

T.C.
ZONGULDAK KARAELMAS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**BÜYÜK DAMAR ATEROSKLEROZUNA BAĞLI AKUT
İSKEMİK İNME İLE BAŞVURAN HASTALARDA PON1
(L55M, Q192R), PON2 (C311S) VE PAF-AH (G994T) GEN
POLİMORFİZMLERİNİN İLİŞKİSİ**

Dr. Salih ÇİÇEK
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ahmet DURSUN

ZONGULDAK
2011

T.C.
ZONGULDAK KARAELMAS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**BÜYÜK DAMAR ATEROSKLEROZUNA BAĞLI AKUT
İSKEMİK İNME İLE BAŞVURAN HASTALARDA PON1
(L55M, Q192R), PON2 (C311S) VE PAF-AH (G994T) GEN
POLİMORFİZMLERİNİN İLİŞKİSİ**

Dr. Salih ÇİÇEK
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ahmet DURSUN

ZONGULDAK
2011

TEZ ONAY TUTANAĞI

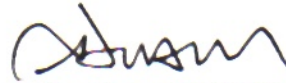
Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Büyük Damar Aterosklerozuna Bağlı Akut İskemik İnme İle Başvuran Hastalarda PON1 (L55M, Q192R), PON2 (C311S) ve PAF-AH (V279F) Gen Polimorfizmlerinin İlişkisi

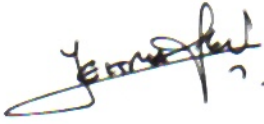
Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Salih ÇİÇEK

Tez Savunma Tarihi: 15/08/2011

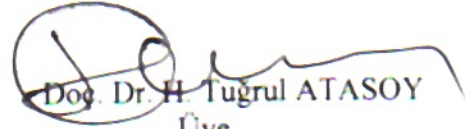
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ahmet DURSUN



Doç. Dr. Ahmet DURSUN
Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ
Üye



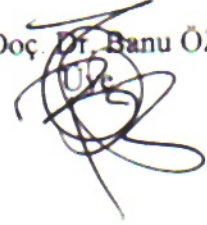
Doç. Dr. H. Tugrul ATASOY
Üye

Doç. Dr. Ufuk EMRE



Üye

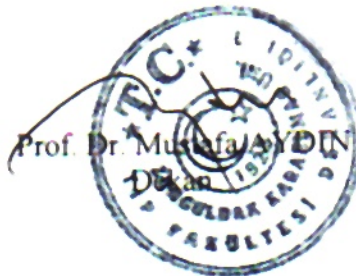
Yrd. Doç. Dr. Banu ÖZEN



Üye

UYGUNDUR

15/08/2011



ÖNSÖZ

Tez konusunun seçiminde ve çalışmaların yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen, tezimin planlanması, yürütülmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesi konusunda büyük katkı ve desteğini görmüş olduğum uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım örnek kişiliğiyle bizlere her zaman yol gösteren, gerek mesleki gerekse sosyal anlamda her türlü desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet DURSUN'a; tez çalışmalarımın yürütülmesinde ve aktif katkı ve desteğini görmüş olduğum değerli hocam Öğr. Gör. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK'e; tez çalışmama sağladıkları katkılardan dolayı başta sayın hocam Doç. Dr. Nida TAŞÇILAR ve Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine; tezimin istatistik aşamasında bana yardımcı olan Firuzan KÖKTÜRK'e; eğitimim boyunca kendileri ile beraber çalışmaktan memnun kaldığım arkadaşlarım Dr. Savaş Barış, Dr. Fatih M. KENİ, Nihan YANIK ve Tuğba AKTAŞ'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük emeği olan çok değerli Anneme, Babama ve Kardeşlerime, desteğini hiç bir zaman yanımda esirgemeyen, fedakar hayat yoldaşım eşim Feray'a ve benim için dünyada en değerli varlık olan bitanecik oğlum Ahmet Asaf'a ithaf ederim.

Dr. Salih ÇİÇEK
ZONGULDAK, 2011

ÖZET

ÇİÇEK S. Büyük Damar Aterosklerozuna Bağlı Akut İskemik İnme ile Başvuran Hastalarda *PON1 (L55M, Q192R)*, *PON2 (C311S)* ve *PAF-AH (G994T)* Gen Polimorfizmlerinin İlişkisi. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, 2011.

İnme; aniden gelişen, minimum 24 saat veya daha uzun süren, ölüme yol açabilen vasküler nedenlere bağlı fokal serebral fonksiyon kaybına ait belirti ve bulguların hızla yerleşmesi ile karakterize bir klinik sendromdur. İskemik inme, beyin enfarktı, intraserebral kanama ve subaraknoid kanama gibi farklı alt tipleri vardır. İskemik inme, tüm inmelerin %85'ni oluşturur. İskemik inmelerin en önemli nedeni aterosklerozdur. Beyinde en sık karotis bifurkasyonu, orta serebral arter çıkışı, baziler arterin orta ve alt bölümleri etkilenir. Çalışmamızda *PON1 (L55M, Q192R)*, *PON2 (C311S)* ve *PAF-AH (G994T)* gen polimorfizmlerinin akut iskemik inme ile olan muhtemel ilişkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Büyük damar aterosklerozuna bağlı akut iskemik inme tanısı almış 75 hasta ile yaş ve cinsiyet özellikleri açısından benzer özelliklere sahip olan ve nörolojik bir hastalığı olmadığı bilinen 75 sağlıklı kontrolden kan alınarak DNA elde edilmiş ve PCR-RFLP yöntemi ile *PON1 (L55M, Q192R)*, *PON2 (C311S)* ve *PAF-AH (G994T)* gen polimorfizmleri belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu *PON1 (L55M, Q192R)*, *PON2 (C311S)* ve *PAF-AH (G994T)* gen polimorfizmleri açısından karşılaştırılmıştır. Büyük damar aterosklerozuna bağlı akut iskemik inme tanısı konulan hasta ve kontrol grupları arasında *PON1 (L55M, Q192R)*, *PON2 (C311S)* ve *PAF-AH (G994T)* genlerinin alel dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlılık göstermediği belirlenmiştir. Ateroskleroz oluşumu önleyici etkisi olan paraoksonaz (*PON*) ve platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz (*PAF-AH*) genetik polimorfizmleri üzerine daha geniş çaplı ve spesifik çalışmaların yapılması ve geliştirilmesi ile akut iskemik inme tanısı, etyopatogenezi ve prognozunda gelişmelerin sağlanması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: İskemik inme, gen polimorfizmi, ateroskleroz, *PON1 L55M*, *PON2 Q192R*, *PON2 C311S*, *PAF-AH G994T*

SUMMARY

ÇİÇEK S. Relationship Between *PON1* (L55M, Q192R), *PON2* (C311S) and *PAF-AH* (G994T) Gene Polymorphisms and Acute Ischemic Stroke Patients With Large-Vessel Atherosclerosis. Zonguldak Karaelmas University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Thesis, 2011.

Stroke; a sudden, a minimum of 24 hours or longer, can lead to death due to vascular causes, symptoms and signs of focal loss of cerebral function is a clinical syndrome characterized by a rapid settlement. There are different sub-types of ischemic stroke, brain infarction, intracerebral hemorrhage and subarachnoid hemorrhage. Ischemic stroke, creates of %85 all strokes. Ischemic strokes are the most important cause of atherosclerosis. The brain, the most common carotid bifurcation, middle cerebral artery-out, middle and bottom sections of the basilar artery is affected. The aim of the study is to investigate, *PON1* (L55M, Q192R), *PON2* (C311S) and *PAF-AH* (G994T) gene polymorphisms with acute ischemic stroke, which is intended to reveal possible relationships. DNA samples were obtained from 75 acute ischemic stroke patients with large-vessel atherosclerosis and age and gender matched 75 healthy control subjects having no neurological disease. Their *PON1* (L55M, Q192R), *PON2* (C311S) and *PAF-AH* (G994T) gene polymorphisms were determined by using PCR-RFLP method. Patient and control group of *PON1* (L55M, Q192R), *PON2* (C311S) and *PAF-AH* (G994T) gene polymorphisms were compared. Allelic distribution between groups for the *PON1* (L55M, Q192R), *PON2* (C311S) and *PAF-AH* (G994T) genes polymorphisms were not statistically significant. Paraoxonase (*PON*) and platelet-activating factor acetylhydrolase (*PAF-AH*) genetic polymorphisms which have preventive effect of atherosclerosis, on the larger scale in order to understand etiopathogenesis, development, and the prognosis of acute ischemic stroke.

Keywords: Ischemic stroke, gene polymorphism, atherosclerosis, *PON1* L55M, *PON2* Q192R, *PON2* C311S, *PAF-AH* G994T

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİL DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serebrovasküler Hastalıklar	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Fiziopatoloji	4
2.1.3. Etiyoloji ve Sınıflandırma	6
2.1.3.1. Serebral İnfarkt	6
2.1.3.1.1. Geniş Arter Ateroskerozu	7
2.1.3.1.2. Kardiyembolizm	8
2.1.3.1.3. Küçük Damar Oklüzyonu (Lakün)	8
2.1.3.1.4. Diğer Belirlenen Nedenlere Bağlı İskemik İnme	9
2.1.3.1.5. Nedeni Belirlenemeyen İskemik İnme	9
2.1.3.2. İntraserebral Kanama	9
2.1.4. Risk Faktörleri	12
2.1.4.1. İnme Risk Faktörlerinin Sınıflandırılması	12
2.1.4.1.1. Değiştirilemeyen risk faktörleri	13
2.1.4.1.2. Değiştirilebilen risk faktörleri	19
2.1.4.1.2.1. Kesinleşmiş risk faktörleri	19
2.1.4.1.2.2. Kesinleşmemiş risk faktörleri	20
2.2. Temel Genetik Kavramlar	21
2.3. Ateroskleroz	25
2.3.1. Ateroskleroz ve <i>Paraoksonaz</i>	27
2.3.2. <i>Paraoksonaz</i> Gen Ailesi	29
2.3.2.1. <i>PON</i> 'ın Biyokimyasal Yapısı	29
2.3.2.2. <i>PON</i> Polimorfizmi	32
2.3.2.2.1. <i>PON1</i>	32
2.3.2.2.2. <i>PON2</i>	34
2.3.2.2.3. <i>PON3</i>	35

2.3.3. <i>PAF-AH</i> ve Ateroskleroz	35
2.3.3.1. <i>PAF-AH</i> (<i>Platelet-Aktive edici Faktör-AsetilHidrolaz</i>)	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Hastalar	39
3.2. Kontrol Grubu	40
3.3. Genetik Metod.....	40
3.3.1. Periferik kandan DNA elde edilmesi	40
3.3.2. İlgili gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu	41
3.3.2.1. <i>PON1 L55M</i> gen polimorfizmi	41
3.3.2.2. <i>PON1 Q192R</i> gen polimorfizmi	41
3.3.2.3. <i>PON2 C311S</i> gen polimorfizmi	42
3.3.2.4. <i>PAF-AH</i> gen polimorfizmi	42
3.3.3. Görüntüleme ve jelin hazırlanması	43
3.3.4. Değerlendirme.....	43
3.3.4.1. <i>PON1 L55M</i> gen polimorfizmi	43
3.3.4.2. <i>PON1 Q192R</i> gen polimorfizmi	44
3.3.4.3. <i>PON2 C311S</i> gen polimorfizmi	45
3.3.4.4. <i>PAF-AH</i> gen polimorfizmi	46
3.3.5. İstatistik	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. Hasta Grubunun Özellikleri	48
4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Polimorfik Allel Dağılımının Karşılaştırması. 49	
4.2.1. <i>PON1 L55M</i> gen polimorfizmi	49
4.2.2. <i>PON1 Q192R</i> gen polimorfizmi	49
4.2.3. <i>PON2 C311S</i> gen polimorfizmi	50
4.2.4. <i>PAF-AH</i> gen polimorfizmi	50
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	59
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER.....	81
Ek 1. Etik Kurul Onayı	81

KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
Aİİ	Akut İskemik İnme
APC	Aktive Protein C
APCR	Aktive Protein C Rezistansı
Apo A	Apolipoprotein A
Apo E	Apolipoprotein E
Arg	Arginin
AT III	Antitrombin III
BBT	Bilgisayarlı Beyin Tomografisi
Bp	Baz çifti
CADASIL	Serebral Otozomal Dominant Arteriyopati Subkortikal İnfarktlar ve Lökoensefalopati
Ca ⁺²	Kalsiyum
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksi-nükleotit-trifosfat
DM	Diabetes mellitus
FV	Faktör 5
FVIII	Faktör 8
F	Forward
Gln	Glutamin
Gp	Glikoprotein
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HPA	Human Platelet Alloantijen
İMT	İntimal Medial Kalınlık
Kb	Kilobaz
KAH	Koroner Arter hastalığı
Mb	Megabaz
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein(a)
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Mesajcı RNA
µl	Mikrolitre
µM	Mikromol
MTHFR	Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
NMDA	N-Metil D-Aspartat
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
PAF-AH	Platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü 1
PON	Paraoksonaz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyon
R	Rewers
RFLP	Restriksiyon Fragmenti (Parça) Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleikasit

SNP	Tek baz değişim polmorfizmi
SPSS	“Statistical Package for Social Sciences” (Sosyal bilimler için istatistik paketi)
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
tPA	Doku Plazminojen Aktivatörü
Tm	Erime derecesi
VNTR	Değişken sayıda ardışık tekrar

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Paraoksonaz enziminin yapısı	31
2. <i>PON-1</i> enzimi gen polimorfizmleri	33
3. <i>PON1 L55M</i> gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü	44
4. <i>PON1 Q192R</i> gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü	45
5. <i>PON2 C311S</i> gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.....	46

TABLULAR DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. İskemik ve hemorajik inmeli hastalardaki risk faktörleri	12
Tablo 2. İnme risk faktörlerinin sınıflandırılması	13
Tablo 3. Hasta-kontrol gruplarının <i>PON1 L55M</i> gen polimorfizm dağılımları açısından karşılaştırması	49
Tablo 4. Hasta-kontrol gruplarının <i>PON1 Q192R</i> gen polimorfizm dağılımları açısından karşılaştırması	50
Tablo 5. Hasta-kontrol gruplarının <i>PON2 C311S</i> gen polimorfizm dağılımları açısından karşılaştırması	50

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütünün tanımlanmasına göre inme; aniden gelişen, minimum 24 saat veya daha uzun süren, ölüme yol açabilen vasküler nedenlere bağlı fokal serebral fonksiyon kaybına ait belirti ve bulguların hızla yerleşmesi ile karakterize bir klinik sendromdur. İskemik inme, beyin enfarktı, intraserebral kanama ve subaraknoid kanama gibi farklı alt tipleri vardır. İskemik inme, tüm inmelerin %85'ni oluşturur.

İskemik inmelerin en önemli nedeni aterosklerozdur. Beyinde en sık karotis bifurkasyonu, orta serebral arter çıkışı, baziler arterin orta ve alt bölümleri etkilenir. Süreç anevrizma, rüptür, tromboz ya da emboli kaynağı olarak sonuçlanır. Ateroskleroz intimada lipid depolanması, fibrozis ve inflamasyon ile karakterizedir. Serum total kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) düzeylerinin yüksek; buna karşılık HDL düzeylerinin düşük olması, aterosklerozun oluşumunda etkili lipoproteinlerdir. HDL'nin aterosklerozdaki koruyucu rolü, ters kolesterol taşıması, nitrik oksit gibi bazı damar genişletici moleküllerin sentezini artırır, inflamasyonu ve tromboz oluşumunu önleyici etki gösterir, adezyon moleküllerinin sentezini azaltır ve endotel tamirini uyarır. HDL'nin bir başka önemli etkisi ise, aterosklerozun başlangıç ve gelişiminden sorumlu tutulan LDL'deki oksidatif değişimleri önlemesidir. HDL'nin antioksidan etkisinin kısmen HDL ile ilişkili enzimlere bağlı olabileceği düşünülmekte, özellikle paraoksonaz (*PON*) ve platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz (*PAF-AH*) enzimleri üzerinde durulmaktadır. PAF-AH hem proinflamatuvar bir molekül olan platelet aktive edici faktörü hem de oksitlenmiş fosfolipidleri hidroliz edici özelliği ile koruyucu etkide önemli rolü olduğu düşünülen bir moleküldür. Ancak PAF-AH insanda, HDL'den çok LDL üzerinde bulunan bir enzimdir. HDL'ye özgü olan ve lipid peroksidleri hidroliz etmede güçlü etkisi olduğu bildirilen enzim ise *PON*'dir

Ateroskleroz iskemik inmenin hem etiyopatogenezinde hem de progresyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. *PON* ve *PAF-AH*'lar detoksifikasyon mekanizmasında çok önemli rol oynayan enzimlerdendir. Bu nedenle *PON* ve *PAF-AH* üretimini ve sekresyonunu etkileyen gen polimorfizmleri ile kardiyovasküler hastalıklar dışında akut iskemik inme, diyabet, sepsis, Alzheimer

ve Parkinson gibi pek çok hastalığın gelişmesine karşı koruyucu, hastalığın oluşum aşamasında, seyrinde ve tedaviye yanıtlarında ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan araştırmalar, *PON* polimorfizminin oksidatif hasara bağlı hastalıklarda önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

PON ve *PAF-AH* üretimi genetik kontrol altında olup salgılanma zamanları ve miktarları genetik olarak ayarlanmaktadır. Buna kanıt olarak polimorfizmlerinin saptanmasıyla serum seviyeleri arasındaki farkın tesbit edilmesi gösterilmektedir. Bu polimorfizimlere göre bireyler yüksek, orta veya düşük düzeyde salgılanmakta ve bireyden bireye ateroskleroz oluşumu farklı olmakla birlikte akut iskemik inmeye yanıt değişmektedir.

Bu çalışmada aterosklerozu oluşumu önleyici etkisi olan *PON1 L55M*, *PON1 Q192R*, *PON2 C311S* ve *PAF-AH G994T (Val279Phe)* gen polimorfizmlerin büyük damar aterosklerozuna bağlı akut iskemik inme ile başvuran hastalar ile olan ilişkisinin karşılaştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serebrovasküler Hastalıklar

Dünya Sağlık Örgütü inmeyi en geniş anlamıyla serebral işlevlerdeki fokal bozukluğa ilişkin 24 saatten uzun süren ya da vasküler kökenli bir neden dışında belirgin bir neden olmaksızın ölüme yol açan, hızlı gelişen klinik belirtiler olarak tanımlamıştır (1). Geçici iskemik atak, tüm belirtileri ilk 24 saatte düzelen beyin iskemisi durumudur. İskemik atak ilişkili nörolojik belirti ve bulgular 3 saatten uzun sürerse 'kısa ömürlü inmeler' olarak isimlendirilir. Çünkü bu hastaların büyük bir kısmında manyetik rezonans görüntüleme beyin infarktüsünü düşündürülen patolojik bulgular elde edilmiştir (2).

2.1.1. Epidemiyoloji

İnme insidansı, belirli bir zaman periyodunda bir popülasyonda ortaya çıkan yeni inme olgularını ifade eder, serebrovasküler olayların epidemiyolojisini incelemeye en geçerli verilerden bir tanesidir. İnme insidansının yaşın ilerlemesi ile birlikte arttığı gözlenmiştir. Örneğin 45 yaş altı kişilerde yıllık inme oranı % 0.2 iken 75-84 yaş arasında %1.6 olarak artmaktadır. Yaş standardizasyonu yapıldıktan sonra 55 yaş ve üstünde toplam yıllık inme insidansı %5.3 olarak saptanmıştır (3).

İnme prevalansı belirli bir zamanda bir popülasyondaki inmeli olguların toplam sayısıdır. Bu sayı inme insidansına ve yaşayabilen hastalara bağlıdır. Prevalans yaşla birlikte artmaktadır. Yaşın standardize edildiği çalışmalarda 65 yaş ve üzerinde 1000 kişilik popülasyonda inme prevalansı 58.6 oranındadır. Erkeklerde inme prevalansı 72.4/1000, kadınlarda ise 48.6/1000 olarak bulunmuştur (3).

Türkiye'de yapılan, 2000 yılında yayınlanan, 3100 hastayı içeren çok merkezli bir inme çalışmasında iskemik inme oranı %72, hemorajik inme oranı %28 olarak bulunmuştur (4). Genelde iskemik inme hemorajik inmeden 3-4 kat daha sık görülmektedir ve tüm inme olgularının %75'ini oluşturmaktadır. İntraserebral

kanama olguların %30'unu oluşturmaktadır. Subaraknoid kanama sıklığı intraserebral kanama sıklığının genellikle üçte biri ile yarısı kadardır. İnfarkt alt tiplerinin sıklığı olguların seçildiği örnekleme, çalışmanın yapıldığı coğrafi alana ve araştırmacı tarafından oluşturulan tanı algoritmalarına göre değişmektedir. Serebral infarkt olgularının yaklaşık %20'sinin kardiyoembolizm kaynaklı infarkt, %15'inin büyük damar aterosklerotik infarktı, %20'sinin küçük damar laküner infarktı olduğu gözlenmiştir. Arterit ya da diseksiyon gibi diğer belirlenmiş nedenlerden kaynaklanan inmeler genellikle %5'den azdır. Bilinmeyen nedenlere bağlı infarktlar iskemik infarktların yaklaşık %40'ını oluşturur (5).

2.1.2. Fiziopatoloji

Normal bir erişkinde istirahat serebral kan akımı dakikada yaklaşık 50-55 ml/100 gr'dır ve serebral metabolik oksijen oranı dakikada 165 mmol/100 gr'dır (6). İstirahatte, her kardiyak kasılma sonrasında 70 ml kan salınır; bunun 10-15 ml'si beyine tahsis edilir. Normal serebral kan akımını sağlamak üzere, her bir internal karotid arterde dakikada 350 ml, vertebrobaziller sistemde ise dakikada 100-200 ml kan akımı söz konusudur (5).

İskemik inme hipotansiyon veya hemodinamik nedenlerle oluştuysa arteriyel sınır veya arteriyel sulama alanları tutulabilir. Kollateral kan akımının varlığında ana arter oklüzyonu mevcut ise arteriyel sulama alanının merkezinde kama şeklinde infarkt oluşabilir. Kollateral kanlanma alanının yokluğunda arter tarafından sulanan tüm alanda infarkt meydana gelir. İnternal karotid arter gibi büyük bir arter tıkanmasında multilobar infarkt ile bunu çevreleyen ödem gelişebilir. Emboli nedeniyle oluşan infarktlar serebral korteks ile beyaz cevher arasındaki bileşkeye yerleşme eğilimindedirler. İnfarktın erken reperfüzyonu pıhtı lizise uğradığı zaman oluşur bu da hemorajik transformasyona neden olabilir. Kardiyak emboliler genelde rekanalize olma eğilimindedir. Kırk sekiz saat sonra çekilen anjiyografide %90 oranında açılma gözlenir. Bu rekanalizasyon eğilimi kardiyoembolik inme sonrası daha sık görülen hemorajik transformasyonun nedeni olabilir (7).

Beyin yüksek oksidatif metabolizma ve yoğun glutamaterjik sinaptik aktivite nedeniyle diğer dokulara göre eksitotoksisteye ve serbest radikallere daha duyarlıdır. İskemide nekrotik hücre ölümüne ek olarak apoptotik mekanizmalar da rol oynar. İskemide apoptotik mekanizmalar mitokondri, DNA, endoplazmik retikulum gibi hücre içinden ya da hücre yüzeyine yerleşmiş olan nörotropin reseptörü P75 (p75 NTR), tümör nekroz faktör reseptör-1 (TNFR-1) gibi ölüm reseptörleri tarafından başlatılabilir (8). Deneysel fokal beyin iskemisinde belirgin iskemik akım eşikleri vardır. Kan akımı dakikada 18 ml/100gr'a indiğinde beyin elektriksel hasar için bir eşığe ulaşır. Nöron bu durumda fonksiyon göremezken iyileşme potansiyeline sahiptir. Kan akımı dakikada 8 ml/100gr'a düştüğünde hücre ölümü ile sonuçlanabilir bu düzey membran hasar eşığı olarak bilinir (6). Bu eşiklerin arasındaki kurtarılabilir beyin dokusuna Astrup ve arkadaşları tarafından iskemik penumbra adı verilmiştir (9). Penumbra, tıkanmanın erken döneminde tromboliz ile tekrar kan sağlanması ve/veya nöroprotektif ajanların kullanılmasıyla potansiyel olarak kurtarılabilir. Ancak hem klinik hem de deneysel çalışmalarda bu zaman diliminin 2-3 saatle sınırlı olduğu saptanmıştır (8).

İskemi beyin enerji metabolizmasında bozulmaya, aerobik glikoliz kaybına, intraselüler sodyum ve kalsiyum birikimine, eksitotoksik nörotransmitterlerin salınımına, lokal asidoz ile birlikte laktat seviyelerinde yükselmeye, serbest radikal üretimine, hücre şişmesine, lipaz ve proteazların fazla aktivasyonuna ve hücre ölümüne neden olur (10). Kan akımı normalin %16'sından daha fazla azaldığı zaman (<12ml/100 gr./dak) ATP hızla tükenir, anoksik depolarizasyon ortaya çıkar (11). Akut dönemde aşırı glutamat salınması nedeniyle N-metil-D-aspartik asit (NMDA) ve non-NMDA reseptörleri aktive olur. Hücre içine NMDA reseptörlerinden yoğun kalsiyum (Ca^{+2}) girişi sonucunda Ca^{+2} bağımlı enzimlerin aktivasyonu ve serbest radikal oluşumu ile gecikmiş hücre ölümü gerçekleşir. Serbest radikaller nükleik asitlere, lipitlere ve proteinlere bağlanarak hücreleri zedeler. Kan beyin bariyerini bozarak beyin ödemine, kanamaya ve inflamatuvar hücrelerin beyin parankimine geçişine neden olur. Nöron kaynaklı nitrik oksit (NO) artışı nörotoksiktir, endotel kaynaklı NO ise rezidüel kan akımını artırarak koruyucu rol oynar. Reperfüzyon sırasında endotel kaynaklı NO ve peroksinitrit oluşumu kan beyin bariyeri hasarına yol açabilir. Kalsiyumun hücre içindeki artışı lipaz, proteaz,

endonükleazların aktivasyonu, mitokondriyal yüklenme ve serbest radikal oluşumunu arttırarak nöron ölümünü tetikler. Ölüm reseptörlerinin uyarılması ve mitokondriyal yolun aktivasyonu kaspaz 3, 7 gibi yürütücü kaspazların aktif formlarına dönüşmesine ve çeşitli nükleer, sitoplazmik ve membranöz proteinlerin parçalanmasına neden olur. Katepsin ve kalpain gibi proteazların sınırlı aktivasyonu apoptozu tetiklerken şiddetli aktivasyonu nekroz gelişimine neden olur. Matriks metalloproteazlar damar bazal laminasındaki bağ dokusunu yıkararak kan beyin bariyeri hasarını artırır. İskemik bölgeye lökosit infiltrasyonunun olması geç iskemik hasarın ilerlemesine yol açar (8).

İntraserebral kanamada kanın ekstrasvazasyonu parankim dokuyu parçalar ve kitle etkisi oluşturur. Kan beyin bariyerini bozarak ödeme neden olur. Komşu beyin dokusuna bası gelişir. Kanamanın şiddeti ve yerleşimi kliniği belirler. İntraserebral kanama sabah sekiz ile akşam sekiz saatlerinde daha sık görülür. Bu sirkadiyan ritmin fizyolojik kan basıncı tepe noktası ile çakışması intraserebral kanamada kan basıncı yüksekliğinin etkisi düşüncesini desteklemektedir (12).

2.1.3. Etiyoloji ve Sınıflandırma

2.1.3.1. Serebral İnfarkt

Ciddi ateroskleroz ve üzerine yerleşmiş tromboz kaynaklı oklüzyon, arter ya da kardiyak kaynaklı embolizm, daha nadir görülen arteriyel diseksiyon, hiperkoagülasyon durumları, vazospazm, vaskülitler, sistemik hipotansiyon, disproteinemi ve polisitemi gibi hiperviskozite nedenleri, moya moya hastalığı, fibromüsküler displazi, tümör tarafından damarın kompresyonu gibi pek çok nedenle serebral kan akımında azalma ve bunun sonucunda infarkt gelişebilir.

İnmeler nöroradyolojik, kardiyolojik, hematolojik ve biyokimyasal tetkikler göz önüne alınarak; serebral iskemi (%60-80), intraserebral hemoraji (%10-15), subaraknoid kanama (%3-10) olmak üzere 3 ana grupta toplanmıştır (13). Bogousslavsky ve arkadaşları tüm inmelerin %89'unun iskemik, bunun da %42'sinin aterosklerotik nedenli inmeler olduğunu göstermişlerdir (14). Ülkemizde, Ege

Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada, tüm inmelerin %77'sinin iskemik, bunun da %37'si ateroskleroza bağlı inmeler olduğu bildirilmiştir (15).

Bamford ve arkadaşları klinik bulguları gözeterek iskemik serebrovasküler hastalıkları 4 kategoriye ayırarak (16)

1. Total anterior dolaşım infarktları,
2. Parsiyel anterior dolaşım infarktları,
3. Posterior dolaşım infarktları,
4. Laküner infarktlar olarak sınıflandırmışlardır.

Bu sınıflandırma olası etiyolojik nedenler gözetilmediğinden pek kullanılmamaktadır (13). “Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment” (TOAST) çalışmasında kullanılan sınıflandırma ise klinik bulguların yanı sıra etiyolojik nedenleri de gözetir. Bu sınıflandırma 5 kategoriden oluşur (17):

1. Geniş arter ateroskerozu (tromboz veya emboli),
2. Kardiyoembolizm,
3. Küçük damar oklüzyonu (lakün),
4. Diğer belirlenen nedenlere bağlı iskemik inme,
5. Nedeni belirlenemeyen iskemik inmedir.

2.1.3.1.1. Geniş Arter Ateroskerozu

Tüm iskemik inmelerin yaklaşık yarısı geniş arter ateroskerozuna bağlıdır (17). Geniş arter ateroskerozu genelde ekstrakraniyal ve daha nadir olmak üzere intrakraniyal damarlarda ve bunların bifurkasyon bölgelerinde oluşan aterom plaklarının rüptürü ve bunu takip eden tromboza bağlı olarak gelişir. Proksimal arterlerin %70-80 üzerindeki darlıklarında geniş arter ateroskerozundan söz edilir. Aterosklerotik inmeler genelde sabah erken saatlerde ve günün aktif saatlerinde gerçekleşir. Ancak uykudan uyanınca fark edilen inmelerin büyük bir çoğunluğu da bu grupta yer alır. Aterosklerotik inmeler %44 oranında sonbahar mevsiminde gelişme eğilimindedirler (18). Kliniğinde sıklıkla yüksek kortikal fonksiyon bozuklukları, duyuusal ve motor etkilenmeler, nadiren de beyin sapı ve serebellar

fonksiyon bozuklukları görülebilir. İnmenin geniş arter aterosklerozuna bağlı olduğunu söyleyebilmek için muhtemel kardiyemboli kaynağı olmaması, bilgisayarlı beyin tomografisi (BBT) ve kraniyal manyetik rezonansda (MR) bir arter sulama alanına uyan infarkt çapının 1.5 cm'den büyük olması, Doppler ultrasonografi (USG) ve anjiyografi de semptomdan sorumlu damarda %50'den fazla stenoz veya oklüzyon tespit edilmesi gereklidir. Bu tetkiklerin normal olduğu hastalarda geniş arter aterosklerozuna bağlı inme tanısı konulamaz (13).

2.1.3.1.2. Kardiyembolizm

Tüm iskemik inmelerin %20'sini oluşturan kardiyembolizmde, arteriyel oklüzyonun nedeni kalpten kaynaklanan embolilerdir (17). Emboliye yol açan kalp hastalıkları, yüksek riskli ve orta riskli olmak üzere alt gruplara ayrılmıştır. Kardiyembolizme neden olan kalp hastalıkları akut miyokard infarktüsü, sol ventrikül anevrizması, kardiyak aritmiler, dilate kardiyomyopati gibi sıralanabilir. Orta yaş ve üzerinde en sık görülen kardiyemboli nedeni miyokard infarktüsü, ileri yaşta ise nonvalvüler atriyal fibrilasyondur (19). Kardiyembolik inmelerin %52 gibi büyük bir kısmı sabah uyanmayı takip eden ilk saatlerde gerçekleşir ve mevsimsel fark göstermez (18). Kliniği geniş arter aterosklerozuna benzer. Ayırımı kardiyak emboli kaynağının gösterilmesi ile yapılır. Kardiyembolik infarkt yıllardır epileptik nöbet açısından tartışmalı bir risk faktörü olarak bilinmektedir (20,21). Ancak son yapılan çalışmalar kardiyembolik inme ile epileptik nöbet gelişimi arasında bir birliktelik olmadığını düşündürmektedir (22). Kardiyembolik inmeli bazı olgularda bulguların hızla düzelme eğilimi göstermesi kardiyembolik infarktın rekanalizasyonu ile açıklanabilir. Tıkalı damarın erken rekanalizasyonu iskemik lezyonun hemorajik lezyona dönüşümüne de sebep olabilir. Kardiyembolik infarktta BT veya MR'da, geniş arter aterosklerozunda olduğu gibi, bir arter alanına uyan geniş kortikal infarktlar görülebilmekle birlikte, değişik vasküler alanlarda birden fazla lezyonun varlığı ayırıcı tanıda yol göstericidir (13).

2.1.3.1.3. Küçük Damar Oklüzyonu (Lakün)

Genellikle, diyabet veya hipertansiyonu olan yaşlı hastalarda ortaya çıkan bu inme tipi tüm iskemik inmelerin %25'ini oluşturur (17). Laküner infarktlar penetran

arterlerin aterosklerozuna bağlı oklüzyon veya mikroemboli sonucu ortaya çıkabilir. Kck damar oklüzyonu tanısı için BT/MR'da saptanan infarkt çapının 1.5 cm'den kck olması gereklidir. Bu olgularda emboliye yol açabilecek bir kalp hastalığı veya ipsilateral arterde %50'den fazla stenoza yol açan büyük damar hastalığı bulunmamalıdır (13). Laknler tek veya çoklu, semptomatik veya asemptomatik olabilirler. En az 20 tip laküner sendrom tanımlanmıştır (23). Bunlar arasında en sık görülenler saf motor hemiparezi, saf duyuusal inme, duyuusal motor inme, ataksik hemiparezi, disartri-beceriksiz el sendromudur. Çok sayıda lakünler kognitif yetide azalmaya neden olabilir (23).

2.1.3.1.4. Diğer Belirlenen Nedenlere Bağlı İskemik İnme

Tüm iskemik inmelerin %5'inden daha az oranda grlrleri (17). Bu grupta, fibromüsküler displazi, santral sinir sisteminin birincil ve ikincil vaskülitleri, CADASIL (Serebral Otozomal Dominant Arteriyopati Subkortikal İnfarktlar ve Lökoensefalopati), moya moya hastalığı, mitokondriyal hastalıklar, serebral amiloid anjiyopati, travma ve diseksiyon ile kan hastalıkları yer alır. Anjiyografi, leptomeningeal biyopsi ve ayrıntılı hematolojik, biyokimyasal ve mikrobiyolojik testlerle tanı konulur. Potansiyel kardiyembolizm ve geniş arter aterosklerozu dışlanmalıdır (13).

2.1.3.1.5. Nedeni Belirlenemeyen İskemik İnme

Bu grupta ayrıntılı tetkiklere rağmen etiyolojisi saptanamayan serebral infarktlar ile yeterli tetkik edilemeyen olgular yer alır. Ayrıca, yapılan tetkiklerde birden fazla etiyolojik neden saptanan olgular da bu grupta değerlendirilmelidir (13).

2.1.3.2 İntraserebral Kanama

İnmelerin %15-20'sini oluşturur. Serebral kanamalar %6-8 oranında subaraknoid, %80 oranında intraparankimal, %12-14 oranında karışık tiptedir (4).

İntraserebral kanamanın en sık nedeni hipertansiyondur. Hipertansiyon diğer inme gruplarına göre intraserebral kanama için daha önemli bir risk faktörüdür. İntraserebral kanama nedeniyle başvuran hastalarda diğer inme hastalarına göre hipertansiyon öyküsü ve sol ventrikül hipertrofisi olma sıklığı daha fazladır (%72-

81) (24). İntraserebral kanamalar arasında hipertansiyonun neden olduğu olguların oranı yaklaşık %50'dir (25).

İntraserebral kanamanın nedenleri arasında kafa içi anevrizmalar, arteriyovenöz malformasyonlar, küçük damar patolojileri de yer almaktadır. Anjiyografi yapılan yaş ortalaması 46 olan 38 intraserebral kanamalı genç hastanın 23'ünde arteriyovenöz malformasyon, 9'unda anevrizma saptanmıştır (24). Arteriyovenöz malformasyonlar özellikle genç intraserebral kanamalı olguların önemli bir kısmında saptanmaktadır. Vasküler malformasyonlarda kendiliğinden kanamalar olabildiği gibi, travmaya ikincil kanamalar da gelişebilir (26). Küçük arteriyovenöz malformasyonlar veya kavernöz anjiyomlar nedeniyle oluşan kanamalar genelde serebral hemisferin subkortikal beyaz cevherinde yerleşme eğilimindedirler ve hipertansiyon kaynaklı intraserebral kanamalara göre daha küçük hacimlidirler. Genelde küçük arteriyovenöz malformasyonlar veya kavernöz anjiyomlar nedeniyle oluşan kanamalara daha genç hastalarda rastlanır.

Serebral tümörlerin içine kanama nadir görülür ve tüm intraserebral kanamaların %10'undan azını oluşturur. Bu komplikasyona en sık neden olan tümör tipleri glioblastoma multiforme, melanoma veya bronkojenik karsinom ve renal hücreli karsinom metastazları olarak sıralanabilir. Malign beyin tümörüne ikincil intraserebral kanamada prognoz kötüdür.

Hemofili gibi kanama bozukluklarından kaynaklanan intraserebral kanama vakaları da nadir görülür. Bu tür kanamalar genelde 18 yaşından küçük hastalarda gelişir.

Oral antikoagülan tedavisi alan hastalarda intraserebral kanama görülme sıklığı oral antikoagülan tedavi almayan hastalara oranla daha fazladır (24). Ciddi lökoariyozis bulunan hastalarda oral antikoagülanların intraserebral kanama geliştirme yönündeki etkisi daha belirgindir (27). Benzer şekilde serebral amiloid anjiyopati gibi bazı anjiyopatilerin varlığında oral antikoagülanların kullanımı intraserebral kanama riskini artırmaktadır (28).

Akut iskemik inme tedavisinde kullanılan rekombinant doku plazminojen aktivatörü (t-PA) uygulaması, olguların %6.4'ünde intraserebral kanama ile sonuçlanabilir (29). Proürokinaz ile intraarteriyel tromboliz daha iyi klinik sonuç

verir ancak erken dönemde intraserebral kanama geliştirme riski %11 gibi yüksek bir değerdir (30). Trombolitik tedaviye ikincil gelişen kanamalar geçirilmiş serebral infarkt alanında yerleşir. Genellikle geniş hacimlidir ve kötü prognozludur (31). Hem proürokinaz, hem de t-PA uygulaması öncesinde hiperglisemisi olan hastalarda intraserebral kanama gelişme riski hiperglisemisi olmayanlara göre daha yüksek gözlenmiştir (31,32).

Sempatomimetik ajanların kullanımı da intraserebral kanamaya neden olabilir. Kanama sempatomimetik ajanların kullanımının akabinde dakikalar ile saatler içinde gelişebilir. Genelde serebral hemisferin subkortikal beyaz cevherinde yerleşme eğilimindedir. Rapor edilen olguların yaklaşık yarısında geçici hipertansiyon saptanmıştır. Hastaların anjiyografilerinde intraserebral arterlerde tesbih tanesi görünümü saptanmıştır. Anjiyografideki bu görünüm muhtemelen ilaca ikincil multifokal spazm kaynaklıdır. Görünüm olarak vaskülit ile karışabilir, ayırımında histopatolojik inceleme gerekmektedir (33).

Tüm incelemelere rağmen intraserebral kanamaların %20'sinin nedeni belirlenmemektedir (4).

İnaserebral kanamalar yerleşim bölgelerine göre putaminal kanamalar (yaklaşık %35), daha sonra lobar kanamalar (yaklaşık %25), talamik kanamalar (yaklaşık %10-15), serebellar kanamalar (yaklaşık %5-10), kaudat kanamalar (yaklaşık %5), pons kanamaları (yaklaşık %5) şeklinde sıralanabilir. Çok nadir olarak da mezensefalik ve meduller kanamalar görülebilir (5).

Lobar kanamalar sıklıkla arteriyovenöz malformasyon ve özellikle genç hastalarda sempatomimetik ajan kullanımı, yaşlı hastalarda ise serebral amiloid anjiyopati gibi hipertansiyon dışı nedenlerden kaynaklanabilir. Kaudat kanamaların en sık nedeni ise hipertansiyondur. İntraventriküler kanama genelde kaudat, talamik, büyük putaminal ve lobar kanamaların ventriküle açılması şeklinde karşımıza çıkar. İntraparankimal kanama ile birliktelik göstermeyen birincil formu ise çok nadir görülür (24).

2.1.4. Risk Faktörleri

Bir hastalığın oluşmasında yatkınlık yaratan etkenler risk faktörü olarak tanımlanır. İnme için risk faktörlerinin saptanması, koruyucu hekimlik uygulamaları açısından önem arz etmektedir. Bazı risk faktörlerinin değiştirilmesi mümkün değildir. Ancak bir kısım risk faktörleri tıbbi tedavi ve/veya cerrahi uygulamalarla rahatlıkla kontrol altına alınabilmektedir. Tablo 1’de iskemik ve hemorajik inmeli hastalardaki risk faktörlerinin görülme yüzdeleri verilmiştir (4).

Tablo 1. İskemik ve hemorajik inmeli hastalardaki risk faktörleri

	İskemik (%)	Hemorajik (%)
Hipertansiyon	62.4	79.2
Kardiyopati	59.4	22.5
Obezite	50	50.6
Ateroskleroz	41	38.6
Sigara	41	34.9
Horlama	30	30.4
Hiperlipidemi	25	25
Diyabetes Mellitüs	23	11.9
Yüksek hematokrit	17.2	13.8

2.1.4.1 İnme Risk Faktörlerinin Sınıflandırılması

İnme oluşumunu etkileyen risk faktörleri değiştirilemeyen risk faktörleri ve değiştirilebilir risk faktörleri olarak iki ana grupta toplanabilir (Tablo 2).

Tablo 2. İnme risk faktörlerinin sınıflandırılması

1. Değişirilemeyen risk faktörleri	2. Değişirilebilen risk faktörleri	
<ul style="list-style-type: none">• Yaş• Cinsiyet• İrk• Etnik köken• Aile öyküsü /genetik	1)Kesinleşmiş faktörler	2)Kesinleşmemiş faktörler
	<ul style="list-style-type: none">• Arteriyal Hipertansiyon• Diyabetes Mellitüs• Kalp hastalıkları• Hiperlipidemi• Sigara• Asemptomatik karotid stenozu• Orak hücreli anemi	<ul style="list-style-type: none">• Alkol kullanımı• Obezite• Beslenme alışkanlıkları• Fiziksel inaktivite• Hiperhomosisteinemi• İlaç kullanımı ve bağımlılığı• Hormon tedavisi• Uykuda solunum bozuklukları• Fibrinojen• İnflamasyon• Enfeksiyon• Migren• Hiperkoagülabilité

2.1.4.1.1. Değişirilemeyen risk faktörleri

Yaş: İnme insidansı, ilerleyen yaş ile birlikte çarpıcı bir şekilde artış göstermektedir. İnme için en önemli risk faktörünün ileri yaş olduğu söylenebilir (34).

Cinsiyet: Yetmişbeş yaşına kadar erkeklerin iskemik inme geçirme riski kadınlardan daha yüksek iken, yaşam boyu prevalans kadınlarda daha yüksektir (34).

İrk: İskemik inme siyah ırkta, beyaz ırktan daha yüksek oranda görülür. Bu durum diyabetes mellitus ve hipertansiyonun siyah ırkta daha fazla olmasıyla açıklanabilir (34).

Etnik köken: Afrika ve Amerika kökenlilerde inme riski daha yüksektir (34).

Aile öyküsü/Genetik: İskemik inme etyolojisi multifaktöryeldir. Hem paternal hem maternal inme öyküsü, kişide inme riskinin artması ile ilişkili bulunmuştur (35). Bunlar aile bireylerinin benzer kültürel/çevresel ve yaşam stili faktörlerini paylaşması, bazı genetik özellikleri taşımasından kaynaklanıyor olabilir (36). Klasik herediter geçiş gösterilememişse de yakın zamanda yapılan çalışmalar kuvvetle genetik faktörlerin önemine dikkat çekmektedir. Monozigotik ikizlerde inme riski, dizigot ikizlere göre daha yüksektir (34). Serebrovasküler hastalıkların patolojisinin

ve tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde kullanılan biyolojik çalışmalar DNA, RNA ve proteinler arasındaki ilişkilerin ve fonksiyonların araştırılması temeline dayanmaktadır. Her gen bir veya daha fazla protein için kod taşımakta ve fenotipi belirlemeye katkı sağlamaktadır. DNA yapısındaki varyasyonlar insanlar arasındaki fenotipik farklılıklara neden olmaktadır. Bu genomik değişikliklerin kimi zaman çok büyük farklılıklara sebep olduğu, kimi zaman da yalnızca etkilerinin görüldüğü bilinmektedir. Bireyler arasındaki hastalıklara karşı farklı yatkınlık durumlarının bazı genlerde ortaya çıkan varyasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir (37,38).

Homosisteinin siklik tioesteri olan homosistein thiolactonun ateroskleroz ve tromboz oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (39). Hiperhomosisteinemi doğumsal bir metabolizma hastalığıdır. Hem arteriyel hem de venöz tromboza neden olabildiği gösterilmiş tek kalıtsal trombofili nedenidir (40). Hiperhomosisteinemi homosistein metabolizmasında remetilasyon veya sülfürasyonda rolü olan enzimlerin bozukluğuna bağlı olarak gelişebilir. En sık sistationin-B sentaz (CBS) ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) genlerini etkileyen mutasyonlar sonucu görülür (40). Sistationin-B sentaz enzim eksikliği otozomal resesif geçişlidir. Homozigot formu ciddi hiperhomosisteinemiye neden olur. Erişkin yaşta görülen inme gelişiminde CBS enzim eksikliğinin MTHFR gen mutasyonundan daha az etkili olduğu düşünülmektedir (41,42). Hiperhomosisteineminin önemli bir diğer nedeni de MTHFR enziminin eksikliğidir (43). MTHFR homosisteinin metionine metilasyonunda hız kısıtlayıcı basamağı katalizleyen folat bağımlı bir enzimdir (44). MTHFR genindeki fonksiyonel polimorfizmler azalmış enzim aktivitesinin yaygın bir nedenidir. Populasyonun %15-20'si, MTHFR C677T veya A1298C varyantlarının biri açısından heterozigottur (45). MTHFR geninin C677T ve A1298C mutasyonlarının total plazma homosistein seviyesi üzerine artırıcı etkileri mevcuttur. Yükselmiş plazma homosistein düzeyi ile MTHFR gen mutasyonları arasındaki birliktelik serum folat düzeyine bağlıdır (46,47). Yapılan çalışmalarda Türk populasyonunda inme hastalarında MTHFR C677T homozigot mutasyon prevalansı yüksek bulunmuştur (48). Türk toplumunda MTHFR C677T heterozigot mutasyon sıklığı %47.4 iken MTHFR C677T homozigot mutasyon sıklığı %9.6 olarak saptanmıştır (49). MTHFR A1298C homozigot mutasyonun plazma homosistein

konsantrasyonundaki artışa etkisinin C677T homozigot mutasyonu kadar etkili olmadığı düşünülmektedir (50).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) epitelyal ve endotelyal hücrelerin yüzeylerinde yaygın olarak dağılım gösteren, anjiyotensin I'i anjiyotensin II'ye dönüştürüp, vasküler hipertrofi ve vazokonstrüksiyon yaparak aterosklerotik sürece dahil olur. Ayrıca ACE, nitrik oksit üretimini stümüle ederek vazodilatatör etki gösterdiği kabul edilen bradikininin indirgenmesinden de sorumludur (51). ACE geni 26 ekzondan oluşur, 17. kromozom üzerinde 21 kb'lık yer kaplar ve 1306 aminoasitli bir protein kodlar. Bu dizide sık görülen intron 16'da 287. baz eşleşmesinde tekrar dizisi varlığı (I aleli) veya yokluğu (D aleli) ile oluşan polimorfizm mevcuttur (52, 53). ACE enzimin genetik polimorfizmi ACE aktivitesinde belirleyici rol alır. ACE D/D geni taşıyanlarda ACE aktivitesinin %56 oranında arttığı gösterilmiştir (54). Anjiyotensin dönüştürücü enzimin I/D gen polimorfizminin değişik etnik gruplarda miyokard infarktüsü, inme, diyabetik nefropati ve hipertansiyon gibi bir takım hastalıklar için risk faktörü olduğu öne sürülmüştür, ama çalışmalar sonucunda elde edilen veriler bu düşünceyi desteklememektedir (55). Türkiye'de yapılan bir çalışmada da ACE I/D polimorfizminin, iskemik inme gelişiminde genetik risk faktörü olmadığı yönünde sonuçlar elde edilmiştir (52).

Lipoproteinlerin plazma düzeyleri ve metabolik hızları yüzeylerinde bulunan apolipoproteinler tarafından kontrol edilmektedir (56). Genetik faktörler lipoprotein düzeyini etkileyerek aterosklerozun oluşumunda önemli bir rol oynar. Bir lipoprotein bileşeni olan protein yapısındaki Apolipoprotein E (Apo E) düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörleri için ligand olarak görev yapar, şilomikronların ve çok düşük dansiteli lipoproteinlerin (VLDL) taşınmasında rol oynar (57). ApoE'nin yapı ve işlevindeki değişiklikler lipoprotein konsantrasyonunu etkiler. Apo E başlıca karaciğer tarafından sentezlenmekle birlikte diğer plazma proteinlerinden farklı olarak santral sinir sisteminde astrositler, schwann hücreleri ve oligodendrositler tarafından da sentezlenir (58). Apo E geni 19. kromozomun 19q13.2 bölgesinde loaklizedir (59). Apo E geni polimorfiktir; $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ olmak üzere üç alele sahiptir ve bu aleller $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotiplerini oluşturur. Sonuçta E2, E3, E4 diye isimlendirilen üç tane izomorfik protein açığa çıkar (58). Her üç fenotipin ateroskleroz riski açısından diyet ve çevreye yanıtları farklıdır. Apo E3-E4

polimorfizmlerinin lipid profilinde neden olduğu değişiklikler ve okside LDL ile olan muhtemel bağlantısının aterosklerotik kalp hastalığına yatkınlık sağladığını düşündüren çalışmalar (56) olmakla birlikte, hemorajik ve iskemik inme geçirmiş hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada Apo E polimorfizmlerinin kontrol grubuna göre farklı olmadığı gösterilmiştir (60).

Apoprotein A1 ve apoprotein B yapısını etkileyen bazı mutasyonlar sonucu LDL kolesterol dolaşımından temizlenemez. Artmış kolesterol değerleri ateroskleroza neden olur. Lipoprotein lipaz (LPL) dolaşımda trigliseridlerin hidrolize olmasını sağlar. Hepatik lipaz genindeki mutasyonlar Hepatik lipaz düzeylerini etkileyerek HDL'yi regüle eder ve kişinin aterosklerotik damar hastalığına olan eğilimi belirler. Lupus antikoagulanı ve antikardiolipin antikorları yaklaşık %10 olguda ailesel olabilir (61).

Birçok koagülopati otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır (24). Faktör V Leiden (FVL) mutasyonu, protein C, protein S eksikliği ve diğer faktör eksiklikleri venöz tromboz riskini arttırmaktadır (62,63). Pıhtılaşma faktörleri (örn; faktör V, VII, VIII, X, XI ve XIII) otozomal resesif olarak kalıtılır ve yenidoğan ve çocukluk döneminde intrakranial kanamalara yol açabilir (62). Türkiye'de yapılmış bir çalışmada heterozigot Faktör V Leiden mutasyonu prevalansı %7.1 olarak bulunmuştur (64). Faktör V'in %80'i plazmada %20'si trombositlerde bulunur (65). Faktör V geni 1. kromozomdadır (1q21-25). Genin 10. ekzonun 506. kodonunda Arginin'in Glutamin'e değişimi sonucunda Faktör V Leiden mutasyonu oluşur. Faktör V Leiden mutasyonu, Faktör Va'nın aktive protein C tarafından inaktivasyonunu engellemektedir (66). Sonuçta tromboza eğilim artmaktadır (67). Bazı çalışmalarda inme için risk faktörü olarak belirtilmiş olmasına rağmen başka çalışmalarda bu ilişki doğrulanmamıştır (65,68). Faktör V Leiden mutasyonu olan aktive protein C rezistansının inme etyolojisinde önemli olmadığı, buna karşılık Faktör V Leiden mutasyonundan bağımsız aktive protein C direncinin inmede önemli olduğu görüşü ağırlık kazanmıştır (69).

Plazma fibrinojen değerleri yeni tanımlanmış risk faktörlerden olup artmış düzeyleri aterosklerotik inme riskini arttırmaktadır. Fibrinojen düzeyleri sıkı genetik kontrol altında olmasına rağmen, çevresel faktörler de plazma düzeyini çok etkiler.

Yapılan çalışmalarda kanda artan fibrinojenin iskemik kalp hastalıkları, miyokard infarktüsü, inme, venöz tromboz ve periferik arter hastalığı için bir risk faktörü oluşturduğu gösterilmiştir (70,71). Plazma fibrinojen seviyeleri yaş, cinsiyet, genetik ve hormonal faktörler (obezite, diabetes mellitus, hiperkolesterolemi) oral kontraseptif kullanımı ve sigara içimi gibi fiziksel etmenlerle değişmektedir (72,73). Artmış olan fibrinojen endotel hücreleri ve subendotelial kollajen kümeleşmesiyle birlikte trombosit agregasyonunda artışla birlikte diğer risk faktörlerinin eşliğinde tromboza eğilimi artırmaktadır. Fibrinojen kan seviyelerindeki artışa yol açan genetik bozukluklar içerisinde en sık β subüniyle ilgili gen polimorfizmleri bulunmaktadır. β -Fibrinojen gen polimorfizmiyle ilişkili olarak yaklaşık 10 mutasyon tanımlanmış olmakla birlikte vasküler patolojide rolü daha iyi anlaşılmış olan β -Fibrinojen -455G/A (β Hae III) gen polimorfizmidir (72,73). Humphries ve ark. plazma kan fibrinojen konsantrasyonları ile β -Fibrinojen gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi incelemişler ve en fazla artışı-455G/A gen varyantında bulmuşlardır (73). Daha sonra yapılan geniş vaka kontrol çalışmalarında özellikle miyokard infarktüsü başta olmak üzere iskemik kalp hastalıkları ile plazma fibrinojen seviyeleri arasında anlamlı ilişki bulmalarına rağmen (73,74), ilişki bulmayan çalışmalarda vardır (70).

Protrombin karaciğerde K vitaminine bağımlı olarak sentezlenen bir proteindir ve trombinin öncülüdür. Protrombin geninin 20210 pozisyonundaki guanin bazının adenine değişimi sonucunda G20210A mutasyonu protrombin sentezini mRNA ve protein sentezi düzeyinde artırarak plazma protrombin miktarını çoğaltır (75). Protrombin G20210A mutasyonu normal kontrollere göre % 30 daha fazla serum protrombin seviyelerine neden olur (76). Protrombin G20210A mutasyonunun sıklığı trombozlu hastalarda %6.2 iken sağlıklı popülasyonda %2.3'dür. Bu mutasyonun miyokard infarktüsü ve inme için risk faktörü olduğuna dair veriler yetersizdir ve bu konu hâlâ tartışılmaktadır (77,78,79).

Fibrinolitik (plazminojen) sistem normal hemostaz ve tromboz gelişimi arasında kilit rol oynar. Plazminojen aktivator inhibitor-1 doku ve ürokinaz kaynaklı plazminojeni hızlı ve güçlü şekilde inaktive eder. Plazminojen aktivator inhibitor-1 karaciğerde ve vasküler endotelde üretilir, ayrıca aktive olmuş trombositlerden de salgınır. Bu faktör endotele veya fibrine bağlanıp lokal fibrinolizisi sınırlandırır.

Düzeşinin arttığı durumlarda ise plazminojen aktifleşemeyeceği için tromboza eğilim olur. Plazminojen aktivator inhibitör-1 geni 7. kromozomdadır (7q21.3-q22) (80). En sık rastlanan PAI-1 gen polimorfizminin genotip analizlerinde PAI-1 geninin promotor bölgesinin 675. pozisyonunda Guanin nükleotidinin insersiyon (5G) / delesyon (4G)'u ile ilişkili bulunmuştur (80). Bu durumda artmış PAI-1 mesajcı RNA salınımı ile dolaşımda PAI-1 protein düzeyleri yükselmektedir. Miyokard infarktılı, inmeli ve diyabetli hastaları içeren çalışmalarda artmış PAI-1 aktivitesinin azalmış fibrinolitik aktiviteden sorumlu olduğu gösterilmiştir (80). Plazminojen aktivator inhibitör-1 4G/4G ve 4G/5G varyantlarının diğer kalıtsal trombofilik nedenleri kadar etkili olmasa da trombozlu olgularda daha sık saptandığı bildirilmiştir (81).

Birincil hemostazın etkin olabilmesi için gereken aşamalar trombosit adezyonu, trombosit sekresyonu ve trombosit agregasyonudur. Adhezyon ve agregasyonda görev alan glikoproteinler içerisinde en önemlileri GPIIIa (HPA-1), GPIb (HPA-2), GPIIb (HPA-3) ve GPIa'dır (HPA-5) (82). GP IIIa geni 17. kromozomdadır (17q21) (83). GPIIIa A1/A2 polimorfizminde 1565. pozisyonadaki timin ile sitozin yer değiştirmesi ile sentezlenen proteinde 33. pozisyonunda lösin yerine prolin aminoasit değişikliği olur. Farklı inme nedenleri ayırt edilmeden yapılmış bazı çalışmalar inme ile A2 aleli arasındaki ilişkiyle ilgili olarak negatif sonuç vermiştir (84). Yapılan çalışmalar artmış A2 aleline sahip olanlarda koroner arter hastalığı, miyokard infarktüsü ve stent takılmış hastalarda restenoz riskinin yüksek olduğunu göstermiştir (85).

Arterial disseksiyon, Moya moya sendromu ve fibromusküler displazi vakalarının %10-20 kadarı genetik ve ailesel özellik taşımaktadır (86,87). Genetik çalışmalar çeşitli haplotip tipleri ile inme arasında ilişkinin olabileceğini ortaya koymakla birlikte, henüz patojenik olabilecek bir mutasyon bulunmamıştır. Nadir genetik hastalıklarda da inme görülebilmektedir. Bunlar arasında Tangier hastalığı (ABCA1 mutasyonu), CADASIL, Marfan sendromu, Fabry hastalığı, Nörofibromatözis Tip I ve II'de artmış inme riski bulunmaktadır (88,89). Genetik faktörler için henüz spesifik bir gen tedavisi mümkün olmadığı için, değiştirilemez risk faktörleri arasında yer almaktadır. Ancak önümüzdeki dekadlarda gen tedavisi

üzerindeki çalışmalar bu faktörün değiştirilemez olduğu konusunda tartışmaları da birlikte getirecektir.

Yapılan tüm çalışmalarda inmenin genetik temeli olmakla birlikte, tek bir “inme geni”nin sorumlu olmadığını ve çevresel faktörlerle ilişkisinin önemli olduğunu göstermektedir.

2.1.4.1.2. Değiştirilebilen risk faktörleri

2.1.4.1.2.1. Kesinleşmiş risk faktörleri

Arteriyal hipertansiyon: Kronik hipertansiyon, inme için primer risk faktörüdür ve aterosklerotik süreci hızlandırdığı düşünülmektedir. İnme riski, sistolik ve diyastolik kan basıncı değerlerinin artışıyla orantılı olarak artar. Yaşlılarda izole hipertansiyonun tedavisi inme insidansında %36 oranında azalma sağlayabilir (90).

Diabetes mellitus: Diyabet hastaları veya oral glukoz tolerans bozukluğu olanlarda inme riski artmıştır. Aterosklerotik hastalığı olanlarda inme insidansı, diyabet varlığında, diabeti olmayanlara göre iki kat artmaktadır (91).

Kalp hastalıkları: Kalp hastalıkları inme için tedavi edilebilir önemli bir risk faktörüdür. Akut miyokard infarktüsü, özellikle ilk günler veya takip eden haftalarda, intrakardiyak mural trombus nedeniyle serebral emboliye sebep olabilir. Atriyal fibrilasyonun, romatizmal kalp hastalığı ve mitral stenoz ile birlikte inme için önemli birer predispozan faktör oldukları bilinmektedir (92).

Hiperlipidemi: Total kolesterol / HDL kolesterol oranına bakıldığında miyokard infarktüsü için, hem erkek hem de kadınlarda doğru orantılı bir artış görülürken, benzer oranlar aterotrombotik beyin iskemisi için de geçerlidir (93).

Sigara: Sigaranın serebrovasküler hastalık riskini arttırdığı iyi bilinmektedir. Bu risk artışı sigara kullanan ve beraberinde hipertansiyon ve/veya diabetes mellitusu olan hastalarda çok daha belirgindir (94).

Asemptomatik Karotis Stenozu: %50'den fazla asemptomatik karotis stenozu, 65 yaş üzeri erkeklerde %7-10, kadınlarda %5-7 dir. Bu vakalarda yıllık inme riski %1-2 dir (95). Özellikle stabil darlıklara göre hızlı progresyon gösteren darlıklarda bu risk daha yüksektir.

Orak Hücreli Anemi: Prevalansı düşük olan bu hastalıkta inme riski çok yüksektir. 20 yaşına kadar inme prevalansı %11'dir (96).

2.1.4.1.2.2. Kesinleşmemiş risk faktörleri

Alkol: Aşırı alkol kullanımı hızlanmış aterosklerozla birlikte, bu da inme insidansında artışa yol açar (97).

Obezite: Obesitesi olan hastalarda hem hipertansiyon hem de diabetes mellitus sık görülür. Obesitenin hızlanmış ateroskleroza yol açan bağımsız bir faktör olduğu gösterilmiştir (34).

Beslenme Alışkanlıkları: Diyetteki yağ miktarı, çeşidi ve balık tüketimi ile koroner arter hastalıkları arasında ilişki bulunmakla birlikte, inmeyle ilişkileri çelişkilidir. Nurses Health Study ve Health Professionals Follow-Up çalışmalarında, en fazla sebze ve meyve tüketen grupta relatif inme riski 0.69 olarak bulunmuştur.

Fiziksel inaktivite: Orta ve yüksek düzeyde fiziksel aktivitenin inme riskini azalttığına yönelik kanıtlar ortaya konmuştur (98,99). Bu azalma bilinen risk faktörlerinin yanısıra, fibrinojen düzeyinin azalması ve plazma Tpa ve HDL kolesterol seviyesinin artışına bağlı olabilir.

Hiperhomosisteinemi: Serum homosistein düzeyinde yükselme özellikle çocukluk çağında ve genç erişkinlerde inme için bilinen bir risk faktörüdür (100).

İlaç kullanımı ve bağımlılığı: İnmeyle en çok ilişki kurulan madde kokaindir (101). Diğer ilişkili olabilecek maddeler eroin, amfetaminler ve marihuana gibi maddelerdir. Bu maddelerin kullanımının hem iskemik hem hemorajik inmeye yol açtığı bilinmekteyse de, bu konuda geniş epidemiyolojik çalışmalar mevcut değildir. Sınırlı çalışmalarda inme riskinin 7 kat arttığı bildirilmektedir.

Hormon tedavisi: Oral kontraseptiflerin inme riski, içeriklerindeki estradiol miktarı ile ilişkili olup, 50 mikrogramdan fazla estradiol içeren ilk jenerasyon ilaçlarda bu risk yüksektir. Son zamanlarda kullanılan düşük estradiollu ve kombine preparatlarla yapılan çalışmalarda ise iskemik ve hemorajik inme riskinde hafif artış gözlenmiştir (102).

Fibrinojen: Serum fibrinojeni, diğer risk faktörleri ile birlikte aterogenezis sürecine ve arteriyel trombus oluşumuna katılmaktadır (103).

İnflamasyon: İskemik inmenin en önemli nedeni aterosklerozdur. Aterosklerozun belirgin olduğu bölgelerde ve aterom plağının gelişimi süresince, çeşitli uyarılar karşısında endotel hücrelerinden; P-selektin, E-selektin, intrasellüler adezyon molekülü (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) eksprese olur. Bunlar lökosit adezyonunu başlatırlar. Monositler ve T hücreleri, eksprese olan adezyon moleküllerine bağlanarak, damar hasarını arttıracak sitokinleri ve proteolitik enzimleri sekrete ederler. Bu şekilde aterosklerotik plağın fibröz kapsülde degradasyon meydana gelir ve plak rüptürü gerçekleşir. Aterosklerotik karotis plaklarında chlamydia pneumoniae adlı bakterinin bulunması plak destabilizasyonunda enfeksiyonun rolünü göstermektedir (104). Ayrıca iskemik inme geçirenlerde akut faz reaktanlarından C-reaktif protein ve serum Amiloid A yüksek olarak bulunmaktadır.

Hiperkoagulibite: Protein C ve S eksikliği, APC rezistansı (105,106), Antitrombin III eksikliği (107) ve protrombin 20210 mutasyonu, yüksek Tpa (108) daha çok venöz tromboza yol açmakla beraber (109) iskemik inmeyle de ilişkilidirler. Antifosfolipid antikorları da özellikle gençlerde rekürren inmelerden sorumlu tutulmaktadır (110). Yüksek Tpa, fibrin D-dimer, von Willebrand faktör ve faktör VIIIc'nin inme risk faktör olduğuna ilişkin bazı çalışmalar bulunmakla beraber bu konuda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yukarıda sayılanlardan başka Arkus aortada aterom plağı, uykuda solunum bozuklukları, enfeksiyon, migren, geçirilmiş inme öyküsü, oral kontraseptif kullanımı, yüksek serum folat düzeyi ve yüksek antikardiyolipin antikor düzeyi de inme insidansını arttıran risk faktörlerindedir (111).

2.2. Temel Genetik Kavramlar

Gen; DNA dizisinde 5'-3' yönünde uzanan, bir promotör ve sonlanma bölgesi olan, ekzon ve intron gibi bölünmüş yapılardan oluşan, olgun bir mesajcı ribonükleikasite (mRNA) dönüştürülebilir ve fonksiyonel olarak aktif bir protein ürününe çevrilen kromozomal DNA parçalarına denilmektedir. İnsan genomu 3 milyar baz çifti (base pair; bp) nden oluşmaktadır ve sadece %1.5-2'lik kısmı protein kodlamaktadır (112). Gen de bulunan intronik parçalar ekzonlardan ayrılmakta ve bu ekzonlar protein

ürününü oluşturacak olgun mRNA adı verilen asıl diziyi oluşturmaktadır. DNA'nın transkripsiyonu sonrası oluşan ve olgun mRNA'da bulunmayan intronlar, primer transkriptten kesilerek atılan genin kodlayan kısımları arasında kalan gen bölgeleridir (113). İtronlar tüm genomik DNA'nın %25'ini oluşturmaktadır. İtronların varlığı bir genin ekzonlarının farklı kombinasyonlarda birleşmesini ve böylece aynı genden farklı protein sentezlenmesine olanak sağlamaktadır. Düzenleyici bölgeler veya transkripsiyon faktörleri içermekte olan intronlarda görülen polimorfizmler genin ekspresyon düzeyini de etkilemektedir (114). İtronlar konumlarına göre 3'e ayrılmaktadır. Faz 0; 2 kodon arasında bulunan intronlara denmekte ve %50 oranında görülmektedir. Faz 1; Kodonun 1. ve 2. nukleotidi arasında olan intronlara denmekte ve %30 oranında saptanmakta iken faz 2 intronu kodonun 2. ve 3. nukleotidleri arasında yer almakta ve %20 oranında saptanmaktadır (113). Promotor bölgesi Genin 5' ucu tarafında 90 ile 100 bp içinde yer alan kısa ve spesifik DNA dizileridir. Promotor bölgeleri, promotorun kendisi de dahil olmak üzere genellikle birkaç yüz nukleotid uzunluğunda ve transkripsiyonun başlaması için çok sayıda proteinin bağlandığı ve çok sayıda elementten oluşan bölgelerdir (114,115). TATA kutusu promotor bölgesinin ilk bileşenidir. RNA polimerazın bağlandığı dizidir. Bu dizi genin 25–30 baz öncesinde yer alan ve genellikle GC bakımından zengin dizilerin yer aldığı bir bölge olup sadece AT'den oluşan 8 bp uzunluğunda bir dizidir (114,115). Promotor bölgesinin diğer bir bileşeni olan CAAT kutusu başlama noktasından 70-80 bp yukarısında olup 5'→3' veya 3'→5' yönünde işlev görebilirler (110). Bu bölgede yer alan bir diğer önemli dizi ise GC kutusu olarak adlandırılan ve -110 bölgesinde yer alan G ve C'den zengin bölgelerdir. Transkripsiyon faktörlerini kendilerine bağlamakta ve enhansır rolü oynamaktadırlar (37,114).

Bütün genlerin ekspresyonları, enhansırlar tarafından kontrol edilmekte olup bu bölgeler, transkripsiyon faktörleri için bir bağlanma bölgesi içeren ve 100–200 bp uzunluğunda düzenleyici DNA bölgesidir (114). Başlıca fonksiyonları transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek transkripsiyonun başlama kapasitesini arttırabilmek ya da promotoru aktif hale getirebilmektir (116). Enhansırlar; promotorlardan farklı olarak farklı uzaklıklarda bulunabilir. Transkribe edilecek genin 5' ucunda (promotorun yukarı bölgesinde) veya son ekzonun 3' ucunda olabileceği gibi promotor

bölgelerinin aşağı ucunda yani bir intron içinde yer alabilmektedir (116). Burada enhansır kodlayıcı iki bölge arasında bulunan bir intronda bulunmaktadır (115,116).

Bir toplumda %1 den daha fazla görülen ve tekrarlayan mutasyonlarla desteklenmesi mümkün olmayan birden fazla alternatif genotipin olmasına DNA polimorfizmi denir (115,117). DNA dizisindeki tek baz değişimi, delesyonu, duplikasyonu veya insersiyonu sonucu oluşabilmektedirler. Bu değişimler her zaman protein yapısında veya işlevinde değişikliğe yol açmamaktadır (117,118).

Restriksiyon endonükleaz enzimleri tarafından DNA dizilerindeki polimorfik değişikliklerin belirlenmesine RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) denir. RFLP, daha çok tek baz değişimi ile olmaktadır. Yeni enzim kesim bölgeleri delesyon veya insersiyon sonucunda oluşabilmektedir (119,120). Toplumda % 1 ile en sık görülen polimorfizm, tek baz değişiminin olduğu 'single nucleotide polymorphisms; SNP'lerdir. SNP sıklığı genel olarak 1000 bazda 1 olarak verilse de bu oran protein kodlayan bölgeler için 2500'de 1'e kadar düşmekte ve böylece bu bölgeler evrim boyunca çok iyi korunmuş kalmaktadırlar. SNP'lerin çoğu belirli pozisyonlarda bulunan ve iki farklı baz içeren iki alele sahiptir. Bu polimorfizmler, genin biyolojik işlevini veya ekspresyon hızını değiştirebilmektedir(120).

Bir gen bölgesi içerisinde aynı dizinin ardı ardına girişi sonucu görülen polimorfizme 'Variable Number Tandem Repeat' (VNTR) polimorfizmi adı verilir ve bunlar içerdikleri baz sayısına göre satellit, minisatellit ve mikrosatellit olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Toplam uzunluğu 100 kb ile 1 Mb arasında olan satellitlere bütün kromozomların sentromerinde yer alan ve 171 bazın tekrarından oluşan alfa satellitler örnek verilebilir. Minisatellitler, 9-24 bazın tekrarından oluşmakta ve toplam olarak 0.5 ile 30 kb arasında bir uzunluk oluşturabilmektedir. Minisatellitler genellikle genin kodlamayan bölgeleri olan intronlarda yer almaktadır. En fazla 6 bazın ardışık tekrarıyla oluşan mikrosatellitlerin toplam büyüklüğü 100 baz kadar olmaktadır (115). Promotor bölgesinde olanlar genellikle transkripsiyon düzeyinde etki yaparken kodlamayan DNA bölgelerinde ve intronlarda yer alan polimorfizmlerinin etki mekanizması henüz bilinmemektedir (115). Genlerde görülen ve sıklıkla promotör bölgede yer alan tek nükleotitlik polimorfizmler, genlerin ürünü olan proteinlerin düzeyi, değiştirmektedir (121). Örneğin bir çok hastalığın *PON* gen polimorfizmi ile ilişkisini gösteren ve *PON* serum düzeyini

etkileyen polimorfizmler hastalığın şiddetini anlayabilmemizde yardımcı olmaktadır (122). Yine bazı çalışmalarda hem in vitro hem de in vivo olarak polimorfizm sonucu gen ekspresyonunun ve *PON* sekresyonunun değiştiği gösterilmiştir (122).

Gen polimorfizmlerinin saptanmasında günümüzde en sık klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmaktadır. PCR, bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan in vitro DNA sentezi yöntemidir (123). Yöntemde, çoğaltılmak istenen bölgenin iki tarafına özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayan, ortalama 20-22 baz uzunluğunda bir çift oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin sentezlenmesine dayanmaktadır (123). Kalıp olarak kullanılan DNA örneği, bir çift primer; deoksiniükleotit-trifosfatlar (dNTP); DNA polimeraz enzimi; pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon karışımı gibi beş ana maddenin karışımı ile PCR döngüsünden ürün elde edilmektedir (124).

Primer; ideal olarak 18-24 bp boyutunda, baz içeriği dengeli olan oligonükleotid dizileridir. Baz içeriklerine göre hesaplanan erime dereceleri (T_m) birbirine yakın olmalıdır. Bağlanma derecesi T_m 'den 5 °C düşük olarak seçilmelidir (124).

DNA polimeraz enzimleri; kalıp DNA zincirine uygun olarak dNTP'den uzun DNA zincirinin sentezini katalize ederler. Günümüzde yaygın olarak kullanılan, optimal sıcaklıkta yaklaşık 1500-2000 nükleotiti zincire ekleyebilen Taq DNA polimeraz enzimi, kullanılmaktadır (125). Taq polimeraz, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen DNA polimeraz enzimidir. *Thermus aquaticus*, termofilik bir bakteridir. Kaplıca ya da jeotermal bölgelerde yaşar. Taq polimeraz enzimi, PCR'da kullanılan, yüksek sıcaklıklara (94°C) dayanabilen bir enzimdir (125).

PCR üç basamaklı bir döngüdür. İlk basamak olan denatürasyonda, DNA'nın iki zinciri yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılır. Sonraki basamakda hedef DNA'ya oligonükleotidlerin bağlanması sağlanacak ve DNA polimeraz için serbest 3'OH ucu oluşturduğu basamaktır. Üçüncü basamakda ise zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması aşamasıdır. PCR ile yaklaşık 25-35 döngü sonra istenilen DNA dizisinin kopyalanarak çoğaltılması sağlanmaktadır (123).

Elde edilen DNA'nın enzimatik kesilmesi birçoğu bakterilerden elde edilen restriksiyon endonükleazlar kullanılarak yapılır. Bu enzimler çift iplikli sarmal

DNA'da özgül bir diziyi tanıyarak her iki ipliğinden kesebilen enzimlerdir (37,124). Enzimler genelde vucut ısısı olan 37 °C'de aktivite göstermekte, mevcut DNA'nın tamamen kesilmesi için DNA ürünü ve enzim karışımının inkübasyonu gerekmektedir. RFLP yönteminde enzim kesimi sonrası ortaya çıkan farklı uzunluktaki parçalar, jelde koşturulduktan sonra görüntüleme analizleri ile değerlendirilmektedir (123).

Jel elektroforezi negatif elektron yüklü moleküllerin pozitif yüklü uca doğru koşturulması ile, jel matriks içerisinde büyüklüklerine göre ayrılması tekniğidir. Genomik DNA, %2-3'lük bir jelde etidyum bromür ile karıştırılarak elektroforeze tabi tutulur. Etidyum bromür DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorblaması sonucu floresan etki göstermesi ile DNA içeriğinin görünür hale gelmesini sağlamaktadır. Yürütülmesi tamamlandıktan sonra jelin fotoğrafı UV ışığı altında çekilir ve değerlendirmeye alınır (37).

2.3. Ateroskleroz

İskemik inmenin en yaygın nedeni aterosklerozdur (126). Ateroskleroz damar endotelinin hasara uğraması neticesinde ortaya çıkmaktadır. Ateroskleroz risk faktörleri ve endotel disfonksiyonunun sebepleri; erkek cinsiyet, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diabetes mellitus, sigara, obezite, fiziksel aktivite, yaş, aile öyküsü, yükselmiş ve modifiye olmuş LDL, genetik yatkınlık, yükselmiş plazma homosistein konsantrasyonu; herpes virusler ve C. pneumoniae gibi enfeksiyöz mikroorganizmalar gibi faktörler veya bunların kombinasyonu yer alır (127). Yaşamın ilk yıllarından itibaren bu risk faktörleri kontrol altına alınabilirse ateroskleroz ve komplikasyonları azaltılabilir (128,129).

Bu değişiklikler endotelin lipoproteinlere geçirgenliğinde artış (nitrik oksit, prostasiklin, trombosit benzeri büyüme faktörü, anjiotensin ve endotelin aracı olur), lökosit adezyonu (L-selektin, integrin ve trombosit endotelial hücre adhezyon molekülü-1 aracı olur), endotel adezyonu (E-selektin, P- selektin, hücre içi adezyon molekülü-1 ve vasküler hücre adhezyon molekülü-1 aracı olur) ve arter duvarına lökosit migrasyonunu (okside düşük dansiteli lipoprotein, monosit kemotaktik

protein-1, interlökin-8, trombosit benzeri büyüme faktörü, makrofaj koloni uyarıcı faktör ve osteopontin aracı olur) içerir (127).

Enflamatuar hücrelerin serebrovasküler damarların 'subendotelyal' veya 'perivasküler' alanları içine giriş nedeni belirgin olmamasına rağmen, bu hücreler sistemik enflamatuar yanıt süresince proliferatif ya da proteolitik maddelerin salınımıyla endotel hücrelere ve düz kas hücrelerine güçlü bir şekilde geçerler. Daha sonra hücreler (makrofaj/monosit kök hücreleri, T-lenfositleri) reseptör aracılığıyla uyarılmakta ve hormonal sistem de aktive olarak interlökin, tümör nekrozis faktör alfa, interferonlar, büyüme faktör-beta gibi enflamatuar mediatörlerin salınımıyla enflamatuar süreci başlatırlar. İnme risk faktörleri ile oluşan enflamasyon, büyük arter duvarında intimal kalınlaşmaya ve ateromatöz plak oluşumuna; küçük arteriyollerde ise lokal trombüs oluşumuna neden olur (128).

Damarın intima tabakası, aterosklerotik lezyonların geliştiği yerdir. Aterosklerotik lezyonlar iki farklı tipte gelişebilir. Klinik hasar oluşturan tipinde, genellikle intimada asimetrik bir kalınlaşma vardır. Bu lümeni daraltarak kan akımını azaltır. İntimada kalınlaşmanın arterial dilatasyon ile birlikte olduğu diğer bir lezyon tipinde ise arter lümen çapında önemli bir değişiklik olmaz ve klinik hasar nadirdir. Ateroskleroz lezyonları üç farklı aşamada oluşur:

1. Yağlı çizgi

2. Fibröz plak

3. Komplike lezyon

1. Yağlı çizgi, her yaşta görülebilen, ilk oluşan aterosklerotik lezyondur (130). Makroskobik olarak lümeneye doğru kabarıktır ancak obstrüksiyon oluşturmaz. Sarı renkte görülürler. Başlangıçta T lenfositlerle birlikte lipid yüklü makrofaj (köpük hücre) ve monositlerden oluşmakta, daha sonra yapısına değişik sayıda düz kas hücresi katılmaktadır.

2. Fibröz plak, arterin kalınlaşmasına ve sıklıkla lümenin obstrüksiyonuna neden olur. Fibröz plak kabarıktır ve soluk gri renkte görülür. En dışta endotel hücreleri, altında düz kas hücreleri, makrofajlar ve T lenfositler yer alır. Makrofaj koloni stimülan faktör, monosit kemotaktik protein-1 ve okside olmuş LDL'ler makrofaj birikimine neden olan temel faktörlerdir. Lipid birikimi ve proteolitik aktiviteyi içeren apoptozis ve nekrozis, nekrotik çekirdek oluşumuna neden olur. OsteoPONTin,

tümör nekrozis faktör-alfa, interlökin-1, dönüştürücü büyüme faktörü-beta ve trombosit benzeri büyüme faktörü aktivasyonu ile fibröz kapsül oluşur (127). Mediadan intimaya çekilen düz kas hücreleri bir fibröz başlık oluşturmak üzere dizilirler. Böylelikle, lümendeki kan ile lezyonun merkezindeki lipid çekirdeğini birbirinden ayırırlar (127).

3. Komplike lezyon, yaygın dejenerasyona ve çoğunlukla kalsifikasyona uğrayan fibröz plaktır. Ülserasyonlar ve yırtılmalar plak yüzeyine trombositlerin tutunmasına, bunların agregasyonuna ve trombüs oluşmasına neden olur. Trombüs damarın aniden tıkanmasına yol açabilir (127).

2.3.1. Ateroskleroz ve *Paraoksonaz*

Son yıllarda yapılan çalışmalar, HDL'nin üzerinde bulunan Ca^{+2} 'a bağlı enzim olan *paraoksonazın*, okside olmuş lipidlerin metabolizmasında ve aterosklerozdan korumada önemli fizyolojik rolü olduğu yönündedir (131). HDL'nin antioksidan etkisinin kısmen HDL ile ilişkili enzimlere bağlı olabileceği düşünülmekte, özellikle *paraoksonaz (PON)* ve *platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz (PAF-AH)* enzimleri üzerinde durulmaktadır (132,133). *PAF-AH* hem proinflamatuvar bir molekül olan platelet aktive edici faktörü hem de oksitlenmiş fosfolipidleri hidroliz edici özelliği ile koruyucu etkide önemli rolü olduğu düşünülen bir moleküldür. Ancak *PAF-AH*, HDL'den çok LDL üzerinde bulunan bir enzimdir (133). HDL'ye özgü olan ve lipid peroksitleri hidroliz etmede güçlü etkisi olduğu bildirilen enzim ise *PON*'dir (132). LDL oksidasyonundan korumasında ve LDL oksidasyonu ile oluşan toksik metabolitlerin aktivitesinin azaltılmasında, *PON*'un HDL üzerine katalizör etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Peroksidasyona uğramış olan lipidler bu enzim tarafından metabolize edildiğinden lipid peroksitlerin hem HDL'de hem de LDL'de birikimi önlenir. İnvitro çalışmalarda gösterildiğine göre; *PON*, biyolojik olarak aktif olan LDL'yi hidrolizleyip lipid peroksit oluşumunu anlamlı olarak azaltarak yağ çizgisinin (fatty streak) oluşmaması içinde önemli koruma rolü üstlenir (131,134). *Paraoksonaz*, HDL üzerinde amino ucundaki hidrofobik bölgede apo A-I ile ilişkilidir ve LDL'nin oksidasyonu ile oluşan proinflamatuvar moleküllerini parçalamasıyla vasküler hastalık riskini azaltabilir. HDL'nin aterosklerozdaki

koruyucu rolü, ters kolesterol taşınması, nitrik oksit gibi bazı damar genişletici moleküllerin sentezini artırır, inflamasyonu ve tromboz oluşumunu önleyici etki gösterir, adezyon moleküllerinin sentezini azaltır ve endotel tamirini uyarır. HDL'nin bir başka önemli etkisi ise, aterosklerozun başlangıç ve gelişiminden sorumlu tutulan LDL'deki oksidatif değişimleri önlemesidir (134).

Serum *PON* aktivitesinin, miyokart enfarktüsü, ailesel hiperkolesterolemi, Taysach hastalığı, Tangier hastalığı ve diabetes mellitus (DM) gibi ateroskleroz riskini arttıran lipit metabolizması ile ilgili hastalıklara yakalanan bireylerde düşük olduğu görülmüştür (135). Aterosklerotik lezyonların meydana geldiği endotelial hücrelerinde, düz kas hücrelerinde makrofajlarda ve lenfositlerde LDL okside olabileme özelliğine sahiptir (56). Ox-LDL'nin makrofajlardan makrofaj koloni stimulan faktör (M-CSF) ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) serbestleşmesini stimüle ettiği ve bu maddelerin monositlerin toplanmasına neden olarak yağ çizgi lezyonlarının oluşumunu kolaylaştırdığı tespit edilmiştir (56). *PON*'ın LDL'nin yanı sıra lipit peroksidlerin taşıyıcı HDL'i de koruduğu, böylece makrofajlardan kolesterol çıkışını artırarak yağ çizgi lezyonlarının oluşumunu engellemesiyle aterosklerozu önler. HDL'deki *PAF-AH*, lesitin kolin açıl transferaz (LCAT) gibi diğer enzimlere göre *PON*'ın lipit peroksidleri hidroliz etmede daha güçlü olduğu bilinmektedir (136). *PON*, lipit peroksidlerin yanı sıra hidrojen peroksid üzerine de etkilidir. Arterogenez sırasında arter duvar hücrelerince üretilen major toksik oksijen metaboliti olan hidrojen peroksid, oksidatif koşullarda daha potent hücrelere dönüşerek LDL oksidasyonuna neden olur. *PON*'ın oksitlenmiş LDL'deki kolesterol linoleat hidroperoksidler ve hidroksitleri indirgemesi nedeniyle peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu düşünülmektedir (136,137)

PONI L55M polimorfizmi üzerinde yapılan bazı vaka-kontrol çalışmalarında, oksidasyondan LDL'yi korumak için L alloenziminin M alloenziminden daha etkili olduğu, bunun sonucunda *PONI L55M* allel ve aterosklerosis arasında ilişki olduğu gösterilirken(138) diğer çalışmalarda bu ilişkiye rastlanmamıştır(139). *PONI* aktivitesindeki farklılıkların 55-192 polimorfizminden bağımsız olarak çevresel faktörlerin HDL'nin lipid çevresinin içeriğine etkisi (*PONI*'in işlevi), *PONI* geninin promotor bölgesi veya henüz tanımlanamayan başka etkiler sonucu olabileceği düşünülmektedir.

2.3.2. Paraoksonaz Gen Ailesi

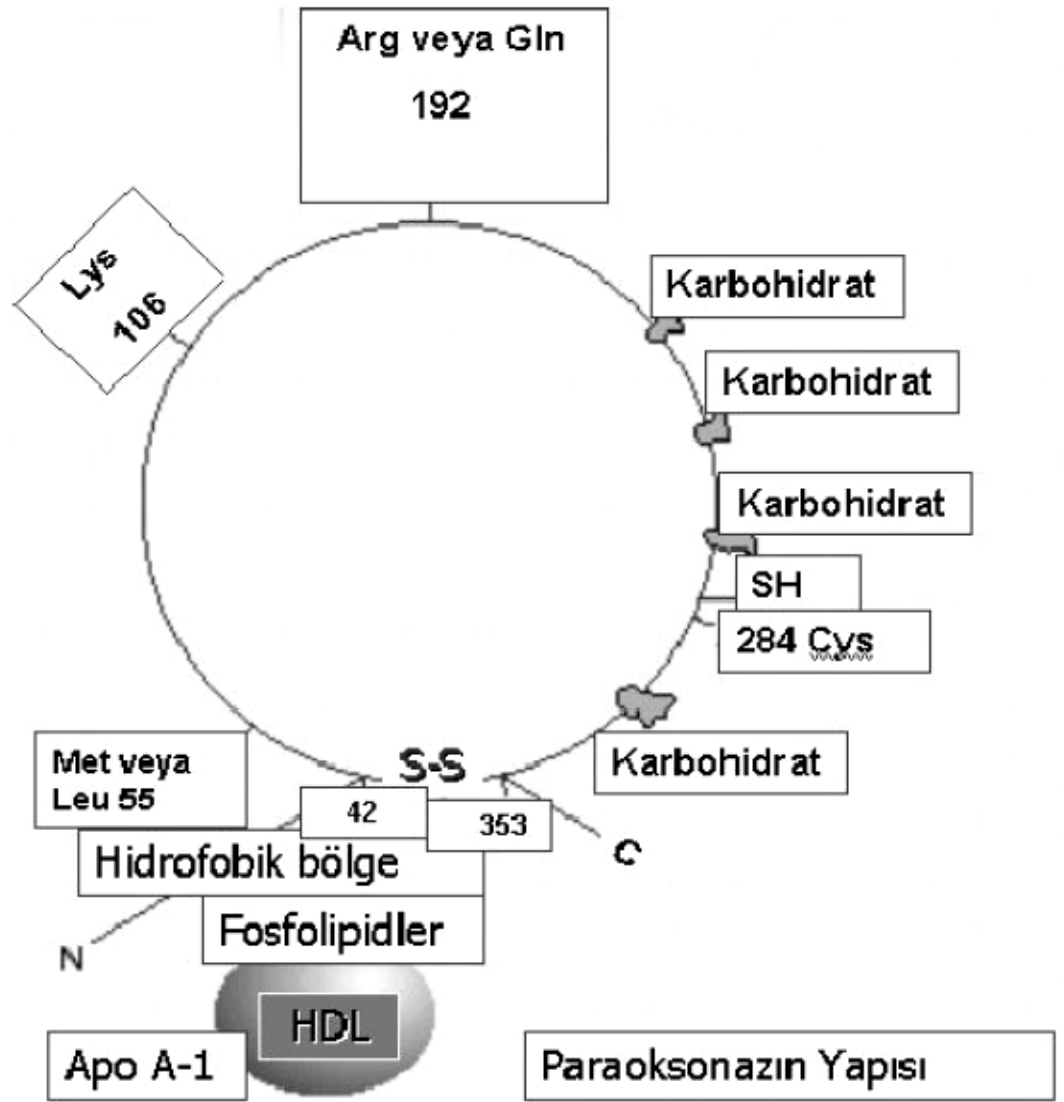
İnsanlarda 7. kromozomun uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında tanımlanabilen paraoksonaz gen ailesinin *PON1*, *PON2* ve *PON3* şeklinde 3 üyesi bulunur. *PON* genleri oldukça benzerdir, 9 ekson, 8 intron ve TATA-less promotor bölgeleri içerirler (131,140,141). *PON* proteinlerinin aminoasit dizilimleri arasında %60 oranında benzerlik olduğu bildirilmektedir (141). İlk olarak memelilerde tanımlanan *PON* ve *PON* ile ilişkili genler, sonraları kümes hayvanları, zebra balığı ve omurgasızlardan *Caenorhabditis elegans*'ta bulunmuştur (142). *PON1*'in diğerlerinden farkı, N-terminalinde hidrofobik bir sinyal dizisinin varlığı ve 4. ekzonun 106. kodonunda lizin aminoasiti bulunmasıdır (143). *PON2* ve *PON3*, *PON1* kadar aydınlatılamamıştır (143). *PON2* diğer üyelerden farklı olarak plazmada bulunmamaktadır. Ancak karaciger, böbrek, kalp, beyin, testis dokularında özellikle endotel tabakasında bulunduğu ve aortik düz kas hücrelerinde de yer aldığı immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir (144,145). *PON3*, tavşan HDL'si üzerinde lokalize olan laktonaz aktivitesi ile tanımlanabilmiştir (135,146). *PON-3* enzimi de *PON1*'e benzer şekilde büyük çoğunlukta karaciğerden sentezlenir ve serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur (146).

PON'ların başlıca iki fonksiyonu bulunmaktadır. Lipit peroksitlerini hidrolize ederek LDL'yi oksidasyondan korumak (132) ve sinir ajanları, aromatik karboksilik asit esterleri ve insektisitler gibi organofosfatlara ters bağlanıp hidroliz ederek, dolaşıma giren organofosfatların nörotoksitesini engellemektir (147). Biyokimyasal ve genetik deneyler sonucunda tüm paraoksonazların aterosklerozus üzerinde etkisi olduğu kanıtlanmıştır (148).

2.3.2.1. *PON*'ın Biyokimyasal Yapısı

PON1 enzimi, 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip 354 aminoasit içeren bir glikoproteindir (149). Total ağırlığının % 15. 8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içerir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. Aminoasit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez (149). Yapısında yer alan 3 sistein (Cys) rezidüsünden 284. pozisyondaki serbest iken, diğer ikisi (Cys 42- 352) arasında disülfid bağı bulunur. Serbest sistein, substrat tanınması ve bağlanması için gereklidir (150). Maksimum

PONI aktivitesi için kalsiyum gereklidir (şekil 1). Üç boyutlu yapıda β -tabakaların merkezinde 7.4 Å aralıklı iki adet kalsiyum iyonu bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi yapısal kalsiyum olup yapıdan uzaklaştırılması, irreversibl denatürasyona neden olmaktadır. Diğeri ise katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur (146). Bu kalsiyum iyonu bir su molekülü ile fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir. *PONI*'in organofosfat substratlarına karşı hidrolitik aktivitesi kalsiyuma bağımlı iken, lipid peroksidlerin birikimini önlemede kalsiyumun gerekli olmadığı bildirilmektedir (151,152). Serum *PONI* aktivitesi, yenidoğan ve prematüre infantlarda erişkin düzeyin yarısı kadardır. Erişkin düzeylerine doğumdan bir yıl sonra ulaşılır, ancak yapılan çalışmaların çoğunda ileri yaşta *PONI* aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Serumdaki *PON* düzeyi ve aktivitesi bireyler arasında çok değişkendir. Bunun bir nedeni *PON* geninin kodlama ve promotor bölgelerinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir. Bir diğeri faktör ise beslenme şeklidir (153,154).



Şekil 1. Paraoksonaz enziminin yapısı (143).

PON2 enzimi bir hücre içi proteini olup yaklaşık olarak 44 kDa molekül ağırlığına sahiptir. *PON2*, hücre içi hidroperoksitlerin üretimini azaltarak ve hücre-aracılı LDL oksidasyonunu önleyerek antiaterojenik fonksiyon göstermektedir. *PON2*, *PON1*'den sonra tanımlanmış ve daha az çalışılmış olmasına rağmen, endotel ve vasküler duvar hücrelerinde ekspresyonu ve bu hücrelerde antioksidan aktivite göstermesi nedeniyle büyük ilgi odağı olmuştur (155).

PON3 enzimi yaklaşık 40 kDa molekül ağırlığında bir protein olup, *PON1*'e göre çok düşük miktarlarda bulunmaktadır. Esas olarak karaciğerde sentez edilir ve serumda HDL ile birlikte bulunur. *PON1*'in aksine *PON3*'ün arilesteraz aktivitesi sınırlıdır ve paraoksonaz aktivitesi yoktur (156).

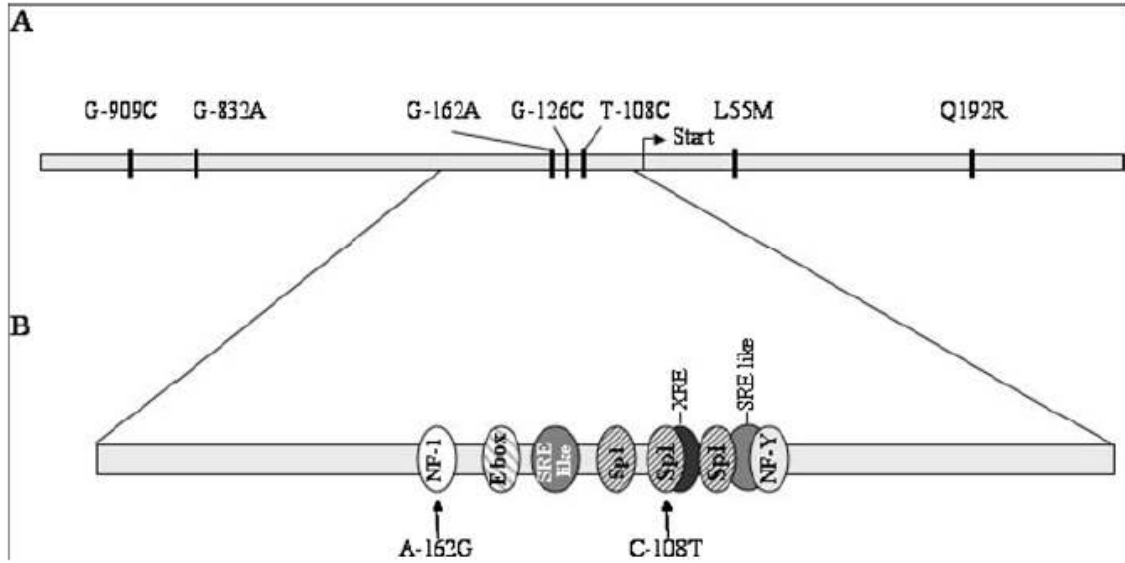
2.3.2.2. *PON* Polimorfizmi

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, bir kısmı *PON* geninin kodlanma bölgesinde, diğerleri intronlarda ve genin düzenleyici yani promotor bölgesinde olmak üzere 160'dan fazla polimorfizm tespit edilmiştir (157). İlk olarak 1973'de Von Mallinckrodt, daha sonra 1976'da Playfer ve arkadaşları tarafından insanlar arasında *PON*'ın düşük, orta ve yüksek aktiviteye sahip polimorfik dağılım gösterdiğini açıklamıştır (157).

2.3.2.2.1. *PONI*

PONI'nin kodlama sekansının dokuz ekzonu ve bir introndaki *Alu* sekansı ve dört intron içindeki polimorfik CA dinükleotid tekrarı vardır (109,131). Paraoksonaz gen polimorfizminin moleküler temeli, *PONI*'in kodlanma bölgesinde meydana gelen mutasyonlar iki aminoasitin yer değiştirmesi ile olur. Bu mutasyonlarda birincisi kodlanma bölgesindeki 192. kodonda glutaminden (Q) arjinine (R) olan değişimdir (131). Kodlanma bölgesindeki ikinci değişim 55. pozisyonda lösin (L), metiyonine (M) olan değişimdir (158) (Şekil 2). Bu mutasyonların *PONI*'in aktivitesi üzerinde etkisi çok az iken, serumdaki protein seviyesini etkilediği tespit edilmiştir. *PON*'in R allelinin kodlandığı proteinin paraoksan hidroliz aktivitesi Q allele göre sekiz kat daha yüksektir (136). Ayrıca *PONI* Q formu yükseltgenmiş HDL ve LDL'nin metabolize edilmesinde R formundan daha etkilidir (159). Homozigot R bireyler homozigot Q ya göre daha yüksek enzim konsantrasyonuna sahiptir (138). Farklı populasyonlardaki polimorfik dağılım bireyler arasında varyasyona neden olur (151). Lösin/Metiyonin (L/M) *L55M* polimorfizmi, *PONI* enzim aktivitesini *Q192R* polimorfizminden bağımsız olarak etkilemektedir. Substrat olarak paraokson kullanıldığı zaman, L allelini taşıyan alkozimin M allelini taşıyan alkozimden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (160). Lösin/Metiyonin (L/M) polimorfizmi aynı zamanda karaciğerdeki enzim ekspresyonunu etkilemekte ve bunun sonucunda enzimin serumdaki yoğunluğunu belirlemektedir. L alleli M allele göre daha çok eksprese olmakta ve dolayısıyla L alleli taşıyan bireylerin serumlarında *PONI* yoğunluğu daha yüksek olmaktadır. Ayrıca M izoformu L izoformuna göre daha az stabil bir yapıdadır (ITP,92). *PONI* enzim aktivitesindeki değişiklik bireyler arasındaki farklılıklardan kaynaklanır. Aynı genotipe sahip

bireylerin *PONI* enzim aktivitesinde 13 kata kadar varan farklılıklar görülebilmektedir (160).



Şekil 2. *PONI* enzimi gen polimorfizmleri (158)

PONI'in kodlanma bölgesindeki *PONI* L55M ve Q192R polimorfizmlerinden başka promotor bölgesinde de en az beş polimorfizm belirlenmiştir. Bu polimorfizmler C108T, C126G, A162G, A832G ve C909G'dir (Şekil 2) (158). *PONI* genindeki promotor polimorfizmlerinin, gen ekspresyonu ve enzimlerin serum düzeyleri üzerinde güçlü etkisinin olduğu bulunmuştur.

Paraoksonaz geninin polimorfik dağılımı ırklar arasında oldukça değişim göstermektedir. Türk popülasyonunda RR allel oldukça düşük bir oranda bulunmuştur. Trimodal dağılım için QQ, QR ve RR allellerinin frekansı sırasıyla %48.6, %41.0 ve % 10.4 olarak tespit edilmiştir (151). Düşük aktivite gösteren Q allel Avrupa, Kanada ve Amerika'da yüksek, Avustralya, Aborigin ve Zambiya'da düşüktür (136). *PONI* L55M allel dağılım sıklığı Kafkas popülasyonunda *PONI* L55M allel dağılım sıklığı LL, LM ve MM sırasıyla %41, %49 ve % 10, (162) Christiansen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada %41.8, %45.5 ve % 12.7 olarak tespit edilmiştir (122). Türk popülasyonunda ise Demirdöğen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *PONI* L55M allel dağılım sıklığı LL, LM ve MM sırasıyla %45.8, %39.7 ve % 14.4 olarak bulunmuştur (163).

PON1 enziminin aktivitesi polimorfizme bağlı olarak oldukça değişim göstermektedir. Söz konusu enzimin organizmada fizyolojik fonksiyonu tam olarak açıklanamamasına rağmen, klinik yayınlarda *PON* enzim aktivitesi ile çeşitli hastalıklar arasında ilişkinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışmaya rastlanmıştır (151). Ayrıca yapılan çalışmalarda özellikle incelenen hastalıklar ile *PON1* polimorfizmi arasında bir bağlantı olup olmadığı araştırılmıştır (136).

2.3.2.2.2. *PON2*

PON2, 7. kromozomun 7q21.3-22.1 bölgesinde lokalize, dokuz ekzonlu ve 22 kb uzunluğunda olan paraoksonaz gen ailesinin ikinci üyesidir (164). Fizyolojik veya patofizyolojik rolü tam olarak bilinmemekle beraber, *PON1* gibi *PON2*'de de bazı polimorfizmler gözlenmektedir. *PON2* 148. pozisyonda alanin veya glisin (A148G) ve 311. pozisyonda sistein veya serin (*C311S*) aminoasitlerinin yer değişimine bağlı olarak polimorfizm göstermektedir. *PON2*'nin A148G polimorfizminin; kolesterol, LDL-kolesterol, açlık kan şekeri ve doğum ağırlığı ile ilişkilendiren çalışmalar mevcuttur (164). 311. pozisyonda sisteinin bulunması enzimin katalitik aktivitesi için gereklidir. Bu durumda enzimin oksitlenmiş lipidleri daha aktif bir şekilde hidroliz ettiği düşünölmektedir. Sisteinin serinle yer değiştirmesinin enzimin katalitik aktivitesini azaltarak oksidatif hasarı önlemede enzimi etkisiz kılacağı öne sürölmektedir (164). Bu nedenle *C311S* polimorfizmi aterosklerotik damar hastalıkları açısından önemlidir. *C311S* polimorfizmi kalp damar hastalıkları, iskemik inme, tip 2 diyabet, alzheimer ve menopoz sonrası kemik ağırlığını düşmesi ile ilişkilidir (165,166). *PON2* SS genotipinin koroner kalp hastalığında önemli bir risk faktörü olduğu ve hem *PON2* CS hem de *PON2* SS genotipinin *PON2* CC genotipiyle karşılaştırıldığında daha yüksek bir risk içerdiği gösterilmiştir. Aynı zamanda *PON2* SS taşıyıcılarının *PON1* RR genotipine sahip olduğu saptanmıştır (155). Bu durum her iki polimorfizm arasında bir etkileşim olabileceğini düşöndürmektedir. Yüksek miktarlarda *PON2* sentezleyen hücrelerde yapılan çalışmalarda okside fosfolipid ve hidrojen peroksida maruz bırakılan hücrelerin oksidatif streslerinin düşük olduğu bildirilmiştir (167).

2.3.2.2.3. *PON3*

PON3, kromozom 7q21.3-22.1 üzerinde *PON1* ve *PON2*'nin arasında bulunan paraoksonaz gen ailesinin üçüncü üyesidir (164). *PON3* en son tanımlananı olup üzerinde en az çalışılanıdır. *PON-3* yüksek oranda HDL'ye bağlı olarak bulunur. Bilinen fonksiyonu laktonazları hidrolize etme ve LDL'nin oksidasyonunu inhibe ederek aterosklerozun progresyonunu yavaşlatır. *PON1* ve *PON2* gibi *PON3*'de antioksidan etkiler göstermektedir. Ancak *PON1* ve *PON2*'nin aksine *PON3* ekspresyonu oksidatif stresten etkilenmemektedir (ITP,88). *PON-3*, 311. pozisyonda serin veya tironin (S311T) ve 324. pozisyonda glisin veya aspartik asit (G324D) aminoasitlerinin yer değişimine bağlı olarak iki polimorfizm göstermektedir. Fakat bu polimorfizmlerin fonksiyonel önemi belirlenememiştir (141,164,168).

2.3.3. *PAF-AH* ve Ateroskleroz

PAF-AH ve ateroskleroz arasındaki ilişki hakkında bazı tartışmalar vardır (169). Bir teoriye göre PAF'ın inaktive olmasıyla aterosklerozda anti inflamatuvar koruyucu etkiler ortaya çıkabilir (170). Bazı çalışmalar gösteriyor ki *PAF-AH* proaterogenik hareketi ve arterial duvarda zararlı etkileri olan LDL kolesterolden okside edilmiş fosfolipitlerin salınımına yol açabilen bir markırdır (169).

Ateroskleroz, LDL'nin modifiye formlarının damar duvarında alımına bağlı olarak lipid birikmesi ve köpük hücresi oluşumu ile karakterizedir. LDL'nin oksidasyonu aterosklerozda, inflamasyon ve oksidize fosfolipidlerin oluşumu ile yakından ilişkili olan anahtar olaylardan biridir (171). Daha sonra oluşan aterosklerotik plaklar ise *PAF-AH* için substrattırlar. *PAF-AH* plazma lipoproteinleri ile ilişkilidir; insan plazmasındaki %70-80 aktivitesi LDL ile ilişkilidir ve kalanı başlıca HDL'ye bağlanır. *PAF-AH*'ın okside fosfolipitleri indirgeyerek LDL'nin apoB bölgesinin oksidatif modifikasyonunu inhibe ettiği (172) ve böylece LDL oksidasyonunu engellediği gösterilmiştir. Ayrıca LDL oksidasyonu sırasında fosfatidilkolinin peroksidasyonu dahil üretilen oksidize fosfolipidleri de hidrolize eder. Oksidize fosfolipidlerin hidrolizi sırasında *PAF-AH* plak formasyonunun birçok

kısımında rol oynayan lipofosfatidilkolinin serbestleşmesini sağlar, bu yüzden bu enzim aynı zamanda proaterojenik olarak da düşünülmektedir (171).

LDL ve HDL arasındaki *PAF-AH* aktivitesinin dağılımı yüksek derecede aterojenik lipoprotein(a) (Lp(a))'nın varlığına göre değişkenlik gösterebilmektedir. Plazmadaki oksidize fosfolipidler tercihen Lp(a) içinde bulunmaktadır ve bu yüzden bu lipoproteinin aterojenisitesinin anlamlı miktarda artmasına yol açabilmektedir; ayrıca oksidize fosfolipidlerin Lp(a) tarafından bağlanması ve/veya transportu *PAF-AH* tarafından indirgenmelerine bağlı olarak proinflamatuvar potansiyellerini azaltabilmektedir(171). *PAF-AH*'in kendisi oksidatif inaktivasyona duyarlıdır ve bu, ateroskleroz dahil patolojik durumlardaki enzimatik aktivitesini elbette değiştirmektedir. LDL ilişkili *PAF-AH* aktivitesi ve düzeyi hiperkolesterolemi ciddiyeti ile paralel olarak artabilir, bu yüzden *PAF-AH*'in plazma düzeylerini saptayan majör faktörlerden biri dolaşımdan LDL'nin alınma oranıdır. Son zamanlarda primer ve sekonder kardiyovasküler olayları azalttığı kanıtlanmış olan lipid-modifiye tedaviler ayrıca *PAF-AH* düzeylerini de düşürmektedir. Bazı klinik çalışmalar HDL ilişkili *PAF-AH*'in potansiyel aterojenik rolünün özellikle LDL'ye oranla statinlerle tedavi ile arttığını vurgulamasına rağmen, *PAF-AH* düzeyleri ile farklı popülasyonlardaki iskemik inme arasında bağımsız ilişki ve farklı kolesterol düzeyleri, *PAF-AH*'in aterosklerozun ilerlemesinde etken bir rolü olduğu hipotezini desteklemektedir; ek olarak, birçok prospektif epidemiyolojik çalışma *PAF-AH*'in risk sınıflandırmasının geliştirilmesinde önemli bir yardımcı olduğunu bildirmiştir (171).

Histopatoloji çalışmaları *PAF-AH*'in özellikle rüptür-pron plakların zayıf destek bölgesinde lokalize olduğunu ve *PAF-AH*'in darapladib ile selektif inhibisyonunun, koroner aterosklerozun gelişimini azalttığını, lezyonların artmasını inhibe ettiğini ve diabetik ve hiperkolesterolemik domuzlarda daha stabil plak oluşumuna yol açtığını göstermiştir (171). Ateroskleroza bağlı gelişen iskemide *PAF-AH*'in rolü halen bir tartışma konusudur ve geniş klinik çalışmalarda ileri değerlendirmeyi beklemektedir.

2.3.3.1. *PAF-AH (Platelet-Aktive edici Faktör-AsetilHidrolaz)*

Fosfolipaz A2 (PLA2) ailesi içinde yer alan plazma *PAF-AH*, aterogenezis gibi inflamatuvar hastalıklarda rol oynayan multipl etkili bir fosfolipiddir. Katalitik bölgelerinde serin/histidin/aspartik asit üçlüsü içerir. Monositler makrofajlara farklılaşma sırasında *PAF-AH* salgılanılır. *PAF-AH* serum ve plazmada yüksek oranda LDL'e bağlı olarak bulunur. *PAF-AH* enzimi 40 kDa ağırlığında N-myrostoylated monomerlerden oluşan lipaz ve fosfolipaza benzer yapıdadır (173).

PAF-AH 6. kromozomun 6p21.2-p12 bölgesinde lokalize yaklaşık 45 kb uzunluğunda 12 ekzonlu bir gendir. Exon 9'un 279. kodonunda bulunan valin aminoasidinin fenilalanine değişimi sonucu *Val279Phe (G994T)* polimorfizmi tanımlanmıştır (172,173). Bu polimorfizm plazmada enzim düzeyinde azalmalara neden olur (173). Cevad Şekuri ve arkadaşlarının Türkiyede yaptığı çalışmada prematüre koroner arter hastalarında *G994T* mutasyonunun sıklığı %2.60 heterozigot, %0 homozigot olarak gözlenmiştir (174). Japon populasyonunda *Val279Phe (G994T)* polimorfizmin sıklığı %27 heterozigot, %4 homozigot olarak gözlenmiştir. Bu polimorfizmin KAH ve stroke erkek hastaları için bağımsız bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (175). *PAF-AH* geni üzerinde tanımlanmış diğer polimorfizimler Gln281Arg (exon 9'da, A 1001G), Arg92His (exon 4'te, G275A), Ile198Thr (exon 7'de, T593C), Ala379Val (exon 11'de, position T1136C), I317N (exon 3'te Insertion191) bölgelerde bulunmaktadır (170).

PAF-AH platelet-aktive edici faktörü sn-2 asetil grubunu hidrolize ederek inaktive eder. Platelet aktive edici faktör (PAF) özellikle trombositlerde, nötrofil ve monositlerde çeşitli biyolojik aktivasyonları olan bir fosfolipid mediatörüdür (176). Dolaşımdaki plazma *PAF-AH* düzeyleri hematopoetik orijinli hücreler tarafından tanımlanmıştır ve ana kaynaklar makrofajlar ve aktive plateletlerdir. Bu zamana kadar tariflenmiş en güçlü proinflamatuvar ajanlardan biridir. Trombosit agregasyonu, endotel hasarı, deri ve bronşlarda anafilaktik reaksiyonları başlatıp ilerletmesi, lenfositlerle etkileşerek iskemi ve inflamasyon oluşturması PAF'ın önemli biyolojik etkileridir (177). İki mekanizma onun regülasyonu ile ilişkilidir: sentez ve enzimatik inaktivasyon (173). Enzimatik inaktivasyonda Ca^{2+} dan bağımsız fosfolipaz olan *PAF-AH* aracılığı ile PAF'ı inaktif metaboliti olan lizo PAF'a dönüştürür (170). Böylece PAF'ın inflamatuvar etkinliği baskılanmış olur. Bu zamana kadar plazma

serumundan 1 tane, intrasellüler ortamdanda 4 tane sekrete edilmiş izoenzimi bulunmuştur (173). Plazma enzimi lipoprotein parçasını (178) oluşturur ve bu da stres, serebrovasküler olay, insülin bağımlı DM, spontan HT olanlarda artmıştır (179,180).

Serum *PAF-AH* enziminin aktivitesinin düşük olduğu hastalıklar arasında astım, sistemik lupus eritematosus, juvenil romatoid artrit, travma sonrası multiple organ yetmezlikleri, akut miyokard infarktüsü, sepsis, Crohn hastalığı, iskemik strok, myokardiyal infarkt, ailesel HDL eksikliği (Tangier hastalığı), kronik kolestiyazis, diabetes mellitus, romatoid artrit, periferel vasküler hastalıklar ve essensiyel hipertansiyon yer almaktadır (170).

İskemik inmenin en sık nedeni aterosklerozdur. Ateroskleroz oluşum mekanizmasında görev alan genlerdeki, polimorfizm ya da mutasyonların inmenin gelişmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda büyük damar aterosklerozu iskemik inmenin alt tipi olmasından yola çıkılarak, aterosklerozu önlemede rolü olan, *PON1 (L55M, Q192R)*, *PON2 (C311S)* ve *PAF-AH (G994T)* gen polimorfizmleri çalışmaya dahil edilmiştir. Amaç, seçilen aterosklerozu önleyici gen polimorfizmleri ile büyük damar aterosklerozuna bağılı akut iskemik inmenin oluşumu arasındaki ilişkinin varlığı araştırılmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastalar

Bu çalışma, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim dalında gerçekleştirilmiştir. Hasta grubu, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Nöroloji AD. polikliniğine başvuran ve “Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment” (TOAST) çalışmasında kullanılan sınıflandırmaya göre (17) büyük damar aterosklerozuna bağlı akut iskemik tanısı konulmuş 33 kadın ve 42 erkek, toplam 75 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalara, araştırmanın amacı ve içeriği ile ilgili bilgilendirme ve onam formu okutulup imzalatılmıştır. Afazi, bilinç düzeyi değişikliği gibi nedenlerle onay veremeyecek olgularda onay hasta yakınlarından alındı. Çalışmanın etik kurul onayı 17.12.2009 tarihinde 2009/04 numaralı etik kurul toplantısında alınmıştır (ek 1).

Çalışmaya katılan gönüllülerin sadece çalışma grubu kriterlerine uygun tanı alması yeterli kabul edildi.

Hasta ve kontrol grubunda demografik veriler çalışmaya katılan kişilerin kendilerinden ya da kişilerin bilgi vermesini kısıtlayan bir bulguları olması durumunda yakınlarından elde edilmiştir. Demografik verilerde kişilerin yaşı, sigara alkol kullanımı ve beslenme alışkanlıkları sorgulandı. Yine kişilerin özgeçmişlerinde hipertansiyon, diyabet, kalp kapak hastalığı, koroner arter hastalığı, kardiyak ritim bozukluğu ve hiperkolesterolemi gibi inme risk faktörlerinin olup olmadığı değerlendirildi.

İnme ve kontrol grubundaki tüm bireylerde açlık kan şekeri, lipit profili, tiroid fonksiyon testleri, homosistein ve vitamin B12 düzeyleri değerlendirildi.

Çalışmaya katılan bireylerin hepsinde elektrokardiyografik inceleme uygulandı. İnmeli ve kontrol grubunda seçilmiş olgularda ayrıca transtorasik ekokardiyografik inceleme uygulandı.

İnmeli hastalarda beyin görüntülemesi BT ya da MR ile yapıldı. Yine inmeli hastalarda karotid vertebral doppler USG incelemesi yapıldı.

Tüm katılımcılardan *PON1* (*L55M*, *Q192R*), *PON2* (*C311S*) ve *PAF-AH* (*G994T*) gen polimorfizmlerini saptamak için EDTA'lı tüpe 2 cc venöz kan örneği alındı. DNA izole edilerek Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)-Restriksiyon fragment length polimorfizm (RFLP) yöntemi ile bu mutasyonların gen dizileri invitro olarak çoğaltıldı.

3.2. Kontrol Grubu

Hasta grubu ile benzer yaş ve cinsiyet özelliklerine sahip olan ve nörolojik bir defisitinin olmadığı kesin olarak bilinen sağlıklı, 45'i kadın, 30'u erkek toplam 75 kişi kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

3.3. Genetik Metod

3.3.1. Periferik kandan DNA elde edilmesi

Hasta ve kontrollerden tam kan tüpüne 2 cc kan alınmış ve DNA, E.Z.N.A[®] Blood DNA İzolasyon Kiti kullanılarak elde edilmiştir. Kit içinde bulunan ve 1.5 ml hacme sahip tüplerin içine konan 250 µl kan üzerine; 250 µl Buffer BL, 5 µl RNase A ve 15 µl proteaz enzimi eklenmiş ve bu karışım 10 saniye vortekslelendikten sonra önceden 42°C'ye ayarlanmış su banyosunda 25 dakika inkübe edilmiştir. Süre bitiminde su banyosundan alınan tüplerin üzerine 260 µl saf alkol eklenmiş ve HiBind[®] DNA spin kolona aktarılmıştır. Dakikada 10.000 devir hız ile 1 dakika santrifüj edildikten sonra, alttaki tüp atılarak yeni tüp konmuş ve spin kolondaki içeriğin üzerine 500 µl HB Buffer ilave edilmiştir. Santrifüj aşaması tekrarlandıktan sonra 650 µl Wash Buffer eklenmiş ve 1 dakika santrifüj edilmiştir. Wash Buffer ile yıkama aşaması tekrarlandıktan ve spinler yeni tüpe yerleştirildikten sonra önceden 70 °C'ye ayarlanmış inkübatörde ısıtılmış 100 µl Elution Buffer eklenmiştir. Dakikada 10.000 devir hız ile 1 dakika yapılan santrifüj sonrası tüpler değiştirilmeden yine 100 µl Elution Buffer konmuş ve son kez 10.000 devir/dak ile 1 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki spin kolon atılarak alttaki tüpte bulunan DNA yeni tüpe aktarılmış ve bu

aşamaların sonucunda yaklaşık 40-60 ng/µl konsantrasyonda 200 µl DNA elde edilmiştir.

3.3.2. İlgili gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

3.3.2.1. *PONI L55M* gen polimorfizmi

PONI geninin kodlama bölgesindeki bir SNP olan ve *Nla* III enzimi için bir kesim bölgesi yaratan *L55M* polimorfizmi bakılmıştır. Araştırılmakta olan gen bölgesi *L55M*:5'-CCTGCAATAATATGAAACAACCTG-3'[Forward(F)] ve *L55M*:5'-TGAAAGACTTAACTGCCAGTC-3' [Reverse(R)] primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiştir (138,181). Toplam 25 µL hacim içinde her primerden 1.5 pmol, 15 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 70 mmol/L KCl, 3.0 mmol/L MgCl₂ (Bioron, cat. no: 103001), her bir dNTP'den 0.2 mmol/µL, 4 unit Taq DNA polimeraz (Bioron, cat. no: 101005) ve 4 µL DNA'dan oluşan PCR miksi kullanılmış, "the MWG PRİMUS THERMAL CYCLER-Primus 96 PCR system" cihazı ile 94°C'de 4 dakikalık ilk denaturasyondan sonra 32 döngü; 94°C'de 50 saniye denaturasyon, 60°C'de 45 saniye bağlanma ve 72°C'de 45 saniye uzama sağlanmış; 172 baz çiftlik(bp) ürün elde edilmiştir (138,181). Amplifiye edilen ürünler %3'lük agaroz jelde koşturularak bant boyları görüntülenmiştir.

3.3.2.2. *PONI Q192R* gen polimorfizmi

PONI geninin kodlama bölgesindeki bir SNP olan ve *Bsp* PI enzimi için bir kesim bölgesi yaratan *Q192R* polimorfizmi bakılmıştır. Araştırılmakta olan gen bölgesi *Q192R*:5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3'(F) ve *Q192R*:5'-CCTGAGAATC TGAGTAAATCCACT-3'(R) primer çiftleri kullanılarak amplifiye edilmiştir (138,181). Toplam 25 µL hacim içinde her primerden 1.5 pmol, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 80 mmol/L KCl, 1.0 mmol/L MgCl₂ (Bioron, cat. no: 103001), her bir dNTP'den 0.6 mmol/µL, 4 unit Taq DNA polimeraz (Bioron, cat. no: 101005) ve 4 µL DNA'dan oluşan PCR miksi kullanılmış, "the MWG PRİMUS THERMAL CYCLER-Primus 96 PCR system" cihazı ile 94°C'de 4 dakikalık ilk denaturasyondan sonra 35 döngü; 95°C'de 30 saniye dakika denaturasyon, 60 °C'de

20 saniye bağlanma ve 72°C'de 50 saniye uzama sağlanmış; 238 bp ürün elde edilmiştir (138,181). Amplifiye edilen ürünler %3'lük agaroz jelde koşturularak bant boyları görüntülenmiştir (138,181).

3.3.2.3. *PON2 C311S* gen polimorfizmi

PON2 geninin kodlama bölgesindeki bir SNP olan ve DdeI enzimi için bir kesim bölgesi yaratan *C311S* polimorfizmi bakılmıştır. Araştırılmakta olan gen bölgesi *C311S*:5'-ACATGCATGTACGGTGGTCTTAT-3'(F) ve *C311S*:5'-GAGTTCAC AATACAAGGCTCTG-3'(R) primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiştir (138,181). Toplam 25 µL hacim içinde her primerden 0.2 pmol, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂ (Bioron, cat. no: 103001), her bir dNTP'den 0.2 mmol/µL, 1 unit Taq DNA polimeraz (Bioron, cat. no: 101005) ve 2.5 µL DNA'dan oluşan PCR miksi kullanılmış, "the MWG PRİMUS THERMAL CYCLER-Primus 96 PCR system" cihazı ile 95°C'de 2 dakikalık ilk denaturasyondan sonra 35 döngü; 94°C'de 45 saniye denaturasyon, 56°C'de 60 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama sağlanmış; 205 bp ürün elde edilmiştir (138,181). Amplifiye edilen ürünler %3'lük agaroz jelde koşturularak bant boyları görüntülenmiştir.

3.3.2.4. *PAF-AH* gen polimorfizmi

PAF-AH geninin kodlama bölgesindeki (9. ekzon) bir SNP olan ve Mae II enzimi için bir kesim bölgesi yaratan *Val279Phe* polimorfizmi bakılmıştır. Araştırılmakta olan gen bölgesi *Val279Phe*:5'-CTATAAATTTATATCATGCT-3'(F) ve *Val279Phe*:5'-TTTACTATTCTCTTGCTTTAC-3'(R) primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiştir (173,182). Toplam 25 µL hacim içinde her primerden 2 pmol, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂ (Bioron, cat. no: 103001), her bir dNTP'den 0.2 mmol/µL, 3 unit Taq DNA polimeraz (Bioron, cat. no: 101005) ve 5 µL DNA'dan oluşan PCR miksi kullanılmış, "the MWG PRİMUS THERMAL CYCLER-Primus 96 PCR system" cihazı ile 94°C'de 4 dakikalık ilk denaturasyondan sonra 35 döngü; 94 °C'de 45 saniye denaturasyon, 54°C'de 60 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama sağlanmış; 160 bp ürün elde edilmiştir

(173,182). Amplifiye edilen ürünler %3'lük agaroz jelde koşturularak bant boyları görüntülenmiştir.

3.3.3. Görüntüleme ve jelin hazırlanması

Bir litre distile suyun içine 0.55 gram borik asit, 1.40 gram Tris Aminometan ve 0.074 gram EDTA konarak tampon çözelti hazırlanmıştır. Konsantrasyonu, PCR sonrası ürünler için %3'lük; enzim kesimi sonrası ürünler için %3'lük olacak şekilde tampon çözelti ve agar karıştırılarak mikrodalga fırında 80°C'de kaynatılmıştır. Karışım, 60°C'ye soğutulduktan sonra üzerine %7'lik olacak şekilde etidyum bromid (Amresco, cat. no: 126K317) eklenmiş, jel kabına aktarılmış ve uygun taraklar yerleştirildikten sonra jelin oda ısısında donması sağlanmıştır. Jel donduktan sonra taraklar çıkartılmış; incelenecek örnekten 5 µL alınmış ve daha önceden 5 kat distile su ile sulandırılarak 1X olarak hazırlanmış 5 µL jel yükleme solusyonu (DZJY001, lot: 0610J12) ile karıştırılarak her bir kuyucuğa yüklenmiştir. Jel tankında (Blue marine serva 200) 120 mV güç kaynağı ile 40 dakika yürütülen örneklerin fotoğrafı, jel görüntüleme cihazı ile (SYNGENE, GeneGenius Bio Imaging System) alınmıştır.

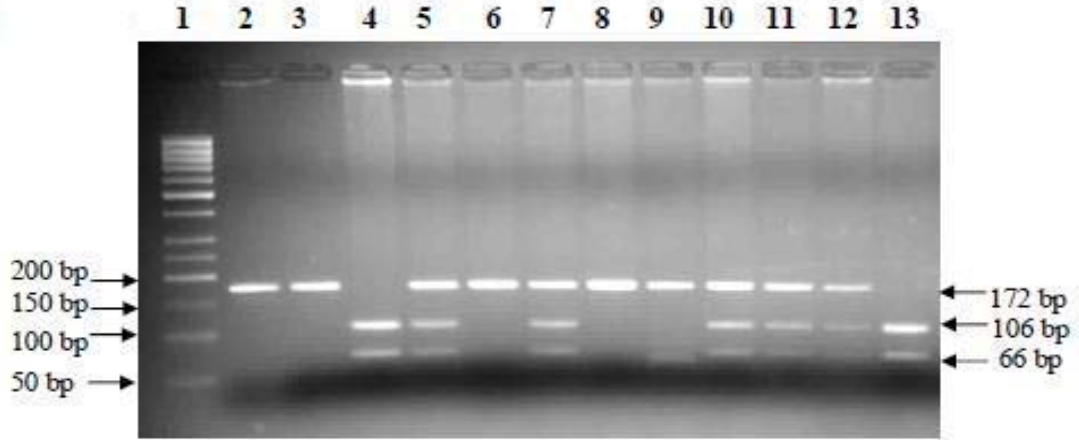
3.3.4. Değerlendirme

Her genin araştırılan polimorfizmleri, PCR sonrası elde edilen ürünleri yükleme boyası eklenerek jele yüklenmiş ve yaklaşık 30 ile 60 dakika arasında, 120 mV güç ile yürütüldükten sonra değerlendirilmiş ve elde edilen bant boylarına göre de isimlendirme yapılmıştır.

3.3.4.1. *PONI L55M* gen polimorfizmi

PCR sonrası elde edilen 172 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünü % 3'lük agaroz jel elektroforezi ile görülmesinin ardından 4 Unit NlaIII enzimi ile kesilmesi için 16 saat 37°C'lik kuru etüvde inkübe edilmiştir. Enzim kesimi sonrası %3'lük agaroz jelde 120 mV güç ile yaklaşık bir saat yürütüldükten sonra, enzim ile kesilmişse 106

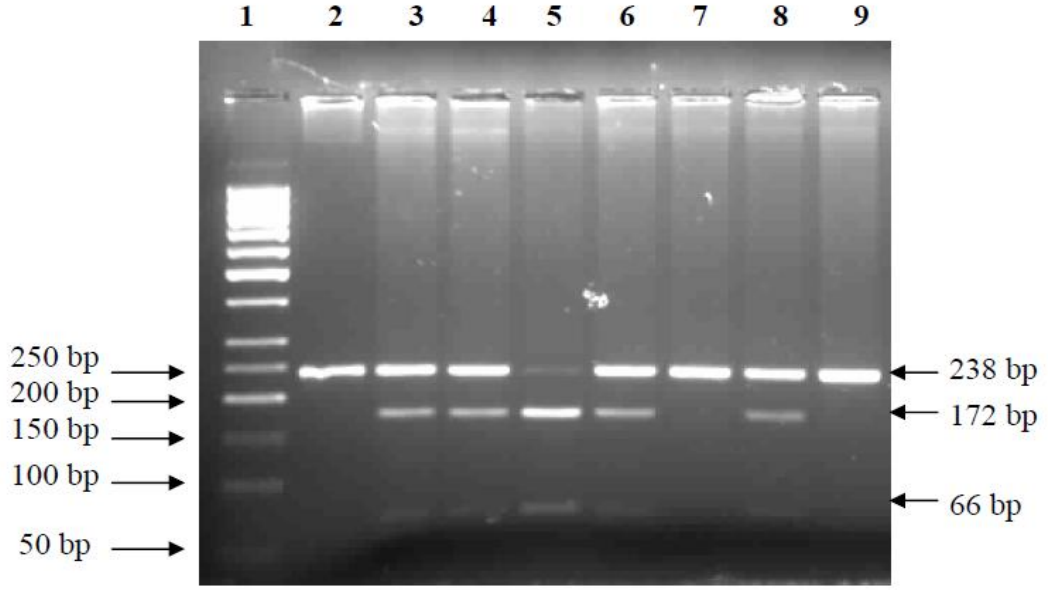
ve 66 bp (M); kesilmemişse 172 bp boyunda bant (L) ortaya konmuştur (Şekil 3)(138,181).



Şekil 3. *PONI L55M* gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü, *PONI L55M* gen polimorfizmi için 172 bp uzunluğunda görülen bant *PONI L55M L*, 106 bp ve 66 bp uzunluğunda görülen bant *PONI L55M M* olarak adlandırılmıştır. 1 no'lu örnek 50 bp uzunluğunda DNA belirteci, 2, 3, 6, 8, 9 no'lu örnekler *PONI L55M L/L*, 5, 7, 10, 11, 12 no'lu örnekler *PONI L55M L/M* ve son olarak 4 ve 13 no'lu örnekler *PONI L55M M/M* olarak gözükmektedir.

3.3.4.2. *PONI Q192R* gen polimorfizmi

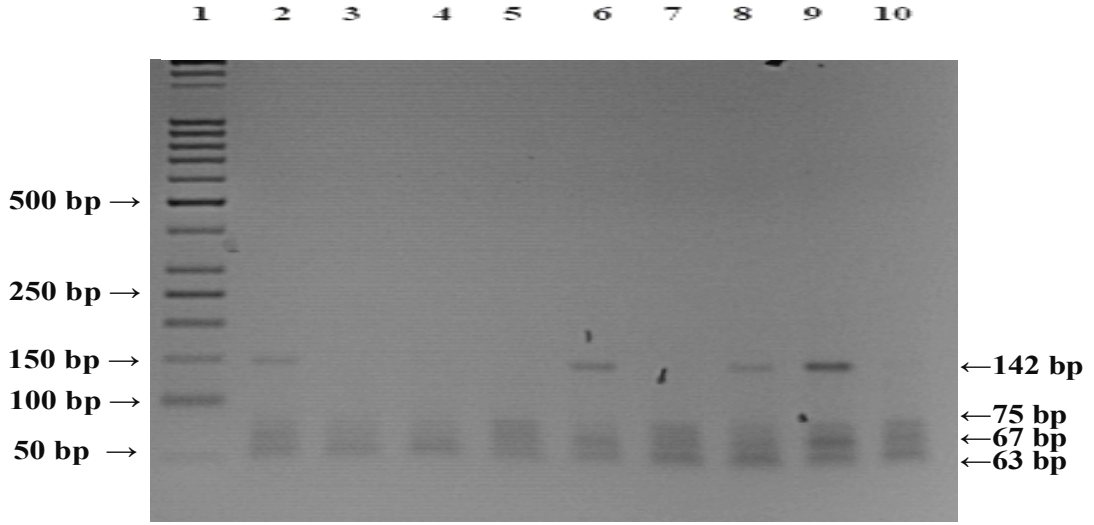
PCR sonrası elde edilen 238 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünü % 3'lük agaroz jel elektroforezi ile görülmesinin ardından 4 Unit Alw1 enzimi ile kesilmesi için 16 saat 37°C'lik kuru etüvde inkübe edilmiştir. Enzim kesimi sonrası %3'lük agaroz jelde 120 mV güç ile yaklaşık bir saat yürütüldükten sonra, enzim ile kesilmişse 172 ve 66 bp (R); kesilmemişse 238 bp boyunda bant (Q) ortaya konmuştur (Şekil 4) (138,181).



Şekil 4. *PON1 Q192R* gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü, *PON1 Q192R* gen polimorfizmi için 238 bp uzunluğunda görülen bant *PON1 Q192R Q*, 172 bp ve 66 bp uzunluğunda görülen bant *PON1 Q192R R* olarak adlandırılmıştır. 1 no'lu örnek 50 bp uzunluğunda DNA belirteci, 2, 7, 9, no'lu örnekler *PON1 Q192R Q/Q*, 3, 4, 6, 8 no'lu örnekler *PON1 Q192R Q/R* ve son olarak 5 no'lu örnek *PON1 Q192R R/R* olarak gözükmektedir.

3.3.4.3. *PON2 C311S* gen polimorfizmi

PCR sonrası elde edilen 205 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünü % 3'lük agaroz jel elektroforezi ile görülmesinin ardından 4 Unit *NlaIII* enzimi ile kesilmesi için 16 saat 37°C'lik kuru etüvde inkübe edilmiştir. Enzim kesimi sonrası %3'lük agaroz jelde 120 mV güç ile yaklaşık bir saat yürütüldükten sonra, enzim ile internal kontrol bölgesinden ve polimorfik bölgeden kesilmişse 75, 67 ve 63 bp (C); yine internal kontrol bölgesi ve polimorfik bölgeden kesilmemişse 142, 63 bp boyunda bant (S) ortaya konmuştur (Şekil 5) (138,181).



Şekil 5. *PON2 C311S* gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü, *PON2 C311S* gen polimorfizmi için 75,67 ve 63 bp uzunluğunda görülen bantlar *PON2 C311S C*, 142 bp ve 63 bp uzunluğunda görülen bant *PON1 Q192R S* olarak adlandırılmıştır. 1 nolu örnek 50 bp uzunluğunda DNA belirteci, 3, 4, 5, 7, 10 no'lu örnekler *PON2 C311S C/C*, 2, 8 ve 9 no'lu örnekler *PON2 C311S C/S* ve son olarak 6 no'lu örnek *PON2 C311S S/S* olarak gözükmektedir.

3.3.4.4. *PAF-AH* gen polimorfizmi

PCR sonrası elde edilen 160 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünü % 3'lük agaroz jel elektroforezi ile görülmesinin ardından 4 Unit MaeII enzimi ile kesilmesi için 16 saat 65°C'lik kuru etüvde inkübe edilmiştir. Enzim kesimi sonrası %3'lük agaroz jelde 120 mV güç ile yaklaşık bir saat yürütüldükten sonra, enzim ile kesilmişse 86 ve 74 bp (F); kesilmemişse 160 bp boyunda bant (V) ortaya konmuştur (173,182). Mutant alel saptanmadığından *PAF-AH G994T* gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü eklenmemiştir.

3.3.5. İstatistik

Veriler SPSS for Windows 12.0 programına aktararak değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda Ki-kare ve Fisher Kesin Ki-kare testleri kullanılmış, analiz sonuçları %95 güven aralığında değerlendirilerek $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Grubunun Özellikleri

Çalışmaya Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi (ZKÜTF) Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran öykü, klinik muayene bulguları ve bilgisayarlı beyin tomografisi (BBT) ya da magnetic resonans (MR) ile akut iskemik inme tanısı alan 33'ü erkek ve 42'si kadın toplam 75 hasta prospektif olarak dahil edildi. Kontrol grubunu 30'u erkek, 45'i kadın toplam 75 normal birey oluşturdu. Bu vakalar ZKÜTF Nöroloji polikliniğine başvuran, nörovasküler hastalığı olmayan, sağlıklı bireyler arasından seçildi.

Hastalar ve kontrol grubu oluşturulurken, özgeçmişinde son üç ay içinde ağır enfeksiyon, sepsis, major kardiyak, renal, hepatik yetmezlik, otoimmün, malign hastalık, gebelik, son altı ay içinde ağır kafa travması veya cerrahi girişim, bunun yanı sıra kollagen vasküler hastalık, trombositoz ya da trombositopenisi bulunanlar çalışma dışında tutuldu.

Hastaların anamnezinde yaşları, cinsiyetleri, inmenin başlangıç şekli (ani, yavaş başlangıç ve progresif seyir) ve eşlik eden bulgular, özgeçmişinde serebrovasküler risk faktörleri (hipertansiyon, diyabet mellitus, aterosklerotik kalp hastalığı, sigara kullanma, hiperlipidemi, atrial fibrilasyon) değerlendirildi. Tüm hastaların sistolik ve diastolik kan basıncı tayini, nabız, ateş, sistemik ve nörolojik muayeneleri, rutin biyokimyasal tetkikleri, rutin hematolojik tetkikleri, acil BBT bulguları, 72 saat sonraki kontrol BBT'leri ya da beyin MR incelemeleri ve elektrokardiyografik değerlendirmeleri yapıldı. Ayrıca tüm hastaların tedavi sırasında ekstra kranial damarların doppler, ultrasonografisi (karotid ve vertebral USG) ya da MR anjiyografisi ve transtorasik ekokardiyografisi (TTE) yapıldı.

TOAST (The Trial of Org 10172'in Acute Stroke Treatment) kriterleri alt tiplerine göre(17) yapılan değerlendirmede, EKG, EKO, MR, magnetic resonans anjiyo (MRA) ve ekstrakranial doppler USG'i yöntemleri ile hastalar değerlendirildi. Çalışmaya alınan Akut iskemik inmeli hastaların hepsinde geniş arter aterosklerozu olarak saptandı.

Sistolik ve diastolik kan basıncı 160/95 mmHg üzerinde olanlar hipertansif olarak kabul edildi. Diyabet mellitus tanısı, tekrarlayan ölçümlerle, açlık kan şekeri (AKŞ) 140 mg/dl ve rastgele alınan tokluk kan şekeri ölçümleri (TKŞ) 200 mg/dl den daha yüksek olmasıyla konuldu.

4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Polimorfik Allel Dağılımının Karşılaştırması

4.2.1. *PONI L55M* gen polimorfizmi

PONI L55M gen polimorfizminin dağılımı gruplar arasında değerlendirildiğinde, *PONI L55M* geninin L alleli hasta grubunda 150 allelin 122'sinde (%81.3) bulunmakta iken, kontrol grubunda 150 allelin 124'ü (%82.7) L alleli idi. M alleli hastalarda 150 allelin 28'inde (%18.7), kontrollerde 150 allelin 26'sında (%17.3) bulunmaktaydı. Gruplar arasında *PONI L55M* L ve *PONI L55M* M dağılımları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p=0.764$; OR=1.095; CI=0.607-1,973) (Tablo 3).

Tablo 3. Hasta- kontrol gruplarının *PONI L55M* gen polimorfizm dağılımları açısından karşılaştırması

Allel	Hasta (n=150)	Kontrol (n=150)	p	OR	%95 CI
<i>L55M</i> L/ <i>L55M</i> M	122/28	124/26	0.764	1.095	0.607-1,973

4.2.2. *PONI Q192R* gen polimorfizmi

PONI Q192R gen polimorfizminin dağılımı gruplar arasında değerlendirildiğinde, *PONI Q192R* geninin Q alleli hasta grubunda 150 allelinin 125'inde (%83.3) bulunmakta iken, kontrol grubunda 150 allelin 136'sı (%84.7) Q alleli idi. R alleli hastalarda 150 allelin 25'inde (%16.7), kontrollerde 150 allelin 14'sinde (%15.3)

bulunmaktaydı. Gruplar arasında *PONI Q192R* Q ve *PONI Q192R* R dağılımları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p=0.086$; $OR=1.943$; $CI=0.967-3,904$) (Tablo 4).

Tablo 4. Hasta-kontrol gruplarının *PONI Q192R* gen polimorfizm dağılımları açısından karşılaştırması

Allel	Hasta (n=150)	Kontrol (n=150)	p	OR	%95 CI
<i>Q192R</i> Q/ <i>Q192R</i> R	125/25	136/14	0.086	1.943	0.967-3,904

4.2.3. *PON2 C311S* gen polimorfizmi

Tanımlanan *PON2 C311S* gen polimorfizminin C alleli hasta grubunda 150 allelinin 116'sında (%77.3) bulunmakta iken kontrol grubunda 150 allelinin 127'si (%84.7) C alleli idi. S alleli hastalarda 150 allelinin 34'ünde (%22.7), sağlıklı kontrollerde 150 allelinin 23'ünde (%15.3) S bulunmakta idi. İki grup arasında dağılım istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmedi ($p=0.105$; $OR=1,618$; $CI=0,901-2,908$) (Tablo 5).

Tablo 5. Hasta-kontrol gruplarının *PON2 C311S* gen polimorfizm dağılımları açısından karşılaştırması

Allel	Hasta (n=150)	Kontrol (n=150)	p	OR	%95 CI
<i>C311S</i> C/ <i>C311S</i> S	116/34	127/23	0.105	1.618	0,901-2,908

4.2.4. *PAF-AH* gen polimorfizmi

PAF-AH gen polimorfizminde mutant allel hem hasta hem de kontrol grubunda saptanmadı. Bu nedenle istatistiksel olarak değerlendirilemedi.

5. TARTIŞMA

Serebrovasküler hastalıklar, tüm dünyada nöroloji kliniklerine başvuran hastaların büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çalışmalarda, inmenin halen mortalitenin önde gelen bir nedeni ve ağır morbiditenin en sık görülen sebebi olduğu bildirilmiştir (92,183,184). Gelişmiş ülkelerde inme ünitelerinin kurulması ile birlikte mortalite ve morbiditenin düştüğü saptanmıştır. Batı Avrupa ülkelerinde 1975 yılından sonra inme nedenli ölüm oranları %30-50 civarında azalmış, Doğu Avrupa ülkelerinde ise bu oran sabit kalmış veya hafif derecede yükselmiştir. Bu oranların önümüzdeki birkaç dekatda yaşlı nüfus nedeni ile artacağı tahmin edilmektedir (185).

PON ve *PAF-AH* üretimini ve sekresyonunu etkileyen gen polimorfizmleri ile kardiyovasküler hastalıklar dışında akut iskemik inme, diyabet, sepsis, Alzheimer ve Parkinson gibi pek çok hastalığın gelişmesine karşı koruyucu, hastalığın oluşum aşamasında, seyrinde ve tedaviye yanıtlarında ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Son zamanlarda özellikle arteriyel ateroskleroza önlemede rolü ön plana çıkan *PON* ve *PAF-AH* genlerinin iskemik inmede de rol alabilecekleri düşünülerek çalışmalar yapılmıştır (173,182,186). Bununla birlikte *PON* ve *PAF-AH* genleri ile inmeli hastalar arasındaki bağlantıyı inceleyen epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar birbirinden farklılık gösterebilmektedir.

Çalışmamızda ateroskleroz oluşumu önleyici etkisi olan *PON1 L55M*, *PON1 Q192R*, *PON2 C311S* ve *PAF-AH G994T* gen polimorfizmlerin büyük damar aterosklerozuna bağlı akut iskemik inme ile başvuran hastalar ile olası bir ilişkisinin varlığının araştırılması için 75 hasta ve 75 kontrol grubundan oluşan bir araştırma planlandı. Büyük damar aterosklerozuna bağlı akut iskemik inme tanısı konulan hasta ve kontrol grupları arasında *PON1 (L55M, Q192R)*, *PON2 (C311S)* ve *PAF-AH (G994T)* genlerinin alel dağılımları karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlılık göstermediği belirlenmiştir (Tablo 3, 4, 5).

Çalışmamızda incelenen *PON1 L55M* gen polimorfizmi ile büyük damar aterosklerozuna bağlı akut iskemik inmeli hastalar arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Türk populasyonunda yapılan çalışmalarda, Demirdöğen B.C.

ile arkadaşları ve Aydın M. ile arkadaşları, *PONI L55M* polimorfizmi ile iskemik inme arasında anlamlı ilişki gözlemlenmemişlerdir (187,188). Schiavon R. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *PONI L55M* polimorfizmi ile Aİİ hastaları arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulamamışlardır (189). Shin B-S ve arkadaşları, *PON* polimorfizmi ile iskemik inme ve lipid profili arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamış olup bu sonuç bizim çalışmamız sonucu ile paralellik göstermektedir. Koreli 350 iskemik inme hastası ve 242 sağlıklı kontrol grubunda *PONI L55M* gen polimorfizmini araştıran bir çalışmada, iskemik inme hastaları ile kontrol grubunda, *PONI L55M* gen polimorfizmi ile arasındaki alel dağılımı istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Bu çalışmada *PON* gen polimorfizmi ve iskemik inme arasındaki ilişkiyi net olarak ortaya koyamasa da *PONI L55M L* aleli plazma homosistein konsantrasyonu, *PON2 A148G G* ve *PON2 C311S S* aleli LDL kolesterol ve apoB plazma konsantrasyonları ile ilişkili olduğunu ve aterosklerotik hastalıkların etyopatogenezine katkısının olabileceğini değerlendirmişlerdir (190). Bu konuda yapılan başka çalışmalarda bizim çalışmamızı desteklemektedir (163,191).

Ancak Ueno T. ve arkadaşlarının Japon serebral infarktli hasta grubunda yaptıkları çalışmada *PONI L55M MM* genotipinin iskemik inme ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş olup, aterosklerotik hastalıklar için önemli bir risk faktörü olabileceğini, aynı zamanda bunun genetik belirteç olarak da kullanılabileceğini belirtmişlerdir (192). Motti C. ve arkadaşları *PONI 192 R*, *PON2 311 S* ve *PONI 55 M* allelerinin KAH, aterosklerotik hastalıklar ve iskemik inme ile ilişkisinin olabileceğini göstermişlerdir (193). Buna ek olarak Schmidt H. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, karotid aterosklerozunda *PON 55* ve *PON 192* genlerinin mutant allelerin intimal-medial kalınlığı (İMT) üzerinde etkili olduğu, ayrıca çevresel faktörlerle (sigara, yaşama tarzı, yeme alışkanlığı, stres gibi) bu etkisinin daha da arttığı, iskemik inme ve aterosklerotik hastalıklara yatkınlıkta artış olduğunu ileri sürmüşlerdir (194). Büyük damar aterosklerozlu Aİİ hastaları ile *PON* gen polimorfizimleri arasındaki çalışmamızda anlamlı ilişki bulamazken, bazı çalışmaların anlamlı sonuçlara ulaşmasını, anlamlı çalışmalarda hasta grubu olarak tüm iskemik inme hastalarının [Geniş arter aterosklerozu (tromboz veya emboli), kardiyembolizm, küçük damar oklüzyonu (lakün)] çalışmalara dahil edilmiş

olmasına ve etnik farklılıklara bağılı olabileceği düşünölmektedir. Büyük damar aterosklerozuna bağılı Aİİ olan hastalarda yapılacak daha geniş çalışmalar, ilişkinin var olup olmadığının ortaya konması açısından faydalı olacaktır.

Çalışmamızda *PONI Q192R* gen polimorfizminin hasta ve kontrol grubu arasındaki ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi. Shin B-S ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada *PONI Q192R* gen polimorfizminin Aİİ ile kontrol grubu arasında fark gösterilememiş olup, çalışmamızla benzerdir (190). Schiavon R. ve arkadaşlarında yaptığı çalışmada da *PONI Q192R* gen polimorfizmi ile Aİİ hastaları arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Daha geniş çalışmalar ve risk faktörleri izole edilerek yapılacak bir çalışmada iskemik inme için bir risk faktörü olabileceğini önermişlerdir (189). Çalışmamızda da *PONI Q192R R* alelinin kontrol grubuna göre OR:1.943 riskin olması bu alelin hastalığın oluşumunda etkisinin olabileceği düşünölmektedir. Aydın M. ve ark. ile Demirdgen B.C. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiş olup çalışmamızı desteklemektedir.

Bununla birlikte Türk populusyonunda yapılan çalışmalarda, Demirdgen B.C. ve arkadaşları, 108 Aİİ hastası ve 78 kontrol grubunda yaptıkları çalışmada, Aİİ ile *PONI Q192R* polimorfizmi arasında anlamlı ilişki gözlemişlerdir. *PONI 192 RR* genotipinin iskemik inme için bir risk faktörü olabileceğini belirtmişlerdir (187). Yine Demirdgen B.C. ve ark. Kafkas populusyonundan olan 172 iskemik inmeli hasta ve 105 sağlıklı kontrol grubu arasında yaptığı çalışmada *PONI Q192R* polimorfizmi ile iskemik inme arasında anlamlı ilişkiye rastlamışlardır (163). Aydın M. ve arkadaşları, 65 Aİİ hastası ve 78 kontrol grubunda yaptıkları çalışmada özellikle *PONI 192 RR* polimorfizminin iskemik inme için bir risk faktörü olduğunu göstermişler ve *RR* genotipinin lipoprotein oksidasyonuna ve Aİİ hastalığına karşı koruyucu bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Türk populusyonunda *PON* genlerinin lipoprotein oksidasyonuna karşı koruma etkileri yoluyla aterosklerozun patogenezinde önemli rol oynayabileceği ileri sürölmüştür (188). Ranade K. ve arkadaşlarının ABD’de yaptığı geniş bir çalışmada *PONI*, *PON2* ve *PON3* genleri üzerinde tanımlanmış 14 gen polimorfizmlerini 2634 (81 iskemik inme hastası) rnekte çalışarak *PONI Q192R* geninin *RR* genotipi iskemik inme için önemli bir risk faktörü olduğu ve bu genin iskemik inmeli hastalar için genetik bir belirteç

olabileceğini önermişlerdir (195). Baum L. ve arkadaşları tarafından 242 iskemik inme, 231 MI geçirmiş birey ve 310 sağlıklı kontrol ile Çin popülasyonunda yapılan bir çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiş olup *PON1 Q192R RR* genotipinin iskemik inme için önemli bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (196). Motti C. ile arkadaşları ve Schmidt H. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, *PON1 192'in R* alellinin, iskemik inme ile ilişkisinin olabileceğini, karotid aterosklerozunda intimal-medial kalınlığı üzerinde etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (193). Yine Liu JL ve arkadaşları *PON1 Q192R* polimorfizmi ile genç iskemik inmeli hastalarda anlamlı ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Genç iskemik inmeli hastalarda *RR* genotipinin İMT arttırıp karotis arterinde aterosklerotik süreci hızlandırarak inme için genetik risk faktörü olabileceğini belirtmişlerdir (197). Bunlara ek olarak Dahabreh Issa J. ile Banerjee I. ve arkadaşlarının yaptığı farklı iki meta analiz çalışmasında *PON1* geninin *Q192R* polimorfizminin KAH'ında olduğu gibi iskemik inme ile de ilişkisinin olabildiğini belirtmişlerdir, iskemik inme için risk faktörü olabileceğini ileri sürmüşlerdir (198,199). Benzer başka çalışmalarda *PON1 192'in RR* genotipinin KAH, iskemik inme gibi vasküler hastalıkların etyopatogenezinde rolü, önemli bir risk faktörü ve bu genin iskemik inmeli hastaları için genetik bir belirteç olarak kullanılabileceğini önermişlerdir (196,200-203).

PON1 Q192R geniyle ilgili yapılan tüm çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında çalışmamızla çelişkili sonuçların olmasının nedenleri; olgu sayısının benzer çalışmalara göre daha sınırlı olması, çalışmaya alınan hastaların tüm iskemik inme alt tiplerinden oluşmuş olması, genç popülasyondan seçilmiş olması, etnik ve çevresel faktörlerin etkili olabileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda iskemik inmenin alt grubundan olan büyük damar aterosklerozlu hastalardan seçilmiş olması, anlamlı ilişki bulamamızın sebebinin bundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Daha geniş hasta grubu ile yapılacak çalışmalarla bu polimorfizmin hastalıkla olan ilişkisini ortaya koymada yol gösterici olacaktır.

Çalışmamızda *PON2 C311S* gen polimorfizmi ile büyük damar aterosklerozuna bağlı Aİİ ilişkisi araştırıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. Pasdar A. ve arkadaşları Kafkas ırkından oluşan 397 iskemik inme hasta ile 405 kontrol grubunda yaptıkları çalışmada, iskemik inme ile *PON2 C311S* gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak anlamsız olduğunu bulmuş olup,

bu sonuç çalışmamızla uyumlu gözükmemektedir (191). Özellikle *PON2 C311S "SS"* genotipinin kardiyembolik erkek inme hastalarında yüksek olduğu, bu hastalar için bir risk faktörü olabileceğini belirtmektedir. Yine Taiwanda Leu HB. ve arkadaşları tarafından yapılan kohort çalışmasında 1989'dan 2002'ye kadar 3330 (80 tanesi iskemik inme hastası) sağlıklı yetişkinler arasında karotis ultrasonu yapılarak, *connexin37 (GJA4)*, *C-reaktif protein (CRP)*, *paraoksonaz (PON1)*, *adiponektin (ACDC)*, dahil olmak üzere, ateroskleroz ile ilişkili genlerin genetik etkileri, *anjyotensin- dönüştürücü enzim (ACE)*, *beta adrenerjik reseptör (ADRB1 ADRB2)*, *antitrombin III (SERPINC1)* ve *kinesin aile üyesi 6 (KIF6)* geleneksel vasküler risk faktörleri için ayarlama, çok değişkenli bir regresyon modeli ile değerlendirmişler. İskemik inme gelişimi için bu genetik varyantlar prognostik etkilerinin değerlendirilmesi için çalışma konularını prospektif takip etmişler. Sonuç olarak Conneksin 37 geninin *CT* ve *TT* polimorfizmleri ile karotis IMT önemli ölçüde etkileyebildiği ve iskemik inme gelişimine katkıda bulunabildiği, *PON* ve diğer genler ile ilgili herhangi bir ilişkiye rastlamamışlardır (204). Tüm bu sonuçlar bizim çalışmamız ile uyumludur.

Bununla birlikte Imai Y. ve arkadaşları, *PON2 C311S* gen polimorfizminin, 431 kontrol grubu, 210 KAH ve 235 iskemik inme hastasında araştırmışlar, *PON1 192 RR* ve *PON2 311 SS* genotipleri ile KAH ve iskemik inme arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlemlenmiş olup bu polimorfizmlerin KAH ve iskemik inme için risk faktörü olabileceğini belirtmişlerdir (200). Yakın zamanda Lazaros L. ve arkadaşlarının 178 iskemik inme hastası (88 laküner infarktılı, 90 geniş arter sklerozlu) ile 181 sağlıklı kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada *PON2 C311S* gen polimorfizmi ile iskemik inme arasındaki ilişkiyi araştırmışlar, *PON2 C311S S* alelinin modifiye Rankin Skalasına göre ciddi derece iskemik inmesi olan hastalarda anlamlı derecede arttığını tespit etmişlerdir. Genotip ve allel dağılımı sıklığının hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı derecede farklı olduğu gözlemlenmiştir. *S* alelini iskemik inmenin ciddi formları için olası bir hazırlayıcı faktör olarak öne sürmüşlerdir (203). Bu çalışmalarla sonuçlarımızı karşılaştırdığımızda farklı sonuç elde etmemizin sebepleri; çalışmamızdaki olgu sayısının benzer çalışmalara göre daha sınırlı olması, diğer çalışmalara alınan hastaların tüm iskemik inme alt tiplerinden oluşmuş olması, diğer çalışmaların genç popülasyondan seçilmiş olması,

etnik ve çevresel faktörlerin etkili olabileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre aterosklerozun oluşumunda rolü olan gen polimorfizmleri açısından, büyük damar aterosklerozuna bağlı iskemik inmenin oluşmasında etkinliğinin sınırlı olduğu söylenebilir. Daha geniş hasta serilerinde ve spesifik alt grubu ile yapılacak çalışmalarla bu polimorfizmin hastalık üzerine olan etkisi hakkında ayrıntılı bilgiye sahip olmamızı sağlayabilir.

Çalışmamızda *PAF-AH G994T* gen polimorfizminin mutant alelini hem kontrol grubunda hem de hasta grubunda saptayamadık. Bu nedenle istatistiksel olarak değerlendirilemedi. Literatürde Türk populasyonunda iskemik inme ile *PAF-AH G994T* gen polimorfizmi arasında yapılan çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızı destekleyen farklı hasta grubunda yapılan çalışmalarda, Şekuri C. ve arkadaşları, Türk populasyonunda yapmış oldukları bir çalışmada 115 prematüre KAH öyküsü olan ile 120 KAH öyküsü olmayan sağlıklı bireylerde *PAF-AH G994T* gen polimorfizmi ile ilişkisi arasında *G994T* mutasyonu prevalansı hastalarda %2.60 heterozigot, kontrollerde ise % 0 olarak bulmuşlardır. Alel frekansı ve genotip dağılımı açısından hasta ve kontrollerde anlamlı bir fark olmadığını gözlemlemişlerdir (174). Balta G. ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada *PAF-AH G994T* mutasyon dağılımına bakmışlar, Türk hasta grubunda 3 (%0.84) heterozigot, Kırgızlarda ise 12 (%8.4) heterozigot mutasyon saptanmışken Azeri ırkında mutasyon görülmemiştir (205). Çalışmamızla benzer sonuçlar elde edilmiş olup bu polimorfizmin istatistiksel olarak değerlendirilebilmesi için daha geniş bir çalışma grubuna ihtiyaç duyulmaktadır.

Ancak Hiramoto M. ve arkadaşları serebral trombozu olan 120 hasta ve 134 sağlıklı kontrol grubu arasında *PAF-AH G994T* polimorfizmini incelemişler. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlemişlerdir. Plazma *PAF-AH* eksikliğinin inme için bir risk faktörü olabileceğini, Japon inme hastalarında *PAF-AH* polimorfizminin nispeten yüksek bulunduğunu, aynı zamanda Japon ırkıyla akrabalığı olan Kafkas ırkında da benzer bir şekilde *PAF-AH* polimorfizmi ile inme arasında ilişki olabileceğini belirtmişlerdir (182). Japon ırkında yapılan başka bir çalışmada, Unno N. ve arkadaşları aterosklerotik okluziv hastalıklarda *PAF-AH G994T*'nin *GT* ve *TT* genotipi ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (206). Zhang X ve arkadaşlarının Çin populasyonunda yaptığı diğer bir çalışmada *PAF-AH G994T*

polimorfizminin aterosklerotik beyin enfarktüsü için bağımsız bir risk faktörü olabildiğini ama laküner enfarktüs için bir risk faktörü olmadığını belirtmişlerdir (207). Yine Satoh K. ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada ise hasta ve sağlıklı bireyler arasında *PAF-AH G994T* genotip dağılımı ve allel sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu belirtmişlerdir (208).

PON ve *PAF-AH* gen polimorfizmleri ile aterosklerotik iskemik inme riski arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışma yapılmış ve bu güne kadar yapılan çalışmalarda birbiriyle çelişen sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesinin nedenleri, hastalığın çok faktörlü hastalık olması, etnik faktörler, çevresel faktörler, örnek şeması, çalışılan örnek sayısı, populasyon tabanlı kontrol gruplarıyla çalışılmaması, bütün hastaların beyin tomografisi, kraniyal manyetik rezonansı, doppler ultrasonografisi ve anjiyografi ile teşhisinin yapılamaması, çalışılan Aİİ örneklerinin alt gruplarından seçilmemiş olması ile açıklanabilir.

Bizim çalışmamızda bazı limitasyonlar bulunmaktadır. Öncelikle hastalarda gen ürünlerinin yani enzimlerin düzeyi ölçülmemiştir. Özellikle heterozigot olgularda enzim düzeyi değişiklik göstermekte, DM, sigara kullanımı enzim düzeyini etkilemektedir. Buna ek olarak çalışmamıza dahil edilen hastaların büyük damar aterosklerozuna bağlı Aİİ hastaları olması, hem hasta sayısı olarak hemde alt grup tanımlı hastalar olması nedeni ile polimorfizmlerin hastalıkla ilişkisini değerlendirmekte sınırlayıcı olmuştur. Etnik köken olarak Türk populasyonunda *PAF-AH* polimorfizminin nadir görülmesi de çalışmamızda değerlendirme zorluğu nedenlerinden birisidir. Büyük damar aterosklerozuna bağlı akut iskemik inme ile bu polimorfizmler arasındaki ilişkiyi doğrulamak için daha büyük örnek sayılarına sahip araştırmaların planlanması uygun olacaktır. Çalışmamızın bu kısıtlılıklarına rağmen, toplumlar arasında ve içinde çok büyük varyasyonlar gösteren polimorfik yapıların incelendiği her çalışmanın, bir toplumdaki genel bilgi birikimine sağlayacağı katkı ortadadır. Ayrıca, multigenik ve kompleks bir hastalık olan Aİİ'de etkili olan gen bölgelerinin çeşitliliği göz önüne alındığında, yapılan çalışmaların değeri bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Böylece biriken bu bilgiler, büyük bir halk sağlığı sorunu olan Aİİ'nin tanı ve tedavisi ile risk altındaki bireylere erken safhada önlem alınabilme ortamı sunabilecektir.

Sonuç olarak çalışmamızda *PON* ve *PAF-AH* gen polimorfizmleri inme için bir risk faktörü olmadığı saptanmıştır. Ancak olgu sayısı azlığından ve *PON* ve *PAF-AH* ölçümleri olmadığından, olgu sayısının genişletilmesi ve *PON* ve *PAF-AH* seviyelerinin ölçümü ile bir ilişki kurularak değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

İskemik inme oluşumunda kesin bir etiyolojik faktör bugüne kadar ortaya çıkarılamamıştır. Bu alanda birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, *PON* ve *PAF-AH*'ların genetik polimorfizmi ile ilgili çalışma sayısı yetersizdir. Çalışmamızda, bu konuda henüz çok fazla araştırılmamış olan bazı *PON* ve *PAF-AH* gen polimorfizmlerinin, iskemik oluşumuna etkisi ve polimorfizmler ile fenotip ilişkisi ortaya konmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızda ateroskleroz oluşumu önleyici etkisi olan *PONI L55M*, *PONI Q192R*, *PON2 C311S* ve *PAF-AH G994T* gen polimorfizmlerin büyük damar aterosklerozuna bağlı akut iskemik inme ile başvuran hastalar ile olası bir ilişkisi olabileceği düşünülerek 75 hasta ile 75 kontrol grubu oluşturulup çalışma planlandı. Çalışmamızda büyük damar aterosklerozuna bağlı akut iskemik inme tanısını almış hastalar ile yaş ve cinsiyet özellikleri açısından benzer özelliklere sahip olan ve nörolojik bir hastalığı olmadığı bilinen sağlıklı kontroller *PONI L55M*, *PONI Q192R*, *PON2 C311S* ve *PAF-AH G994T* gen polimorfizimleri açısından karşılaştırılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında *PONI L55M*, *PONI Q192R*, *PON2 C311S* ve *PAF-AH G994T* gen polimorfizmleri allel dağılım sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre bu polimorfizimlerin hasta ve kontrol grubundaki allel dağılımı istatistiksel yönden anlamlı fark göstermemektedir. Dolayısı ile bu polimorfizmlerin, iskemik inme ile bağlantılı olmadığı sonucuna varılabilirse de, ateroskleroza eğilimi artıran ve ateroskleroz oluşumunu engelleyen *PON* ve *PAF-AH* haplotiplerinin incelenebileceği daha kapsamlı bir araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Aterosklerozun oluşumundaki poligenik altyapı nedeniyle bir genin kesin etkisinin belirlenmesi için etki eden pek çok genin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

Gen polimorfizminin ırksal farklılıkları ve ülkemizin genetik çeşitlilik açısından zengin yapısı göz önüne alındığında, iskemin inme hastaları allel frekansının farklı coğrafi bölgelerimize göre dağılımının yeni araştırmalarla belirlenmesi uygun olacaktır.

Hasta grubunun klinik özellikleri göz önüne alınarak bu polimorfizmlerin hastalığın klinik heterojenitesi ile kısmen de olsa bağlantılı olabileceği söylenebilir. Bu polimorfizmler toplumda sık görülse de iskemik inmeye yakalanma açısından risk faktörü olarak değerlendirilmemelidir. Polimorfizimlerin sıklığı göz önüne alınarak kesin bir sonuca varmak için daha fazla hasta ve kontrol grubu ile düzenlenecek çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Recommendations on stroke prevention, diagnosis and therapy. *Stroke*; 20:1407-31, 1989.
2. Kidwell CS, Alger JR, Di Salle F, Starkman S, Villablanca P, Bentson J, et al. Diffusion MRI in patients with transient ischemic attacks. *Stroke*;30:1174-80, 1999.
3. Kumral E. Serebrovasküler hastalıkların epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri Nöroloji*; 2(1):15-21, 2004.
4. Özdemir G. Serebrovasküler hastalıklardan stroğa yaklaşım. *Türkiye Klinikleri Nöroloji*; 2: 1-14, 2004.
5. Sacco RL. Pathogenesis, classification, epidemiology of cerebrovascular disease. In: Rowland LP (Ed.). *Merritt's Neurology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins:275-90, 2005.
6. Biler J, Love BB. Ischemic cerebrovascular disease. In: Bradley WG (Ed.). *Neurology in Clinical Practice*. 14th ed. Philadelphia: Butterworth Heinemann;1197-251, 2004.
7. Berger C, Fiorelli M, Steiner T, Schäbitz WR, Bozzao L, Bluhmki E, et al. Hemorrhagic transformation of ischemic brain tissue: Asymptomatic or symptomatic? *Stroke*, 32:1330-35, 2001.
8. Yemişçi M, Gürer G, Dalkara T. İskemik inmede gelişen fizyopatolojik olaylar. *Türkiye Klinikleri Nöroloji*; 2: 22-30, 2004.
9. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra. *Stroke*; 12:723-25, 1981.
10. Fisher M, Ratan R. New perspectives on developing acute stroke therapy. *Ann Neurol*;53:10–20, 2003.
11. Ay H, Dalkara T. İskemik penumbra ve terapötik zaman aralığını etkileyen faktörler. *Serebrovasküler Hastalıklar*. Editör: Balkan S. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi Yayınları, 29-36, 2009.
12. Parati G, Valentini M. Prognostic relevance of blood pressure variability. *Hypertension*;47:137-8, 2006.

13. Utku U, Çelik Y. İnmede etyoloji, sınıflandırma ve risk faktörleri. 3th ed. (Ed. Balkan S). Serebrovasküler Hastalıklar. Ankara: Güneş Kitabevi; 51-62, 2009.
14. Bogousslavsky J, Melle GV, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: Analysis of 1000 consecutive patients with first stroke. *Stroke*; 19:1083-92, 1988.
15. Kumral E, Özkaya B, Sağduyu A, Şirin H, Vardarlı E, Pehlivan M. The Ege stroke registry. A hospital based study in the Aegian Region, İzmir, Turkey. Analysis of 2000 patients. *Cerebrovasc Dis*; 8: 278-88, 1998.
16. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinical subtypes of cerebral infarction. *Lancet*; 337:1521-6, 1991.
17. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle J, Biler J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definition for use in multicenter clinical trial. *Stroke*;24:35-41, 1993.
18. Sohtaoğlu M, Bendir G, Uludüz D, Göksan B. Aterotrombotik ve kardiyoembolik serebrovasküler olayların mevsimsel ve sirkadiyen dağılım özellikleri. *Türk Nöroloji Dergisi*;13:60, 2007.
19. Emir CB, Öztürk B, Savrun A, Yazıcı I, Adıgüzel E, Budak F ve ark. İskemik inmeli olgularda kardiyak etyoloji spektrumu. *Türk Nöroloji Dergisi*;13(5):59, 2007.
20. So EL, Annegers JF, Hauser WA, O'Brien PC, Whisnant JP. Population-based study of seizure disorders after cerebral infarction. *Neurology*;46:350-5, 1996.
21. Misirli H, Ozge A, Somay G, Erdoğan N, Erkal H, Erenoğlu NY. Seizure development after stroke. *Int J Clin Pract*;12:1536-41, 2006.
22. Alberti A, Paciaroni M, Caso V, Venti M, Palmerini F, Agnelli G. Early seizures in patients with acute stroke: frequency, predictive factors and effect on clinical outcome. *Vasc Health Risk Manag*; 4(3): 715-20, 2008.
23. Gan R, Sacco RL, Kargman DE, Roberts JK, Boden-Albala B, Gu Q. Testing the validity of the lacunar hypothesis: the Northern Manhattan stroke study experience. *Neurology*;48:1204-11, 1997.
24. Kase CS. Intracerebral hemorrhage. (Ed. In: Bradley WG). *Neurology in Clinical Practice*. 14th ed. Philadelphia: Butterworth Heinemann; 1251-69, 2004.
25. Woo D, Sauerbeck LR, Kissela BM, Khoury JC, Szaflarski JP, Gebel J, et al. Genetic and environmental risk factors for intracerebral hemorrhage: preliminary results of a population-based study. *Stroke*;33:1190-96, 2002.

26. Koçak Y, Öztürk SM, Ege F, Öztürk Ş, Özbakır Ş. Lunapark eğlencesinin tetiklediği intraserebral hematom-olgu sunumu. *Türk Nöroloji Dergisi*;13(5):75, 2007.
27. Smith EE, Rosand J, Knudsen KA, Hylek EM, Greenberg SM. Leukoariosis is associated with warfarin-related hemorrhage following ischemic stroke. *Neurology*;59:193-7, 2002.
28. Rosand J, Hylek EM, O'Donnell HC, Greenberg SM. Warfarin-associated hemorrhage and cerebral amyloid angiopathy: a genetic and pathologic study. *Neurology*;55:947-51, 2000.
29. Kwiatkowski TG, Libman RB, Frankel M, Tilley BC, Morgenstern LB, Broderick J. et al. Effects of tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke at one year. *N Engl J Med*;340:1781-7, 1999.
30. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, et al. Intraarterial prourokinase for acute ischemic stroke: the PROACT II study: a randomized controlled trial. *JAMA*;282(21):2003-11, 1999.
31. Kase CS, Furlan AJ, Wechsler LR, Higashida RT, Rowley HA, Hart RG, et al. Cerebral hemorrhage after intra-arterial thrombolysis for ischemic stroke: the PROACT II trial. *Neurology*;57:1603-10, 2001.
32. Bruno A, Levine SR, Frankel MR, Brott TG, Lin Y, Tilley BC, et al. Admission glucose level and clinical outcomes in the NINDS rt-PA stroke trial. *Neurology*;59:669-74, 2002.
33. Kernan WN, Viscoli CM, Brass LM, Broderick JP, Brott T, Feldmann E, et al. Phenylpropanolamine and the risk of hemorrhagic stroke. *N Engl J Med*;343:1826-32, 2000.
34. Bradley WG, Daroff BR, Fenichel GM, Marsden CD. *Neurology in Clinical Practice. The Neurological Disorders. Third Edition. Vascular Diseases of The Nervous System*; 1125-1126. 2000.
35. Kiely DK, Wolf PA, Cupples LA, et al. Familial aggregation of stroke: the Framingham Study. *Stroke*.;24: 1366–1371. 1993.
36. Liao D, Myers R, Hunt S, et al. Familial history of stroke and stroke risk: the Family Heart Study. *Stroke*; 28: 1908–1912. 1997.

37. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel CF. Tibbi Genetik. (Çev: Emre S) s.79-94, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2005.
38. Öztas S, Gül D, Tatar A. İnsan Genomu: Genler ve DNA, Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci, 1(2):18-23, 2005.
39. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. N Engl J Med;338:1042-50, 1998.
40. Ülkü B. Trombofili. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi;36:133-42, 2003.
41. Hademenos J, Alberts MJ, Awad I, Mayberg M, Shephard T, Jagoda A, et al. Advances in the genetics of cerebrovascular diseases and stroke. Neurology;56:997-1008, 2001.
42. Markus HS, Nadira A, Swaminathan R, Sankaralingam A, Molloy J, Powell J. A common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine and ischemic cerebrovascular disease. Stroke;28:1739-43, 1997.
43. Ho GYH, Eikelboom JW, Hankey GJ, Wong CR, Tan SL, Chan JBC, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and homocysteine-lowering effect of vitamin therapy in Singaporean stroke patients. Stroke;37:456-60, 2006.
44. Wu Y, Tomon M, Sumino K. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke: sex difference in Japanese. Kobe J Med Sci;47: 255-62, 2001.
45. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Mol Genet Metab;64:169-72, 1998.
46. Harmon DL, Doyle RM, Meleady R, Doyle M, Shields DC, Barry R, et al. Genetic analysis of the thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for ischemic stroke. Arterioscler Thromb Vasc Biol;19:208-11, 1999.
47. Frederiksen J, Juul K, Grande P, Jensen GB, Schroeder TV, Tybjaerg-Hansen A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T), hyperhomocysteinemia and risk of ischemic cardiovascular disease and venous thromboembolism: prospective and case control studies from the Copenhagen City Heart Study. Blood;104:3046-51, 2004

48. Ucar F, Sonmez M, Ovali E, Ozmenoglu M, Karti SS, Yilmaz M, et al. MTHFR C677T polymorphism and its relation to ischemic stroke in the Black Sea Turkish population. *Am J Hematol*;76:40-3, 2004.
49. Sazcı A, Ergül E, Kaya G, Kara I. Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochem Funct*;23(1):51-4, 2005.
50. Emiroğulları EF, Saatçi Ç, Ünal A, Özkul Y. Arteriyovenöz fistül trombozu gelişen ve gelişmeyen kronik böbrek yetersizliği olan hastalarda metilentetrahidrofolate redüktaz polimorfizmlerinin araştırılması. *Sağlık Bilimleri Dergisi*;16(3):121-8, 2007.
51. Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke. *Arch Neurol*;61:1652-62, 2004.
52. Sipahi T, Güldiken B, Güldiken S, Üstündağ S, Turgut N, Budak M, et al. The association of gene polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor type 1 with ischemic stroke in Turkish subjects of Trakya region. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*;26(1):1-8, 2009.
53. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. *J Biol Chem*;266:15377-83, 1991.
54. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;20:484-92, 2000.
55. Kunz R, Bork JP, Fritsche L, Ringel J, Sharma AM. Association between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy, a methodologic appraisal and systemic review. *J Am Soc Nephrol*;9:1653-63, 1998.
56. Ağaçhan B, Yılmaz H, Öztürk O, Ergen HA, İsbir CS. Aterosklerozda apolipoprotein E, okside-LDL ve lipid profili ilişkisinin araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*;19(3):193-7, 2005.
57. Coşkun T. Nutrisyonel genomik. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2007;50:47-66
58. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*;240:622-9, 1988.

59. Öztürk Ş. Apolipoprotein E ve Alzheimer hastalığı. *Demans Dizisi*;1:62-7, 1999.
60. Somay G, Mısırlı H, Güler M, Çalışkan T, Sayhan N, Erenoğlu YN. Serebrovasküler hastalıklarda apolipoprotein E ve anjiotensin converting enzim gen polimorfizmi. *Türk Beyin Damar Hastalıkları Dergisi*;8(2):113-7, 2002.
61. Goldberg SN, Conti-Kelly AM, Greco TP. A family study of anticardiolipin antibodies and associated clinical conditions. *Am J Med.* 99: 473–479, 1995.
62. Ortel TL. Genetics of coagulation disorders. In: Alberts MJ, ed. *Genetics of Cerebrovascular Disease*. Armonk, NY: Futura Publishing; 129–156, 1999.
63. Hillier CE, Collins PW, Bowen DJ, et al. Inherited prothrombotic risk factors and cerebral venous thrombosis. *QJM.* 91:677–680, 1998.
64. Gürgey A, Mesci L. The prevalence of factor V Leiden (G1691A) mutation in Turkey. *Turk J Pediatr*;39:313-5, 1997.
65. Sılan F, Zafer C. Faktör V Leiden mutasyonu. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*;1:33-6, 2004.
66. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, De Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*;369:64-7, 1994.
67. Sun X, Evatt B, Griffin JH. Blood coagulation abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. *Blood*;83:3120-5, 1994.
68. Press RD, Liu XY, Beamer N, Coull BM. Ischemic stroke in the elderly: role of common factor V mutation causing resistance to activated protein C. *Stroke*;27:44-8, 1996.
69. Fisher M, Fernandez JA, Ameriso SF, Xie D, Gruber A, Paganini-Hill A, et al. Activated protein C resistance in ischemic stroke not due to factor V arginin-506-glutamin mutation. *Stroke*;27:1163-6, 1996.
70. Kristensen B, Malm J, Nilson T, Hultdin J, Carlberg B, Olsson T. Increased fibrinogen levels and acquired hypofibrinolysis in young adults with ischemic stroke. *Stroke.* 29;2261-2267,1998.
71. Kessler C, Spitzer C, Stauske D, Mende S, Standlmüller J, Walther R, Rettig R. The apolipoprotein E and B-fibrinogen G/A -455 gene polymorphism are associated with ischemic stroke involving large-vessel disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;17(11):2880-4, 1997.

72. Martiskainen M, Pohjasvaara T, Mikkelsen J, Mantyla R, Kunas T, Laippala P, Ilveskoski E, Kasta M, Karhunen PJ, Erkinjuntti T. Fibrinogen Gene Promoter-455 A Allele as a Risk Factor for Lacunar Stroke. *Stroke*. 34;886, 2003.
73. Nishiuma S, Kario K, Yakushijin K, Maeda M, Murai R, Matsuo T, Ikeda U, Shimada K, Matsuo M. Genetic variation in the promoter region of the beta-fibrinogen gene is associated with ischemic stroke in a Japanese population. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 9;373-379, 1998.
74. Koster T, Rosendaal FR, Reitsma PH, van der Velden PA, Briet E, Vandenbroucke JP. Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 71:719-722. 1994.
75. Sucak G, Haznedar R. Trombofili. *Türkiye Klinikleri Cerrahi Dergisi*;5:59-64, 2000.
76. Pratt RW, Adams D, Balmaceda C. Hematologic and related diseases. In: Rowland LP (Ed.). *Merritt's Neurology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;1050-64, 2005.
77. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood*;5:1747-50, 1997.
78. Longstreth WT, Rosendaal FR, Siscovick DS, Vos HL, Schwartz SM, Psaty BM, et al. Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: factor V Leiden and prothrombin gene variant (G20210A). *Stroke*;29:577-80, 1998.
79. Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A Mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation*;99:999-1004, 1999.
80. Johansson L, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Stegmayr B, Hallmans G. Tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, and tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 complex as risk factors for the development of a first stroke. *Stroke*;31:26-32, 2000.
81. Celkan T. Çocukluk çağında kalıtsal nedenli tromboz. *Türk Pediatri Arşivi*;38:131-45, 2003.

82. Sperr WR, Huber K, Roden M, Janisiw M, Lang T, Graf S, et al. Inherited platelet glycoprotein polymorphisms and a risk for coronary heart disease in young central Europeans. *Thromb Res*;90:117-23, 1998.
83. Thornton MA, Poncz M, Korostishevsky M, Yakobson E, Usher S, Seligsohn U, et al. The human platelet alpha IIb gene is not closely linked to its integrin partner beta 3. *Blood*;94:2039-47, 1999.
84. Slowik A, Dziedzic T, Turaj W, Pera J, Glodzik-Sobanska L, Szermer P, et al. A2 Allele of GpIIIa gene is a risk factor for stroke caused by large-vessel disease in males. *Stroke*;35:1589-93, 2004.
85. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med*;334:1090-4, 1996.
86. Begelman SM, Olin JW. Fibromuscular dysplasia. *Curr Opin Rheumatol*. 12: 41–47, 2000.
87. Shetty-Alva N, Alva S. Familial moyamoya disease in Caucasians. *Pediatr Neurol*. 23: 445–447, 2000.
88. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, et al. Primary Prevention of Ischemic Stroke: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: Cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke*; 37:1583-1633. 2006.
89. Kalimo H, Viitanen M, Amberla K, et al. CADASIL: hereditary disease of arteries causing brain infarcts and dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 25: 257–265. 1999.
90. Wolf PA, Belanger AJ, D’Agostino RB. Management of risk factors. *Neurol Clin*. 10: 177-175. 1992.
91. Burcfield CM, Curb JD. Glucose intolerance and 22 year stroke incidence. The Honolulu Heart program. *Stroke*. 25: 951, 1994.

92. Barnett HM, Mohr RP, Bennett MS, Yatsu FM. Epidemiology and stroke. Second edition. pp. 23-29, Stroke Pathophysiology, Diagnosis and Management.; 23-29, 1998.
93. Simons LA. Triglycerid Levels and The Risk of Coronary Artery Disease. Review from Australia. The American journal of Cardiology. 70: 15-19, 1992.
94. Rohr J, Kittner S, Feuser B. Traditional risk factors and ischemic stroke in young adults: The Baltimore – Washington Cooperative Young Stroke Study. Arch Neurol. 53: 603-605, 1996.
95. Bogousslavsky J, Despland PA, Regli F. Asymptomatic tight stenosis of the internal carotid artery: long term prognosis. Neurology; 36: 861-863, 1986.
96. Ohenne-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. Blood;91:288-294, 1998.
97. Hilbom M, Haapaniemi H, Juvela S. Recent alcohol consumption, cigarette smoking and cerebral infarction in young adults. Stroke; 40: 26-28, 1995.
98. Abbott RD, Rodriguez BL, Burchfield CM, Curb JD. Physical activity in older middle-aged men and reduced risk of stroke:the Honolulu Heart Program. Am.J. Epidemiol. 139:881-893, 1994.
99. Kiely DK, Wolf PA, Cupples LA, Beiser AS, Kannel WB. Physical activity and stroke risk: the Framingham Study. Am.J.Epidemiol. 140:608-620, 1994.
100. Amerenco P, Cohen A, Tzourio C et al Atherosclerotic Disease of the aortic arch and the risk of ischemic stroke. N Eng J Med; 331:1474-1479, 1994.
101. Kelly MA, Gorelick PB, Mirza D. The role of drugs in the etiology of stroke. Clin Neuropharmacol. 15: 249-275, 1992.
102. Petiti DB, Sidney S, Bernstein A, Wolf S, Quesenberry C, Ziel HK. Stroke in users of low-dose oral contraceptives. N Engl J Med. 335:8-15, 1996.
103. Bonita R, Epidemiology of Stroke. Lancet; 239: 342-347, 1992.
104. Yamashita K, Ouchi K, Shiari et al. Distribution of Chlamydia pneumoniae infection in the atherosclerotic carotid artery. Stroke;29:773-778. 1988.
105. De Lucia, Renis V, Belli A, Conte M, Di Mauro C, Tortora N, d'Alessio D, Nina PP, Franco A, Schisano G, Papa ML. Familial coagulation-inhibiting and fibrinolytic protein deficiencies in juvenile transient ischaemic attacks.J Neurosurg Sci; 40(1):25-35, 1996.

106. Szolnoki Z, Somogyvari F, Kondacs A, Szalo M, Fodor L. Evaluation of the roles the Leiden V Mutation and ACE I/D polymorphism subtypes of ischaemic stroke. *J Neurol*; 248(9):756 -761, 2001.
107. Folsom AR, Rosamond WD, Shahon E, Cooper L, Aleksic N, Nieto FJ, Rasmussen ML, Wu KK. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis risk in communities (ARIC) study investigators. *Circulation*; 17(7):736-42, 1999.
108. Ridker PM, Hennekes CH, Stampfer MJ, Manson JE, Vaughan DE. Prospective study of endogenous tissue plasminogen activator and risk of stroke. *Lancet*. 343:940-943, 1994.
109. Ridker PM, Hennekes CH, Miletich JP. G 20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation*; 99(8):999-1004, 1999.
110. Brey RL, Abbott RD, Curb JD, Sharp DS, Ross GW, Stallworth CL, Kittner SJ. Beta (2)-Glycoprotein 1-dependent anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and myocardial infarction: the Honolulu Heart Program. *Stroke*; 32(8) :1701- 6, 2001.
111. Jones EF, Kalman JM.. Proximal aortic atheroma. An independent risk factor for cerebral ischemia. *Stroke*; 26:218, 1995.
112. Kence A, Gürata A, Akyerli CA, Sayın DB, Karabulut HG, Bökesoy I. *Genetik Terimleri Sözlüğü*. 1.baskı, s.82, Semih Ofset, Ankara, 2004.
113. Long M, Rosenberg C. Testing the “Proto-splice Sites” Model of Intron Origin: Evidence from Analysis of Intron Phase Correlations. *Mol Biol Evol* 17(12):1789–1796, 2000.
114. Klug WS, Cummings MR. *Genetik Kavramlar*. (Çev. Ed: Öner C.) s.433-442, Palme yayıncılık, Ankara, 2003.
115. Turppnny PD, Ellard S. *Emery’s Elements of Medical Genetics*. 12th edition. pp.123-136. Elseiver Churchill Livingstone, UK, 2005.
116. Kang S.W. Kuzuhara T. Horikoshi M. Functional interaction of general transcription initiation factor TFIIE with general chromatin factor SPT16/CDC68; *Genes to Cells* 5, 251±263, 2000.

117. Dilşen N, Koniçe M, Aral O. Our diagnostic criteria for Behçet's disease. Proceedings of the third Mediterranean Congress of Rheumatology 11-15, 1986.
118. Franekova M, Halasova E, Bukovska E, Luptak J, Dobrota D. Gene polymorphisms in bladder cancer. *Urol Oncol* 26(1):1-8, 2008.
119. Mahoney MC. Genetic Polymorphisms and Disease Prevention. *Pediatr Blood Cancer* 48:742–747, 2007.
120. Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WER, Thornhill MH. Recurrent aphthous stomatitis and gene polymorphisms for the inflammatory markers TNF-a, TNF-b and the vitamin D receptor: no association detected. *Oral Diseases* 8:303–307, 2002.
121. Basturk B, Yavascaoglu I, Barbaros Oral B, Goral G, Oktay B. Cytokine gene polymorphisms can alter the effect of Bacillus Calmette–Guerin (BCG) immunotherapy. *Cytokine* 35:1–5, 2006.
122. Christiansen L, Bathum L, Frederiksen H and Christensen K. Paraoxonase 1 polymorphisms and survival. *European Journal of Human Genetics*. 12:843–847, 2004.
123. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350, 1987.
124. Temizkan G, Yılmaz S, Öztürk M, Arı Ş, Ertan, Sarıkaya AT, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. s.102-109, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004.
125. Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 9;27(16):6008, 1988.
126. Voorend M, Faber CG, Ven A.J.A.M, Kessels F, Bruggeman CA, Lodder J. *Chlamydia pneumoniae* is a likely risk factor for ischemic stroke in young patients. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 13(2):85-91, 2004.
127. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*. Jan14;340(2):115-126. 1999.
128. Lindsberg PJ, Grau AJ. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34:2518-2532.
129. Crowther MA. Pathogenesis of atherosclerosis. *American Society of Hematology Educ. Program*:436-441, 2005.

130. Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ. Lipids, Lipoproteins, And Apolipoproteins. Ed: Burtis CA, Ashwood ER, Tietz Textbook of Clinical Chemistry. pp. 809-861, 3rd edition. W. B. Saunders Company USA. 1999.
131. Humbert R, D.A. Adler, C.M. Distech, C. Hassett, C.J. Omiecinski and Furlong C.E. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genet* 3:73-76, 1993.
132. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs*; 4:211-7, 2004.
133. Chait A, Han CY, Oram JF, Heinecke JW. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J Lipid Res*; 46:389-403, 2005.
134. Blatter M-C, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of high density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, k-45. *Eur J Biochem.*;211:871-879, 1993.
135. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*;86:193-199, 1991.
136. Azarsız E, E.Y.S., Paraoksonaz ve Klinik Önem. *Türk Biyokimya Dergisi*. 25(3):109-119, 2000.
137. La Du B. N., A.M., Billecke S., Navab M., Primo Parmo S., Sorenson R.C., Standiford T.J. On the Physiological Role(s) of The Paraoxonase. *Chemice-Biological Dnteractions*, 119-120,379-388, 1999.
138. Mackness B, Mackness M, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett*;423:57-60, 1998.
139. Antikainen M, Murtomaki S, Syvanne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M, Frick MH, Ehnholm C. The Gln-Arg 192 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest*. 98:883–885, 1996.

140. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN: The human serum paraoxonase/arylesterase gene (*PON1*) is one member of a multigene family. *Genomics*;33:498-507, 1996.
141. Campo S, Sardo AM, Campo GM, Avenoso A, Castaldo M, D'Ascola A, Guinta E, Calatroni A, Saitta A: Identification of paraoxonase 3 gene (*PON3*) missense mutations in a population of southern Italy. *Mutation Research*, 546:75-80, 2004.
142. Draganov I, B.N.L.D. Pharmacogenetics of Paraoxonases: A Brief Review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, 78–88, 2004.
143. Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease. *Mol Med Today*:5:381-6, 1999.
144. Dharambir K.S., Nilmani S., Christopher E.A., Ilyas K.M.: Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 17: 1067 – 1073, 1997.
145. Fuhrman B. and Aviram M.: Preservation of paraoxonase activity by wine flavonoids: possible role in protection of LDL from lipid peroxidation. *Ann. NY Acad. Sci.* 957: 21–24, 2002.
146. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L. et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*11:412–419, 2004.
147. Costa TG, Cole LG, Furlong CE, Polymorphisms of paraoxonase (*PON1*) and their significance in clinical toxicology of organophosphates. *J Toxicol Clin Toxicol.* 41(1):37-45, 2003.
148. Aviram M, Rasenblat M: Paraoxonase 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage FOAM cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology & Medicine*. 0891-5849, 2004.
149. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos.*19:100-6, 1991.
150. Lourdes R, Bharti M, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J.* 354:1-7, 2001.

151. Aynacıoğlu A.S., Cascorpi I., Mrozikiewicz M.P., Nacak M., Tapanyigit E.E., Roots I: Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 157 ,174-177, 1999.
152. Dharambir K.S., Christopher E.A., Nilmani S., Ilyas K.M. DNA polymorphism in two paraoxonase genes (*PON* 1 and *PON* 2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 36- 44, 1998.
153. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci*; 107:435-47, 2004.
154. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (*PON*-1) activity. *Biochem Pharmacol*;69:541-50, 2005.
155. Martinelli N, Girelli D, Oliveri O, et al. Interaction between smoking and *PON*-2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*; 34:14-20, 2004.
156. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 21:542-547, 2001.
157. Costa LG, Jarvik G, and Furlong C.E. Functional Genomics of the paraoxonase (*PON1*) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism. *Annu. Rev. Med.* 54,371–92, 2003.
158. Brophy VH, J.R., Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (*PON1*) Expression *Am J Hum. Genet.*, 68: 1428–1436, 2001.
159. Aviram M, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human Serum Paraoxonases (*PON1*) Q and R Selectively Decrease Lipid Peroxides in Human Coronary and Carotid Atherosclerotic Lesion. *Circulation*, 101; 2510-2517, 2000.
160. Baltter Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased cardiovascular risk in diabetes. *J Clin Invest*. 99:62-66, 1997.

161. Leviev I, Deakin S, James RW. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J Lipid Res.* 42:528-535, 2001.
162. Salonen JT, Malin R, Tuomainen TP, Nyyssönen K, Laka TA, Lehtimäki T. Polymorphism in high density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. *BMJ* 319:487-489, 1999.
163. Demirdöğen BC, Demirkaya Ş, Türkanoglu A, Bek S, Arınç E and Adalı O. Analysis of paraoxonase 1 (*PON1*) genetic polymorphisms and activities as risk factors for ischemic stroke in Turkish population. *Cell Biochem Funct*; 27: 558–567, 2009.
164. Carey J, Ng D.M.S., Susan Y. Hama, Natividad Villa, Mohamad Navab, Srinivasa T. Reddy, The Paraoxonase Gene Family and Atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*; 38:153–163, 2005.
165. Chen Q, Reis S. E, Kammerer, C. M., McNamara, D. M., Holubkov, R., Sharaf, B. L., Sopko, G., Pauly, D. F., Merz, C. N., Kamboh M. I. Association Between The Severity of Angiographic Coronary Artery Disease and Paraoxonase Gene Polymorphisms in The National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am. J. Hum. Genet.*, 72:13-22, 2003.
166. Yamada YA, Niino F, Miki T, Shimokata H. Association of polymorphisms of paraoxonase 1 and 2 genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese. *J. Hum. Genet.*, 48:469-475, 2003.
167. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 276:44444-44449, 2001.
168. Liang H, L.L.D -P.L.C.-C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med*, 81:766–779, 2003.
169. Caslake MJ, Packard CJ, Suckling KE, Holmes SD, Chamberlain P, Macphie CH. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet activating factor

- acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 150:413–9, 2000.
170. Karasawa K, Harada A, Satoh N, Inoue K, Setaka M. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (*PAF-AH*). *Prog Lipid Res*;42:93–114, 2003.
171. Karabina SA, Gora S, Atout R, Ninio E. Extracellular phospholipases in atherosclerosis. *Biochimie* 92:594-600, 2010.
172. Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoprotein. *Trans Assoc Am Physicians*;105:44-63, 1992.
173. Stafforini DM, Satoh K, Atkinson DL, Tjoelker LW, Eberhardt C, Yoshida H, Imaizumi T, Takamatsu S, Zimmerman GA, McIntyre TM, Gray PW, Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency: a missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase. *J Clin Invest.*;97:2784–2791, 1996.
174. Şekuri C, Çam FS, Tengiz İ, Ercan E, Bayturan Ö, Berdeli A. Association of platelet-activating factor acetylhydrolase gene polymorphism with premature coronary artery disease in Turkish patients. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*. 6: 132-4, 2006.
175. Yamada Y, Ichihara S, Fujimura T, Yokota M. Identification of the G994*/T missense mutation in exon 9 of the plasma platelet activating factor acetylhydrolase gene as an independent risk factor for coronary artery disease in Japanese men. *Metabolism*. 47:177-81, 1998.
176. Derewenda ZS, Ho YS. PAF-acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta*;1441:229–36, 1999.
177. Burgers A.J., Bruynzeel L.B.P., Mengelers J.J.H. Occupancy of platelet receptors for platelet activating factor in asthmatic patients during an allergen-induced bronchoconstrictive reaction. *Journal of Lipid Mediators*, 7: 135-149, 1993.
178. Colhoun HM, Schalkwijk C, Rubens MB, Stehouwer CD. C-reactive protein in type 1 diabetes and its relationship to coronary artery calcification. *Diabetes Care*. 25:1813–7, 2002.

179. Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, et al. C-reactive protein and soluble vascular cell adhesion molecule-1 are associated with elevated urinary albumin excretion but do not explain its link with cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:593–8, 2002.
180. Fan P, Liu HW, Wan DH, Li Y, Song Q, Bai H. Altered distribution of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase between high-density lipoprotein and low-density lipoprotein in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* Jul 9. 2009.
181. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (*PON1* and *PON2*) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet*;62:36–44, 1998.
182. Hiramoto M, Yoshida H, Imaizumi T, Yoshimizu N, Satoh K. A Mutation in Plasma Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase (Val²⁷⁹→Phe) is a Genetic Risk Factor for Stroke. *Stroke.* 28:2417-2420, 1997.
183. Vibo R, Korv J, Haldre S, Roose M. First-year results of the third stroke registry in Tartu, Estonia. *Cerebrovasc Dis.* 18(3):227-231, 2004.
184. Amanda G, Dewey H, Macdonell R, McNeil J, Donan G. Incidence of the Major Stroke Subtypes. *Stroke.* 32: 1732-1738, 2001.
185. Stegmayr B, Asplund K. Exploring the declining case fatality in acute stroke. Populationbased observations in the northern Sweden MONICA Project. *J Intern Med*;240(3): 143-149, 1996.
186. Hong-Liang L, De-Pei L, Chihj-Chuan L. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *J Mol Med*; 81:766-79, 2003.
187. Demirdöğen BC, Türkanoglu A, Bek S, Sanisoğlu Y, Demirkaya Ş, Vural O, Arınç E, Adalı O. Paraoxonase/arylesterase ratio, *PON1* 192Q/R polymorphism and *PON1* status are associated with increased risk of ischemic stroke. *Clinical Biochemistry* 41:1–9, 2008.
188. Aydin M, Gencer M, Çetinkaya Y, Özkök E, Özbek Z, Kılıç G, Örken C, Tireli H and Kara I. *PON1* 55/192 Polymorphism, Oxidative Stress, Type, Prognosis and Severity of Stroke. *IUBMB Life*, 58(3): 165 – 172, 2006
189. Schiavon R, Turazzini M, De Fanti E, Battaglia P, Targa L, Del Colle R, FasolinA, SilvestriM, Biasioli S, Guidi G. *PON1* activity and genotype in patients

with arterial ischemic stroke and in healthy individuals. *Acta Neurol Scand*: 116: 26–30, 2007.

190. Shin B-S, Oh S-Y, Kim Y-S, Kim K-W. The paraoxonase gene polymorphism in stroke patients and lipid profile. *Acta Neurol Scand*: 117: 237–243, 2008.

191. Pasdar A, Ross-Adams H, Cumming A, Cheung J, Whalley L, Clair D and MacLeod MJ. Paraoxonase gene polymorphisms and haplotype analysis in a stroke population. *BMC Medical Genetics*. 7:28, 2006.

192. Ueno T, Shimazaki E, Matsumotoad T, Watanabe H, Tsunemi A, Takahashi Y, Mori M, Hamano R, Fujioka T, Soma M, MatsumotoK, Kanmatsuse K. Paraoxonase1 polymorphism Leu-Met55 is associated with cerebral infarction in Japanese population. *Med Sci Monit*. 9(6): CR260-264, 2003.

193. Motti C, Dessi M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB, Bernardini S, Fucci G, Federici G, Cortese C. A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis* 158:35–40, 2001.

194. Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K, Gradert A, Schumacher M, Watzinger N, Hartung HP, Kostner GM. Paraoxonase *PON1* polymorphism leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Stroke*. 29:2043–2048. 1998.

195. Ranade K, Kirchgessner TG, OIakoubova OA, Devlin JJ, DelMonte T, Vishnupad P, Hui L, Tsuchihashi Z, Sacks FM, Sabatine MS, Braunwald E, White TJ, Shaw PM, Dracopoli NC. Evaluation of the Paraoxonases as Candidate Genes for Stroke Gln192Arg Polymorphism in the Paraoxonase 1 Gene Is Associated With Increased Risk of Stroke. *Stroke*;36;2346-2350, 2005.

196. Baum L, Keung H, Woo KS, Tomlinson B, Rainer TH, Chen X, Cheung WS, Chan TKY, Thomas GN, Tong CSW, Wong KS. Paraoxonase 1 gene *Q192R* polymorphism affects stroke and myocardial infarction risk. *Clinical Biochemistry*.39:191–195, 2006.

197. Liu JL, Li JP, Wang XL, Yang Y. Relationship between *Q192R* polymorphisms in paraoxonase 1 gene and young ischemic stroke. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*.6;90(13):912-6, 2010.

198. Dahabreh IJ, Kitsios GD, Kent DM and Trikalinos T. Paraoxonase 1 polymorphisms and ischemic stroke risk: A systematic review and meta-analysis. *Genet Med*:12(10):606–615, 2010.
199. Indranil Banerjee. Relationship between Paraoxonase 1 (*PON1*) gene polymorphisms and susceptibility of stroke: a meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 25:449–458, 2010.
200. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, Hamada C, Kurihara Y, Shindo T, Oh-hashii Y and Yazaki Y. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 149: 435–442, 2000.
201. Voetsch B, Benke KS, Damasceno BP, Siqueira LH, Loscalzo J. Paraoxonase 192 Gln→Arg Polymorphism, An Independent Risk Factor for Nonfatal Arterial Ischemic Stroke Among Young Adults. *Stroke*.;33:1459-1464, 2002
202. Voetsch B, Benke KS, Panhuysen CI, Damasceno BP, Loscalzo J. The Combined Effect of Paraoxonase Promoter and Coding Region Polymorphisms on the Risk of Arterial Ischemic Stroke Among Young Adults. *Arch Neurol*. 61:351-356, 2004.
203. Lazarosa L, Markoulab S, Kyritsisb A. and Georgioua I. Paraoxonase gene polymorphisms and stroke severity. *European Journal of Neurology*, 17: 757–759, 2010.
204. Leu HB, Chung CM, Chuang SY, Baig CH, Cheni JR, Chen JW, Pan WH. Genetic variants of connexin37 are associated with carotid intima-medial thickness and future onset of ischemic stroke. *Atherosclerosis*, 214:101–106, 2011.
205. Balta G, Gurgey A, Kudayarov DK, Tunç B and Altay Ç. Evidence for the Existence of the PAF Acetylhydrolase Mutation (*Val279Phe*) in Non-Japanese Populations: A Preliminary Study in Turkey, Azerbaijan, and Kyrgyzstan. *Thrombosis Research*, 101:231±234, 2001.
206. Unno N, Nakamura T, Kaneko H, Uchiyama T, Yamamoto N, Sugatani J, Miwa M, Nakamura S. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency is associated with atherosclerotic occlusive disease in japan. *J Vasc Surg*.;32(2):263-7, 2000.

207. Zhang X, Yuan CL, Zhang HZ, Xu J, Wu J, Chen BL. Analysis of 994(G--> T) mutation in the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene in the patients with cerebral infarction. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 22(4):450-2, 2005.
208. Satoh K. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (*PAF-AH*) deficiency as a risk factor for stroke. *Brain Nerve*.;60(11):1319-24, 2008.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

ZONGULDAK KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

TOPLANTI KARARLARI

TOPLANTI TARİHİ : 17/12/2009
TOPLANTI NO : 2009/04

KARARLAR :

1- ZKÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet DURSUN'un "Büyük damar aterosklerozuna bağlı akut iskemik inme ile başvuran hastalarda PON1 (L55M, Q192R), PON2 (C311S) ve PAF-AH (V279F) gen polimorfizmlerinin ilişkisi" konulu çalışmasının; etik kurallara uygunluğuna, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Fonu tarafından proje kabul edildiğinde Etik Kurul Başkanlığımıza sunulmasına,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R



Algül DERE
Etik Kurul Sekreteri