

**T.C**  
**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**  
**MERAM TIP FAKÜLTESİ**  
**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Prof. Dr. İdris Mehmetođlu**  
**ANABİLİM DALI BAŐKANI**

**KORONER ARTER HASTALARINDA**  
**Ox-LDL, TOTAL ANTIÖKSİDAN AKTİVİTE,**  
**NİTRİK OKSİT ve eNOS GEN POLİMORFİZMİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Gülsüm Yılmaz**

**TEZ DANIŐMANI**  
**Prof. Dr. İdris Mehmetođlu**

**KONYA-2006**

# İÇİNDEKİLER

|   |    |
|---|----|
| <b>1. GİRİŞ</b>   | 7  |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                      | 8  |
| <b>2.1. KORONER ARTER HASTALIĞI</b>                           | 8  |
| 2.1.1. Ateroskleroz Oluşum Hipotezleri                        | 8  |
| 2.1.2. Aterosklerozun Fizyopatolojisi                         | 12 |
| 2.1.3. Epidemiyolojik Risk Faktörleri                         | 14 |
| <b>2.2. SERBEST RADİKALLER</b>                                | 15 |
| 2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri | 15 |
| 2.2.1.1. Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )               | 16 |
| 2.2.1.2. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )                       | 16 |
| 2.2.1.3. Hidroksil radikali ( $OH\cdot$ )                     | 16 |
| 2.2.1.4. Singlet Oksijen ( $O_2$ )                            | 17 |
| <b>2.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ</b>                    | 17 |
| 2.3.1. DOĞAL (ENDOJEN) ANTİOKSİDANLAR                         | 20 |
| 2.3.1.1. ENZİM YAPISINDAKİ ANTİOKSİDANLAR                     | 20 |
| 2.3.1.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1)            | 20 |
| 2.3.1.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, E.C.1.11.19)         | 20 |
| 2.3.1.1.3. Glutasyon - S – Transferazlar (GST) (E.C.2.5.1.18) | 21 |
| 2.3.1.1.4. Katalaz (E.C.1.11.1.6)                             | 21 |
| 2.3.1.1.5. Mitokondrial sitokrom oksidaz                      | 21 |
| 2.3.1.2. ENZİM YAPISINDA OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR               | 22 |
| 2.3.1.2.1. Redükte glutasyon (GSH)                            | 22 |
| 2.3.1.2.2. Askorbik asit (C vitamini)                         | 22 |
| 2.3.1.2.3. E vitamini (Tokoferoller)                          | 22 |
| 2.3.1.2.4. Karotenler   | 23 |
| <b>2.4. VASKÜLER OKSİDAN ENZİM SİSTEMLERİ</b>                 | 23 |
| 2.4.1. NADPH Oksidaz  | 23 |
| 2.4.2. Ksantin oksidaz (XOD)                                  | 24 |

|   |    |
|---|----|
| 2. 4. 3. Endotelyal nitrik oksit sentaz                   | 24 |
| <b>2. 5. OKSİDE LDL (Ox-LDL)</b>                          | 24 |
| 2.5.1. LDL Oksidasyonunu Etkileyen Faktörler              | 25 |
| 2.5.2. İntrensek Faktörler                                | 25 |
| 2.5.3. Ekstresek Faktörler                                | 25 |
| <b>2.6. NİTRİK OKSİT (NO)</b>                             | 28 |
| 2.6.1. NİTRİK OKSİT SENTAZ (NOS) ENZİMİ                   | 30 |
| 2.6.1.1. NOS izoformları                                  | 30 |
| 2.6.1.1.1. Endotelyal Nitrik oksit Sentaz (NOS-3)         | 30 |
| 2.6.1.1.2. İndüklenebilir NOS (iNOS, NOS-2)               | 32 |
| 2.6.1.1.3. Nöronal NOS (NOS-1)                            | 33 |
| 2.6.2. İnsan NOS-3(eNOS) Geninde Varyasyonlar             | 34 |
| <b>3. MATERYAL VE METOD</b>                               | 37 |
| <b>3.1. MATERYAL</b>                                      | 37 |
| 3.1.1. Kullanılan Cihazlar                                | 38 |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar                             | 39 |
| <b>3.2. METOD</b>   | 40 |
| 3.2.1. Ox-LDL Ölçümü                                      | 40 |
| 3.2.2. Total Antioksidan aktivite ölçümü                  | 41 |
| 3.2.3. Nitrit ve nitrat ölçümü                            | 41 |
| 3.2.3.1. Nitrat ölçümü                                    | 42 |
| 3.2.3.2. Nitrit ölçümü                                    | 44 |
| 3.2.4. eNOS polimorfizminin araştırılması                 | 44 |
| 3.2.4.1. DNA İzolasyonu                                   | 44 |
| 3.2.4.2. eNOS intron 4 bölgesinin incelenmesi             | 45 |
| 3.2.4.3. Jel Elektroforezi                                | 46 |
| 3.2.4.4. eNOS İtron 23 bölgesinin incelenmesi             | 47 |
| 3.2.4.5 İstatistik Analizler                              | 48 |
| <b>4. BULGULAR</b>  | 49 |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>                               | 54 |
| 5.1. Total Antioksidan Aktivite Bulgularının Tartışılması | 54 |
| 5.2. Ox-LDL Bulgularının Tartışılması                     | 55 |

|  |    |
|--|----|
| 5.3. NO Bulgularının Tartışılması                    | 57 |
| 5.4. eNOS Gen Polimorfizmi Bulgularının Tartışılması | 58 |
| <b>6. ÖZET</b>                                       | 61 |
| <b>7. SUMMARY</b>                                    | 62 |
| <b>8. KAYNAKLAR</b>                                  | 63 |

## **KISALTMALAR**

ABTS: 2',2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulphonate)

ADP: Adenozin difosfat

Apo B100: Apolipoprotein B-100

cGMP: Siklik guanozin monofosfat

CO: Karbon monoksit

DM: Diabetes mellitus

DNA: Deoksiribonükleik asit

DTPA: Dietilentriamin pentaasetik asid

EDRF: Endotel kaynaklı gevşeme faktörü

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz

ETZ: Elektron transport zinciri

FAD: Flavin adenin dinükleotid

FMN: Flavin adenin mononükleotid

GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör

GSH: Redükte glutasyon

GST: Glutasyon - S – transferaz

HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

KAH: Koroner arter hastalığı

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein

M-CSF: Makrofaj koloni uyarıcı faktör

MCP-1: Monosit kemoatraktant protein-1

MDA: Malondialdehit

MM-LDL: Minimal modifiye LDL

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz

OH<sup>•</sup> : Hidroksil radikali

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : Süperoksit radikali

ONOO<sup>•-</sup> : Peroksinitrit

Ox-LDL: Okside LDL

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri

RNA: Ribonükleik asit

SOD: Süperoksit dismutaz

SOR: Serbest oksijen radikali

TAA: Total antioksidan aktivite

TG: Trigliserid

VLDL: Çok düşük dansiteli lipoprotein

VNTR: Variable number of tandem repeats (Değişken sayıda ardışık tekrarlar)

XO: Ksantin oksidaz

## 1. GİRİŞ

Gelişmiş batı ülkelerinde ölümlerin en başta gelen sebebi kardiyovasküler hastalıklardır. Bu yüzden çok sayıda araştırmaya konu olmakta ve gün geçtikçe bu konuda yeni gelişmeler sağlanmaktadır.

Kardiyovasküler hastalıkların temelinde yatan asıl olay ateroskleroz olup etyopatogenezinde çok sayıda genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. Özellikle serbest radikaller ve bunların etkisi sonucu oluşan okside LDL (Ox-LDL) köpük hücre oluşumunun ve aterosklerozun başta gelen sebebi olarak kabul edilmektedir.

Antioksidanlar, serbest radikal etkisine karşı korunma sağlarlar. Bu noktada beslenme ile dışarıdan alınan antioksidan vitaminler büyük öneme sahiptirler. Bundan dolayı her bölge için antioksidan aktivite ölçümü hastalıktan korunmada ve destek tedavisi almada yol gösterici olmaktadır.

Öte yandan, son yıllarda keşfedilen nitrik oksidin (NO) de kardiyovasküler sistem ve özellikle damar tonusu üzerinde çok etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu özelliği ile NO metabolizması ile ilgili çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bunlardan, NO sentezini sağlayan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin genetik polimorfizminin koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğuna dair bulgular elde edilmiştir. Örneğin, eNOS geninin 4a alleli için homozigot olan hastalarda bu allelin koroner arter hastalığı (KAH) ve MI ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. eNOS geni 4a allelinin düşük NO seviyeleri ile ilişkili olduğu ve 4a alleli için homozigot olan bireylerde NO metabolitlerinin 4b/b genotipli bireylerinkinden %20 daha düşük olduğu gösterilmiştir. Böylece, eNOS geni 4a alleli NO düzeyini etkilemek suretiyle KAH patogenezinde rol almaktadır. Japon bireylerde 4a allelinin artmış kan basıncı ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir.

Genetik polimorfizm toplumlar arası varyasyon gösterdiğinden her toplum için ayrı ayrı araştırılması gerekmektedir.

Biz bu çalışmamızda bölgemiz koroner arter hastaları ve sağlıklı kontrollerde total antioksidan aktivite (TAA), Ox-LDL ve NO seviyesi ile eNOS geni intron 4 ve intron 23'deki polimorfik yapıların sıklığını araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. KORONER ARTER HASTALIĞI

Kardiovasküler hastalıklar; koroner kalp hastalığı, inme ve periferik damar hastalıklarını da içine alan farklı hastalık gruplarını kapsar. Fakat bütün bu hastalıkların tümünün altında yatan patoloji aterosklerozdur. Aterosklerozun fizyopatolojisi oldukça komplekstir, kan damarlarının subendotelyal aralığında, arter duvarının tüm yapısal elemanları, trombosit, lökosit ve özellikle monosit, makrofaj gibi çeşitli inflamatuvar hücreler ile lipid ve lipoproteinlerin birikimini içeren kronik, inflamatuvar bir hastalıktır (1,2).

Bu süreçte merkezi rol oynayan vasküler endotel, arteriyel duvar ve kan dolaşımı arasında dinamik bir geçiş bölgesidir. Damar duvarındaki değişiklikler yaşam boyunca oluşurken, ateroskleroz yaşanmadan farklı bir patolojik bir süreçtir (1).

Aterosklerozun öncü lezyonları; yağ izleri (fatty streak) ve fibröz plaktır. Yağ izleri, aterosklerozun en erken görülen bulgusudur. Üç yaşın altındaki çocuklarda da gözlenmektedir. Batı tipi diyetle beslenen çoğu kişiler 20 yaşında bir kısım yağ izlerine sahip olurlar. Yağ izleri mikroskopik olarak; köpük görünümü veren intrasellüler lipidlerle dolu büyük hücrelerin (köpük hücreleri, foam cells) subendotelyal bölgeye toplanmasıyla karakterizedir. Köpük hücrelerinin bir kısmı düz kas orijinli olsa da esas olarak lipidlerle yüklü makrofajlardır. Fibröz plak, aterosklerotik hastalıkların kliniğinde önemli rol oynar. Yağ izleri arteriyel damarlarda yaygın plak gelişmeyen bölgelerde bile oluşabilir. Mikroskopik olarak, fibröz plaktaki değişikliklerin çoğu intimal tabakada meydana gelir ve burada monosit, lenfosit, köpük hücreleri ve konnektif doku toplanmıştır. Bazı lezyonlarda, hücre yıkıntılarının nekrotik çekirdeği, köpük hücreleri ve kolesterol kristalleri görülür. Bazılarında da konnektif matriks içinde düz kas hücrelerinden ibaret fibröz bir başlık bulunur. Yağ izlerinden farklı olarak, fibröz plak içindeki köpük hücrelerinin çoğu düz kas orijinlidir (3).

#### 2.1.1. Ateroskleroz oluşum hipotezleri

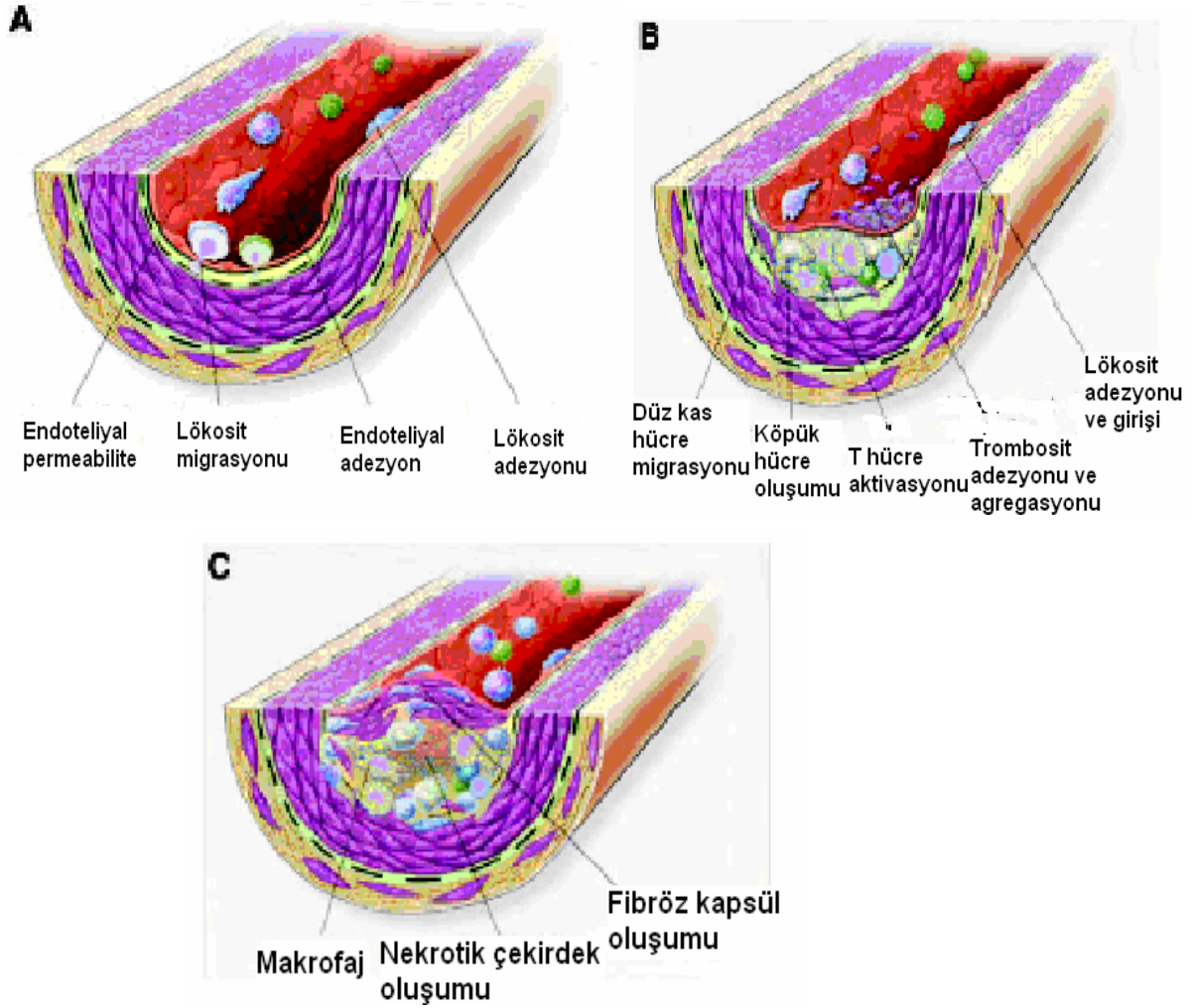
Ateroskleroz gelişimiyle ilişkili kompleks olayları açıklamak için üç farklı hipotez ortaya atılmıştır (4). Bunlar;

- 1) Hasara yanıt hipotezi
- 2) Tutulmaya (retention) yanıt hipotezi
- 3) Oksidatif modifikasyon hipotezi

**1) Hasara yanıt hipotezi:** Bugün hala aterosklerotik sürecin nasıl başladığı tam olarak anlaşılamamıştır. Bu anlamda en fazla kabul gören görüş Ross tarafından ortaya atılan hasara tepki (“response to injury”) hipotezidir. Bu hipotezde anahtar olay endotel hasarıdır (5). Endotel hasarı, normal vasküler özellikleri değiştiren bir takım kompensatuvar cevaplara yol açar. Örneğin, hasar, lökosit ve trombositlerin endotele adezyonunu artırır ve lokal vasküler antikoagulan çevreyi prokoagulan bir çevreye dönüştürür. Toplanan lökosit ve trombositler, sitokin, vazoaktif ajanlar ve büyüme faktörlerini salgırlar ve intima içerisine düz kas hücre migrasyonunu ve onların proliferasyonu ile karakterize olan inflamatuvar cevabı arttırlar (4).

İnflamatuvar cevabın bir diğer komponenti arter duvarı içerisine makrofajların toplanmasıdır. Bu makrofajlar düşük dansiteli lipoprotein (LDL) partiküllerini alarak içi lipid dolu köpük hücrelerini oluştururlar. Lipid birikimi ve köpük hücre oluşum süreci inflamatuvar cevapla devam eder. Süregelen inflamasyon olayını, sitokin, büyüme faktörleri ve proteolitik enzimlerin salınımı ile birlikte olan hücresel nekroz izler. Lezyonun otokatalitik olarak genişlemesiyle lezyon lümenine doğru ilerler ve sonunda kan akımını bozar (4).

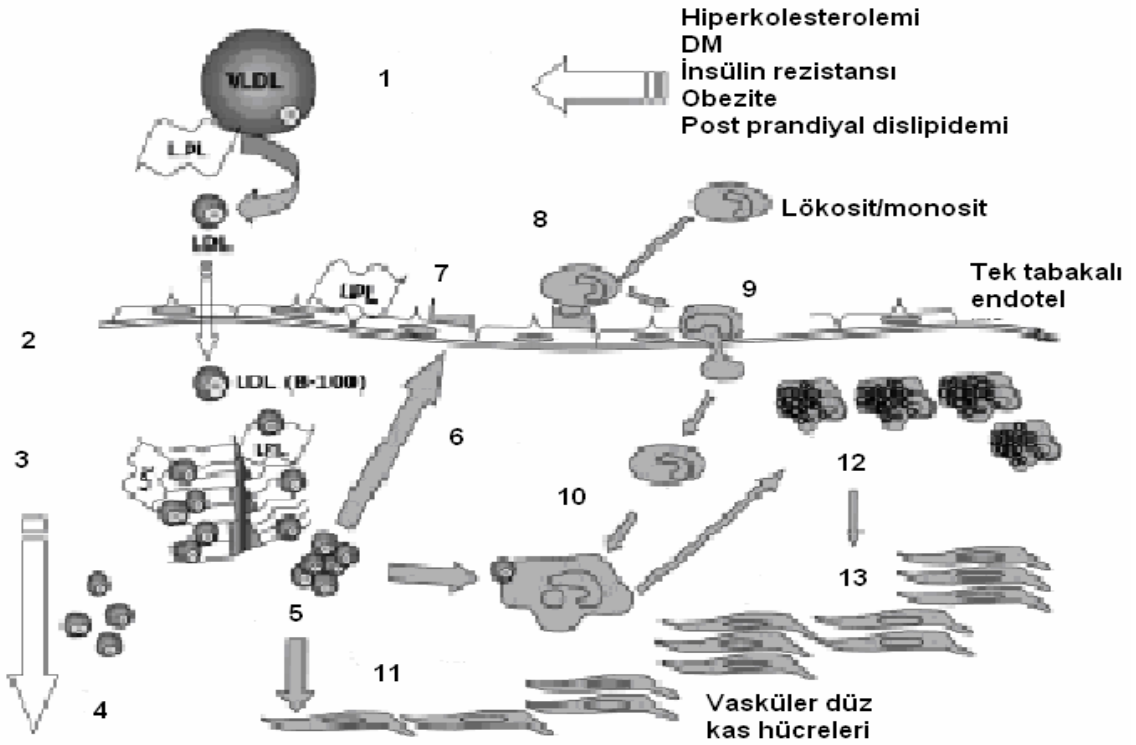
Şekil-1’de hasara yanıt hipotezi şematize edilmiştir.



Şekil-1: Hasara yanıt hipotezi (4)

(A: Artmış endotel geçirgenliği ve subendotel aralığına LDL birikimi. Endotele lökosit adezyonu ve transmigrasyonu B: T hücre aktivasyonu, lökosit adezyonu, trombosit adezyon ve agregasyonu ile köpük hücre oluşumu C: Süregelen makrofaj birikimi, fibröz kapsül oluşumu ve lezyonun merkezinin nekrozu)

**2) Retansiyona yanıt hipotezi:** Bu hipoteze göre ateroskerozu başlatan olay lipoprotein retansiyonudur. Arter duvarına lipoprotein retansiyonu, ekstrasellüler matriks komponentleriyle sıkı olarak bağlantılı gibi görünmektedir. Özellikle, apolipoprotein B-100 içeren lipoproteinlerin, damar duvarına birikiminin inflamatuvar kaskadı tetiklediği düşünülmektedir (4). Şekil-2’de retansiyona yanıt hipotezi özetlenmiştir.

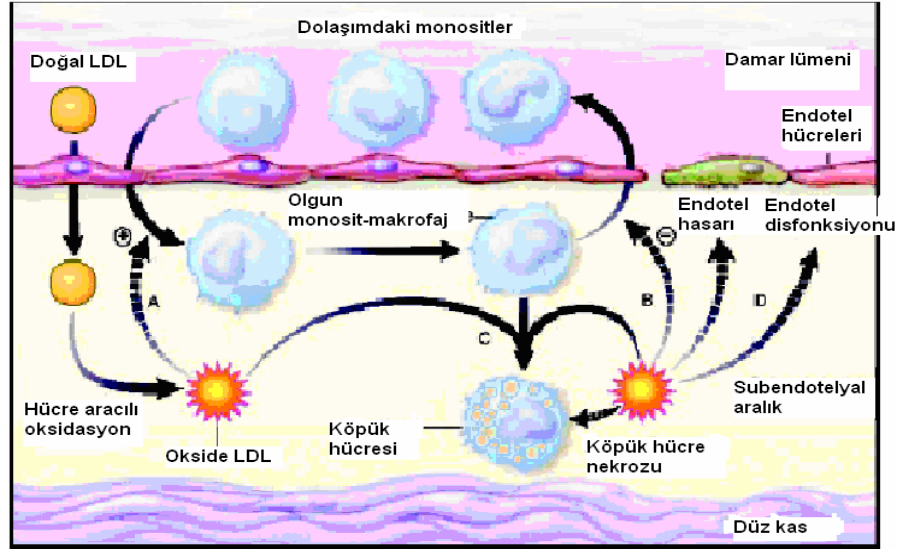


**Şekil-2:** Retansiyona yanıt hipotezi (4)

1. Lipoprotein sekresyonu ve lipoliz
2. Artere geçiş
3. Bağlanma ve tutulma
4. Atılma (efflux)
5. Birikme
6. Kemotaksis
7. Adezyon moleküllerinin ekspresyonu
8. Ekleme
9. Damar dışına atılma
10. Farklılaşma
11. Modifiye LDL'nin içeri alınması
12. Köpük hücre oluşumu
13. Vasküler düz kas hücre proliferasyonu

**3) Oksidatif modifikasyon hipotezi:** Aterosklerozda oksidatif modifikasyon hipotezi, Goldstein ve arkadaşlarının kültüre makrofajların kimyasal olarak modifiye olmuş LDL (Ox-LDL) varlığında lipit yüklü hücelere dönüştüğü görüşü ile ortaya çıkmıştır (6). Modifiye LDL'nin in vitro düz kas hücresi ve endotel hücrelerinde monosit kemotaktik protein-1'in sentezini arttırdığı gösterilmiştir. Ox-LDL, monosit ve lenfositler için kemotaktiktir ve Ox-LDL'nin düz kas hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir

(4). Ox-LDL, makrofajlar tarafından köpük hücre oluşumu için daha hızlı oranda alınmaktadır. Ayrıca, Ox-LDL endotelial hücreler gibi bir takım hücelere sitotoksiktir (7). Şekil-3’de oksidatif modifikasyon özetlenmiştir.



**Şekil -3:** Oksidatif Modifikasyon Hipotezi

([www.kcl.ac.uk/.../tabs/image10.gif](http://www.kcl.ac.uk/.../tabs/image10.gif))

( A: Ox-LDL monosit kemotaksisini uyarır. B: Monosit gidişini engeller.  
C: Köpük hücre oluşumuna aracılık eder. D: Ox-LDL endotel disfonksiyonu ve hasarına yol açar. E: Ox-LDL birikiminden dolayı köpük hücre nekrozu oluşur.)

### 2.1.2. ATROSKLEROZUN FİZYOPATOLOJİSİ

Aterosklerotik plak gelişiminde çeşitli evreler vardır. Bu evreler şunlardır:

1. Endotelial aktivasyon veya disfonksiyon
2. İnflamatuar evre
3. Reperativ evre
4. Trombotik evre (1)

### **a. ENDOTELYAL AKTİVASYON VEYA DİSFONKSİYON**

Aterosklerotik süreçteki ilk basamak endotel disfonksiyonudur. Sirkülasyondaki yüksek lipid konsantrasyonları, artmış kan basıncı, sigaradaki toksinler ve yüksek glukoz düzeyleri gibi aterosklerotik risk faktörleri endotel fonksiyonunda bozukluğa yol açmaktadır (1,8). Lezyona eğilimli arter bölgelerinde albümin, LDL ve fibrinojene geçirgenliğin arttığı gösterilmiştir. LDL, subendotelyal aralıktaki kollajen ve glikozaminoglikanlar gibi ekstra sellüler matriks proteinlerine bağlanarak arter duvarında birikir. Ayrıca endotelyal yüzeyde etkilenmiş bölgelerde, özellikle monositler toplanmaya başlar ve makrofajlara dönüşürler. Ateroskleroz sıklıkla fokal olup kısmen, kan damarlarının dallanma noktalarına yakın lokal girdap bölgelerini etkiler (1,6).

### **b. İNFLAMATUVAR FAZ**

Arteriyal duvara monositlerin girişi ve makrofajlara dönüşümü inflamatuvar yanıtın tipik bir özelliğidir. Makrofajların asıl amacı hasarlı hücreleri bulmak ve reaktif oksijen ve nitrojen türevleri ile enfeksiyonu başlatmaktır. Makrofajlar aynı zamanda lipit biriktirmekte ve bu faz ekstraselüler lipid depolanmasının veya yağlı çizgilenmelerin görüldüğü faz olmaktadır ki bu durum çok genç insanlarda bile görülebilir (1).

### **c. REPERATİF FAZ**

Birçok aterosklerotik plağın olgunlaşma sürecinde belirli bir zaman periyoduna ihtiyaç duyması plağın olgunlaşmasında inflamatuvar durumu önlemeye zıt bir defans veya savunma mekanizmasının olduğunu bildirmektedir. Bu durum özellikle düz kas hücrelerinin kontraktıl özelliklerinin kaybı, kollajen ve matriks proteinlerini sentez edebilecekleri daha fibroblastik bir fenotipe dönüşmeleri ile ilişkilidir. Değişimin yararı ise yağlı dokunun yeniden yapılanmasında büyük mekanik güçlü bir fibröz kapsül, yani bir çeşit skar dokusu ile kaplanmasıdır. Bu noktada birçok plak progresyona gitmemekte ve klinik sonuç gelişmemektedir. Lipid depolanmasının ve yeni fibröz kapsüllerin oluşumunun çoklu fazları olabilir ve bazen arter duvarı kalınlaşır, plak arteriyal lümeneye girer ve kısmen kan akımını önler. Ayrıca oksijen ve besin maddeleri için kalınlaşmış arteri geçmek zorlaşır ve hipoksik ve sonuçta nekrotik hale gelebilir. Bunun önlenmesi için, anjiogenez süreci, yeni kan damarlarının oluşumu uyarılabilir ve gerekli besinler sağlanabilir (1).

#### **d. TROMBOTİK FAZ**

Tüm aterosklerotik plaklar aynı değildir; içerikleri ( makrofaj sayısı ve lipid oranı gibi) ve fibröz kapsülün kalınlığı değişiklik gösterebilir. Fibröz kapsülü ince olanlar mekanik bir zorlamaya daha duyarlı olabilir. Fibröz kapsüldeki hasarlanma doku faktörü gibi pro-trombotik proteinlerin sızıntısı sonucunda koagülasyon kaskadını aktive ederek trombüs oluşumunu başlatacaktır. Bu durumda oluşan trombus arteri tamamen veya kısmen tıkanabilir veya oluşan trombüs bir başka artere göç ederek orada tıkanmaya sebep olabilir (1).

#### **2.1.3. EPİDEMİYOLOJİK RİSK FAKTÖRLERİ**

Koroner arter hastalığının gelişmesini veya ilerlemesini önlemede ya da seyrini yavaşlatmada, özellikle geri döndürülebilir risk faktörleri çok önemlidir. Bunların en önemlileri; sigara içme, hipertansiyon ve hiperkolesterolemidir. Özellikle genç erişkinlerde bu risk faktörlerinin kontrolü koroner arter hastalığının yaygınlığını azaltmada çok önemlidir (3).

#### **Koroner kalp hastalığı risk faktörleri (3)**

##### **Major risk faktörleri**

Sigara içme

Hipertansiyon

Serum total kolesterol veya LDL kolesterol yüksekliği

HDL kolesterol düşüklüğü

Diabetes mellitus

##### **Kondisyonel risk faktörleri**

Trigliserid yüksekliği

Lipoprotein(a)

Homosistein

Pıhtılaşma faktörleri

Plazminojen aktivatör inhibitör-1

Fibrinojen

C-reaktif protein

##### **Predispozan risk faktörleri**

Obezite (özellikle abdominal obezite)

Fiziksel aktivite azlığı

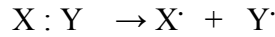
Erkek cinsiyet  
Ailede erken yaşta KAH bulunması  
Sosyal ve ekonomik faktörler  
Psikolojik faktörler  
İnsülin direnci

## 2.2. SERBEST RADİKALLER

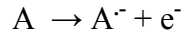
Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküller olup ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktifler ve yarı ömürleri kısadır. Radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girerek, yeni radikal oluşumuna yol açarlar ve böylelikle zincir reaksiyonunu başlatırlar (9-13).

Bu bileşikler organizmada normal metabolik yollar ve patolojik mekanizmalar sonucu üç yolla oluşmaktadır:

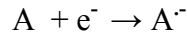
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.



2. Normal bir molekülde tek bir elektronun kaybı



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



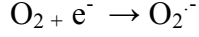
Biyolojik sistemde oluşan radikaller organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  metallerinde ortaklanmamış elektronları olmakla beraber serbest radikal olarak kabul edilmezler (10,13).

### 2.2.1.Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksid, hidrojen peroksid, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları ile sonuncusu meydana gelir (11,14,15).

### 2.2.1.1. Süperoksit Radikali (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) meydana gelir.

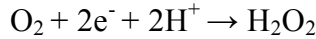
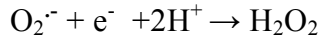


Süperoksit anyonu hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Katekolaminlerin, tiollerin ve hemoproteinlerin oksidasyon tepkimelerinde, çeşitli enzimatik tepkimelerde, oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin katalitik etkileri sırasında süperoksit anyon radikali oluşur (16,17). İnsan vücudunda en büyük süperoksit kaynağı ETZ'dir (12,13,18).

Lipofilik özelliği olan süperoksit radikali uzun yarı ömre sahiptir. Bu özelliğinden dolayı uzak bölgelere diffüze olabilmektedir. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direk olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (11,19).

### 2.2.1.2. Hidrojen peroksit

Oksijenin iki elektron veya süperoksitin bir elektron alması ile hidrojen peroksit oluşur.



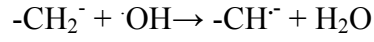
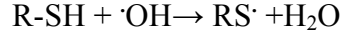
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (11,21).

Hidrojen peroksit süperoksitle reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar veren serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur(22).

### 2.2.1.3. Hidroksil radikali

Hidroksil radikali (OH), hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu ile) meydana gelir. Son derece reaktif bir oksidan radikaldir. Ayrıca hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda da (Haber Weiss reaksiyonu) oluşur (11,16,23).

Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Yarılanma ömrü çok kısa olup, oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur. Aşağıda gösterildiği gibi tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına sebep olur (11).



#### 2.2.1.4. Singlet Oksijen

Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur(11).

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ( $\text{R}\cdot$ ), peroksil (peroksi) radikalleri ( $\text{ROO}\cdot$ ), alkoksil (alkoksi) radikalleri ( $\text{RO}\cdot$ ), thiyl radikalleri ( $\text{RS}\cdot$ ) gibi önemli serbest radikaller de meydana gelirler. Bunlardan özellikle poliansatüre yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir (11).

Thiyl radikalleri ise oksijenle tekrar reaksiyona girip sülfenil ( $\text{RSO}\cdot$ ) veya thiyl peroksil ( $\text{RSO}_2\cdot$ ) gibi radikalleri meydana getirirler (11).

## 2. 3. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Metabolik ve fizyolojik süreçlerde reaktif oksijen türleri üretilirler. Zararlı oksidatif maddeler, enzimatik ve non-enzimatik reaksiyonlarla uzaklaştırılırlar. Bazı durumlarda, oksidanlarda artma ve antioksidanlarda azalma önlenemeyebilir ve oksidatif/antioksidatif denge oksidatif duruma doğru kayabilir. Sonuç olarak, pek çok hastalıkla ilişkisi olduğu gösterilen oksidatif stres gelişir (24,25).

Serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması bulunmaktadır. Bunlar antioksidanlar olarak bilinirler ve hedef moleküldeki oksidan hasarı engellerler veya geciktirirler.

Antioksidanların etki mekanizmaları başlıca şunlardır:

— Reaktif oksijen türlerinin antioksidan enzimler aracılığı ile veya doğrudan temizlenmesi

- Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun engellenmesi
- Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalizleyen metal iyonlarının bağlanması
- Zedelenmiş hücresel yapıların hasar sonrası tamir edilmesi veya temizlenmesi.

### **Antioksidanların sınıflandırılması (11)**

- 1) Yapılarına göre
  - a) Enzimler
  - b) Enzim olmayan moleküller
- 2) Kaynaklarına göre
  - a) Endojen antioksidanlar
  - b) Eksojen antioksidanlar
- 3) Çözünürlüklerine göre
  - a) Suda çözünenler
  - b) Yağda çözünenler
- 4) Yerleşimlerine göre
  - a) Hücre içinde bulunanlar
  - b) Plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunanlar

Bazı önemli antioksidanlar ve etkileri Tablo-1'de verilmiştir.

**Tablo-1:** Bazı önemli antioksidanlar ve etkileri

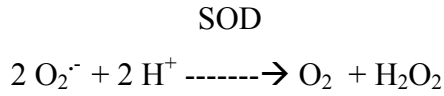
| Tip   | Doku lokalizasyonu   | Fonksiyonu   |
|---|--|--|
| <b>I. Nonenzimatikler</b><br>-Vitamin E<br>( tokoferol)         | Membranlar, ekstra<br>sellüler sıvı                                | $O_2^{\cdot-}$ , $\cdot OH$ ve lipid peroksil radikallerini daha az reaktif bileşiklere çevirir, zincir kırıcı antioksidandır.                       |
| -Vitamin A<br>( $\beta$ -karoten)                               | Membranlar   | $O_2^{\cdot-}$ 'yi temizler; peroksil radikalleri ile direk reaksiyona girer.  |
| -Vitamin C<br>(askorbik asit)                                   | İntra- ve ekstraselüler<br>sıvıda geniş bir biçimde<br>dağılmıştır | $O_2^{\cdot-}$ , $\cdot OH$ ile direk reaksiyona girer. Lökositlerden salınan ROS'leri nötralize eder. Vitamin E radikalinin rejenerasyonunu sağlar. |
| -Glutatyon  | Esas olarak intrasellüler  | $O_2^{\cdot-}$ , $\cdot OH$ ve lipid hidropeksitlerle direk reaksiyona girer. GSH enzimleri için substrattır   |
| -Ürik asit  | Geniş olarak dağılmıştır   | Geçiş metallerini bağlar. $O_2^{\cdot-}$ , $\cdot OH$ ve peroksil radikalleri ile reaksiyona girer. Askorbik asidin oksidasyonunu önler.             |
| <b>II. Enzimatikler</b><br>-SOD                                 | Mitokondri ve sitozol  | Dismutaz reaksiyonu ile $O_2^{\cdot-}$ 'yi $H_2O_2$ 'ye dönüştürür.  |
| -GSH dönüşüm<br>enzimleri<br>- GSH peroksidaz<br>- GSH redüktaz | Sitozol ve mitokondri  | Normal metabolizma süresince $H_2O_2$ 'yi indirger. Düşük molekül ağırlıklı disülfidleri (GSSG->GSH), NAD(P)H kullanarak indirger.                   |
| -Katalaz (CAT)  | Peroksizomlar  | Özellikle hastalık durumlarında $H_2O_2$ 'yi indirger  |

## 2.3.1. DOĞAL (ENDOJEN ) ANTIOKSİDANLAR

### 2.3.1.1. ENZİM YAPISINDAKİ ANTIOKSİDANLAR

#### 2.3.1.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1)

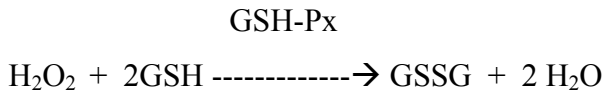
Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Bu reaksiyon spontan da meydana gelebilir. Fakat, SOD varlığında reaksiyonun aktivitesi 4000 kat artar (11,25).



Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikalinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylelikle lipid peroksidasyonunu inhibe eder (11). SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyi düşük tutulur (11).

#### 2.3.1.1.2 Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px,E.C.1.11.19)

Glutatyon peroksidaz, aktivitesi için selenyuma ihtiyaç duyan ve selenyum içeren tetramerik, antioksidan bir enzimdir (4,25). Selenyum aktif olarak katalitik reaksiyona katılır. Sitozolde bulunan glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksit ile kolesterol ve yağ asidi hidroperoksitlerine etki eder. Bu reaksiyonda indirgeyici olarak glutatyon (GSH) kullanılır (4,26).

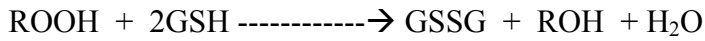


Diğer antioksidanlarla birlikte bu enzim, solunum patlaması sırasında oluşan serbest radikallerin fagositik hücreye zarar vermesini engeller. Eritrositlerde de oksidan strese karşı en etkili antioksidan enzimdir (27).

### 2.3.1.1.3 Glutasyon - S – Transferazlar (GST) (E.C.2.5.1.18)

Glutasyon - S – transferazlar (GST), ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda rol alan, her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. Başta araşidonik asit ve lineloat hidroperoksitleri olmak üzere lipit peroksitlere karşı selenyumdan bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar (11).

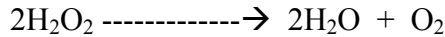
GST



### 2.3.1.1.4. Katalaz (E.C.1.11.1.6)

Başlıca hücrel peroksizomlarda lokalize olan hücre içi antioksidan bir enzimdir. Hidrojen peroksiti, su ve moleküler oksijene dönüştüren reaksiyonu katalizler.

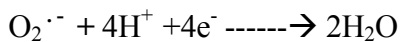
Katalaz



Ayrıca bu enzimin peroksidaz aktivitesi de vardır, organik peroksitlerle reaksiyona girer ve su ve organik alkollere hidrojen verir. Katalaz artmış oksidatif stres durumlarında çok etkilidir ve hücrede üretilen hidrojen peroksitten hücreleri korur. Bu enzim özellikle glutasyon miktarının kısıtlı ve GPx aktivitesinin azaldığı durumlarda önemli olup, adaptif hücre cevabında oksidatif strese tolerans gelişiminde önemli bir rol oynar (25).

### 2.3.1.1.5. Mitokondrial sitokrom oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir(11).



## **2.3.1.2. ENZİM YAPISINDA OLMAYAN ANTIOKSİDANLAR**

### **2.3.1.2.1. Redükte glutatyon (GSH)**

GSH, karaciğerde sentezlenen bir tripeptiddir. Glutamik asid, sistein ve glisin aminoasidlerinden meydana gelmiştir. Çok önemli bir antioksidan olan glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunun dışında, proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Böylece, fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Redükte glutatyon (GSH), reaksiyon sonucu oksitlenerek okside glutatyon (GSSG) dönüşür (19). Okside glutatyonun tekrar redükte hale gelmesi NADPH' in kullanılması ile mümkündür (28).

### **2.3.1.2.2. Askorbik asit (C vitamini)**

C vitamini suda çözünebilen güçlü bir antioksidandır (29). Aynı zamanda çok güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbik asit semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidrosil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Semidehidroaskorbat da antioksidan etki gösterir. C vitamini tokoferoksil radikalinin,  $\alpha$ -tokoferole indirgenmesini sağlar. Askorbatın fizyolojik konsantrasyonları, vasküler hücreler, aktif nörofiller ve hücreden bağımsız sistemler tarafından başlatılan LDL peroksidasyonunu inhibe eder (4,6).

### **2.3.1.2.3. E vitamini (Tokoferoller)**

E vitamini tokoferol yapısındadır ve doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli türevleri bulunmaktadır. D- $\alpha$ -tokoferol en geniş doğal dağılımı ve en büyük biyolojik aktiviteyi gösterir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol de  $\alpha$ -tokoferoldür. Yapısında bulunan fenolik hidrosil grubuna sahip aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır.  $\alpha$ -tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur.

Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini (PUFA) serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Bir molekül  $\alpha$ -tokoferol 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini, süperoksid ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger (11).

E vitamini, zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Çünkü fonksiyonları, lipid peroksi radikallerini (LOO-) parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktır (11).

#### **2.3.1.2.4. Karotenler**

$\beta$ -karotenin, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksid radikalini temizlediği ve peroksi radikalleri ile direk olarak etkileşerek antioksidan vazife gördüğü tesbit edilmiştir (11).

### **2. 4. VASKÜLER OKSİDAN ENZİM SİSTEMLERİ**

#### **3. 4. 1. NADPH Oksidaz**

Membrana yerleşmiş bulunan NADPH oksidaz enzimi, moleküler oksijene bir elektron ilave ederek süperoksiti ( $O_2^{\cdot -}$ ) oluşturur. Elektron vericisi olarak NADH veya NADPH'ı kullanır (4,9). Hücre zarının dış yüzeyinde bulunan NADPH oksidaz, respiratory burst'ten (solunumsal patlama) sorumludur. Uygun bir uyarıyla fagosit uyarıldıktan sonra NADPH oksidaz aktive edilir (10). Preklinik çalışmalar, NADPH bağımlı  $O_2^{\cdot -}$  üretiminin endotelial disfonksiyonu arttırdığını göstermektedir. Klinik çalışmalar, vasküler hastalıklarda NADPH oksidaz'ın rolünü desteklemektedir. Vasküler hücrelerde NADPH oksidaz, anjiotensin II, trombin, platelet derived growth faktör, tümör nekrozis faktör- $\alpha$ , interlökin1, endotel hücrelerine shear stresi içeren mekanik kuvvetler ve vasküler endotel büyüme faktörü gibi uyaranlar tarafından aktive edilebilmektedir (4).

## 2. 4. 2. Ksantin oksidaz (XOD)

Kapillerler ve sinüzoidlerin endotel hücrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunan ksantin oksidaz, pürin metabolizması sırasında ksantin ve hipoksantin oksidasyonunu katalizler (4,25). Patolojik durumlarda, ksantin oksidaz, büyük miktarda reaktif oksijen türlerinin (süperoksidin) üretimini sağlar (25). Ksantin oksidaz için endotel içerisinde tanımlanan bir sinyal de shear stresdir (4). Endotel disfonksiyonun patogeneğinde XOD ilişkisini gösteren pek çok kanıt, oxypurinol veya allopurinol ile enzimin deneysel inhibisyonu ile elde edilmiştir (30).

## 2. 4. 3. Endotelyal nitrik oksit sentaz

Vasküler hemostazda önemli rol alan nitrik oksitin üç izoformundan birisi olan eNOS, endotel disfonksiyona iştirak eder. eNOS, L-arjinin ve tetrahidrobiyopterin ile bağlandığında, NO üretimini katalizler. eNOS, L-arjinin ve tetrahidrobiyopterin ile bağlanmadığında,  $O_2^- \cdot$  ve  $H_2O_2$  üretir. Bu durum endotel disfonksiyonunda meydana gelir, NO azalır, süperoksit ve peroksinitrit oluşumu ile aterosklerotik lezyonlarda köpük hücre oluşumu artar (30).

## 5. OKSİDE LDL (Ox-LDL)

LDL, yoğunluğu 1.019 - 1.063 g/mL, çapı 20-30 nm olan ve periferik dokulara endojen kolesterol sağlayan, kolesterolden zengin bir lipoproteindir (31). LDL kendine ait reseptörlerle hücre içine alınır. Bu yolla alınan kolesterol miktarı oldukça sınırlıdır (32). Doğal LDL ne sitotoksiktir, ne de endotel fonksiyonlarında değişime yol açar. Fakat, makrofaj tarafından alınan LDL'nin yapısındaki bir takım değişiklikler sonucunda makrofajların köpük hücrelere dönüşümü gerçekleşir (33). LDL, oksidasyon, glikolizasyon, asetilasyon veya malondialdehitin bağlanmasıyla modifiye olabilir. LDL oksidasyonu, LDL yapısındaki doymamış yağ asitlerinin lipit peroksidasyonu sonucu yıkılmasıyla oluşur (11). LDL oksidasyonu üç safhada gerçekleşmektedir; (32-34)

1) Lag fazı: Bu safhada oksidatif reaksiyonlar yavaştır ve bu safha LDL'deki antioksidanların tükendiği safhadır.

2) Progresyon Fazı: Hızlı lipit peroksidasyonunun olduğu safhadır.

3) Dekompozisyon fazı: Bu safhada çoklu doymamış yağ asitlerinin %70-80'i oksidasyona uğrar ve hexanal, 4-hidroksinonenal ve malondialdehit (MDA) gibi aldehitik ürünler oluşur.

### 2.5.1. LDL Oksidasyonunu Etkileyen Faktörler

#### 2.5.2. İntrensek Faktörler

- a) **Substratın niteliği:** LDL'nin içerdiği yağ asitlerinin bileşimi oksidasyonda önemlidir. Tavşan ve insanlarda yapılan çalışmalarda LDL'nin oleik asit miktarının arttırılmasının oksidasyona duyarlılığı azalttığı gösterilmiştir (32).
- b) **LDL'nin antioksidan içeriği:** LDL çeşitli antioksidanlar tarafından oksidasyondan korunur. Gerçekten, LDL'deki  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, ubiquinol, 10-lycopen ve probukol gibi antioksidanların miktarının fazla olması oksidasyona olan direnci arttırarak lag fazının uzamasını sağlarlar (11,32).
- c) **LDL partikülünün büyüklüğü:** Küçük, yoğun LDL partikülleri oksidanlara daha duyarlıdır ve LDL reseptörlerine daha az afinite gösterirler. Bu yüzden daha uzun yarılanma süresine sahiptirler ve koroner arter hastalığı için daha fazla risk taşırlar (31,32,35).

#### 2.5.3. Ekstresek Faktörler

a) **Hücrel potansiyel aktivitedeki değişiklikler:** Hücrelerin süperoksit anyonu salgılama yetenekleri ile makrofajların 15-lipooksijenaz ekspresyonundaki farklılıklar LDL oksidasyonunu etkilemektedir (32).

b) **Plazma ve hücre dışı sıvıdaki bazı metallerin (örn; selenyum, bakır, demir) konsantrasyonu veya bu metalleri bağlayan proteinlerin konsantrasyonu (32)**

c) **Plazma veya hücre dışı sıvıdaki antioksidanların konsantrasyonu:** Özellikle ürik asit ve askorbik asit gibi antioksidanlar büyük öneme sahiptir (32).

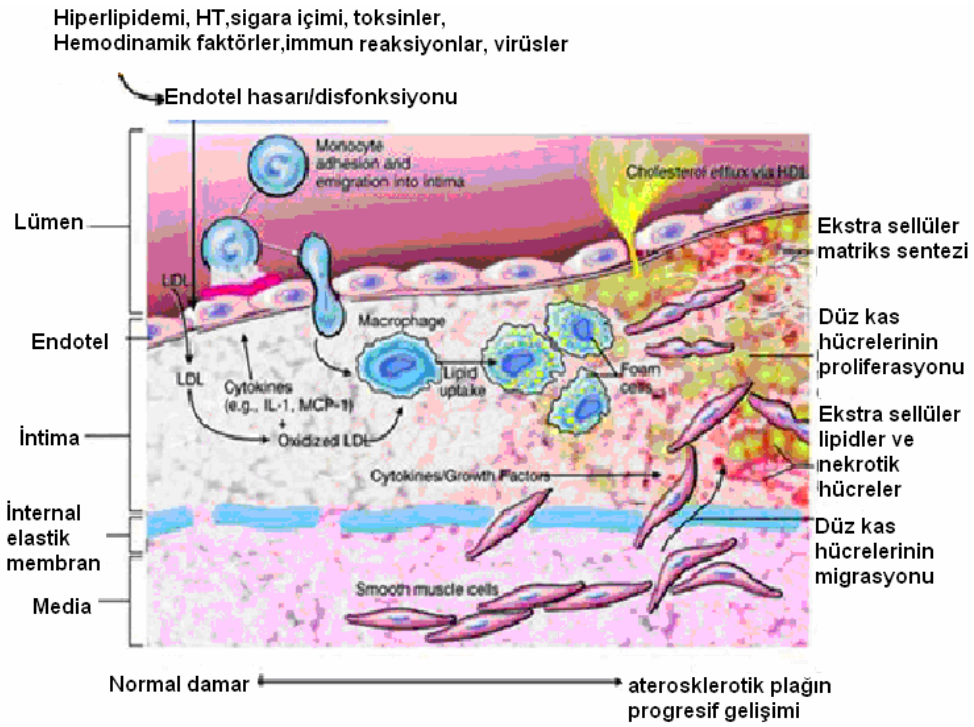
d) **HDL konsantrasyonu:** HDL'nin lipid peroksidasyonunu azalttığı kaydedilmiştir, ancak bu etkinin mekanizması bilinmemektedir (32).

e) **LDL'nin intimada bulunma süresi:** Lipoprotein(a), LDL'yi bağlayan glikoproteinler ve matriks proteinlerindeki değişiklikler, LDL veya matriks proteinlerinin non-enzimatik glikozilasyonu, LDL'nin intimada bulunma süresini etkiler (32).

İntimaya giren LDL oksidan etkiye maruz kaldıktan sonra, oksidatif modifikasyona uğrar. Bu oksidatif modifikasyona uğrayan ürünler, minimal modifiye LDL (MM-LDL)

olarak adlandırılırlar. Bu ürünler scavenger reseptörler tarafından tanınmayıp normal reseptörlerce hücre içine alınırlar. Minimal modifiye LDL (MM-LDL), makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) salınımına yol açarak aterosklerozda önemli rol oynar. M-CSF, monositlerin makrofajlara dönüşümünü indükler ve oluşan makrofajlar MM-LDL'nin Ox-LDL'ye dönüşümünü hızlandırır (32).

Plazmadaki antioksidanlardan dolayı LDL oksidasyonu, plazmadan daha çok reaktif oksijen türlerinin fazlaca sentezlendiği endotel hücreleri ve aktif lökositler tarafından damar duvarının subendotel tabakasında meydana gelir (36). Şekil-4'de intimada Ox-LDL'nin ve köpük hücre oluşumu gösterilmiştir.



**Şekil-4:** Ox-LDL ve köpükhücre oluşumu

([www.smbs.buffalo.edu/.../y2case/y2ans04.htm](http://www.smbs.buffalo.edu/.../y2case/y2ans04.htm))

Ox-LDL çöpü ve yakalayıcı reseptörler olarak adlandırılan bir takım spesifik reseptörlere bağlanarak hücrel özelliklere aracılık ederler. Birçok Ox-LDL reseptörü tanımlanmıştır, büyük arterlerin endotel hücrelerinde bulunan major reseptör olarak LOX-1 (lektin benzeri Ox-LDL reseptörü-1) karakterize edilmiştir. LOX-1 aortik, karotid, torasik ve koroner arter ve venlerde sentezlenmekte ve hipertansiyon (HT), diabetes mellitus (DM) ve

aterosklerozis gibi damar durumunu etkileyen patolojik durumlarda sentezi artmaktadır. Yine yapılan bazı çalışmalar bu reseptörlerin makrofajlarda, düz kas hücrelerinde, fibroblastlarda ve plateletlerde exprese edildiğini göstermektedir. LOX-1'in aterosklerozdaki potansiyel rolü şu 4 kanıtla gösterilebilir:

1) LOX-1, Ox-LDL'yi bağlamada ve proteolitik olarak yıkımında güçlü bir aktivite ortaya koymaktadır.

2) Ox-LDL, LOX-1 aktivasyonu ile endotelial disfonksiyon veya apoptoza aracılık etmektedir.

3) LOX-1 dinamik olarak proaterojenik durumlarda sentezi artmaktadır.

4) LOX-1 ateroskleroz türevi hücrelerde bulunmakta, *invivo* olarak insan ve hayvan ateroskleroz lezyonlarında birikmektedir (37).

Ox-LDL, doğal haldeki LDL'den birçok yönleriyle farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar aşağıdaki gibidir (7).

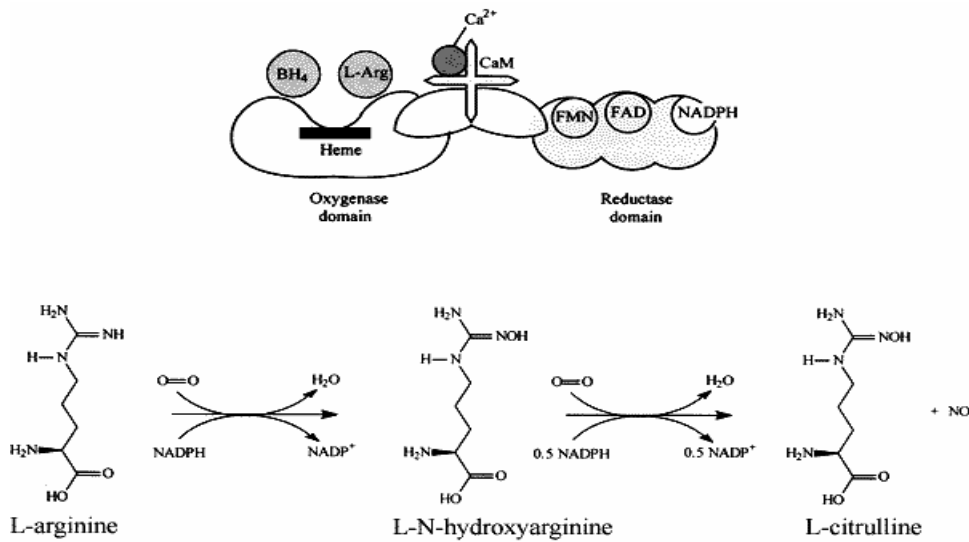
- Ox-LDL, makrofajlar tarafından scavenger reseptörleri aracılığı ile daha hızlı oranda ve kontrolsüz bir şekilde alınmaktadır. Ayrıca, Ox-LDL, gelişen lezyonda makrofajların birikimiyle sonuçlanacak tuzaklayıcı bir etkiyi ortaya çıkaran doku makrofajlarının motilitesini inhibe ederek makrofajların arter intimasında kalış süresini uzatmaktadır (7,33,37-39).
- Ox-LDL ve onun bazı ürünleri kısmen proinflamatuvardır. Bu inflamasyon hem hümmoral, hem de hücrel immun cevapla oluşmaktadır (40). Ox-LDL, dolaşımdaki monositler ve T hücreleri için kemoatraktan molekülleri sekrete eder ve onların damar intimasına göçünü hızlandırır (7,33,37,41). Ox-LDL endotelial hücrelerden monosit kemoatraktan protein (MCP-1) salınımını stimüle eder. Yani, Ox-LDL teorik olarak sirkülasyondan monositlerin göçüne direkt veya indirekt olarak etki edebilir (7).
- Ox-LDL endotel hücreleri gibi arter duvarındaki bir takım hücrelere sitotoksiktir. Endotel hücrelerine etkileriyle NO aracılı düz kas gevşemesini inhibe eder (7,33,37,42).
- Ox-LDL, düz kas hücre migrasyonu, proliferasyonu ve transformasyonunu indüklemekte de etkilidir (37).
- Ox-LDL'ye has olan diğer bir özellik ise oksidasyon sürecinin LDL'yi modifikasyon yönünde birçok neopitoplara dönüştürmesiyle ona immunojenik özellik kazandırmasıdır (7,40). Hem insan ve hayvan serumlarında, hem de aterosklerotik lezyonlarda Ox-LDL'nin epitoplara karşı spesifik immunglobulin G'ler tesbit

edilmiştir (7,32). Bu otoantikorların aterosklerozun patogeneziyle eşlik ettiği veya sıradan bir belirteç olup olmadığı henüz kesin değildir (7). Pek çok araştırmacıya göre lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA veya 4-hidroksinonenal LDL'ye bağlanarak spesifik antikor oluşumuna yol açan epitoplara oluştururlar (43). MDA, Apo B100'de bulunan lizin rezidülerine kovalent bağ ile bağlanır ve onun immünojenik özellik kazanmasına yol açar (44).

## 2.6. NİTRİK OKSİT (NO)

NO, membranlardan kolayca geçebilen, hidrofobik, küçük bir molekül olup 6-30 saniye yarılanma ömrü olan bir gazdır (45-47). Pek çok hücrede nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından, endojen bir aminoasit olan L-argininin terminal guanidin grubunun NO'ye çevrilmesiyle üretilir (48,49). Bu reaksiyon sırasında moleküler O<sub>2</sub> ile kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) ve 'hem' kullanılır.

NO sentezinin iki basamağı vardır: Birinci basamak, L-argininin N<sup>G</sup>-hidroksi-L-arginine hidroksilasyonudur. İkinci basamak ise, N<sup>G</sup>-hidroksi-L-argininin, L-sitrüllin ve NO'ye oksidasyonudur (50). Şekil-5'de NO'nun sentezi ve NOS'un yapısı gösterilmiştir.



Şekil-5: NO'nun sentezi ve NOS'un yapısı

Asetilkolin, histamin, trombin, serotonin, ADP, bradikinin, norepinefrin, substant P ve izoproterenol gibi çeşitli agonistler, endotelden NO sentez ve salınımını arttırabilmektedirler (45,51,52). Bununla birlikte, NO salınımı için en fizyolojik agonist, süregelen shear stresdir

(51, 53). *In vitro* shear stres veya *in vivo* shear oranı, endotelyal hücre yüzeyindeki kan akımı tarafından oluşturulan kuvvetin teğetsel vektörüdür. Endotelyal hücrelerin shear strese maruz kalması güçlü bir fazla devam eden NO salınımında patlama ile sonuçlanır (51).

Membranları kolayca geçen NO, guanilat siklaz enzimi aracılığıyla şu etkilere yol açar:

- Vasküler düz kas hücre relaksasyonunun stimülasyonu ve vazodilatasyonu (52,54),
- Trombosit agregasyonunun inhibisyonu (52,54,55),
- Lökosit ve monositlerin endotele adezyonunun inhibisyonu (54),
- Endotel geçirgenliğinin azalması (54).

NO, guanilat siklazın 'hem' bölgesine bağlanarak guanozin trifosfattan, siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini sağlar (56). cGMP damar düz kas hücrelerinin gevşemesine yol açan iyon kanal fonksiyonlarını modüle eder, sitozolde Ca konsantrasyonlarını azaltarak, cGMP bağımlı protein kinazları aktive eder ve kaspas aktivitesinin baskılanmasına yol açan bir sekonder mesajcı gibi davranır. Ayrıca NO direkt olarak vasküler düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon ve relaksasyona yol açan kalsiyum bağımlı potasyum kanallarını da uyarır (47,57).

Bu özelliklerinden dolayı, NO'nun antiaterojenik bir molekül olduğu kabul edilmektedir (54). Ayrıca NO, bunların dışında nörotransmitter, immunomodülatör ve yabancı maddelere karşı sitotoksik etkiler de göstermektedir (58).

Reaksiyon sonucu oluşan NO gaz yapısında olduğu için hızla çevre hücrelere diffüze olabilir ve etkisini yok edilene kadar sürdürebilir. Fakat, fazla miktarda oluşumu dokular için toksik olduğundan hızla etkisiz hale getirilir. Kan içine salınan NO'nun büyük kısmı esas olarak eritrositler tarafından metabolize edilir. Hemoglobine ve myoglobine bağlanan NO, nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) olarak atılır (59,60).

Bunun yanında NO, zayıf bir oksidan veya redüktan bir bileşik olarak birçok reaksiyona katılabilecek eşlenmemiş elektron içeren, biatomik serbest bir radikaldir. Fizyolojik şartlar altında, NO, serbest oksijen radikali ile reaksiyona girerek, güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturur (48). Peroksinitrit, hücresel proteinlerin, lipidlerin ve LDL partiküllerinin oksidasyonu veya direk hücre toksisitesi ile vasküler fonksiyonlar üzerinde zararlı etkilere sahiptir (61). NO ile  $\text{O}_2^-$  arasındaki reaksiyon, NO'in 'hem' ile olan reaksiyonundan veya  $\text{O}_2^-$  'in süperoksit dismutaz ile olan reaksiyonundan daha hızlıdır (4).

NO, sülfhidril içeren proteinler ve 'hem' proteinleri ile kolaylıkla etkileşir. Proteinleri nitrozilleme yeteneğinden dolayı onların aktivitelerini ve özelliklerini değiştirebilir. Son

zamanlarda, NO'in hemoglobinin çok iyi korunan iki sülfidril grubu ile etkileştiği bulunmuştur (62). Endojen NO donörü olarak fonksiyon gören S-nitrozotiyoller güçlü platelet agregasyon inhibitörleri olup EDRF gibi vazorelaktan etki gösterirler (48,61).

### **2.6.1. NİTRİK OKSİT SENTAZ (NOS) ENZİMİ**

Memeli hücrelerinde NO üretimi, nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından düzenlenmektedir. NOS enzimleri, sitokrom P<sub>450</sub> redüktaz enzim ailesi ile benzerlik göstermektedir. Onlar gibi 'hem' grubu içermektedir ve sitokrom P<sub>450</sub> için tipik olan indirgenme ve CO ile muamele ile 450 nm'de maksimum absorbans gösterme özelliğine sahiptirler. Saflaştırılmış NOS enziminin CO ile inhibe olduğunun gösterilmesi de, reaksiyonda sitokrom P<sub>450</sub> tipi bir 'hem'in varlığını göstermektedir (63-65).

### **2.6.2. NOS İZOFORMLARI**

Üç farklı NOS izoformu tanımlanmış olup, bunlardan ikisi yapısal, üçüncüsü ise sitokin ve diğer bileşikler tarafından uyarılabilen formdur. NOS'un yapısal izoformlarından biri endotelial NOS (eNOS, NOS3), diğeri ise nöronal NOS (nNOS, NOS1) olarak adlandırılmıştır (48). İndüklenen izoformu (iNOS, NOS2) ise, pek çok hücrede infeksiyon ve inflamasyon gibi anormal durumlarda uyarılır (66).

NOS, L-NMMA gibi L-arginin analogları ve L-argininin guanidyum kısmına benzeyen pek çok amino asit bileşiği tarafından inhibe edilir. Ayrıca glukokortikoidler de NOS'u inhibe ederler (67).

NOS'ları sentezleyen 3 gen bölgesi bulunur ve bu genler sırasıyla kromozom 12,7 ve 6 da lokalizedir (67).

#### **2.6.1.1.1. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz**

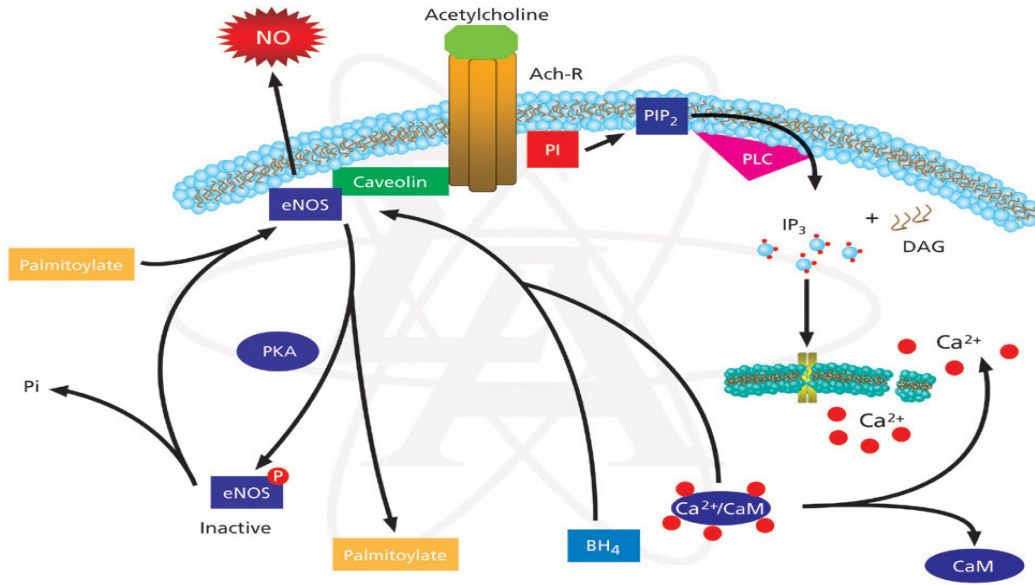
İlk defa endotel hücrelerinde tanımlanmış olan eNOS aktif hale gelmek için Ca<sup>2+</sup>'a ihtiyaç duyar. Yapısal NOS'lar olan eNOS ve nNOS'un sentez süresi kısa olup, üretilen NO miktarı çok düşüktür. Bunun sebebi, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun azalmasıyla enzimin inaktif duruma geçmesidir (67).

eNOS'un aminoasit dizilimi nNOS ile %60 oranında benzerlik göstermektedir. Her ikisinde de benzer olan bölgeler FAD, FMN, NADPH, kalmodulin ve protein kinaz A fosforilasyon bölgesidir (59,68). eNOS'un NH<sub>2</sub> terminalinde, nöronal NOS'da bulunan 220 aminoasitlik bölge eksiktir ve eNOS 2. pozisyonunda glisin N-miristollenmesi ve 15 ve 26. pozisyonlarında post translasyonel sisteinin palmitoillenmesi ile modifiye edilmiştir. Bu da, eNOS'un membranla ilişkili olduğunu düşündürmektedir (50,62). Bu yağ asitleri plazmalemmal kaveola ve golgi bölgesinin işaretlenmesi için de önemlidir (50).

Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), 134 kD'luk iki benzer monomerden oluşan bir dimerdir. eNOS monomeri, fonksiyonel olarak iki farklı bölgeye, N-terminal oksijenaz bölgesi ve C-terminal redüktaz bölgesine sahiptir. eNOS enzimi sadece dimerik formda tam olarak fonksiyoneldir (50). Redüktaz bölgesi, NADPH, FAD ve FMN flavinleri ve kalmodulin için bağlanma bölgeleri içerir. Katalitik bölge içeren N-terminal oksijenaz bölgesi, L-arjinin, BH<sub>4</sub> ve 'hem' için bağlanma bölgeleri içerir. Redüktaz bölgesi, flavinlerden oksijenaz bölgesine bağlı 'hem' grubuna elektron transfer eder.

Enzimin dimerik hale gelmesi hem molekülünün bağlanması ile başlar; 'hem'in yokluğunda enzim monomer halde kalır. Dimerik halde enzime BH<sub>4</sub> bağlanabilir ve dimeri kararlı hale getirir, kararlı hale geçiş aynı zamanda çinko iyonları ile de sağlanır. eNOS dimerinin fonksiyonel aktivitesi tetrahidrobiopterin moleküllerinin bağlanma sayısına bağlıdır. Tetrahidrobiopterin bağlanmamış bir eNOS dimeri O<sub>2</sub><sup>-</sup> üretmeye eğilimlidir, tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) molekülünün birinin bağlanması, eNOS dimerinin NO ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> 'nin her ikisini üretme eğilimi ile sonuçlanır. Yüksek seviyede BH<sub>4</sub> varlığı ise doymuş bir dimer oluşturarak yalnızca NO sentezleyen bir enzim oluşmasını sağlar (50).

Hücre içi artan Ca seviyeleri kalsiyum/kalmodulin kompleksinin oluşumuna yol açar ve bu kompleks kaveolinle yer değiştirerek, NOS enzimidaki kalmodulin bölgesine bağlanır ve enzimi aktifleştirir (50). Şekil-6'de eNOS'un etki tarzı gösterilmiştir.



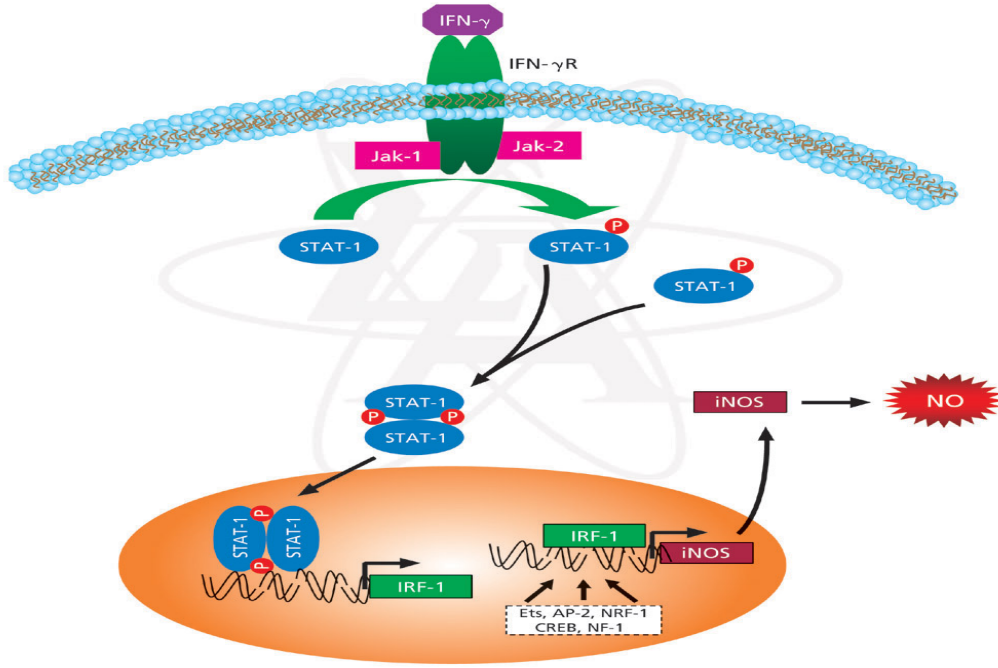
**Şekil-6: eNOS enziminin etki tarzı**  
([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))

#### 2.6.1.1.2. İndüklenebilir NOS (iNOS, NOS2)

130 kDa'luk sitozolik bir enzimdir (62,65). Makrofaj, endotel hücresi, nötrofil ve düz kas hücresi gibi pek çok hücre tipinde sitokinler, endotoksin ve lipopolisakkarit gibi bakteriyel ürünlere maruziyet sonrası indüklenir (47,69). eNOS ve nNOS gibi aktivasyon için eksojen kalsiyum ve kalmoduline bağımlı olmadığı için aktivitesi uzun sürer ve fazla miktarlarda NO üretimine yol açar (47,62). Enzim indüklendiğinde NO üretimi saatlerce hatta günlerce sürer (70). iNOS'un kalsiyumdan bağımsız olması kalmoduline sıkıca bağlanması sebebiyledir (69). iNOS aracılığıyla üretilen NO, bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerine sitotoksik etki yapar ve bazı DNA ve RNA virüslerinin yayılmasını önler. Bu etkilerini de, bazı enzimlerde bulunan demir gruplarını bağlayarak, çoğalmayı sağlayan ana metabolik yolları baskılayarak ve oksijenle birleşip hidrojen radikali ve antioksidanları ortaya çıkararak sağlar (67).

Makrofajlardan salınan NO, yabancı mikroorganizmalara karşı nonspesifik bir savunma yapar. Bunun yanısıra artmış NO'nun doku tahribatı yaparak damar geçirgenliğini artırdığı ve septik şoktaki vazodilatasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir. NO

sentezinin tamamen bozulması da inflamasyonu hızlandırmaktadır (71-73). Şekil- 7'de iNOS'un etki mekanizması gösterilmiştir.



Şekil-7: iNOS enziminin etki mekanizması  
(www.sigmaaldrich.com)

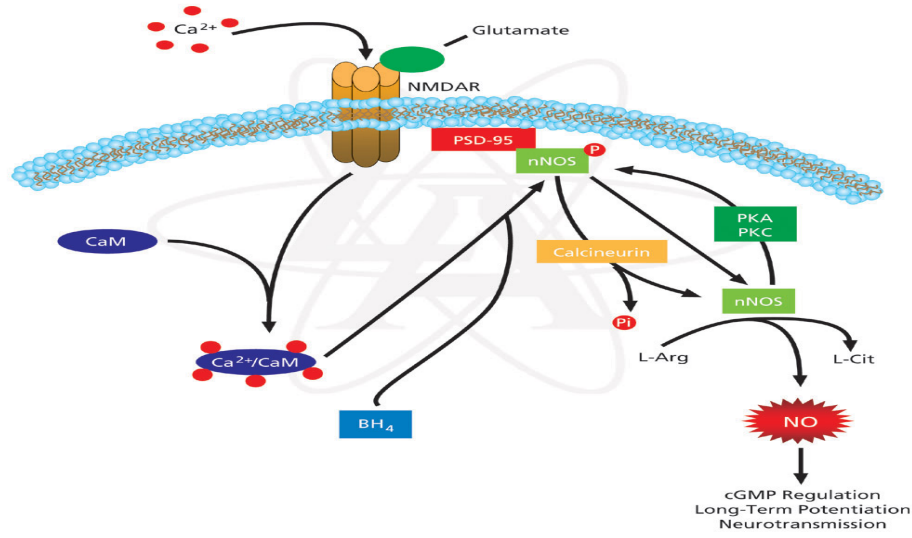
### 2.6.1.1.3. Nöronal NOS

160 kDA'lık bir polipeptiddir ve sitokrom P<sub>450</sub> ile %36 benzerlik göstermektedir. NADPH, FAD, FMN ve kalmodulin için bağlanma bölgesi içermektedir (64,71).

Nöronal NOS başta beyin, spinal kord, sempatik gangliyon gibi sinir sisteminde bulunmakla beraber, adrenal bez, uterusun epitelyal hücreleri, akciğer ve mide gibi başka dokularda da tesbit edilmiştir (70)

Merkezi sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev alır, ayrıca koku alma, görme, ağrıyı algılama ve hafıza oluşması gibi işlevlerde de rolü vardır.

Periferik sinir sisteminde ise nonadrenerjik nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak görev alır. Solunum fonksiyonlarında, Gastrointestinal sistem motilitesinde, tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde rol alır (67). Şekil-8'da nNOS'un etki tarzı gösterilmiştir.



Şekil-8: nNOS etki tarzı  
([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))

### 2.6.3. İnsan NOS-3 (eNOS) Geninde Varyasyonlar

İnsan NOS-3 geni 7. kromozomun 7q35-36' da yerleşik olup, 4052 nükleotidlik mRNA tarafından kodlanmakta ve 26 ekzon içermektedir (74,75). 1990'ların ortasında eNOS'un tanımlanmasından bu yana kardiovasküler olaylarla ilişkili olabileceği düşünülen bir çok spesifik allel varyasyonları tesbit edilmiş ve genel olarak 3 tip varyasyon tanımlanmıştır (74). Bunlar:

- 1) İtron kodlayan bölge varyasyonları,
- 2) 5' flanking (promotor) bölgesindeki varyasyonlar,
- 3) Açık okuma alanında (open reading frame) tanımlanan varyasyonlar (74).

**1) İtron kodlayan bölge varyasyonları:** NOS-3 gen varyasyonlarının çoğunluğu intronlar üzerinde bulunmaktadır (74). İtron 2, intron11, intron 12, İtron 18 (ala 27 cys), intron 22 ve intron 23 (gly 10 thr)'de tek nükleotid varyasyonları ile intron 2, intron 8, intron 13 ve intron 4 bölgelerinde VNTR polimorfizmi tanımlanmıştır (66,74). İtron 13 bölgesinde 37'yi aşan sitozin-adenin (CA) tekrarının varlığı gösterilmiştir (74,75).

eNOS geninin intron 4'de iki allel tanımlanmıştır. Büyük 4b allelinde 27 bp'lik dizi beş defa, 4a allelinde ise aynı dizi 4 defa tekrar etmektedir (76).

Son zamanlarda eNOS geninin 4a alleli için homozigot olan hastalarda bu allelin koroner kalp hastalığı ve MI ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (76).

eNOS geni 4a allelinin düşük NO seviyeleri ile ilişkili olduğu ve 4a alleli için homozigot olan bireylerde NO metabolitlerinin 4b/b genotipli bireylerinkinden %20 daha düşük olduğu gösterilmiştir. Böylece, eNOS geni 4a alleli NO düzeyini etkilemek suretiyle KAH patogenezinde rol almaktadır (76).

Yine, Japon bireylerde 4a allelinin artmış kan basıncı ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir(76)

Yapılan çalışmalar intron 4 bölgesindeki polimorfizmin enzimin 'hem' bağlayan bölgesinin yapısını ve dolayısı ile fonksiyonunu etkilediğini göstermiştir (77).

İntronlar proteinlerin amino asit diziliminde etkili olmadıkları halde ekzonların doğru okunmalarında ve gen regülasyonunda etkilidirler. Dolayısı ile intronlardaki polimorfizm ekzonların yanlış okunmalarına ve sonuçta proteinin hatalı sentezine sebep olurlar (77, 78).

İntron 4 a/b VNTR için sense ve antisense primerleri ile 27 bp'lik tekrarlanan baz dizisi aşağıda verilmiş ve dizi üzerinde belirtilmiştir.

Sense primer: **aggcctatg gtagtgctt (5111-5130 arası)**

Antisense primer: **gtgaccacag cactaagaga (5511-5530 arası)**

27 bp'lik tekrarlanan baz dizisi: **gtc tagacctgct gcaggggtga ggaa**

#### **İntron 4'e ait baz dizisi:**

```
gtgcggc tggccagcga
4921 ctgagagacc cgggcgctac caaaagggga gcgggggtggc ggggcagttc ctaaggcttc
4981 ccgggggctg ggaggtccca aactgtgggg gagatccttg ccttttcct tagagactgg
5041 aaaggtaggg ggactgcccc accctcagca cccagggga cctcagccca gtagtgaaga
5101 cctggttatc aggcctatg gtagtgctt ggctggagga ggggaaagaa gtctagacct
5161 gctgcagggg tgaggaagtc tagacctgct gcaggggtga ggaagtctag acctgctgca
5221 gggggtgagga agtctagacc tgctgcgggg gtgaggaagt ctagacctgc tgcgggggtg
5281 aggacagctg agcggagttc cctgggcggg gctgtcagta gcaggagcag cctcctggaa
5341 aagccctggc tgctgcttct cccccaagag agaaggcttc tcccgccag ctagtccagt
5401 gcagccccctc acccacacc actgctacc cagttcccct gcttcggccc gcaccctccc
5461 tcacacccca gccacagac tcggggctgg ccttagttac tggaacgcct gtgaccacag
5521 cactaagaga agcaagctgc cccatggggg acttgggtccc catggccttg gcctccttca
5581 ccatcactgg ccgccaagaa gtttgaata aagccacgtg cccagtgaat cccaaaggaa
5641 cctcaactaa aataaaaaca atcctatctg acacttgctt gaccctctaa gtcattcaaa
5701 gcttttagctc aacttcgatc catctgagct gccatagtgg accccactca gagctgcgtc
5761 cctcccttga cccaggttg gtccctgcca ctcccctgcc cctgtcactg acacatgttt
5821 cctcctccct caggcaggag tgggacctcc cagcctcctc ctggggcctc cactcagaat
5881 gtcaggatga gcagggctct aggaggctcc tgggtgcagcc tcccctccc accatccatg
5941 tgctcaaaga gaatcaccgg tcctttcttg aatgccatgg atcatggggg atttgctgcc
6001 cacactccta ggcgccctct tagacatccg ttgggtgccta acccaagcat cagtttgga
6061 gaggccgagt ccctcctctg tactggatac caagtcagct tccataggga tggggagaca
6121 cctggcccag ggaggagatg agaagcagcc cggatggtgc tacatatgtc agagagcagg
6181 gcaggaaggg atcagtgtgg ctgccaatgg tcaggagggc gccatggagt gaaccatggc
6241 ccctgcctcc tcaaccaaga agtccctctgg agctgatact caagaccccc cgtctctctc
6301 ctcaccctcc tctcccctg cctcggctgg ctcag
```

**2) 5'flanking (promotor) bölgesindeki varyasyonlar:** Bu promotor bölgedeki allel varyasyonu transkripsiyonu ve enzim düzeylerini direkt olarak etkileme potansiyeline sahiptir (74). Nakayama ve arkadaşları NOS-3 geninin 5' ucu ile ilişkili 3 adet mutasyon tanımlamışlardır. Bunlar:

- 1) Thr 786 Cys,
- 2) Ala 922 Gly,
- 3) Thr 1468 Ala'dır (74,79,80).

**3) Ekzon 7'de Tek Nükleotid Polimorfizmi:** Ekzon 7'nin açık okuma bölgesinde tanımlanan varyasyon proteinin primer yapısını değiştirip enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel özelliğine etki edebilmektedir. Bu mutasyon 298. pozisyonda glutamat yerine aspartat geçişi ile oluşmaktadır (74).

Gen varyasyonlarının ırk, cinsiyet, çevre şartları (DNA yapısını etkileyen radyoaktivite, ultraviyole ışınlar, kimyasal maddeler, çevre kirliliği, serbest radikaller vs.) ve diğer faktörlerden etkilendiği bilinmektedir (81). Biz bu çalışmada bölgemizde yaşayan sağlıklı kişilerle KAH olan kişilerde eNOS'un intron 4 VNTR ve intron 23 polimorfizmini araştırarak varsa bölgemiz için bu tip varyasyonları ortaya koymayı ve bu varyasyonun KAH riskinde rol alıp almadığını belirlemeği amaçladık.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. MATERYAL

Bu çalışma 40-70 ( $57,6 \pm 8,9$ ) yaşları arasında toplam 106 koroner arter hastası (KAH) (30 kadın, 76 erkek) ile 41-73 ( $54,2 \pm 7,6$ ) yaşları arasında hiçbir şikayeti ve bulgusu olmayan toplam 89 sağlıklı kontrol (49 kadın, 40 erkek) vakası üzerinde gerçekleştirildi. Hastalar, S.Ü.M.T.F. Kardiyoloji AD'na başvurup teşhis edilen ve yatırılarak tedavi altına alınan kişilerden seçildi. Hastalara koroner anjiyografi yapıldı ve koroner arterlerin en az birinde %50'den fazla tıkanma belirlenenler çalışmaya dahil edildi. Hastaların yaş, cinsiyet, kilo, boy, sigara ve alkol kullanımı, hipertansiyon, diyabet ve aile öyküsü sorgulandı. Tablo-2'de KAH ile sağlıklı kontrollere ait yaş, cinsiyet, sigara, DM, HT, aile öyküsü ve damar tutulumu gibi özellikleri verilmiştir. Hastalar klinik özelliklerine göre anhipertansif, antidiyabetik, antiagregan, antihiperlipidemik veya nitrat türevi ilaçlar alıyorlardı.

|                    | KAH (n)        | KONTROL(n)     |
|--------------------|----------------|----------------|
| Yaş (yıl)          | $57,6 \pm 8,9$ | $54,2 \pm 7,6$ |
| Sigara (+)         | 51             | 18             |
| Sigara (-)         | 55             | 71             |
| Aile Öyküsü (+)    | 44             | 12             |
| Aile Öyküsü (-)    | 62             | 77             |
| DM (+)             | 26             | -              |
| DM (-)             | 80             | 89             |
| HT (+)             | 55             | -              |
| HT (-)             | 51             | 89             |
| Tek damar tutulumu | 27             | -              |
| İki damar tutulumu | 30             | -              |
| Üç damar tutulumu  | 43             | -              |

**Tablo-2:** KAH ve kontrol grubunun özellikleri

Hasta ve kontrol gruplarına ait rutin olarak ölçülen lipid parametreleri tablo-3 de karşılaştırılmıştır.

| Parametre           | n  | Grup    | X ± SD         | p            |
|---------------------|----|---------|----------------|--------------|
| TG<br>mg/dl         | 68 | Kontrol | 157,01 ± 84,9  | 0,478        |
|                     | 97 | KAH     | 169,32 ± 107,7 |              |
| Kolesterol<br>mg/dl | 68 | Kontrol | 202,28±43,7    | <b>0,001</b> |
|                     | 98 | KAH     | 178,8±42,8     |              |
| HDL Kol.<br>mg/dl   | 57 | Kontrol | 45,26±12,02    | <b>0,001</b> |
|                     | 98 | KAH     | 37,91±8,08     |              |
| LDL Kol.<br>mg/dl   | 56 | Kontrol | 126±41,41      | <b>0,002</b> |
|                     | 95 | KAH     | 106,45 ± 35,08 |              |
| VLDL Kol.<br>mg/dl  | 68 | Kontrol | 31,42±16,98    | <b>0,480</b> |
|                     | 97 | KAH     | 33,53±21,52    |              |

**Tablo-3:** Hasta ve kontrol gruplarına ait lipid değerleri

Tablo-3'ten görüldüğü gibi hastalara ait total kolesterol, HDL kolesterol ve LDL kolesterol değerleri kontrollere kıyasla düşük bulunmuştur. Bunun nedeni, hastalarımızın lipid düşürücü tedavi almış olmaları ve ayrıca bir kısmının MI geçirmiş olmalarıdır. Bilindiği gibi MI'dan sonra lipid seviyeleri düşer ve uzun süre düşük seyrederek.

Çalışmamızda asıl amaç lipidler olmayıp TAA, Ox-LDL, NO ve eNOS gen polimorfizmini ortaya koymak olduğundan lipid parametreleri sadece birer rutin test olarak ve hastaların takibi için ölçüldü. Bu yüzden, hastaların lipid düşürücü tedavi almış olmaları dikkate alınmadı.

### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Soğutmalı santrifüj (ORTO marka)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)
- Vortex (Nüve)

- Hassas terazi ( Precisa 125 A)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler
- Shaker (DPC marka)
- Otomatik Eliza okuyucusu ve yıkayıcısı (cihazı ELx 50 marka)
- Thermo cyclers (Biometra)
- Görüntüleme cihazı (Biometra)
- Elektroforez Tankı (Horizon 58)
- Güç Kaynağı (Titan plus)

### 3.1.2. Kullanılan kimyasallar

- Nitrat redüktaz (sigma)
- FAD ( Flavin Adenin Dinükleotid) (sigma)
- NADP (Nikotin Adenin Dinükleotid Fosfat) (sigma)
- Hidroklorik asit (HCL) (Merck)
- %1'lik sülfanilik asit (Sigma)
- %1'lik N-naftiletilediamin (Sigma)
- Çinko sülfat ( $ZnSO_4$ ) (Merck)
- Sodyum Hidroksit (NaOH) (Sigma)
- Sodyum Nitrit ( $NaNO_3$ ) (Horasan Kimya)
- Fosfat Tamponu
- $H_2O_2$  (Hidrojen Peroksit) (Merck)
- Kloroform (Sigma)
- Trolox (Sigma)
- Glasiel Asetik asit (Merck)
- Sodyum asetat (Merck)
- Taq Polimeraz (Bioron)
- dNTP set (Promega)
- 25mM  $MgCl_2$  (Bioron)
- Reverse-forward primer
- Restriksiyon enzimi (Hind II)
- 100 bp'lik ladder ( Amresco)
- Agaroz (Sigma)
- Etidyum Bromid

- Tris (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- 6 x loading dye
- Etanol (Merck)

### **3.2. METOD**

Hastalardan koroner anjiyografiden sonra sağlıklı kontrollerden ise 10-12 saatlik açlıktan sonra sabah aç karna kan örnekleri alındı. Anjiyografi de aç en az bir gecelik açlıktan sonra yapılmaktadır.

Vakalardan 8-10 ml antikoagülsüz tam kan ve genetik analizler için 2 ml EDTA'lı kan örneği alındı. Antikoagülsüz tam kandan Ox-LDL, TAA ve NO tayini yapıldı. Bunun için kan örnekleri pıhtılaştıktan hemen sonra bekletilmeden santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

#### **3.2.1. Ox-LDL Ölçümü**

Ox-LDL, ELİSA yöntemi ile çalışan Mercodia marka kit kullanılarak (kat no:10-1158-01) ölçüldü. Testin prensibi, okside apolipoprotein-1'in antijenik determinantlarına karşı oluşmuş iki monoklonal antikor kullanılarak hazırlanmış sandviç ELİSA yöntemidir. ELİSA kuyucuklarına konulan serumdaki Ox-LDL, kuyucuklardaki katı fazda bulunan anti Ox-LDL antikor (Ig-Ox-LDL) ile reaksiyona girer. İnkübasyondan sonra reaktif olmayan plazma komponentleri yıkama ile uzaklaştırılır. Sonra, kuyucuklara konulan Ox-LDL'yi tanıyan peroksidaz işaretli apolipoprotein B antikor katı faza bağlı Ox-LDL ile reaksiyona girer. İkinci inkübasyondan sonra, yıkama ile bağlı olmayan enzim işaretli antikor uzaklaştırılır. Kuyucuklara katı fazda bağlı bulunan konjugat ile reaksiyona giren 3,3',5,5'-tetrametil benzidin (TMB) ilave edilir. Reaksiyon, asit ilavesi ile durdurulur ve oluşan renk ELİSA okuma cihazında 450 nm'de okunur. Sonuçlar, 0.5 U/L, 1.2 U/L, 2.6 U/L, 5 U/L ve 9.7 U/L konsantrasyonundaki standartlar kullanılarak %B/B<sub>0</sub>'a karşılık çizilen konsantrasyon grafiğinden faydalanarak hesaplanır.

### 3.2.2. Total Antioksidan aktivite ölçümü (TAA)

TAA, Erel'in modifiye ettiği metoda göre ölçüldü (82). Testin prensibi, ABTS<sup>+</sup> radikalinin oluşturduğu mavi-yeşil rengin ortama ilave edilen numunedeki antioksidanlar ile azalması esasına dayanmaktadır. ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylebenzothiazoline-6-sulfonate), ABTS<sup>+</sup> radikalini oluşturmak üzere bir peroksidaz olan metmiyoglobin (HX-Fe<sup>+</sup>) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilir. Oluşan ferrilmiyoglobin (X-(Fe<sup>+4</sup>=0)) ABTS ile ABTS<sup>+</sup> radikalini oluşturmak üzere reaksiyona girer.

ABTS<sup>+</sup> radikali kısmen stabil, mavi-yeşil renktedir. İlave edilen numunedeki antioksidanların oranına göre renk oluşumu inhibe olur. Bu renk değişimi 600 nm'lik dalga boyunda ölçülür. TAA hesaplanmasında bir E vitamini analogu olan Trolox standart olarak kullanılır.

#### **Kullanılan Reaktifler**

1. 0,4 mol/L, pH 5,8 asetat tamponu:

0,4 mol/L sodyum asetat ve 0,4 mol/L glasiel asetik asit çözeltileri ayrı ayrı hazırlandı. Bunun için, 32,8 g CH<sub>3</sub>COONa 1000 ml deiyonize suda çözüldü ve 22,8 ml reagent-grade glasiel asetik asit 1000 ml deiyonize suda dilüe edildi. Daha sonra 940 ml sodyum asetat solusyonu ile 60 ml asetik asit solusyonunu pH metre eşliğinde karıştırıldı. Asetik asit- sodyum asetat tamponunun pH'sı 5,8'e getirildi.

2. pH'ı 3,6 olan 30 mmol/l asetat tamponu:

Bunun için 2,46 g CH<sub>3</sub>COONa ve 1.705 ml reagent-grade glasiel asetik asit 1000'er ml deiyonize suda ayrı ayrı çözüldü. Daha sonra 75 ml sodyum asetat solusyonu 925 ml asetik asit solusyonu ile karıştırıldı ve pH'sı 3,4'e getirildi. 278 µl %35'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solusyonu 1000 ml bu tampona ilave edildi. Bu hazırlanan çözelti içerisinde 0,549 g ABTS çözüldü. 1 saat oda ısısında bekletildi.

Hazırlanan reaktiflere numune ilave edildikten sonra okumalar otoanalizörde tarafımızdan hazırlanan programa göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Reaktif ve numune ilavesi metotta belirtilen oranlara göre yapıldı. Her numune için 200 µl R1, 5 µl numune ve 20 µl R2 kullanıldı.

### 3.2.3. Nitrit ve nitrat ölçümü

NO'nun yarı ömrü çok kısadır. Oksijen varlığında hızla nitrite ve nitrata dönüşerek inaktive olur (83). Ayrıca oksijen, 'hem' ve sülfidril grupları ile kolayca reaksiyona girer. Bu

nedenle NO'yu ölçmek zordur. Nitrit ve nitrat NO metabolitleridir. Bu moleküllerin biyolojik aktiviteleri yoktur ancak, ölçülen nitrat ve nitrit düzeyleri endojen NO düzeyi hakkında bilgi verir (84).

Nitrit ve nitrat tayininde en çok kullanılan yöntem ‘‘Griess’’ reaksiyonuna dayanan yöntemdir. Bu yöntem ilk defa 1879’da kullanılmıştır. Griess yöntemi asidifiye nitratın uygun aromatik amininin tipik diazotizasyonuna dayanır. Daha sonra gelişen kenetlenme (coupling) reaksiyonu sonucu renkli bir bileşik olan azo kromoforu oluşur. Oluşan azo kromoforu, nitrit konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak spektrofotometrede ölçülebilir ve 500-600 nm’de maksimum absorbans verir. Bu yöntemde en çok kullanılan aminler ve kenetleyici ajanlar sülfanamid ve N-1-naftil etilendiamin’dir. Bunların dışında amin olarak sülfanilik asit, nitroaniline ve p-aminoasetofenon kullanılır. Güçlü kenetleyici ajan olarak ise fenol, 1-naftol, 1-naftol-4-sülfonat, 1-amino naftalen ve 1,3 diaminobenzen kullanılır (85,86).

### 3.2.3.1. Nitrat ölçümü

Nitrit ve nitrat ölçümleri Smarason tarafından modifiye edilen enzimatik yöntemle ve Griess reaksiyonu kullanılarak yapıldı (87).

Buradaki temel prensip nitrat’ın nitrat redüktaz enzimi ile nitrite çevrilmesine dayanır. Böylece total nitrit düzeyleri Griess reaksiyonu ile ölçülür. Daha sonra enzimatik dönüşüm olmaksızın nitrit düzeyleri yine Griess reaksiyonu ile ölçülür. Böylece total nitrit’ten bu ölçülen nitrit düzeyleri çıkarılınca nitrat düzeyleri elde edilmiş olur. Oluşan nitrit pembe renk verir ve konsantrasyonları 548 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür.

### Kullanılan Reaktifler

- **Fosfat tamponu** (pH =7,5): 6.8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 8.7 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tartıldı. Her biri ayrı ayrı bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra son hacimleri deiyonize su ile 500 mL’ye tamamlandı. Böylece, her birinin 0.1 M’lık solüsyonları hazırlandı. Daha sonra pH 7.5 olacak şekilde bu çözeltilerden karıştırılarak fosfat tampon hazırlandı.
- **NADPH çözeltisi ( 2 mmol / L):** 16.6 mg NADPH tartılarak bir miktar deiyonize suda çözüldü ve son hacmi deiyonize su ile 10 mL’ ye tamamlandı.
- **FAD çözeltisi ( 50  $\mu\text{mol}$  / L):** 4.1 mg FAD tartılarak bir miktar deiyonize suda çözüldü ve son hacmi deiyonize su ile 100 mL’ ye tamamlandı.

- **Aspergillus nitrat redüktaz ( 1U / mL):** 5 ünite nitrat redüktaz bir miktar deiyonize suda çözüldü ve son hacmi deiyonize su ile 5 mL'ye tamamlandı.
- **Çinko sülfat çözeltisi ( 0,2 mol / L):** 28,75 g ZnSO<sub>4</sub> bir miktar deiyonize suda çözüldü ve son hacmi deiyonize su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- **Sodyum hidroksit ( 2 mol / L):** 40 g NaOH tartılarak bir miktar deiyonize suda çözüldü ve son hacmi deiyonize su ile 500 mL' ye tamamlandı.
- **Sülfanilik asit % 1 (Griess 1):** 5 g sülfanilik asit 61.25 mL HCl'de (4 mol/L) çözülerek deiyonize su ile 500 mL' ye tamamlandı.
- **Naftiletilediamin, % 1 (Griess 2):** 2.5 g Naftiletilediamin tartılarak bir miktar deiyonize suda çözüldü ve son hacmi deiyonize su ile 250 mL' ye tamamlandı.
- **Standart çözelti (Stok):** 17.25 mg sodyum nitrit 250 mL deiyonize su içerisinde çözülerek 1000 µmol/L konsantrasyonda çözelti hazırlandı.
- **Çalışma standartları:** Stok standart çözeltisinden deiyonize su ile seyreltilerek 5, 12.5, 25, 50, 100 µmol/L konsantrasyonda çalışma standartları hazırlandı.

## Metod

Tüplere 150 µL hasta serumu, 150 µL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu, 25 µL 2 mmol / L NADPH, 25 µL 25 µmol / L FAD ve 25 µL IU / mL aspergillus nitrat redüktaz eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Daha sonra tüplere 250 µL 0,2 mol / L ZnSO<sub>4</sub> ve 35 µL 2 mol / L NaOH eklenerek örnekler deproteinize edildi. Tüpler 5000 devir/dakika hızında 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerden 375 µL süpernatant alındı. 500 µL Griess 1 ayırıcı eklendikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerine 375 µL taze hazırlanan Griess 2 ayırıcı eklenerek oluşan pembe rengin 548 nm'deki absorbansı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Çalışma sırasında değişik konsantrasyonlardaki standartlar da serumlarla birlikte çalışılarak standart eğrisi çizildi. Hasta örneklerinin absorbanslarına göre konsantrasyonlarının tayini standart eğrisine göre yapıldı.

### **3.2.3.2. Nitrit ölçümü**

Nitrit düzeyleri Griess ayıracıyla ölçülür. Hasta serumları  $ZnSO_4$  ile deproteinize edildikten sonra 4 mol/L HCl içinde % 1 sülfanilik asit (Griess 1) eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Daha sonra üzerine % 1 N- naftiletilediamin (Griess 2) reaktifi ilave edilince pembe renk oluşur. Oluşan pembe renkli ürünün absorbansı 548 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

### **Kullanılan Reaktifler**

Nitrit ölçümünde kullanılan ayıraçlar, enzim reaksiyonu dışında nitrat ölçümünde kullanılan reaktifler ile aynıdır.

### **Metod**

375  $\mu$ L hasta serumuna, 250  $\mu$ L 0,2 mol / L  $ZnSO_4$  ve 35  $\mu$ L 2 mol / L NaOH eklenerek örnekler deproteinize edildi. Tüpler 5000 devir/dakika hızında 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatandan 375  $\mu$ L alındı ve 500  $\mu$ L 4 mol/L HCl içinde % 1 sülfanilik asit (Griess 1) eklendikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerine taze hazırlanan % 1 N- naftiletilediaminden (Griess 2) 375  $\mu$ L eklenerek oluşan pembe rengin absorbansı 548 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Çalışma sırasında değişik konsantrasyonlardaki standartlar da serumlarla birlikte çalışılarak standart eğrisi çizildi. Hasta örneklerinin absorbanslarına göre konsantrasyonlarının tayini bu eğriye göre yapıldı.

## **3.2.4. eNOS POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

### **3.2.4.1. DNA İzolasyonu**

Hasta ve kontrol grubundan alınan 2 ml'lik kan örneği EDTA'lı tüplere alındı. DNA izolasyonu, Miller ve arkadaşlarının (88) geliştirdikleri yoğun tuz konsantrasyonu metoduna bazı küçük modifikasyonlar uygulanarak aşağıdaki gibi yapıldı.

- Falkon tüplerinin içerisine 10 ml soğuk steril distile su konuldu.
- Bunun üzerine EDTA'lı tüp içerisindeki kandan 1 ml eklendi ve pipetleme yapılarak homojen bir şekilde karışması sağlandı.
- 4500 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Oluşan süpernatant kısmı atılarak pelletin falkon tüpün dip kısmında kalması sağlandı.
- Pellet'in üzerine 850 µl nuclei lizis buffer (10 mM Tris HCL, 400 mM NaCl ve 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,2) eklendi ve pipetleme yapılarak pelletin homojen hale gelmesi sağlandı.
- 37°C'de 10 dakika bekletildi ve tekrar pipetleme yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.
- Homojen hale gelmiş olan materyalin üzerine 850 µl kloroform eklendi ve vorteks ile karıştırılıp 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı.
- 13000 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi ve sonucunda faz oluşumu sağlandı.
- Üst tabakadaki şeffaf kısım alınarak ayrı bir eppendorf içerisindeki 1 ml %96'lık etil alkolün üzerine eklendi ve alt üst edildikten sonra DNA yumak halinde gözle görüldü.
- 12000 RPM'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra alkol fazı döküldü ve böylece DNA eppendorfun dibine çöktürüldü.
- Üzerine 200-500 µl %70'lik etil alkol eklenip 12000 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Alkol fazı dökülüp dip kısımdaki DNA'nın kurumması için eppendorf ters çevrilip havada kurumaya bırakıldı.
- Havada kurutulan DNA steril distile su (150-300 µl) ile homojen hale getirildi.
- DNA, PCR analizi yapılincaya kadar -20°C'de saklandı.

#### **3.2.4.2. eNOS intron 4 bölgesinin incelenmesi**

eNOS intron 4 a/b VNTR polimorfizminin değerlendirilmesinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanıldı. Bunun için

(Forward) 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT-3'

(reverse) 5'- TCT CTT AGT GCT GTG CTC AC-3' primerleri kullanılarak çoğaltma

yapıldı (81). PCR reaksiyonu için toplamı 20 µl'yi bulan aşağıdaki karışım kullanıldı:

Reaksiyon karışımı:

1,6 µl dATP, dGTP, dTTP ve dCTP (10 mM)

2 µl 10xPCR tamponu

1 µl MgCl<sub>2</sub>

1,2 µl 10 pmol primer  
11,8 µl dH<sub>2</sub>O  
0,4 µl DNA Taq polimeraz enzimi  
2 µl genomik DNA

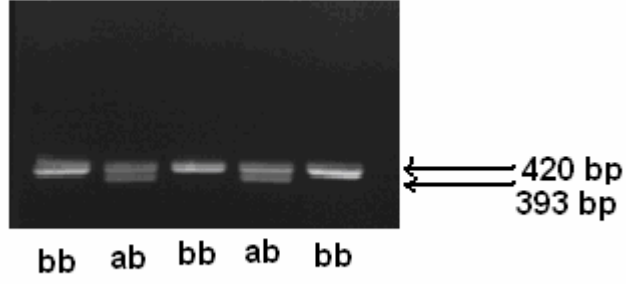
PCR reaksiyonu Biometra marka termal cyclers'da aşağıdaki gibi gerçekleştirildi;

94°C'de 3 dakika bir döngü  
Denaturasyon 94°C'de 1 dakika,  
Annealing 56°C'de 1 dakika,  
Extension 72°C'de 2 dakika, } 35 döngü  
72°C'de 5 dakika ve  
4°C'de bir döngü programı uygulanarak yapıldı.

### 3.2.4.3. Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürününü değerlendirmek için %2'lik agaroz, TAE solüsyonu ile karıştırılıp kaynatılarak agaroz jel hazırlandı. TAE solüsyonu hazırlamak için 10 ml EDTA (pH=8, 0,5 M), 24,2 g Tris, 5,71 ml glasiel asetik asit karıştırılarak son hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyon 50 katı dilüe edilerek çalışıldı. Agaroz, TAE içinde eritildikten sonra EtBr (10µg/ml Ethidium bromür) ilave edildi. Jel ile kuyucuklar oluşturmak için jel kabına dökülerek uygun taraklar yerleştirildi. Elde edilen PCR ürününden 5 µl alınıp yükleme boyası (6 x loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel, 45 dakika 120 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu. Ayrıca, gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 100 bp'lik ladder kullanıldı. Jeldeki bantlar UV illüminator altında değerlendirildi.

eNOS intron 4 bölgesi, 4 ve/veya 5 kez tekrarlanmaktadır. Bu bölgenin 5 tekrarı bb, 4 tekrarı aa, 4 ve 5 tekrar ise ab şeklinde genotiplendirildi. Şekil-9'da İtron 4a/b VNTR gen bölgesinin jel görüntüsü gösterilmiştir.



**Şekil-9 : İtron 4 VNTR bölgesinin görünümü**

#### 3.2.4.4. eNOS İtron 23 bölgesinin incelenmesi.

**Bunun için,**

Forward: 5'CCC CTG AGT CAT CTA AGT ATT C-3'

Reverse: 5'AGC TCT GGC ACA GTC AAG-3' primerleri kullanılarak 676 bp'lik amplifikasyon ürünü PCR ile çoğaltıldı (81). PCR programı aşağıdaki şekildeydi;

|                            |   |          |
|----------------------------|---|----------|
| 94°C'de 3 dakika bir döngü | } | 35 döngü |
| 94°C'de 0,15 dakika,       |   |          |
| 59°C'de 0,15 dakika,       |   |          |
| 72°C'de 0,15 dakika,       |   |          |
| 72°C'de 3 dakika ve        |   |          |
| 4°C'de bir döngü           |   |          |

Elde edilen ürün HindII restriksiyon enzimi kullanılarak kesildi. Restriksiyon enzim kesimi için 6 µl'lik karışımlar oluşturuldu. Bu 6 µl'lik karışım içinde;

3,5 µl steril dH<sub>2</sub>O

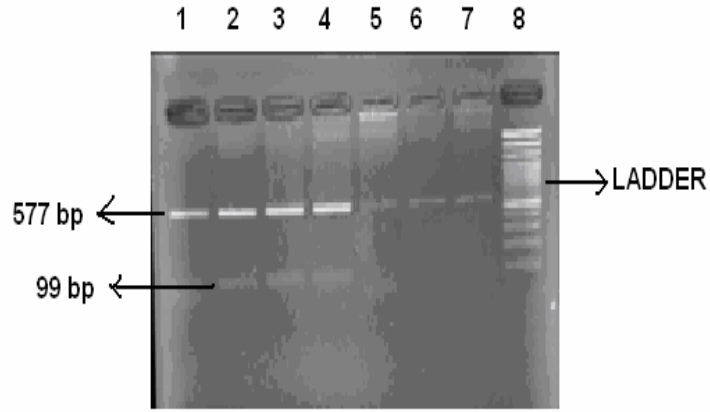
2 µl Restriksiyon Enzim Buffer

0,5 µl Restriksiyon Enzimi (Hind II)

bulunmaktadır. Bu 6 µl'lik karışımlar PCR ürününün içerisine eklendi ve su banyosunda 37°C'de 12-16 saat bekletildi.

İnkübasyon sonrasında %3'lük agaroz jel hazırlandı. Elde edilen enzim kesimi ürünü jele yüklendi. Jel 45 dakika 120 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu ve gözlenen bantların

beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 100 bp'lık ladder kullanıldı. Bantlar, UV illüminator altında değerlendirilip fotoğrafı çekildi. Şekil-10'da intron 23 bölgesinin PCR'ı takiben enzim kesimi sonrası görüntüsü gösterilmiştir.



**Şekil-10** : İtron 23 bölgesinin kesim sonrası jel görüntüsü

1-7'ye kadar olan kuyucuklar hastalara ait, 8. kuyucuk ise 100 bp'lık laddere ait görüntüdür. 1-7'ye kadar olan örnekler GG olarak genotiplendirilmiştir.

#### **3.2.4.5. İstatistiksel Analizler**

Hasta ve kontrol grubuna ait biyokimyasal testler ve PCR-RFLP tekniği ile elde edilen değerler SPSS programı kullanılarak değerlendirildi. Ox-LDL ve kolesterol testleri için t-testi, NO, TAA, TG, HDL, LDL, VLDL bulguları için Mann-Whitney testi kullanıldı. Genetik analizlerin istatistiksel değerlendirmesi için Ki-kare analizi yapıldı.

#### 4.BULGULAR

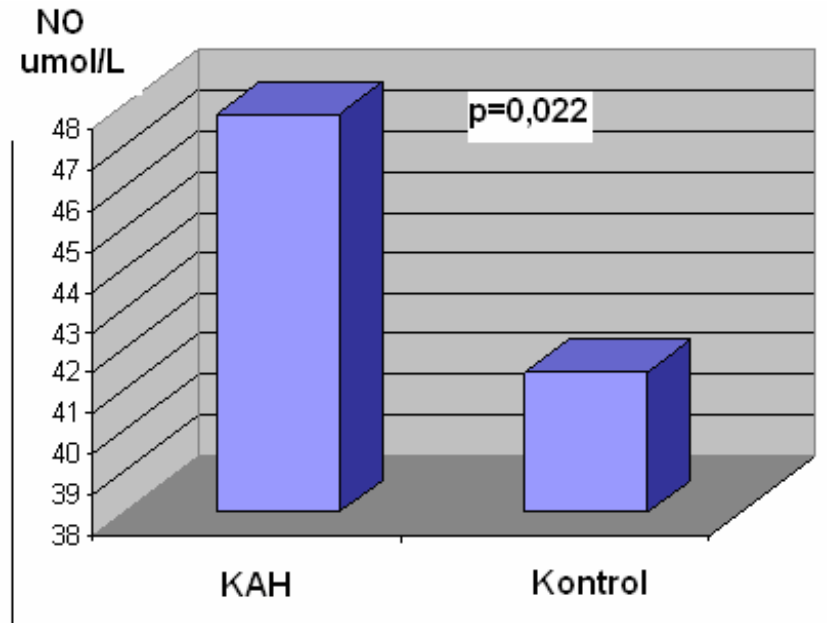
Vakalarımıza ait NO, Ox-LDL ve TAA bulguları tablo-4’de toplu halde verilmiştir.

**Tablo-4:** KAH ve sağlıklı kontrol vakalarına ait NO, Ox-LDL ve TAA parametrelerinin karşılaştırması

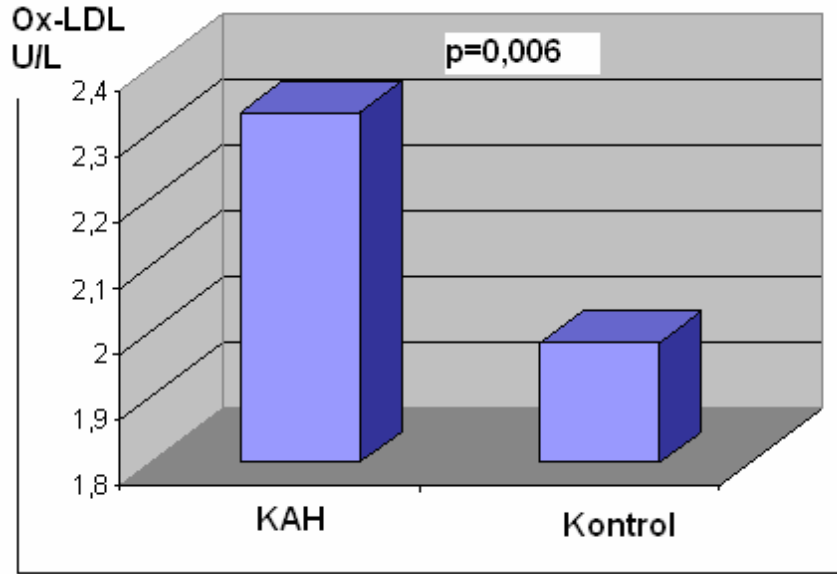
| Parametre     | n   | Grup    | X ± SD         | p            |
|---------------|-----|---------|----------------|--------------|
| NO<br>µmol/L  | 82  | Kontrol | 41,44 ± 25,9   | <b>0,022</b> |
|               | 95  | KAH     | 47,78 ± 27,0   |              |
| Ox-LDL<br>U/L | 74  | Kontrol | 1,983 ± 0,682  | <b>0,006</b> |
|               | 101 | KAH     | 2,332 ± 0,896  |              |
| TAA<br>mmol/L | 83  | Kontrol | 1,0495 ± 0,173 | <b>0,001</b> |
|               | 90  | KAH     | 0,915 ± 0,225  |              |

Tablo-4’den görüldüğü gibi, KAH hastalarına ait NO ve Ox-LDL değerleri kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli oranda yüksek, TAA düşük bulunmuştur.

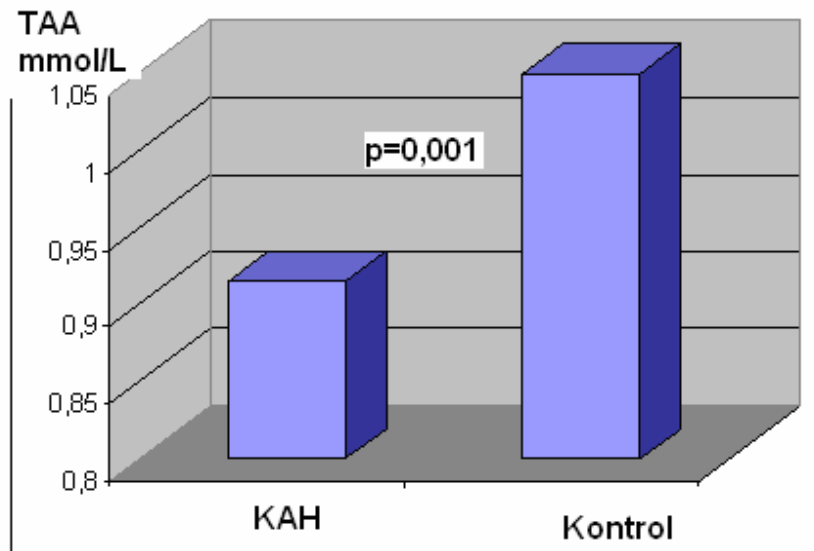
KAH ve kontrollere ait NO değerleri şekil-11’de, Ox-LDL değerleri şekil-12’de, antioksidan aktivite değerleri şekil 13’de gösterilmiştir.



**Şekil-11:** KAH ve kontrollere ait NO değerleri



Şekil-12: KAH ve kontrollere ait ox-LDL değerleri



Şekil-13: KAH ve kontrollere ait antioksidan aktivite değerleri.

KAH'a ait parametreler arasındaki korelasyonlar tablo-5'te ve sağlıklı kontrollere ait parametreler arasındaki korelasyonlar tablo-6'da verilmiştir.

**Tablo-5:** KAH'a ait parametreler arasındaki korelasyonlar

| Parametre            |                      | NO          | Ox-LDL      | TAA         | Tutulan Damar Sayısı |
|----------------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|
| NO<br>µmol/L         | Korelasyon Katsayısı | -           | -,270(**)   | -,189       | ,094                 |
|                      | p                    | -           | <b>,009</b> | ,081        | ,372                 |
|                      | n                    | -           | 93          | 86          | 93                   |
| Ox-LDL<br>U/L        | Korelasyon Katsayısı | -,270(**)   | -           | ,349(**)    | ,206(*)              |
|                      | p                    | <b>,009</b> | -           | <b>,001</b> | <b>,041</b>          |
|                      | n                    | 93          | -           | 89          | 99                   |
| TAA<br>mmol/L        | Korelasyon Katsayısı | -,189       | ,349(**)    | -           | ,030                 |
|                      | p                    | ,081        | <b>,001</b> | -           | ,779                 |
|                      | n                    | 86          | 89          | -           | 89                   |
| Tutulan Damar Sayısı | Korelasyon Katsayısı | ,094        | ,206(*)     | ,030        | -                    |
|                      | p                    | ,372        | <b>,041</b> | ,779        | -                    |
|                      | n                    | 93          | 99          | 89          | -                    |

Tablo-5'ten görüldüğü gibi KAH'a ait NO-Ox-LDL arasında istatistiki açıdan önemli bir negatif korelasyon, Ox-LDL ile TAA ve Ox-LDL ile tutulan damar sayısı arasında önemli pozitif korelasyon bulunmuştur.

**Tablo-6:** Kontrol vakalarına ait parametreler arasındaki korelasyonlar

| Parametre     |                      | NO    | Ox-LDL | TAA  |
|---------------|----------------------|-------|--------|------|
| NO<br>µmol/L  | Korelasyon Katsayısı | -     | -,148  | ,076 |
|               | p                    | -     | ,224   | ,503 |
|               | n                    | -     | 69     | 79   |
| Ox-LDL<br>U/L | Korelasyon Katsayısı | -,148 | -      | ,179 |
|               | p                    | ,224  | -      | ,137 |
|               | n                    | 69    | -      | 70   |
| TAA<br>mmol/L | Korelasyon Katsayısı | ,076  | ,179   | -    |
|               | p                    | ,503  | ,137   | -    |
|               | n                    | 79    | 70     | -    |

Tablo-6’da görüldüğü gibi sağlıklı kontrollere ait parametreler arasında istatistiki açıdan önemli bir korelasyon bulunamamıştır.

#### **eNOS polimorfizmi bulguları**

KAH ve kontrol vakalarına ait eNOS intron 4 VNTR polimorfizminin dağılımı ve intron 23 polimorfizminin dağılımı tablo-7’de verilmiştir.

**Tablo-7:** KAH ve kontrol vakalarında intron 4 VNTR ve intron 23 genotip sıklıkları, yüzdeleri ve allel sıklıkları (frequency) ve istatistiki önemleri

| Polimorfizm   | Grup    | Genotip sıklıkları (frequency) |          |          | Allel sıklığı (frequency) |      |     |
|---------------|---------|--------------------------------|----------|----------|---------------------------|------|-----|
|               |         | 4a/4                           | 4a/b     | 4b/b     | 4a                        | 4b   | p   |
| İntron 4 VNTR | KAH     | 1 (%1)                         | 16 (%21) | 59 (%78) | 0,11                      | 0,89 | Ö.D |
| İntron 4 VNTR | Kontrol | 1 (%1)                         | 16 (22)  | 58 (%77) | 0,12                      | 0,88 | Ö.D |
|               |         | GG                             | GT       | TT       | G                         | T    | p   |
| İntron 23     | KAH     | 75 (%100)                      | -        | -        | 1                         | 0    | Ö.D |
| İntron 23     | Kontrol | 61 (%100)                      | -        | -        | 1                         | 0    | Ö.D |

Ö.D: Önemli değil

Tablo-7'den görüldüğü gibi KAH ile kontrol vakalarına ait intron 4 VNTR polimorfizmi arasında yüzde dağılım ve allel sıklığı bakımından önemli bir fark bulunamamıştır. Yine, her iki grupta intron 23 polimorfizminin tamamı GG olarak bulunmuştur.

KAH ve kontrol vakalarına ait eNOS polimorfizmi ile NO düzeyleri arasındaki ilişki tablo-8'de verilmiştir.

**Tablo-8:** KAH ve kontrol vakalarına ait intron 23 ve intron 4 allelleri ile NO düzeyleri arasındaki ilişki

|          | Genotip | Kontrol |    | KAH   |    |
|----------|---------|---------|----|-------|----|
|          |         | NO      | n  | NO    | n  |
| İntron 4 | aa/ab   | 35,74   | 15 | 42,38 | 14 |
| İntron 4 | bb      | 40,9    | 56 | 46,7  | 62 |
|          |         | Ö.D     |    | Ö.D   |    |

Tablo-8'den görüldüğü gibi gerek KAH'da gerekse kontrol vakalarında İntron 4 VNTR polimorfizmi ile NO üretimi arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunamamıştır.

## 5. TARTIŞMA

### 5.1.TOTAL ANTIOKSİDAN AKTİVİTE BULGULARININ TARTIŞILMASI

Oksidatif olaylar, lipid peroksidasyonunun artması, diğer zararlı metabolitlerin oluşumu ve plazma antioksidanların tükenmesi ile sonuçlanır (89).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengesizlik sonucu oksidatif stres artar.

Serbest radikallerin ve peroksitlerin biyolojik etkileri, vücutta geniş bir antioksidan savunma mekanizması tarafından kontrol edilmektedir (90). Gerçekten, antioksidan sistem serbest radikallerin zararlı etkisinden korunmada önemli role sahiptir. Oksidan maddelere karşı savunmada, geçiş metal iyonlarının bağlanması, SOR oluşumunun önlenmesi, oluşan radikallerin toplanması veya baskılanması, radikal zincir reaksiyonlarının kırılması, hasara uğrayan hedef moleküllerin tamiri veya ortamdan uzaklaştırılması gibi mekanizmalar yer almaktadır (91).

Deneysel çalışmalar, serbest radikal aracılı reaksiyonların endotel disfonksiyonu ve hasarını uyarabildiğini göstermiştir (92).

Çalışmamızda koroner arter hastalarında serum TAA düzeyi kontrollere kıyasla önemli oranda düşük bulunmuştur. Bu bulgu koroner arter hastalarında oksidatif/antioksidatif dengenin oksidatif tarafa kaydığını ve bu hastaların yoğun oksidatif stres altında olduklarını göstermektedir. Bu bulgumuz literatür bulguları ile uyum halindedir.

Nojırı ve arkadaşları (93), total antioksidan durum, karotenoidler ve GSH-Px içeren antioksidanların seviyelerinin koroner arter hastalığının şiddeti ile ilişkili olduğunu, total antioksidan aktivite seviyesinin koroner arter hastalarında kontrollere göre belirgin olarak düştüğünü bulmuşlardır. Bu araştırmacılar, tutulan damar sayısı ile TAA seviyesi arasında da negatif bir korelasyon bulunduğunu göstermişlerdir.

Vassalle ve arkadaşları (94), oksidatif stres ile KAH ve farklı aterosklerotik risk faktörleri arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, koroner arter hastalarında TAA düzeylerini kontrollere kıyasla daha düşük bulmuşlardır. Yine, aynı çalışmada etkilenmiş damar sayısı ile TAA düzeyleri arasında negatif ilişki bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada, lipid peroksidasyon markırı olan 8-izoprostan (8-epiPGF<sub>2α</sub>) düzeyleri, koroner arter hastalarında kontrollere kıyasla yüksek bulunmuş ve yine izoprostan düzeyleri tutulan damar sayısı ile de artış göstermiştir.

Demirbag ve arkadaşları (95), koroner arter hastaları ile normal koroner arterli bireylerde, DNA hasar skoru ile total antioksidan aktivite arasında belirgin bir farklılık

olduğunu ve hastalarda total antioksidan aktivite ile DNA hasar skoru arasında negatif bir korelasyon bulunduğunu göstermişlerdir.

Serdar ve arkadaşları(96), koroner arter hastalığı olan hastalarda antioksidan parametrelerini (SOD, GPx, serum paroksanaz, serum arilesteraz, plazma vitamin C, E, karotenoid) kontrollere kıyasla daha düşük, lipid peroksidasyon ürünü olan plazma MDA miktarını ise daha yüksek bulmuşlardır.

Tamer ve arkadaşları (97), aterosklerozlu hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla serum vitamin C, eritrosit-redükte glutatyon ve total antioksidan durumun azaldığını, serum malondialdehit seviyesinin ise arttığını bildirmişlerdir.

Bütün bu bulgular, koroner kalp hastalarının azalmış antioksidan kapasite sonucu oksidatif stres altında olduklarını, dolayısı ile tedavilerinde antioksidan kullanımının faydalı olacağını göstermektedir. Ancak, bu hastalarda TAA düzeylerindeki azalmanın sebebi bilinmemektedir. Fakat, artmış serbest radikal üretiminin antioksidan madde kullanımını arttırması sonucu TAA düzeyinin düşmesine sebep olabilir diye düşünüyoruz.

Öte yandan, Dogru-Abbasoglu ve arkadaşları (98) anjiyografi ile teşhis edilen koroner aterosklerozlu hastalarla sağlıklı kontrollerde serum MDA ve total antioksidan aktivite bakımından bir farklılık bulamamışlardır. Bu bulgu bizim bulgularımıza ve diğer araştırmacıların bulgularına uymamaktadır.

Nojırı ve ark. ile Vassale ve ark. TAA düzeyi ile tutulan damar sayısı arasında negatif korelasyon bulmalarına rağmen çalışmamızda böyle bir korelasyon bulunamamıştır. Bunun nedenini izah edemedik. Ancak, bizim çalıştığımız vaka sayısı her iki araştırmacılarımızdan çok daha fazladır. Dolayısı ile bulgumuzun daha güvenilir olduğunu söyleyebiliriz. Fakat, hastalarımızın tedavi altında olmaları, diyet kısıtlaması ve aldıkları ilaçlar gibi faktörler antioksidan etki gösteren bileşenler üzerinde farklı etkiler gösterebilir. Böylece, sonuçta hastalara ait toplam TAA düzeyleri düşük çıksa bile damar sayısı ile olan korelasyon beklenenden farklı çıkabilir.

Sonuç olarak, hastalar tedavi altında olmalarına rağmen TAA'nın düşük olduğunu gösteren bulgumuz bu hastalarda klasik tedaviye ilave olarak antioksidan tedavinin de mutlaka uygulanması gerektiğini göstermesi bakımından oldukça önemlidir.

## **5.2. OKSİDE LDL BULGULARININ TARTIŞILMASI**

Ox-LDL'nin KAH için çok önemli bir risk faktörü olduğu birçok araştırmacı tarafından (99-105) ortaya konmuştur ki bizim bulgumuz da bu yöndedir. Gerçekten,

çalışmamızda koroner anjiyografi ile üç damardan herhangi birinde en az %50 oranında tıkanma olan KAH'larında Ox-LDL düzeylerini kontrollere göre istatistiki açıdan anlamlı derecede yüksek bulduk. Bu bulgumuz da literatür bulguları ile uyum halindedir (99-105).

Anselmi ve arkadaşları (99), stabil ve unstabil anjinalı hastalar ile kontrol vakalarında Ox-LDL düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında, Ox-LDL düzeylerinin, unstabil hastalarda stabillere, stabillerde de kontrollere kıyasla daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar, anjiyografik olarak tesbit edilen kompleks plak varlığı ile Ox-LDL düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır.

Miyazaki ve arkadaşları (100), koroner arter hastalarının ayırıcı teşhisi için yararlı bir markır olabileceğini düşündükleri malondialdehid-modifiye LDL (MDA-LDL) düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında koroner arter hastalarında kontrollere kıyasla LDL kolesterol düzeylerinde bir farklılık bulmazken, MDA-LDL düzeylerinin anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu tesbit etmişlerdir. Başka bir çalışmada akut miyokard infarktüsü geçiren vakalarda Ox-LDL/kolesterol oranının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (101).

Suzuki ve arkadaşlarının (102) çalışmalarında, koroner arter hastalarında Ox-LDL ve LDL kolesterol düzeyleri kontrollere göre anlamlı derecede yüksek, HDL kolesterol düzeyleri ise daha düşük bulunmuştur.

Ehara ve arkadaşları (103), akut MI geçiren kişilerde plazma Ox-LDL seviyelerini sağlıklı kontrollere göre belirgin bir biçimde yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, Ox-LDL seviyesi yüksek olup akut MI'dan ölen hastaların otopsilerinde, aterosklerotik lezyonlarda immünohistokimyasal olarak makrofaj kökenli köpük hücrelerinin bolca bulunduğunu göstermişlerdir.

Toshima ve arkadaşları (104), koroner kalp hastalarında plazma Ox-LDL düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Shimada ve arkadaşları (105), kardiyak ölüm, nonfatal myokard infarktüsü veya koroner arter bypass grefti gibi kardiyak olaylarda Ox-LDL düzeylerini yüksek bulmuşlardır.

Bütün bu bulgular, LDL oksidasyonunun KAH'ın patogenezinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Aynı hastalarda TAA'nin düşük çıkması da bu hastalara klasik tedaviye ilave olarak antioksidan tedavinin mutlaka düşünülmesi gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, serbest radikal etkisine karşı korunmanın KAH oluşumunu önlemede son derece önemli olduğu da anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda KAH'da, Ox-LDL ile tutulan damar sayısı arasında önemli pozitif korelasyon bulunmuştur. Bu bulgu, Ox-LDL'nin koroner kalp hastalığı için oynadığı rolü

daha net göstermesi bakımından oldukça önemlidir. Literatürde böyle bir korelasyonu ortaya koyan başka herhangi bir çalışmaya rastlayamadık.

Yine, çalışmamızda KAH'da Ox-LDL ile NO arasında anlamlı negatif bir korelasyon bulunmuştur. Bu bulgu her iki parametrenin birbirinden bağımsız olduğunu göstermektedir. Çünkü, Ox-LDL oluşumunun asıl sebebi NO dışındaki diğer serbest radikallerdir. Ayrıca, Ox-LDL'nin eNOS gen ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (106). Buna göre, yüksek Ox-LDL düzeyleri ile birlikte NO düzeyinin de artmış olması başka mekanizmaların da NO artışında etkili olduğunu göstermektedir. Nitekim, aterosklerotik plaklarda aktive olmuş makrofajların, sitokin salınımını uyararak indüklenebilir NOS izoformunun salınımını uyardığı ve bu enzimatik uyarılma sonucu eNOS tarafından sentezlenen NO miktarlarının yaklaşık 100 katı kadar arttığı kaydedilmiştir (107).

Öte yandan, KAH'da TAA düşük ve Ox-LDL'nin yüksek çıkması bu hastalar açısından çok önemli bir bulgudur. Ancak, Ox-LDL yüksek ve TAA düşük bulunmuşken her ikisi arasında pozitif bir korelasyon çıkmasını izah edemedik. Fakat, kontrol grubunda böyle bir korelasyon çıkmadığı halde sadece hasta grubunda bu tip bir korelasyonun bulunmuş olması hastalara uygulanan tedaviden kaynaklanmış olabilir.

Öte yandan, Ox-LDL'nin artışı TAA azalmasından ziyade serbest oksijen radikallerinin (SOR) artmasının bir sonucudur. Çünkü, SOR artışı antioksidanların tüketimiyle sonuçlanır. Sonuçta, SOR artışı hem Ox-LDL artışı hem de TAA azalmasına neden olur. Dolayısı ile, Ox-LDL düzeyindeki artış ile TAA düzeyindeki azalış birbirlerine olan etkiden ziyade SOR etkisinin bir sonucudur.

Çalışmamızda ortaya çıkan en önemli bulgulardan birisi de hasta grubunda tedavi sonucu lipid parametreleri düşmüş olmasına rağmen Ox-LDL düzeyinin oldukça yüksek olmasıdır. Çünkü, gerek bizim bulgularımızdan gerekse diğer araştırmacıların bulgularından Ox-LDL'nin diğer lipid parametrelerinden çok daha önemli bir risk faktörü olduğu anlaşılmaktadır. Dolayısı ile, koroner arter hastalarında lipid düşürücü tedaviye ilave olarak antioksidan tedavinin de mutlaka uygulanması gerektiği kanaatindeyiz.

### **5.3. NİTRİK OKSİT BULGULARININ TARTIŞILMASI**

Çalışmamızda NO düzeylerini koroner arter hastalarında kontrollere kıyasla belirgin yüksek bulduk.

Bu bulgumuz çok sayıda araştırmacıların bulguları ile uyum halindedir (81,108,109) . Nitekim; Yoon ve arkadaşları (81), koroner arter hastalarında plazma nitrik oksit düzeylerini

kontrollere kıyasla daha yüksek bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada hipertansiyonu olan koroner arter hastalarında NO düzeyinin hipertansiyonu olmayanlara kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Akarasereenont ve arkadaşları (108), anjiyografi ile koroner lezyonun varlığı gösterilen hastalarda NO düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Ferlito ve arkadaşları (109), koroner arter hastalığı olan hastaların nitrit düzeylerini kontrollere kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulmuşlardır. Bu artışın özellikle akut koroner kalp hastalığı olan hastalarda daha da belirgin olduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar, hipertansif koroner arter hastalarının ortalama nitrit değerlerini hipertansiyonu olmayanlara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, KAH ve hiperkolesterolemik kişilerde nitrit seviyelerinin kontrollere göre önemli derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Görüldüğü gibi yukarıdaki araştırmacıların bulguları bizim bulgularımızı destekler mahiyettedir.

Çalışmamızda sadece 19 hasta nitrat türevi kullanıyordu. Bu hastalara ait NO değerleri  $50,7 \pm 29,6$   $\mu\text{mol/L}$  şeklindedir. Nitrat türevi kullanmayan hastalara ait NO değeri ise  $47,03 \pm 29,5$   $\mu\text{mol/L}$  dir. Her iki bulgu arasındaki fark istatistiki açıdan önemli değildi. Dolayısıyla, hastalarımızdaki yüksek NO bulgularının tedaviden ziyade artmış NO sentezinin sonucu olduğu anlaşılmaktadır.

Akut miyokard hipoksisinde hipoksiye karşı kompensatuvar ve koruyucu bir rol oynamak üzere NO'nun arttığı kaydedilmiştir. Yine, hiperkolesterolemik ve hipertansif KAH da da NO üretiminin arttığı ve bu artışın endotele olan baskının azaltılması amacıyla adaptasyon sonucu geliştiği bildirilmiştir (81,109). Ayrıca, koroner arter hastalığının bir risk faktörü olan hipertansiyonda artmış shear strese bağlı olarak NO düzeyinin arttığı kaydedilmiştir (81). Uzamış hipoksiyi tolere etmek için de endotele bağlı bir adaptif cevap sonucu NO'nun artabileceği belirtilmiştir (109).

#### **5.4. eNOS GEN POLİMORFİZMİ BULGULARININ TARTIŞILMASI**

Koroner arter hastalığı multifaktöriyel bir hastalık olup, prevalansı ırklar ve etnik gruplar arasında farklılık gösterebilir. Aynı şekilde eNOS gen polimorfizminin çeşitli etnik gruplar arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir. KAH ile ilgili çeşitli eNOS gen polimorfizmi olduğu gösterilmiştir (81).

Bu yüzden aynı enzimin farklı etnik özellikleri, çevre şartları ve yaşam tarzları olan bölgemiz insanlarında eNOS polimorfizminin belirlenmesi bölgemizde KAH riski açısından büyük önem arz eder.

eNOS geni intron 4 a/b VNTR bölgesi aa genotipi nadir olup sıklığı farklı populasyonlar arasında %1 ve %10,6 arasında değişmektedir (110).

Çalışmamızda KAH ile kontrollere ait intron 4 VNTR polimorfizmi ve intron 23 G10-T polimorfizmi bakımından önemli bir fark bulunamamıştır. Yine, çalışmamızda KAH ve kontrol vakalarında intron 23 geninin tamamen GG şeklinde olduğu bulunmuştur. Ayrıca her iki gen ile hastalık riski arasında da bir ilişki bulunamamıştır. Literatürde bu konuda farklı bulgular elde edilmiştir. Ülkemizde sadece Adana bölgesinde intron 4 VNTR polimorfizmi üzerine bir çalışma (110) yapılmış intron 23 G10-T polimorfizmi hakkında ise herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Dolayısı ile, ülkemizde intron 23 G10-T polimorfizmi ilk defa bu çalışmada araştırılmış bulunmaktadır.

Yoon ve arkadaşları (81), Güney Koreli insanlarda KAH ile sağlıklı kontroller arasında intron 4 VNTR polimorfizmi bakımından önemli fark bulamamışlardır.

Matyar ve arkadaşları (110), tarafından ülkemiz Adana bölgesinde yapılan bir çalışmada KAH ile kontroller arasında intron 4 VNTR polimorfizmi bakımından önemli fark bulamamışlar, fakat intron 4 VNTR polimorfizminin diğer risk faktörleri ile birlikte değerlendirildiğinde koroner arter hastalığı için risk faktörü olduğunu belirlemişlerdir.

Hibi ve arkadaşları (111), intron 4 a/b geninin aa genotipi ile AMI'nın artmış riski ve koroner aterosklerozun şiddeti arasında önemli bir ilişki bulamazken Ichihara ve arkadaşları (112), eNOS'un a allelinin Japonlarda myokard infarktüsü için bir risk faktörü olduğu sonucuna varmışlardır.

Nakagami ve arkadaşları (113), 40 koroner arter hastası ve 34 kontrol vakası üzerinde yaptıkları çalışmalarında koroner arter hastalığı ile eNOS ve ACE gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Sonuçta, her iki grup arasında a ve b alleli sıklığı açısından bir fark bulamamışlardır.

Odawara ve arkadaşları (114) da Japonlarda KAH ve eNOS intron 4 a/b gen polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır.

Park ve arkadaşları (115), akut MI ve eNOS gen polimorfizmi arasında önemli bir korelasyon bulmuşlar ve a/a genotipine sahip bireylerin akut MI için artmış bir riske sahip olduklarını göstermişlerdir.

Fowkes ve arkadaşları (116), periferik arter hastalığı ve koroner kalp hastalığının, metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ve eNOS gen polimorfizimleri ile olan ilişkisini

araştırdıkları çalışmalarında, gruplar arasında MTHFR ve eNOS genotipleri bakımından anlamlı bir fark bulamamışlardır. Bununla birlikte eNOS 4a allelinin sigara içmeyen koroner kalp hastalarıyla zayıf ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Pulkkinen ve arkadaşları (76), eNOS geninin intron 4 polimorfizmini, tip II diabeti olan koroner kalp hastası, diabeti olmayan koroner kalp hastası ve sağlıklı kontrollerde araştırdıkları çalışmalarında, eNOS geni intron 4a alleli ile KAH ve tipII DM arasında bir ilişki bulamamışlardır. Ancak, KAH olan tip II DM'li hastalarda özellikle artmış kan basıncı seviyeleri ile intron 4a alleli arasında pozitif bir ilişki bulmuşlardır.

Poirier ve arkadaşları (117), MI'lı hastalarla sağlıklı kontroller arasında intron 4 VNTR polimorfizmi bakımından önemli bir fark bulmamışlardır.

Wang ve arkadaşları (118), sigara içen ve ileri derecede tıkalı damarı olan hastalarda eNOS 4aa alleli oranının damar tıkanıklığı olmayan veya hafif olanlara kıyasla önemli oranda arttığını bulmuşlardır.

Poirier ve arkadaşları (117), MI'nın eNOS gen polimorfizmi ile olan ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında intron 23 ile MI arasında herhangi bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir.

Yoon ve arkadaşları (81), koroner arter hastalarında intron 23 deki G10-T polimorfizmindeki G allel sıklığını kontrollere kıyasla daha yüksek bulmuşlardır.

Sonuç olarak, eNOS'un genetik polimorfizmi ile plazma NOx düzeyi ve KAH riski arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Özellikle, gen ekspresyonu ve protein üretiminin araştırılması gerektiği kanaatindeyiz. Bu amaçla mRNA ve eNOS'un enzim aktivitesinin araştırılması faydalı olacaktır.

## 6. ÖZET

Bu çalışma 40-70 yaşları arasında toplam 106 koroner arter hastası (KAH) (30 kadın, 76 erkek) ile 41-73 yaşları arasında hiçbir şikayeti ve bulgusu olmayan toplam 89 sağlıklı kontrol (49 kadın, 40 erkek) vakası üzerinde gerçekleştirildi. Hasta grubuna anjiyografi ile koroner arterlerinin en az birinde %50'den fazla tıkanık olduğu belirlenen kişiler alındı.

Vakalardan sabah aç karna kan örnekleri alındı ve total antioksidan aktivite(TAA), Ox-LDL, NO ve eNOS gen polimorfizmi araştırıldı. Tüm bireyler sigara ve alkol kullanımı, HT, DM varlığı ve aile öyküsü bakımından sorgulandı.

Ox-LDL tayini, Mercodia marka ticari kit kullanılarak ELİSA metoduyla, NO tayini Griess metoduyla ve antioksidan aktivite tayini ise spektrofotometrik yöntemle çalışıldı. Vakaların tam kanlarından DNA izolasyonu yapılarak PCR-RFLP tekniği ile genetik analizleri yapıldı. Bulgular aşağıdaki gibidir:

KAH'da Ox-LDL ve NO düzeyleri kontrollere kıyasla önemli oranda yüksek, TAA düzeyleri ise düşük bulundu. Ox-LDL ile tutulan damar sayısı arasında önemli pozitif korelasyon bulundu.

KAH'da Ox-LDL , NO ve TAA düzeyleri sırası ile  $2,332 \pm 0,896$  U/L,  $47,78 \pm 27$   $\mu\text{mol/L}$  ve  $0,915 \pm 0,225$  mmol/L olarak, kontrollerde ise aynı parametler sırası ile  $1,983 \pm 0,682$  U/L,  $41,44 \pm 25,9$   $\mu\text{mol/L}$  ve  $1,0495 \pm 0,173$  mmol/L olarak bulundu.

KAH'ları ile sağlıklı kontrol grubu arasında eNOS intron 4 VNTR ve intron 23 polimorfizmi bakımından önemli bir fark bulunamadı.

Sonuç olarak, serbest radikallerin ve Ox-LDL'nin KAH'ın patogeneğinde önemli rol oynadığı belirlendi. Ayrıca, KAH ile eNOS intron4 VNTR ve intron 23 polimorfizmi arasında herhangi bir korelasyon bulunamadı. Bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

## **7. SUMMARY**

### **INVESTIGATION OF Ox-LDL, TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY, NITRIC OXIDE AND eNOS GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE.**

The study was performed on 106 patients (30 F, 76 M) with coronary artery disease (CAD) aged between 40-70 years and 89 healthy controls (49 F, 40 M) aged between 41-73 years. All patients had more than 50% stenosis in at least one coronary artery documented by angiography.

Ox-LDL, total antioxidant activity (TAA), NO and eNOS gene polymorphism were measured on fasting blood samples. Smoking, alcohol drinking, HT, DM and family history of all cases were recorded.

Ox-LDL was measured using a commercially available kit (merckodia) by ELISA method, NO was measured by Griess reaction, TAA was measured spectrophotometrically, eNOS gene polymorphism was investigated by PCR-RFLP technique.

Ox-LDL and NO levels of the patients were significantly higher whereas TAA level was lower than the same parameters of the controls.

Ox-LDL, NO and TAA levels of the patients were  $2,332 \pm 0,896$  U/L,  $47,78 \pm 27$   $\mu\text{mol/L}$  and  $0,915 \pm 0,225$  mmol/L respectively. The same parameters of the controls were  $1,983 \pm 0,682$  U/L,  $41,44 \pm 25,9$   $\mu\text{mol/L}$  and  $1,0495 \pm 0,173$  mmol/L respectively.

A significant positive correlation was found. between Ox-LDL and the number of stenotic vessels.

No significant difference was found between eNOS intron 4 VNTR and intron 23 polymorphism of the patients and the controls.

Our results shows that free radicals and especially Ox-LDL play an important role in the pathogenesis of the disease. Also, we have found no correlation between CAD and eNOS polymorphism which need to be further investigated.

## 8. KAYNAKLAR

- 1) Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 2005; 26(1-2):33-65.
- 2) Leitinger N. Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49(11):1063-71.
- 3) Gök H. *Klinik Kardioloji Nobel:* 2002:203-204.
- 4) Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004 ;84(4):1381-478.
- 5) Öngen Z, Yılmaz Y. Aterosklerozun Patogenezi. *Türkiye klinikleri J Int Med Sci* 2006;2(7):1-9.
- 6) Frei B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999;222(3):196-204.
- 7) Steinberg D. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis* 1997;131:S5-S7.
- 8) Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 1990 5;323(1):27-36.
- 9) Jamieson D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Radical Biol Med* 1989;7:87.
- 10) Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *The Lancet* 1984;23:1396-1397.
- 11) Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayıncılık 1995:1-11,42-43,49-50,54-56,61,63-64,68-73.
- 12) Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998;11:336-41.
- 13) Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49(3):481-93.
- 14) Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health, Experimental strategies for optimisation of nutritional antioxidants intake in humans. *Free Radical Res* 1996;25:57- 74.
- 15) Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Japan J Physiol* 1996;46:15-32.
- 16) Halliwell B. The biological significance of oxygen-derived species. In Valentine JS, Foote CS, Greenber A, Liebman JF editors. *Active oxygen in biochemistry.* Blackie Academic and Profesional , London 1995;313-34.

- 17) Yiğit Ş, Yurdakök M. Yenidoğanlarda serbest radikallere bağlı hastalıklar. Çocuk sağlığı ve hastalıkları dergisi 1996, 39:746-765.
- 18) Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, biochemistry, and role in human. Am J Med 1991;91:14-22.
- 19) Ünal D. Serbest radikaller. Sendrom 1999; Mart:68-80.
- 20) Halliwell B. Gutteridge JMC. Role of the free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. Methods Enzymology 1990;186:1-85.
- 21) Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995,14/12:1819-28.
- 22) Klebanof SJ. Oxygen metabolism and toxic properties of phagocytes. Ann Int Med 1980,93:480-489.
- 23) McCord JM. Human disease, free radicals and oxidant balance. Clin Biochem 1984;26:351-357.
- 24) Erel Ö. A Novel method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clinical Biochemistry 37 (2004) 112-119.
- 25) Wassman S, Wassman K and Nickenig G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. Hypertension 2004; 44:381-386.
- 26) Yalçın AS. Antioksidanlar. Klinik Gelişim 1998;11:342-46.
- 27) Forslid J, Björkstén B, Hagersten K, Hed J. Erythrocyte-mediated scavenging of reactive oxygen metabolites generated by human polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. Inflammation 1989;13:543-551.
- 28) Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. Türkiye klinikleri J. Med Sci 2002;22:442-48.
- 29) Carr A, Frei B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. Free Radic Biol Med. 2000 Jun15;28(12):1806-14.
- 30) Fenster BE, Tsao PS, Rockson SG. Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress. Am Heart J. 2003 Aug;146(2):218-26.
- 31) Roheim PS, Asztalos BF. Clinical significance of lipoprtein size and risk for coronary atherosclerosis. Clin. Chem 1995;41:147-52.
- 32) Dirican M. LDL oksidasyonu ve aterosklerozla ilişkisi. Biyokimya Dergisi 1999;1(24):41-48.
- 33) Baykal Y, Tüzün A, Kocabalkan F. Aterosklerozun Patogenezi Türkiye Klinikleri J Med Sci 1998;18:360-368.

- 34) Esterbauer H, Ramos P. Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1996;127:31-64.
- 35) Chapman MJ, Guerin M, Bruckert E. Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *European Heart J* 1998;19 (Supply A): 24-30.
- 36) Orem C, Orem A, Uydu HA, Celik S, Erdal C, Kural BV. The effects of lipid-lowering therapy on low-density lipoprotein oxidation and plasma total antioxidant status. *Coron Artery Dis* 2002;13:65-71.
- 37) Chen M, Masaki T, Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther.* 2002;95(1):89-100.
- 38) Kurban S, Mehmedoglu İ. Okside LDL otoantikörlerinin klinik önemi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2005;25:73-84 .
- 39) Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: A clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42(4):498-506.
- 40) Witztum JL. Immunological response to oxidized LDL. *Atherosclerosis* 1997;131:S9-S11.
- 41) Jialal I. Evolving lipoprotein risk factors: Lipoprotein(a) and oxidized low-density lipoprotein *Clin Chem* 1998; 44: 1827 - 1832.
- 42) Upston JM, Kritherides L, Stocker R, The role of vitamin E in atherosclerosis. *Progress in Lipid Research* 2003;42:405-22.
- 43) Karadi I, Kostner G. The role of apolipoproteins in lipid metabolism. *Ther Umsch* 1990;47:467-74.
- 44) Steinerova A, Racek J, Stozicky F, Zima T, Fia-lova L. Antibodies against oxidized LDL-theory and clinical use. *Physiol Res* 2001;50:131-41.
- 45) Cannon RO 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998; 44(8):1809-19.
- 46) Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: An update *Nitric Oxide* 2006;15(4):265-279.
- 47) Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, Authier S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 2005;208(2):177-92.
- 48) Marin J, Rodriguez-Martinez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther* 1997;75(2):111-34.

- 49) Cylwik D, Mogielnicki A, Buczko W. L-arginine and cardiovascular system. *Pharmacol Rep* 2005;57(1):14-22.
- 50) Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003;199(1):8-17.
- 51) Sessa WC. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100 Suppl 1:15-8.
- 52) Carr A, Frei B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium derived nitric oxide. *Free Radical Biology Medicine* 2000;28:1806-14.
- 53) Crabos M, Coste P, Paccalin M, Tariosse L, Daret D, Besse P, Bonoron-Adele S. Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(1):55- 65.
- 54) Kawashima S. Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: Endothelial nitric oxide (NO) synthase/NO system in atherosclerosis. *J Pharmacol Sci* 2004;96(4):411-9.
- 55) Kobara M, Tatsumi T, Takeda M, Mano A, Yamanaka S, Shiraishi J, Keira N, Matoba S, Asayama J, Nakagawa M. The dual effects of nitric oxide synthase inhibitors on ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res Cardiol* 2003;98(5):319-28.
- 56) Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 1986;78:1-5.
- 57) Tomasion D, Keaney JF, Vita JA. Antioxidants and the bioactivity of endothelium derived nitric oxide. *Cardiovascular Research* 2000;47:426-435.
- 58) Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res* 2003;59(2):488-500.
- 59) Anggard E. Nitric oxide Mediator, murder and medicine. *Lancet* 1994;343:1199-1206.
- 60) Darley-Usmar V, Halliwell B,. Blood radicals-Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmacol Res* 1996;13:649-662.

- 61) Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53(4):515-24.
- 62) Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997;48:489-509.
- 63) Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects, concerning structure and catalysis cell. 1994;78:927-30.
- 64) Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. In: Meister A. Ed. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, Newyork: John Wiley Sons 1992;65:287-346.
- 65) Marletta MA, Hurshman AR, Rusche KM. Catalysis by nitric oxide synthase *Curr Opin Chem Biol* 1998;2(5):656-63.
- 66) Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Molecular genetic and metabolism* 2000;70:241-251.
- 67) Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri. *T Klin Tıp Bilimleri* 2000;20:107-111.
- 68) Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes: Characterization, purification, molecular cloning and function. *Hypertension* 1994;23:121-131.
- 69) Sethi S, Dikshit M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thromb Res* 2000;100(3):223-47.
- 70) Cekmen M.B, Turgut M, Turkoz Y, Aygun AD, Gozukara EM. Nitric oxide (no·) and nitric oxide synthase (nos): Physiologic and pathologic characteristics. 2001;10;226-235.
- 71) Bruhwylter J, Chleide E, Liegeois JF, Carreer F. Nitric oxide: A new messenger in brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993;17:373-384.
- 72) Nathan C. Inducible nitric oxide synthase. What difference does it make. *J Clin Invest* 1997;100:2417-2423.
- 73) Minc-Golomb D, Tsarfaty I, Schwartz JP. Expression of inducible nitric oxide synthase by neurones following exposure to endotoxin and cytokines. *Br J Pharmacol* 1994;112:720-722.
- 74) Wattapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA. Therapeutic implicatons of human endothelial nitric oxide synthase gene polimorphism. *Trends in Pharmalogical Sciences* 2001;22:361-367.

- 75) Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *The journal of biological chemistry* 1993;268(23):17478-88.
- 76) Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Vauhkonen I, Laakso M. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *J Mol Med* 2000;78(7):372-9.
- 77) Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H and Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:3-8.
- 78) Gremke L. *Devel Biol.* 1993 159:513-527.
- 79) Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T<sup>786</sup>→C mutation in the 5' flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* 1999;99:2864-2870.
- 80) Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Mizuno Y, Harada E, Nakamura S, Ito T, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, and Nakao K. T<sup>786</sup>→C mutation in the 5' flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with Myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am J Cardiol* 2000;86:628-634.
- 81) Yoon Y, Song J, Hong S H, Kim JQ Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphism in coronary artery disease. *Clin Chem* 2000;46:1626-1630.
- 82) Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry* 2004;37:277-285.
- 83) Kelm M, Feelish M, Soahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1988; 154:236-244.
- 84) Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.* 1993; 7:349-360.

- 85) Giovannoni G, Land JM, Keir G, Thompson EJ, Heales SJR. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 193-198.
- 86) Guevara I, Iwanejko J, Dembinska A, Pankiewicz J. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 1998; 274: 177-188.
- 87) Smarason AK, Alman KG, Young D, Redman CW. Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with pre-eclampsia, *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104(5):538-43.
- 88) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids res*, 1998;16:1215.
- 89) Kunt AS, Selek S. Decrease of total antioxidant capacity during coronary artery bypass surgery. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 2006;73:777-783.
- 90) Guemouri L, Artur Y, Herbert B, Jeandel C, Cuncy G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, Glutathion peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 1991;37:1932-1937.
- 91) Taskiran A, Eskiocak S, Cıkkırıkçıoğlu M, Ege T, Duran D. Koroner bypass cerrahisi öncesinde plazma total antioksidan kapasite düzeylerinin iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilişkisi. *Trakya Ün Tıp fak. Dergisi* 2005; 22(1):16-22.
- 92) Anuk M. Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stress in chronic renal failure. *Acta Universitatis Upsaliensis comprehensive summaries of Uppsala dissertation from faculty of medicine* 1122. 56 pp.
- 93) Nojiri S, Daida H, Mokuno H, Iwama Y, Mae K, Ushio F, Ueki T. Association of serum antioxidant capacity with coronary artery disease in middle-aged men. *Jpn Heart J* 2001;42(6):677-90.
- 94) Vassalle C, Petrozzi L, Botto N, Andreassi MG, Zucchelli G.C. Oxidative stress and its association with coronary artery disease and different atherogenic risk factors *J of Int Med* 2004 ;256: 308-315.
- 95) Demirbağ R, Yılmaz R, Koçyiğit A. Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. *Mutat Res* 2005;570(2):197-203.
- 96) Serdar Z, Yesilbursa D, Dirican M, Sarandol E, Serdar A. Sialic acid and oxidizability of lipid and proteins and antioxidant status in patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct.* 2006;27.

- 97) Tamer L, Sucu N, Polat G, Ercan B, Aytaçoğlu B, Yücebilgiç G, Ünlü A, Dikmengil M, Atik U. Decreased serum total antioxidant status and erythrocyte-reduced glutathione levels are associated with increased serum malondialdehyde in atherosclerotic patients. *Arch Med Res.* 2002;33(3):257-60.
- 98) Doğru-Abbasoğlu S, Kanbagli O, Bulur H, Erhan Babalik, Ozturk S, Aykac-Toker G, Uysal M. Lipid peroxides and antioxidant status in serum of patients with angiographically defined coronary atherosclerosis. *Clinical Biochemistry* 1999; 32(8): 671-672.
- 99) Anselmi M, Garbin V, Agostoni P, Fusaro M, Pasini A.F, Nava C, Keta D. Turri M, Zardini P, Vassanelli C, Cascio V.L, Cominacini L. Plasma levels of oxidized-low-density lipoproteins are higher in patients with unstable angina and correlated with angiographic coronary complex plaques. *Atherosclerosis* 2006;185:114-120.
- 100) Miyazaki T, Shimada K, Sato O, Kotani K, Kume A, Sumiyoshi K, Sato Y, Ohmura H, Watanebe Y, Mokuno H, Diada H. Circulating malondialdehyde-modified LDL and atherogenic lipoprotein profiles measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005;179:139-145.
- 101) Fredrikson GN, B. Hedblad B, Berglund G, Nilsson J. Plasma oxidized LDL: a predictor for acute myocardial infarction? *J In Medi* 2003;253:425-429.
- 102) Suzuki T, Kohno H, Hasegawa A, Toshima S, Amaki T, Kurabayashi M, Nagai R. Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease. *Clinical Biochemistry* 2002;35:347-353.
- 103) Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Matsuo T, Ogami M, Ikura Y, Itabe H, Komatsu R, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J. Pathophysiological role of oxidized low-density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases. *J Diab Comp* 2002;16;60-64.
- 104) Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe M, Takano T, Sugano J, Shimamura K, Kimura J, Michishita I, Suzuki T, Nagai R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2243-2247. Circulating Oxidized Low density lipoprotein levels a biochemical risk marker for coronary heart disease.
- 105) Shimada K, Mokuno H, Masunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Miyauchi K, Diada H. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004;174:343-347.

- 106) Mehta JL. Oxidized or native low density lipoprotein cholesterol. Which is more important in atherogenesis. *J Am Coll Card* 2006;48(5):980-982.
- 107) Depre C, Havaux X, Renkin J, Vanaverschelde JLJ, Winjs W. Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res* 1999;41:465-472.
- 108) Akarasereenont P, Nuamchit T, Thaworn A, Leowattana W, Chotewuttakorn S, Khunawat P. Serum nitric oxide level in patients with coronary artery disease. *J Med Assoc Thai* 2001;84 Suppl 3:S730-9.
- 109) Ferlito S, Gallina M. Nitrite plasma levels in acute and chronic coronary heart disease. *Minerva Cardioangiol* 1997;45(11):553-8.
- 110) Matyar S, Attila G, Acarturk E, Akpinar O, Inal T. eNOS gene intron 4a/b VNTR polymorphism is a risk factor for coronary artery disease in Southern Turkey. *Clin Chim Acta* 2005;354(1-2):153-8.
- 111) Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998;32(3):521-6.
- 112) Ichihara S, Yamada Y, Fujimura T, Nakashima N ve Yokota M. Association of polymorphism of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population. *Am J Cardio* 1998;81:83-86.
- 113) Nakagami H, Ikeda U, Maeda Y, Yamamoto K, Hojo Y, Kario K, Kuroki S, Shimada K. Coronary artery disease and endothelial nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. *J Thromb Thrombolysis* 1999;8(3):191-5.
- 114) Odawara M, Sasaki K, Tachi Y, Yamashita K. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and coronary heart disease in Japanese NIDDM. *Diabetologia* 1998;41(3):365-6.
- 115) Park JE, Lee WH, Hwang TH, Chu JA, Kim S, Choi YH, Kim JS, Kim DK, Lee SH, Hong KP, Seo JD, Lee WR. Aging affects the association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction in the Korean male population. *Korean J Intern Med* 2000;15(1):65-70.
- 116) Fowkes FG, Lee AJ, Hau CM, Cooke A, Connor JM, Lowe GD. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and nitric oxide synthase (eNOS) genes and

risks of peripheral arterial disease and coronary heart disease: Edinburgh Artery Study. *Atherosclerosis* 2000;150(1):179-85.

117) Poirier O, Mao C, Mallet C, Nicaud V, Herrmann SM, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Soubrier F, Cambien F. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study *Eur J Clin Invest* 1999;29(4):284-90.

118) Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996;2(1):41-5.

## **TEŐEKKÖR**

Uzmanlık tez çalıőmam boyunca desteklerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Baőkanı ve tez danıőmanım Prof. Dr. İdris Mehmetođlu'na, diğer Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve Prof. Dr. Hasan Acar'a (Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Baőkanı) teőekkür ederim. Ayrıca, bugünlere gelmemde ve yetişmemde maddi, manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teőekkür ederim.