T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KORONER KALP HASTALARINDA ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN (ADMA) DÜZEYLERİ VE DİMETİLARJİNİN DİMETİLAMİNO HİDROLAZ (DDAH, EC 3.5.3.18) ENZİMİNİN GENETİK VARYASYONUNUN İNCELENMESİ

Sedat ABUŞOĞLU
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

KONYA-2012

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KORONER KALP HASTALARINDA ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN (ADMA) DÜZEYLERİ VE DİMETİLARJİNİN DİMETİLAMİNO HİDROLAZ (DDAH, EC 3.5.3.18) ENZİMİNİN GENETİK VARYASYONUNUN İNCELENMESİ

Sedat ABUŞOĞLU
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

KONYA-2012

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ali ÜNLÜ hocamıza, desteklerini yanımda hissettiğim Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü asistanlarına ve değerli personeline, istatistiksel analiz kısmında yardımcı olan biyokimya uzmanı Hüseyin Tuğrul Çelik'e ve manevi desteklerinden ötürü ailem ve sevdiklerime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
KISALTMALAR iv
ŞEKİL LİSTESİ vi
TABLO LİSTESİ vii
1. GİRİŞ 1
2. LİTERATÜR BİLGİ 3
2.1. Ateroskleroz 3
2.2. Aterosklerozun Epidemiyolojisi 4
2.3. Aterosklerozun Patofizyolojisi 6
2.3.1. Endotel Disfonksiyonu 7
2.3.2. Ateroskleroza Yatkın Bölgeler 8
2.3.3. Yağlı Çizgiler 8
2.3.4. Plak Oluşumu 9
2.3.5. Lipid Çekirdek Oluşumu 12
2.3.6. Düz Kas Proliferasyonu 13
2.4. Ateroskleroz ve İnflamasyon 13
2.4.1. İnflamasyonun Sistemik Belirteçleri 15
2.4.2. Kararlı Aterosklerotik Plak 16
2.4.3. Kararsız Aterosklerotik Plak 17
2.5. Aterosklerozu Etkileyen Faktörler 19
2.5.1. Lipoproteinler 20
2.5.2. Sigara 20
2.5.3. Hipertansiyon 22
2.5.4. Diabetes Mellitus 22
2.5.5. Aile Öyküsü 23
2.5.6. Cinsiyet 23
2.5.7. Yaşlanma 24
2.5.8. İnflamasyon ve İnfeksiyon 24
2.5.9. Hemostatik Faktörler 25
2.6. Metil Arjininler 25

2.6.1. Metil Arjininlerin Oluşumları ve Çeşitleri 25
2.6.2. Asimetrik Dimetilarjinin 27
2.6.2.1 ADMA Metabolizması 28
2.6.3. DDAH Geninin Yapısı 30
2.6.3.1. DDAH Tek Nükleotid Polimorfizmleri 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM 33
3.1. Gereç 33
3.1.1. Vakaların Oluşturulması 33
3.1.2. Numunelerin Toplanması 33
3.1.3. Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler 33
3.1.4. Kullanılan Cihazlar 34
3.2. Yöntem 34
3.2.1. ADMA ve Arjinin Analizi 34
3.2.1.1. Mobil Faz A'nın Hazırlanması (82:17:1) 34
3.2.1.2. Mobil Faz B'nin Hazırlanması (22:77:1) 35
3.2.1.3. Mobil Fazların Filtrasyonu ve Degaze Edilmesi 35
3.2.1.4. ADMA Standart Hazırlanması 35
3.2.1.5. Arginin Standart Hazırlanması 35
3.2.1.6. Numune Hazırlanması 36
3.2.1.7. Türevleştirme 36
3.2.1.8. Kromatografik Analiz 36
3.2.2. DDAH1 geninin T87M Mutasyonunun İncelenmesi 37
3.2.2.1 Genomik DNA İzolasyonu 37
3.3.2.2. T87M Mutasyonunun İncelenmesi 37
3.2.3. İstatistiksel Analiz 39
4. BULGULAR 40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 46
6. ÖZET 50
7. SUMMARY 51
8. KAYNAKLAR 52
9. ÖZGEÇMİŞ 59

KISALTMALAR

ABD	: Amerika birleşik devletleri
ACE	: Anjiotensin dönüştürücü enzim
ADMA	: Asimetrik dimetilarjinin
AMI	: Akut myokard enfarktüsü
AT_1	: Anjiotensin reseptörü-1
β-FGF	: β-fibroblast büyüme faktörü
BAG	: Bozulmuş açlık glukozu
CAT	: Katalaz
CO	: Karbon monoksit
CRP	: C-reaktif protein
DDAH	: Dimetilarjinin dimetilamino hidrolaz
DM	: Diabetes mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
GMCSF	: Granülosit makrofaj uyarıcı faktör
HCl	: Hidroklorik asit
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
hs- CRP	: Yüksek duyarlılıklı C-reaktif protein
HT	: Hipertansiyon
ICAM-1	: İntra selüler adezyon molekülü
IFN-ɣ	: İnterferon gamma
IL-1	: İnterlökin-1
IL-1β	: İnterlökin-1β
IL-6	: İnterlökin-6
IL-7	: İnterlökin-7
IL-8	: İnterlökin-8
IR	: İnsülin direnci
KAH	: Koroner arter hastalığı
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LDLR	: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü
L-NMMA	: L-n metil arjinin
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein-1

MCSF	: Makrofaj koloni uyarıcı faktör
$MgCl_2$	: Magnezyum klorür
NF-KAPPA β	: Nükleer faktör kappa β
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
OPA	: O-pitaldehit
Ox-LDL	: Oksitlenmiş düşük dansiteli lipoprotein
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitör-1
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PCR-RFLP	: Polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
PDAY	: Gençlerde aterosklerozun patobiyolojik belirleyicileri
PDGF	: Platelet türevli büyüme faktörü
PECAM-1	: Platelet endotelyal hücre adezyon molekülü-1
PRMT	: Protein arjinin N-metil transferazlar
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SAH	: S-adenozil homosistein
SAM	: S-adenozil metiyonin
SDMA	: Simetrik dimetilarjinin
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
TF	: Doku faktörü
TG	: Trigliserid
TGF-β	: Doku büyüme faktörü-β
TNF-α	: Doku nekroz faktörü- α
TPA	: Doku plazminojen aktivatör
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Arjinin ve metil arjinin türevleri ve PRMT etkisi ile oluşumları 27

Şekil 2.2. ADMA metabolizması 30

Şekil 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait ADMA seviyelerinin ortalamaları 41

Şekil 4.2. Hasta ve kontrol grubuna ait Trigliserid seviyelerinin ortalamaları 42

Şekil 4.3. Hasta ve kontrol grubuna ait HDL-kolesterol seviyelerinin ortalamaları. 42

Şekil 4.4. Hasta grubundan DDAH 1 heterozigot bireyin genomik DNA görüntüsü 44

Şekil. 4.5. DDAH 1 wild tip bireyin genomik DNA görüntüsü 45

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Mobil fazların akış şeması 36

Tablo 3.2. DDAH 1 primer ve problarının erime sıcaklıkları 37

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait demografik veriler 40

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubuna ait biyokimyasal veriler 40

Tablo 4.3. Hasta grubunda ADMA, Total Kolesterol ve LDL-kolesterol arasındaki korelasyon grafiği 42

Tablo 4.4. Hasta grubuna ait demografik verilerin korelasyonu 43

Tablo 4.5. Kontrol grubunda ADMA, Total Kolesterol ve LDL-kolesterol arasındaki korelasyon grafiği 43

Tablo 4.6. Kontrol grubuna ait demografik verilerin korelasyonu 44

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar tüm dünyada farklı etnik gruplardaki erkek ve kadınlarda önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Kardiyovasküler hastalıklara yol açan durumlardan birisi koroner arterlerin daralmasına neden olan aterosklerozdur (Murray CJ ve ark 1997, Ross R 1986, Tousoulis D ve ark 2003).

Son yıllarda aterosklerozda inflamasyonun rolüne dair kanıtlar artmaktadır (Ross R 1993). İnflamasyonun ateroskleroz, ateromatöz plak büyümesi ve plak kopmasındaki rolünün daha iyi anlaşılması ileriki dönemde kardiyovasküler hastalık riski altında olan bireylerin tanımlanabilmesi için dolaşımda bulunan inflamasyon biyobelirteçlerine olan ilgiyi tetiklemiştir (Pearson TA ve ark 2003).

ADMA, serbest L-arjininin metilasyonu ile oluşmamaktadır. ADMA, hücre çekirdeğinde baskın olarak bulunan birtakım proteinler aracılığıyla L-arjininin posttranslasyonel modifikasyonu ile açığa çıkar. Arjinin kalıntılarının metilasyonu protein arjinin N-metiltransferazlar (PRMT) denen birtakım enzimlerce gerçekleştirilmektedir. Proteinler proteolize uğradığında serbest metilarjininler açığa çıkmaktadır.

İki tip PRMT aktivitesi bildirilmiştir. Tip 1, ADMA'i oluştururken tip 2 SDMA'i meydana getirmektedir (Tran CT 2003).

ADMA, Endotelyal NOS'ın aktivitesini azaltmak suretiyle vasküler yapıyı etkileyebilir. Hasarlanmış damar duvarını örten endotelyal hücreler, artmış hücre içi ADMA seviyelerine sahip olup bozulmuş endotelyum bağımlı vazodilatasyon gösterirler (Weidinger FF ve ark 1990, Masuda H ve ark 1999).

ADMA seviyesindeki yükseklikler aterogenezdeki klinik süreçlerle ilişkilidir. Değişik seviyelerde risk taşıyan Japon bireylerde yapılan bir çalışmanın çoklu değişken analizleri, ADMA düzeyi ve yaşın, karotid intima-media kalınlığının tek bağımsız göstergesi olduğunu bildirmektedir (Miyazaki H 1999).

ADMA'nin (fakat SDMA'nin değil) yıkımı büyük oranda DDAH enzimi tarafından gerçekleştirilir (McDermott JR 1976, Murray-Rust J ve ark 2001).

DDAH enziminin DDAH 1 ve DDAH 2 olmak üzere 2 izoformunun olduğu, azalmış DDAH fonksiyonelliğine yol açabilecek polimorfizmlerin ADMA birikimi ile sonuçlanabileceği ve NO sinyalizasyonunda düşüşe yol açabileceği bildirilmektedir. Araştırmacılar bu nedenle baskın form olan DDAH 1 enzim formunun hastalık araştırmalarında aday bir gen olabileceğini bildirmektedirler (Pankaj Sharma ve ark 2010).

DDAH2/ ADMA yolağının kardiyak NO üzerine etkilerinin olduğu fakat normal koşullarda kan basıncına ılımlı etkiler sağladığını gösterdiğini bildirmişlerdir (Kazuhiro Hasegawa ve ark 2007).

Çalışmamızda koroner kalp hastalarında arginin metabolizmasında ortaya çıkan değişikliklerin araştırması amaçlanmıştır. Bu çalışmada çalışmaya gönüllü olarak katılan koroner kalp hastalarında ADMA seviyeleri ve DDAH(EC 3.5.3.18) enziminin genetik varyasyonu incelenmiştir. Koroner kalp hastalığı olan bireylerde genetik olarak polimorfizm olması kardiyovasküler olaylara yatkınlığı arttırabilir. DDAH enziminde bu genetik değişimin saptanması ile bu hastalık grubunda daha ileri tedavi protokolleri geliştirilmesine katkı sağlaması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz, plazma kaynaklı aterojenik lipoprotein birikimine karşı arter intimasında gelişen kompleks inflamatuar, bir yanıttır (Tamminen M 1999). Orta ve büyük çaplı arterlerin intima ve mediasında ilk önce endotel bozuklukları devamında aterosklerotik plak gelişimi ile sonuçlanan yaygın yapısal değişimlere neden olur (Nenci GG, 1999).

Ateresklerozun koroner arterlerde meydana gelmesi ile oluşan hastalığa Koroner Arter Hastalığı (KAH) denilmektedir.

Ateroskleroz elastik arterlerin (aorta ve popliteal arterler) ve büyük-orta büyüklükteki müsküler arterlerin (koroner ve popliteal arterler) hastalığıdır. Nadiren daha küçük arterler etkilenirler. Ateroskleroz; nedenleri tespit edilip tedavi edilirse durdurulabilen veya geriletilebilen çok faktörlü, sadece koroner arterleri değil tüm arterleri tutabilen sistemik bir hastalıktır (Cem H 2002). Endotel fonksiyonlarının bozulması ile başlayan aterotrombotik süreç, aterom plağının oluşması, komplike olması ve üzerine trombüs oturmasıyla, akut iskemik olaylar olarak klinikte ortaya çıkarlar. Makrofajlar, lenfositler ve trombositler süreçte yer alan diğer önemli hücrelerdir. İnflamatuar sitokinler ve litik enzimler hem sürecin ilerlemesine hem de plağın yarılabilir olmasına katkıda bulunurlar (Ören Z 2004).

Dolaşımdaki monositler damar duvarına göç etmekte ve endotelyal hasara yol açabilecek çok sayıda sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımına yol açmaktadır. Ateroskleroz gelişiminde kişisel ve çevresel faktörler rol oynamakta olup kişisel faktörler birinci derece akrabalarda koroner arter hastalığı olması, hipertansiyon, kolesterol yüksekliği, diabetes mellitus olması, yaş ve netleştirilmemiş genetik faktörlerdir. Çevresel veya sonradan edinilen risk faktörleri ise sigara kullanımı, yüksek kolesterol içerikli beslenme, stresli ve pasif yaşam şeklidir.

Genetik faktörler nadiren tek başlarına semptomatik ateroskleroza (örn, homozigot LDLR eksikliği) neden olabilirler. Bireyin proaterojen faktörlere cevabını ve damar duvarının aterojen uyarıya yatkınlığını sıklıkla genetik yapı belirler. Ancak

çevresel faktörler hastalığın ilerleme hızını (plak oluşumu) belirgin şekilde etkileyerek KAH gelişip gelişmeyeceğini belirler (Solberg LA ve ark 1983).

Bazı kişiler ateroskleroza diğer insanlardan daha yatkındır (örn, erkekler kadınlara göre) ve aynı durum aynı kişide farklı arter segmentleri için de geçerlidir. Kişinin proaterojenik faktörlere cevabını ve damar duvarının aterojen uyarıya yatkınlığını genellikle genetik yapı belirler. Ancak çevresel faktörler hastalığın ilerleme hızını belirgin olarak etkiler ve KAH gelişip gelişmemesinde etkili olurlar (Falk E ve ark 2004).

2.2. Aterosklerozun Epidemiyolojisi

Ateroskleroz, geleneksel olarak gelişmiş ülkelerin bir sorunu olarak kabul edilmesine rağmen, bu tablo günümüzde değişmiştir. Gelişmekte olan ülkelerin, enfeksiyon hastalıkları ile savaşta başarılı olması, çok sayıda kişinin, ileri orta yaş dönemi ve yaşlılık dönemine kadar yaşamasına yol açmıştır. Bu toplumlarda, koroner hastalığın insidansı, Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya'ya göre daha düşük olmakla birlikte, risk altında olan kişilerin sayısının fazla olması ve Çin gibi bölgelerde, felç insidansının nisbeten yüksek olması, aterosklerozu dünya genelinde, en önde gelen ölüm nedeni haline getirmektedir (Crawford ve ark 2003).

Ateroskleroz toplumda en sık rastlanan hastalık olup, en fazla sakatlanmaya ve ölüme yol açan hastalıktır. Ana belirtilerini koroner arter hastalıkları ve iskemik inme olarak yapar. Kuzey Amerika ve Avrupa'daki ölümlerin üçte birinden sorumludur (Hankey G 1998). ABD ve Avrupa'da (17 Batı Avrupa ülkesinde) yıllık myokard enfarktüsü insidansı (yeni olgu/yıl) 2.1 milyon, iskemik inme insidansı ise 1.75 milyondur. Ancak aterotrombotik olaylara bağlı gelişen komplikasyonlar bölgeden bölgeye değişmektedir. Aterosklerotik myokard olaylarının ABD' de (350 yeni olgu/100.000/yıl) diğer Avrupa ülkelerine (Fransa; 150 olgu; İtalya 150 olgu; İngiltere 250 olgu/100.000 populasyon/yılda) göre insidansı daha fazladır. İskemik aterosklerotik inmeler açısından bakıldığında bu ülkelerdeki insidans benzer olup, 120-180/100.000/yıl olarak değişmektedir (Giroud M ve ark 1991).

Türkiye'de epidemiyolojik verilere göre 1000 erişkin nüfusta 63 kalp hastasının 35'i aterosklerotik koroner, 20'si de hipertansif kalp hastasıdır. Türkiye

genelinde erişkinlerde, aterosklerotik kalp hastalığı prevelansı %3.8 (erkeklerde %4.1, kadınlarda %3.5)'dir. Aterosklerotik koroner kalp hastalığı prevalansı %2 veya altında iken 50-59 yaşlarında %8 sıklığındadır. Aterosklerotik vasküler risk faktörlerinden hastaların %36'sında hipertansiyon, %27'sinde sigara içimi, %16'sında hiperkolesterolemi, %16'sında obezite, %7.5'unda diyabet saptanmıştır. TEKHARF çalışmasının sonuçlarına göre aterosklerotik kalp hastalıklarında hipertansiyon 3.2 kat, yüksek kolesterol veya diyabet normalden 2 kat daha sıktır. Hipertansiyon 50 yaş üzeri erkeklerin %7.8'inde, kadınların %14'ünde mevcuttur. Önemli risk faktörlerinden olan diyabetin erkeklerde %2.5'luk prevelansına karşın kadınlarda prevelans %4'tür. Bir başka risk faktörü olan obezite, ülkemizde erkeklerde %9 civarında iken kadınlarda %30 gibi yüksek rakamlara çıkmaktadır. Sigara içimi ise erkeklerde %59-60'lı rakamlara çıkmakta ise de kadınlarda %19 dolayındadır (Onat A 1996).

Semptomatik aterosklerozu olan hastaların izlemi ve bakımı, geleneksel olarak tıbbi uygulamanın birçok dalları arasında paylaştırılmıştır. Ateroskleroz. birden fazla hastalığa neden olan bir patofizyolojik süreç olarak kabul edilir. Kardiyologlar koroner hastalıkla, nörologlar serebrovasküler hastalıkla ve damar cerrahları, karotis ve periferik arterlerdeki aterosklerozla ilgilenirler. Aslında bu ayrım tamamen sunidir çünkü ateroskleroz sistemik bir hastalıktır (Crawford ve ark 2003).

Türk Kardiyoloji Derneğinin 2000 yılında yayınladığı raporda hastalığın ülkemizdeki önemi vurgulanmaktadır. Buna göre aterosklerozun neden olduğu koroner arter hastalıkları ve inmeden kaynaklanan ölümlerin, tüm ölüm nedenlerinin %43'ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir.

Bu rakamlar Avrupa ülkeleri ile kıyaslandığında, koroner ölüm oranının erkeklerimizde en yüksek mortaliteye sahip olduğu bilinen Baltık ülkeleri ve Rusya sınıflamaya dahil edilmediğinde ilk sırada yer aldığı, kadınlarımızda ise, Ukrayna kadınlarında görülen ölüm oranından sonra ikinci sırada olduğu bildirilmektedir (Türk Kalp Raporu 2000).

Etyolojik, patofizyolojik, klinik ve epidemiyolojik karmaşıklığına rağmen, ateroskleroz önlenebilir bir hastalıktır. Bu konu ile ilgili pek çok bulgu vardır. Temel

epidemiyolojik incelemeler, ateroskleroz ile ilişkili klinik olayların insidansında çok fazla değişiklik göstermektedir. Örneğin, orta yaşta, akut miyokard enfarktüsü (AMI), erkeklerde, kadınlara göre 3-4 kat daha fazladır ve iskemik kalp hastalığına bağlı mortalite oranları, sadece Avrupa'da dört kat değişim göstermektedir (Tunstall-Pedoe H ve ark 1999). Ancak, en önemli nokta, aterosklerotik hastalıkların insidansının, nisbeten kısa süreler içinde, her iki yönde de radikal olarak değişebilmesidir. Bu değişiklikler, genetik faktörlerle açıklanamayacak kadar fazla ve hızlıdır; bunlar çevrede veya davranışta değişikliklerin etkisini yansıtmaktadır. Bu tür ipuçları, bilim insanlarını, değiştirilebilir risk faktörlerini temel analitik epidemiyolojik çalışmalar ile araştırmaya yönlendirmiştir (Crawford ve ark 2003).

2.3. Aterosklerozun Patofizyolojisi

Ateroskleroz fizyopatolojisini Virchow üçlüsü ile tanımlarsak damar duvarındaki değişiklikler, kan akımında meydana gelen bozukluklar ve kanda dolaşan sistemik faktörlerdir.

Aterosklerotik süreç, bilinen risk faktörlerinin (hiperlipidemi,hipertansiyon, diyabet, yaşlanma, sigara) endoteli bozması ile başlar. Damar içi homeostaz ve homeostazın düzenlenmesinde temel bir rol üstlenen endotel hücrelerinin fonksiyonunun bozulması, bu hücrelerin, aterotromboza karşı koruyucu nitelikteki maddeleri (nitrik oksit, prostaglandin) üretme yeteneğini azaltır.

Sürekli mikrotravma altında bulunan damar ağızları, çatallanma ve kıvrılma bölgeleri, endotel fonksiyon bozukluğunun ilk görüldüğü damar yerleridir. Seçici geçirgen ve antitrombotik özelliğini yitiren endotel, hücre ve yağların geçişine izin verirken, lipoprotein oksidasyonu, düz kas proliferasyonu, hücre dışı matriks oluşumu ile parçalanmasını ve trombositlerin aktiflenmesini uyarır (Fuster V ve ark 2003).

Endotel altında depolanmaya başlayıp okside olan lipoproteinler inflamatuar sürecin başlamasını tetikler. Bu şekilde salınımı artan bazı adezyon molekülleri, kemoreaktanlar ve büyüme faktörleri süreci tetikler (Rauch U ve ark 2001).

2.3.1. Endotel Disfonksiyonu

Endotel sağlıkta ve hastalıkta kalp-damar işlevlerinin devamlılığını sağlayan önemli bir organdır. Endotel hücreleri uzun yıllar yalnızca kan ve damar düz kası arasında yarı geçirgen ve damar duvarını koruyucu bir bariyer olarak düşünülmüştür.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ise endotelin damar düz kas mitojenitesi, vasküler tonus, trombositlerin antiadezif ve antiagregan etkileri, lökosit fonksiyonları, koagülasyon mekanizması, angiogenez, tümör büyümesi ve yayılması üzerinde aktif rol oynayan kompleks bir organ sistemi olduğunu göstermiştir. Nitekim erişkindeki toplam endotel kitlesi 1.5 kg ile yaklaşık olarak karaciğer kütlesi kadardır (Di Corleto PE ve ark 1996).

Aterojenik uyarılar endotel yapı ve fonksiyonlarında adaptasyonla ilgisi olmayan değişiliklere yol açabilir (Falk E ve ark 2004). Endotel hücrelerinin fonksiyonunun bozulması, bu hücrelerin, aterotromboza karşı koruyucu nitelikli maddeleri (nitrik oksid, prostaglandin) üretme yeteneğini azaltırken süreci tetikleyen adezyon moleküllerinin (hücrelerarası adezyon molekül-1, VCAM-1 ve selektin) ve kemoreaktanların (monosit kemoreaktan protein-1, makrofaj koloni uyarıcı faktör, interlökin-1, interlökin-6, interferon-α ve interferon-γ) salgılanmasını artırır (Ören Z 2004). Endotel disfonksiyonuna neden olan bu maddeler ile birlikte pro ve antitrombotik faktörler, büyüme faktörleri, inhibitörleri ve vazoaktif faktörlerin fonksiyonlarındaki bölgesel dengesizlikler aterosklerozun başlama, ilerleme ve klinik komplikasyonlarında önemli rol oynarlar (Di Corleto PE ve ark 1996). Aterosklerotik plağın oluşumunda ve klinik tablo oluşturacak şekilde bozunmasında yüzey proteinleri önemli rol oynar. Bu sürecin önemli hücreleri endotel, lökosit ve trombositlerin yüzeyinde beliren, inflamasyon ve trombozun ortaya çıkışına katkıda bulunan bu proteinler, başlıca üç grupta toplanabilirler: Selektinler, immuglobulin üst ailesi ve integrinler (Rugger LF ve ark 2002). Selektinlerin görevi lökosit ve trombositlerin endotel hücresi ile etkileşimlerini düzenlemektir. P-selektin trombositlerin, E-selektin endotel hücresinin inflamasyon ile uyarılması sonucunda belirirken, lökositlerin uyarılması ile yüzeylerinde L-selektin düzeyi artar.

Adezyon molekülleri immunglobulin üst ailesinde yer alır. Bu moleküller nükleer reseptör NF Kappa-β'nın kontrolü altındadır. Damarsal hücre adezyon

molekülü (VCAM-1), hücre içi adezyon molekülü 1 ve 2 (ICAM-1 ve 2) ve trombosit-endotel adezyon molekülü-1 (PECAM-1), hem hücrelerin plağa tutunmasını sağlar hem de kronik inflamatuar süreçte rol alırlar. İntegrinler, trombosit-endotel, trombosit-lökosit ve endotel-lökosit arasındaki ilişkide etkili olan proteinlerdir. Trombositlerin aterotrombotik süreçte rolünü belirleyen integrinlerdir.

Bunlardan en çok üzerinde çalışılanı Glikoprotein IIb/IIIa'dır ve agregasyon ile trombüs oluşumunda temel rol üstlenmektedir (Rugger LF ve ark 2002).

Aterosklerozda önemli rol üstlenen bir başka madde grubu da reaktif oksijen türleridir (ROS). İnflamasyon, yaralanma ve onarımda sentezleri artar. Aterosklerozda plağın oluşmasında, yüksek riskli duruma gelmesinde ve trombüs oluşmasında etkilidirler. Bilinen bütün risk faktörleri oksidatif stresi artırırlar (Rugger LF ve ark 2002).

2.3.2. Ateroskleroza Yatkın Bölgeler

Aterojenik uyarandan bağımsız olarak özellikle bifurkasyonlarda olmak üzere doğumdan itibaren herkeste belli bölgelerde tıkayıcı olmayan intimal kalınlaşmalar vardır. Bu intimal kalınlaşmalar zamanla ilerler. Adaptif intimal kalınlaşmalar basınç, çevresel gerilim veya baskı ve shear stres (dilatasyon) gibi mekanik güçlere yanıt olarak gelişir (Hughes SD ve ark 1997). Azalmış duvar shear stres ve artan basınç (HT) adaptif intimal kalınlaşmayı teşvik ederek basıncı normale çekmeyi hedefler. Ekzantrik intimal kalınlaşma sıklıkla basıncın eşit dağılmadığı bifürkasyonlara yakın ve dallanma bölgelerinde görülür (Stary HC ve ark 1992).

Kanıtlar akım özelliklerinden daha çok damarın şeklinin adaptif intimal kalınlaşma miktarını belirlediğini ve sonunda semptomatik lezyon oluşumu için risk faktörü oluşturduğunu düşündürmektedir (Weninger WJ ve ark 1999).

2.3.3. Yağlı Çizgiler

Aterosklerozun erken lezyonları özellikle disfonksiyone endotelde, intimal kalınlaşmanın olduğu ateroskleroza meyilli bölgelerde oluşur. İnflamasyon ve immün yanıtlar aterogenezin daha en başında önemli rol oynarlar (Ross R 1999).

Hiperkolesterolemi endotel geçirgenliğinde artma, hücre göçünde artma ve lipoproteinlerin intimada birikmesi ile ve endotel aktiflenmesi monosit ve T lenfosit toplanmasına yol açan VCAM-1' in fokal ekspresyonu ile ilişkilidir. İntimada monosit kökenli makrofajlar kandan gelen LDL' leri, olasılıkla oksidatif değişimden sonra çöpçü (scavenger) reseptörleri aracılığıyla içeri alırlar ve lipidden zengin köpük hücrelerine dönüşürler. Bu enflamatuvar hücreler erken yağlı çizgi lezyonlarının esas kısmını oluştururlar. T hücre ve makrofaj oranı 1:10 ila 1:50' dir.

Aktif makrofaj ve T lenfositlerin varlığı aterosklerotik plakta immunolojik bir reaksiyonun varlığını gösterir. Yağlı çizgilerin olgun aterosklerotik plaklara dönüşmesinde olasılıkla önemli rol alırlar (Hansson GK 1996). Yağlı çizgiler lümen içine uzanmaz ve dolayısıyla semptoma neden olmazlar (McGill HC Jr 1984).

İntimada lipid yüklü köpük hücreleri çıplak gözle sarı nokta veya yarık şeklinde yağlı çizgiler görülebilir. Yakın zamanda yağlı çizgilerin insan fetüslerinde de olduğu fakat geç gebelikte ve erken çocukluk döneminde düşük kan kolesterolüne bağlı olarak fetal aortik yağlı çizgilerin gerileyebileceği ve çocukluk döneminden sonra tekrar ilerleyebileceği gösterilmiştir (Napoli C 1999).

Geç dönemde erkeklerde lezyonların daha ileri olmasına karşı hayatın erken döneminde yağlı çizgiler kadınlarda erkeklerden daha fazladır (McGill HC Jr 1997).

2.3.4. Plak Oluşumu

Normal arter 3 ayrı katmandan oluşur. İçten dışa endotel, media ve adventisya.

Tek katlı endotel hücreleri ile kaplı intimaya bitişik olan subintima tabakasına vasküler düz kas hücreleri gömülüdür. Tunika media ile arasında iç elastik lamina vardır. Tunika media düz kas hücreleri zengin kollajen ve elastin arasına gömülüdür.

En dış tabaka olan adventisya ile media arasında da dış elastik lamina bulunur. İntima tabakasındaki yağlı çizgiler, tümü endotel hücrelerini örseleme potansiyeline sahip vasküler risk faktörlerinin bir veya daha fazlasının gelecekteki lezyon noktasında kritik eşiğe ulaşmaları halinde gelişmeye başlar.

Bu saldırı ile endotel hücreleri dolaşımdaki monositleri kendisine bağlayan ve adezyona neden olan molekülleri salgılamalarını tetikler. Zamanla biriken monositler endotel hücreleri arasındaki mesafelere sızarlar. Bu birikim klasik inflamasyon yanıtı meydana getirir. Monositler bu göç esnasında makrofajlara dönüşür. Bunlar okside LDL'lerdeki yağ asitleriyle karşılaşınca vasküler hücrelerden salgılanan kemoatraktan sitokinlerin de (örn. Kemokin Makrofaj Kemoatraktif Protein 1) etkisiyle subintimal mesafeye göçerler.

Makrofajlar modifiye olup, okside LDL'leri tanıyan reseptörlerinin ekspresyonunda artış gösterebilirler. Böylece okside LDL'deki yağ asitlerini alan makrofajlar köpük hücrelerine dönüşürler. Makrofajlar diğer yandan 15-lipooksijenaz yardımıyla LDL oksidasyonuna neden olmaktadır. Bu esnada üstündeki endotel hücreleri arasında ayrılmalara neden olup bu alanların kanla direkt temasına neden olurlar. Bu alanlara trombositler yapışır ve aktiflenen bu trombositler salgıladıkları sitokinlerle trombüs oluşma potansiyelini artırırlar. Gelişen plak olgunlaşırken üzerinde fibröz bir başlık oluşur ve bu lümene taşarak çeşitli düzeyde tıkanmalara neden olabilir. Tunika mediadaki düz kas hücreleri subintimal mesafeye göçedip plak yatağı materyali salgılar. Metalloproteinler de salgılayan düz kas hücreleri fibröz başlığı dirsek noktasından inceltir. Fibröz başlık yırtılmasına kadar ilerleyen bu incelmeyle plak içeriği prokoagulasyon elemanları ile temas eder. Böylece akut pıhtı oluşur. Bu akut pıhtı damar lümeninde geri kalan kısmı tamamen kapatırsa tıkanmanın distalinde kalan dokularda bir infarktüs gelişmiş olur.

Yırtılan plakların çoğu, fokal kalsifikasyon alanları içermektedir. Bu oluşumu indükleyenler arasında okside steroller ve bazı vasküler hücrelerden türeyen transforme edici gelişme faktörü beta (TGF-β) bulunmaktadır (Di Corleto PE ve ark 1996).

American Heart Association plak tiplerini isimlendirmede şu şekilde bir sınıflandırma kullanmıştır (Stary HC ve ark 1995):

Tip I (ilk lezyon) monositlerin endotel yüzeyine yapışıp arter lümeninden intimaya geçmeleriyle olur.

Tip II lezyon köpük hücrelerinin sağlam endotel altında bölgesel kümelenmesinden oluşan yağlı çizgilerdir.

Tip III lezyon ek olarak az miktarda ekstrasellüler lipid kümeleri içerir.

Tip I-III lezyonlar daha ileri lezyonların öncülleri olmalarına karşın klinik semptomlara yol açmazlar.

Tip IV lezyonda endotel altında lezyon içinde düz kas hücreleri belirir ve ekstrasellüler lipid kümeleri bir araya gelerek bir lipid çekirdek oluştururlar.

Tip V lezyonda yoğun bağ dokusu depolanması söz konusudur ve lipid çekirdeği çevreleyen fibröz bir kapsül oluşur. Çekirdeği lümenden ayıran kapsül kısmı plak başlığıdır.

Tip Va lezyonlar bir lipid çekirdek ile bir fibröz başlık içerir.

Tip VI plaklar çoğunlukla Tip Va plaklarda gelişen trombozun komplike ettiği plaklardır.

Tip Vb yoğun kalsifikasyon bulunan plaklardır.

Tip Vc lezyonları ise neredeyse tamamen kollajen ve düz kas hücrelerinden oluşur.

Bu nedenledir ki, akut aterotrombotik olay oluşma olasılığı, plağın damar lümeninde oluşturduğu darlık düzeyinden çok lezyonun yapısı ile ilişkilidir. Nitekim yapılan çalışmalarda akut koroner sendromların ortaya çıkmasına neden olan lezyonların %75 olasılıkla kritik düzeyde darlık oluşturmayan plaklar olduğu gözlenmiştir (Falk E ve ark 1995). Anjiyografik olarak gösterilen darlık düzeyinin aslında plağın büyüklüğünü de tam olarak yansıtmadığı bilinmektedir. İntimada oluşmaya başlayan her aterosklerotik plağın büyümesi başlangıçta lümene doğru olmayabilmektedir.

Plağın büyümeye başlamasıyla birlikte medya tabakası atrofiye olup plağa direnç göstermezse, büyüme lümene doğru değil de duvara doğru olur. Bunun

sonucunda lümen çapında bir azalma olmaz, damarın o kesimiyse bütünüyle daha geniş görülür (Glagov S ve ark 1987).

Birçok tip IV ve tip Va plağı kaplayan endotel yüzeyinde endotel hücrelerinin kaybolduğu, küçük alanlarda subendotelyal bağ dokusunun açığa çıktığı ve trombositlerin yapıştığı ultramikroskopik alanların oluştuğu gösterilmiştir. Bu sürecin ilerleyen plak üzerinde endotelin soyulduğu büyük alanlar oluşturması semptomlara yol açabilecek çok daha büyük trombüslerin açığa çıkmasına neden olur (Burring KF 1991).

Güncel ve farklı bir yaklaşıma göre plak büyümesi yukarıda tanımlandığı gibi gittikçe dikleşen sabit bir eğriyi izleyerek değil, basamak biçiminde olmaktadır. Durağan ve etkin dönemlerin zaman içinde birbirini izlemesi sonucunda plak basamak biçiminde bir büyüme göstermektedir (Libby P 2001).

2.3.5. Lipid Çekirdek Oluşumu

Lipid çekirdekler intima bağ dokusu matriksinde hücre kalıntıları ve kolesterolle dolan potansiyel boşluklardır. Aktif plaklarda çekirdek kenarında toplanan çok sayıda makrofaj bulunur. Salgılanan bir dizi metalloproteinaz olasılıkla kollajen matriksin yıkımında aktif rol alır. Hücre dışı lipidin bir kısmı doğrudan intimada proteoglikanlara bağlı olan LDL'den kaynaklanabilir (Guyton JR ve ark 1994).

LDL'nin intimadan eliminasyonu sınırlıdır, çünkü bu bölgede mikrodamar sistemi eksiktir. Bu nedenle LDL ekstrasellüler matriks içinde tutulur (Nordestgaard BG 1996).

Ancak lipid çekirdeğindeki kolesterol ve lipid esterleri büyük oranda ölen köpük hücrelerinin sitoplazmasından salınır. Çekirdekteki makrofajların doku faktörü (TF) salgılaması bu alanı arter lümenine maruz kaldığında hayli trombojenik kılar (Badimon J ve ark 1999).

2.3.6. Düz Kas Proliferasyonu

Özellikle laktat, adenozin ve karbonmonoksit (CO) gibi metabolitlerin toplanması durumunda vasküler düz kaslar, koroner arter açıklığını düzenleyerek iskemiye karşı koruyucu olur. Bu mekanizmalar spontan trombüs oluşumunun önlenmesinde birbirlerine yardımcı olurlar. Ancak aterosklerotik plak varsa, bu koruyucu mekanizma bozulabilir ve sonuçta trombotik oklüzyon gelişir (Gök H 1996).

Arter duvarının asıl kitlesini oluşturan düz kas hücreleri yağ dokusu molekülleri ve PDGF-AA gibi büyüme faktörlerini üretmektedir. Endotel, T lenfositler trombositler ve makrofajlar ile reaksiyona giren düz kas hücreleri, değişik sitokinler, büyüme faktörlerini düzenleyen moleküller, vazokonstrüktör ve vazodilatatör maddelerin oluşumuna neden olurlar. Bu hücreler ateroskleroza özgü lipid dolu hücreler (köpük hücreleri) haline dönebilmektedir (Onat T 2002). Lipid çekirdekleri olan plakların başlıkları bağ dokusu matriksini üreten düz kas hücrelerinin lakünlerini içeren kollajen kafesten oluşmuştur. İntimal düz kas hücreleri apopitozisle ölmeye eğilimlidirler ve başlıkların çoğu göreceli olarak asellüler kalır. Kollajen depolanması yanı sıra düz kas hücre göçü ve çoğalması düz kas hücrelerinin kendileri de dahil hemen hemen tüm hücreler tarafından üretilen büyüme faktörlerince sürdürülür (Libby P 2001).

2.4. Ateroskleroz ve İnflamasyon

Aterosklerotik damar hastalığı tipik bir çevre gen etkileşimidir. Genetik eğilimi olan kişilerde çevresel risk faktörleri tetiği çekerek proinflamatuvar bir yanıt başlatır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, sigara, kolesterol, hipertansiyon, diabetes mellitus gibi risk faktörlerinin ateroskleroz gelişimindeki rolünü kanıtlamıştır. Deneysel çalışmalar ise bu risk faktörlerinin genel inflamatuvar bir yanıt başlatarak vücutta yaygın bir reaksiyon oluşturduğunu göstermiştir. Risk faktörlerine yanıt olarak hem sistemik akut faz reaktanları aktiflenir, hem de endotelden bir sinyal trafiği başlar (Guyton JR ve ark 1994).

Normalde parlak kaygan ve trombüs oluşumunu engelleyici özellikte olan endotel risk faktörlerinin etkisi ile kayganlık özelliğini kaybeder, yapışkan ve

protrombotik hale gelir. Erken yaşlardan itibaren risk faktörlerine maruz kalan endotel hücrelerinden adezyon molekülleri (VCAM-1, ICAM) büyüme faktörleri (PDGF, β-FGF, TGF-β, IL-1, TNF-α) ve sitokinler (MCSF, GMCSF) salınmaya başlar (Nordestgaard BG 1996).

Tek bir öğün aşırı yağlı yiyecekler yemenin bile endotel fonksiyonunu bozduğu, CRP düzeylerini yükselttiği ve adezyon moleküllerini arttırdığı gözlenmiştir (Badimon J ve ark 1999).

Yapılan hayvan deneylerinde kolesterolden yüksek diyetle beslenen hayvanlarda birkaç hafta içinde endotel bozulup yapışkan bir hale gelir ve adezyon moleküllerini salgılamaya başlar (Gök H 1996).

VCAM-1 hem monositleri hem de T lenfositleri bağlar. Endotele bağlanan bu hücreler subendotelyal bölgeye 'diapedez' diye adlandırılan bir mekanizma ile geçer ve burada birikir. Monositlerin subendotelyal bölgeye geçmesi için monosit kemoatraktan protein (MCP-1) isimli kemokinin bulunması gereklidir. Transgenik olarak MCP-1 salgılayamayan deney hayvanları oluşturulduğunda bu hayvanlarda subendotelyal lipit birikiminin hemen hemen hiç olmadığı görülmüştür (Onat T 2002). T hücreleri ise farklı kemokinlerin etkisi ile subendotelyal bölgede birikir. Son zamanlarda mast hücrelerinin de benzer mekanizmalarla biriktiği gösterilmiştir.

Damarda oluşan yangı nedeni ile salgılanan bu proteinler erken aterosklerotik lezyonun en önemli sorumlularıdır.

Bir yandan endotelde inflamatuar yanıt sürerken öte yandan sistemik bir subklinik inflamasyon da süregelmektedir. OxLDL gibi proinflamatuvar risk faktörleri primer proinflamatuar sitokin adı verilen IL-1 ve TNF-α' yı aktiflerler (Abdalla Abbas M ve ark 2008).

Bu primer proinflamatuvar sitokinler IL-6' yı aktifleyerek karaciğerden CRP, SAA gibi akut faz reaktanlarının salınmasına yol açarlar.

Sistemik subklinik inflamasyonun varlığını, kanda bazı akut faz reaktanlarını ölçerek veya endotelden salınan periferik belirleyicileri ölçerek anlamak mümkündür. Aterosklerotik sürece bağlı arttığı bilinen ve inflamasyonun bir

göstergesi kabul edilen akut faz reaktanları şunlardır: CRP, fibrinojen, faktör 7, PAI-1, tpa, lipoprotein (a) (Guyton JR ve ark 1994).

Bunlardan klinikte en fazla kullanılanı hsCRP olarak adlandırılan yüksek duyarlıklı CRP' dir (58). CRP iyi bir inflamasyon göstergesidir çünkü değerleri zaman içinde stabildir (Rizzo M ve ark 2009). İnflamasyon dışındaki bir nedenle yükselmez.

Oldukça hassas ve ucuz bir testle değerleri ölçmek mümkündür. Yapılan çalışmalarda CRP düzeylerinin diğer risk belirleyicilerine ilave etkisinin olduğu gösterilmiştir. Örneğin Physicians Health Study' de total kolesterol/HDL oranı güçlü bir risk göstergesidir (Ridker PM ve ark 1997). Ancak, CRP değerlerini de buna ilave edince risk belirlemede ilave bir duyarlılık kazanılır. En yüksek risk altındaki grup hem total kolesterol/HDL oranı yüksek hem de CRP düzeyleri yüksek olan gruptur. PROVE-IT çalışmasında, kişideki risk faktörü sayısı arttıkça buna paralel CRP değerlerinin de arttığı gösterilmiştir (Cannon CP ve ark 2004).

2.4.1. İnflamasyonun Sistemik Belirteçleri

Aterosklerotik arterdeki inflamatuar süreç, inflamatuar sitokinler ve diğer akut faz reaktanlarının artışına yol açar. Kararsız anjina pektoris ve AMI olan hastalarda, artmış CRP ve IL-6 düzeyleri kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Aynı zamanda bu hastalarda diğer antiinflamatuar belirteçlerden IL-7, IL-8, çözünür CD 40 ligand ve CRP ile ilişkili protein pentraksin-3 düzeyleri de artmıştır (Wilhelmsen L ve ark 1984).

Kararsız anjina pektorisdeki yükselmiş CRP düzeyi olasılıkla aterosklerotik plaktaki koroner trombozise bağlı olup, vazospazma bağlı varyant anjinada CRP düzeyinde yükselme görülmez (Liuzzo G ve ark 1996). Akut koroner sendromu olan hastaların kanında aktiflenmiş inflamatuar T hücrelerinin sayısı artmıştır (Caligiuri G ve ark 2000).

Tüm bu bulgular koroner arterdeki inflamatuar immün aktiflenmenin akut koroner sendromu başlattığını göstermekle beraber inflamatuar belirteçlerin dolaşımdaki seviyeleri de bu hastalığın klinik sürecini yansıtmaktadır.

IL-6 koroner aterosklerotik plaklarda inflamasyon durumunda, dolaşımda saptanan bir sitokindir. IL-6 hem endokrin hem de parakrin etkileri ile pek çok fonksiyonu olan bir sitokindir. Bakteriyel toksinler ve bakteri kökenli metalloproteinazlar IL-6' nın aktiflenmiş nötrofil ve monositlerin membranlarından serbestlenmesini uyarabilirler (Basucci LM ve ark 2003). IL-6 konakçı savunmasında pek çok fonksiyona aracılık eder, IL-6 aktiflenmiş makrofajların ve lenfositlerin etkilerini düzenleyerek aterogenez, lipid bozukluğu, HT ve insülin direnci gelişimini hızlandırır (Bennet AM ve ark 2003). IL-6 akut faz cevabı için merkezi bir uyarandır, aynı zamanda CRP' nin karaciğerde üretiminde primer belirleyicidir.

Serum IL-6 düzeyi akut miyokard infarktüs, kararsız anjina pektoris, perkütan koroner girişimlerde ve geç stenozda artar. IL-6 trombosit kümeleşmesi ile beraber doku faktörü, makrofaj LDL reseptörü, CRP ve fibrinojenin salgılanmasını uyarır. IL-6 aynı zamanda IL-1 ve TNF-α gibi inflamatuar sitokinlerin salınımını düzenler (Ikeda U ve ark 2001).

2.4.2. Kararlı Aterosklerotik Plak

Bir aterom plağının kararlı diye nitelendirilmesi, komplike olma riskinin düşük olduğunu anlatır. Bir plağı kararlı kılan yapısal özellikler şunlardır:

1- Kalın fibröz başlık. Fibröz başlığın kalınlığı plağın her bölgesinde eşit düzeydedir. Bu yapısal özellik plağa mekanik travmalara direnme yeteneği kazandırır. Plaktaki çevresel gerilme stresini azaltır.

2- Fibröz başlık, düz kas hücresi ve kollajen bakımından zengindir (Weisberg P 1999).

3- Lipid çekirdeği plağın toplam hacminin %40 'ından daha azdır.

4- Lezyondaki enflamasyon (makrofaj ve T lenfosit) hücrelerinin sayısı azdır (Kinlay S ve ark 1997).

Bu özellikleri taşıyan bir aterom plağı lümende kritik düzeyde daralma yapacak kadar büyür ise oluşturacağı klinik tablo kararlı anjina pektoristir. Plağa kararlı olma özelliğini veren kalın fibröz başlığın temel elemanı düz kas hücreleridir.

2.4.3. Kararsız Aterosklerotik Plak

Kararlı plağın aksine kolay hasar görebilecek başka bir deyişle komplikasyon riski yüksek plaklardır. Bu plakların ortak özellikleri sırasıyla şöyledir:

1- Plağın toplam hacminin %40' ından daha büyük olan lipid çekirdek

2- Çok sayıdaki inflamasyon hücreleri (makrofaj ve T lenfosit)

3- Düz kas hücresi ve kollajen içeriği azalmış ince bir fibröz başlık

4- Fibröz başlık üzerindeki çevresel duvar stresinde artma

Lezyon tipleri ile yukarda sıralanan özellikler birlikte değerlendirildiğinde kararsız plakların tip IV ve V olduğu görülür. İstirahat iskemisi mevcut olup bu olay dinamik darlığa bağlıdır. Tıkanıklık devamlı olmayıp akım bazen engellenir. Bu durumdan iki ana mekanizma sorumludur. Bunlar plağın olduğu yerdeki mural trombüs ve değişen vazomotor tonustur.

Kararsız plaklar bütün aterosklerotik plakların %10-20 kadarını oluştururken, akut koroner sendromların %80-90' ından sorumludur. Bir plak bozunduğu zaman akut koroner sendromlara neden olabileceği gibi tamamen sessiz de kalabilir. İleri düzeyde koroner daralma yapan lezyonların %70' inin bozulup onarılmış lezyonlar olduğu saptanmıştır.

Kararsız plakların yaralanmaya en açık bölgeleri omuz bölgeleri diye nitelendirilen fibröz başlığın damar duvarı ile birleştiği bölgelerdir. İnflamasyon hücreleri en yoğun olarak buralarda birikmiştir. Plağı kararsız kılan da inflamasyon hücrelerinin etkinliği ile düz kas hücrelerinin onarım hızı arasındaki dengedir. İnflamasyon hücreleri çeşitli yollar ile fibröz başlıkta yaralanmaya neden olur. Aktif durumdaki makrofajlar, T lenfositler ve mast hücreleri inflamatuar sitokinler, proteazlar, koagulasyon faktörleri, radikaller ve vazoaktif moleküller üreterek plağı kararsız hale getirir, kollajeni parçalar ve trombüs formasyonu oluşturarak iskemiye

yol açar. Makrofajlar doğrudan doğruya dokundukları düz kas hücrelerinde apoptozisi uyarırlar.

Bunun yanında makrofajlar proteolitik enzimler de salgılarlar. Metalloproteinaz (kollajenaz, jelatinaz, stromelizin) denen bu enzimler, fibröz başlığın kollajen matriksini parçalarlar. Aktiflenmiş T-lenfositlerden de bir sitokin olan IFN- γ salgılanır. Bu hücre sitokini hem düz kas hücrelerin proliferasyonunu hem de hücrelerin kollajen üretimini baskılar.

Bunun yanında aktiflenmiş makrofajlardan salgılanan IL-1β ve TNF-α ile T-lenfositlerden salgılanan IFN-ã sinerjistik etki göstererek düz kas hücrelerinin ölümüne neden olur (Kristensen SD ve ark 1997).

Plağın kararsız hale gelmesinde anahtar rol oynayan matriks metalloproteinaz ve sistein proteaz olmak üzere iki tip proteaz vardır (Weissberg PL 1999). Matriks metalloproteinaz etkinliği birkaç basamakta kontrol edilir. İnflamatuar sitokinler matriks metalloproteinaz geninin salınımını arttırır, plazmin matriks metalloproteinaz enziminin proformunu aktifler ve matriks metalloproteinaz baskılayan doku proteinlerini baskılar. Benzer şekilde sistein proteazın düzeyi inflamatuar sitokinler tarafından arttırılır ve sistatin adı verilen inhibitörler tarafından baskılanır (Liu J ve ark 2004).

Koroner Arter Hastalığının Anjiyografik Sınıflaması (Libby P ve ark 2000):

1. Kritik darlığa neden olmayan (Çap olarak %50, alan olarak %70'den daha az darlığa neden olan),

2. Kritik darlığa neden olan (Çap olarak %50, alan olarak %70 ve üzerinde darlığa neden olan).

Kritik KAH da kendi içinde;

a. Tek damar hastalığı ve

b. Çok damar hastalığı (iki veya üç damar KAH) olarak sınıflandırılabilir.

2.5. Aterosklerozu Etkileyen Faktörler

Ateroskleroz genler ve çevre arasında çok sayıda ve karmaşık etkileşimin bir sonucudur. Kişinin proaterojen faktörlere cevabını ve damar duvarının aterojen uyarıya yatkınlığını sıklıkla genetik yapı belirler. Ancak çevresel faktörler hastalığın ilerleme hızını belirgin olarak etkileyerek KAH gelişip gelişmeyeceğini belirlerler.

Yüksek riskli toplumlarda otopsi takibi ile yapılan epidemiyolojik çalışmalarda homojen alt gruplar arasında plak yaygınlığının oldukça değişken olduğu bulunmuştur (Solberg LA ve ark 1983).

Erkeklerde yapılan otopsi çalışmalarında aterosklerotik lezyonların yaygınlığı ile en fazla orantılı bulunan 3 faktör; yüksek kolesterol, düşük HDL ve yüksek kan basıncı hep birlikte bireysel değişkenliğin ancak %25' ni açıklamaktadır (Shlipak MG ve ark 2005). Kadınlar için ise yeterli veri bulunmamaktadır.

Aterosklerozun neden olduğu klinik olaylar için yüksek serum total kolesterol ve LDL kolesterol, düşük serum HDL kolesterol, sigara, hipertansiyon (HT), DM ve ileri yaşı içeren bazı bağımsız major risk faktörleri tanımlanmıştır (Grundy SM ve ark 1999). Tedavi edilmedikleri takdirde bu major risk faktörleri her biri ayrı ayrı klinik bir olaya yol açabilir. Bununla birlikte temelde AS için yüksek serum LDL kolesterol düzeyleri tek başına gerekli ve bağımsız bir etiyolojik ajan olarak tanımlanmıştır (Grundy SM ve ark 1999).

Aterotrombotik damar hastalığının patofizyolojisinin giderek daha iyi anlaşılması ve mekanizmaların aydınlatılması ile bu hastalıktan korunmaya yönelik başarılı stratejiler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu stratejilerin yoğun olarak uygulandığı ülkelerde kardiyovasküler mortalite ve morbiditenin azalmaya başladığı görülmektedir.

Örneğin aterotrombotik damar hastalığı prevalansı Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve Avusturalya'da azalmakta, Doğu Avrupa ve Asya'da artmaktadır. KAH prevalansının azalmasında WHO MONICA projesinin de gösterdiği gibi bu toplumlarda sigara, kolesterol ve hipertansiyon ile savaşın büyük katkısı olmuştur.

Riskin arttığı toplumlarda ise obezite ve diğer çevresel etmenlerde olumsuz yönde gidiş gözlenmiştir (Greenland P ve ark 2003).

2.5.1. Lipoproteinler

Beslenme özelliklerinin aterotrombotik damar hastalığının gelişimi üzerine önemli etkilerinin olduğu günümüzde kanıtlanmıştır. Toplumların koroner mortalitesi ile diyetle alınan yağ ve doymuş yağ tüketimi arasında önemli ilişkiler saptanmıştır.

Yüksek serum total kolesterol ve LDL kolesterol ile düşük serum HDL kolesterol düzeyleri KAH için başlıca bağımsız major risk faktörleridir. Yüksek serum LDL kolesterol düzeyleri primer KAH risk faktörü olarak görülmektedir. Total ve LDL kolesterol düzeyleri ne kadar yüksek ise aterosklerotik olay gelişme riski de o kadar yüksek olmaktadır (Grundy SM ve ark 1999).

Ortalama kolesterol düzeyinin göreceli olarak yüksek olduğu toplumlarda düşük HDL kolesterol düzeyi KAH' ı öngören güçlü bir parametredir. Ancak ortalama serum total kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerinin düşük olduğu toplumlarda HDL düzeyi bir öngördürücü olamayabilir (Grundy SM ve ark 1990). Yani düşük HDL kolesterol ve lipid dışı faktörler LDL kolesterolün etkisini arttırır.

2.5.2. Sigara

Sigara hem yüksek hem de düşük riskli toplumlarda ateroskleroz ile ilişkili klinik olaylarda temel ve değiştirilebilen tek risk faktörüdür (Grundy SM ve ark 1990). Sigara periferik arter hastalığı ve abdominal aort anevrizmasının önde gelen nedenlerinden ve iskemik inme için major risk faktörlerindendir. Sigara patogenetik olarak kolesterole bağlı bir faktördür ve diğer risk faktörleriyle sinerjistik etki yaparak KAH riskini artırır (Grundy SM ve ark 1990). Sigara içen sağlıklı genç erişkinlerde endotel bağımlı vazodilatasyonda doza bağımlı ve geriye dönebilen bir bozulma vardır. Ayrıca sigara koroner arter spazmına da katkıda bulunur (Yoshimura M ve ark 1999).

Sigara, stabil angina için değil ancak AMI için güçlü bir risk faktörüdür (Grundy SM ve ark 1990). Bu durum sigaranın ateroskleroza yol açmadığı ancak

belli bir koroner ateroskleroz seviyesine ulaşan kişilerde trombotik olay riskini arttırdığı anlamına gelebilir. Bu konudaki kanıtlar otopsi takipleri yapılan prospektif epidemiyolojik çalışmalardan gelmektedir. Sigara içenlerde koroner ateroskleroz (kabaca intimal yüzeyde plak olmaması olarak değerlendirilmiştir) sigara içmeyenlerden daha yaygın değildir (Solberg LA ve ark 1983). Bu bulgu Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) çalışmasında da doğrulanmıştır; koroner ateroskleroz derecesi ile tiyosiyonat (sigaraya maruz kalma göstergesi olup postmortem ölçülmüştür) arasında bir ilişki saptanmamış ancak mikroskobik düzeyde mevcut plakların daha hızlı ilerleyerek hastalığın ileri evrelerine daha erken geçirdiği gözlenmiştir (Zieske AW ve ark 1999). Koroner arter hastalığına bağlı ani ölümlerde sigara içenlerde içmeyenlerden daha sık koroner trombüs saptanmıştır. Elimizdeki bilgiler sigaranın doku faktör ekspresyonunu arttırarak plağın trombojenitesini arttırabileceğini düşündürmektedir (Moreno PR ve ark 1998). Koroner aterosklerozun aksine aort aterosklerozu özellikle abdominal aorta anevrizması sigara içmeyle yakından ilişkilidir. Sigaranın aterojen değil de trombojen olduğuna dair bazı kanıtlar vardır (Bottcher M ve ark 1999).

1- Sigara trombüsün aracılık ettiği olgularda (AMI v.b) güçlü bir risk faktörü olmasına karşın aterosklerozun sadece semptoma neden olduğu durumlarda (angina pektoris) bir risk faktörü değildir.
2- Anjiografik olarak sigara yavaş plak progresyonundan çok koroner arterlerde hızlı trombozla ilişkilidir.
3- AMI'de tromboliz sonrası sigara içenlerde içmeyenlere oranla damarda daha az rezidüel duvar hastalığı kalır.
4- Sigara sistemik hipertrombotik bir durumla (sistemik trombin üretimi, aktif plateletler ve yüksek fibrinojen) ilişkilidir (Roald HE ve ark 1994).
5- Patofizyolojik olarak sigara ile koroner tromboz arasında güçlü bir bağlantı varken altta yatan ateroskleroz ile bağlantısı zayıftır.
6- Sigaranın bırakılmasıyla AMI riskinin hızla ciddi ölçüde azalması sorumlu sürecin hızla gerilediğini gösterir (Bottcher M ve ark 1999).

2.5.3. Hipertansiyon

Hipertansiyon patogenetik olarak kolesterole bağımlı bir ateroskleroz hızlandırıcısı olmakla beraber KAH için bağımsız bir major risk faktörüdür (Roberts WC 2001).

Hipertansiyon ve hiperkolesterolemi koroner ateroskleroz oluşumunda güçlü bir şekilde etkileşir (Grundy SM ve ark 1990). Hipertansiyon normal kolesterol düzeyleri olan laboratuvar hayvanlarında aterosklerozu uyarmaz; tek başına aterojenik değildir.

Aterosklerozu hızlandırması için kan basıncının belli bir değerin üzerinde olması gerekir (Roberts WC 2001). Framingham çalışmasının son verilerine göre KAH riskini öngörmede nabız basıncı sistolik ve diyastolik basınçtan daha üstündür.

2.5.4. Diabetes Mellitus

Patogenetik olarak kolesterole bağımlı olmakla beraber istatiksel olarak bağımsız olan bir diğer major kardiyovaskuler risk faktörü insüline bağımlı olmayan Tip-2 DM' dir. Tip-2 DM ve hiperkolesterolemi KAH oluşumunda güçlü bir şekilde etkileşir. Total kolesterol düzeylerinin 150 mg/dL olduğu toplumlarda DM' si olanlarda bile aterosklerotik olaylar nadirdir (Roberts WC 2001). Ayrıca Tip-2 DM öncüsü insülin rezistansı (İR) ile glukoz tolerans bozukluğu kardiyovasküler riski oldukça arttırmaktadır. Ancak İR'nin kendisinin hiperinsülinemi, hiperglisemi (ileri glikozilasyon son ürünleri), hemostatik bozukluklar (trombositler, koagülasyon ve fibrinoliz) ve dislipidemi gibi geleneksel risk faktörleri (yüksek TG, düşük HDL ve yüksek LDL) ve HT' nin tek başlarına rolü net değildir. Hipergliseminin yanı sıra diyabetik olmayan sınırlardaki glukoz değerleri de AS ile ilgili hastalıkların artmasıyla ilişkilidir (Laakso M 1999). Yani DM'un hangi mekanizmalarla aterosklerozu teşvik ettiği ve/veya klinik sonuçları çok az anlaşılmıştır.

PDAY çalışmasında %8' in üzerindeki glikohemoglobin düzeylerinde 25-34 yaşındaki bireylerin yağlı çizgi yaygınlığında ve sağ koroner arter lezyonlarında artış saptanmıştır (M.Gill HC Jr ve ark 1995). Son zamanlarda diyabetik hastalardaki koroner plakların dış görünüşlerinin diyabetik olmayanlardakine benzediği bilinmektedir. Ancak koroner arterlerin DM'de daha yaygın etkilendiği ve hastalığın

daha distale uzanabileceğine dair hem patolojik hem de anjiyografik deliller bulunmaktadır (American Diabetes Association 1998).

Diabetes Mellitus eğer aterosklerozu hızlandırmıyorsa trombotik olayları hızlandırarak ateroskleroza bağlı olay riskini arttırabilir. Diabetes Mellitusta trombosit aktivitesi artar, plazma fibrinojen ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 düzeyleri artar. Sıklıkla endotel disfonksiyonu gözlenir ve diyabetik hastalarda koroner trombozdan plak rüptüründen çok endotel erozyonu sorumlu gibi görünmektedir (UKPDS Group 1999).

Sıkı kan şekeri kontrolünün DM hastalarında aterosklerotik olayları azalttığına dair yapılmış kontrollü bir çalışma yoktur. Tip-2 DM hastalarında yapılan UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study)'de mikrovasküler komplikasyonlarda oldukça anlamlı azalma sağlanmasına karşın aterosklerotik olaylarda az ve anlamlı olmayan bir azalma saptanmıştır (UKPDS Group 1999). Diğer yandan statin ile lipid düşürmenin diyabetikler ve sadece bozulmuş açlık glukozu (BAG) olanlar dahil risk altındaki her bireyde faydalı olduğu görülmüştür (Haffner SM ve ark 1999). Akut miyokard infarktüsünden sonra tip-2 DM' lilerde yoğun insülin tedavisinin sağkalım üzerine olumlu etkide bulunduğu gösterilmiştir.

2.5.5. Aile Öyküsü

Otuzbeşin üzerinde vaka kontrollü ve randomize çalışmada KAH ile ailede birinci derece yakınların erken başlangıçlı KAH olması arasında ilişki saptanmıştır (Hopkins PN ve ark 1989). Bu risk genellikle diğer risk faktörlerinin düzeltilmesinden sonra da devam eder. Koroner kalp hastalığı için en güçlü aile öyküsü, birinci derece bir yakında erken yaşta KAH öyküsünün varlığıdır. 55 yaş öncesi erkek bir yakınında ya da 65 yaş öncesi bir kadın yakınında KAH bulunması pozitif aile öyküsü olarak kabul edilmektedir. Ayrıca erken yaşta KAH olan yakın sayısı arttıkça veya KAH yaşı azaldıkça aile öyküsünün KAH' ı tahmin ettirici değeri artmaktadır (Rissanen AM 1979).

2.5.6. Cinsiyet

Her iki cinste de major kardiyovasküler risk faktörleri aynı olduğu halde KAH erkeklerde kadınlardan 10-15 yıl daha erken başlamaktadır. 60 Yaş sonrası ise

hem erkek hem de kadınlarda ölümün en önde gelen nedeni KAH olmakta ve erkekler kadar kadınlar da KAH' tan ölmektedir (Grundy SM ve ark 1998). Cinsiyetin KAH riski üzerindeki belirgin etkisi kolesterole bağımlıdır. Kolesterol seviyesi ne kadar fazlaysa kardiyovasküler olay riski de o kadar fazladır ve cinsiyetten bağımsız olarak kardiyovasküler olaylar daha erken ortaya çıkmaktadır.

Premenopozal döneme uygun olarak KAH' tan koruyucu en olası faktör östrojen olabilir. Menapozla beraber LDL düzeyleri artmaya başlar, HDL' de ise artma durur yada biraz düşer (Walsh BW ve ark 1991). Hormon replasman tedavisinin lipid profilini düzeltmesine karşın östrojenin yararlı etkileri serum lipidi üzerine sınırlı kalmayabilir. Özellikle östrojen tedavisiyle endotel disfonksiyonunun düzelmesi östrojenin damar duvarında direkt ateroskleroza karşı koruyucu olduğunu düşündürmektedir. Çünkü vasküler hücrelerde östrojen reseptörleri vardır (Bush DE ve ark 1998).

2.5.7. Yaşlanma

Yaş KAH için güçlü bir risk faktörüdür. 65 yaşına kadar cinsiyet ve etnik kökenden bağımsız olarak ateroskleroz oluşumu giderek yaşla birlikte artar (Falk E ve ark 2004). Ateroskleroz ve stabil anginanın 65 yaş sonrası daha az belirgin olarak artmasına karşın AMI' nın pekçoğu özellikle kadınlarda olmak üzere 65 yaş sonrası görülür. KAH mortalitesi yaşla birlikte giderek artar. Yaşa bağlı artan nabız basıncı ve sistolik kan basıncı miyokard infarktüsü ve koroner ölümü öngören güçlü parametrelerdir.

Her ne kadar yaş güçlü ve bağımsız bir KAH risk faktörü olsa da yaşın KAH riskine olan bağımsız katkısı kolesterole bağımlıdır. Ortalama serum total kolesterol değerlerinin 150 mg/dL ve altında olduğu toplumlarda aterosklerotik olay yaşlılarda bile nadirdir (Roberts WC 1987).

2.5.8. İnflamasyon ve İnfeksiyon

İnflamasyon aterosklerozun başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynar (Nenci GG 1999). C- reaktif protein (CRP), serum amiloid A ve fibrinojen gibi inflamasyonun sistemik belirteçleri asemptomatik erkeklerde ve kadınlarda kararlı ve kararsız anginası olan hastalarda ve AMI sonrası koroner olayları öngörmede güçlü

parametreler olarak ortaya çıkmaktadırlar (Donesh J ve ark 1998). Düşük derece inflamasyonun bu duyarlı ama özgül olmayan belirteçleri sitokinleri uyarmasıyla karaciğerde üretilirler. Ancak proinflamatuar sitokinlerin damar duvarının kendisinden mi kaynaklandığı (makrofajlar?), ateroskleroz yaygınlığı veya aktivitesini yansıtıp yansıtmadığı veya kronik infeksiyon gibi inflamatuvar süreci yansıtan damar dışı durumlardan mı kaynaklandığı belli değildir. Kaynakları ve aracılık ettikleri işlev ne olursa olsun proinflamatuar sitokinler aterogenezi ve/veya sonuçlarını hızlandırabilirler. Ancak inflamasyonun değiştirilebilir risk faktörü olup olmadığı halen bilinmemektedir (Libby R ve ark 1999).

İnfeksiyonun ateroskleroza yol açması olası olmakla beraber kanıtlanamamıştır. Yapılan çalışmalarda özellikle seroepidemiyolojik olmak üzere ortaya konan delillerin çoğu Klamidya Pnömonia, Helikobakter Pilori ve bazı Herpes virüslere (özellikle sitomegalovirüs) yöneliktir (Danesh J ve ark 1997).

2.5.9. Hemostatik Faktörler

Fibrinojen, faktör VII, plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve trombositler gibi bazı sistemik hemostatik faktörlerin gelecek KAH olaylarını öngörebileceği bildirilmektedir (Fuster V ve ark 1996). Aterosklerozun aracılık ettiği lümen trombozu ve büyük ihtimalle aterosklerotik lezyonların yavaş yavaş ilerlemelerinde trombin üretimi ve trombosit aktivasyonu nedensel bir rol almaktadır.

Hemostatik faktörler arasında KAH ile ilişkisi en güçlü ve tutarlı olan fibrinojen; sigara, diyabet ve CRP ile yakından ilişkilidir (Maresca G ve ark 1999). Ciddi aterosklerozu olmayan özellikle genç kişilerde AMI'nü tetiklemede protrombotik genetik risk faktörleri önemli görünmektedir ve sigara kullanımının azaltılması ile aralarında bir birliktelik mevcuttur (Ardissino D ve ark 1999).

2.6. Metil Arjininler

2.6.1. Metil Arjininlerin Oluşumları ve Çeşitleri

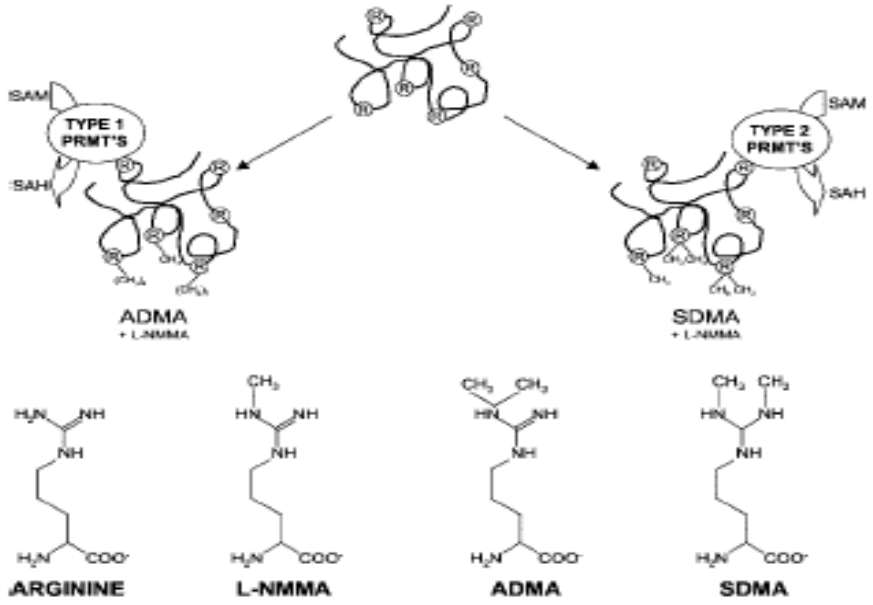
Proteinlerde bulunan arjinin rezidülerinin metilasyonu sonucu oluşurlar. Bu proteinler yaygın olarak nükleusta bulunurlar. Protein-arjinin metilasyonu,

proteinlerin içindeki arjininin guanido azotuna 1 veya 2 metil gruplarını aktaran bir posttranslasyonel modifikasyondur (Clarke S 1983). İnsanlarda protein-arjinin metilasyonu PRMT'ler (Protein Arjinin Metil Transferaz) tarafından gerçekleştirilir. PRMT'nin iki geniş tipi vardır, insanlarda PRMT aktivitesi gösteren 9 adet PRMT vardır. PRMT 5,7,9 PRMT II olarak diğer PRMT'ler PRMT I olarak bilinir (Krause CD ve ark 2006).

Tip1 PRMT en çok rastlanan PRMT'dir, çok sayıda proteine spesifik farklı tipleri vardır. Kardiovasküler sistemde kalp, düz kas hücreleri ve endotelyal hücrelerde expresse edilir. Expresyon paterni hakkında ayrıntılı bilgi olmamakla birlikte PRMT 1'in bütün tipleri (Krause CD ve ark 2006, Schulze F ve ark 2004) vasküler hücrelerde expresse edilir. PRMT 1 expresyonu LDL expresyonuyla artırılmaktadır. Tip 1 PRMT aktivitesi sonucu oluşan ürün Asimetrik Dimetilarjinin ve N-Monometil L-Arjinindir. NOS'u inhibe edebilme özelliği vardır. Artan LDL ile birlikte artmış tip 1 PRMT ekspresyonu ile ADMA düzeylerinin LDL ile pozitif korelasyonu olduğu gözlemlenmiştir. Endotelyal hücre kültürlerinde LDL, oxLDL konsantrasyonu artışı PRMT gen expresyonu artışına neden olur (Boger RH ve ark 2004).

Tip 2 PRMT SDMA (simetrik dimetilarjinin) oluşumunda rol oynar. SDMA'nın NOS'u inhibe etme özelliği yoktur. Proteinler hidrolize uğradığında onların metillenmiş arjinin rezidüleri serbest kalır, metillenmiş arjininler idrarla atılır. Renal yetmezlik hastalarında metilenmiş arjininler idrarla atılamaz seviyeleri yükselir. Metil arjininler böbrekte dimetilarjinin metil transferaz, karaciğerde asetilasyonla metabolize edilir.

PRMT'ler protein metilasyonunda metil vericisi olarak S- Adenozil Metionini (SAM) kullanır. SAM artışı PRMT aktivasyonunu artırırken, S-Adenozil Homosistein (SAH) artışı PRMT'yi inhibe eder (Lentz SR ve ark 2003).



Şekil 2.1. Arjinin ve metil arjinin türevleri ve PRMT etkisi ile oluşumları (Boger RH ve ark 2004)

ADMA, metillenmiş arjinin rezidüleri içeren proteinlerin katabolizması sonucu meydana gelir. Hücresel proteinlerin arjinin metilasyonu PRMT'ler tarafından katalize edilir. PRMT'ler başlıca alveolar ve bronşiyal epitelyumda yerleşmiştiği ve hipoksi sonucu alveolar tip 2 hücrelerde PRMT 2 ekspresyonu arttığı yy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir (Schulze F ve ark 2004). Aynı çalışmada PRMT'lerin akciğerlerde fonksiyonel olduğunu ve hipoksinin PRMT 2 ekspresyonu ve akciğer ADMA konsantrasyonlarında düzenleyici olduğunu göstermiştir. Hipoksi sonucu yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ADMA metabolizması ile ilişkilidir (Schulze F ve ark 2004).

2.6.2. Asimetrik Dimetilarjinin

Asimetrik N_G,N_G dimetilarjinin L Arjininin guanidino analoğu, endojen olarak sentezlenen proteinlerdeki arjinin rezidülerinin protein arjinin metil transferazlarıyla (PRMT I) metillenmesiyle meydana gelen bir türev aminoasittir.

ADMA NOS'un endojen inhibitörü iken SDMA'nın NOS enzimi üzerine inaktive edici etkisi yoktur fakat arjinin ve ADMA ile hücre giriş yolunu etkileyerek NO üretim hızında dolaylı yoldan etkisi vardır (Yıldırım AO ve ark 2006).

3 adet metilarjinin (ADMA, SDMA ve L-NMMA) Y taşıyıcı protein adı verilen katyonik aminoasit taşıyıcıları aracılığıyla endotelyal hücrelerin içine girerler. Metilarjininler birbirleriyle ve arjinin aminoasidi ile hücre içine giriş için yarışırlar. Yüksek konsantrasyondaki ADMA L- Arjininin hücre içine transportunu engeller. Sonuç olarak NO sentezi azalır (Yıldırım AO ve ark 2006).

ADMA kan basıncını yükseltir, vazokonstrüksiyona neden olur, endotel bağımlı relaksasyonu bozar, endotelyal hücre adhezivitesini artırır. Kardiak outputu azaltır. Uzamış NOS inhibisyonu sonucu olarak sol ventrikuler hipertrofi gelişir.

Böbrek yetmezliğinde ADMA birikimi olur. Plazma ADMA seviyeleri ile endotel disfonksiyonu arasında ilişki vardır. Hemodiyaliz hastalarında gelişen endotel disfonksiyon kardiyovasküler olaylar ve mortalitede ADMA sorumlu faktörlerden birisidir (Yıldırım AO ve ark 2006). Endotel kaynaklı NO endotel fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemlidir. NO'nun vazodilatasyon, antitrombotik proses ve inflamasyonun kontrolünde kritik rolleri vardır. NO biosentezinin bozulması endotel fonksiyonun bozulmasıyla beraber çok sayıda vasküler hadiseyle birliktedir. ADMA arjininden NO sentezini kompetetif olarak inhibe eder.

ADMA'nın endotel fonksiyon bozukluğundan sorumlu faktörlerden biri olduğuna dair kanıtlar vardır. Konjestif kalp yetmezliği, diyabet, insulin rezistansı, hipertansiyon, hiperhomosisteinemi, son dönem böbrek yetmezliği, ADMA yüksekliği ve endotel fonksiyon bozukluğu ile seyreden çeşitli klinik durumlardır. Bu hastalıklarda akut vasküler olaylar sonucu ölüm sık görülür.

2.6.2.1 ADMA Metabolizması

Metilarjininlerin bir kısmı renal yolla atılır. Bununla birlikte SDMA tamamıyla renal yolla atılır fakat ADMA ve L-NMMA yaygın olarak metabolize edilir. En önemli metabolik yol DDAH enzimiyle sitrülin ve dimetilamine yıkılmasıdır (Vallance P ve ark 2004, Ogawa T ve ark 1989).

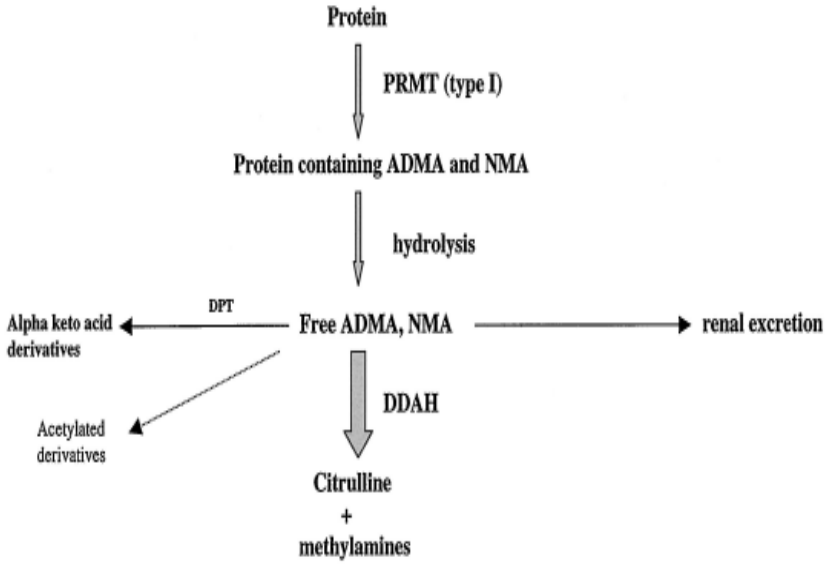
DDAH, ADMA seviyelerini regüle etmede önemli rol oynar. SDMA intravenöz olarak enjekte edilirse %60 oranında idrara çıkar fakat ADMA intravenöz olarak enjekte edildikten sonra %5 oranında idrara çıkar. Bu nedenle renal yetmezlikte SDMA ADMA' ya göre plazmada çok daha yüksek seviyelerde bulunur.

Yapılan araştırmalar ADMA'nın DDAH için substrat olduğunu SDMA' nın olmadığını göstermiştir. ADMA'nın SDMA'ya göre yaygın bir metabolizmasının olduğunu göstermiştir (Kimoto M ve ark 1995). DDAH iki izofomdan oluşur her ikisi de vasküler endotelyumdan exprese edilir.

İnsanları da kapsayan gelişmiş canlılarda DDAH enziminin 2 izoformu tanımlanmıştır. DDAH 1'i kodlayan gen 1. kromozomda lokalize olmuş iken DDAH 2'yi kodlayan gen 6. kromozomda lokalizedir. Bu izoformlar farklı doku dağılımları göstermelerine rağmen aktiviteleri benzerdir. DDAH 1expresyonu ile nöral NOS arasında DDAH 2 ile endotelyal NOS (eNOS) arasında ilişki vardır fakat NOS expresse eden doku ve hücrelerde DDAH'lar fazlaca exprese edilmesine rağmen bu doku ve hücrelerde sınırlı değildir. Her iki izoform da kardiovasküler sistemde identifiye edilmesine rağmen muhtemelen DDAH 2 expresyonu çok daha fazladır (Cooke JP ve ark 2000, Tran Cam TL ve ark 2000).

Bazı araştırmacılar çalışmalarında hipoksiye maruz bırakılan domuzlarda DDAH aktivitesinin baskılandığını göstermişlerdir. DDAH 1 ve DDAH 2 farklı doku dağılımları göstermektedir. DDAH 2 aktivitesi ve ekspresyonu yeni doğanların primer pulmoner hipertansiyonunda azaltmıştır. Bu da NOS aktivitesinin azalmasını ve ADMA seviyelerinin yükselmesini açıklamaktadır (Tsikas D ve ark 2003).

Endotelyal hücre kültürlerinde DDAH'ın selektif inhibisyonu nitrik oksit sentezinde azalmaya yol açar. Ortamın arjinin muhtevasının artırılması bu durumu tersine çevirebilir (Leiper J ve ark 1999).



Şekil 2.2. ADMA metabolizması (Kimoto M ve ark 1995)

Rat tip 1 DDAh izoformunun 285 aminoasitli moleküler ağırlığı yaklaşık 33 kDa olduğu gösterilmiştir. ADMA metabolizması için saptanan Km değeri 0.18 mM düzeyindedir. İnsan ve rat çalışmalarının bir çoğunda plazma ADMA düzeylerinin 0.3 to 0.5 μmol/l düzeyinde olduğu görülmüştür. ADMA oldukça yaygın halde bulunan CAT enzimleri tarafından sentezlenerek hücre içinde birikmekte ve bu birikim sonucu yüksek hücre içi ADMA düzeyleri oluşmaktadır. DDAH enzimi herhangi bilinen bir kofaktör kullanmaksızın ADMA molekülünü sitrülin ve dimetilamine çevirir.

2.6.3. DDAH Geninin Yapısı

DDAH1 geninin 1 nolu kromozomda, DDAH 2 geninin 6 nolu kromozomda yerleşik olduğu gösterilmiştir (Tran Cam TL ve ark 2000). DDAH izoformları diğer memeli canlılarda bulunana ve arjinin modifikasyonunda rol alan enzimlerle oldukça az miktarda yapısal benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte primitif ökaryotik canlılarda ve bakterilerde arjinin deaminasyonunu gerçekleştiren ve arjinini sitrüline dönüştüren enzimin DDAH enzimine benzerliği gösterilmiştir.

İnsan DDAH 285 amino asidi kodlayan 858 baz çifti içermektedir. DDAH 1 ve DDAH 2 enzim genlerini araştıran çalışmalarda 6 adet exon bulunduğunu

gösterilmiştir (Leiper J ve ark 1999). Aynı sayıda ekzon bulunmasına karşın DDAH 1 ve 2'de intronların oldukça farklı uzunlukta olduğunu göstermişlerdir. İnsan, sığır ve farelede yapılan DDAH protein dizin çalışmalarında %90 üzerinde Hem DDAH 1 hemde DDAH 2 için benzerlik saptanmışsa da substrat bağlama bölgesinde türe özgü alanların olduğu gösterilmiştir.

Buna karşılık türlerde her izoform için substra bağlama kenarının korunduğu gözlenmiştir. DDAH 2 gen yapısı DDAH 1'e benzese de substrat bağlama bölgelerinde farklılıklar göstermektedir.

2.6.3.1. DDAH Tek Nükleotid Polimorfizmleri

DDAH2 geninin promoter bölgesinde 6 adet yaygın polimorfizim saptanmıştır. 871 yerleşik 6G/7G insersiyon/delesyon polimorfizmi sonucu DDAH2 protein ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Jones LC ve ark 2003). 6 adet DDAH1 varyantı saptanan DDAH1 mutasyon taşıyıcılarının 50 kat daha fazla koroner arter yakalanma riskine sahip oldukları gösterilmiştir (Veli-Pekka Valkonena ve ark 2005).

DDAH 1 gen mutasyon taşıyan her 13 kişi yakınlarından yaklaşık 1,5 kadarınında bu mutasyonu taşıdığı görülmüştür. Yine bu mutasyonu taşıyanların yakınlarında yüksek oranda hipertansiyona rastlanmıştır. Yapılan bir çalışmada 236 kalp ameliyatı geçiren hastanın 107 tanesinde DDAH2 homozigot -449G allelini taşıdığını saptanmıştır. DDAH 1 knock-out farelerin intrauterin hayatta öldükleri tespit edilmiştir. DDAH-1 +/– fareler ise azalmış DDAH1 proteinlerine karşılık DDAH 2 'de herhangi bir değişiklik göstermemiştir (Ryan R ve ark 2006).

Rat DDAH1 285 amino asitli yaklaşık 33 kDa moleküler ağırlığındadır. ADMA metabolizması için K_m değer, 0.18 mM değerinde olduğu gösterilmiş ve spesifik bir kofaktörü belirlenememiştir (18). İnsanda yapılan çalışmalarda plazma ADMA düzeylerinin yaklaşık 0.3 to 0.5 μmol/l düzeyinde olduğu gösterilmiştir (Fredrik Palm ve ark 2007). Saflaştırılmış DDAH enziminin maksimum aktivitesi için optimal ısı 55°C ve optimal pH aralığı ise 5.2 – 6.5 olarak belirlenmiştir (Ogawa T ve ark 1989). DDAH aktivitesi ile ADMA'dan 1 molekül sitrülin 1 molekül dimetilamin oluşmaktadır.

Yine bir çalışmada DDAH1 enziminin çinko içeren bir enzim olmasına karşılık çinkonun herhangi bir katalitik aktivitesinin olmadığını göstermişlerdir. Buna karşılık çinkonun enzimin stabilitesini koruyarak tam olarak aktivite göstermesini sağladığını göstermiştir (Knipp M ve ark 2001).

DDAH1 enziminin özellikle böbrek ve karaciğerde NOS ekspresyonunun olduğu yerlerde başta olmak üzere oldukça yaygın bir şekilde ekspresyonu vardır. Böbrek ve karaciğer ADMA metabolizmasının gerçekleştiği ana organlardır. Her 2 organda da arter-ven ADMA oranlarına bakıldığında ciddi miktardaki farklılık ADMA'nın bu 2 organda önemli derecede metabolize edildiğini göstermektedir (Fredrik Palm ve ark 2007).

Farelerde yapılan DDAH1 geninin homozigot delesyonunun uterin hayatta ölüme neden olduğu gösterilmiştir. DDAH-1 +/– farelerde ise DDAH-1 proteininde azalma gözlenirken DDAH2 protein ekspresyonlarında herhangi bir azalmaya rastlanılmamıştır. Bu farelerde pulmoner vasküler sistemin etkilenmesine bağlı olarak pulmoner hipertansiyonun geliştiği gözlemlenmiştir (Fredrik Palm ve ark 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Vakaların Oluşturulması

Araştırmanın kapsamında Konya bölgesindeki koroner ateroskleroz hastaları ve bu bölgede yaşayan sağlıklı kontrol grup bulundurulmuştur. Dışlama kriteri olarak kronik böbrek yetmezliğinin olması, dahil etme kriteri olarak ise hastaların ateroskleroz tanısı almış olması esas alınmıştır. Bu merkezde etik olarak klinik sorumlularıyla görüşülmüş bilgileri dahilinde görüşme izni alınan bütün hastaların araştırmaya dahil edilmiştir.

Ateroskleroz tanısı almış olan 50 birey ve koroner aterosklerozu bulunmayan 50 kontrol bireyi çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastaların kardiyak belirteç düzeyleri ve risk faktörleri çalışma kapsamında incelenmiştir.

3.1.2. Numunelerin Toplanması

ADMA ve Arjinin için hastalar oturur pozisyonda iken iki ayrı düz tüpe venöz kan örnekleri alındı. ADMA ve Arjinin örnekleri hemen soğuk zincire riayet edilerek soğutmalı santrifüj ile +4 ^{0}C de 2000 x g de 5 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar sülfosalisilik asit ile uygulanan deproteinizasyon işleminden sonra ADMA ve Arjinin çalışmaları için ependorf tüplere aktarılıp – 80 ^{0} C de çalışma gününe kadar muhafaza edildi.

DDAH gen polimorfizmi çalışmaları için aynı hasta ve kontrol grubundan K2-EDTA içeren tam kan tüplerine kan örnekleri alındı.

3.1.3. Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler

1-) ADMA Standart (Calbiochem, Lot: 311204, US)
2-) Arjinin Standart (Merck, 519- K 538944, Darmstadt Germany)
3-) HCl (Merck, K 25039614-814 Darmstadt Germany)
4-) Metanol (Merck, K 26301108-914 Darmstadt Germany)
5-) Sodyum Asetat ($CH_3COONa(H_2O)_3$, Merck, 9023840A Darmstadt Germany)

6-) Tetrahidrofuran (Merck, K 34870914 529 Darmstadt Germany)

7-) Sülfosalisilik Asit (Merck 53656684 Darmstadt Germany)

8-) O-Fitaldialdehit (Merck S 30064448 Darmstadt Germany)

9-) Borik Asit (Sigma, B 7660)

10-) 2-Merkaptoetanol (Merck, Schuchardt)

11-) Potasyum Hidroksit (Sigma, 97H08531 Steinheim Germany)

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

1. Santrifüj (Beckman Coulter)
2. PH Metre
3. Nuçe Erleni
4. Magnetik karıştırıcı, magnetik bar
5. Millipore Filtre
6. Floresans dedektörlü HPLC cihazı (HP Agillent 1100)
7. Analitik Kolon; 250x4,6mm C18 Supelcosil 5µm kolon
8. Real Time PCR analiz cihazı (Roche Diagnostic Light Cycler 2.0)

3.2. Yöntem

3.2.1. ADMA ve Arjinin Analizi

ADMA ve arginin düzeyleri gradient pompa kullanılarak analiz edildi. Gradient mobil fazları olarak Mobil faz A ve B hazırlandı.

3.2.1.1. Mobil Faz A'nın Hazırlanması (82:17:1)

1-) 5,57 gr sodyum asetat ($CH_3COONa(H_2O)_3$) bir miktar distile su içinde çözülerek pH 6,8 e ayarlandıktan sonra distile su ile son hacim 820ml'ye tamamlandı.

2-) 170 ml metanol ilave edildi.

3-) 10 ml THF eklenerek son hacim 1 lt'ye tamamlanmış oldu.

3.2.1.2. Mobil Faz B'nin Hazırlanması (22:77:1)

1-) 1,49 gr $CH_3COONa(H_2O)_3$ bir miktar distile su içinde çözülerek pH 6,8 e ayarlandıktan sonra distile su ile son hacim 220 ml'ye tamamlandı.

2-) 770 ml metanol ilave edildi.

3-) 10ml THF eklenerek son hacim 1lt'ye tamamlanmış oldu.

3.2.1.3. Mobil Fazların Filtrasyonu ve Degaze Edilmesi

Hazırlanan mobil faz 0.45 µm filtreler kullanılarak filtre edildi. Degaze işlemi su trombu ile sağlandı. Musluğa bağlı olan su trombu bir hortum vasıtasıyla nuçe erlenine bağlandı. Nuçe erleni magnetik karıştırıcının üzerine yerleştirildi, magnetik bar mobil fazın içine kondu ve nuçe erleninin ağzı tıpa ile kapatılarak etrafı parafilmle sıkıca sarılarak hava girişi engellenmiş oldu. Musluk hafifçe açılıp, magnetik bar düşük devirde çevrilirken, 1-2 dakika içinde kabarcıklar görülmeye başlandı. Kabarcıklar kaybolunca musluk daha fazla açıldı ve karıştırıcının devri artırıldı, hiç kabarcık oluşmayana kadar işleme devam edildi, daha sonra çıkarılarak çalkalamadan cihazda uygun pompalara hortumlar vasıtasıyla bağlandı.

3.2.1.4. ADMA Standart Hazırlanması

ADMA stok standart solüsyonu (0.5mM) 0.1 M HCl içinde hazırlanıp buzdolabında saklandı. Stok solüsyonunun 0.1 M HCl ile dilüsyonuyla standart solüsyonu (50µM) hazırlandı. Hazırlanan 50µM standart solusyondan 0,1M HCl ile dilüsyonlarla sırasıyla 25µM, 12.5µM, 6.25µM, 3.1µM, 1.56µM, 0.78µM olmak üzere standart çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan standartlar derivatizasyon işleminden sonra otomatik örnekleme cihazına konularak 10 µl enjekte edildi. Alınan pik alanlarıyla ADMA standart grafiği oluşturuldu.

3.2.1.5. Arginin Standart Hazırlanması

Arjinin stok standart solüsyonu (1 mM) 0.1 M HCl içinde hazırlanıp buzdolabında saklandı. Stok solüsyonunun 0.1 M HCl ile dilüsyonuyla standart solüsyonu (500µM) hazırlandı. Hazırlanan 500 µM standart solusyondan 0,1M HCl ile dilüsyonla sırasıyla 250 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, olmak üzere

standart çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan standartlar derivatizasyon işleminden sonra otomatik örnekleme cihazına konularak 10 µl enjekte edildi. Alınan pik alanlarıyla arginin standart grafiği oluşturuldu

3.2.1.6. Numune Hazırlanması

Hastalardan düz tüplere alınan kanlar bekletilmeden 2000 x g devirde 4 ^{0} C'de 10 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serumdan 1 ml alınıp 20 mg sülfosalisilik asit ilave edilip 10 dakika buz banyosunda bekletildi. Tekrar 2000 x g devirde 4 ^{0} C'de 10 dakika santrifüj edildi. Deproteinizasyon işleminden sonra üstte kalan süpernatanttan ADMA analizi yapıldı. Süpernatantlar 0.22 çaplı enjektör filtrelerden süzülerek sisteme verildi.

3.2.1.7. Türevleştirme

Standart ve numuneler o-fitaldialdehid (OPA) kullanılarak derivatize edildi. Derivatizasyon için 10 mg OPA, 0.5 ml metanol ve 2 ml 0.4 M borat tamponunda (pH=10) çözüldü. Hazırlanan solüsyona 30 µL merkaptoetanol eklendi. Hazırlanan derivatizasyon solüsyonunun stabilitesi 2 gün olduğundan her analiz öncesi taze olarak hazırlandı. 10 µL numune süpernatantı 100 µL OPA ile karıştırılıp 3 dk oda ısında bekletilip analiz için cihaza enjekte edildi. Bulunan alan yardımıyla standart grafiğinden faydalanılarak örneklerin ADMA ve Arginin değerleri hesaplandı.

3.2.1.8. Kromatografik Analiz

Gradyent mobil faz kullanıldı. Mobil faz A ve B aşağıda gösterildiği şekilde dakikada 1 ml olacak şekilde sisteme pompalandı.

Tablo 3.1. Mobil fazların akış şeması

ZAMAN (dk)	A (%)	B (%)
0	95	5
6	88	12
16	60	40
28	25	75
32	0	100
34	0	100
35	95	5

Deteksiyon:

Floresans dedektör eksitasyon için 338 nm.ve emisyon için 425 nm'ye ayarlandı. Agilent 1100 serisi HPLC cihazı, 250 x 4.6 mm C_{18} Supelcosil 5µm kolon ve floresans dedektör kullanıldı (54). Toplam analiz süresi 35 dk. olacak şekilde ayarlandı.

3.2.2. DDAH1 geninin T87M Mutasyonunun İncelenmesi

3.2.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen bireylerden her iki EDTA'lı tüpe 2'şer ml kan alındı. Tüplerden biri hastaların DNA izolasyonlarını yapmak için kullanıldı. Tam kandan DNA izolasyonu DNA izolasyon kiti kullanılarak (High Pure PCR Template Preparation kit, Roche Diagnostic, Germany) yapıldı ve -20ºC'de saklandı.

3.3.2.2. T87M Mutasyonunun İncelenmesi

DDAH 1 T87M gen mutasyonu Light Cycler mutasyon belirleme primer-prob düzeneği (TIB Molbiol Syntheselabor, GmbH, Berlin, Germany) kullanılarak Light Cycler cihazında Real Time PCR ile saptandı.

DDAH ekzon 1 T87M tek nükleotid gen polimorfizmi için dizayn edilen primer ve problar tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. DDAH 1 primer ve problarının erime sıcaklıkları

	DDAH ekzon 1 T87M	**Erime ısısı**
DDAH1_F	CGAGTCGGCAGTTACCTCCT	60ºC
DDAH1_S	AGTCGGCAGTTACCTCCTTCC	59 ºC
DDAH1_A	GAGGACGTGG**T**CGTGGTGT	59,2ºC
DDAH1_R	CGTGGAGGACGTGG**T**CGT	60,4 ºC
DDAH1_C	FAM-CGAGGAGA**C**GGCCTCAT-BBQ	60,1ºC
DDAH1_T	YAK-CGAGGAGA**T**GGCCTCATC-BBQ	58,4 ºC

Polimorfizm analizi, geleneksel olarak polimeraz zincir reaksiyonu-bağlantılı restriksiyon fragment polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile yapılmaktadır. Bu yöntem, polimorfizmi ortaya çıkaran baz değişiminin bir restriksiyon enzimi için yeni bir kesim yeri ortaya çıkarması veya mevcut olan bir kesim yerini ortadan kaldırmasına bağlı olarak, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan fragmentin enzim kesimi sonucunda normal durum ile polimorfik allel arasında uzunluk farklıklarının (veya polimorfizminin) izlenmesi esasına dayanır. Yöntem, birden fazla ara aşama içermesi, bazı restriksiyon enzimleri ile ilgili sorunların ortaya çıkması gibi dezavantajlara sahiptir. Son zamanlarda, floresan maddelerle işaretli problar kullanılarak, polimeraz zincir reaksiyonunda DNA amplifikasyonunun floresan ölçümü sayesinde eş zamanlı olarak izlenebildiği polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ("real-time fluorescence PCR") sıkça kullanılmaktadır.

Çalışmamızda uyguladığımız LightCycler floresan PCR yöntemi nükleik asit miktarının kantitatif analizine olanak sağlaması yanında bilinen mutasyonların (veya polimorfizmlerin) analizini de gerçekleştirebilmektedir.

LightCycler Floresan PCR Yöntemi ile Polimorfizm Analizi LightCycler floresan PCR yöntemi (Roche, Mannheim, Almanya) alışılmış polimeraz zincir reaksiyonunu floresan ölçüm sistemi ile kombine ederek, DNA amplifikasyonunun eş-zamanlı izlenmesini sağlamaktadır. Bu yöntemde, normal PCR'da kullanılan primerlere ek olarak, floresan işaretli iki prob kullanılmıştır. Problardan bir tanesi, polimorfizm içeren bölgeye spesifik dizayn edilirken, diğeri hemen bunun yakınında (1 baz çifti uzaklıkta) yerleştirilmiştir. Bu yöntemde genotiplerin ayırt edilmesi "erime eğrisi analizi" ("melting curve analysis") ile gerçekleştirilmektedir. Bunun için, PCR'da DNA amplifikasyonun tamamlanmasından sonra, sıcaklık çok yavaş bir şekilde yükseltilerek her bir örnek için erime eğrisi oluşturulmuştur. Sıcaklık yükseltilmesi sırasında normal dizi ile polimorfizm içeren dizinin ayırımı gerçekleşmektedir.

Polimorfizm içeren dizi ile floresan işaretli prob arasında oluşan dupleks yanlış bir eşleşme ("mismatch") içerdiğinden, normal dizi ile prob arasında oluşan duplekse oranla daha az stabildir. Bu durum, polimorfizm içeren dupleksin daha düşük bir erime noktasına ("melting point") sahip olmasına ve dolayısıyla sıcaklık yükseltilmesi sırasında daha düşük bir sıcaklıkta ayrışmasına yol açmaktadır.

Matematiksel bir dönüşüm kullanılarak erime eğrilerinden floresan değerinin negatif türevinin sıcaklığa göre değişimini veren profiller elde edilmekte ve değişik allellere ait farklı erime sıcaklıkları gösteren tepeler izlenmektedir. Çalışmamızda polimorfizm analizi için periferik lenfositlerden proteinaz K/izopropanol yöntemi ile elde edilen genomik DNA ve TIB Molbiol (Syntheselabor, GmbH, Berlin, Almanya) tarafından dizayn edilen floresan-işaretli problar kullanıldı. Hibridizasyon karışımı (Taq polimeraz, reaksiyon tamponu, nükleotid karışımı), $MgCl_2$, primerler, problar ve genomik DNA toplam 20 µl hacimde karıştırılarak kapillerlere aktarıldı.

PCR koşulları daha önce tanımlandığı gibi gerçekleştirildi. Amplifikasyonun tamamlanmasından sonra, sıcaklığın saniyede 0.2°C artırılarak 40°C'den 85°C'ye yükseltilmesiyle erime eğrileri oluşturuldu. Floresan/sıcaklık negatif türevinin sıcaklığa göre çizilmesiyle de, erime eğrileri, erime tepelerine dönüştürüldü.

3.2.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiki analiz SPSS v15 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Normal dağılım gösteren parametreler arasında gruplar arasındaki farklılık bağımsız örneklem t testi ile incelendi.

Normal dağılım göstermeyen parametreler ise Mann Whitney U testi ile analiz edildi. Çalışmamızda gruplara ait bulgular ortalama ± standart sapma şeklinde verildi. Bulgular arasındaki korelasyon Pearson korelasyon testi ile değerlendirilirken $p<0,05$ olan sonuçlar önemli olarak değerlendirmeye alındı.

4. BULGULAR

Araştırmaya dahil olan hasta grubu ve sağlıklı kontrollere ait demografik veriler tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait demografik veriler

	N (kişi sayısı)	Yaş	Cinsiyet K/E	Sigara	Diabetes Mellitus	Hipertansiyon	Aile öyküsü
Hasta Grubu	50	63,7±12	16/34	35	22	33	14
Kontrol Grubu	50	56,9±10	20/30	24	10	24	3
p		0.005	0.52	0.025	0.01	0.07	0.003

Araştırmaya dahil olan hasta grubu ve sağlıklı kontrollere ait biyokimyasal veriler tablo 4.2'de verilmiştir.

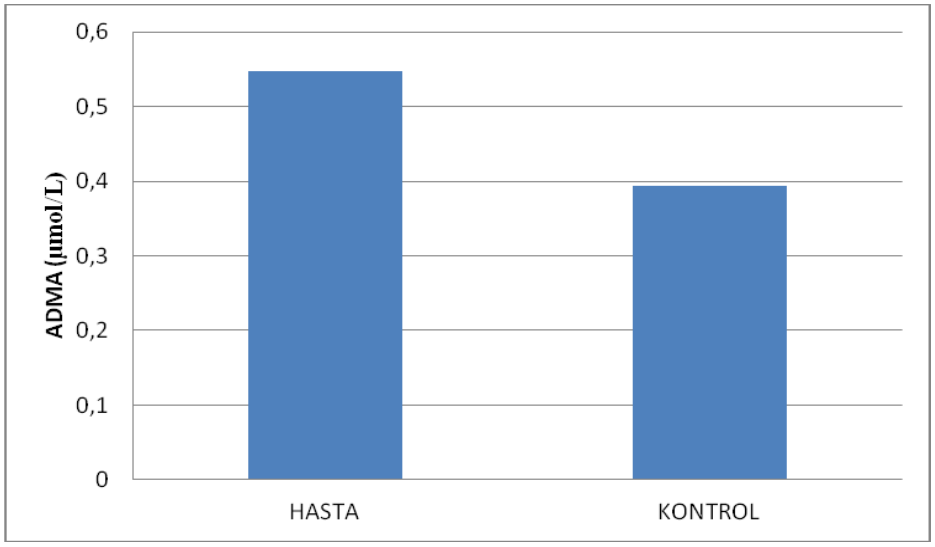
Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubuna ait biyokimyasal veriler

	Total Kolesterol	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Trigliserid (mg/dL)	ADMA (µmol/L)	DDAH 1 SNP
Hasta Grubu	186,3±51,1	114,8±44,6	34,2±10,8	190,4±171	0,54±0,084	1
Kontrol Grubu	185,8±38,8	115,2±32,4	44,4±12,1	131,3±72	0,39±0,10	0
p	NS	NS	p<0.001	0,027	p<0,001	

SPSS programında yapılan bağımsız örneklem testi ile ADMA düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuş olup Arjinin/ADMA oranlarında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir (Sırasıyla p<0,001 ve p=0,08).

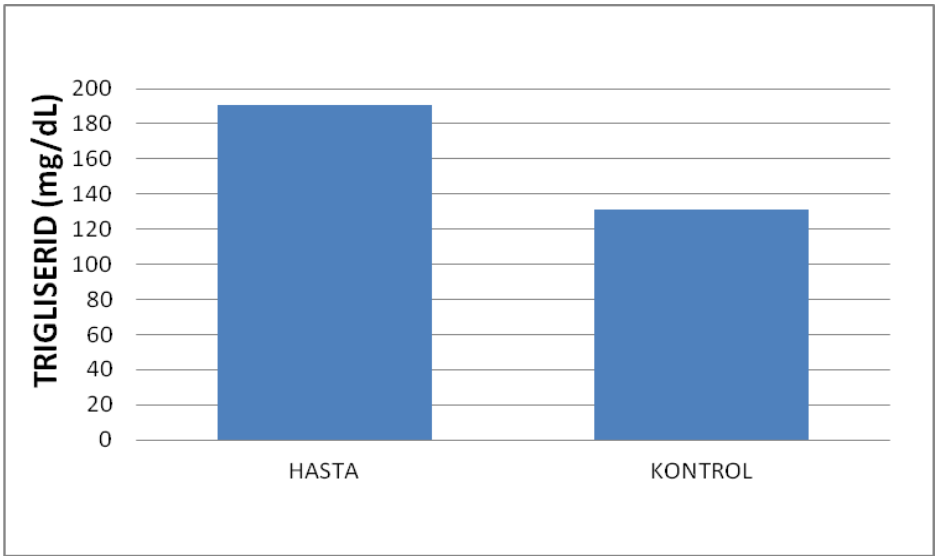
Total kolesterol ve LDL kolesterol konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık gözlenmez iken TG ve HDL-kolesterol düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak farklı bulunmuştur (Sırasıyla p=0,955 ve p=0,960; p=0.027 ve p<0,001).

ADMA düzeylerindeki bu anlamlı fark grafiksel olarak şekilde gösterilmiştir.

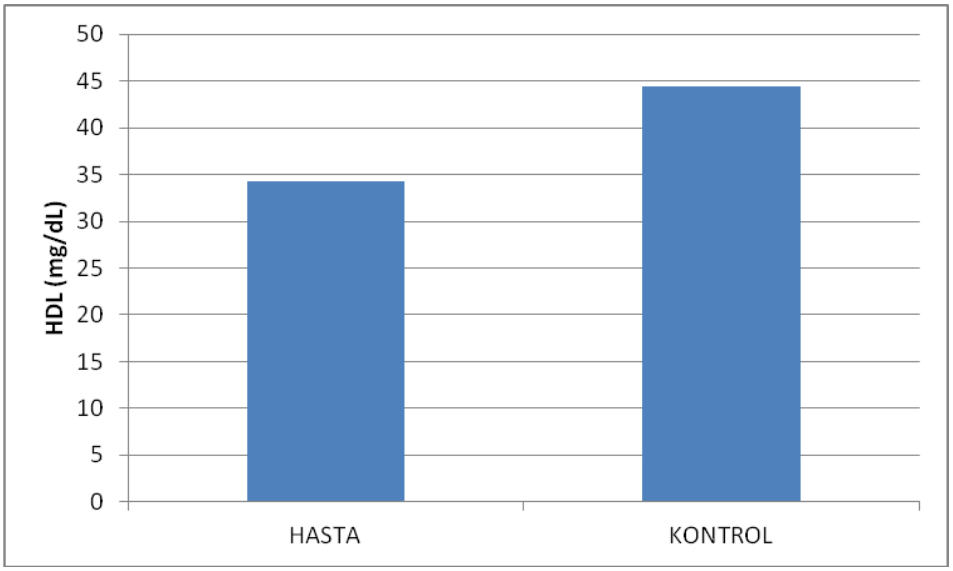


Şekil 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait ADMA seviyelerinin ortalamaları

Mann Whitney U analizi sonucunda hasta grubunda trigliserid düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek (p=0,033), HDL-kolesterol seviyeleri ise düşük tespit edilmiştir (p<0,001) (Şekil 4.2 ve 4.3).



Şekil 4.2. Hasta ve kontrol grubuna ait Trigliserid seviyelerinin ortalamaları



Şekil 4.3. Hasta ve kontrol grubuna ait HDL-kolesterol seviyelerinin ortalamaları.

Yine hasta grubunda aile öyküsü bulunması, sigara içimi ve diabetes mellitus sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanırken (sırasıyla p=0.004, p=0,026 ve p=0,010) hipertansiyon için bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (p=0,07).

Hasta grubuna ait pearson korelasyon analizi tablo da verilmiştir. ADMA ile Total kolesterol ve LDL-kolesterol arasında herhangi bir korelasyon saptanamamıştır. Total kolesterol ile LDL kolesterol arasında ise pozitif bir korelasyon bulunmaktadır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Hasta grubunda ADMA, Total Kolesterol ve LDL-kolesterol arasındaki korelasyon grafiği

	ADMA	**T.KOLESTEROL**
T.KOLESTEROL	,167	
LDL	,121	,899(**)

** p<0,01 * p<0,05

Hasta grubunda yapılan spearman korelasyon analizinde Trigliserid ile HDL kolesterol arasında ve sigara ile HDL kolesterol arasında negatif korelasyon tespit edilirken aile öyküsü ile HDL arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Hasta grubuna ait demografik verilerin korelasyonu

	TRIGLISERID	HDL	SIGARA	HIPERTANSIYON	AILEOYKUSU	DIABET
HDL	-,477(**)					
SIGARA	,129	-,306(*)				
HIPERTANSIYON	,047	,032	-,009			
AILEOYKUSU	-,150	,345(*)	-,175	,165		
DIABET	-,046	-,038	-,035	-,044	,165	
YAS	-,098	,081	-,197	,105	-,168	-,133

** p<0,01 * p<0,05

Kontrol grubunda yapılan pearson korelasyon analizi ile total kolesterol ve LDL-kolesterol arasında pozitif korelasyon saptanırken, trigliserid ile HDL arasında negatif korelasyon saptanmıştır (Tablo 4.5).

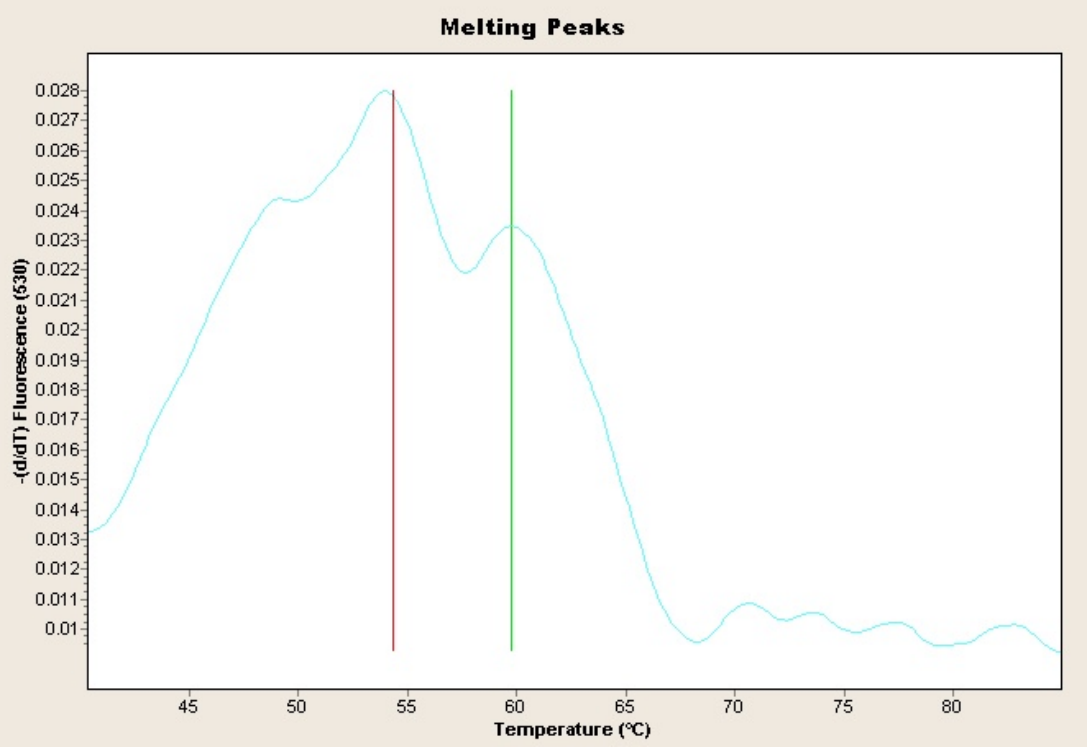
Tablo 4.5. Kontrol grubunda ADMA, Total Kolesterol ve LDL-kolesterol arasındaki korelasyon grafiği

	ADMA	T.KOLESTEROL
T.KOLESTEROL	-,044	
LDL	-,112	,934(**)

Tablo 4.6. Kontrol grubuna ait demografik verilerin korelasyonu

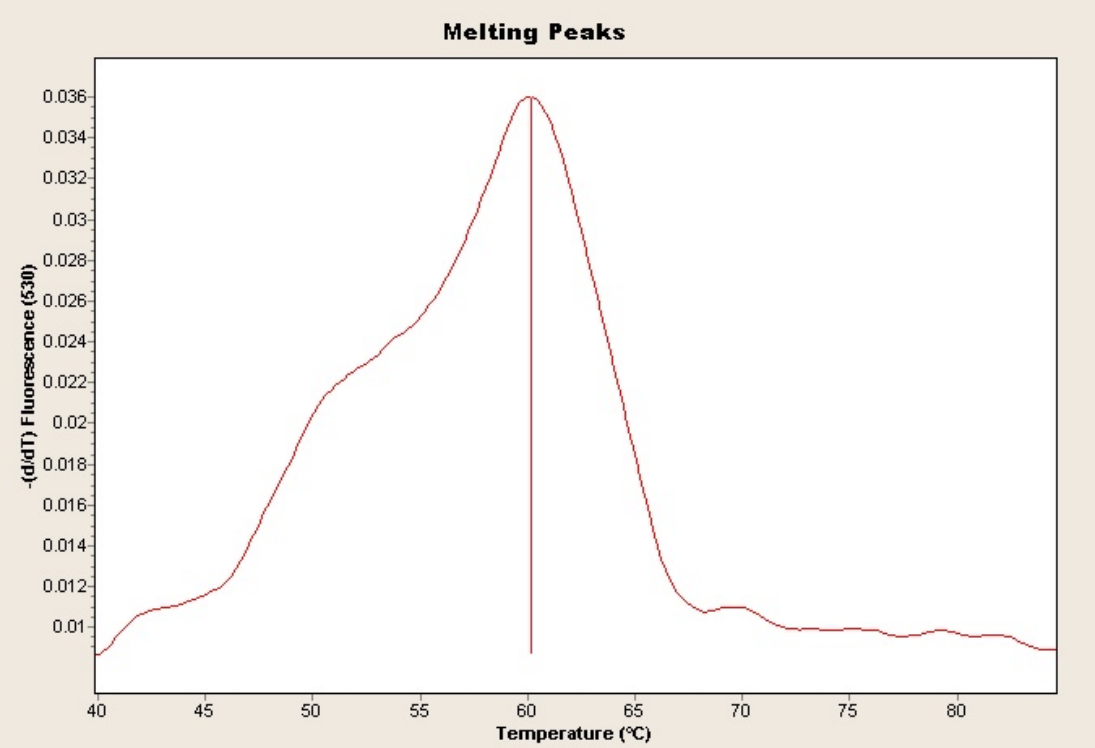
	TRIGLISERID	HDL	SIGARA	HIPERTANSIYON	AILEOYKUSU	DIABET
HDL	-,474(**)					
SIGARA	,176	-,213				
HIPERTANSIYON	-,182	,371(**)	-,122			
AILEOYKUSU	,009	,281(*)	,094	,094		
DIABET	-,185	,123	-,280(*)	,420(**)	-,126	
YAS	-,080	,193	-,39(**)	,275	,026	,166

Çalışmamıza dahil edilen 50 koroner arter hastasından sadece bir bireyde DDAH 1 gen heterozigot polimorfizmi saptanmıştır. Hasta grubunda homozigot polimorfik bir yapı gözlenmemiştir. Şekil 4.4'de heterozigot polimorfik hastanın melting curve grafiği gösterilmiştir. Mutant baz 54°C'de ayrışım göstermiştir.



Şekil 4.4. Hasta grubundan DDAH 1 heterozigot bireyin genomik DNA görüntüsü

Kontrol ve hasta grubunda diğer bireyler ise DDAH 1 polimorfizmi açısında wild tip olarak saptanmıştır (Şekil 4.5). Wild type baz çiftinin ayrışımı 60°C'de gerçekleşmektedir.



Şekil. 4.5. DDAH 1 wild tip bireyin genomik DNA görüntüsü

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Arterin endoteli aşırı miktarda LDL-kolesterol, glukoz veya homosisteine maruz kaldığı zaman vazodilatasyonu uyaran bozulmuş geçirgenlik gibi çeşitli fonksiyon kayıpları baş göstermeye başlamaktadır.

Endotelyal vazodilatasyon fonksiyon kaybı çok faktörlü olup kesin olan bir bulgu varsa o da yükselmiş ADMA düzeylerinin bu olayda bir rolü olduğudur (Stuhlinger MC, ve ark 2003).

Artmış ADMA' nın hipertansiyon ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde bulunduğu ve endotelyal disfonksiyonda anahtar rol oynadığına dair çok sayıda literatür bilgisi mevcuttur (Leiper J ve ark 1999, Boger RH, ve ark 2005). ADMA, ateroskleroz, kardiyovasküler ölüm ve koroner kalp hastalığı olan bireylerde, böbrek yetmezliği olanlarda bağımsız bir risk faktörü olarak bildirilmektedir (Schnabel R, ve ark 2005).

Arjininden NO oluşumu ADMA gibi çeşitli arjinin analogları tarafından inhibe edilir. Bu analoglar trombüs oluşumu ve ateroskleroz gelişimine sebep olabilir. Akut koroner sendromlu olgularda yapılan çalışmalarda ADMA seviyeleri yüksek olarak bulunmuştur, bu hastaların medikal tedavi sonrası ADMA seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir (Won Bae S ve ark 2005).

Azuma ve arkadaşları karotid arterlerine balon uygulanan tavşanların rejenere endotelyumunda sağlıklı olanlara göre düşük intraselüler arjinin ve yüksek ADMA seviyeleri bulmuşlardır.

Bu bulgular rejenere endotelyumda DDAH aktivitesinin düşük olduğunu ve arjinin seviyesinin yetersiz olduğunu düşündürmektedir (Mark F 2004). ADMA seviyeleri kalp yetmezliği olan hastalarda da artar. ADMA'nın ventrikül kontraksiyonu ve kalp hızını azaltma kapasitesi vardır.

ADMA'nın kardiyak fonksiyondaki rolü ve kalp yetmezliğindeki endotel fonksiyonundaki rolü tam aydınlatılamamıştır (Vallance P ve ark 2004).

Yüksek ADMA düzeylerinin kardiyovasküler olay insidansının artması yanında konsantrik sol ventriküler hipertrofi ve karotid arter intima media kalınlığının artması ile de kuvvetli bir ilişki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Zoccali C 2004).

Karotid intima media kalınlığı güçlü kardiyovasküler risk markırıdır (Hodis HN 1998). Plazma ADMA konsantrasyonları klinik aşikar aterosklerozu olanlarda olmayanlara göre yüksek olarak bulunmuştur (Kielstein JT ve ark 1999).

Kardiyovasküler patoloji için tedavinin amacı artmış ADMA'nın etkilerini ortadan kaldırmak veya ADMA seviyelerini azaltmaktır. Teorik olarak arjinin ADMA'nın yerini alabilir, NOS aktivitesini tamir edebilir.

Arjininin hiperkolesterolemili hastalarda endotel disfonksiyonunu ve periferal vasküler hastalığı olan hastalarda yürüme zorluğunu düzelttiği gözlenmiştir. Bu hastalarda ADMA düzeylerini azaltmada diğer bir alternatif yol DDAH ekspresyonunu veya aktivitesini artırmaktır (Böger RH ve ark 1998).

Bizim çalışmamızda da literatürdeki çalışmalara benzer olarak koroner arter hasta grubunda ADMA düzeyleri yüksek olarak tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Maymunlar ve tavşanlar ile yapılan deneysel çalışmalarda hiperkolesterolemik diyetin kendi başına ADMA düzeylerini arttırdığı ve endotelyal fonksiyon azalmasını tetiklediği bildirilmiştir (Yu XJ ve ark 1994). İnsanlarda yapılan çalışmalarda ADMA seviyeleri ile kolesterol seviyeleri arasında pozitif korelasyon rapor etmektedir. Aynı yaş grubunda hiperkolesterolemik bireylerde kolesterol düzeyleri normal olanlara kıyasla ADMA seviyeleri yaklaşık iki kat yüksek bulunurken LDL-kolesterol düzeyleri ile pozitif korelasyon saptanmıştır (Böger RH ve ark 1998).

Bizim çalışmamızda koroner arter hasta grubunun ADMA düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen her iki grup arasında Total kolesterol ve LDL-kolesterol düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunmadığı gibi bizim bulgularımız literatürdeki bazı çalışmalar ile aynı yöndedir (Paiva H ve 2003).

Bu çalışmanın kısıtlılıkları arasında hasta grubunun kullandığı ilaçların net olarak bilinememesi yer alabilir. Öyle ki 2010 yılında yapılan bir çalışmada antioksidanlar, östrojen, A vitamini, ACE inhibitörleri, AT1 reseptör antagonistleri, lipid düşürücü, hipoglisemik ve beta adrenoreseptör bloke edici ilaçların ADMA düzeylerini düşürdüğü bildirilmektedir (Trocha M ve ark. 2010). Koroner arter hasta grubunda söz konusu ilaçların kullanımı yaygın olmakla birlikte lipid düzeyleri kontrol grubunun değerlerine yakın olarak saptanmıştır.

Fakat buna rağmen ADMA düzeylerindeki düşüş her halükarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın sürmesine mani olamamıştır fakat ADMA ile lipid düzeyleri arasında korelasyon saptanamamasının sebebi olabilir.

ADMA düzeylerinin tespitinde bu çok yönlü değişkenlerin dikkate alınarak daha büyük bir hasta grubu ile yapılacak çalışmalar bu parametrenin kardiyovasküler hastalıkları öngörmede bir belirteç olarak kullanılmasına imkan sağlayabilir.

Yapılan bir çalışmada plazma ADMA düzeylerinin 2,4 μmol/L sınırında bir eşik değer alınması yavaş koroner akım fenomeni için 65.4 %sensitivite ve 74.2 % spesifiteye sahip olunmasını sağladığı rapor edilmektedir (Selcuk MT ve ark 2007).

ADMA düzeylerinin artmasının en yaygın nedeni bozulmuş DDAH aktivitesidir. DDAH enzimi aktif bölgesinde bir reaktif sülfidril grubu içerdiğinden oksidatif strese duyarlıdır (Murray-Rust J ve ark 2001). Endotelin yüksek oranda LDL-kolesterol gibi oksidatif stresi tetikleyen bir aracı moleküle maruz kalması DDAH aktivitesini azalttığı gibi ADMA seviyelerini yükseltebilir (Lin KY ve ark 2002).

İnsan dokularında bugüne dek DDAH enziminin iki adet izoformu saptanmış olup (DDAH 1 ve DDAH 2) bu enzimlerin doku dağılımları kısmen örtüşmektedir.

DDAH 2 birçok dokuda DDAH aktivitesinin sadece çok az bir kısmına katkı sağlarken DDAH 1 enziminin azaltılması ADMA birikimine ve nitrik oksit sinyal yolağının aksamasına yol açmaktadır (Leiper J ve ark 2007).

DDAH 1 enzim formunun serum ADMA düzeyleri için belirleyici bir rolü olduğu, DDAH 2' nin ise endotelin nitrik oksit aracılı fonksiyonlarını düzenlediği

öne sürülmektedir (Wang ve ark 2007). DDAH gen polimorfizminin insanlarda kardiyovasküler hastalık riskine aracılık edebileceğine dair çok az çalışma olmakla birlikte etnik olarak bu polimorfizmin saptandığı çalışma sayısı da çok azdır. Biz çalışmamızda koroner arter hastalığı olan bireylerde DDAH 1 gen polimorfizmini araştırdık ve bir hastada heterozigot bir varyant tespit ettik.

Bizim çalışmamızdan önce DDAH 2 geninde fonksiyonel insersiyon/delesyon bildiren bir çalışma mevcuttur (Jones ve ark 2003). 2009 yılında ise DDAH 2 promotor bölgesinde -1151 A/C (SNP 1) ve -449 G/C (SNP 2) polimorfizmleri artmış hipertansiyon prevalansı ile birliktelik gösterecek şekilde taranmıştır (Maas ve ark 2009). Yine yapılan bir çalışmada 48 rastgele seçilen Çinli bireyden alınan örneklerden DDAH 1 geni sekanslanmış biri promotor bölgede, biri ekzon 4'te, 5'i intronik bölgelerde ve 2,3' okunmayan bölgelerde olmak üzere 9 adet polimorfizm saptanmıştır. Bu varyantlardan birisinde yüksek ADMA düzeyleri tespit edilmiş olup yüksek kardiyovasküler hastalık riski oluşumu DDAH 1 promotor bölgesinin baskılanmasına bağlanmıştır (Hu Ding ve ark 2010) Türk toplumunda bu enzimin polimorfizminin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Daha geniş bir populasyon ile yapılacak polimorfizm çalışmaları ve bu polimorfik bireylerde risk faktörlerinin detaylı olarak incelenmesi yüksek ADMA düzeylerinin kardiyovasküler olaylardaki rolünü netleştirilmesi adına katkı sağlayacaktır.

6. ÖZET

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
S.Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Koroner Kalp Hastalarında Asimetrik Dimetil Arjinin (Adma) Düzeyleri Ve Dimetilarjinin Dimetilamino Hidrolaz (DDAH, EC 3.5.3.18) Enziminin Genetik Varyasyonunun İncelenmesi

Sedat Abuşoğlu

BİYOKİMYA (TIP) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA-2012

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

Ateroskleroz tanısı almış olan 50 birey ve koroner aterosklerozu bulunmayan 50 kontrol bireyi çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastaların kardiyak belirteç düzeyleri ve risk faktörleri çalışma kapsamında incelenmiştir.

ADMA ve Arjinin için hastalar oturur pozisyonda iken iki ayrı düz tüpe venöz kan örnekleri alındı. ADMA ve Arjinin örnekleri hemen soğuk zincire riayet edilerek soğutmalı santrifüj ile +4 ^{0}C de 2000 x g de 5 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar sülfosalisilik asit ile uygulanan deproteinizasyon işleminden sonra ADMA ve Arjinin çalışmaları için ependorf tüplere aktarılıp – 80 ^{0} C de çalışma gününe kadar muhafaza edildi.

DDAH gen polimorfizmi çalışmaları için aynı hasta ve kontrol grubundan K2-EDTA içeren tam kan tüplerine kan örnekleri alındı.

Total kolesterol ve LDL kolesterol konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Sırasıyla p=0,955 ve p=0,960).

Mann Whitney U analizi sonucunda hasta grubunda trigliserid düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek (p=0,033), HDL-kolesterol seviyeleri ise düşük tespit edilmiştir (p<0,001). Yine hasta grubunda aile öyküsü bulunması, sigara içimi ve diabetes mellitus sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanırken (sırasıyla p=0.004, p=0,026 ve p=0,010) hipertansiyon için bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (p=0,07)

ADMA ile Total kolesterol ve LDL-kolesterol arasında herhangi bir korelasyon saptanamamıştır. Total kolesterol ile LDL kolesterol arasında ise pozitif bir korelasyon bulunmaktadır.

Hasta grubundan bir kişide DDAH 1 gen polimorfizmi heterozigot bulunurken homozigot mutant genotip hiçbir katılımcıda gözlenmemiştir. Diğer katılımcılarda genin ilgili bölgesi wild tip olarak belirlenmiştir..

Sonuç olarak daha geniş bir populasyon ile yapılacak polimorfizm çalışmaları ve bu polimorfik bireylerde risk faktörlerinin detaylı olarak incelenmesi yüksek ADMA düzeylerinin kardiyovasküler olaylardaki rolünü netleştirilmesi adına katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Koroner kalp hastalığı; Asimetrik dimetil arginin; DDAH; polimorfizm

7. SUMMARY

Investigation of the Genetic Variation of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase (DDAH, EC 3.5.3.18) Enzyme and the Levels of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Patients with Coronary Heart Disease

Fifty patients diagnosed with coronary heart disease and fifty healthy subjects were included to this study. Risk factors and levels of cardiac markers were eveluated.

For arginine and ADMA measurements, venous blood samples were collected from patients at sitting position to two different anticoagulant free tubes. Serum was seperated by centrifugation of tubes at +4 ^{0}C at 2000 g for five minutes according to the procedures. After deproteinization with sulfosalicylic acid, serum was stored in eppendorff tubes at -80 ^{0}C until arginine and ADMA analysis. For DDAH gene polymorphism analysis, blood samples were taken from all subjects to K_2-EDTA containing tubes.

There was no significant difference for total cholesterol and LDL-cholesterol levels between groups (p=0,955 and p=0,960 respectively). By Mann-Whitney U analysis, triglyceride levels were higher in patients and HDL-cholesterol levels were lower compared to the control group (p=0,033 and p<0,001, respectively).

Patients have higher incidence for family history, smoking and diabetes mellitus (p=0.004, p=0,026 and p=0,010,respectively) compared with control group, but there was no difference for hypertension (p=0,07). There was no correlation between ADMA, total cholesterol and LDL-cholesterol. Also there was a positive correlation between total and LDL-cholesterol.

One patient was heterozygosit polymorphic for DDAH 1 gene and there was no homozygotic polymorphic individual from all groups. Rest of the participants showed wild type of DDAH 1 gene.

Consequently, polymorphism studies which are performed with bigger population and detailed investigation of risk factors in these polymorphic individuals will contribute to ensure the role of high ADMA levels in cardiovascular diseases.

Keywords: Coronary Heart Disease; Asymmetric dimethylarginine; DDAH; polymorphism

8. KAYNAKLAR

Abdalla Abbas M, Guenther A, Galantucci S et al. Microbial risk factors of cardiovascular and cerebrovascular diseases: potential therapeutical options. Open Neurol J 2008;2:94.

American Diabetes Association. Consensus development Conferance on the diagnosis of coronary heart disease in people with diabetes: 10-11 February 1998. Miami, Florida. Diabetes Care 1998; 21: 1551.

Ardissino D, Manucci PM, Merlini PA et al. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. Blood 1999;94: 46-51.

Badimon J, Lettino M, Toschi V, et al. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of distrupted human atherosclerotic plaques: Effects of tissue factor Pathway inhibitor on plaque trombogenecity under flow conditions. Circulation 1999;99:1780.

Basucci LM, Liuzzo G, Cervo A, et al. Antibody response to chlamydial heat shock protein is strongly associated with acute coronary syndromes. Circulation 2003;107:301-517.

Bennet AM, Prince JA, Fei GZ, et al. Interleukin-6 serum levels and genotypes influence the risk for myocardial infarction. Atherosclerosis 2003;171:359-362.

Boger RH, Cooke JP, Vallance P. ADMA: an emerging cardiovascular risk factor. Vasc Med 2005;10, Suppl 1: S1–S2.

Boger RH, Sydow K, Borlak J et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. Circ Res. 2000;87: 99–105.

Bottcher M, Falk E. Pathology of the Coronary arteries in smokers and non smokers. J Cardiovascular Risk 1999;6: 299-302.

Burring KF. The endothelium of advenced artheriosclerotic plaques in humans. Artherioscler Thromb 1991;11: 1678.

Bush DE, Jones CE, Bass KM et al. Estrogen replacement reverses endothelial dysfunction in postmenopausal women. Am J Med 1998; 104:5-8.

Caligiuri G, Paulson G, Nicoletti A, et al. Evidence for antigen driven T cell response in unstable angina. Circilation 2000;102:111-119.

Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronarysyndromes. N Engl J Med 2004;350:459-504.

Cem H, Multidispiliner Kardiyoloji, 1. Baskı. İstanbul: Nobel-Güneş 2002; 105-107.

Clarke S. Protein methylation. Curr Opin Cell Biol. 1993;5:977–983.

Cooke JP. Does ADMA Cause Endothelial Dysfunction? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:2032-2037.

Crawford, H.M., DiMarco, P.J., Crawford Kardiyoloji. 1. Baskı. İstanbul, AND Danışmanlık, Eğitim, Yayıncılık ve Organizasyon Ltd. Şti. 2003; I. Cilt, 21.

Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: Is there a link? Lancet 1997; 350: 3-6.

Di Corleto PE, Gimbrone MA. Vascular Endothelium. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, ade. Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, vol 1. Philadelphia: Lippicott-Raven; 1996;387.

Donesh J, Collins R, Appleby P et al. Association of fibrinogen, C. Reactive protein, albumin or leukocyte count with coronary heart disease. Meta analyses of prospective studies. JAMA 1998; 279: 77-82.

Falk E, Fuster V. Aterogenez ve belirleyicileri. İn: Valentin F. Hurst's The Heart, Türkçe. 10. ed. 2004; 65- 93.

Falk E, Shan PK, Fuster V. Coronary plaque distruption. Circulation 1995;92: 657-710.

Falk E., Fuster V. Aterogenez ve belirleyicileri. in Valentin F. Hurst's The Heart, Türkçe. 10. ed. 2004; 1065.

Fredrik P, Maristela LO et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;293: H3227–H3245.

Fuster V, Corti R, Fayad ZA, et al. Integration of vascular biology and magnetic resonance imaging in the understanding of atherothrombosis and acute coronary syndromes. J Thromb Haemost 2003;1: 1410.

Fuster V, Gotto AM, Libby P et al. Task Force 1: Pathogenesis of coronary heart disease. The biologic role of risk factors. J Am Coll Cardiol 1996; 26: 64-76.

Giroud M, Milan C, Beauriat P. Incidence and survival rates during a two-year period of intracerebral and subarachnoid hemorrhagies, cortical infarcts, lacunes and transient ischaemic attacks. The Stroke Registry of Dijon; 1985-1989. Int J Epidemiol. 1991; 20:892-899.

Glagov S, Weisenberg E, Zarinsk CK. et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotics coronary arteries. N Engl J Med 1987;316:1371.

Gök H, İskemik Kalp Hastalıkları. Klinik Kardiyoloji 1996;97-171.

Greenland P, Knoll MD, Stamler J et al. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. JAMA 2003; 290:891.

Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, et al. Assesment of cardiovascular risk by use of multiple risk factor assesment equations: A statement for healtcare professionals from the American Heart Association and the American Collage of Cardiology. Circulation 1999;100:1481.

Grundy SM, Wilhelmsen L, Rose G, et al. Coronary heart disease in high risk populations; Lessons from Finland. Eur Heart J 1990;11: 62-71.

Guyton JR, Klemp KF. Development of the atherosclerotic core region: Chemical and ultrastructural analysis of microdissected atherosclerotic lesions from human aorta. Atheroscler Thromb 1994;14:1305-1401.

Haffner SM, Alexander CM, Cook TJ et al. Reduced coronary events in Simvastatin-treated patients coronary heart disease and diabetes or impaired fasting glucose levels subgroup analyses in the Scandinavian Simvastatin Survival Study. Arch Intern Med 1999;159:1-7.

Hankey G. The risk of vascular ischaemic events in patients various clinical manifestations of atherothrombosis: Data from CAPRIE. Cerebrovasc. Dis. 1998;8 (suppl 4):30.

Hansson GK. İmmune responses in atherosclerosis. İn: GK Hansson, P Libby, et al. İmmune functions of the vessel Wall. Harwood Academic 1996;40: 87-92.

Hodis HN, Mack WJ, Labree L et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. Ann Intern Med 1998;128:262–269.

Hopkins PN, Williams RR. Human genetics and coronary heart disease: A public health perspective. Annu rev Nutr 1989,9: 303.

Hu D, Bin W et al. Increased Susceptibility to Thrombosis Stroke and Coronary Heart Disease A Novel Loss-of-Function DDAH1 Promoter Polymorphism Is Associated With Increased Susceptibility to Thrombosis Stroke and Coronary Heart Disease. Circulation Research 2010, 106:1145-1152.

Hughes SD, Verstuyft J, Rubin EM. HDL deficiency in genetically engineered mice requires elevated LDL to accelerate atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 25-29.

Ikeda U, Ito T, Shimada K. Interleukin-6 and acute coronary syndrome. Clin Cardiol. 2001;24:70-91.

Jones LC, Tran CTL, Leiper JM et al. Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2003;310:836–843.

Kazuhiro H, Shu W, Satoru T et al. Role Of Asymmetric Dimethylarginine İn Vascular Injury İn Transgenic Mice Overexpressing Dimethylarginie Dimethylaminohydrolase 2. Circulation Research 2007; 101:e2 e10.

Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: Relationship to treatment method and atherosclerotic disease. J AmSoc Nephrol 1999;10:594–600.

Kimoto M, Whitley GS, Tsuji H et al. Detection of NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody. J Biochem. 1995;117:237–238.

Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coranary artery disease and implications for therapy. Am J Cardiol 1997;80:11-19.

Knipp M, Charnock JM, Garner CD et al. Structural and functional characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain. Zn(II) release activates DDAH-1. J Biol Chem 2001;276: 40449–40456.

Krause CD, Yang ZH, Kim YS et al. Protein arginine methyltransferases: Evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential.Pharmacol Ther. 2006;12-35.

Kristensen SD, Ravn HB, Falk E. Insights in to the pathophysiology of unstable coronary artery disease. Am J Cardiol 1997;80:599.

Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. Diabetes 1999;48: 37-42.

Leiper J, MacAllister R, Whitley Get al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology to microbial arginine deiminases. Biochem J. 1999;343:209–214.

Leiper J, Nandi M, Torondel B et al. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. Nat Med. 2007;13:198 –203.

Lentz SR, Rodionov RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. Atherosclerosis Supplements 2003; 4: 61–65.

Libby P, Bonow RO. Braunwald's Heart Disease, Textbook of cardiovaskuler medicine, 7th edition 2000; 124.

Libby P. The Vascular biology of atherosclerosis. İn Braunwald E, Zipes DP, Libby P. Heart Disease, A Text book of cardiovascular medicine 6th ed. W.B Saunders Company, Philadelphia 2001;995-1009.

Libby R, Ridker PM. Novel inflammatory markers of coronary risk: Therory versus practice. Circulation 1999; 100: 48-50.

Lin KY, Ito A, Asagami T et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: Role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Circulation. Aug 20; 2002; 106(8):987–92.

Liu J, Sukhova GK, Sun JS et al. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:359.

Liuzzo G, Biasucci LM, Rebuzzi AG, et al. Plasma protein acutephase response in unstable angina is not induced by ischemic injury. Circulation 1996;94:237-380.

M.Gill HC Jr, Mc Mahan CA, Malcolm GT et al. Relation of glycoheamoglobin and adiposity to atherosclerosis in youth: Pathobiological Determinants of Arteriosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15: 31-40.

Maas R, Erdmann J, Lüneburg N et al. Polymorphisms in the promoter region of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene are associated with prevalence of hypertension. Pharmacol. Res. 2009;60, 488–493.

Maresca G, Blasio AD, Marchioli R et al. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: An update. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 68-77.

Mark F. McCarty. Medical Hypotheses 2004;63: 699–708.

Masuda H, Goto M, Tamaoki S, et al. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxaninduced hyperglycaemia. Br J Pharmacol. 1999; 126:211–218.

McDermott JR. Studies on the catabolism of *N*G-methylarginine, *N*G,*N*_G dimethylarginine and *N*G,*N*G-dimethylarginine. Biochem J. 1976;154:179–184.

McGill HC Jr, McMahan CA, Malcom GT et al. Effects of serum lipoproteins and smoking on atherosclerosis in young men and women. The PDAY Research Group: Pathobiological Determinants of Atherosiclerosis in Youth. Artherioscler Tromb Vasc Biol17 1997; 95-106.

McGill HC Jr. George Lyman Duff Memorial lecture: Persistent problems in the pathogenesis of atherosclerosis. Atherosclerosis 1984;4: 443-510.

Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. Circulation. 1999;99:1141–1146.

Moreno PR, Leon MN, Vyalkov VA, et al. Coronary plaque composition and tissue factor in cigaratte smokers. Circulation 1998;98: 145.

Murray CJ, Lopez AD. Global mortality disability and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease study. Lancet 1997; 349: 36-42.

Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Nat Struct Biol. 2001; 8:679–683.

Napoli C, Witztum JL, de Nigris F. et al. İntracranial arteries of human fetuses are more resistant to hypercolesterolemia induced fatty streak formation than extracranial arteries. Circulation 1999;99: 10.

Nenci GG. Unifying concept of arterial vascular disease. Eur Heart J;1 (supl A) 1999; 27-30.

Nordestgaard BG. The vascular endothelial barrier selective retention of lipoproteins. Curr Opin Lipidol 1996;7: 269.

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme. NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. J Biol Chem. 1989;264:10205–10209.

Onat A. Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı, yeni koroner olaylar ve kalpden ölüm sıklığı. TEKHARF: Türk Erişkinlerinde Kalp Sağlığının Dünü Ve Bugünü. Edit: Onat A ve ark., BMS. 1996;15-27.

Onat T, Emerk K,. Sözmen. EY. İnsan Biyokimyası 2002;291-354.

Ören Z, Aterotrombozun Fizyopatolojisi, Türk Kardiyoloji Semineri Cilt 4 Nisan 2004; 2: 180.

Päivä H, Laakso J, Lehtimäki T et al. Effect of high-dose statin treatment on plasma concentrations of endogenous nitric oxide synthase inhibitors. J Cardiovasc Pharmacol. 2003;41:219-22.

Pankaj S, Paul B. Candidate Gene-Based Studies Still Have Value İn A World Dominated By Whole Genome Approaches. Circ Res. 2010;106:1019-1021.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RWN et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the american heart association. Circulation 2003; 107:499 –511.

Rauch U, Osende JI, Fuster V, et al. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: Pathogenesis and clinical consequences. Ann Inten Med 2001;134: 24-38.

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N Engl J Med 1997;336:73-79.

Rissanen AM. Familial aggregation of coronary heart disease in a high incidence area. Br Heart J 1979;42: 294.

Rizzo M, Corrado E, Coppola G et al. Markers of inflammation are strong predictors of subclinical and clinical atherosclerosis in women with hypertension. Coron Artery Dis 2009;20:15-20.

Roald HE, Orvim U, Bakken IJ et al. Modulation of thrombolitic responses in moderately stenosed arteries by cigarette smoking and aspirin ingestion. Arterioscler Thromb 1994; 14: 17-21.

Roberts WC. Preventing and arresting coronary atherosclerosis. Am Heart J 2001;195;130:580-600.

Ross R The pathogenesis of atherosclerosis. NEJM 1986;314:488-512.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature Lond 1993;362:801–900.

Rugger LF, Leopold JA, Loscalzo J. Atherothrombosis: Plague instability and thrombogenesis. Progress Cardiovascular Diseases 2002;44: 81-94.

Ryan R, Thornton J, Duggan E et al. Gene polymorphism and requirement for vasopressor infusion after cardiac surgery. Ann Thorac Surg 2006;82: 895–901.

Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E et al. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. Clin Chem Lab Med 2004;42:1377–1383.

Selcuk MT, Selcuk H, Temizhan A et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations and L arginine/asymmetric dimethylarginine ratio in patients with slow coronary flow Coron Artery Dis. 2007 Nov;18(7):545-51.

Solberg LA, Strong JP. Risk factors and atherosclerotic lesions: A review of autopsy studies. Arteriosclerosis 1983; 3: 87-98.

Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis prone regions: Coincil on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 1992; 85: 391-405.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al. A definition of advenced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: A report from the Committe on Vascular Lesions Of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association. Circulation 1995;92: 355-374.

Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia: Role of ADMA. Circulation. Aug 26; 2003 108(8):933–8.

Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, et al. Ultrastructure of early lipid accumulation in apoE-deficient mice. Arteriosclero Thrombo Vasc Biol 1999; 19: 47-53.

Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, et al. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. Heart 2003;89:93-97.

Tran Cam TL, Fox MF et al. Chromosomal localization, gene structure and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. Genomics 2000;68:101–105.

Tran CT, Leiper JM, Vallance P et al. The DDAH/ADMA/NOS pathway. Atheroscler Suppl 2003;4:33–40.

Trocha M, Szuba A et al. Effect of selected drugs on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels. Pharmazie. 2010 Aug;65(8):562-71.

Tsikas D, Schubert B et al. Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography- tandem mass spectrometry as methyl ester tri (Npentafluoropropionyl) derivative. J Chromatogr B 2003;798:87–99.

Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M et al For the WHO MONICA Project. Contributions of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10 year results from 37 WHO MONICA Project populations. Lancet 1999;353:54-57.

Türk halkında kalp kökenli ölümler. Türk Kalp Raporu, Yenilik Basımevi 2000;11.

UKPDS Group. Intensive blood glocose control with Sulphanylurea or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with Type 2 Diabetes. Lancet 1999; 54:60.

Vallance P, Leiper J. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:1023-1030.

Veli-Pekka V, Tomi-Pekka T,Reijo L. DDAH gene andcardiovascular risk. Vascular Medicine 2005;10:45-48.

Walsh BW, Schiff I, Rosner B et al. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. N Engl J Med 1991; 325:196-204.

Wang D, Gill P. S, Chabrashvili T et al. Isoform-specific regulation by N(G),N(G)- dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. Circ. Res. 2007;101, 627–635.

Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky M, et al. Persistent dysfunction of regenerated endothelium following balloon angioplasty of rabbit iliac artery. Circulation 1990;81:1667–1679.

Weisberg P. Mechanisms modifying atherosclerotic disease from lipids to vascular biology. Atherosclerosis 1999;147:3-10.

Weissberg PL. Atherosclerosis involves more than just lipids: Plaque dynamics. Eur Heart J 1999;1:139.

Weninger WJ, Muller GB, Reiter C et al. İntimal hyperplasia of the infant parasellar carotid artery: A potential developmental factor in atherosclerosis and SIDS. Circ Res 1999; 85: 970.

Wilhelmsen L, Svardsudd K, KorsanBengtsen K, et al. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. N Engl J Med 1984;311:501-502.

Won Bae S, Stühlinger MC et al. Plasma Asymmetric Dimethylarginine Concentrations in Newly DiagnosedPatients With Acute Myocardial Infarction or Unstable Angina Pectoris During Two Weeks of Medical Treatment Am J Cardiol 2005;95:729–733.

Yıldırım AO, Bulau P, Zakrzewicz D et al. Increased Protein Arginine Methylation in Chronic Hypoxia: Role of Protein Arginine Methyltransferases. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006; 35: 436-43.

Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, et al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786 C and missense Glu298 Asp variants. Circulation 1999;100: 189.

Yu XJ, Li YJ, Xiong Y. Increase of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in serum of high cholesterol fed rabbits. Life Sci. 1994;54:753-8.

Zieske AW, Takei H, Fallon KB et al. Smoking and atherosclerosis in youth. Atherosclerosis 1999; 144:403.

Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Novel Cardiovascular Risk Factors in End-Stage Renal Disease Journal of the American Society of Nephrology 2004;15: 77–80.

9. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum da tamamladı. 1998-2002 yılları arasında Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde eğitimini tamamlayarak 2002-2004 yılları arasında Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D da yüksek lisans eğitimi aldı. İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesinde tıpta uzmanlık ihtisasını alarak biyokimya uzmanı oldu. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya bölümünde doktora öğrencisi olarak eğitimine devam etmektedir. Yabancı dili İngilizcedir.