroksil radikalleri
- ✓ Trombin
- ✓ Vasopressin

2.Sekonder agregasyon ajanları

- ✓ Enfeksiyöz ajanlar ve ürünleri (Antijen–antikor kompleksleri, bakteriler, virüsler, endotoksin, tüberkülin)
- ✓ Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF)
- ✓ Proteinler (CRP, DNA, Ferritin, İmmünglobulinler,)
- ✓ Enzimler (Kompleman başlıca bileşenleri, papain, plazmin, fosfolipaz)

Diğerleri (Ach, kollajen, miyofibriller, yağ asitleri, iyonoforlar, amniyonik sıvı, metilen mavisi, nötrofil miyeloperoksidazı , ristosetin, u.v. ışınları, unkonjuge bilirubin, ürik asit kristalleridir.

2.4.2.1. Hemostaz, Aterogenez ve Tromboz Oluşumu

Hemostaz

Hemostaz hasara uğramış damarda meydana gelen kanamanın durdurulması için başlatılan fizyolojik olaylar sürecidir. Bir damarın hasara uğraması sonucu endotelial bütünlük bozulur ve endotel membranı fosfolipidlerinden araziidonik asit yoluyla tromboxan A₂, prostoglandin, prostosiklin ve doku plazminojen aktivatörü salınır. Subendotelial dokudan da von Willebrand faktörü, kollagen, doku faktörü ve doku plazminojen aktivatörü salınır. Tüm bu mediatörler etkisiyle kanamayı durdurmak için vasokonstriksiyon, trombosit kümelenmesi, fibrin oluşumu ile pıhtı tıkaçı oluşması sağlanır.

Bir damarın hasara uğraması sonucu damarsal faktörler, plazma faktörleri ve trombositlerin oluşturduğu bu süreç sonucunda trombüs oluşumu ve daha sonra fibrin ve kan elemanlarının devreye girmesiyle sağlam pıhtı tıkaçı oluşumu sağlanmaktadır. Bu kompleks fizyolojik olaylar esnasında trombüsü sınırlı tutmak, normal kan dolaşımının sağlıklı devamı için aşırı pıhtı oluşumunu engellemek ve pıhtıyı lezyon bölgesiyle sınırlı tutmak için karşıt faktörler de devreye girer. Bu pıhtı oluşumu ve fizyolojik fibrinolitik mekanizmaların karşılıklı dengesi ile kanın damar dışına çıkmadan normal kan dolaşımının devamını sağlayan bu mekanizmaların tümüne hemostaz denir. Bu dengenin bozulmasıyla tromboza eğilim ve ya hemorajik diatez oluşur. Tromboza eğilim sonucu yaygın damar içi pıhtılaşma (DIC), iskemik kalp hastalıkları, inmeler en önemli komplikasyonlardır.

Özellikle aterosklerotik zeminlerde daha büyük damar lezyonlarına yol açtıkları bilinir.

Aterogenez

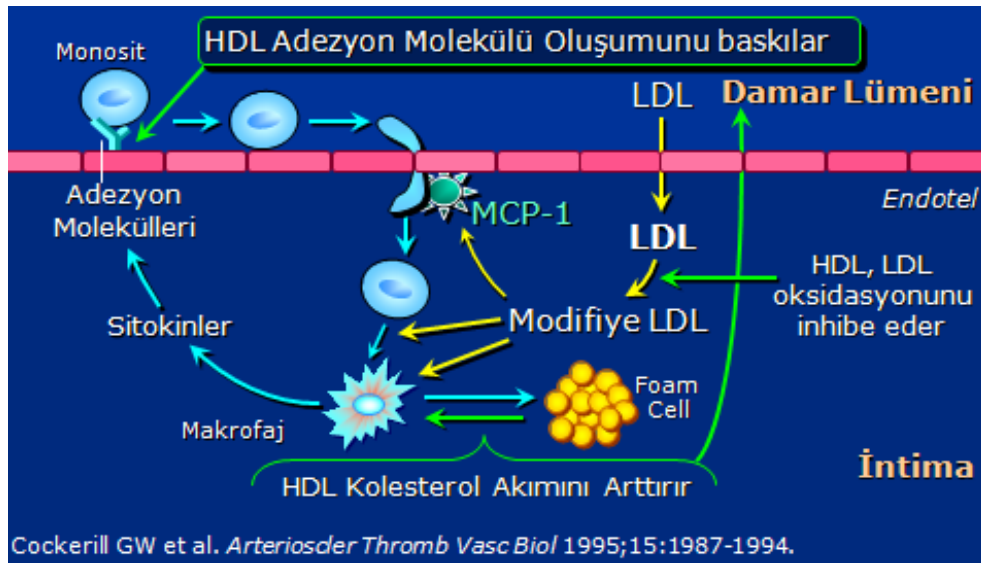
Tromboz olayının ilk basamağı aterom plağı oluşumudur. Endotel hücreleri kan akımını ve damar tonusunu düzenleme görevi görür. Hipertansiyon ve artmış mekanik ‘shear stres’ (kalbin her sistolde kanı damarlara göndermesi sonucu damar endotelial yüzeyinde oluşturduğu mekanik etki), oksidize LDL, artmış homosistein, sigara içimi ile ortaya çıkan serbest radikaller, enfeksiyon (klamidya, sitomegalovirüs, herpes simpleks virüs v.b.), hiperglisemi gibi bir çok faktör aterosklerozun başlamasına ve ilerlemesine neden olacak endotel zedelenmesine yol açar. Ortaya çıkan zedelenme ile endotelin geçirgenliği, lökosit ve trombositlere karşı adhesivitesi artar. Artan

geçirgenlik ile LDL girişi çoğalır ve intima altında birikmeye başlar. Biriken LDL molekülleri okside olarak inflamatuvar reaksiyonu başlatır. Dolaşımdan intima altına geçen monositler makrofaj haline dönüşür ve okside hale gelen LDL'yi fagosit ederek köpük hücrelerini oluşturur (Şekil 2-9). İnflamatuvar hücrelerden ve trombositlerden salınan vasoaktif maddeler, sitokin ve büyüme faktörleri ile endotel pıhtılaşmaya eğilimli hale gelir ve düz kas hücrelerinde artış ile arter duvarı kalınlaşır. Tüm bu değişimler sonuçta ateromatöz lezyon oluşumuna neden olur.

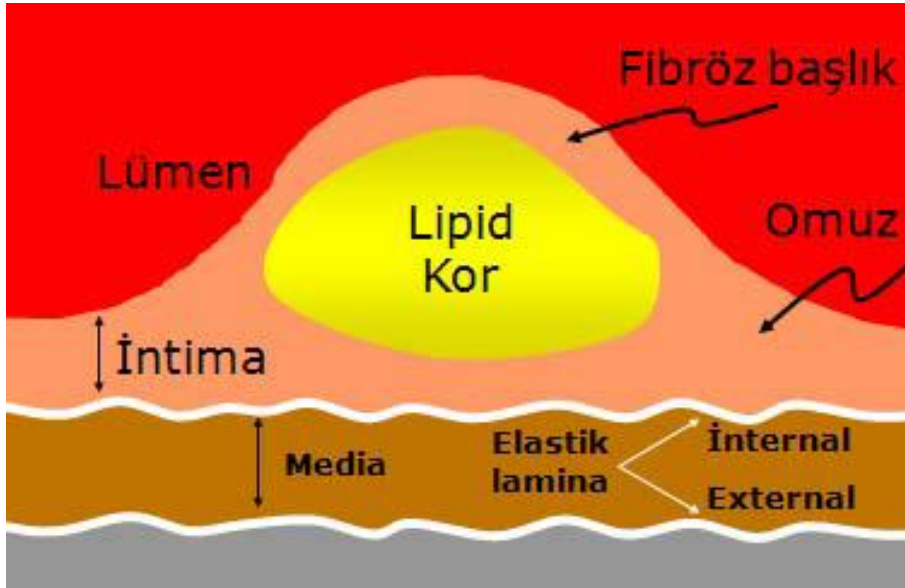
Klasik ateromda köpük hücrelerinden oluşan ana bir yapı ve etrafında kolesterol kristallerinin üzerini örten fibröz bir örtü vardır. Bu örtü ekstrasellüler matriks, düz kas hücreleri ve salgıladıkları kollajen ve elastinden oluşur .

İçerideki lipid çekirdekte ise inflamatuvar hücreler bulunmaktadır (Şekil 2-10). Bu tip lezyonlar yıllarca sessiz kalabilir. Ancak plağın yol açtığı düzensiz yüzeyde kan akımının oluşturduğu girdap ve endotelin pro-trombotik özellik kazanması trombüs oluşumunu tetikleyebilir. Bazı plakların üzerindeki fibröz örtü gevşektir ve yağ çekirdeğin kitlesi fazladır. Bunlar dengesiz plaklardır. Lipid çekirdekte yer alan makrofajların içerdiği fibröz örtünün yıkılmasına yol açan enzimler ile fibröz örtü giderek incelik ve yırtılır. Plağın yırtılması ve lipid yapının arter lümeni ve kan elemanları ile teması sonucunda trombotik cevap ortaya çıkar.

Hızlı bir şekilde lümende trombüs oluşur. Aterotrombotik plaktan kopan emboli ise kolesterol birikimi, trombosit agregatları ve fibrinin bir kombinasyonudur (70).



Şekil 2.9. Adezyon moleküllerinin inhibisyonu



Şekil 2.10. Lipid kor oluşumu

Libby P ve ark. Current concepts in cardiovascular pathology. Am J Med 1998; 104(2A):145-185

Tromboz

Tromboz, kanı oluşturan bazı elemanların damar yatağı içinde pıhtılaşarak kitle oluşturmasıdır. Kan akımındaki yavaşlama, damar hasarı ve kanın bileşimindeki değişiklikler (Virchow Triadı 1856) tromboz patogeneğinde önemli rol oynar.

Arteriyel tromboz arteroskleroz gibi endotelial hasar meydana getiren hastalıklarla birlikte görülür. Venöz tromboz ise venlerin erozyonu ve ya travması sonucu olabildiği gibi ya kanın pıhtılaşma yeteneğinin artması ya da kanın fibrinolitik yeteneğinin azalması sonucu meydana gelir (71, 72). Arteriyel trombozda tromboz, hızlı kan akımının devam ettiği bir damarda olmaktadır. Pıhtı, damar duvarına sıkıca yapışmış bir trombosit kitlesi ve az miktarda fibrin, eritrosit ve lökosit ihtiva eder. Bu pıhtıya *beyaz pıhtı* denir. Venöz tromboz ise kan akımının nispeten yavaş olduğu damarlarda oluşur. Pıhtı büyük miktarda fibrin ve eritrositten oluşur. Bu pıhtıya da *kırmızı pıhtı* denir. Venöz trombozda stazın çok önemli bir rolü olup, staz muhtemelen aktive edilmiş plazma faktörlerinin dolaşımdan alınmasını geciktirmektedir (73).

Bir damar travması durumunda önce hasara karşı ani yanıt olarak vazokonstriksiyon gelişir ve hasara uğrayan endotel membranından tromboksan A₂, prostoglandinler, prostasiklin, Tpa gibi mediatörler açığa çıkar. Daha sonraki basamakta subendotelial dokudan von Willebrand Faktör, doku faktörü, kollajen ve doku plazminojen aktivatörü (Tpa) açığa çıkar. Bu esnada damar dışına çıkan kanın etkisi ile

ki bu olaya ekstrevasyon denir, normal kan akımının bozulması ve bu mediatörlerin kemotaktik etkisi ile şekilli kan elemanları ve trombositler damar cidarına gelirler (74,75).

Damar endotelindeki hasarla birlikte, hasar bölgesindeki trombosit aktivasyonu bir trombosit tıkaçı meydana getirir ve koagülasyon aktivasyonu için bir platform oluşturur (76). Bütün bu süreç kanamayı önlemek içindir ve damar endotelinin hasarından sonra, dolaşan trombositlerin damar subendotelinin komponentleri ile karşılaşması ile başlar. Bu olaylar trombosit adezyonu, salınım ve agregasyonuna ihtiyaç duyar ve pıhtı retraksiyonu ile devam eder.

Trombosit agregasyonu ve adhezyonu yüzey özelliklerine, matriks bileşimine ve kan akımının oluşturduğu shear strese bağlıdır. Bu yüzden, aterom ya da bazı biyomateriyaller gibi yüzey değişiklikleri, hem direkt olarak hem de yüzeyde kitrombin aracılı süreçler aracılığıyla trombositleri aktive ederler. Bundan dolayı, karotid arter duvarındaki aterosklerotik değişiklikler trombüs formasyonu ile, trombosit aktivasyonuna neden olur. Bazı patolojik durumlar altında, trombosit aktivasyonu, görünür bir vasküler hasar olmasa bile trombüs formasyonuna ve damar oklüzyonuna neden olur. Dissemine koagülopatinin trombotik olayları ya da trombositopenik purpuranın CNS’de mikrovasküler oklüzyonlar yapması bunlara örnek teşkil eder.

Trombosit Adezyonu

Trombosit adezyonu trombositin farklı yüzeylere tutunmasıdır.

Trombositler, kollajen ve non kollajen liflere yapışarak trombosit adezyonunu başlatır ve aktif hale geçerler. Trombositler non kollajen liflere Ca^{+2} , von Willebrand Faktör ve diğer adeziv proteinler aracılığı ile yapışırken, kollajene direkt yapışır ve aktif hale gelirler. Yüzey reseptörü integrin $[\alpha]2[\beta]1$, trombositlerin endotel altındaki kollajene bağlanmasına aracılık eder. Bu bağlanma trombosit aktivasyonunu başlatır ve aktin polimerizasyon ve reorganizasyonuna, psödopodi formasyonuna ve nihayetinde hücre salınımına neden olan Ca^{+2} aracılı hücre içi olayları tetikler. Trombositlerin adezyonu ve salınımı sırasında, sitoplazmik organeller–alfa granüller ve delta yoğun granüller hücrenin merkezinde yoğunlaşırlar. Aktivasyonla birlikte, alfa ve delta granüller membran sınırında birleşirler ve içeriklerini plazmaya salarlar. Granüler içerikler (ADP, betatromboglobulin, trombosit faktör 4, serotonin, vWF, fibrinojen) trombosit agregasyonuna neden olan eksitatuvar reaksiyon kasladını stimüle ederler.

Özellikle kollajen ile teması sonucu trombositler aktive olur, normal diskoid yapısı küçük protrüzyon ve filopodlarla iğneli yuvarlak haline dönüşür. Bu filopodlar ince bir membranla çevrili aktin demetleridir, agregasyon ve adezyonu hızlandırabildiği ve agregatların stabilizasyonunda rol aldığı bilinmektedir. Bu değişikliklerle beraber ve ya hemen ardından salınım reaksiyonu meydana gelir (77).

Salınım reaksiyonu (Sekresyon) sırasında su da kaybeden trombositler daha da ufalır ve aktomyozin sisteminin kas aktivitesi gibi kasılmasıyla ufak ve daha stabil tıkaç oluşumunu sağlar. Ayrıca fibronektin etkisiyle fibrin ve kollajene çapraz bağlarla bağlanarak tromboz stabilizasyonu sağlanır. Fibronektin endotel tarafından sentezlenerek trombositlerde depolanan bir proteindir. Adhezyonda rol oynamasının yanısıra asıl görevi trombositin fibrin ve kollajen ile çapraz bağlarla sıkıca bağlanmasını sağlamasıdır. Böylece oluşan trombosit tıkaçı kanın dışarıya sızmasını engelleyecek derecede stabil hal kazanır. Bu sıkılaşma sırasında kanın şekilli elemanlarının da devreye girmesi sonucu trombus albus denen sabit tıkaç meydana gelir.

Trombosit adezyonunun içerdiği spesifik reseptör ve ligandların aktiviteleri vasküler duvar matriksi ve kan akım hızı tarafından belirlenir. Orta ve yüksek kan akımının olduğu yerlerdeki vasküler hasarın olduğu yerlerde kollajene maruziyet, trombositlerin glikoprotein reseptörleri GPVI ve GP Ib-VIX ile bunların vWF ile bağlanmasına yol açarlar. Sonuç olarak da trombosit ve kollajen arasında indirekt bir ilişki başlatılmış olur. Düşük kan akım hızı olan yerlerde trombosit ile kollajen GPIV ve integrin $[\alpha]2[\beta]1$ reseptörleri aracılığı ile direkt bağlanırlar ve ya vWF ile GP Ib-VIX aracılığı ile kollajene indirekt bağlanırlar. Aterom oluşan bölgelerdeki fibrine trombositlerin bağlanması GP IIb-IIIa (integrin $[\alpha]IIb, [\beta]3$) reseptörü aracılığı ile sağlanır.

Trombosit yüzeyindeki reseptörlerden glikoprotein Ib reseptörlerinin adezyonda, glikoprotein IIb/IIIa reseptörlerinin agregasyonda rol oynadığı tespit edilmiştir.

Trombosit Agregasyonu

Trombosit agregasyonu aktive trombositlerin birbirine tutunmasıdır.

Trombosit agregasyonu trombüs oluşumunun ana basamağıdır. Aktive olan trombosit reseptörlerinin, dolaşan ve aynı zamanda komşu trombositler arasında çapraz bağlantılar kurmak için trombositlerden salınan fibrinojene bağlanması suretiyle

agregasyon meydana gelir. Trombosit–trombosit etkileşmesinin bu son basamağına, trombosit integrin [alfa]2b,[beta]3 ün fibrinojene bağlanması aracılık eder (78).

Primer agregan ajanlar yanında aktive trombositlerden salınan ADP' nin salınımı da arttırması ve prostoglandin metabolizmasını hızlandırmasıyla sekonder agregasyon adı da verilen agregasyonun artışı izlenir (79,80).

Agregasyon integrin [alfa]IIb,[beta]3 reseptörlerinin fibrinojene direk bağlanması ile ortaya çıkar. Bu bağlanmada pek çok farklı molekül rol oynasa da, bunlardan en iyi anlaşılan ve en önemli rolü olan trombindir. Trombin koagulasyon kaskadının aktivasyonu sonucu dolaşımdaki protrombinden kaynaklanır. Trombin hem trombosit yüzeyindeki reseptörleri uyarak agregasyonu arttırırken aynı zamanda endotelden trombüs serbest büyüme faktörünün salgılanmasını, trombomodulin aracılığı ile protein C ve S sistemini aktive ederek faktör Va ve VIIIa'yı aktif hale getirdiği bilinmektedir (81,82).

Böylece başlangıçta doku faktörünün subendotelyal dokudan salınmasıyla başlayan plazma faktörleri aktifleşmesi bu zincir reaksiyonla daha da aktifleşerek koagulasyonun artışı da sağlanır Sırasıyla trombin trombosit agregasyonunu başlatır, pıhtıyı stabilize eden fibrinojenin fibrine dönüşümün katalizler, endotel hücre p-selektin ekspresyonunu uyarır ve endotel hücre geçirgenliğini artırır.

Trombin trombositte iki reseptörle bağlanır, orta afiniteli ve yüksek afiniteli reseptör (GP Ib-V-IX , vWF reseptörü). Trombosit aktivasyonu sonrasında, delta granüllerden ADP salınır, bu da trombosit purinoseptör P2Y ye bağlanarak trombosit agregasyonunu güçlendirir. Sonuçta ek ADP salınımına neden olur ve trombosit agregasyonunu hızlandırır.

Kollajen, içeriğindeki peptidler vasıtasıyla irreversible olarak trombosit agregasyonunu indükler. Kollajenin, alfa granüllerden ADP salınımını indükleyerek, ayrıca prostoglandin-tromboksan sistemini aktive ederek, hem de yüksek konsantrasyonda zayıf bir primer agregan ajan rolü üstlenerek trombosit agregasyonunu aktive ettiği sanılmaktadır (83).

Fibrinojen, hem aterosklerotik kardiovasküler hastalıklarda, hem de iskemik serebrovasküler hastalıklarda bağımsız risk faktörlerinden biridir.

Trombosit membran reseptörleri aracılığı ile trombosit agregasyonunda çok önemli rol oynar. Fibrinojene karşı trombosit membran reseptörleri glikoprotein IIb/IIIa

olarak adlandırılır. Bu reseptör fibrinojen, fibronektin ve von Willebrand faktörü bağlayabilir. Fibrinojen bağlanması trombosit agregasyonunu hızlandırır (84).

Trombositlerdeki araşidonik asit metabolizmasının primer ürünü tromboxan A2 dir. Tromboxan A2 oldukça güçlü bir trombosit agregatı ve vasokonstriktörüdür. Damar duvarında siklooksijenaz yolunun primer ürünü, güçlü bir trombosit agregasyon inhibitörü ve vasodilatör olan prostosiklidir (85). Prostaglandin metabolizması trombosit yüzeyindeki fosfolipidlerden trombin oluşumuyla başlar.

Trombositler ayrıca lökositlerle etkileşirler ve agregasyona katkıda bulunurlar.

Trombosit membranında reseptör-aktivatör kompleksinin formasyonu tubuler sistemden kalsiyum çıkışıyla sonuçlanan metabolik süreçlere yol açar.

Trombosit intrasellüler kalsiyum salınımının diğer önemli bir belirteci c-AMP'dir. Dipridamol'un, antitrombosit aktivitelerinin bir mekanizması olarak trombosit c-AMP seviyelerini yükselttiği ileri sürülmüştür (86).

Salınım reaksiyonu (Sekresyon) sonucu trombositlerdeki alfa granüller ve yoğun cisimlerden ADP, serotonin, PF4, BTG, PDGF, vWF salınır. ADP fizyolojik olarak agregasyonun santral faktörüdür. Trombositlerin alfa granüllerden salgısal reaksiyonu sırasında atılır, hasarlı dokulardan da köken alabileceği düşünülmektedir. ADP salgısal reaksiyonu sonucunda serbestlenince hem alfa granül üzerindeki GP IIb/IIIa reseptörlerini de uyarak salgısalı arttırdığı, hem de trombosit membranındaki GP IIb/IIIa reseptörlerini de uyarak agregasyonu artırdığı gözlenmiştir (83,87).

Protein-C, önemli bir Vitamin-K bağımlı koagülasyon inhibitörüdür.

Trombin, protein-C' yi aktive protein-C'ye dönüştürür. Protein-C sadece fibrin formasyonunu inhibe etmekle kalmaz, yeni oluşmuş fibrin degradasyonunu da hızlandırır. Protein-S, protein-C için plazma proteindir ve protein-C tarafından F Va'nın inaktivasyonunu artırır. Protein-S de vitamin-K bağımlı bir plazma proteindir. Protein-S fosfolipid yüzeylerde, protein-C ile bir kompleks oluşturur.

Antitrombin-III, en önemli plazma serin proteaz inhibitörüdür. Trombin inhibitör aktivitesinin %85'inden fazlasından sorumludur. Antitrombin-III eksikliği olan kişiler trombotik olaylara predispozitedir. Heparinin antitrombotik aktivitesi için antitrombin-III şarttır. Heparin antitrombin-III'ün trombini nötralize etme hızını artırarak hareket eder (88). Trombin, ADP salgısalını, tromboksan A2 formasyonundan bağımsız bir mekanizma aracılığı ile yapan güçlü bir trombosit aktivatörüdür. Fibrin

pıhtının formasyonu da trombosit agregatı stabilize edebilir. Trombin, F XIII'ü, fibrin pıhtısını stabilize eden ve trombosit agregasyonunu da artıran F XIIIa'ya çevirir.

Bu mekanizmalar esnasında doku plazminojen aktivatörü ve plazminojen aktivatör inhibitörleri endotelden salınarak antiplazmin salınımını da uyarırlar.

Bunların etkisiyle fibrinolitik mekanizmalar da aynı anda devreye girer ve trombüs oluşumunu ve lokalizasyonunu sınırlar.

Patolojik trombüs gelişimini azaltmak ya da engellemek için geliştirilmiş terapötik ajanlar, trombosit adezyon ve agregasyonunun içerdiği ligandların ya da reseptörlerin inhibitörleridir. Bu reseptörlerden bazıları ve ligandları tabloda gösterilmiştir. Adezyon ya da agregasyona aracılık eden reseptörleri bloke etmek trombüs formasyonunu engelleyebilir. Trombosit aktivasyonuna müdahale etmek, iskemik olayları önlemek için yaygın olarak kullanılan stratejidir. Aspirin irreversibl olarak trombosit siklooksijenazı inhibe eder ve güçlü bir trombosit aktivasyon stimulatörü olan tromboxan A₂ formasyonunu azaltır. Dipyridamol trombosit fosfodiesteraz aktivitesini inhibe ederek trombosit aktivasyonunu inhibe eder ve Ca²⁺ aracılı trombosit aktivasyonunu bloke eden artmış c-AMP ve c-GMP düzeyleri ile sonuçlanır. Bu aynı zamanda vasküler prostosiklini stimüle eder ve vasküler endotelden ve dolaşan kan hücreleri aracılığı ile vasodilatör adenozin alınımını bloke eder.

Eksituar reseptörler de trombosit fonksiyonlarının inhibisyonu için potansiyel hedeflerdir. Tiklopidin ve klopidoğrel ADP reseptör P₂Y₁'i inhibe eder, ADP'nin indüklediği agregasyonu bloke eder. Primat modellerde, trombosit agregasyonunu ve koagülasyon aktivasyonunu bloke etmek için tiklopidin ve heparin ile tedavi edilen hayvanlar, tedavi edilmeyen kontrollerle karşılaştırıldığında, iskemik basal ganglionlardaki mikrovasküler oklüzyonların total miktarında ve trombosit birikiminde anlamlı bir azalma göstermişlerdir (89).

Tablo 2.5. Trombosit Reseptör ve Ligandları

Reseptör	Ligand
İntegrin Reseptörleri	
A2 β 1	Kollajen
A5 β 1	Fibronektin
A6 β 1	Laminin
α IIb β 3 (GP IIb-IIIa)	Fibrinojen Von Willebrand Faktör Vitronektin Fibronektin
α v β 3	Fibrinojen Von Willebrand faktör Vitronektin Fibronektin Kollajen Laminin
Trombin	Trombin
P2Y1	Adenozin difosfat
GP Ib-V-IX	Von-Willebrand faktör
GP IV (CD36)	Kollajen
GP VI (P62)	Kollajen
P-Selektin	PSGL-1 (Lökositler)

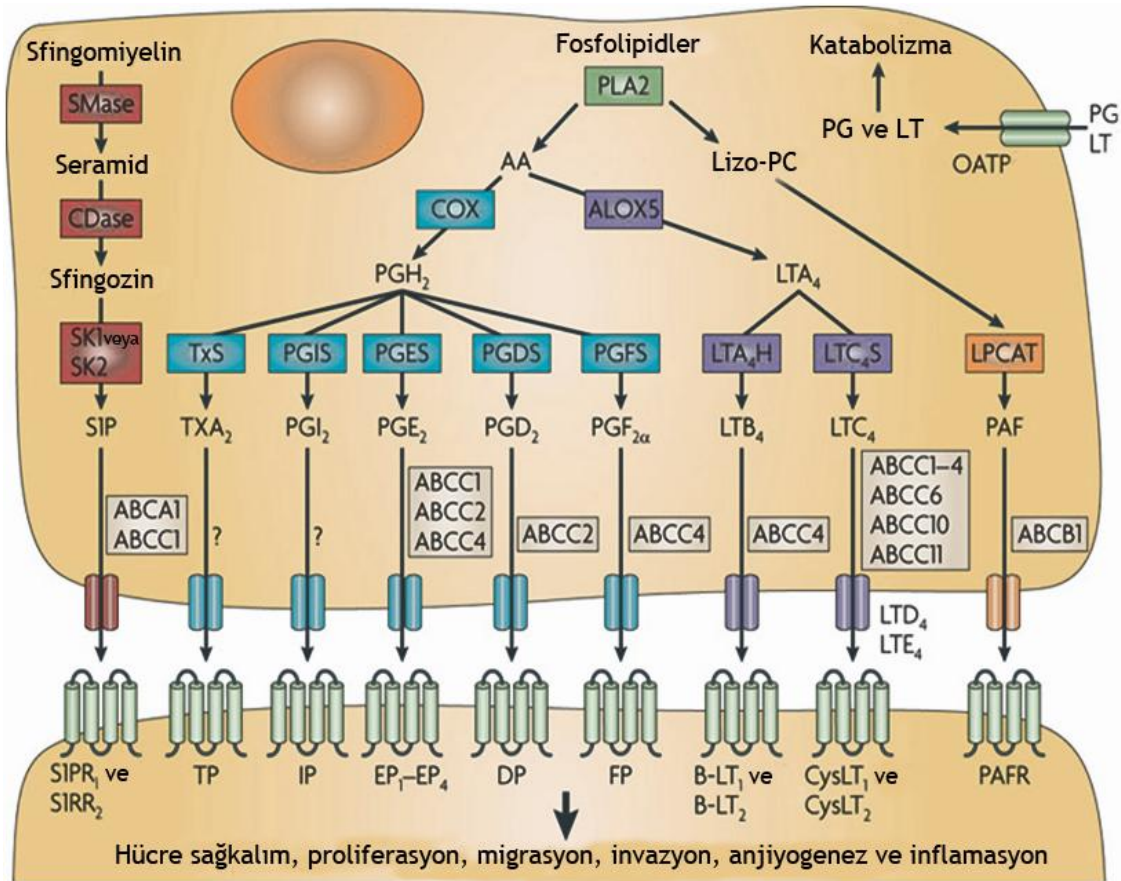
İskemik inmede trombosit fonksiyonlarının başka inhibitörleri incelenmektedir. Hirudin gibi trombin inhibitörleri fibrin birikimini ve trombosit agregasyonunu etkiler ancak serebral iskemide deneysel çalışmaları henüz yoktur. Trombosit-kollajen bağlanmasını boke eden ajanlar da potansiyel terapotik ajanlardır. Örneğin, deneylerde böyle bir bileşiğin integrin [alfa]2, [beta]1 reseptörünün kollajene bağlanmasını bloke ettiği saptanmıştır ve böylece trombosit birikimi önlenmiştir. Trombosit integrin [alfa]IIb, [beta]3 reseptör inhibitörleri mikrovasküler oklüzyon formasyonunu önleyebilir. Deneysel bir serebral iskemi modelinde peptid TP9201 ile tedavi

kontrollere göre kapiller, postkapiller, venüler ve arteriyel dolaşımı anlamlı oranda artırmıştır ve bu da bölgesel kan akımını iyileştirebileceğini göstermektedir. Bu strateji ile doku kanaması anlamlı bir risktir. Benzer bir dikkat trombin inhibitörlerine karşı gösterilmesi gerekmektedir.

2.5. Trombosit Aktive Edici Faktör

Trombosit aktive edici faktör (PAF), memelilerde bulunan en potent ve çok amaçlı araçlardan biridir. Başlangıçta trombositlerden lökosit bağımlı histamin ve serotonin salınımında görevli "solubl bir faktör" olarak tanımlanmıştır (90,91). 1972'de Benveniste ve ark. (92) bu solubl faktörün IgE stimülasyonu sonrası tavşan bazofillerinden salındığını göstermiş ve PAF terimini ortaya koymuştur. PAF'ın lipid yapısını tanımlayan birçok çalışma bunu takip etmiştir (93,94,95,96). Hemen hemen aynı yıllarda, Muirhead ve ark.'ları tarafından renal medulladan PAF'a benzer özelliklere sahip bir faktör izole edilmiştir (97, 98, 99). Bu faktör, hipertansiyon oluşturulmuş Goldblatt sıçan modelinde kan basıncını düşürme yeteneğine sahip olması nedeniyle antihipertansif polar renal lipid olarak adlandırılmıştır. 1979 yılında, üç bağımsız grup (100, 97, 95) yarı sentetik bir fosfoaçilgliserol olan 1-O-alkil-2-asetil-sn-gliserol-3-fosfokolin'in, doğal olarak sentezlenen bu PAF ve antihipertansif polar renal lipid'den fizikokimyasal ve ayrıca biyolojik özellikler açısından farklılıklar gösterdiğini belirlemiştir. Hanahan ve ark. (101), IgE ile duyarlanmış tavşan bazofilleri tarafından sentezlenen PAF'ın kimyasal yapısını gaz-likid kromatografisi ve kütle spektrometresi ile 1-O-alkil-2-asetil-sn-gliserol-3-fosfokolin olarak karakterize etmiştir. PAF en yaygın kullanılan terim olmasına rağmen, bu medyatörün sadece trombosit etkisini tanımladığı için yanlış adlandırılmıştır. PAF günümüzde biyolojik olarak aktif, yapısal olarak alkil fosfolipidler ailesine ait olan, farklı ve potent fizyolojik etkilere sahip bir fosfolip olarak düşünülmektedir (102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111). PAF, interselüler veya intraselüler haberci olarak görev yapabilen, hücre-hücre iletişimine ait bir medyatör olarak varsayılmaktadır (104). PAF'ın bazı etkileri, 10⁻¹² M kadar düşük konsantrasyonlarda elde edilir ve çeşitli patolojik ve fizyolojik süreçlerin devamı ile ilgili olaylarda görev alır. Uygun stimülasyon sonucu çeşitli hücre türlerinin ve dokuların PAF ürettiği gösterilmiştir (112). PAF özellikle, monositler/makrofajlar, polimorf nüveli nötrofiller (PMN), eozinofiller, bazofiller ve trombositler gibi inflamatuvar reaksiyonun oluşumuna katılabilen çeşitli hücreler tarafından üretilmektedir

(113, 103, 114, 115). Ayrıca insan endotel hücrelerinin de, trombin (116, 117, 118, 119), anjiyotensin II (116), vazopressin (116), lökotrien C4 ve D4 (120), histamin (120), bradikinin (120), elastaz (121), katepsin G (121), hidrojen peroksit (122, 123), plazmin (124, 125), interlökin (IL)-8 (126) ve IL-1a veya tümör nekrozis faktör (TNF)-a'nın (127, 128, 129, 130, 131, 132, 133) dahil olduğu çeşitli inflamatuvar medyatörler tarafından stimülasyon sonrası PAF ürettiği belirlenmiştir. Kardiyomiyositlerin de uygun stimülasyon altında PAF sentezlediği bildirilmiştir (134). PAF üreten birçok hücre aynı zamanda PAF reseptörlerine sahiptir (135, 136, 137, 138) ve PAF etkinliği için hedeftir. İn vitro PAF, agregasyon, kemotaksis, granül sekresyonu ve lökositlerden oksijen radikali üretimi ile lökositlerin endotele adheransını stimüle eder (139, 140, 141, 142, 143). PAF, tek katlı endotel hücre tabakasının permeabilitesini artırır (144), düz kas (145, 146, 147) ve miyometriyum (148, 149) kasılmasını stimüle eder ve kardiyak kas üzerinde negatif inotropik ve aritmojenik etkilere sahiptir (150, 151, 152, 153, 154, 155).



Jamie I. Fletcher ve ark. 10,147-1456 (Feb.2010)'dan uyarlanmıştır

Nature Reviews | Cancer

Şekil 2.11. ABC proteinlerinin taşıdıkları substratlar ve bağlandıkları reseptörler

2.5.1. Trombosit Aktive Edici Faktör'ün Moleküler Heterojenitesi ve Fonksiyonel Sonuçları

PAF genel olarak geniş spektrumda farklı ve potent biyolojik özellikleri olan tek bir moleküler yapı olarak düşünülse de, günümüzde, çok sayıda aynı fizyolojik etkinliği paylaşan yapısal olarak çeşitli biyolojik orijinlere ait fosfolipid molekülleri olduğu bilinmektedir. Ancak, kimyasal yapı PAF'ın biyolojik potensini ciddi anlamda etkilemektedir (108). Biyolojik potensinin tam ekspresyonu, gliserol omurganın sn-1 konumundaki bir eter bağını, sn-2 konumunda genellikle bir asetil kalıntısı şeklindeki kısa bir açıl zincirini, sn-3 konumunda kolin veya etanolamin polar baş grubunu gerektirir (106, 108). Sn-1 konumundaki alkil zincirinin uzunluğu ve çift bağ sayısı PAF'ın biyolojik potensi üzerinde önemsiz kabul edilen etkilere sahiptir. Tersine, gliserolün sn-1 konumunda ester bağının varlığı ve sn-2 konumunda üç karbonlu daha uzun bir açıl zinciri biyolojik özellikleri önemli oranda zayıflatır ve değiştirir. İnsan PMN'i tarafından sentezlenen PAF'ın kütle spektrometre analizi, 15:0-, 16:0-, 17:0-dallı zincir , 17:0-, 18:0, 18:1-, 18:2- ve 22:2-PAF'ı (156, 157, 158, 159) içeren çeşitli moleküler alkil PAF tiplerinin varlığını ortaya koymuştur. İnsan PMN'i aynı zamanda bu hücreler tarafından sentezlenen total PAF'ın %13 ila %25'ini oluşturan açıl-PAF'ı da üretir (160, 161). Yakın bir zaman önce açıl-PAF'ın, insan pulmoner mastositleri (162, 163) ve vasküler endotelyum (164, 115, 165) dahil çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen PAF'ın major moleküler türlerinden biri olduğu ileri sürülmüştür. Perfüze olmuş sıçan ve kobay kalbi (166) vinil-PAF üretir. Biyolojik olarak aktif diğer asetile-gliserol lipid türleri, PAF'ın nötral prokürsörleri 1-alk-1'-enil-2-asetil-sn-gliserol-3-fosfokolin ve 1-alk-1'-enil-2-asetil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin ile 1-alkil-2-asetil-sn-gliseroller gibi PAF'ın plazmalojen analoglarıdır. PAF'tan daha az aktif olsalar bile bu tür plazmalojenler PAF ile sinerjistik olarak görev alabilir (156, 109). 1-alkil-2-asetil-sn-gliseroller'in biyolojik aktivitesi, bu nötral lipidlerin PAF'a dönüşümü ile ilişkilidir. Bununla birlikte, 1-alkil-2-asetil-sn-gliseroller ve bunların metabolik ürünlerinin, HL-60 hücrelerinin (167) diferansiyasyonu, diaçilgliserol ile indükte protein kinaz C (PKC) aktivasyonunun azalması ve makrofajların aktivasyonu (168) dahil intrinsik biyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Son olarak, bir fosfatik asit analogu olan 1-alkil-2-asetil-sn-gliserol-fosfat, bir kalsiyum iyonoforu olarak görev alabilir (169). PAF'ın farklı moleküler tipleri, trombosit aktivasyonu üzerinde farklı etkinliğe sahiptir (106). Ancak trombosit bioassay, belirli bir moleküler türün, farklı hücre tipleri veya

dokular üzerindeki biyolojik aktivasyonunu illaki yansıtmaz. Örneğin, alkil zincirinde sn-1 pozisyonundaki tek çift bağın varlığının, negatif inotropiyi 50 kat ve koroner vazkonstrüksiyonu 100 kat arttırarak kardiyak aktivasyonu önemli oranda değiştirdiği, ancak trombositlerin stimülasyonu üzerine çok az bir etkisinin olduğu gösterilmiştir (106). McManus ve ark. (106) yakın bir geçmişte, tavşan trombositleri, insan PMN'si ve izole kobay kalbinde in vitro olarak ve trombositopenik, lökopenik ve sağ ventriküler hipertrofisi olan tavşanlara enjeksiyon sonucu in vivo olarak, alkil ve açıl-PAF moleküllerinin potens sıralamasındaki farklılıkları incelemiştir. Bu çalışma, PAF'ın çeşitli moleküler tiplerinin biyolojik özelliklerindeki farklılıkların, kritik miçel konsantrasyonu veya albümin bağlama afinitesi gibi biyofiziksel özelliklerde ya da birden çok PAF reseptör alttipinin varlığında ortaya çıkan farklılıklara bağlı olabileceğini ileri sürmüştür.

2.5.2. Trombosit Aktive Edici Faktörün Metabolizması

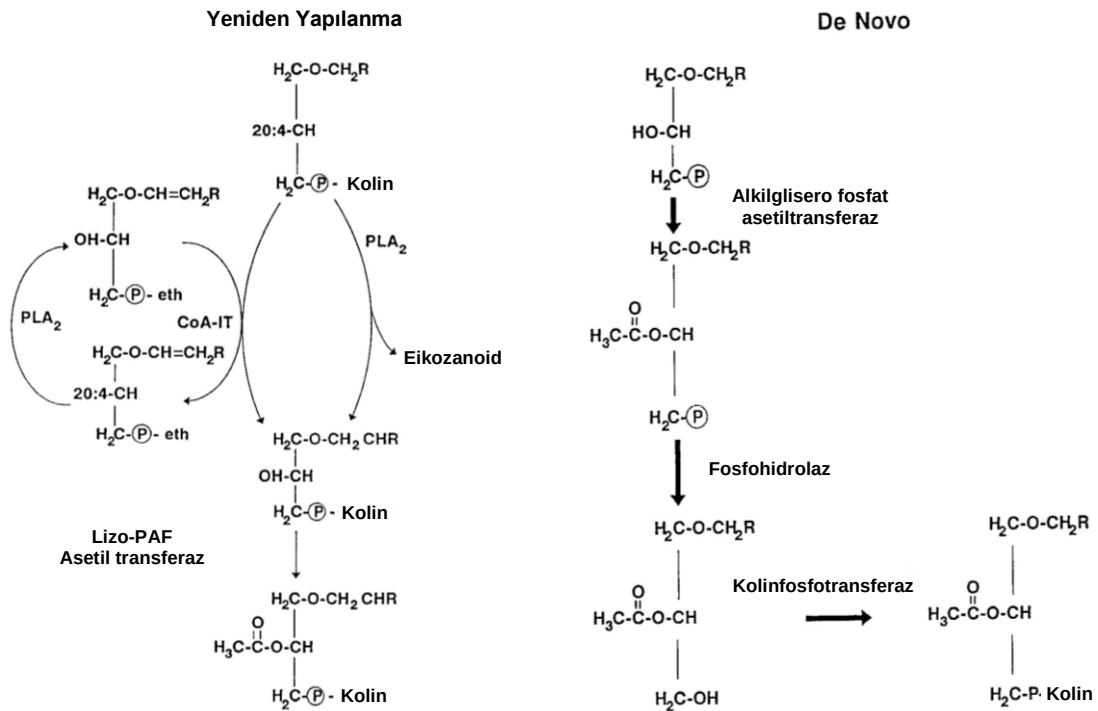
2.5.2.1. PAF'ın Biyosentetik Yolları

PAF'ın moleküler heterojenitesi olasılıkla farklı hücre tiplerinin sentezi ve degradasyonunda görevli multipl enzimatik aşamalara bağlıdır.

PAF, çeşitli dokular ve hücrelerde iki ana yol ile sentezlenir. "Remodeling (Yeniden Yapılanma) yolu" başlıca, stimüle inflamatuvar hücrelerin sentezlenmesi ile görevlidir (170, 171, 172). Bu yol, fosfolipaz (PL) A2 ve asetil CoA:1-alkil-sn-gliserol-3-fosforilkolin 2-O-asetiltransferaz reaksiyonunu gerektirir (173). PLA2 (174) aktivasyonu, 2-lizofosfolipidlerin (örn. 1-alkil-2-lizo-gliserol-3-fosfokolin, lizo-PAF) bir türünü oluşturmak üzere membran fosfolipidlerinin hidrolizine neden olur. Bu 2-lizofosfolipidler, asetil-KoA'dan asetik kısmını sn-2 pozisyonundaki serbest hidroksile transferini katalize eden asetil-KoA:1-alkil-sn-gliserol-3-fosforilkolin 2-O-asetiltransferazın substratıdır. Membran gliserofosfolipidlerinin doğrudan alkilasyonuna ek olarak, 2-lizofosfolipidlerin oluşumuna dair diğer bir yol yakın bir zaman önce tanımlanmıştır. Lizo-PAF, alkilaçıl-gliserol-3-fosfokolin ve varsayımsal bir PLA2'nin etkinliği sonucu oluşan lizofosfolip akseptörü arasındaki bir KoA-bağımsız transaçılasyon reaksiyonu ile elde edilebilir (175, 176, 177, 178, 179, 180). Bu KoA-bağımsız transaçılaz yolu, araşidonik aside bağlı alkil-kolin-fosfogliserid türlerine spesifik olduğu için, eş zamanlı PAF sentezi ve araşidonik asidin mobilizasyonunun

nedenini açıklar (181, 182). Şekil 2-12, remodeling (yeniden yapılanma) yolunun enzimatik aşamalarını göstermektedir.

Başlıca böbrek ve merkezi sinir sisteminde aktif olan PAF'ın ikinci biyosentetik yolu, "de novo yol" olarak tanımlanmıştır (Şekil 2-12). Bu yol, daha sonra spesifik bir dithiothreitol duyarsız CDP-kolin:1-alkil-2-asetil-sn gliserol kolinfosfotransferaz ile PAF'a dönüştürülen 1-O-alkil-2-asetil-gliserol'ün sentezinde görev alır. Kolinfosfotransferazın dithiothreitol'e duyarsızlığı dışında bu yol, lesitinlerin biyosentezinde görev alan yolun analogudur (183). Bu yoldaki direkt PAF prekürsörleri, asetilKoA:1-alkil-2-lizo-sn-gliserol-3-fosfat asetiltransferaz ve 1-alkil-2-asetil-sn-gliserol-3-fosfat fosfohidrolaz ile katalize edilen bir asetilasyon-defosforilasyon reaksiyon dizisi ile oluşan 1-alkil-2-asetil-sn-gliseroller'dir (185, 185, 186). Remodeling (Yeniden Yapılanma) yolunun ve de novo yolun enzimleri, spesifik bir uyarana yanıt olarak belirli bir hücre veya doku tarafından üretilen PAF'ın moleküler tiplerindeki heterojenitenin temelini oluşturan, görece olarak geniş substrat spesifitelerine sahiptir (106, 108).



Şekil 2.12. PAF'ın Biyosentetik Yolları (Ref:106)

2.5.2.2. PAF Katabolizması

Bu potent fosfolipid otokoidin sentezi ve katabolizması birbiri ile oldukça ilişkilidir. Dokularda PAF'ın son moleküler kompozisyonu ve biyolojik aktivitelerinin ekspresyonu, aynı zamanda akutlik yolların aktivasyonuna da bağlıdır. PAF'ın biyoaktivitesinin sınırlamasında görevli en önemli enzim, sn-2 pozisyonundaki kısa açıl zincirini kesen ve biyolojik olarak inaktif lizo-PAF'ı oluşturan PAF-spesifik bir asetilhidrolazdır (PAF-AH). Bu enzim plazmada (187) ve çeşitli dokularda (188, 189, 190, 191, 192) bulunur. İnsan plazma PAF-AH'nın moleküler klonlaması ve karakterizasyonu yakın bir geçmişte bildirilmiştir (193, 194). İnsan plazmasında bulunan aktif PAF-AH, LDL ve HDL ile kompleks yapmış olarak dolaşımda yer alır (195, 196, 197). Ekstraselüler enzime ilaveten, iki intraselüler PAF-AH moleküler tipi de bildirilmiştir (198, 199). PAF-AH, aynı zamanda PAF reseptörlerine (200) bağlandığı gösterilmiş olan PAF-benzeri okside fosfolipidleri de yıkar ve ateroskleroz patogeneğinde rol oynamaktadır (201). Lizo-PAF ardından bir açıl-KoA:1-radyl-sn-glisero-3-fosforilkolin açıltransferaz tarafından yeniden açillir. Lizo-PAF'ın alkil kısmının aynı zamanda tetrahidropiridin bağımlı bir alkilmonooksijenaz tarafından bir aldehide ayrıldığı da bilinmektedir (184). Alternatif olarak fosfolipaz-D, bir fosfatidik asid analogu oluşturmak amacıyla fosfokolin kısmını hidrolize edebilir ya da bir transfosfotidilasyon reaksiyonu ile bir fosfat transferini katalize edebilir (202). Açıl PAF molekülü ayrıca, 1-lizo-2-asetil-glisero-3-fosfokolin oluşturmak amacıyla sn-1 pozisyonunda esterleşmiş olan uzun zincirli açıl yağ kalıntısını hidrolizleyen bir PLA, tarafında da yıkılabilir (203). Yakın geçmişte, kobay kalbinin sistemik dolaşıma asetil hidrolaz saldırdığı ve izole ventriküler miyositlerin PAF'ı alıp inaktif ürünlere katabolize edebildiği gösterilmiştir (204, 205). Koroner arter bypass cerrahisinin serum PAF hidrolaz aktivitesindeki değişiklikleri indüklediği ortaya konmuştur (206).

2.5.2.3. Trombosit Aktive Edici Faktör Reseptörleri ve Sinyal Transdüksiyonu

PAF, duyarlı olan hücre membranları üzerinde spesifik reseptörler aracılığı ile etkinlik gösterir (207, 208) (Şekil 2-13). Bağlanma çalışmaları, insan trombositleri üzerinde iki farklı tipte bağlanma bölgesi olduğunu ortaya çıkarmıştır (209). PAF'ın bir bağlanma bölgesi, 37 ± 13 nm bir disosiasyon sabitesi (Kd) değeri ile yüksek afinite göstermiştir ve 1.399 ± 498 bölge/trombosit değerinde bir düşük kapasiteye sahiptir.

İkinci bağlanma bölgesi, PAF için düşük bir afinite ile neredeyse sınırsız bir bağlanma kapasitesi göstermiştir. Trombositlerin aktivasyonu, PAF'ın yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri ile etkileşimi sayesinde gerçekleşir. Tavşan trombositleri, insan trombositleri gibi, 0.9 ± 0.5 nM bir Kd değeri ile PAF için yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri ortaya koymuştur (210, 211, 212).

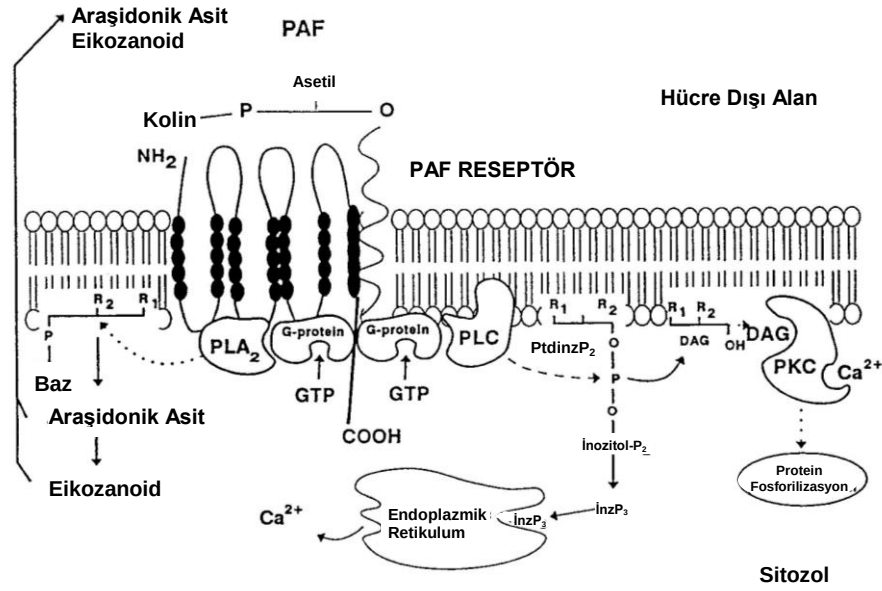
Tersine, PAF'ın etkisine duyarlı olan sıçan trombositleri, PAF için sadece düşük afiniteli bağlanma bölgeleri ortaya koymuştur (213, 214). PAF için spesifik bağlanma bölgelerinin sonrasında düz kas hücreleri (215), kardiyomiyositler (137), nötrofiller (216, 217), monositler-makrofajlar (218, 219), eozinofiller (220), endotelial hücreler (221) ve Kupffer hücrelerinde (222, 223, 224) olduğu da gösterilmiştir. Ayrıca, PAF spesifik bağlanma bölgeleri, merkezi sinir sistemi hücrelerinde de tanımlanmıştır. Sıçan serebral korteksi sinaptik plazma membranları ve intraselüler membranlarında üç farklı sınıf PAF bağlanma bölgesi belirlenmiştir (225, 226, 227). Yakın bir zaman önce, endotelial hücrelerdeki PAF reseptörünün yalnızca hücre yüzeyinde değil aynı zamanda büyük endozomal kompartmanda da eksprese edildiği gösterilmiştir (228). İntraselüler reseptörlerin önemi henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Ancak, intraselüler PAF reseptörlerinin, PAF ile indükte protoonkogen ekspresyonu için kabul edildiği şekilde, PAF bağımlı bir sinyal transduksiyon yoluna aracılık edebildiği öne sürülmüştür (227). PAF reseptörü için kobay akciğerinden bir cDNA klonlanmıştır (135). Kullanılan strateji, uç kısmı fraksiyone olmuş poly(A) RNA'dan elde edilen bir cDNA kütüphanesinin oluşturulması, kalıp olarak faj DNA'sını kullanan bir cDNA transkriptinin sentezi ve *Xenopus* oositlerinde transkript ekspresyonunu içermiştir (135). PAF reseptörü cDNA analizi, plazma membranını içten ve dıştan 7 kez dolanan, 7 helikal domaine sahip "serpentin reseptörleri" ailesine ait bir PAF reseptörüne işaret etmektedir. PAF reseptörü şaşırtıcı bir şekilde sadece 342 aminoasit içermektedir ve 38.982 Da değerinde bir moleküler ağırlığa sahiptir (135). Serpentin reseptör ailesindeki G proteinen bağlandığı düşünülen üçüncü intraselüler loop (kangal) ve karboksil ucu, PAF reseptöründe çok kısadır. Aynı zamanda reseptörün karboksil ucunda dokuz potansiyel fosforilasyon bölgesinin mevcut olduğu bulunmuştur. Bölgelerin fosforilasyonu G proteinlerin reseptörlere bağlanmasını modüle edebilir ve PAF reseptörlerinin hızlı desensitizasyonuna neden olabilir (229). PAF reseptörü akabinde insan lökositleri ve HL-60 granülositlerinden klonlanmıştır. İnsan lökositlerinden klonlanan PAF reseptörü, kobay akciğerinden elde edilen lökositler ile %83 oranında bir

aminoasit eşleşmesi ortaya koymuştur. Yakın bir zaman önce, insan kardiyomiyositleri tarafından eksprese edilen PAF reseptör proteininin, insan lökositleri tarafından eksprese edilen PAF reseptörü ile tamamen aynı olduğu gösterilmiştir. Ancak, kardiyak PAF reseptörü için cDNA kodlayan bölgenin 5' kodlamayan bölgesinin lökositlerden farklı olması, bir doku spesifik regülatör mekanizmasının varlığına işaret etmektedir.

Xenopus laevis oositlerindeki ve COS-7 hücrelerindeki PAF reseptör ekspresyonunun indüksiyonu, PAF reseptörünün fonksiyonel olarak bir G proteini ile fosfoinozitid metabolizmasına bağlı olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar PAF'ın PLC' ve PLA2 ye bir G proteini aracılığı ile bağlandığına inansa da, ilgili G proteini henüz tam olarak karakterize edilememiştir. PAF'ın reseptöre bağlandığı ve ilgili G proteinini, guanozin trifosfatı guanozin difosfata çevirerek aktive ettiği ileri sürülmektedir. Ardından G protein fosfatidilinozitol spesifik bir PLC'yi aktive eder. Bu nedenle, PAF reseptörlerinin stimülasyonu, PKC'yi aktive eden geçici diaçilgliserol üretimine ve internal kalsiyum depolarının boşalmasına aracılık eden inozitol trifosfat üretimine yol açar. Bu yolun temel bileşenlerinin PAF reseptörlerini içeren tüm hücrelerde görev yaptığı ve PAF'a karşı farklı yanıtların hedef hücrelerin fonksiyonuna bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca, PAF'ın farklı mekanizmalar ile çeşitli hücre tiplerinde araşidonik asit salınımını stimüle ettiği de belirlenmiştir. Örneğin, nötrofillerde PAF sadece intraselüler kalsiyum depolarının mobilizasyonunu gerektiren bir mekanizma ile PLA2 nin aktivasyonu indüklerken, Kupffer hücrelerinde PLA2 aktivasyonu ekstraselüler kalsiyum akışına bağlıdır. Ayrıca, PAF tarafından PLA2 aktivasyonu PKC bağımlı bir mekanizma ile de meydana gelmekte, bunun bir pertussis toksini ile önlenmesi bu yolda bir G proteininin görev aldığına işaret etmektedir. PLA2 nin PAF ile indükte olan aktivasyonu aynı zamanda intraselüler cAMP düzeyleri ile de düzenlenmektedir. Araşidonik asit metabolitlerinin PAF'ın çeşitli biyolojik etkinliklerine aracılık ettiği tespit edilmiştir. PAF ile indükte olan koroner vazokonstriksiyon ve azalmış kontraktilitede, siklooksijenaz ve lipoksijenaz türevi araşidonik asit metabolitlerinin etkisi söz konusudur. Buna ilaveten PAF, vaksüler düz kas hücreleri dahil çeşitli hücre tiplerinde sitozolik serbest kalsiyumun artmasını indüklemektedir. PAF ile indükte sitozolik serbest kalsiyumun artmasında rol oynayan iki temel mekanizma, inozitol trifosfat üretimine bir sonucu olarak intraselüler depolardan kalsiyumun mobilizasyonu ve doğrudan PAF ile veya lipoksijenaz türevi araşidonik asit metabolitleri gibi intraselüler ikinci haberci ile indirekt olarak membrana

bağlı kanal regülasyonu ile ekstraselüler kalsiyumun içeri doğru akışı şeklindedir. Kalmodülin inhibisyonu ve verapamil gibi kalsiyum kanal antagonistlerinin tavşan trombositlerinde Ca'un içeri akışını bloke ettiği gösterilmiştir; ayrıca verapamil PAF'ın çeşitli in vitro ve in vivo biyolojik etiklerini de önlemektedir. Yakın geçmişte PAF'ın, trombositler, nötrofiller ve makrofajlardaki çeşitli proteinlerin tirozin fosforilasyonunu stimüle ettiği ortaya konmuştur. Ayrıca, PAF'ın inflamatuvar hücrelerde NFkB ile c-fos ve c-jun genlerinin aktivasyonunu stimüle etme yeteneğinde olduğu da gösterilmiştir. PAF reseptörü intraselüler loop'ları (kangalları) ve kuyruğunda çeşitli tirozin rezidüleri içerdiğinden, tirozin fosforilasyonunun reseptörün downregülasyonunda görevli olabileceği ileri sürülmektedir. Son zamanlarda PAF'ın mitojen ile aktive olan bir protein kinazı (MAPK) aktive edebildiği ve insan endotelial hücrelerinde fokal adhezyon kinazın (p125FAK) erken tirozin fosforilasyonunu indükleyebiliği ortaya konmuştur. Ayrıca, insan nötrofillerinde PAF, p38 MAPK' nın bilinen bir aktivatörü olan MAPK kinaz-3'ü aktive etmektedir.

PAF ile herhangi bir yapısal ilişkisi olmayan ve yapısal analogu olmayan birçok PAF reseptör antagonisti tanımlanmıştır. Potent ve selektif PAF reseptör antagonistlerinin geliştirilmesi özellikle PAF patofizyolojisi ile ilgili çalışmalar için değerlidir. Sırasıyla Gingo biloba ve Piper futokadsura izole edilen BN 52021 ve kadsurenon'u içeren çok sayıda doğal PAF antagonisti tanımlanmıştır. Yakın bir zaman önce, çeşitli sentetik PAF reseptör antagonistleri geliştirilmiştir. Bular arasında, 1) FR 72112, CV 3988, CV 6209, SRI 63441, ONO 6240 ve RP 48740 gibi fosfolipid analogları; 2) L 652731 gibi tetrahidrouran türevleri; ve 3) WEB 2086, WEB 2170, BN 50726 ve BN 50739 gibi triazolobenzodiazepin türevleri yer almaktadır. Bu kimyasal olarak farklı PAF reseptör antagonistleri, reseptörüne bağlanarak PAF'ı inhibe edebilme ve hedef hücreler üzerindeki PAF ile indükte spesifik yanıtı antagonize edebilme yeteneğine sahiptirler.



Şekil 2.13. PAF reseptörleri ve sinyal yolağını gösteren şema

2.5.3. Trombosit Aktive Edici Faktöre Karşı Kardiyovasküler Yanıtlar

2.5.3.1. PAF'ın Hemodinamik Etkisi

PAF'ın hemodinamik üzerine potansiyel düzenleyici rolü kapsamlı olarak çalışılmıştır. Bu araştırma çalışmaları, hipertansif sıçanlarda tek böbreğin çıkarılmasının ardından renal medulla ve renal venden izole edilen iki antihipertansif lipiddin biri olan polar renomedüller lipidin PAF ile aynı kimyasal yapıya sahip olduğunun gözlemlenmesi ile başlatılmıştır. İlk hemodinamik çalışmalar, antihipertansif polar renal lipid ve ayrıca sentetik PAF'ın kobaylarda, sıçanlarda ve tavşanlarda, mikrogram dozlarda intravenöz veya oral ilaç uygulamalarının ardından, normal ve hipertansif durumlarda, arteriyel basıncı düşürdüğünü ortaya koymuştur. Kan basıncı modülasyonunda PAF'ın potansiyel rolü olduğu, hipertansif sıçanlarda PAF'ın düşmüş olan düzeyleri ve plazma asetilhidrolazının artmış olan aktivitesinin gözlemlenmesinden çıkarılmıştır. Esasen intravenöz olarak uygulandığında PAF çalışılan tüm türlerde hipotansif etkilidir. Türler arasında duyarlılık varyasyonuna rağmen, PAF'a karşı farklı hemodinamik yanıt özellikleri sık karşılaşılan bir durumdur. Bu varyasyonel özellikler, hipotansiyon derecesinin doz bağımlı olması, başlangıcının çok hızlı olması, maksimum etkiye 30-60 sn içinde ulaşılması ve normale dönme süresinin de doz bağımlı olması şeklindedir. Ortalama bazal arteriyel basınca (MAP) intravenöz enjeksiyon sonrası 5-10 dk. içinde ulaşılır. Trombositlerin PAF etkinliğine duyarsız olduğu sıçan gibi türlerde

taşıflaksi gözlenmemiştir. Tersine, trombositlerin PAF etkinliğine oldukça duyarlı olduğu tavşanda taşıflaksinın olması, PAF ile indükte fizyolojik değişikliklerin, en azından kısmen trombosit aktivasyonu ve diğer medyatörlerin sekresyonu ile meydana geldiğine işaret etmektedir. Bu nedenle sıçan modeli, PAF'ın direkt vasküler etkilerini, dolaşan trombositlerin aktivasyonuna bağımlı olanlardan ayırt etmek için kullanılmıştır. Tablo 1, farklı hayvan türlerinde PAF infüzyonu ile indükte olan hemodinamik değişimleri göstermektedir. PAF ile indükte hipotansiyon mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olsa da, birtakım veriler, PAF'ın kalp, periferik vasküler yapılar ve mikrosirkülasyon üzerindeki etkinliğinin, en azından kısmen, sistemik kan basıncının düşmesine neden olabildiğine işaret etmektedir. PAF kardiyak çıkışı çeşitli mekanizmalar ile azaltmaktadır. Bu mekanizmalar şu şekildedir: 1) periferik vazodilatasyon veya vazokonstrüsyon ve artmış mikrovasküler permeabilitenin bir sonucu olarak venöz kan dönüşünü azaltmaktadır; 2) artmış sağ atrial basınç ile sağ ventrikülde aşırı bir yük ve pulmonervasküler rezistanstaki artışın bir sonucu olarak sol ventrikülde azalmış bir dolum oluşturmaktadır; 3) direkt negatif inotropik etki ve koroner kan akışının (CBF) azalması ile kardiyak fonksiyonu bozabilmektedir; ve 4) son olarak PAF'ın kardiyak elektriksel aktivite ve iletim sistemini etkilediği gösterilmiştir.

PAF'ın kan damarları üzerindeki vasküler etkileri, farklı bölgelerde ve farklı hayvan türlerinde kullanılan PAF dozuna bağlı olarak değişmektedir. Bilinci açık sıçanlarda, düşük doz PAF, tüm vasküler bölgelerde kan akımını artırır ve vasküler direnci düşürür. Tersine yüksek doz PAF, kardiyak indekste sürekli bir düşüş, taşikardik yanıt ve total periferik direçte sürekli bir artışı takiben geçici bir düşüş oluşturmıştır. Mezenterik bölgede, mezenterik rezistanstaki artışın bir sonucu olarak kan akımında gözeçarpan bir azalma gözlenmiştir.

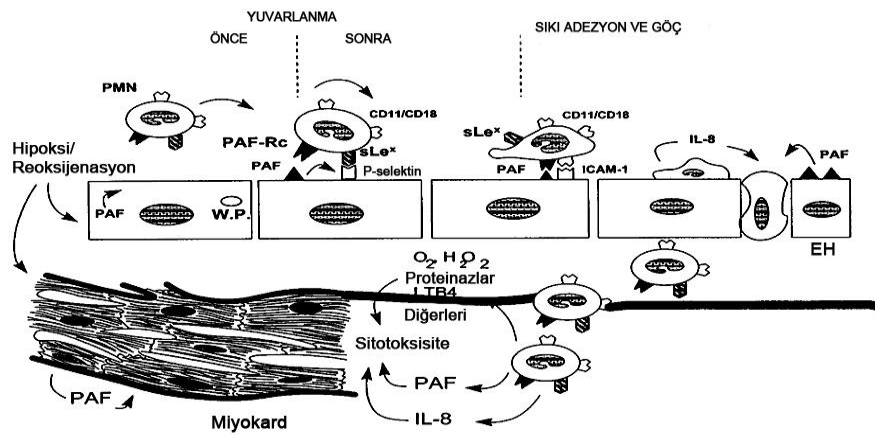
PAF'ın bu doz bağımlı ve bölgesel hemodinamik etkileri, anithipertansif polar renal lipid infüzyonu ile elde edilen etkileri taklit eder. Ayrıca, PAF ile indükte hipotansiyonun, merkezi sinir sistemi, renin-anjiyotensin sistemi, muskarinik, beta-adrenerjik, dopaminerjik, eikozanoidler, kalsiyumun içeri akışı, tiotropin salıcı hormon, steroidler veya histaminerjik mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşmediği belirlenmiştir. Tersine, PAF ile indükte gecikmiş ve persistan olan, erken olmayan hipotansiyonun, endotelial hücrelerden nitrik oksit üretimini inhibe eden Nw-nitro-L-arjinin ile inhibe edildiği bulunmuş ve bu şekilde, "“endothelium-derived relaxing factor"ün bir rolü

olduğuna dikkat çekilmiştir. İn vitro çalışmalar, sıçan torasik aortunun PAF ile indükte relaksasyonunda nitrik oksit yolunun görev aldığını göstermektedir. PAF'ın taşikardik etkisinin beta-adrenoreseptör blokörü propranolol ile inhibe olması, sistemik hipotansiyon sonucu bir baroreseptör refleksi aktivasyonuna işaret etmektedir. Tavşan, köpek, domuz ve babunda PAF, trombositlerin ve lökositlerin potent bir aktivatörüdür. Bu nedenle, bu hücrelerden salınan vazodilatör maddeler PAF'ın hemodinamik etkisine katkıda bulunur. Tavşanlarda göreceli olarak intravenöz yüksek doz PAF uygulaması (0.6 – 0.8 mg/kg), bradikardi, kardiyak çıkışta azalma, hipotansiyon, akciğer kompliyansında düşme ve periferik vasküler ve akciğer rezistanslarında artış meydana getirir. Birbirini izleyen üç aşamada ortaya çıkan hemodinamik değişiklikler şu şekildedir: 1) sol ventriküler sistolik basınç (LVSP), MAP ve meydana gelen kardiyak çıkışta azalma ile birlikte geçici bir bradikardi (15 sn); 2) kardiyak frekansta 30 sn içinde gelişen bir artış, LVSP, MA, total periferik rezistanslar (TPR) ve kardiyak çıkışta artış; ve 3) PAF infüzyonundan ≈90 sn sonra LVSP ve MAP'ta azalma meydana gelirken, TPR ve sağ arteriyel sistolik basınç yüksek kalmayı sürdürmüştür. Bu değişimler 30-60 dk. içinde tersine dönmüştür. Düşük dozda PAF (0.2 mg/kg) kullanıldığında, hemodinamik yanıt benzerdi, ancak yoğunluk (intansite) azalmıştı (yayınlanmamış gözlemler). H1 ve H2 antagonistleri dikkat çekici bir şekilde ikinci fazın, yani kardiyak frekans, LVSP, MAP ve TPR gelişimini önlemiştir, ancak birinci ve üçüncü fazları önemli oranda değiştirmemiştir. Ayrıca, trombositlerden tromboksan-A2 üretimi tavşanda hemodinamik değişimlerin gelişimine katkıda bulunabilir. Esasen indometazin PAF'la indükte hemodinamik değişimlerde toplam bir azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlar, trombositlerden histamin ve tromboksan-A2 salınımının, PAF'la indükte hemodinamik değişimlerin kısmen nedeni olabileceğine işaret etmektedir. Bu durum, trombosit ve lökositlerin özellikle pulmoner mikrovasküler dolaşımında tutulması kanıtı ve trombosit deplesyonu çalışmaları ile doğrulanmıştır. Bir kalsiyum kanal blokörü olan verapamil'in PAF ile indükte tüm hemodinamik ve elektriksel değişimleri önlediği belirlenmiştir. Kronik intravenöz PAF uygulaması, pulmoner rezistanslarda persistan artışla birlikte pulmoner arteriyel atrofi ve hipertansiyonu ve de kardiyak çıkıştaki azalmayı indükler. Anestezi altındaki köpeklerde PAF'ın infüzyon etkileri çalışıldığında, trifazik bir yanıt gözlemlenmiştir. Birinci fazda (15-30 sn) hipotansiyon, kardiyak çıkışta bir yükselme ile ilişkili sistemik vasküler rezistanslarda bir azalmaya yol açmıştır. İkinci faz (30-90 sn), pulmoner ve sistemik rezistanslarda bir artış ile ilişkili kardiyak çıkıştaki bir azalma sonucu ortaya

çıkan sürekli hipotansiyondan oluşmuştur. Üçüncü faz, sistemik vasküler rezistanslar ve persistan düşük kardiyak çıkışta yedi kat bir artış ile ilişkili MAP'ın yavaş yavaş düzelmesi ile karakterizedir. Lökotrien reseptörlerinin büyük oranda bloke edilmesinin üçüncü fazda sistemik vasküler rezistanslardaki artışı inhibe etmesi, lökotrienlerin sekonder medyatör rolüne işaret etmektedir. Birinci fazda gözlenen vazodilatasyon, prostaglandin üretiminden bağımsızdır. Tersine, ikinci fazda gözlenen kardiyak çıkıştaki azalmanın, araşidonik asit siklooksijenaz metabolitlerinin üretimine bağlı olduğu gösterilmiştir. Düşük doz PAF sadece, hipotansiyon ile birlikte ilk vazodilatör faza neden olmuştur. Evcil domuzlarda gerçekleştirilen çalışmalar, PAF'la indükte şokun ilk belirleyicisi olarak bir sağ ventrikül yetmezliği ile birlikte erken bir pulmoner vazkonstrüksiyonu ortaya koymaktadır. Sol ventrikülün yetersiz doluşuna neden olan, kardiyak çıkış ve sistemik hipotansiyondaki daha sonra meydana gelen düşme, sağ taraftan kaynaklanan olayların bir sonucu olarak yorumlanmıştır.

2.5.3.2. PAF'ın Endotelial Hücre Üzerine Etkisi

Endotel, dokularla kan arasındaki makro moleküllerin akışını dengeleyen bir mikro çevre oluşturur. Bu moleküller mikro çevreyi düzenler. Bu moleküllerin akışı eriyebilen araçlarla, yüzey reseptörleri, dış sinyaller ve adezyon moleküllerinin etkisiyle kontrol edilir. PAF, endotelial fonksiyonlar üzerine etkisini otokrin ve parakrin mediatör olarak gösterir. Endotelin içerdiği trombin vazoaktif araçlar ve proinflamatuvar sitokinler endotelden PAF'ın sentezlenmesine sebep olur. Endotel hücrenin fonksiyonları PAF'ın sentezlenmesiyle iki şekilde düzenlenir. Bunlar endotelial hücrenin bariyer fonksiyonu ve endotel tabakaya lokositlerin yapışmasıdır.



Şekil 2.14. PAF'ın Endotelial Hücre Üzerine Etkisini Gösteren Şema

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu

İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı ile ortaklaşa yapmış olduğumuz çalışmamız, Anjio polikliniğine ardışık olarak başvuran ve Anjiyografi ile damarları tetkik edilen 198 kişi ile gerçekleştirildi. Anjio sonucuna göre damar tıkanıklığı olduğu saptanan 113 kişi KAH hasta grubu olarak ,anjio sonucuna göre damar tıkanıklığı olmayan 85 kişi Kontrol grubu olarak belirlendi. KAH (hasta) grubu hastalık şiddetine göre (tıkali damar sayısı) 3 gruba ayrıldı. 1 damar tıkali (43 kişi) 2 damar tıkali (36 kişi), 3 damar tıkali (34 kişi). KAH-Kontrol grubu yaş, vki, trombosit sayısı ve trombosit volümü olarak benzerdi. Çalışmamıza katılan KAH hastalarının %76'sı (87 kişi) ♂, %24'ü (27 kişi) ♀ cinsiyetten oluşmaktaydı. Kontrol grubunun ise %45'i (38 kişi) ♂, %55'i (47 kişi) ♀'lardan oluşmaktaydı.

Alınan anamnezde KAH gurubunun %70'i, Kontrol grubunun %42'si ASA (asetil salisilik asit) kullananlardan oluşuyordu. KAH grubunda 29 kişi (%26) Kontrol grubunda ise 50 kişi (%58) kişi ASA kullanmıyordu.

Çalışmamıza denek olarak katılan gönüllülerden onayları alınarak 9/2010 - 01/2011 tarihleri arasında materyal toplandı. Çalışmanın deneysel aşaması İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Her bir denekten anjio sonrasında, femoral arter kanı EDTA'lı ve sitratlı tüplere alınmıştır. EDTA'lı olarak alınan kan örneğinden bir miktarı MDR-1 gen polimorfizmi çalışmak üzere -20 °C'de saklandı. Kalan EDTA'lı kan örneğinden ise plazma ayrıldı ve ELISA yöntemi ile plazma PAF düzeylerine bakılmak üzere -20 °C'de saklandı. Sitratlı kan örneklerinden, trombosit fonksiyon testlerinden biri olan Trombosit agregasyonu lumiagregometre cihazında çalışıldı. Deney sonuçları uygun istatistiksel yöntemler ile değerlendirildi.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

ADP (Adenozin di fosfat)	Chronolog
Biotin-antikör	Cusabio
HRP-avidin	Cusabio
Biotin-antikör diluent	Cusabio
HRP-avidin diluent	Cusabio
Yıkama solüsyonu	Cusabio
TMB substrate	Cusabio
Durdurucu solüsyon	Cusabio
Agaroz	Promega
Metafor Agaroz	Promega
Borik Asit	Merck
Brom fenol mavisi	Merck
Etilendiamintetraasetat (EDTA)	Sigma
Etidyum Bromür	Sigma
Etanol	Merck
dATP	Fermentas
dGTP	Fermentas
dCTP	Fermentas
dTTP	Fermentas
Trizma -Base (Tris-Baz)	Sigma
Taq DNA Polimeraz Enzimi	Fermentas
PZR Buffer (Magnezyumsuz)	Fermentas
Magnezyum Klorür	Fermentas
Kesim Enzimi Mbo I	Fermentas
Kesim Enzimi Bsr I	Fermentas
Kesim Enzimi Ban I	Fermentas
Kesim Buffer (Mbo I)	Fermentas
Kesim Buffer (Bsr I)	Fermentas
Kesim Buffer (Ban I)	Fermentas

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Tamponlar ve Jel Sistemleri

Agaroz Jel (%2)

- ✓ 0,6 gr agaroz
- ✓ 0,5 µl etidyum bromür
- ✓ 30 ml 0,5XTBE

Metafor Agaroz Jel (% 5)

- ✓ 1,50 gr metaforagaroza
- ✓ 0,5 µl etidyum bromür
- ✓ 30 ml 0,5XTBE

ELEKTROFOREZ TAMPONLARI

5XTBE (Tris-Borik asit-EDTA) (1000ml) (pH:7,5)

- ✓ 54 gr Tris-Baz
- ✓ 27,5 gr Borik asit
- ✓ 20 ml (0,5M; pH:8.0) EDTA

6X Agaroz Jel Yükleme Tamponu (10ml)

- ✓ %0,25 brom fenol mavisi
- ✓ %40 süktroz
- ✓ Etidyum Bromür (EtBr)
- ✓ 10 mg/ml

ELEKTROFOREZ ANALİZİNDE KULLANILAN STANDARTLAR

50 bç'lik DNA Ladder Marker (0,5 µg/µl, 50-1000 baz çifti)

RESTRIKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP) YÖNTEMİNDE KULLANILAN ENZİMLER VE TAMPONLAR

Restriksiyon Enzimi		Restriksiyon Enzim Tamponu
BsrI (10U /µl)	→	10XBuffer
BanI(10U/µl)	→	10XBuffer
MboI(10U/µl)	→	10XBuffer

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON (PZR) KARIŞIMI

- ✓ Taq DNA Polimeraz (rekombinant) (5U/µl)
- ✓ 10X PZR Buffer (100mM Tris-HCl, 500mM KCl)
- ✓ MgCl₂ (25mM)
- ✓ dNTP (2mM)
- ✓ Primerler ve DNA

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Lumiagregometre	Chronolog 500
Elisa yıkayıcısı	Pasteur LP 35
Elisa Okuyucusu	GDV
PZR Cihazı	Techne
Yatay Elektroforez Aleti	Thermo
Güç Kaynağı	Thermo
UV-Transilluminatör	Vilber Lourmat
Spektrofotometre	Shimadzu
Benmary (Su Banyosu)	Kottermann
Çeker Ocak	
Manyetik Karıştırıcı	Ühromag
Hassas Terazî	CHYO tip JL 180
Mikropipetler	Socorex, Eppendorf
Vorteks	Velp
Mini Santrifüj	Hettich
Soğutmalı Santrifüj	Heraus Rotina
PH Metre	pH537 WTW tip 50
Buzdolabı ve Derin Dondurucu (+4 °C ve -20 °C)	Arçelik
Etüv	Memmert

3.2. Yöntemler

3.2.1. Elisa Yöntemi

Plazma PAF konsantrasyonları ölçümü Elisa yöntemi ile yapıldı.

Kullanılan Solüsyonlar:

- ✓ PAF standart (47 pg/ml-3000 pg/ml arasında 7 konsantrasyon) hazırlandı.
- ✓ Sample diluent
- ✓ Biotin –antikor diluent
- ✓ HRP-avidin diluent
- ✓ Biotin-antikor
- ✓ HRP-avidin
- ✓ Yıkama Tamponu
- ✓ TMB substrate
- ✓ Durdurucu solüsyon

Plazma PAF düzeyleri Cusabio marka, İnsan Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF) ELISA kiti ile çalışıldı.

Testin yapılışı:

1. EDTA'lı tüpe alınan femoral arter kanı 15 dakika oda ısısında bekledikten sonra +4 C 'de 2000 RPM 'de 15 dakika çevrildi.Oluşan plazma örnekleri 2 eş parça olacak şekilde ayrılıp -20 C'ye kaldırıldı.Hemolize olan örnekler çalışma dışı bırakıldı.
2. PAF ELISA kiti içerisinde bulunan ve 96 adet kuyucuk içeren antikor kaplı tabağa ayarlanan örnekler ve standartlardan 100 ul konuldu.
3. Antijen antikor bağlanması için tabağın üzeri kapatılarak 37 C'lik etüvde 2saat inkübe edildi.
4. Tabağın içi boşaltılıp yıkama yapılmadan tüm kuyucuklara 100 ul biotin antikor solusyon eklendi.
5. Üzeri kapatılıp 37 C'de 1 saat bekletildi.

6. Her bir kuyucuk 3 defa yıkandı.
7. Her bir kuyucuğa 100 ul HRP avidin solüsyonu eklendi.
8. 37 C 'de 1 saat bekletildi.
9. Her bir kuyu 5 kez yıkandı.
10. Her bir kuyucuğa 90 ulTMB substrat eklendi ve üstü kapatılarak 30 dakika 37 C'de bekletildi.
11. Her bir kuyucuğa 50 ul durdurma solüsyonu eklendi.
12. Örnekler 450 nm dalga boyunda mikropate okuyucusunda okundu.Sonuçlar standart eğri üzerinden hesaplandı.

3.2.2. Trombosit Agregasyon Yöntemi

Femoral arter kanı 1/9 oranında %3.8'lik sodyumsitrat ile karıştırıldı. 750 RPM 'de 15 dak.santrifüj edilerek üst fazdaki trombositlerden zengin plazma (TZP) alındı. Kalan kısım 3000 RPM'de santrifüj edilerek trombositlerden fakir plazma (TFP) hazırlandı.TFP'dan 500 µl alınarak agregometri cihazına uyumlu cam küvetin içerisine koyuldu ve cihazın referans bölümüne yerleştirildi. TZP'dan ise 500 µl alınarak diğer bir cam küvete koyuldu ve cihazın 37 C 'lik inkübasyon bölümüne yerleştirildi. TZP 37 C de 3 dakika inkübasyondan sonra referans bölümünün karşısındaki optik dansite okuma bölümüne yerleştirildi. TFP'ya göre daha bulanık ve koyu görünen TZP'nın içine 5 µl ADP eklenerek trombositlerin uyarılması sağlandı. Uyarılan trombositlerin sekresyon(eğim) ve şekil değiştirerek akabinde oluşturdukları agregasyon (% amplitüd) fazları ayrı ayrı değerlendirilerek hesaplama yapıldı. Bulanık bir suspansiyon olan TZP'nın içinde ne kadar çok agregat oluşursa rengi o kadar açılır ve ışık geçirgenliği artar. Geçirgenlikteki artış indirek olarak agregatlar oluştuğunu gösterir. Optik agregometri yöntemi halen günümüzde altın standart olarak kabul edilmesine rağmen, kan örneklerinin hazırlanmasındaki güçlükler ve tetkik prosedürü bakımından yüksek oranda testi yapan kişiye bağımlı oluşu nedeni ile zorla uygulanabilen bir yöntemdir. Bu sebeplerden dolayı yaygın olarak kullanılamamaktadır (230).

3.2.3. DNA İzolasyonu

Vakumlu steril K3-EDTA'lı tüplere alman kan örnekleri -20°C'de saklandı ve izole edildi. Çalışmamızda DNA izolasyonu Roche DNA kiti kullanılarak yapıldı.

Roche DNA kiti kullanılarak kandan DNA izolasyonu yöntemi:

1. 1,5 ml lik ependorf tüplere 300 µl kan, 200 µl Binding Buffer ve 40 µl proteinaz K eklendi. Tüpler 20'şer saniye vortekslendikten sonra su banyosunda 72 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
2. Inkübasyon sonunda mikrosantrifüj tüplere 100 µl izopropanol eklendi ve 20 saniye vorteks yapıldı.
3. "Roche filtreli toplama tüpleri" hazırlandı ve filtreli toplama tüpleri üzerine mikrosantrifüj tüplerde bulunan karışım eklenerek 8000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Filtreli toplama tüpleri santrifüjden dikkatlice alındı ve filtreli tüplerin altındaki toplama tüpleri değiştirildi. Filtreli tüplerin üzerine 500 µl Baskılayıcı Removel Tampon eklendi ve 8000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüjden sonra filtreli tüplerin altındaki toplama tüpleri değiştirildi. Filtreli tüplerin üzerine 500 µl Yıkama Tamponu eklendi ve 8000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. 5 no'lu işlem ikinci kez tekrarlandı.
7. Filtreli tüpler santrifüjden çıkartılmadan 13000g'de 20 saniye daha santrifüj edildi.
8. Filtreli tüpler santrifüjden çıkartılarak 1,5 ml' lik ependorf tüplerine yerleştirildi ve üzerine 200 µl Elusyon Tampon eklendi. 8000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. İzolasyonları yapılan DNA'ların saflık ve miktar ölçümleri yapıldıktan sonra kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı.

DNA KONSANTRASYONUNUN VE SAFLIĞININ ÖLÇÜLMESİ

DNA izolasyonunun sonuçları spektrofotometrik ölçüm yöntemi ile değerlendirildi. Stok DNA örneğinden 5 ul örnek 1,5 ml'lik ependorf tüpe konuldu. Üzerine 495 µL 1 distile su eklenerek örneğimiz 1/100 oramnda sulandırıldı. Hazırlanan örneğin DNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik densitesinden (OD), saflığı da 260 nm/280 nm'deki OD oranından tespit edildi. DNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

DNA konsantrasyonu (µg / ml)= OD 260nm x 50 x seyreltme faktörü.

$$\text{DNA Saflığı} = \frac{260}{280}$$

Çalışmamıza katılan deneklerden elde edilen sonuçlara göre;

DNA konsantrasyonu= 59 ±14 µg/ml

DNA saflığı= 1.93 ± 0.57

olarak tespit edilmiştir.

3.2.4. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PZR in vitro koşullarda belirli bir DNA bölgesinin çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. PZR üç basamakta gerçekleşir:

- 1. Basamak:** Hedef DNA'nın termal denatürasyonu
- 2. Basamak:** 17-35 nükleotidden oluşan özgül sentetik oligonükleotid primerlerin hedef bölgeye bağlanması
- 3. Basamak:** DNA sentezi.

Bu çalışmada KAH hasta ve kontrol örneklerine ait genomik DNA üzerindeki MDR1 genine ait iki bölge (ekzon 26 ve 21) PZR ile amplifiye edildi. Her reaksiyon için İleri (F) ve Geri (R) olmak üzere bir çift primer kullanıldı.

PRİMERLERİN HAZIRLANMASI

Test edilen polimorfizmlerin belirlenebilmesi için kullanılan ileri ve geri primerler, liyofilize halde satın alındı. Primerler, steril, DNaz, RNaz içermeyen ultra saf su ile çözündürüldükten sonra (1mM), -20 °C'de muhafaza edildi. Bu çalışmada kullanılan Primer dizileri Tablo 3,1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan Primer Dizileri

Primer Dizileri	Bağlandığı GenBölgesi	Ürün
F: 5'-TTG ATG GCA AAG AAA TAA AGC -3'	MDR1 Ekzon 26	206 bç
R: 5'-CTT ACA TTA GGC AGT GAC TCG -3'		
F: 5'-TTT GCA GGC TAT AGG TTC CAG -3'	MDR1 Ekzon 21	222 ve 226 bç
R: 5'-GTT TGA CTC ACC TTC CCA G -3'		
R: 5'-TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC G -3'		

PZR REAKSİYON KARIŞIMI

MDR1 gen polimorfizmlerinin tespiti için 25 µl reaksiyon hacminde 0,2 ml'lik PZR tüplerinde PZR karışımı hazırlandı. Kullanılan PZR koşulları Tablo 3.2, 3.3 ve 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3. 2. MDR1 (C3435T ve G2677T/A) polimorfizmi için PZR koşulları

	(her bir örnek için)
İleri Primer	1µM
Geri Primer	1µM
10xBuffer	1x
dNTP	0,04mM
MgC12	1mM
Taq DNA Polimeraz (ekzon 26) veya TueStart Taq DNA Polimeraz (ekzon21)	1U
DNA	150ng

Tablo 3. 3. MDRI (C3435T ve G2677T/A) polimorfizmi için PZR programları

PZR PROGRAMLARI		
MDR1 ekson 26 polimorfizmi:		
1) 94 °C	4 dak	
2) 94 °C	30 sn	
56 °C	30 sn	35 siklüs
72 °C	30 sn	
3) 72 °C	5 dak	
MDR1 ekson 21 polimorfizmi:		
1) 94 °C	3 dak	
2) 94 °C	20 sn	.
55 °C	20 sn	40 siklüs
72 °C	30 sn	
3) 72 °C	5 dak	

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA parçalarının ayrılması ve tanımlanması için standard bir metod olarak agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır. Jeldeki DNA bantları jelin bir floresans boya olan etidyum bromür ile boyanması ve jelin UV ışık altında incelenmesi ile saptanabilir. Çoğunlukla jel elektroforezinde bilinen büyüklükteki bir belirteç (marker) DNA kullanılarak moleküler büyüklüğü bilinmeyen DNA'larm boyları kolayca saptanabilir.

Yapılan bu çalışmada PZR ile amplifiye edilen ürünlerin doğruluğunun ve kalitesinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi uygulandı.

PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

PZR ürünlerinin jeldeki kuyucuklara çökmesini sağlamak ve ayrıca bu PZR ürünlerinin ilerlemesini takip edilebilmek amacıyla 6X brom fenol mavisi içeren yükleme tamponundan 1 µl alınarak PZR ürününden 5 µl örnek ile karıştırıldı ve bu karışım jeldeki kuyucuklara yüklendi. Bütün örnekler ve 50 bç'lik DNA ladder marker yüklendikten sonra tankın elektrodları güç kaynağına takıldı ve 120 V'da örnekler yaklaşık 20 dakika yürütüldü. İşlem sonunda jel UV ışığı altında incelendi.

MDR1 ekson 26 polimorfizmi için 206 bç uzunluğundaki PZR ürünü MDR1 ekson 21 polimorfizmi için 222 bç (G2677A) ve 226 bç (G2677T) uzunluğundaki PZR ürünleri tespit edildikten sonra restriksiyon enzim kesimine alındı.

3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP)

PZR ile istenilen gen bölgesinin çoğalması sağlandıktan sonra polimorfik bölgenin restriksiyon endonükleazı (RE) ile kesilmesi temin edilir. RE'lar 4 ve 8 baz çiftlik spesifik DNA dizilerini kesen enzimlerdir. Bu doğrultuda polimorfik bölgedeki baz değişimine bağlı olarak RE'lar bu bölgeden ya kesim yaparlar ya da kesim yapmazlar. Kesim durumuna göre oluşan DNA parçaları jel elektroforez sisteminde görüntülenir.

MDR-1 GENİNİN C3435T POLİMORFİZMLERİ İÇİN PZR ÜRÜNLERİNİN MBOI ENZİMLERİ İLE KESİLMESİ VE GENOTİP TAYİNİ

Mbol restriksiyon enzimi için kesim koşulları:

- ◆ 11,5ul dH₂O
- ◆ 10X Buffer
- ◆ 15U MboI restriksiyon enzimi
- ◆ 5 µl PZR ürünü

olmak üzere toplam hacim 20 µl'dir. Enzim kesimi için 37 °C'de 1 gece inkübe edildi. Kesim ürünü %2 lik agaroz jelde incelendi.

206 bç banta sahip olan kişiler **TT** genotipli;

206, 130 ve 76 bç bantlara sahip olan kişiler **CT** genotipli;

130 ve 76 bç bantlara sahip olan kişiler **CC** genotipli olarak kaydedildi.

MDRI GENİNİN G2677T/A POLİMORFİZMLERİ İÇİN PZR ÜRÜNLERİNİN BSRI VE BANI ENZİMLERİ İLE KESİLMESİ VE GENOTİP TAYİNİ

BsrI ve Bani restriksiyon enzimleri için kesim koşulları

- ◆ 11,5 µl dH₂O
- ◆ 10XBuffer
- ◆ 15U BsrI (G2677A için) veya Ban I(G2677T için) restriksiyon enzimleri
- ◆ 5 µl PZR ürünü

olmak üzere toplam hacim 20 µl'dir. PZR ürünleri Bsr I enzimi ile 65 °C de 1 saat ve Ban I enzimi ile 37 °C'de 1 saat etüvde inkübe edilerek enzim kesimleri gerçekleştirildi.

G2677A PCR ürününün (222 bp) *BsrI* ile kesiminde

A ise kesim oluşur =208+14bp

G veya T ise kesim oluşmaz

G2677T PCR ürününün (226 bp) *Bani* ile kesiminde

A veya G ise kesim oluşur = 200 +26 bp

T ise kesim oluşmaz

Kesim ürünleri %3'lük metafor agaroz jelde incelendi:

222 ve 200 bç bantlara sahip olan kişiler GG genotipli;

222, 208 ve 200 bç bantlara sahip olan kişiler TA genotipli;

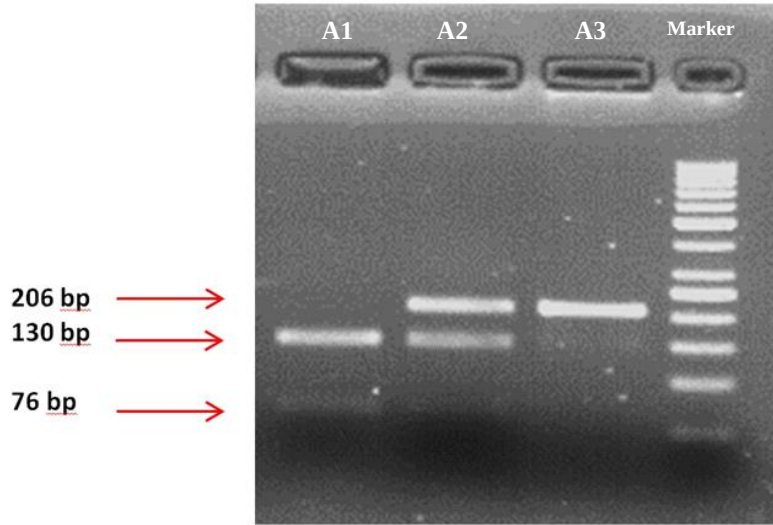
226 ve 222 bantlara sahip olan kişiler TT genotipli;

226, 222 ve 200 bç bantlara sahip olan kişiler GT genotipli ve;

226,222,208 ve 200 bç bantlara sahip olan kişiler GA genotipli olarak kaydedildi.

3.2.7. RFLP Analiz Sonuçları

MDR1 EKSON 26 POLİMORFİZMİNİN RESTRIKSİYON ENZİM ANALİZLERİ



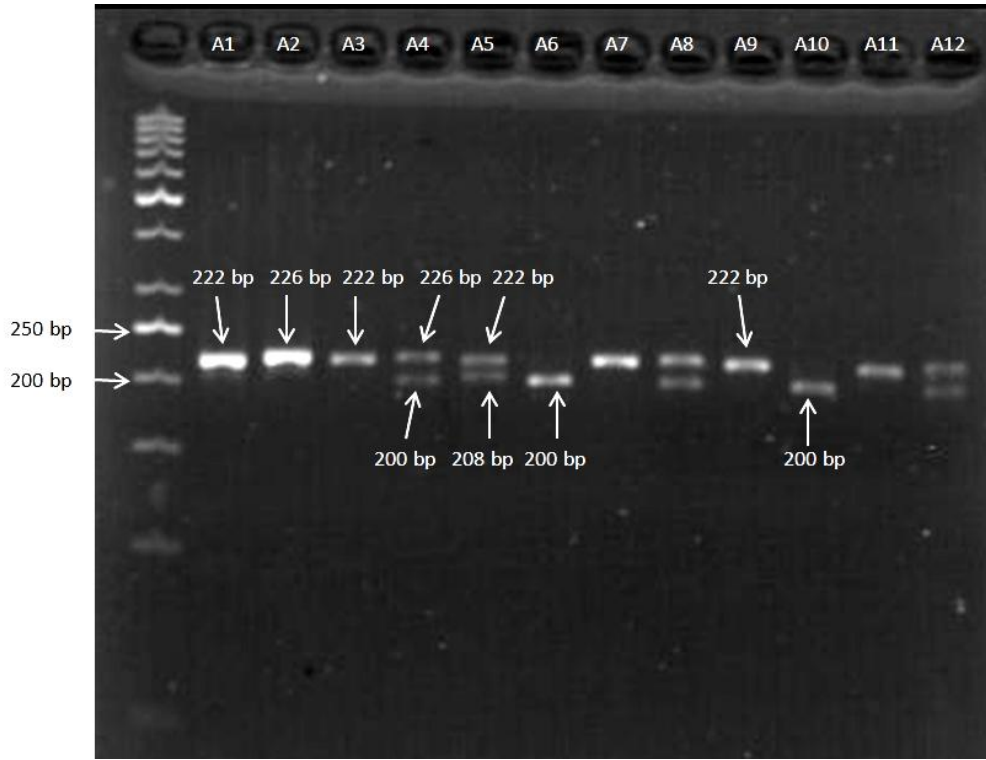
Şekil 3. 1. MDR1 C3435T polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüsü

A1 = 130 bp + 76 bp $\Rightarrow$ CC genotipi

A2 = 206 bp + 130 + 76 bp $\Rightarrow$ CT genotipi

A3 = 206 bp $\Rightarrow$ TT genotipi

MDR1 EKSON 21 POLİMORFİZMİNİN RESTRİKSİYON ENZİM ANALİZLERİ



Şekil 3. 2. MDR-1 G2677T/A polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüsü

A1 & A2 = (PCR ürünü)

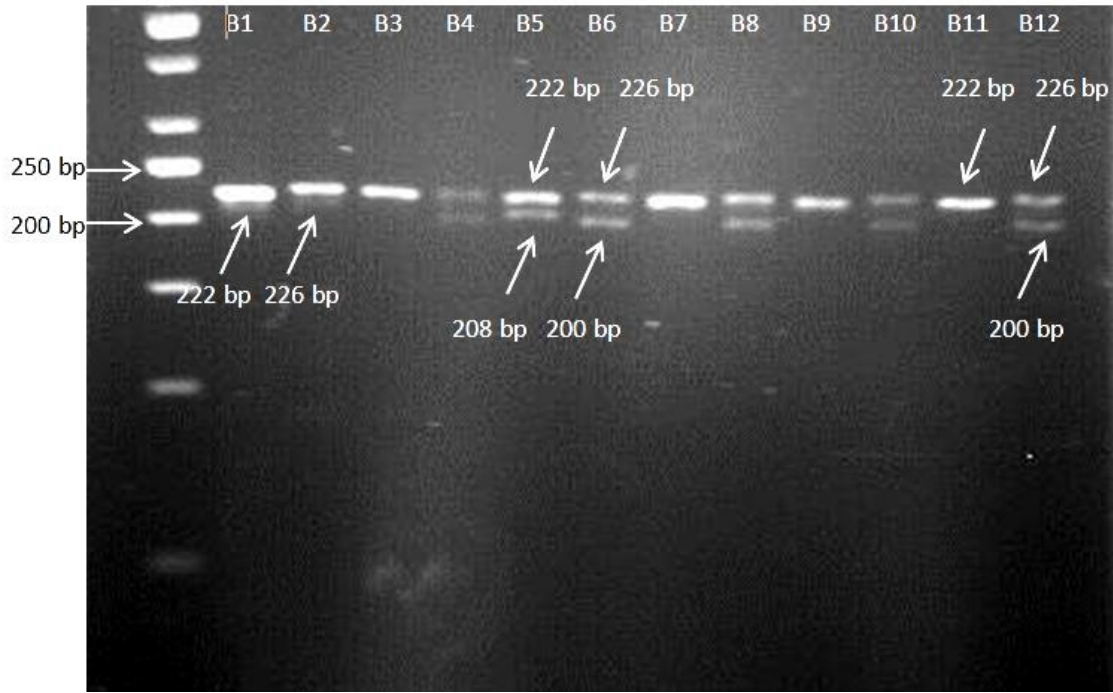
A3 & A4 = GT genotipi

A5 & A6 = AT genotipi

A7 & A8 = GT genotipi

A9 & A10 = GG genotipi

A11 & A12 = GT genotipi



Şekil 3. 3. MDR-1 C267T/A polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüsü

B1 & B2 = PCR ürünü

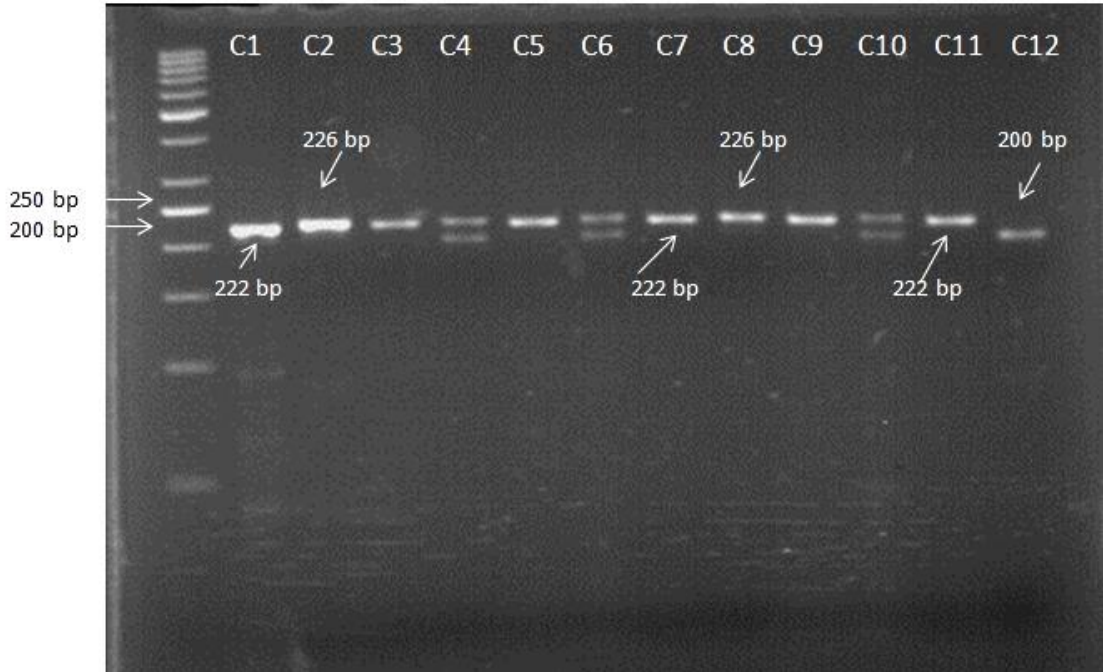
B3 & B4 = GT genotipi

B5 & B6 = GA genotipi

B7 & B8 = GT genotipi

B9 & B10 = GT genotipi

B11 & B12 =GT genotipi



Şekil 3. 4. MDR-I C2677T/A polimorfizmi genotiplerine ait agaroz jel görüntüsü

C1 & C2 = PCR ürünü

C3 & C4 = GT genotipi

C5 & C6 = GT genotipi

C7 & C8 = TT genotipi

C9 & C10 = GT genotipi

C11 & C12 = GG genotipi

3.3. İstatistiksel Analizler

Çalışmanın biyoistatistiksel çözümlenmesinde ele alınan ölçütler Ortalama, Standart Sapma, frekans ve yüzde değerleri ile tanımlanmıştır.

Gruplar arası frekans ve yüzdelerin kıyaslanmasında Ki-kare ve Fisher kesin olasılık testi kullanılmıştır.

Normal dağılıma sahip değişken ortalamaların karşılaştırılması için, iki grup kıyaslamasında t testi, ikiden fazla grup ortalamasının karşılaştırılmasında "Tek yönlü varyans analizi" (One-Way ANOVA), ANOVA ile anlamlı fark bulunan değişkenlerde

altgrupların arasındaki farkların yorumlanması için altgrupların ikili kıyaslamasında da post-hoc ''Turkey HSD'' testi kullanılmıştır.

Değişkenler arasındaki bağıntıları saptamak için korelasyon''Spearman çözümlemeleri'' yapılmıştır.

Anjio hasta-kontrol değişkenini etkileyen serbest değişkenlerin araştırılması amacıyla denetleme kurgusuna uygun olan multivariate lojistik regresyon analizi yapılmıştır.

Yorumlamalarda anlamlılık sınırı **p=0.05** alınmıştır.

Biyoistatistiksel analizlerde **SPSS (Sürüm :17.5** paket programı kullanılmıştır.

Her iki polimorfizimin birlikte kalıtılma oranlarını saptamak için Haplowiev (Sürüm 3.32) ve Midas paket programları kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamız 113 KAH ile benzer yaş ($p=0.07$) grubundaki 85 kontrol arasında gerçekleştirildi. Tablo 4-1' de KAH ve Kontrol grubu genel bilgileri verilmiştir.

Tablo 4. 1. KAH - Kontrol Grupları Genel Bilgileri

	KAH (n=113) Ort ± Std	Kontrol (n=85) Ort ± Std	p Değeri
Yaş (Yıl)	61.45 ±9.71	59.36 ±10.92	0.07
Yaş Aralığı (Yıl)	29 - 85	31 - 83	
Kilo (Kg)	78.37±13.18	78.33±14.35	0.986
Boy (cm)	167.77±8.72	164.05±9.08	0.003
vki (Kg/m ²)	27.77±3.70	29.21±5.58	0.042
Erkek. n (%)	86 (%76)	38 (%45)	0.000
Kadın . n (%)	27 (%24)	47 (%55)	0.000

Nonparametrik student- t testi ile yapılmıştır.

Çalışmamızın 2.grubu olan Asetilsalisilik Asit (ASA) kullanmayan (Ø) KAH (n=29) ve Kontrol (n=50) gruplarının genel bilgileri verilmiştir(Tablo 4-1a). Tablo 4-1a'daki bulgular Tablo 4-1 ile paralellik göstermektedir.

Tablo 4.1. A.Asetilsalisilik Asit (ASA) kullanmayan KAH - Kontrol Gruplarının Genel Bilgileri

	KAH Ort ± Std (n=)	Kontrol Ort ± Std (n=)	p Değeri
Yaş (Yıl)	60.52±9.96 (n=29)	55.96±10.76 (n=49)	0.07
Yaş Aralığı (Yıl)	40-77	30-85	
Boy (cm)	170.3±8.24 (n=29)	164.6±9.03 (n=48)	0.007
Kilo (Kg)	79.34±12.13 (n=29)	77.29±13.72 (n=48)	0.51
vki (Kg/m²)	27.30±3.27 (n=29)	28.65±5.38 (n=48)	0.23
Erkek. n (%)	24 (%83)	24 (%48)	
Kadın . n (%)	5 (%17)	26 (%52)	

İstatistiksel Analiz için Student-t testi kullanılmıştır.

KAH ve Kontrol gruplarının kan parametrelerine göre değerlendirilmesi Tablo 4-2 de verilmiştir. KAH ve Kontrol grupları, kan parametreleri açısından karşılaştırıldığında incelenen parametrelerden "HDL" düzeyleri KAH grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı oranda düşük bulunurken ($p=0.001$), "Trigiliserid" düzeyleri KAH grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı oranda yüksek bulundu ($p=0.029$). Trombosit volüm ve trombosit sayısı her iki grupta benzerdi. Diğer parametreler açısından karşılaştırıldığında her iki grup arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilemedi.

Tablo 4. 2. KAH ve Kontrol Gruplarının Kan Parametre Değerlerine Göre Karşılaştırılması

	KAH (n=113)		Kontrol (n=85)		P
	Ort $\pm$ std	CV	Ort $\pm$ std	CV	Değeri
Trombosit ($10^3/\mu\text{l}$)	248.69 $\pm$ 82.28	33.08	256.6 $\pm$ 53.87	20.99	0.482
Trombosit V (fL)	10.37 $\pm$ 1.12	10.80	10.08 $\pm$ 1.55	15.38	0.164
Tot Kol (mg/dL)	195.15 $\pm$ 44.42	22.76	204.24 $\pm$ 46.53	22.78	0.209
LDL (mg/dL)	122.45 $\pm$ 34.68	28.32	130.34 $\pm$ 34.12	26.18	0.15
HDL (mg/dL)	38.96 $\pm$ 10.03	25.74	45.16 $\pm$ 12.65	28.01	0.001
TRİG (mg/dL)	169.01 $\pm$ 77.34	45.76	140.21 $\pm$ 87.96	62.73	0.029
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	8.06 $\pm$ 2.25	27.92	7.70 $\pm$ 2.38	30.91	0.334
HGB (g/dL)	13.53 $\pm$ 1.80	13.3	13.22 $\pm$ 1.76	13.31	0.272
KREA (mg/dL)	1.00 $\pm$ 0.69	69	0.95 $\pm$ 0.66	69	0.591
SGOT (U/L)	22.4 $\pm$ 15.17	67.72	21.33 $\pm$ 8.93	41.87	0.609
SPGT (U/L)	22.77 $\pm$ 12.76	56.04	24.26 $\pm$ 14.54	59.93	0.492

Nonparametrik student- t testi ile yapılmıştır.

ASA kullanmayan KAH (n=29) ve Kontrol(n=50) gruplarının Kan Parametre Değerlerine Göre Karşılaştırılmasında bulgular Tablo 4-2 ile paralellik göstermektedir (Tablo 4-2a).

Tablo 4.2. A. ASA kullanmayan KAH-Kontrol gruplarında tüm kan parametrelerinin karşılaştırılması

	ASA Ø KAH		Kontrol		
	Ort ± Std	CV	Ort ± Std	CV	P Değeri
	(n=)		(n=)		
Trombosit (10³/µl)	244.04±86.56 (n=27)	35.47	255.29±55.29 (n=42)	21.66	0.51
Trombositv (fL)	10.33±1.27 (n=27)	12.30	10.00±1.52 (n=41)	15.17	0.35
Tot Kol (mg/dL)	202.9±41.10 (n=23)	20.26	200.1±52.41 (n=37)	26.19	0.83
LDL (mg/dL)	131.5±32.42 (n=24)	24.66	128.3±35.63 (n=38)	27.77	0.73
HDL (mg/dL)	37.48±8.86 (n=23)	23.63	44.37±13.66 (n=38)	30.78	0.035
TRİG (mg/dL)	161.8±60.12 (n=23)	37.15	125.6±56.87 (n=38)	45.27	0.021
WBC (10³/µl)	7.85±2.08 (n=26)	26.48	7.55±1.86 (n=39)	24.66	0.55
HGB (g/dL)	13.88±1.67 (n=25)	12.01	13.12±1.72 (n=41)	13.11	0.08
KREA (mg/dL)	1.14±0.58 (n=29)	51.05	1.18±0.82 (n=44)	68.94	0.80
SGOT (U/L)	19.27±8.92 (n=26)	46.31	20.69±6.78 (n=36)	32.77	0.48
SPGT (U/L)	22.88±18.15 (n=26)	79.30	25.61±17.42 (n=38)	68.04	0.55

Nonparametrik student- t testi ile yapılmıştır.

MDR-1'in doğal substratlarından biri olan PAF proinflamatuar bir mediatördür. KAH ve Kontrol gruplarında plazma PAF düzeyleri ELISA yöntemiyle tespit edildi. KAH ve Kontrol gruplarında plazma PAF düzeylerinin karşılaştırılması tablo 4-3'de gösterilmiştir. KAH grubunda plazma PAF düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.009$).

Trombosit fonksiyonları, sekresyon ve agregasyon açısından değerlendirilmek üzere lumiagregometre cihazı yardımı ile ADP uyararı verilerek çalışıldı. KAH ve Kontrol grupları, trombosit agregasyon eğrisinin (kurbunun) iki ölçüsü olan Eğim (Ω) ve % Amplitüd cinsinden değerlendirilerek yapılan karşılaştırmada (Tablo 4-3) KAH ve Kontrol Grupları arasında Eğim (Ω) ve %Amplitüd değerleri açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilememiştir. Eğim ($p=0.53$) Amplitüd ($p=0.06$)

Eğim KAH grubunda Kontrol grubuna oranla yüksek bulunmakla beraber istatistiksel olarak bir anlamlılık göstermemiştir. %Amplitüd değerleri ise KAH grubuna göre Kontrol grubunda daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 4. 3. KAH ve Kontrol gruplarında PAF (pg/mL), Trombosit agregasyon Eğim (Ω) ve Trombosit agregasyon %Amplitüd değerlerinin karşılaştırılması

	KAH		Kontrol		
	Ort $\pm$ Std	CV	Ort $\pm$ Std	CV	P Değeri
	(n=)		(n=)		
PAF (pg/mL)	38.16 $\pm$ 17.16 (n=99)	44.96	31.13 $\pm$ 14.98 (n=62)	48.11	0,009
Trombosit agregasyon EĞİM (Ω)	116.90 $\pm$ 28.21 (n=97)	24.12	113.90 $\pm$ 35.16 (n=74)	30.88	0,526
Trombosit agregasyon% AMPLİTÜD	66.51 $\pm$ 25.18 (n=97)	37.86	74.73 $\pm$ 30.71 (n=74)	41.09	0,056

Parametreler nonparametrik student- t testi ile karşılaştırılmıştır.

ASA Ø KAH (n=29) ve Kontrol(n=50) gruplarının PAF(pg/ml), Trombosit agregasyon Eğim (Ω) ve Trombosit agregasyon %Amplitüd değerlerinin karşılaştırılması Tablo 4-3a'da verilmiştir.

Bulgular PAF (pg/mL) ve Eğim (Ω) değerleri için Tablo 4-3 ile paralellik gösterirken trombosit agregasyon %Amplitüd değerleri açısından ASA Ø KAH kontrole göre yüksek çıkmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 4-3a).

Tablo 4.3. A. ASA kullanmayan KAH-Kontrol gruplarında PAF(pg/ml), Trombosit agregasyon Eğim(Ω) ve Trombosit agregasyon %Amplitüd değerlerinin karşılaştırılması

	ASA Ø KAH		Kontrol		P Değeri
	Ort $\pm$ Std (n=)	CV	Ort $\pm$ Std (n=)	CV	
PAF (pg/ml)	48.20 $\pm$ 14.07 (n=25)	29.20	33.81 $\pm$ 17.11 (n=36)	50.60	0.001
Trombosit agregasyon EĞİM (Ω)	116.3 $\pm$ 28.30 (n=25)	24.35	113.3 $\pm$ 32.74 (n=43)	28.89	0.71
Trombosit agregasyon% AMPLİTÜD	75.45 $\pm$ 24.06 (n=25)	31.89	74.85 $\pm$ 30.63 (n=43)	40.92	0.93

İstatistiksel Analiz için Student-t testi kullanılmıştır

Hastalık şiddetine göre (1-2-3 damar) KAH ve Kontrol gruplarında plazma PAF düzeylerinin karşılaştırılması tablo 4-4'te verilmiştir. Hastalık şiddetine (1-2-3 damar) göre KAH grubunda plazma PAF düzeylerinin arttığı görülmüştür. Tablo 4-4'te 1 Damar KAH ve Kontrol grubu PAF düzeyleri benzer bulundu. 1 Damar KAH ve Kontrol grubu plazma PAF düzeyleri 3 Damar KAH ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı olarak düşük bulundu (p=0.0002).

Trombosit fonksiyonları, sekresyon ve agregasyon açısından değerlendirilmek üzere lumiagregometre cihazı yardımı ile ADP uyararı verilerek çalışıldı. Hastalık şiddetine göre (1-2-3 damar) KAH ve Kontrol grupları, trombosit agregasyon eğrisinin (kurbunun) iki ölçüsü olan Eğim (Ω) ve % Amplitüd cinsinden değerlendirilerek karşılaştırıldı (Tablo 4-4). Hastalık şiddetine göre KAH ve Kontrol grupları arasında

Eğim (Ω) ve %Amplitüd değerleri açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilememiştir. Eğim($p=0.461$) Amplitüd($p=0.140$). Tablo 4-4

ASA Ø KAH ve Kontrol Gruplarında Hastalık Şiddetine Göre, PAF (pg/mL), trombosit agregasyon EĞİM (Ω) ve trombosit agregasyon % AMPLİTÜD Değerlerinin Karşılaştırılması Tablo 4-4a'da verilmiştir. Tablo 4-4a bulgular açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak Tablo 4-4 ile paralellik göstermektedir. Hastalık şiddetine göre PAF (pg/mL) düzeyleri artarken Eğim (Ω), % Amlitüd değerleri hastalık şiddeti ile bağlantılı bulunmadı. Tablo 4-4 ve Tablo 4-4a karşılaştırıldığında Eğim (Ω), % Amlitüd değerleri'nin gruplar arası dağılımında değerler farklı olmakla beraber sonuç olarak paralellik gösterdiği görülmektedir.

Tablo 4. 4. KAH ve Kontrol gruplarında hastalık şiddetine göre PAF (pg/mL), Trombosit agregasyon Eğim(Ω), Trombosit agregasyon % Amplitüd değerlerinin karşılaştırılması

	1 Damar		2 Damar		3 Damar		Toplam KAH		Kontrol	
	Ort $\pm$ Std	CV	Ort $\pm$ Std	CV	Ort $\pm$ Std	CV	Ort $\pm$ Std	CV	Ort $\pm$ Std	CV
	(n)		(n)		(n)		(n)		(n)	
PAF (pg/mL)	31.70 $\pm$ 13.18 (n=33)	41.57	36.46 $\pm$ 16.49 (n=35)	45.22	46.97 $\pm$ 18.41 ^{a,b} (n=31)	39.20	38.16 $\pm$ 17.16 (n=99)	44.96	31.13 $\pm$ 14.98 (n=62)	48.11
Trombosit agregasyon EĞİM (Ω)	122.80 $\pm$ 29.14 (n=39)	23.74	110.40 $\pm$ 32.26 (n=32)	29.22	113.50 $\pm$ 22.81 (n=26)	20.10	116.90 $\pm$ 28.21 (n=97)	24.12	113.90 $\pm$ 35.16 (n=74)	30.88
Trombosit agregasyon% AMPLİTÜD	67.69 $\pm$ 25.78 (n=40)	38.09	70.98 $\pm$ 25.98 (n=32)	36.60	60.63 $\pm$ 23.90 (n=26)	39.43	66.51 $\pm$ 25.18 (n=97)	37.86	74.73 $\pm$ 30.71 (n=74)	41.09

PAF (pg/mL) için ^ap=0.0002 One-way ANOVA.(Post-hoc Tukey). 1 Damar ile karşılaştırıldığında

PAF (pg/mL) için ^bp=0.0002 One-way ANOVA.(Post-hoc Tukey). Kontrol ile karşılaştırıldığında

Eğim (Ω) için p=0.461 One-way ANOVA.(Post-hoc Tukey).

% Amplitüd için p=0.140 One-way ANOVA.(Post-hoc Tukey).

Tablo 4.4. A. ASA Kullanmayan(Ø) KAH ve Kontrol Gruplarında Hastalık Şiddetine Göre, PAF (pg/mL),), Trombosit agregasyon EĞİM(Ω) ve Trombosit agregasyon % AMPLİTÜD Değerlerinin Karşılaştırılması

	ASA Ø KAH						Toplam KAH	CV	Kontrol	CV
	1 Damar	CV	2 Damar	CV	3 Damar	CV				
	(n)		(n)		(n)		(n)		(n)	
PAF (pg/mL)	42.33±10.09 (n=12)	23.84	46.75±7.91 (n=8)	16.91	64.60±18.85 ^{a,b} (n=5)	29.18	48.20±14.07 ^c (n=25)	29.20	33.81±17.11 (n=36)	50.60
Trombosit agregasyon EĞİM (Ω)	124.6±29.85 (n=13)	23.96	104.7±27.76 (n=9)	26.51	114.6±11.20 (n=3)	9.78	116.3±28.30 (n=25)	24.35	113.3±32.74 (n=43)	28.89
Trombosit agregasyon% AMPLİTÜD	77.21±26.87 (n=13)	34.80	76.53±24.45 (n=9)	31.94	64.58±4.73 (n=3)	7.33	75.45±24.06 (n=25)	31.89	74.85±30.63 (n=43)	40.92

PAF (pg/mL) düzeyleri için;

^a $p<0.0001$ 3damar KAH,kontrol ile karşılaştırıldığında (ANOVA-Tukey)

^b $p<0.0001$ 3damar KAH 1 damar KAH ile karşılaştırıldığında (ANOVA-Tukey)

^c $p<0.0001$ Toplam KAH toplam kontrol ile karşılaştırıldığında (ANOVA-Tukey)

EĞİM (Ω) için;

$p=0.645$ olup gruplar arası istatistiksel olarak herhangi bir fark yoktur.

%AMPLİTÜD için;

$p=0.969$ olup gruplar arası istatistiksel olarak herhangi bir fark yoktur.

KAH ve kontrol gruplarında C3435T ve G2677T/A polimorfizmleri için genotip ve allel frekans dağılımları Tablo 4-5'te verilmiştir. KAH ve Kontrol grupları C3435T ve G2677A/T genotip ve allel sıklıkları dağılımı bakımından karşılaştırıldığında her iki grup arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

Tablo 4. 5. KAH ve kontrol gruplarında C3435T ve G2677T/A polimorfizmleri için genotip ve allel frekans dağılımları

Genotip/Allel	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	OR (95% CI)	p-value
C3435T	113	85		
CC	31 (27)	23 (27)	Referans	
CT	55 (49)	35 (41)	0.86 (0.43-1.70)	0.66
TT	27 (24)	27 (32)	1.34 (0.63-2.87)	0.44
C allel sıklığı	0.52	0.48	Referans	
T allel sıklığı	0.48	0.52	1.17 (0.67-2.04)	0.57
G2677A/T				
GG	29 (26)	24 (28)	Referans	
GT	53 (47)	34 (40)	0.77(0.39-1.55)	0.47
GA	4 (4)	1 (1)	0.30(0.03-2.88)	0.38
AT	6 (5)	4 (5)	0.8(0.20-3.19)	1,00
TT	21 (18)	22 (26)	1.26(0.56-2.83)	0.56
AA	0	0		
G allel sıklığı	0.51	0.49	Referans	
T allel sıklığı	0.45	0.48	1.11(0.63-1.95)	0.77
A allel sıklığı	0.04	0.03	1.04(0.24-4.39)	1.00

KAH-Kontrol gruplarında PAF değerlerinin C3435T ve G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılmasında(Tablo 4-6) tüm genotipler için PAF düzeyleri Kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık tespit edilmedi.Her bir polimorfizm kendi içinde değerlendirilmiştir. C3435T için $p=0.10$ ve G2677A/T için $p=0.117$ olarak bulunmuştur. (One-way ANOVA.Post-hoc Tukey)

Tablo 4. 6. KAH- Kontrol gruplarında PAF değerlerinin, C3435T ve G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılması

Polimorfizm	PAF pg/ml			
	KAH (n=99)		Kontrol (n=62)	
	Ort $\pm$ SD (n)	CV	Ort $\pm$ SD (n)	CV
C3435T				
CC	39.46 $\pm$ 15.36(n=26)	38.93	34.53 $\pm$ 19.91 (n=15)	57.66
CT	36.28 $\pm$ 18.46 (n=50)	50.88	29.31 $\pm$ 11.87 (n=29)	40.49
TT	40.78 $\pm$ 16.35 (n=23)	40.09	31.22 $\pm$ 15.18 (n=18)	48.62
G2677A/T				
GG	39.96 $\pm$ 17.24 (n=25)	43.14	33.67 $\pm$ 17.69 (n=18)	52.53
GT	38.56 $\pm$ 18.75 (n=48)	48.62	28.73 $\pm$ 13.77 (n=26)	47.92
GA+AT	30.20 $\pm$ 13.47 (n=9)	44.60	21.33 $\pm$ 6.28 (n=3)	29.44
TT	37.71 $\pm$ 14.52 (n=17)	38.50	34.20 $\pm$ 14.27 (n=15)	41.72
AA	0		0	

C3435T için $p=0.101$ One-way ANOVA.Post-hoc Tukey

G2677A/ T için $p=0.117$ One-way ANOVA.Post-hoc Tukey

Aspirin kullanmayan KAH ve Kontrol gruplarının PAF düzeylerinin C3435T genotiplerine göre karşılaştırılmasında gruplar arası analiz için One-way(ANOVA) Tukey test kullanılmıştır. $p=0.0246$ KAH TT Kontrol TT'ye göre anlamlı oranda yüksek Aspirin kullanmayan KAH ve Kontrol gruplarının PAF düzeylerinin G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılmasında G2677A/T gruplar arası analiz için One-way(ANOVA) Tukey test kullanılmıştır. $p=0.012$ Hasta GT ,Kontrol GT'ye göre anlamlı oranda yüksek **bulunmuştur** **Tablo 4-6a** **tablo 4-6 ile karşılaştırıldığında** Aspirin kullanmayan KAH ve Kontrol gruplarının PAF düzeylerinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.6. A. ASA kullanmayan KAH- Kontrol gruplarında PAF değerlerinin, C3435T ve G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılması

Polimorfizm	KAH (n=25)		Kontrol (n=36)	
	Ort $\pm$ SD (n)	CV	Ort $\pm$ SD (n)	CV
C3435T				
CC	47.14 $\pm$ 10.19 (n=7)	21.61	38.60 $\pm$ 21.52 (n=10)	55.75
CT	46.46 $\pm$ 15.53 (n=13)	33.42	30.47 $\pm$ 12.99 (n=15)	42.65
TT	54.20 $\pm$ 15.90 (n=5)	29.33	34.00 $\pm$ 18.20 (n=11)	53.53
G2677A/T				
GG	51.60 $\pm$ 9.40 (n=5)	18.21	35.70 $\pm$ 21.56 (n=10)	60.38
GT	46.38 $\pm$ 14.68 (n=16)	31.65	29.94 $\pm$ 14.33 (n=18)	47.86
GA+AT	39.00 (n=1)		15.00 (n=1)	
TT	55.33 $\pm$ 20.26 (n=3)	36.61	43.71 $\pm$ 14.28 (n=7)	32.67
AA	0		0	

One-way ANOVA.Post-hoc Tukey

C3435T $p=0.0246$, G2677A/T $p=0.012$

MDR-1'in doğal substratı olan PAF ELİSA yöntemi ile tespit edildi. Toplam KAH grubu hastalık şiddetine göre 1-2-3 Damar olarak gruplandırıldı ve kontrol grubu ile tüm gruplar kendi aralarında karşılaştırıldı (Tablo 4-7).

Hastalık şiddetine göre KAH - Kontrol grupları arasında Plazma PAF düzeylerinin, C3435T genotiplerine göre karşılaştırılmasında 3 Damar CT genotipinin PAF düzeyleri kontrol CT genotipine göre ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. ($p=0.006$) (One-way ANOVA.Post-hoc Tukey) (Tablo 4-7) C3435T polimorfizmi için CT genotipine sahip 3 damar tıkalı hastalarda PAF düzeylerinin kontrol CT'ye göre yüksek bulunması CT genotipinin hastalık şiddeti bakımından bir risk faktörü olduğunu düşündürülebilir.

Hastalık şiddetine göre KAH - Kontrol grupları arasında Plazma PAF düzeylerinin, G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılmasında 1 Damar GG genotipine sahip hastaların PAF düzeyleri 3 Damar GG genotipine göre istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı olarak düşük bulunmuştur. 1 Damar GG 3 Damar GT ile karşılaştırıldığında Plazma PAF düzeyleri İstatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı olarak düşüktür. ($p=0.003$) (Tablo 4-7). 3 Damar GG genotipi kontrol GT genotipiyle karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek bulundu. 3 Damar GT genotipi ile kontrol GT genotipi karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.003$). (One-way ANOVA.Post-hoc Tukey) (Tablo 4-7). G2677A/T polimorfizmi için GG,GT genotipine sahip 3 damar tıkalı hastalarda plazma PAF düzeylerinin 1 Damar GG,GT genotipine göre yüksek bulunması GG,GT genotipinin hastalık şiddeti bakımından bir risk faktörü olduğunu düşündürülebilir.

Tablo 4. 7. Hastalık şiddetine göre KAH - Kontrol grupları arasında ,PAF düzeylerinin, C3435T ve G2677A/T genotipleri ile değerlendirilmesi

Polimorfizm	KAH (n=99)		Kontrol (n=62)		1 Damar (n=33)		2 Damar (n=35)		3 Damar (n=31)	
	Ort ±SD (n)	CV	Ort ±SD (n)	CV	Ort ±SD (n)	CV	Ort ±SD (n)	CV	Ort ±SD (n)	CV
C3435T										
CC	39.46±15.36(n=26)	38.93	34.53±19.91 (n=15)	57.66	30.44±11.23 (n=9)	36.89	37.67±9.41 (n=9)	24.98	51.63±17.86 (n=8)	34.59
CT	36.28±18.46 (n=50)	50.88	29.31±11.87 (n=29)	40.49	31.53±14.90 (n=17)	47.25	31.56±16.78 (n=18)	53.16	47.33±20.26 ^a (n=15)	42.80
TT	40.78±16.35 (n=23)	40.09	31.22±15.18 (n=18)	48.62	33.71±12.62 (n=7)	37.43	46.13±19.10 (n=8)	41.40	41.63±15.98 (n=8)	38.38
G2677A/T										
GG	39.96±17.24 (n=25)	43.14	33.67±17.69 (n=18)	52.53	23.56±6.76 ^{b,c} (n=9)	28.69	44.00±15.93 (n=7)	36.20	53.22±11.86 ^d (n=9)	22.28
GT	38.56±18.75 (n=48)	48.62	28.73±13.77 (n=26)	47.92	34.75±14.92 (n=16)	42.93	34.95±18.28 (n=21)	52.30	51.00±20.73 ^e (n=11)	40.64
GA+AT	30.20±13.47 (n=9)	44.60	21.33±6.28 (n=3)	29.44	39.21±11.57 (n=3)	25.64	32.43±4.24 (n=2)	13.25	26.50±17.23 (n=4)	65.01
TT	37.71±14.52 (n=17)	38.50	34.20±14.27 (n=15)	41.72	32.20±13.63 (n=5)	42.32	34.94±11.25 (n=5)	33.08	44.29±16.34 (n=7)	36.89
AA	0		0		0		0		0	

NOT: Sayı yetersiz olduğu için GA ve AT genotipleri tek grupta birleştirilmiştir. AA genotipine rastlanmamıştır.

C3435T genotipi için $p = 0.006$ (One –way ANOVA-Tukey test). ^a $p = 0.006$ kontrol CT genotipi ile karşılaştırıldığında

G2677A/T genotipi için $p = 0.003$ (One –way ANOVA-Tukey test)

^b p 3Damar GG genotipi ile karşılaştırıldığında

^c p 3Damar GT genotipi ile karşılaştırıldığında

^{d,e} p Kontrol GT genotipi ile karşılaştırıldığında

ASA Kullanmayan KAH ve Kontrol Gruplarında, PAF (pg/mL) Düzeylerinin, Hastalık Şiddetine ve C3435T - G2677A/T Genotiplerine Göre Değerlendirilmesi Tablo 4-7a'da verilmiştir. Hastalık şiddetine göre KAH - Kontrol grupları arasında Plazma PAF düzeylerinin, C3435T genotiplerine göre karşılaştırılmasında ($p=0.544$) Gruplar arasında PAF(pg/mL) Düzeyleri oldukça değişken olarak görülmüştür. Yapılan istatistiksel değerlendirmede alt gruplar arası "n" sayıları yetersiz olduğu için ANOVA testi sağlıklı sonuç vermemiştir. Hasta sayılarının alt gruplardaki n yetersizliği göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede Total KAH'da en yüksek değere TT genotipinde Hastalık şiddetine göre yine TT genotipinde rastlanmıştır (Tablo4-7a.) Bu bulgular Tablo 4-7 ile karşılaştırıldığında Total KAH'da benzer olmasına rağmen Hastalık şiddetindeki tabloya uymamaktadır. (One-way ANOVA.Post-hoc Tukey) (Tablo 4-7a)

ASA kullanmayan KAH - Kontrol grupları arasında hastalık şiddetine göre Plazma PAF düzeylerinin, G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılması Tablo 4-7a'da verilmiştir. Hastalık şiddetine göre KAH - Kontrol grupları arasında plazma PAF düzeylerinin, G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılmasında ($p=0.0127$). (One –way ANOVA-Tukey test). Gruplar arasında PAF (pg/mL) düzeyleri oldukça değişken olarak görülmüştür. Yapılan istatistiksel değerlendirmede alt gruplar arası "n" sayıları yetersiz olduğu için ANOVA testi anlamlılık vermesine rağmen güvenilirliği ve sağlıklı sonuç için yüksek n değerlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hasta sayılarının alt gruplardaki n yetersizliği göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede Total KAH'da en yüksek değere TT genotipinde, hastalık şiddetine göre yapılan değerlendirmede yine TT genotipinde rastlanmıştır. Tablo 4-7a Hastalık şiddetindeki değerler yönünden Tablo 4-7 ile farklılıklar göstermektedir.

Tablo 4.7. A. ASA Kullanmayan KAH ve Kontrol Gruplarında, PAF(pg/mL) Düzeylerinin, Hastalık Şiddetine ve C3435T - G2677A/T Genotiplerine Göre Değerlendirilmesi

Polimorfizm	KAH (n=25)		Kontrol (n=36)		1 Damar (n=12)		2 Damar (n=8)		3 Damar (n=5)	
	Ort ±SD (n)	CV	Ort ±SD (n)	CV	Ort ±SD (n)	CV	Ort ±SD (n)	CV	Ort ±SD (n)	CV
C3435T										
CC	47.14±10.19 (n=7)	21.61	38.60±21.52 (n=10)	55.75	40.00±1.41 (n=2)	3.54	45.75±6.24 (n=4)	13.64	67.00±0 (n=1)	0
CT	46.46±15.53 (n=13)	33.42	30.47±12.99 (n=15)	42.65	42.43±13.24 (n=7)	31.20	43.00±4.58 (n=3)	10.66	59.33±24.01 (n=3)	40.46
TT	54.20±15.90 (n=5)	29.33	34.00±18.20 (n=11)	53.53	43.67±5.03 (n=3)	11.53	62.00±0 (n=1)	0	78.00±0 (n=1)	0
G2677A/T										
GG	51.60±9.40 (n=5)	18.21	35.70±21.56 (n=10)	60.38	0	0	48.00±5.29 (n=3)	11.02	57.00±14.14 (n=2)	24.81
GT	46.38±14.68 ^a (n=16)	31.65	29.94±14.33 (n=18)	47.86	42.33±11.48 (n=9)	27.11	46.00±9.67 (n=5)	21.02	65.50±30.41 (n=2)	46.42
GA+AT	39.00 (n=1)		15.00 (n=1)		39.00 (n=1)	0	0	0	0	0
TT	55.33±20.26 (n=3)	36.61	43.71±14.28 (n=7)	32.67	44.00±7.07 (n=2)	16.07	0	0	78.00 (n=1)	0
AA	0		0		0		0		0	

NOT: Sayı yetersiz olduğu için GA ve AT genotipleri tek grupta birleştirilmiştir. AA genotipine rastlanmamıştır.
C3435T genotipi için p=0.544 (One –way ANOVA-Tukey test).
G2677A/T genotipi için p=0.0127(One –way ANOVA-Tukey test)

HAPLOTİP ANALİZ SONUÇLARI

Genotip-fenotip ilişkisi haplotiplerle incelenir. Haplotip, bir lokusta bulunan ve birlikte taşınan farklı alellerin bir kombinasyonu olarak tanımlanabilir. Haplotip, bir gen için var olan varyantların her kromozom üzerinde birlikte nasıl bulunduğunu gösterir.

Haplotip Terimleri:

r^2 =İki SNP arasındaki bağlantı katsayısının karesi ($r^2=1$ ise rekombinasyon olmamış ve her iki allel birlikte aktarılmış. Eğer $r^2 < 1$ ise rekombinasyon olmuş ve birlikte kalıtımla ihtimali düşmüştür.

LOD= Göreceli risk oranları (10 tabanlı) logaritması. En yüksek LOD skoruna sahip nokta bağlantı olasılığının en yüksek olduğu yer sayılır. LOD arttıkça r^2 artar.

Yapılan haplotip çalışmalarında C3435T ve G2677A/T polimorfizmlerinin birlikte kalıtılma oranları yüksek bulunmuştur. Her iki polimorfizmin birbirlerinin fonksiyonu üzerine etkili olabileceği belirtilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak yapmış olduğumuz çalışmada haplotip analizi ile hangi alellerin daha çok birlikte kalıtıldığı ve bu alelleri birlikte taşıyanların plazma PAF düzeylerinin ne şekilde etkilendiğini araştırdık.

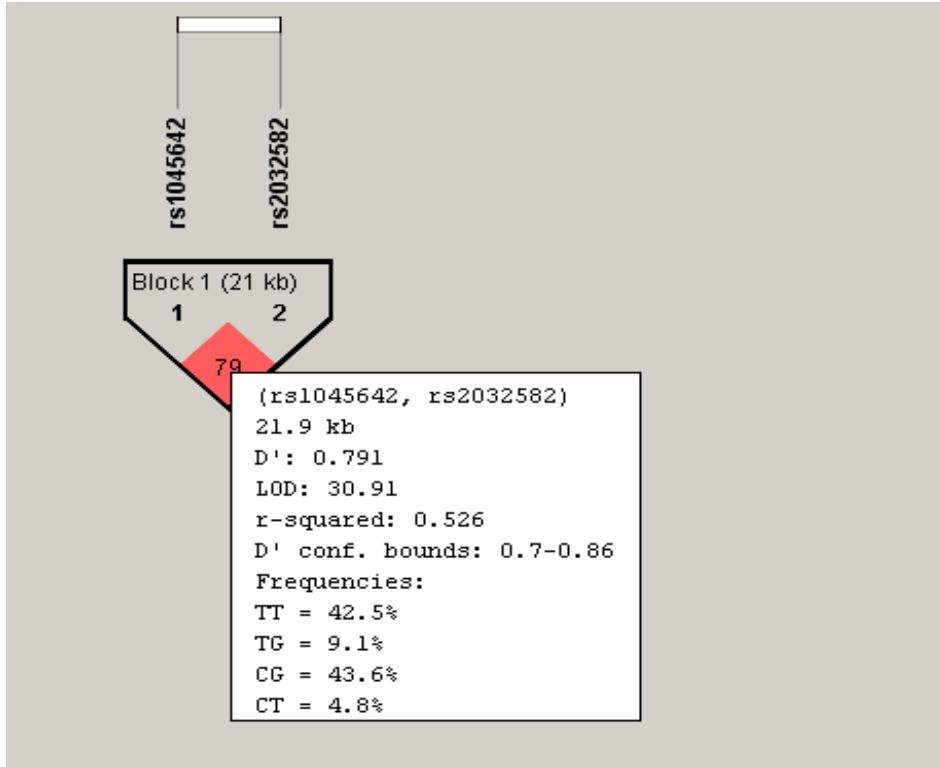
C3435T ve G2677A/T (A alelleri çıkartılarak) polimorfizmlerinin haplotip analiz sonuçları Haplowiew (3.32 sürüm) programıyla hesaplanıp Tablo 4-8'de verilmiştir. Çalışmamız 113 KAH ve 85 Kontrol grubuyla gerçekleştirilmiştir. Her iki grupta MDR-1 geninde en sık görülen C3435T ve G2677A/T polimorfizmleri PCR ve RFLP yöntemleriyle genotiplendirilmiştir. G2677A/T triallelik bir polimorfizm olup C3435T polimorfizmi ile bağlantı dengesizliği içinde bulunduğu öne sürülmüştür. Haplowiew programı triallelik polimorfizmleri hesaplayamadığı için G2677A/T'deki A alelleri çıkartılarak hesaplama yapılmıştır. Toplam 4 Haplotip kendi aralarında değerlendirilmiştir. (KAH grubunda toplam 10 kişi Kontrol grubunda toplam 5 kişi A alelini heterozigot taşımaktaydı, AA genotipine hiçbir grupta rastlanmamıştır). Haplotip frekansları açısından değerlendirildiğinde (χ^2 ve p) KAH ve Kontrol grupları arasında herhangi bir anlamlılık görülmedi. Haplotipler açısından tablo Hardy Weinberg dağılımına uygun bulunmuştur. KAH grubu kendi arasında Haplotip % frekans olarak değerlendirildiğinde en sık görülden en az görülene doğru sıralandığında C-G(%46), T-T(%42), T-G(%8), C-T(%4), Kontrol grubunda ise T-T(%43), C-G(%41), T-G(%10),

C-T(%5) olarak bulunmuştur. Hasta ve Kontrol gruplarında en sık görülen iki haplotip C-G ve T-T olarak tespit edilmiştir. (Tablo 4-8) A allelleri çıkartılarak C3435T ve G2677A/T haplotip sonuçları Şekil 4-8'te verilmiştir. $r^2=0.526$ $D'=0.79$ olarak bulundu. Bu sonuçlar iki polimorfizmin birlikte kalıtımla oranlarının yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 4. 8. C3435T ve G2677A/T Polimorfizmlerinin Haplotip Analiz Sonuçları (A alleli çıkartılarak yapılmıştır)

Haplotip İlişkileri	Hasta (%)	Kontrol (%)	χ^2	p değeri
C-G	46	41	0.82	0.37
T-T	42	43	0.10	0.75
T-G	8	10	0.47	0.49
C-T	4	5	0.19	0.66

KAH – Kontrol gruplarında haplotiplerin frekansları



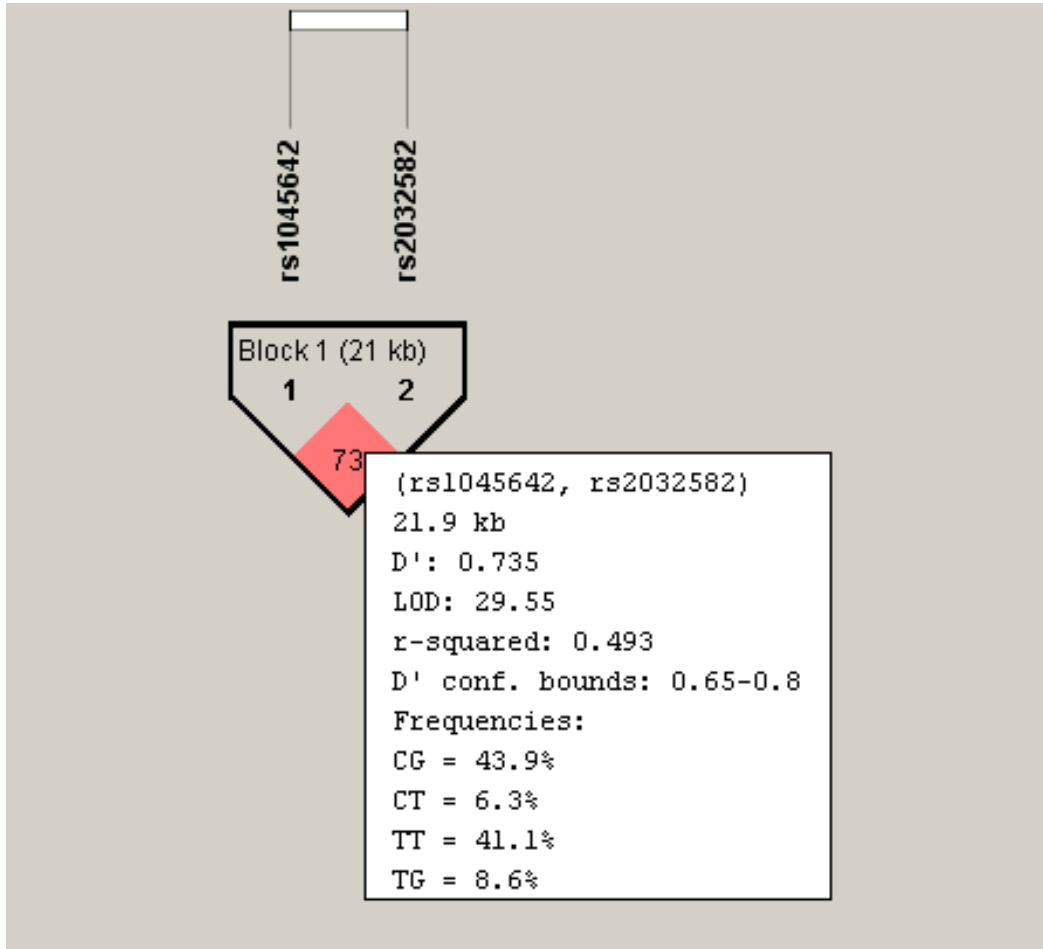
Şekil 4. 1. C3435T ve G2677A/T Polimorfizmlerinin Haplotip Analiz Sonuçları (A alleli çıkartılarak yapılmıştır).

C3435T ve G2677A/T (A allelleri GT genotipine dahil edilmiştir.) Polimorfizmlerin haplotip analiz sonuçları Haplowiev (3.32 sürüm) programıyla hesaplanıp Tablo4-9'da verilmiştir. Çalışmamız 113 KAH ve 85 Kontrol grubuyla gerçekleştirilmiştir. Her iki grupta MDR-1 geninde en sık görülen C3435T ve G2677A/T polimorfizmleri PCR ve RFLP yöntemleriyle genotiplendirilmiştir. G2677A/T triallelik bir polimorfizm olup C3435T polimorfizmi ile bağlantı dengesizliği içinde bulunduğu öne sürülmüştür. Haplowiev programı triallelik polimorfizmleri hesaplayamadığı için G2677A/T'deki A allelleri G-T genotipine dahil edilerek biallelik formatında hesaplama yapılmıştır. Toplam 4 Haplotip kendi aralarında değerlendirilmiştir. (KAH grubunda toplam 10 kişi Kontrol grubunda toplam 5 kişi A allelini heterozigot taşımaktaydı, AA genotipine hiçbir grupta rastlanmamıştır). Haplotip frekansları açısından değerlendirildiğinde (χ^2 ve p) KAH ve Kontrol grupları arasında herhangi bir anlamlılık göstermedi. Haplotipler açısından değerlendirildiğinde gruplar Hardy Weinberg dağılımına uygun bulunmuştur. KAH grubu kendi arasında Haplotip % frekans olarak değerlendirildiğinde en sık görülen en az görülene doğru sıralandığında C-G(%46), T-T(%40), T-G(%8), C-T(%4), Kontrol grubunda ise T-T(%43), C-G(%41), T-G(%10), C-T(%6) olarak bulunmuştur. Hasta ve Kontrol gruplarında en sık görülen iki haplotip C-G ve T-T olarak tespit edilmiştir. (Tablo 4-9) Bu bulgular Tablo 4-8 ile paralellik göstermektedir. A allelleri G-T genotipine dahil edilerek C3435T ve G2677A/T haplotip sonuçları Şekil 4-9'da verilmiştir. $r^2=0.493$ $D'=0.735$ olarak bulundu. Bu sonuçlar iki polimorfizmin birlikte kalıtımla oranlarının yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 4. 9. C3435T ve G2677A/T Polimorfizmlerinin Haplotip Analiz Sonuçları (A alleli, GT genotipi taşıyan bireylere dahil edilmiştir)

Haplotip İlişkileri	KAH(%)	Kontrol (%)	χ^2	p değeri
C-G	46	41	0.81	0.37
T-T	40	43	0.23	0.63
T-G	8	10	0.58	0.45
C-T	6	6	0.0	0.99

KAH –Kontrol gruplarında haplotiplerin frekansları



Şekil 4. 2. C3435T ve G2677A/T Polimorfizmlerinin Haplotip Analiz Sonuçları (A alleli, GT genotipi taşıyan bireylere dahil edilmiştir)

C3435T ve G2677A/T Polimorfizmlerinin MİDAS Haplotip Analiz Sonuçları Tablo 4-10'da verilmiştir. G2677A/T triallelik polimorfizmini hesaplayabilen bir program olan Midas ile 113 KAH ve 85 Kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Toplam 6 Haplotip bulunmuştur. AA genotipi hiçbir grupta görülmemiştir. (KAH grubunda toplam 10 kişi Kontrol grubunda toplam 5 kişi A allelini heterozigot olarak taşımaktaydı). Her iki grupta MDR-1 geninde en sık görülen C3435T ve G2677A/T polimorfizmleri PCR ve RFLP yöntemleriyle genotiplendirilmiştir. G2677A/T triallelik bir polimorfizm olup C3435T polimorfizmi ile bağlantı dengesizliği içinde bulunduğu öne sürülmüştür. Toplam 6 Haplotip kendi aralarında değerlendirilmiştir. Haplotip frekansları açısından değerlendirildiğinde KAH ve Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilmedi. Haplotipler Hardy Weinberg dağılımına uygun bulunmuştur. KAH grubu kendi arasında Haplotip % frekans olarak değerlendirildiğinde en sık görülden en az görülene doğru sıralandığında

C-G(%43.01), T-T(%38.84), T-G(%7.86), C-T(%5.84), C-A(%4.43) ve T-A(%0), Kontrol grubunda ise T-T(%41.82), C-G(%38.70), T-G(%10.12), C-T(%6.41), C-A (%2.94) ve T-A(%0) olarak bulunmuştur. Hasta ve Kontrol gruplarında en sık görülen iki haplotip C-G ve T-T olarak tespit edilmiştir (Tablo 4-10). Bu bulgular Tablo 4-8 ve Tablo 4-9 ile benzerlik göstermektedir. Triallelik polimorfizmlerin hesaplanmasında kullanılan MIDAS haplotip programı bulgularımıza göre T-G, C-T ve C-A haplotipleri KAH ve Kontrol gruplarında %10 ve altında frekanslarda görülmüştür. T-A Haplotipine ise hiçbir grupta rastlanmamıştır. KAH ve Kontrol gruplarında en yüksek frekansa sahip iki haplotip C-G ve T-T olarak bulunmuştur.

Tablo 4. 10. C3435T ve G2677A/T Polimorfizmlerinin MİDAS Haplotip Analiz Sonuçları

Haplotip İlişkileri	KAH(n=113)	Kontrol(n=85)
T-A	0.0	0.0
T-G	0.0786	0.1012
T-T	0.3884	0.4182
C-A	0.0443	0.0294
C-G	0.4301	0.3870
C-T	0.0584	0.0641

KAH –Kontrol gruplarında haplotiplerin frekansları

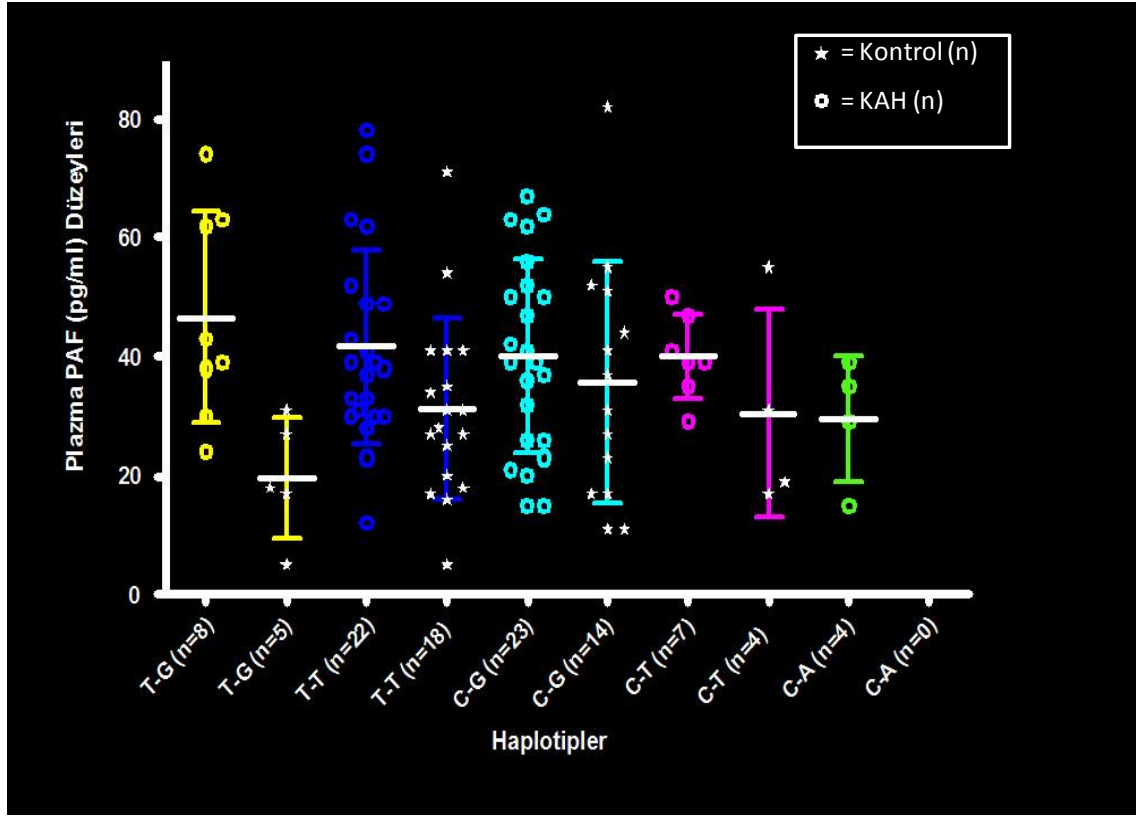
KAH-Kontrol Gruplarında C3435T ve G2677A/T Haplotiplerine Göre PAF Düzeylerinin Karşılaştırılması Tablo 4-11'da verilmiştir. KAH ve Kontrol gruplarında haplotiplere göre PAF seviyeleri One-Way ANOVA post-hoc Tukey test ile kıyaslanmıştır. $p=0.06$ ile anlamlılık sınırına yakın bulunmuştur. Değerler incelendiğinde KAH grubunda tüm haplotiplerde PAF düzeylerinin Kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır. En yüksek fark ise T-G haplotipini taşıyan grupta görülmüştür. Aradaki fark anlamlılık sınırına yakın olarak bulunmuştur (Tablo 4-11). Şekil 4-3

Tablo 4. 11. KAH-Kontrol Gruplarında C3435T ve G2677A/T Haplotiplerine Göre PAF(pg/ml) Düzeylerinin Karşılaştırılması

C3435T G2677A/T Haplotipleri	KAH Ort $\pm$ Std (n=64)	CV	Kontrol Ort $\pm$ Std (n=41)	CV
T-A	0	0	0	0
T-G	46.63 $\pm$ 17.68 (n=8)	37.92	19.60 $\pm$ 10.09 (n=5)	51.48
T-T	41.55 $\pm$ 16.31 (n=22)	39.26	31.22 $\pm$ 15.18 (n=18)	48.62
C-A	29.50 $\pm$ 10.50 (n=4)	35.61	0	0
C-G	40.13 $\pm$ 16.17 (n=23)	40.30	35.64 $\pm$ 20.18 (n=14)	56.61
C-T	40.00 $\pm$ 7.05 (n=7)	17.62	30.50 $\pm$ 17.46 (n=4)	57.26

p= 0.06 One –way ANOVA Post-hoc Tukey

KAH-Kontrol Gruplarında C3435T ve G2677A/T Haplotiplerine Göre Plazma PAF (pg/ml) Düzeylerinin Karşılaştırılması



Şekil 4. 3. KAH-Kontrol Gruplarında C3435T ve G2677A/T Haplotiplerine Göre Plazma PAF (pg/ml) Düzeylerinin Karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Hasarlanmış endotel membranından ve inflamasyonda rol alan aktive olmuş ücrelerden salınan PAF aynı zamanda trombositlerin aktive olmasına yol açar (6,7). Hücre içindeki PAF MDR-1'in doğal substratıdır, PAF hücre dışına MDR-1 tarafından taşınır. MDR-1 geninde meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon veya polimorfizm MDR-1 proteininin taşıdığı substratın miktarına veya taşınma hızına etki edebilir. Literatürlerde KAH olgularında plazma PAF düzeylerinin yükseldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (8,9,10,11). Fakat yaptığımız literatür taramalarında KAH olgularında plazma PAF düzeyleri ile MDR-1 genotipi arasındaki ilişkiyi açıklayan herhangi bir yayına rastlanmamıştır.

Çalışmamızın ilk bölümünde KAH ve Kontrol gruplarında plazma PAF düzeylerini ELISA yöntemiyle tespit ettik. KAH olgularını hastalık şiddetine göre (1-2-3 damar tıkanıklığı) olarak alt gruplara ayırdık. Bu alt gruplar ile PAF düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırdık. Aynı zamanda KAH, alt gruplar ve kontrol gruplarında trombosit fonksiyonlarının ne şekilde değiştiğini gözlemlemek amacıyla ADP uyararı vererek lumiagregometre cihazında trombosit fonksiyonlarını inceledik.

Çalışmamızın ikinci bölümünde ise MDR-1'in doğal substratlarından biri olan PAF'ın plazma konsantrasyonlarının MDR-1 polimorfizmi ile ilişkisini araştırdık. Bu amaçla KAH ve kontrol gruplarında MDR-1 geninde en sık bildirilen 2 polimorfik bölgeyi (C3435T ve G2677A/T) PCR-RFLP yöntemleri ile tespit edip; genotiplerin, hastalık şiddeti, plazma PAF konsantrasyonları ve trombosit fonksiyonları ile ilişkisi olup olmadığını araştırdık.

MDR-1'in doğal substratlarından biri olan PAF proinflamatuvar bir mediatördür. PAF düzeylerinin inflamatuvar hastalıklarda arttığını gösteren bir çok yayın bulunmaktadır (8,9,10,11). Çalışmamızda trombotik ve inflamatuvar hastalıklardan olan KAH ve Kontrol gruplarında plazma PAF düzeylerini ELISA yöntemiyle tespit ettik. KAH ve Kontrol gruplarında plazma PAF düzeylerinin karşılaştırılması tablo 4-3'de gösterilmiştir. KAH grubunda plazma PAF düzeyleri, Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.009$). Bu bulgumuz literatürlerde yer alan KAH'ın inflamatuvar bir hastalık olduğu bilgisini

desteklemektedir. KAH yalnızca inflamatuvar bir hastalık olmakla kalmayıp aynı zamanda trombosit fonksiyonlarını arttırıcı etkisiyle de sürecin kronikleşmesini ve ilerlemesini sağlar.

Çalışma gruplarımızda trombosit fonksiyonları, sekresyon ve agregasyon açısından değerlendirilmek üzere lumiagregometre cihazı yardımı ile ADP uyarımı verilerek çalışıldı. KAH ve Kontrol gruplarında, trombosit agregasyon eğrisinin (kurbunun) iki ölçüsü olan Eğim (Ω) ve % Amplitüd cinsinden değerlendirilerek yapılan karşılaştırmada KAH ve Kontrol grupları arasında Eğim (Ω) ve %Amplitüd değerleri açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilememiştir. Eğim ($p=0.526$), Amplitüd ($p=0.056$) (Tablo 4-3).

Eğim KAH grubunda Kontrol grubuna oranla yüksek bulunmakla beraber istatistiksel olarak bir anlamlılık göstermemiştir. %Amplitüd değerleri ise KAH grubuna göre Kontrol grubunda daha yüksek bulunmuştur. KAH grubunun literatürle çelişen % Amplitüd değerlerindeki bu düşüklüğün sebebinin COX enzim inhibitörlerinden ASA kullanımına bağlı olabileceğini düşündük. Trombosit fonksiyonları üzerine inhibisyon etkisi yapan ASA'nın etkilerini dışlamak amacıyla gereçler kısmında belirttiğimiz KAH grubundan ASA kullanmayan 29 kişi(%26) ile Kontrol grubundan ise yine ASA kullanmayan 50 kişi (%58) kişiyi alarak oluşturduğumuz ikinci grubumuzda tüm parametreleri yeniden değerlendirdik. Bulgular PAF (pg/mL) ve Eğim (Ω) değerleri için Tablo 4-3 ile paralellik gösterirken trombosit agregasyon %Amplitüd değerleri açısından ASA Ø KAH kontrole göre yüksek çıkmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. (Tablo 4-3a).

Bu bulgularımız ASA kullanımının trombosit fonksiyonlarını belli oranlarda inhibe ettiğini göstermektedir, ASA'nın bu inhibisyon etki daha çok trombosit agregasyon eğrisinin (kurbunun) agregasyon fazı olan % Amplitüd değerleri üzerinden olmaktadır.

KAH grubunda yüksek olarak bulduğumuz plazma PAF düzeylerinin, hastalık şiddetine göre değişip değişmediğini gözlemlemek amacıyla KAH hasta grubunu hastalık şiddetine göre (1-2-3 damar tıkalı) olarak ayırdık. Grupların plazma PAF düzeylerinin karşılaştırılması tablo 4-4'te verilmiştir. Hastalık şiddetine (1-2-3 damar tıkalı) göre KAH grubunda plazma PAF düzeylerinin arttığı görülmüştür. Tablo 4-4'te 1 Damar KAH ve Kontrol grubu PAF düzeyleri benzer bulundu. 3 Damar KAH

hastalarının 1 Damar KAH ve Kontrol grubu plazma PAF düzeyleri kıyaslandığında, 3 damar tıkalı hastaların PAF düzeyleri istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0002$). Bu bulgumuz hastalık şiddeti ile PAF düzeyleri arasında ilişki olduğunu göstermektedir.

Trombosit fonksiyonları, sekresyon ve agregasyon açısından hastalık şiddetine göre (1-2-3 damar tıkalı) değerlendirilmek üzere KAH ve Kontrol grupları, trombosit agregasyon eğrisinin (kurbunun) iki ölçüsü olan Eğim (Ω) ve % Amplitüd cinsinden karşılaştırıldı. Hastalık şiddetine göre KAH ve Kontrol Grupları arasında Eğim (Ω) ve % Amplitüd değerleri açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilememiştir. % Amplitüd değerleri 3 damar tıkalı KAH hastalarında %60.63 değeri ile toplam KAH ve kontrol grubuna göre en düşük bulunmuştur. Plazma PAF düzeyleri en yüksek olan 3 damar tıkalı KAH hastalarında %Amplitüd değerleri en düşük bulundu. Bu düşüklüğün sebebini araştırmak amacıyla ASA kullanmayan(Ø) grupla karşılaştırma gereği duyduk. Eğim ($p=0.461$), Amplitüd ($p=0.140$) (Tablo 4-4).

ASA kullanmayan(Ø) KAH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulduğumuz plazma PAF düzeylerinin, hastalık şiddetine göre değişip değişmediğini gözlemlemek amacıyla ASA(Ø) KAH hasta grubunu hastalık şiddetine göre (1-2-3 damar tıkalı) olarak ayırdık. Alt grupların plazma PAF düzeylerinin karşılaştırılması tablo 4-4a'da verilmiştir. Hastalık şiddetine (1-2-3 damar tıkalı) göre KAH grubunda plazma PAF düzeylerinin arttığı görülmüştür. Plazma PAF düzeyleri tablo 4-4 ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu bulgumuz ASA kullanımının plazma PAF düzeylerini azalttığını göstermektedir. Proinflatuar bir mediatör olan PAF, ASA'nın antinflatuar etkisi ile düşmüş olabilir.

PAF etkisini spesifik reseptörleri aracılığıyla gösterir. Bu reseptörler G-proteini aracılı reseptörlerdir. Trombosit membranı üzerinde PAF reseptörleri mevcuttur. IP-3 ve hücre içi kalsiyumun mobilizasyonu DAG ile PKC'yi uyarır ve sonuçta PLC aktifleşir.

PLC aktivasyonundan bağımsız olarak PAF, kalsiyum kanalları aracılığıyla sitozolik kalsiyumun artmasına yol açar. Artan hücre içi kalsiyum yukarıda belirttiğimiz sinyal yolağını uyarır ve trombosit agregasyonuna aracılık eder. Ayrıca tromboxan A2 trombosit agregasyonunun güçlü bir uyarandır.

Siklooksijenaz enzimi Araşidonik Asit (AA) metabolitlerinden prostoglandin (PG), prostosiklin (PS) ve tromboxan A2 (TXA2) oluşumu için kilit enzimdir. TXA2 trombosit agregasyonunda önemli role sahiptir. COX-1 enzim inhibitörleri (ASA) AA metabolit oluşumunu inhibe ederek trombosit agregasyonunu engellerler. Yapılan bir invitro çalışmada COX enzim inhibitörleri kullanılarak trombosit agonistlerinden PAF ve epinefrinin trombosit agregasyonu etkilerinin bloke edildiği gösterilmiştir (231). Fakat bu blokaj etkisinin trombosit fonksiyonlarından daha çok hangisi üzerine olduğunu gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Yapmış olduğumuz çalışmada ASA kullanmayan grupta PAF düzeylerinin daha yüksek çıkması ASA kullanımının PAF düzeylerini düşürdüğünü ayrıca ASA kullanımı ile trombosit fonksiyonlarından daha çok agregasyon fazının % Amplitüd değerlerinin etkilendiğini söyleyebiliriz. Bu bilgi çalışmamıza özgünlük getirmektedir.

Tablo 4-4a'da 1 Damar KAH ve Kontrol grubu plazma PAF düzeyleri 3 Damar KAH ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.0001$). Bu bulgumuz hastalık şiddeti ile PAF arasında ilişki olduğunu göstermektedir.

Trombosit fonksiyonları, sekresyon ve agregasyon açısından değerlendirilmek üzere lumiagregometre cihazı yardımı ile ADP uyararı verilerek çalışıldı. Hastalık şiddetine göre (1-2-3 damar tıkalı) KAH ve Kontrol grupları, trombosit agregasyon eğrisinin (kurbunun) iki ölçüsü olan Eğim (Ω) ve % Amplitüd cinsinden değerlendirilerek karşılaştırıldı. Hastalık şiddetine göre KAH ve Kontrol Grupları arasında Eğim (Ω) ve % Amplitüd değerleri açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilememiştir. Eğim ($p=0.645$) Amplitüd ($p=0.969$) (Tablo 4-4a). Tablo 4-4 ve 4-4a'da 3 damar KAH olgularında %Amplitüd değerleri en düşük bulunmuştur. Bu duruma açıklık getirebilmek için 3 damar hastalarında PAF reseptörleri incelenebilir.

Çalışmamızın 2. bölümünde KAH ve kontrol gruplarında MDR-1 geninde sık olarak bildirilen C3435T ve G2677A/T polimorfizmlerini inceledik.

MDR-1 geninde ilk olarak 1989 yılında Kioka ve arkadaşları tarafından Gly185 Val polimorfizmi bildirilmiştir (232). Akabinde Hoffenmeyer ve arkadaşları MDR-1'in 28 eksonunu ve promotor bölgelerini inceleyerek 15 polimorfizm saptamışlardır. Bu 15 polimorfizmin 12'sinin protein dizisini değiştirmediğini, 2-5 ve 11. eksonlarda bulunan 3'ünün ise a.a değişimine neden olduğunu göstermişlerdir. 26. eksonda bulunan ve a.a değişimine yol açmayan C3435T polimorfizmi ile MDR-1 ekspresyon düzeyi ve P-gp

aktivitesi arasında in vivo olarak kuvvetli bir bağlantı bulunduğunu bildirmiştir (23). Bu çalışmada digoxin alımı sonrası P-gp ekspresyonu ve fonksiyonu immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiş ve MDR-1'in ekspresyon düzeyleri MDR-1 genindeki C3435T polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur. Homozigot olarak TT genotipini taşıyan hastalarda, bu genotipi taşımayanlara oranla duodenumdaki MDR-1 ekspresyonu en düşük bulunmuştur (B45). C3435T polimorfizmi için TT genotipi taşıyanların CC genotipi taşıyanlara göre P-gp'yi barsaklarda daha düşük eksprese ettiği Schaeffeler ve arkadaşları tarafından da desteklenmiştir (233).

Farklı etnik kökenlerde yapılan P-gp ekspresyon çalışmaları polimorfizmlerin etkilerinin ırksal değişim gösterdiğini ortaya koymaktadır. Hoffenmeyer ve Schaeffeler'in aksine Japon toplumunda yapılan bir çalışmada; C3435T polimorfizmi için T allel varlığının, P-gp ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (234).

Kimchi-Sarfaty ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmada; MDR-1 genindeki C3435T polimorfizminin a.a değişimine yol açmayan sessiz bir polimorfizm olmasına rağmen P-gp fonksiyonunu azaltmasının nedenlerini araştırmışlar ve 3 olasılık üzerinde durmuşlardır. Bunlarda birincisi C3435T polimorfizminin fonksiyonel bir polimorfizm olan G2677A/T polimorfizmi ile bağlantı dengesizliği içinde bulunabileceği, ikinci olasılık olarak mRNA kesimi, işlenmesi yada translasyonel düzenlenmeyi etkilemesi ve 3. olasılık olarak bu polimorfizmin P-gp ekspresyonu ve fonksiyonuna etkilerinin taşınan substrata spesifik olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada C3435 T polimorfizminin; P-gp'nin aktivitesini nasıl etkilediği araştırılmış yabanıl tip ve polimorfik P-gp taşıyan hücrelerde mRNA miktarları benzer olmasına rağmen, polimorfik proteinin konformasyonu diğerinden farklı olarak bulunmuştur. Bu durum C3435T sessiz polimorfizminin mRNA ekspresyonunu ve dolayısıyla P-gp miktarını değiştirmedeği ancak kotranslasyonel katlanmaların zamanlamasını ve P-gp'nin membrana çıkışını etkilediğini ve böylece taşıdığı substratın etkileşim bölgelerini değiştirerek hücre içi ve hücre dışı konsantrasyonların değiştiğini ortaya koymuştur (22). KAH ve kontrol gruplarında C3435T ve G2677T/A polimorfizmleri için genotip ve allel frekans dağılımları Tablo 4-5'te verilmiştir. KAH ve Kontrol grupları C3435T ve G2677A/T genotip ve allel sıklıkları dağılımı bakımından karşılaştırıldığında her iki grup arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

Polimorfizmlerdeki allel frekansları ve genotip dağılımları etnik kökene göre farklılıklar gösterir. C3435T polimorfizmi allel sıklıkları değerlendirildiğinde beyaz ırkla yapılan bir çalışmada C allel sıklığı %43,5 ve T allel sıklığı %56,5 olarak saptanmıştır (235). Çin halkında C allel sıklığı %59,6, T allel sıklığı 40,4 (236). Uygurlarda C allel sıklığı %47,2 ,T allel sıklığı 52,8 , Kazaklarda C allel sıklığı %60,2 , T allel sıklığı 39,8 , Hun kökenlilerde ise C allel sıklığı %62,1 , T allel sıklığı 37,9 (237) olarak bulunmuştur.Batı Afrikalılarda ise C allel sıklığı %90, T allel sıklığı 10 olarak gözlenmiştir (233). 2005 yılında Türk toplumunda yapılan bir çalışmada MDR-1 C3435T polimorfizmine ait C allel sıklığı 51,T allel sıklığı 49; genotip sıklıkları ise TT %25, CC %28,2 ve CT %46 olarak bulunmuştur (238). Türk popülasyonunda yapılan başka bir çalışmada ise C allel sıklığı 61,T allel sıklığı 39;genotip sıklıkları ise TT %12, CC %34 ve CT %54 olarak bulunmuştur (239). Bizim yaptığımız çalışmada ise kontrol grubunda C allel sıklığı 48, T allel sıklığı 52; genotip sıklıkları ise TT %32, CC %27 ve CT %41 olarak bulunmuştur (Tablo 4-5). Türk toplumunda daha önce yapılmış olan popülasyon çalışmalarında saptanan allel frekanslarının anlamlı farklılık göstermediği anlaşılmıştır. Bizim çalışmamızda kullanılan kontrol grubunda görülen allel frekansları Hardy Weinberg dağılımına uygun bulunmuştur. Dolayısıyla ortaya çıkan farklılığın genotip hatasından kaynaklanmadığı belirlenmiştir.

Farklı etnik gruplarda görülen genotip ve allel frkansları arasındaki farklar bu polimorfizmin etnik kökene göre farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda yer alan diğer bir polimorfizm olan G2677A/T triallelik'tir. G'nin T ile değişimi, MDR-1 proteininin yapısındaki Alanin yerine Serin, A ile değişimi ise Alanin yerine Treonin oluşumuna yol açar. T veya A allelinin yani polimorfik allellerin bazı yayınlarda kemik iliği, kalp ve barsaklarda MDR-1'in ekspresyonunu arttırdığını (240,241) plasenta dokusunda ise azalttığını göstermişlerdir (b77). Ancak birkaç çalışmada ise ilişki saptanmamıştır (242,243).

C3435T'ye göre G2677A/T polimorfizm sıklığını araştıran popülasyon çalışmalarının sayısı daha azdır (235,237,244). Yapılan bu çalışmalarda T ve G allel frekansları birbirlerine yakın değerlerde bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada G allel sıklığı 49, T allel sıklığı 48 ve A allel sıklığı 3 olarak bulunmuştur. T ve G allel sıklıkları bakımından birbirlerine yakın değerler gözlenmiştir. Genotip dağılımları ise GG %28 ,GT %40, GA %1,AT %5,TT %26 ,AA % 0 olarak tespit edilmiştir. Kontrol

grubu Hardy- Weinberg dağılımına uygun bulunmuştur. Dolayısıyla ortaya çıkan farklılığın genotip hatasından kaynaklanmadığı belirlenmiştir.

Yaptığımız bu çalışmayı özgün kılan ve yaptığımız literatür taramalarında şu ana kadar incelenmemiş olan KAH-Kontrol gruplarında PAF değerlerinin C3435T ve G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılmasında (Tablo 4-6) tüm genotipler için PAF düzeyleri Kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber, gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık tespit edilmedi. Her bir polimorfizm kendi içinde değerlendirilmiştir. C3435T için $p=0.10$ ve G2677A/T için $p=0.117$ olarak bulunmuştur. (One-way ANOVA.Post-hoc Tukey)

Aspirin kullanmayan KAH ve Kontrol gruplarının PAF düzeylerinin C3435T genotiplerine göre karşılaştırılmasında gruplar arası istatistiksel analiz için One-way (ANOVA) Tukey test kullanılmıştır ($p=0.0246$). KAH TT grubunun plazma PAF düzeyleri Kontrol TT'ye göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur.

Aspirin kullanmayan KAH ve Kontrol gruplarının PAF düzeylerinin G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılmasında G2677A/T gruplar arası analiz için One-way(ANOVA) Tukey test kullanılmıştır. $p=0.012$ Hasta GT, Kontrol GT'ye göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur Tablo 4-6a tablo 4-6 ile karşılaştırıldığında Aspirin kullanmayan(Ø) KAH ve Kontrol gruplarının PAF düzeylerinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

MDR-1'in doğal substratı olan PAF ELİSA yöntemi ile tespit edildi. Toplam KAH grubu hastalık şiddetine göre (1-2-3 damar tıkalı) olarak gruplandırıldı ve kontrol grubu ile tüm gruplar kendi aralarında karşılaştırıldı (Tablo 4-7).

Hastalık şiddetine göre KAH - Kontrol grupları arasında Plazma PAF düzeylerinin, MDR-1 C3435T genotiplerine göre karşılaştırılmasında 3 damar tıkanıklığı bulunan KAH hasta grubunda CT genotipini taşıyan bireylerde PAF düzeyleri kontrol CT genotipine göre ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. ($p=0.006$) (One-way ANOVA.Post-hoc Tukey) (Tablo 4-7)Bu durum CT heterozigot genotipi taşıyan kişilerdeki PAF düzeyindeki artışın hastalık için bir risk faktörü olduğunu düşündürmektedir.Bulgularımız Tablo 4-4 ' te 3damar tıkanıklığı olan KAH grubunun yüksek PAF düzeylerinin CT genotipinden kaynaklandığını göstermektedir.

Hastalık şiddetine göre KAH - Kontrol grupları arasında Plazma PAF düzeylerinin, MDR-1 G2677A/T genotiplerine göre karşılaştırılmasında 3 damar tıkalı

GG ve GT genotipine sahip KAH hastalarının plazmaPAF düzeyleri 1 damar tıkalı GG genotipine sahip KAH hastalarına göre istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. ($p=0.003$) (Tablo 4-7) G allelini taşıması risk olabilir mi? Ayrıca 3 damar tıkalı GG ve GT genotipine sahip KAH hasta grubu ,plazma PAF düzeyleri açısından kontrol GT genotipiyle karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek bulundu. ($p=0.003$) (One-way ANOVA.Post-hoc Tukey) (Tablo 4-7) Yine G allelini taşıması risk olabilir mi? Sorularına açıklık getirebilmek amacıyla haplotip analizi yaptık.

Yapılan haplotip çalışmaları MDR-1 geni üzerinde bulan G2677A/T ve C3435T polimorfizmlerinin bağlantı dengesizliği içinde olduğu ve birlikte kalıtımla oranlarının yüksek olduğunu göstermiştir (245). Türk popülasyonunda 107 sağlıklı bireyde yapılan bir çalışmada G2677A/T ve C3435T polimorfizmleri için haplotip frekanslarını T-T % 42.5, G-C %36, G-T %9.8, T-C %6.1, A-C %5.6, A-T %0 bulmuşlardır. $D' = 0.74$ $r^2 = 0.47$ değerleri ile her iki SNP'nin bağlantı dengesizliği içinde olduğu ve birlikte kalıtımla oranlarının yüksek olduğu gösterilmiştir (245).

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada Kontrol grubundaki haplotip frekansları

T-T(%41.82), C-G(%38.70), T-G(%10.12), C-T(%6.41), C-A(%2.94) ve T-A(%0) olarak bulunmuştur. (Tablo 4-10). Bu bulgular Tablo 4-8ve Tablo 4-9 ile benzerlik göstermektedir. Triallel polimorfizmlerin hesaplanmasında kullanılan MIDAS haplotip programı bulgularımıza göre T-G, C-T ve C-A haplotipleri KAH ve Kontrol gruplarında %10 ve altında frekanslarda görülmüştür. T-A Haplotipine ise hiçbir grupta rastlanmamıştır. KAH ve Kontrol gruplarında en yüksek frekansa sahip iki haplotip C-G ve T-T olarak bulunmuştur. Bulgularımız kontrol grubunda frekans değerleri açısından 245 nolu literatür ile benzerlik göstermektedir.

Farklı etnik gruplarda yapılan bir çalışmada MDR-1 geninde en sık bildirilen C1236T, G2677A/T ve C3435T polimorfizmleri için haplotip analizleri yapılmış. Sonuç olarak C-G-C ve T-T-T haplotiplerinin major 2 haplotip olduğu gösterilmiş (246). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada KAH grubunda C-G(%43.01), T-T(%38.84), Kontrol grubunda T-T(%41.82), C-G(%38.70) 2 major grubu oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmalarda C3435T ve G2677A/T polimorfizmlerinin birlikte kalıtılma oranları yüksek ve her iki polimorfizmin birbirlerinin fonksiyonu üzerine etkili olabileceği belirtilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak yapmış olduğumuz çalışmada

haplotip analizi ile hangi allelerin daha çok birlikte kalıtıldığı ve bu allelleri birlikte taşıyanların plazma PAF düzeylerinin ne şekilde etkilendiğini araştırdık.

Tablo 4-7’de MDR-1 genine ait C3435T ve G2677A/T polimorfizmlerinin genotiplerine göre istatistiksel olarak farklılık bulunmayan fakat PAF düzeylerinde farklılık bulduğumuz genotiplerin hangi allelden kaynaklandığını belirleyebilmek amacıyla KAH ve kontrol grupları arasında haplotip dağılımlarına göre plazma PAF düzeylerini karşılaştırdık. Bulgularımız Tablo4-11’de verilmiştir. Sonuçlarımıza göre KAH grubunda T-G haplotipini taşıyanların plazma PAF konsantrasyonları, Kontrol T-G haplotipini taşıyalara göre istatistiksel olarak anlamlılık sınırına yakın bulunmuştur. Sonuç olarak bu bulgumuz KAH olgularında, C3435T polimorfizminde T alleli G2677A/T triallelik polimorfizminde ise G allelini birlikte taşıyor olmak plazma PAF konsantrasyonlarının yüksek olmasına sebep olabilir.

SONUÇ OLARAK ÇALIŞMAMIZDA:

1.Koroner Arter Hastalarında plazma PAF düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur.

2.Hastalık şiddetine göre plazma PAF düzeyleri artmıştır.

3.ASA’nın trombosit fonksiyonlarını inhibisyon etkisini daha çok agregasyon kurbunun % Amplitüd değerleri üzerine olduğu gözlenmiştir.

4.C3435T polimorfizmi için 3 damar tıkalı KAH’larda CT heterozigotidesinin yüksek plazma PAF düzeyleri üzerine etkili olabileceği G2677A/T polimorfizmi için 3 damar tıkalı KAH’larda GG ve GT genotipini taşıyanların yüksek plazma PAF düzeyleri üzerine etkili olabileceği gösterilmiştir.

5. Yaptığımız çalışmadaMDR-1 geni üzerinde bulan G2677A/T ve C3435T polimorfizmlerinin bağlantı dengesizliği içinde olduğu ve birlikte kalıtımla oranlarının yüksek olduğunu göstermiştir.

6.KAH-kontrol grubunda plazma PAF düzeyleri açısından en yüksek fark T-G haplotipine sahip bireylerde gözlenmiştir.

Daha sonraki çalışmalarda plazma PAF düzeyleri PAF-AH aktivitesi ile beraber değerlendirilebilir.

PAF reseptör polimorfizmleri MDR-1 polimorfizmleri birlikte değerlendirilip sonuçlar üzerine etkisi tartışılabilir.

Flow sitometri cihazında trombosit-lökosit agregatları değerlendirilebilir. Aktive olmuş ve istirahat durumundaki hücrelerin durumları yorumlanabilir.

Hücre içi Ca konsantrasyonları belirlenip ve diğer parametreler kıyaslanabilir.

Ox-LDL düzeylerine bakılabilir.

PAF reseptör antagonistleri ile çalışma dizayn edilebilir.

Kontrol sayısı arttırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Sagach VF, Zhukova AV, Braquet P.(1992): Endothelium-dependent effect of platelet-activating factor in the coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* ;20Suppl 12:S85-89
2. Ross R.(1999): Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med*, 340,115-126
3. Ninio E.(2004) :Platelet-activating factor-acetylhydrolase and PAF-receptor gene haplotypes in relation to future cardiovascular event in patients with coronary artery disease. *Human Molecular Genetics*,Vol.13,No.13
4. Triggiani M.(2008): Allergy and cardiovascular system, British Society for Immunology, *Clinical and Experimental Immunology*,153 (Suppl.1): 7-11
5. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM.(2000) Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem*; 69:419-45
6. Shukla SD. (1992): Platelet activating factor receptor and signal transduction mechanism. *FASEB J*; 6: 2296-301
7. Nino E. (2005) Phospholipid mediators in the vessel wall:involvement in atherosclerosis.*Current Opin clin Nutr Metab care* 8:123-131
8. Montrucchio G,Alloatti G,Camussi G. (2000): Role of platelet- activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol REV* ;80:1668-99
9. Libby P,Clinton SK. (1993): Cytokines as mediators of vascular pathology. *Nouv Rev Fr Hematology* ;34 Suppl:S47-53
10. Mueller HW, Haught CA, McNatt JM,et al. (1995): Measurement of platelet Activating Factor in canine model of coronary thrombosis and in endarterectomy samples from patients with advenced coronary artery disease. *Circ Res* ;77:54-63
11. Subbanagounder G, Leitinger N, Shih PT, Faull KF, Berliner JA. (1999): Evidence that phospholipid oxidation products and/ or platelet- activating factor play an important role in early atherogenesis: in vitro and in vivo inhibition by WEB 2086. *Circ Res* 85:311-318.

12. Klein I. , Sakadi B,Varadi A. , (1999): An inventory of the human ABC proteins, *Biochim. Biophys.Acta* 1461 pp.237-262.
13. Riordan J.R. , Deuchars K., Kartner N. , ve ark.(1985): Aplification of P-glicoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316:817-819
14. Rene J. Raggers, Ilse Vogels and Gerrit VAN Meer. (2001): Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet activating factor. *Biochem* 357:859-865
15. Chin JE. , Soffir R. , noonan KE. , ve ark. (1989): Structure and expression of the human MDR(P-gliycoprotein) gene family. *Mol Cell Biol* ; 9 : 3808-3820
16. Litman T. , Druley TE. , Stein WD ve ark. (2001): New understanding of the multidrug resistance system, their properties and clinical significance, *Cell Mol.Life ;Sci.*58:931-959
17. Brinkmann U, Eichelbaum M, (2001):Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. *Pharmacogenomics J*;1(1):59-64
18. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, ve ark. (2003): P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*. Oct 20;22(47):7468-85
19. Fung KL.;Gottesman MM., (2009): A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta*. May;1794(5):860-71.
20. Richert N.D, Aldwin L, Nitecki D, ve ark.(1988): Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells. *Biochemistry*, 27(20):7607-13.
21. Kerb, R. , (2006):Implications of genetic polymorphism in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett*. 234(1):4-33.
22. Kimchi- Sarfaty, C, Oh, J. M, Kim, I.-W, ve ark. (2007): A ‘silent’ polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315: 525-528.
23. Hoffmeyer S,Burk O,von Richter O, ve ark.(2000): Funvtional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene:Multiple sequence variations and

correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acadsci USA*,97:3473-3478

24. Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, ve ark.(2004): Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy *Neurology*. 28;63(6):1087-9
25. Lucie Couture, Nash J.A, Turgeon J. (2006): The ATP –Binding Casette Transporters and Their Implication in Drug Disposition: A Special Look at the *Heart Pharmacol Rev*. 58:244-258.
26. Fojo, A. T, Ueda, K, Slamon, D. J, ve ark. (1987): Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 84: 265-269.
27. Chan, H. S. L., Haddad G., Thorner P. S., ve ark. (1991): P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *New Eng. J. Med*. 325: 1608-1614.
28. Baldini N., Scotlandi K., Barbanti-Brodano G.,ve ark.(1995): Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *New Eng. J. Med*. 333: 1380-1385.
29. Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., ve ark. (1987): Cellular localisation of the MDR gene product P-glycoprotein in normal human tissues, *ProcNatl Acad Sci USA*. 84: 7737-7738.
30. Chen, C, Chin, J.E., Ueda, K., ve ark.(1986): Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the Mdr1(P-gp) gene from multi-drug resistant human cells. *Cell*, 47(3):381-389.
31. Ueda, K., Clark, D.P., Chen, C, ve ark.(1987): The human multi-drug resistance(mdr1) gene. *J Biol Chem*, 262(2):505- 508.
32. Oude Elferink RP, Zadina J. (2001): MDR1 P-glycoprotein transports endogenous opioid peptides. *Peptides*. 22(12):2015-20.
33. Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, ve ark.(2002): Drug resistance in epilepsy expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy *Brain*. 125(Pt 1):22-31

34. Gümüř-Akay G, Rüstemoğlu A, Karadağ A, Sunguroğlu A (2010): Haplotype-Based Analysis of MDR-1/ABCB1 Gene Polymorphism in a Turkish Population. *DNA and Cell Biology* Vol 29, Number 2, Pp 83-90
35. İlerigelen B. Koruyucu Kardioloji. Kardiyovasküler Hastalık Korunma ve Tedavisi ile İlgili Yaklaşımlar(2003): (2. Baskı). İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kardioloji Anabilim Dalı
36. Öngen Z.(2000): Klinik Kardioloji; MN Medikal ve Nobel Basımevi,2000;89-92
37. Onat A. Erişkinlerde Kalp Hastalıkları Prevalansı Yeni Koroner Olaylar ve Kalpten Ölüm Sıklığı. Onat A, TEKHARF, Orhan Matbaacılık, İstanbul, TR,2000; 16-23
38. Türk Halkında Kalp Kökenli Ölümler. Türk Kalp Raporu, Yenilik Basımevi, 2000;11-15.
39. Stary HC.(2003) :Atlas of atherosclerosis progression and regression,2nd ed. *The Partheonon Pulishing Group*, New York, USA ;13-15.
40. Sönmez H, Süer S, Ulutin T, Kökoğlu E, Üçışık N.(1998): The relationship of various factors in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Appl Thromb Hemost* ;4:105-10.
41. Ulutin T, Bayram Ç, Özlük K, Tözün N, Ulutin O.(1995): The effect of endothelin-1 on venajugularis thrombus model in rabbits. *Reviews in Clinical and Basic Pharmacology and Physiology* :6:295-302
42. Süer S, Ulutin T, Sönmez H, Kökoğlu E, Üçışık N, Bayram Ç, Sultuybek G.(1996): Plasma Lp(a) and – tPA-PAI-1 complex levels in coronary heart disease. *Thrombosis Research*: 83:77-85
43. Sayhan N, Gürel ÇB, Yılmaz Ş, Ulutin T, Ulutin ON.(2000): PCR-RFLP detection of PAI-2 gene variants and ACE gene polymorphism in myocardial infarction. *Haemostasis*; 30:1.
44. Ulutin O, Ulutin ŞB, Göker BB, Çizöeci G, Ferhanoğlu B, Özsoy Y, Uğur MŞ, Ulutin T, Yaman A, Yardımcı T.(1996): Effect of defibrotide on platelet function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*; 22:21-4.

45. Adelson E, Rheingold J, Crosby W.(1961): The platelet as a sponge :A review. *Blood*;17:767-774.(89)
46. Lee G.R.(1993): Bithall T.C., Foerster J. *Wintrobe's Clinical Hematology*; 9.Baskı, Philadelphia-London.
47. Paulus JM, Bury J, Grosdent JC.(1979): Control of platelet territory development in megakaryocytes. *Blood Cells*; 5:59-88.
48. Frojmovic MM, Panjwani R.(1976) :Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. *Biophys J* ;16:1071-1089.
49. Guyton & Hall: Hemostaz ve kan pıhtılaşması.(1996): Tıbbi Fizyoloji.Nobel Tıp Kitabevi,463-473.
50. White JG, Gerrard JM.(1976): Ultrastructural features of abnormal blood platelets. *Am J Pathol* ;83:590-614.
51. Coller BS.(1984): Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation. *Ann NY Acad Sci* , 416:693-708.
52. Zwed RF., Hemker HC.(1982): Blood cell membranes and hemostasis. *Hemostasis*; 11:12.
53. White JG, Glawson CC.(1980): Overview article: Biostructure of blood platelets. *Ultrastruct Pathol.* 1:533.
54. Martin JH, Carson FL, Race GJ.(1974): Calcium- containing platelet granules. *J Cell Biol* ,60:775-777.
55. Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. Colman RW, J Hirsh, VJ Marder and EW Salzman. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practise. Philadelphia: *J B Lippincott Company*, 1994:524-545.
56. Niewiarowski S.(1977): Proteins secreted by the platelet. *Thromb. Haemost.* 38:924.
57. Holt J.C, Niewiarowski S.(1985): Biochemistr of alfa- granule proteins. *Semin Hematol.* 22:151.
58. Gogstad GO.(1980): A method for the isolation of α -granules from human platelets. *Thromb Res*;20:669-681.

59. Zucker MB, Borrelli J.(1958): A survey of some platelet enzymes and functions: The platelets as the source of normal serum acid glycerophosphatase. *Ann New York Acad Sci* ; 75:203-213.
60. Febbraio M, Silverstein RL. (1990): Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *J Biol Chem* ; 265: 18531-18537.
61. Kannan K, Divers SG, Lurie AA.(1995): Cell surface expression of lysosomeassociated membrane protein-2 (LAMP-2) and CD63 as markers of in vivo platelet activation in malignancy. *Eur J Haematol* ;55:145-151.
62. Metzelaar MJ, Clevers HC.(1992): Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb Haemost* ;68: 378-382.
63. White JG.(1993) Platelet secretory granules and associated proteins. *Lab Invest* ;68: 497-498.
64. Day Haje, Holmsen H.(1971): Concepts of the blood platelet release reaction. *Sem. Heamatol* 4:3.
65. Bentfeld-BarkerME, Bainton DF.(1982) :Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. *Blood* 59:472.
66. Tavasolli M.(1986): Modulation of megakaryocyte amp. Peripolexis by phlebotomy: Megakaryocytes as a component of marrow-blood barrier. *Blood Cells*. 12:205.
67. Radley GM, Haller CJ.(1983): Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Br.J. Haematol* 53:277.
68. Corash L. Et al.(1987): Regulation of thrombopoiesis. Effects of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood* 70:177.
69. Cronkite EP. Et al.(1960): Studies on the origin, production and destruction of platelets. In blood platelets ad SA Johnson.Boston : Little, Brown.
70. Warlow CP, Dennis MS, Gijn J.Van.(1996): *Stroke*. A practical guide to management ; pp :186-192.
71. Müftüoğlu E.(1995): Klinik Hematoloji, *Trombosis ve hemostaz*; s:501- 502.

72. Goldsmith H.L.(1972) : Progress in Hemostasis and thrombosis. New York , Grune and Stratton. p:97.
73. Steele P(1975): *Circulation*, s:358.
74. Risberg B(1979): *Thrombosis, Hemostasis*, 40:512.
75. Roach MR(1980): Role of vascular wall elastic tissue in hemostasis. *Thromb. Haemos.* 40:59.
76. De Gaetano G, ed. (1997) : State of the Art: XVlth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* ;78: 1-784.
77. Adams GA. et al(1983): Kinetics of platelet adhesion and thrombus growth. *Blood.* 62: 69.
78. Du X, Ginsberg MH.(1997): Integrin [alfa]IIb, [beta]3 and platelet function. *Thromb Haemost* ; 78: 96-100.
79. Grabowski E.F.(1978): Platelet agregation in following blood in vitro. *I.Microvas. Res.* 16:159.
80. Hugues J, Matices P.(1970): Platelet aggregation induced by basement membranes. *Thromb. Haemost.*24:395.
81. Clause LH., Camp PC.(1986): The regulation of haemostasis, the protein C system.N. *Engl.Med*, 314:1298-1304.
82. Rick ME(1990) Protein C and Protein S. Vitamin K dependent inhibitors of blood coagulation. *JAMA* ; 263:701-703.
83. Capobienco JO, et al.(1981): The role of metabolic energy in platelet-collagen adhesion. *Thromb. Res.* 29: 79.
84. Cahill M, Mistry R, Barnett DB.(1992): The human platelet fibrinogen receptor: clinical and therapeutic significance.*Br.J.Clin.Pharmacol.* 33:3-9.
85. Tohgi H, Kanno S, Tamura K., Kimura B., Katsumi K. (1992): Effects of low tohigh doses of aspirin on platelet aggregability and metabolities of tromboxane A2 and prostacyclin; *Stroke.*23 :1400-1403.
86. Clause LH., Camp PC.(1986): The regulation of haemostasis, the protein C system. *N.Engl. Med.* 314: 1298-1304.

87. Rick ME. (1990): Protein C and Protein S. Vitamin K dependent inhibitors of blood coagulation. *JAMA*, 263:701-703.
88. Harker LA, Fuster V. (1986): Pharmacology of platelet inhibitors. *J. Am. Coll. Cardiol.* ; 8: 21B – 33B.
89. Konstantopoulos K, Grotta JC, Sills C, Wu KK, Hellums JD. (1995): Shear-induced platelet aggregation in normal subjects and stroke patients. *Thromb Haemost* ; 74:1329-1334.
90. Hendson PM. (1970): Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen. *J Exp Med* 131: 287-306.
91. Siraganian RP and Osler AG. (1971): Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. 1. Demonstration of a fluid phase intermediate. *J Immunol* 106: 1244-1251.
92. Benveniste J, Henson PM and Cochrane CG. (1972): Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets: the role of IgE, basophils and platelet-activating factor. *J Exp Med* 136: 1356-1377.
93. Benveniste J. (1974): Platelet activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. *Nature* 249: 581-582.
94. Benveniste J, LE Couedic JP, Polonsky J and Tence M. (1977): Structural analysis of purified platelet activating factor by lipases. *Nature* 269: 170-171.
95. Demopoulos CA, Pinckard RN and Hanahan DJ. (1979): Platelet activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem* 254: 9355-9358.
96. Pinckard RM, Farr RS and Hanahan DJ. (1979): Physicochemical and functional identity of rabbit platelet activating factor (PAF) release in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J Immunol* 123: 1847-1857.

97. Blank ML, Snyder F, Byers LW, Broohs B and Muirhead EF. (1979): Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun* 90: 1194-1200.
98. Muirhead EE, Byers LW, Desiderio DM, Brooks B and Brosius WM. (1981): Antihypertensive lipids from the kidney: alkyl ether analogs of phosphatidylcholine. *Federation Proc* 40: 2285-2290.
99. Muirhead EE, Pitcock JA and Brooks B. (1986): Renal medullary system of blood pressure control. *J Hypertens* 4 Suppl 4: S27-S32.
100. Benveniste J, Tence M, Varenne P, Bidault J, Boullet C and Polonsky J. (1979): Semisynthese et structure proposee du facteur activant les plaquettes (PAF): PAF-acether un alkyl ether analogue de la lysophosphatidilcholine. *CR Acad Sci Paris* 289: 1037-1040.
101. Hanahan DJ, Demopoulos CA, Liher J and Pinckard RN. (1980): Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J Biol Chem* 255: 5514-5516.
102. Braquet P and Rola-Pleszczynski M. (1987): Platelet-activating factor and cellular immune response. *Immunol Today* 8: 345-350.
103. Camussi G, Tetta C and Baglioni C. (1990): The role of platelet activating factor in inflammation. *Clin Immun Immunopathol* 57: 331-338.
104. Chao W and Olson MS. (1993): Platelet-activating factor: receptor and signal transduction. *Biochem J* 292: 617-629.
105. Hanahan D. (1986): Platelet-activating factor: a biologically phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem* 55: 483-509.
106. Mcmanus LM, Woodard DS, Deavers SI and Pinckard RL. (1993): Biology of disease. PAF molecular heterogeneity: pathobiological implications. *Lab Invest* 69: 639-650.
107. Prescott SM, Zimmerman GA and McIntyre TM. (1990): Platelet-activating factor. *J Biol Chem* 265: 17381-17384.

- 108.Snyder F. (1987): Enzymatic pathways for platelet activating factor, related alkyl glycerophids and their precursors, in: *Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators*, edited by Snyder F. New York: Plenu.
- 109.Snyder F. (1990): Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. *Am J Physiol Cell Physiol* 259: C697-C708.
- 110.Vargaftig BB, Pretolani M, Coeffier E and Chignard M. (1989): Platelet activating factor: biology receptors and antagonists. *Handb Inflammation* 6: 113-146.
- 111.Venable ME, Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM. (1993): Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res* 34: 691-702.
- 112.Braquet P, Paulbert-Braquet M, Koltay M, Bourgain R Bussolino F and Hosford D. (1989): IS there a case for PAF antagonists in the treatment of ischemic states? *Trends Pharmacol Sci* 10: 23-30.
- 113.Bratton D and Henson PM. (1989): Cellular origin of PAF. In: *Platelet-Activating Factor and Human Disease*, edited by Barnes PJ, Page CP and Henson PM. London: Blackwell, p. 23.
- 114.Lotner GZ, Lynch JM, Betz SJ and Henson PM. (1980): Human neutrophil-derived platelet activating factor. *J Immunol* 124: 676-684.
- 115.Triggiani M, Schleimer RP, Warner JA and Chilton FH. (1991): Differential synthesis of 1-acyl-2-acetyl-n-glycero-3-phosphocholine and platelet-activating factor by human inflammatory cells. *J Immunol* 146: 660-666.
- 116.Camussi G, Aglietta M, Malavasi F, Tetta C, Sanavio F, Piacibello W and Bussolino F. (1983): The release of platelet activating factor from human endothelial cells in culture. *J Immunol* 131: 2397-2403.
- 117.Hirafuji M, Mencia-Huerta JM and Benveniste J. (1987): Regulation of PAF-acether (platelet activating factor) biosynthesis in cultured human vascular endothelial cells stimulated with thrombin. *Biochim BiophysActa* 930: 359-369.

- 118.Hirafuji M, Mencia-Huerta JM and Benveniste J. (1987): Regulation of PAF-acether (platelet activating factor) biosynthesis in cultured human vascular endothelial cells stimulated with thrombin. *Biochim BiophysActa* 930: 359-369.
- 119.Zavoico GB, Hrbolich JK, Gimbrone MA and Schafer IA.(1990): Enhancement of thrombin and ionomycin-stimulated prostacyclin and platelet activating factor production in cultured endothelial cells by a tumor-promoting phorbol ester. *J Cell Physiol* 143: 596-605.
- 120.Mcintyre T, Zimmerman GA and Prescott SM. (1986): Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2204-2208.
- 121.Camussi G, Tetta C, Bussolino F and Baglioni C. (1988): Synthesis and release of platelet-activating factor is inhibited by plasma alpha-1-proteinase inhibitor or alpha-1-antichymotrypsin and is stimulated by proteinases. *J Exp Med* 168: 1293-1306.
- 122.Gasic AC, McGuire G, Rater SK, Farhood AI, Goldstein MA, Smith CW, Lentman M and Taylor AA. (1991): Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induced ICAM-1 and CD18-dependent neutrophil adherence. *Circulation* 84: 2154-2166.
- 123.Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott TM and Zimmerman GA. (1988): Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 82: 2045-2055.
- 124.Montrucchio G, Alloatti G, Mariano F, Lupia E, Greco-Lucchina P, Musso E, Emanuelli G and Camussi G. (1993): Role of platelet-activating factor in hypotension and platelet activation induced by infusion of thrombolytic agents in rabbits. *Circ Res* 72: 658-670.
- 125.Montrucchio G, Lupia E, De Martino A, Silvestro L, Rea Savu S, Cacace G, De Filippi PG, Emanuelli G and Camussi G. (1996): Plasmin promotes an endothelium-dependent adhesion of neutrophils. Involvement of platelet activating factor and P-Selectin *Circulation* 93: 2152-2160.

126. Au BT, Williams TJ and Collins PD. (1994): Zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils involves activation via the CD lib/CD 18 receptor and endogenous platelet activating factor as an autocrine modulator. *J Immunol* 152: 5411-5419.
127. Bussolino F, Breviario F, Tetta C, Aglietta M, MantovanI A and Dejana E. (1986): Interleukin-1 stimulates platelet activating factor production in human endothelial cells. *J Clin Invest* 77: 2027-2033.
128. Bussolino F, Camussi G and Baglioni C. (1988): Synthesis and release of platelet activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor and interleukin-1a. *J Biol Chem* 263: 11856-11862.
129. Bussolino F, Arese M, Silvestro L, Soldi R, Benfenati E, Sanavio F, Aglietta M, Bosia A and Camussi G. (1995): Involvement of a serine protease in the synthesis of platelet activating factor by endothelial cells stimulated by IL-1a or TNF-a. *Eur J Immunol* 24: 3131-3139.
130. Camussi G, Bussolino F, Salvidio G and Baglioni C. (1987): Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorpho-nuclear neutrophils and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet activating factor. *J Exp Med* 166: 1390-1404.
131. Kuijpers TW, Hakkert BC, Hart MHL and Roos D. (1992): Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet activating factor and IL-8. *J Cell Biol* 117: 565-572.
132. Kuijpers TW, Hakkert BC, Hoogerwerf M, Leewenberg JFM and Roos D. (1991): Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet activating factor in neutrophil adherence to IL-1 prestimu-lated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation. *J Immunol* 147: 1369-1376.
133. Meoguchi Y, Ichikawa Y, Kicka K, Kawada N, Kobayashi K and Yamamoto S. (1991): Effects of arachidonic acid metabolites and interleu-kin-1 on platelet activating factor production by hepatic sinusoidal endothelial cells from mice. *J Gastroenterol Hepatol* 6: 283-291.

134. Janero DR and Burghardt C. (1990): Production and release of platelet-activating factor by the injured heart-muscle cell (cardiomyocyte). *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 67: 201-218.
135. Honda Z, Nakamura M, Miki I, Minami M, Watanabe T, Seyama Y, Hokado H, Toh H, Ito K, Miyamoto T and Shimizu T. (1991): Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* 349: 342-346.
136. Kunz D, Gerard NP and Gerard C. (1992): The human leukocyte platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem* 267: 9101-9106.
137. Sugimoto T, Tsuchinouchi H, McGregor CG, Mutoh H, Shimizu T and Kurachi DY. (1992): Molecular cloning and characterization of the platelet activating factor receptor gene expressed in the human heart. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 617-624.
138. Ye RD, Prossitz ER, Zuo A and Cochrane CG. (1991): Characterization of a human cDNA that encodes a functional receptor for platelet activating factor. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 105-111.
139. Bratton DL, Dreyre E, Kailey JM, Fadok FV, Clay KL and Henson PM. (1992): The mechanism of internalization of platelet activating factor in activated human neutrophils. Enhanced transbilayer movement across the plasma membrane. *J Immunol* 148: 514-523.
140. Camussi G, Tetta C, Bussolino F, Caligaris-Cappio F, Masera C and Segoloni G. (1981): Mediators of immune complex induced aggregation of polymorphonuclear neutrophils. II. Platelet activating factor as the effector substance of immune-induced aggregation. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 64: 25-41.
141. O'Flaherty JT, Wykle RL, Miller CH, Lewis JC, Waite M, Bass DA, McCall CE and Dechatelet LR. (1981): 1-O-alkyl-m-glyceryl-3-phosphorylcholine: a novel class of neutrophil stimulants. *Am J Pathol* 103: 70.
142. Shaw JO, Pinckard RN, Ferrigni KS, McManus L and Hanahan J. (1981): Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-m-

- glyceryl-3-phosphorylcholine (platelet activating factor). *J Immunol* 127: 1250-1255.
143. Zimmerman GA, Prescott SM and McIntyre TM. (1992): Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 13: 93-100.
 144. Bussolino F, Camussi G, Aglietta M, Braquet P, Bosia A, Pescar-Mona G, Sanavio F, D'Urso N and Marchisio PC. (1987): Endothelial cells are targets for platelet activating factor. Platelet activating factor induces changes in cytoskeleton structure. *J Immunol* 139: 2439-2446.
 145. Findlay SR, Lichtenstein LM, Hanahan DJ and Pinckard RN. (1981): The contraction of guinea pig ileal smooth muscle by acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *Am J Physiol Cell Physiol* 241: C130-C133.
 146. Kester M, Ledvora RF and Barany M. (1984): The potentiation of arterial contraction with platelet activating factor. *Pflugers Arch* 400: 200-202.
 147. Stahl GL and Lefer AM. (1987): Heterogeneity of vascular smooth muscle responsiveness to lipid vasoactive mediators. *Blood Vessels* 24: 24-30.
 148. Montrucchio G, Alloatti G, Tetta C, Roffinello C, Emanuelli G and Camussi G. (1986): In vitro contractile effect of platelet activating factor on guinea-pig myometrium. *Prostaglandins* 32: 539-554.
 149. Tetta C, Montrucchio G, Alloatti G, Roffinello C, Emanuelli G, Benedetto C, Camussi G and Massobrio M. (1986): Platelet activating factor contracts human myometrium in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 183: 376-381.
 150. Alloatti G, Montrucchio G, Mariano F, Tetta C, DE Paulis R, Morea M, Emanuelli G and Camussi G. (1986): Effect of platelet-activating factor (PAF) on human cardiac muscle. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 79: 108-112.
 151. Benveniste J, Boullet C, Brink C and Labat C. (1983): The actions of PAF-acether (platelet-activating factor) on guinea-pig isolated heart preparations. *Br J Pharmacol* 80: 81-83.

152. Camussi G, Alloatti G, Montrucchio G, Meda M and Emanuelli G. (1984): Effect of platelet activating factor on guinea-pig papillary muscle. *Experientia* 40: 697-699.
153. Levi R, Burke JA, Guo ZG, Hattori Y, Hoppens CM, Mcmanus LM, Hanahan DDJ and Pinkard RN. (1984): Acetyl glyceryl ether phosphoryl-choline (AGEPC), a putative mediator of cardiac anaphylaxis in the guinea pig. *Circ Res* 54: 117-124.
154. Robertson DA, Genovese A and Levi R. (1987): Negative inotropic effect on platelet-activating factor on human myocardium: a pharmacological study. *J Pharmacol Exp Ther* 243: 834-839.
155. Robertson DA, Wang DY, Lee CO and Levi R. (1988): Negative inotropic effect of platelet-activating factor: association with a decrease in intracellular sodium activity. *J Pharmacol Exp Ther* 245: 124-128.
156. Ludwig JC and Pinckard RN. (1987): Diversity in the chemical structures of neutrophil-derived platelet activating factors. In: *New Horizons in Platelet Activating Factor Research*, edited by Winslow CM and Lee JL. New York: Wiley, p. 57-71.
157. Pinckard RN, Jackson EM, Hoppens C, Weintraub ST, Ludwig JC, Mcmanus LM and Mott GE. (1984): Molecular heterogeneity of platelet activating factor produced by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 325-332.
158. Weintraub ST, Lear CL and Pinckard RN. (1990): Analysis of platelet activating factor by GC/MS after direct derivatization with pentafluoro benzoyl chloride and heptafluorobutyric anhydride. *J Lipid Res* 31: 719-725.
159. Weintraub ST, Ludwig JC, Mott GE, Mcmanus LM and pinckard RN. (1985): Fast atom bombardment-mass spectrometric identification of molecular species of platelet activating factor produced by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 129: 868-876.
160. Mueller HW, O'Flaherty JT and Wykle RL. (1984): The molecular species distribution of platelet activating factor synthesized by rabbit and human neutrophils. *J Biol Chem* 259: 14554-14559.

161. Triggiani M, Goldman DW and Chilton FH. (1991): Biological effects of 1-acyl-2-acetyl-5n-glycero-3-phosphocholine in the human neutrophil. *Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab* 1084: 41-47.
162. Triggiani M, Fonteh AN and Chilton FH. (1992): Factors that influence the proportions of platelet-activating factor and 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine synthesized by the mast cell. *Biochem J* 286: 497-503.
163. Triggiani M, Hubbard WC and Chilton FH. (1990): Synthesis of 1-O-acyl-2-acetyl-5n-glycero-3-phosphocholine by an enriched preparation of the human lung mast cell. *J Immunol* 144: 4773-4780.
164. Clay KL, Johnson C and Worthen GS. (1991): Biosynthesis of platelet activating factor and 1-O-acyl analogues by endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1094: 43-50.
165. Whatley RE, Clay KL, Chilton FH, Triggiani M, Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM. (1992): Relative amounts of 1-O-alkyl- and 1-acyl-2-acetyl-5n-glycero-3-phosphocholine in stimulated endothelial cells. *Prostaglandins* 43: 21-29.
166. Nakayama R and Saito K. (1989): Presence of 1-O-alk-1-enyl-2-O-acetyl-glycerophosphocholine (vinyl form of PAF) in perfused rat and guinea pig hearts. *J Biochem* 105: 494-496.
167. McNamara MJC, Schmitt JD, Wykle RL and Daniel LW. (1984): 1-Hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol stimulates differentiation of HL-60 human promyelocyte leukemia cells to macrophage-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 824-830.
168. Yamamoto N, ST Claire DA, Homma S and Ngwenya BZ. (1988): Activation of mouse macrophages by alkylglycerols, inflammation products of cancerous tissues. *Cancer Res* 48: 6044-6049.
169. Bussolino F, Camussi G and Arese P. (1984): Platelet-activating factor phosphatidate, but not platelet-activating factor, is a powerful calcium ionophore in the human red cell. *Cell Calcium* 5: 463-466.

170. Alonso F, Gill MG, Sanchez-Crespo M and Mato JM. (1982): Activation of l-alkyl-2-lyso-glycero-3-phosphocholine-acetyl-CoA transferase during phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 257: 3376-3378.
171. Lee TC, Lenihan DJ, Malone B, Roddy LL and Wasserman SI. (1984): Increased biosynthesis of platelet activating factor in activated human eosinophils. *J Biol Chem* 259: 5526-5530.
172. Ninio E, Mencia-Huerta JM, Heymans F and Benveniste J. (1982): Biosynthesis of platelet activating factor. 1. Evidence for a acetyl-transferase activity in murine macrophages. *Biochim Biophys Acta* 710: 23-31.
173. Wykle RL, Malone B and Snyder F. (1980): Enzymatic synthesis of l-O-alkyl-2-acetyl-m-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregation lipid. *J Biol Chem* 255: 10256-10260.
174. Winkler JD, Sung CM, Hubbard WC and Chilton FH. (1993): Influence of arachidonic acid on indices of phospholipase A₂ activity in the human neutrophil. *Biochem J* 291: 825-831.
175. Balestrieri ML, Servillo L and Lee T. (1997): The role of platelet-activating factor-dependent transacylase in the biosynthesis of l-acyl-2-acetyl-m-glycero-3-phosphocholine by stimulated endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 17431-17437.
176. Colard O, Bidault J, Breton M and Ninio E. (1993): Biosynthesis of platelet-activating factor in cultured mast cells: involvement of the CoA-independent transacylase demonstrated by analysis of the molecular species of platelet-activating factor. *Eur J Biochem* 216: 835-840.
177. Nieto ML, Venable ME, Bauldry SA, Greene DG, Kennedy M, Bass DA and Wykle RL. (1991): Evidence the hydrolysis of ethanolamine plasmalogens triggers synthesis of platelet activating factor via a transacylase reaction. *J Biol Chem* 266: 18699-18706.
178. Snyder F, Lee TC and Blank ML. (1992): The role of transacylase in the metabolism of arachidonate and platelet-activating factor. *Prog Lipid Res* 31: 65-86.

179. Uemura Y, Lee Y and Snyder F. (1991): A coenzyme A-independent transacylase is linked to the formation of platelet-activating factor (PAF) by generating the lyso-PAF intermediate in the remodeling pathway. *J Biol Chem* 266: 8268-8272.
180. Venable ME, Nieto ML, Schmitt JD and Wykle RL. (1991): Conversion of 1-O-3H-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine to lyso-platelet-activating factor by the CoA-independent transacylase in membrane fraction of human neutrophils. *J Biol Chem* 266: 18691-18698.
181. Robinson M, Blank ML, Fitzgerald V and Snyder F. (1985): Activation of lysophospholipids by rabbit alveolar macrophages: specificity of CoA-dependent and CoA-independent reactions. *J Biol Chem* 260: 7889-7895.
182. Winkler JD and Chilton FH. (1993): The role of CoA-independent transacylase in the production of platelet-activating factor and the metabolism of arachidonate. *Drug News Perspect* 6: 133-138.
183. Renooij W and Snyder F. (1981): Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-phosphocholine (platelet activating factor and a hypotensive lipid) by cholinephosphotransferase in various rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 663: 545-556.
184. Lee TC, Blank ML, Fitzgerald V and Snyder F. (1981): Substrate specificity in the biocleavage of the O-alkyl-bond: 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet activating lipid) and its metabolites. *Arch Biochem Biophys* 280: 353-357.
185. Lee TC, Malone B and Snyder A. (1988): Formation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerols via de novo biosynthetic pathway for platelet activating factor. Characterization of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphohydrolase in rat spleen. *J Biol Chem* 263: 1755-1760.
186. Lee TC, Malone B and Snyder A. (1986): A new de novo pathway for the formation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerols, precursors of platelet activating factor. Biochemical characterization of 1-alkyl-2-lyso-,m-glycero-3-acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen. *J Biol Chem* 261: 5373-5377.

- 187.FARR RS, Cox CP, WARDLOW ML, AND JORGENSEN R. (1980): Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF). *Clin Immunol Immunopathol* 15: 318-330.
- 188.Blank ML, Lee TC, Fitzgerald V and Snyder F. (1981): A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phospho choline (a hypotensive and platelet activating lipid). *J Biol Chem* 256: 175-178.
- 189.Howard KM, Miller JE, Mirwa M and Olson MS. (1997): Cell-specific regulation of expression of plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in the liver. *J Biol Chem* 272: 27543-27548.
- 190.Lee TC, Malone B, Wasserman SI, Fitzgerald V and Snyder F. (1982): Activities of enzyme that metabolizes platelet activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phospho choline) in neutrophils and eosinophils from humans and the effect of a calcium ionophore. *Biochem Biophys Res Commun* 105: 1303-1308.
- 191.Nijssen JG, Rosenboom CF and Van Den Bosch H. (1986): Identification of a calcium-independent phospholipase A₂ in rat lung cytosol and differentiation from acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAF-acether). *Biochim Biophys Acta* 876: 611-618.
- 192.Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA and McIntyre TM. (1991): Platelet-activating factor acetylhydrolase in human tissue and blood cells. *Lipids* 26: 979-985.
- 193.Tew DG, Southan C, Rice SQ, Lawrence MP, Li H, Boyd HF, Moores K, Gloger IS and Macphee CH. (1996): Purification, properties, sequencing and cloning of a hpoprotein-associated, serine-dependent phosphohpase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 16: 591-599.
- 194.Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schmpf B, Hooper S, LE Trong H, Cousens LS, Zimmerman GA, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM and Gray PW. (1995): Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 374: 549-553.

195. Karabina SAP, Liapikos TA, Grekas G, Goudevenos J and Tselepis AD. (1994): Distribution of PAF acetylhydrolase activity in human plasma low-density lipoprotein subfractions. *Biochim Biophys Acta* 1213: 34-38.
196. Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME and Prescott SM. (1987): Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: association with lipoprotein particles in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 262: 4125-4222.
197. Tselepis AD, Dentan C, Karabina SAP, Chapman MJ and Ninio E. (1995): PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VLDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 15: 1764-1773.
198. Hattori M, Adachi H, Aoki J, Tsujimoto M, Arai H and Inoue K. (1995): Cloning and expression of cDNA encoding the beta-subunit (30-kDa subunit) of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 270: 31345-31352.
199. Hattori M, Arai H and Inoue K. (1993): Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 268: 18748-18753.
200. Smiley PL, Stremmel KE, Prescott SM, Zimmerman GA and McIntyre TM. (1991): Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor. *J Biol Chem* 266: 11104-11110.
201. Heery JM, Kozak M, Stafforini DM, Jones DA, Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM. (1995): Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest* 96: 2322-2330.
202. Agwu DE, McPhail LC, Chabot MC, Daniel LW, Wykle RL and McCall CE. (1989): Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatide acid and diglycerides in stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 264: 1405-1413.

203. Triggiani M, D'Souza DM and Chilton FH. (1991): Metabolism of 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine in the human neutrophils. *J Biol Chem* 266: 6928-6935.
204. Quian C, Lee TC, And Snyder F. (1989): Metabolism of platelet activating factor (PAF) and related ether lipids by neonatal rat myocytes. *J Lipid Mediators* 1: 113-123.
205. Triggiani M and Chilton FH. (1992): Metabolism of platelet-activating factor in the guinea-pig heart. *J Moll Cell Cardiol* 24: 1101-1111.
206. Nathan N, Cornu E, Denizot Y, Feiss P and Arnoux B. (1994): Serum platelet activating factor acetylhydrolase during coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Vase Anesth* 8: 254-255.
207. Bito H and Shimizu T. (1997): Molecular characterization and physiological functions of PAF receptor. *Adv Exp Biol* 400: 215-21.
208. Shimeu T, Honda Z, Nakamura M, Brro H and Izumi T. (1992): Platelet-activating factor receptor and signal transduction. *Biochem Pharmacol* 44: 1001-1008
209. Valone FH, Coles E, Reinhold VR and Goetzl EJ. (1982): Specific binding of phospholipid platelet activating factor by human platelets. *J Immunol* 129: 1639-1641.
210. Homma H, Tokumura A and Hanahan DJ. (1987): Binding and internalization of platelet activating factor 1-O-alkyl-2-acetyl-glycero-3-phosphocholine in washed rabbit platelets. *J Biol Chem* 262: 10582-10587.
211. Shaw JO and Henson PM. (1980): The binding of rabbit basophil derived platelet activating factor to rabbit platelets. *Am J Pathol* 98: 791-810.
212. Ukena D, Dent G, Birke FW, Robault C, Sybrecht GW and Barnes PJ. (1988): Radioligand binding of antagonists of platelet activating factor to intact human platelets. *FEBS Lett* 228: 285-289.
213. Inarrea P, Gomez-Cambronero J, Nieto M and Sanchez-Crespo M. (1984): Characteristic of the binding of platelet activating factor to platelets of different animal species. *Eur J Pharmacol* 105: 309-315.

214. Namm DH, Tadepalli AS and High JA. (1982): Species specificity of the platelet responses to 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Thromb Res* 25: 341-350.
215. Hwang SB, Ching-Shin CL, Cheah MJ and Shen TY. (1983): Specific receptor sites for 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor) on rabbit platelet and guinea pig smooth muscle membranes. *Biochemistry* 22: 4756-4763.
216. O'Flaherty JT, Surles JR, Redman J, Jacobson D, Piantadosi C and Wykle RL. (1986): Binding and metabolism of platelet activating factor by human neutrophils. *J Clin Invest* 78: 381-388.
217. Valone FH and Goetzl EJ. (1983): Specific binding by human polymorphonuclear leucocytes of the immunological mediator 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3 phosphorylcholine. *Immunology* 48: 141-149.
218. Liu H, Chao W and Olson MS. (1992): Regulation of the surface expression of the platelet activating factor receptor in IC-21 peritoneal macrophages. Effect of lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 267: 20811-20819.
219. Valone FH. (1988): Identification of platelet activating factor receptors in P38SD murine macrophages. *J Immunol* 140: 2389-2394.
220. Ukena D, Krogel C, Dent G, Yukawa T, Sybrecht G and Barnes PJ. (1989): PAF-receptors on eosinophils: identification with a novel ligand, 3H-WEB 2086. *Biochem Pharmacol* 38: 1702-1705.
221. Korth R, Hirafuji M, Lalau-Keraly C, Delautier I, Bidault J and Benveniste J. (1989): Interaction of antagonist WEB 2086 and its hexazepine analogue with human platelets and endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 44: 223-229.
222. Chao W, Liu H, Debuysere MS, Hanahan DJ and Olson MS. (1989): Identification of receptors for platelet activating factor in rat Kupffer cells. *J Biol Chem* 264: 3591-3598.
223. Chao W, Liu H, Hanahan DJ and Olson MS. (1989): Regulation of platelet activating factor receptors in rat Kupffer cells. *J Biol Chem* 264: 448-457.
224. Chao W, Liu H, Zhou W, Hanahan DJ and Olson MS. (1990): Regulation of platelet activating factor receptor and platelet activating factor receptor-mediated

- biological responses by cAMP in rat Kupffer cells. *J Biol Chem* 265: 17576-17583.
- 225.Domingo MT, Spinnewyn B, Chabrier PE and Braquet P. (1998): Presence of specific binding sites for platelet activating factor (PAF) in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 730-736.
- 226.Marcheselli VL, RossoWSKA MJ, Domingo MT, Braquet P and Bazan NG. (1990): Distinct platelet activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex. *J Biol Chem* 265: 9140-9145.
- 227.Thierry AT, Dolly M, Braquet P, Cluzel J and Meyniel G. (1989): Presence of specific platelet activating factor binding sites in the rat retina. *Eur J Pharmacol* 163: 97-101.
- 228.Ihida K, Predescu D, Czekay RP and Palade GE. (1999): Platelet activating factor receptor is found in a large endosomal compartment in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Sci* 112: 285-295.
- 229.Nakamura M, Honda Z, Izumi T, Sakanaka C, Mutoh H, Minami M, Bito H, Seyama Y, Matsumoto T, Noma M and ShimizuT. (1998): Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocyte. *J Biol Chem* 266: 20400-20405.
- 230.Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Hass NF, Taite BB, Szlony TA, Page JD et al. (1998): Assessment of platelet fuction assays. *Am Heart* 5;135(5 Pt 2 Su):S 170-8.
- 231.Saeed S.A, Rasheed H.(2003): Calcium-dependent synergistic interaction of platelet activating factor and epinephrine in human platelet aggregation. *Acta Pharmacol Sin* 24 (1): 31-36.
- 232.Kioka, N, Tsubota, J., Kakehi, Y., ve ark. (1989): P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-gp carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun*, 162(1):224- 231.
- 233.Schaeffeler E., Eichelbaum M., Brinkmann U. ve ark. (2001): Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. (Letter) *Lancet* 358: 383-384.

234. Nakamura, T., Sakaeda, T., Horinouchi, M. ve ark. (2002): Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDRL gene on expression level of MDRL messengerribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *ClinPharmacol Ther*, 71:297- 303.
235. Pechandova K., Buzkova H., Slanar O., ve ark. (2006): Polymorphisms of the MDRL Gene in the Czech Population *Folia Biologica (Praha)* 52, 184-189
236. Tang K., Wong L. P., Lee P., ve ark (2004): Genomic evidence for recent positive selection at the human MDRL gene locus. *Hum. Molec. Genet.* 13: 783-797
237. D. Li MD, G-L. Zhang PhD, Y-Q. Lou ve ark. (2007): Genetic polymorphisms in MDRL and CYP3A5 and MDRL haplotype in mainland Chinese Han, Uygur and Kazakh ethnic groups *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 32, 89-95
238. Bebek N. Cine N. Oner G.O. Eskazan E. ve ark. (2005): Genotype and Allele Frequencies of MDR-1 C3435T Polymorphism in Turkish Population. *Journal of Neurological Sciences* (Turkish) Volume 22, Number 3, Page(s) 261-266
239. Yeşil G. (2009): Epilepsi Hastalarında İlaç Direncinin MDR-1 Genindeki C3435T ve G2677T/A Polimorfizmleri ile İlişkisi. Uzmanlık tezi.
240. 111mer, T. Schuler, U.S. Thiede C ve ark. (2002): MDRL gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res*, 62(17):4955- 62.
241. Moriya, Y., Nakamura, T., Horinouchi, M., ve ark. (2002): Effects of polymorphisms of MDRL, MRP1 and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull*, 25:1356- 1359.
242. Owen A, Goldring C, Morgan P, ve ark. (2005): Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol.* 59(3):365-70.

- 243.Larsen UL, Hyldahl Olesen L, Guldberg Nyvold. (2007): Human intestinal P-glycoprotein activity estimated by the model substrate digoxin. *C.Scand J Clin Lab Invest.* 67(2): 123-34.
- 244.Cascorbi I, Gerloff T, Johne A ve ark. (2001): Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDRI gene in white subjects. *Clin Pharmacol.Ther.* 69(3), 169 174
- 245.Gümüő Akay G, Rüstemoğlu A, Karadağ A, Sunguroğlu A. (2010): Haplotype-Based Analysis of MDR-1/ ABCB-1 Gene Polymorphisms in a Turkish Population. *DNA and Cell Biology.* Vol 29, Num 2.
- 246.Li D, Abudula A, Abulahake M, Zhu P, Lou Y, Zhang GL. (2010): Influence of CYP3A5 and MDR-1 Genetic Polymorphisms on Urinary 6B-Hydroxycortisol/Cortisol Ratio After Grapefruit Juice Intake in Healthy Chinese *.Journal of Clinical Pharmacolog,* 50:775-784.

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

Sayın:

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Koroner Arter Hastalığında MDR-1 Polimorfizmi ve PAF (Platelet activating factor) Düzeylerinin Araştırılması " isimli ortaklaşa yürütülecek bir çalışma yapılacaktır.

Yapılan klinik çalışmalarda Koroner Arter Hastalığında serum PAF seviyelerinin, bu hastalığa sahip olmayanlara göre yaklaşık 3 kat yüksek olduğu tespit edilmiştir. PAF seviyelerindeki bu yükselmenin sebebi MDR-1 olarak bilinen gen polimorfizmi ile ilgili olabilir. Günümüzde Kardiyolojik Hastalıklarda risk faktörü olarak bilinen genetik yatkınlıkla ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. MDR-1 polimorfizmi ve PAF seviyelerini birlikte inceliyeceğimiz bu çalışmada genetik yatkınlıkla hastalık şiddeti arasında bir ilişki olup olmadığı açıklığa kavuşturulacaktır.

Eğer kabul ederseniz sizi bu araştırmaya dahil etmek istiyoruz. Bu araştırmaya katıldığınız için sizden herhangi bir para talep edilmeyecektir. Aynı şekilde size herhangi bir para ödenmeyecektir. Bu çalışma için az miktarda kan örneği yeterli olacaktır. Alınan kan örneği Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarlarında çalışılacaktır. Bu araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçlarla kullanılacak ve kimliğiniz her zaman gizli tutulacaktır.

Araştırmaya katılmak isterseniz size uygulanacak işlemler şu şekilde olacaktır. Öncelikle hekiminiz tarafından kardiyolojik muayeneniz ve gerekli tetkikleriniz yapılacaktır. Analiz için anjiyografi sırasında sizden az miktarda kan alınması yeterli olacaktır.

Çalışma sonuçlarının yalnızca bilimsel amaçlarla ve kimliğiniz gizli tutularak kullanılacağını tekrar vurgulamak istiyoruz.

HASTANIN BEYANI

Dr..... tarafından Koroner Arter Hastalığı ve Genetik Yatkınlık ile ilgili araştırma hakkında bana bilgi verildi. Araştırmanın amacı, uygulama biçimi tarafıma bildirildi. Tıbbi bilgilerimle ilgili gizliliğin sağlanacağı konusunda yeterli açıklama yapıldı. Bu araştırmaya katılımın tamamen gönüllü olduğu, katılmam veya katılmamam halinde tedavi ve tetkiklerimin bundan etkilenmeyeceği belirtildi. Bu araştırmaya kendi gönüllü onayım ile katılmayı kabul ediyorum.

Hasta:

Adı Soyadı :

Doğum tarihi :

Adres / Tel :

İmza :

Doktor :

Adı Soyadı :

Adres/ Tel :

İmza :

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : 20698
Konu :

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

İstanbul / /

12 Temmuz 2010

İLGİ: 18.06.2010 tarihli, 473 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof.Dr. Turgut ULUTİN**'nin danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğr. Gülsel AYAZ**'ın yürüteceği "**Koroner Arter Hastalarında MDR-1 Gen Polimorfizminin ve PAF (Platelet Activating Factor) Düzeylerinin Hastalıkla Olan İlişkisinin Araştırılması**" başlıklı (Rutin tetkik ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyallerle yapılan çalışma) Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **06 Temmuz 2010** tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Değerlendirme Komisyonunda müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

Eki:
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ
Dekan Yardımcısı ve Etik
Değerlendirme Komisyon Başkanı

Not: Yanıtlarda yazınızın gün sayısının belirtilmesi rica olunur.Tel(0212)4143000

TEZ BAŞLIK DEĞİŞİMİ



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



Sayı : B.30.2.İST.O.42.00.00/ 6915
Konu: Tez projesi hk.

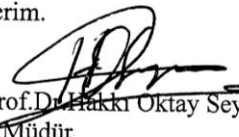
25.10.2011

Tıbbi Biyoloji. Anabilim Dalı Başkanlığı'na,
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

İlgi: 21.10.2011 tarihli 524 sayılı yazınız ve ekleri.

Anabilim Dalınızda 2008-2009 öğretim yılı bahar yarıyılında başladığı Yüksek Lisans eğitimine Prof.Dr.Turgut Ulutin'in Danışmanlığı altında devam eden **5155** no'lu **Gülsel Ayaz** hakkındaki ilgi yazınız ve dosyası Yönetim Kurulumuzun 25.10.2011 tarihli 42 sayılı toplantısında incelenmiş, adı geçen öğrencinin Yönetim Kurulumuzun 27.07.2010 tarihli 30 sayılı toplantısında kabul edilen "Koroner Arter Hastalarında MDR-1 Gen Polimorfizminin ve PAF (Platelet Activating Factor) Düzeylerinin Hastalıkla Olan İlişkisinin Araştırılması" başlıklı tez konusunun "Koroner Arter Hastalarında MDR-1 Gen Polimorfizmi ve Trombosit Aktivite Edici Faktör (PAF) Düzeylerinin Hastalıkla olan İlişkisinin Araştırılması" olarak değiştirilmesine karar verilmiştir.

Danışman öğretim üyesine ve öğrenciye duyurulmasını rica ederim.


Prof.Dr.Hakkı Oktay Seymen
V.Müdür

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gülşel	Soyadı	AYAZ
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	16.09.1975
Uyruğu	T.C	TC Kim No	407866666632
Email	gulsel.ayaz@gmail.com	Tel	05335910363

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2011
Lisans	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	1997
Lise	Bakırköy Yahya Kemal Beyatlı Lisesi	1992

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Lab. Teknik Elemanı	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2010-
2.	Ürün Sorumlusu	Organon İlaçları A.Ş	2000-2003
3.	Tıbbi Mümessil	Organon İlaçları A.Ş	1997-2000

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta	55	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	63	62	61
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Ofis Programları	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Antik Medeniyetler Tarihi, Yüzme, Karikatür, Bilardo.

TC
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
TEZ SINAVI TUTANAĞI

İlgi : Sağ.Bil.Enst.Yazısı Tarihi :

Sayısı :

Öğrenci No ve Adı Soyadı : 2701080197 Gülsel AYAZ
Programın Seviyesi (YL / D) : YÜKSEK LİSANS
Ana/Bilim Dalı : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Fakülte / Enstitü / Yüksekokul : Cerrahpaşa Tıp Fakültesi / Sağlık Bilimleri Enst.
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Turgut ULUTİN
Varsa İkinci Tez Danışmanı :
Sınavın Yapıldığı Yer : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Sınavın Yapıldığı Tarih : 13.12.2011 Saat : 14.00 -15.00
Sınava Kaçınıcı Girişi : İlk

Tez Başlığı : Koroner Arter Hastalarında MDR-1 Gen Polimorfizmi ve Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF) Düzeylerinin Hastalıkla Olan İlişkisinin Araştırılması

Yukarıda adı, soyadı ve tez başlığı yazılı adayın Tez Sınavını yapan Jürimiz, Tez'in
kzbidine ** karar vermiştir.

Sınav Jürisi

Başkan

Prof. Dr. Turgut ULUTİN

Üye

Prof. Dr. Gönül KANIGÜR

Üye

Prof. Dr. Mehmet GÜVEN

Üye

Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ

Üye

Prof. Dr. Barış İLERİGELEN

* KABULÜNE / REDDİNE / DÜZELTİLMESİNE

**OYBİRLİĞİYLE / OYÇOKLUĞUYLA

- Jüri üyeleri, tezin kendilerine teslim edildiği tarihten itibaren en erken on, en geç otuz gün içinde toplanarak öğrenciyi tez sınavına alır.
- Jüri, Sınavın dinleyicilere açık olmasını sağlar. Jüri kararını dinleyicilere kapalı olarak salt çoğunlukla verir.
- Sınav, aday tarafından Tezi'in sunumu ve bunu izleyen soru-cevap bölümünden oluşur.
- Sınav süresi **Yüksek Lisans**ta 45 dakikadan az, 90 dakikadan fazla; **Doktora**da 2 saatten az, 3 saatten fazla olamaz.
- Jüri üyelerinin Tez hakkındaki kişisel raporları tutanağa eklenmelidir.
- Jüri Tez'in reddine veya düzeltilmesine karar vermişse, red gerekçeleri veya düzeltilmesi gereken hususlar ayrı bir kağıda açıkça yazıldıktan ve Jüri tarafından imzalandıktan sonra tutanağa eklenmelidir. Düzeltme, Yüksek Lisans'ta 3, Doktora'da 6 ay içinde tamamlanmalıdır.
- Sınav başarılı olduğunda **ikinci sayfadaki Tez Onayı 7 adet doldurulup imzalanarak** Sınav tutanağı ekinde gönderilecektir. Müdür tarafından imzalanan Tez Onay sayfası, Enstitüye teslim edilecek tezlerde ilgili sayfa yerine yerleştirilecektir.
- İkinci sayfadaki Tez Onayında, Tez Danışmanı /Tez İzleme Komitesi üyesi olanlar isimden sonra parantez içinde belirtilecek
- Tutanak, sınavı izleyen 3 gün içinde Anabilim Dalı Başkanlığı tarafından Enstitüye iletilecektir.