

156832

T.C
F.Ü. TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KORONER ARTER HASTALARINDA
ANJİYOTENSİN KONVERTİNG ENZİM GEN
POLİMORFİZMİ**

UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr. Dilara Seçkin

DANIŞMAN
Prof. Dr. Necip İLHAN

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) tarafından desteklenmiştir (Proje No:825)

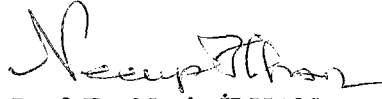
ELAZIĞ – 2004

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Özge ARDIÇOĞLU
DEKAN



Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Necip İLHAN
Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş olup, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Necip İLHAN
Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

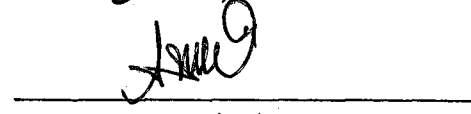
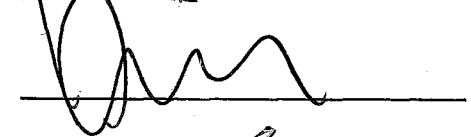
Prof. Dr. Necip İLHAN
.....

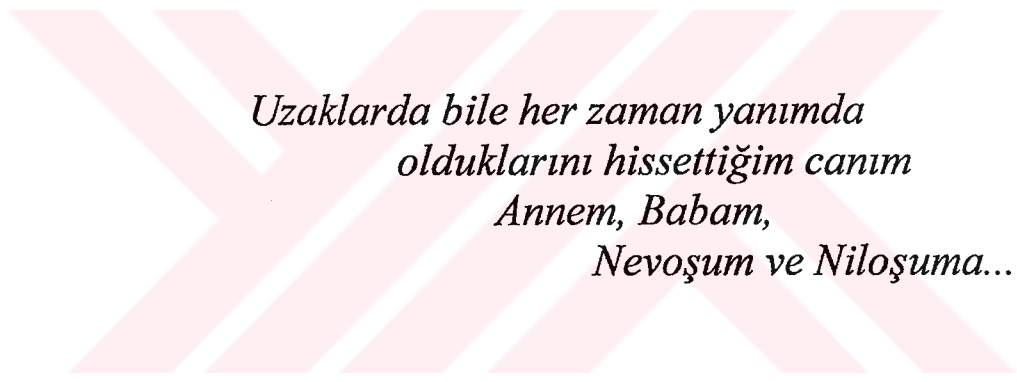
Prof. Dr. Ferit GÜRSU
.....

Doç.Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ
.....

Doç Dr. Nevin İLHAN
.....

Yrd. Doç. Dr. Tansel Ansel BALCI
.....





*Uzarlarda bile her zaman yanımlda
olduklarını hissettiğim canım
Annem, Babam,
Nevoşum ve Niloşuma...*

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde, tez çalışmalarım sırasında ve ihtisas dönemim boyunca her türlü destek ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Necip İLHAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında ve ihtisas süresince yardımlarını gördüğüm anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Ferit GÜRSU'ya, Doç. Dr. Nevin İLHAN'a, Doç. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, Doç. Dr. İhsan HALİFEOĞLU'na ve asistan arkadaşlarım ile Biyokimya Anabilim Dalında görevli bütün personele teşekkür ederim.

Ayrıca hasta seçiminde bana yardımcı olan Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Erdoğan İlkay'a ve Yrd. Doç. Dr. Yılmaz ÖZBAY'a, tez çalışmam için gerekli bilgileri edinmemde bana yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'nün değerli hocası Prof. Dr. Turgay İSBİR'e ve çalışma arkadaşlarına, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU'na ve Yrd. Doç. Dr. Buket KOSOVA'ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2.SUMMARY.....	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. RENİN ANJİYOTENSİN SİSTEMİ	6
3.1.1. Renin Anjiyotensin Sisteminin Fonksiyonları.....	9
3.1.2. Anjiyotensin-Konverting Enzim.....	10
3.1.2.1. Anjiyotensin Konverting Enzim ve Karboksipeptidazlar.....	12
3.1.2.2. Anjiyotensin Konverting Enzimin Dağılımı.....	12
3.1.2.3. İnsan Anjiyotensin Konverting Enziminin Yapısı.....	13
3.1.2.4. Anjiyotensin Konverting Enzim Aktivitesinin Tayini.....	17
3.1.3. Renin Anjiyotensin Sistemi ve Ateroskleroz.....	17
3.1.4. Anjiyotensin Düzeylerinin Genetik Regülasyonu.....	18
3.1.5. Hipertansiyon ve Renin Anjiyotensin Sistemi.....	21
3.1.6. Renin Anjiyotensin Sistemi ve Miyokard İnfarktüsu.....	22
3.2. HOMOSİSTEİN.....	23
3.2.1.Homosistein Metabolizmasının Düzenlenmesi	24
3.2.2. Homosistein Metabolizmasını Etkileyen Faktörler	25
3.2.3. Homosistein ve Aterotrombotik Vasküler Hastalıklar.....	28
3.2.4. Homosisteinin Neden Olduğu Vasküler Hasarın Patofizyolojisi.....	29
3.3. DOKU PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR ve PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNİHİTÖR-1.....	31
3.3.1. Plazminojen Aktivatör Sistemi.....	31
3.3.2. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 Molekülünün Yapısı	33
3.3.3. Renin Anjiyotensin Sistem Aktivitesi ve Fibrinolitik Denge.....	34
4. GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
4.1. Hasta Populasyonunun Seçimi ve Kan Örneklerinin Alınması.....	36
4.2. Plazma Lipid Düzeylerinin Ölçülmesi.....	37
4.3. Plazma Homosistein Düzeylerinin Ölçümü.....	37
4.4. Plazma Doku Plazminojen Aktivatör ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 Düzeylerinin Ölçümü.....	37

4.5. Anjiyotensin Konverting Enzim Düzeyinin Ölçülmesi.....	37
4.6. DNA İzolasyonu.....	38
4.7. Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Saptanması.....	38
4.7.1. Termal Cycler ile Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Saptanması.....	38
4.7.1.1. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler.....	38
4.7.1.2. Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Saptanması.....	39
4.7.1.3. Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Bölgesi İçin Kullanılan Amplifikasyon Koşulu...39	
4.7.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	39
4.7.2. Light Cycler ile Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Saptanması.....	40
4.8. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....	41
5.BULGULAR.....	44
5.1. Çalışma Gruplarının Karakteristik Özellikleri	44
5.2. Anjiyotensin Konverting Enzim Geninin Genotip ve Allel Frekansları.....	44
5.3. Anjiyotensin Konverting Enzimin Plazma Düzeyleri.....	45
5.4. Plazma Lipid Düzeylerinin Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Genotiplerine Göre Dağılımı.....	47
5.5. Plazma Doku Plazminojen Aktivatör ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 Düzeyleri.....	48
5.6. Plazma Anjiyotensin Konverting Enzim düzeyi ile plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ve Doku Plazminojen Aktivatör arasındaki korelasyon.....	48
5.7. Plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ve Doku Plazminojen Aktivatör Düzeylerinin Anjiyotensin Konverting Enzim Genotiplerine Göre Değişimi.....	49
5.8. Plazma Homosistein Düzeyleri.....	51
5.9. Plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ile Plazma Homosistein Düzeyi Arasındaki İlişki.....	52
5.10. Plazma Anjiyotensin Konverting Enzim düzeyi ile Plazma Homosistein Düzeyi Arasındaki İlişki.....	52
6. TARTIŞMA.....	54
7. KAYNAKLAR.....	68
8. EKLER.....	84
EK-1: Hasta Anket formu.....	84
9. ÖZGEÇMİŞ.....	85

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Hiperhomosisteinemi Nedenleri.....	29
Tablo 2. Koroner Arter Hastaları (KAH) ile Kontrol Grubuna Ait Özellikler	44
Tablo 3. Hasta ve Kontrol Grubunda Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Genotip Dağılımları.....	45
Tablo 4. Hasta ve Kontrol Grubunda Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Allel Dağılımları	45
Tablo 5. Çalışmaya Katılan Tüm Bireylerin Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Genotiplerine Göre Plazma Anjiyotensin Konverting Enzim Düzeyi.....	46
Tablo 6. Çalışmaya Katılan Tüm Bireylerin Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Genotiplerine Göre Plazma Lipid Düzeyleri.....	47
Tablo 7. Hasta ve Kontrol Grubunda Plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ve Doku Plazminojen Aktivatör Düzeyleri	48
Tablo 8. Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Genotiplerine Göre Plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ve Doku Plazminojen Aktivatör Düzeyi.....	50
Tablo 9. Koroner Arter Hastaları ve Kontrol Grubunda Plazma Homosistein Düzeyleri	51

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Renin Anjiyotensin Sistemi.....	7
Şekil 2. Renin-Anjiyotensin-Kinin Sistemi.....	8
Şekil 3. Renin Anjiyotensin Sisteminin Fonksiyonları.....	11
Şekil 4. Anjiyotensin Konverting Enzim'nin etki ettiği bölgeler ve primer dizilimler.....	12
Şekil 5. Endotelial Anjiyotensin Konverting Enzim izoenzimi	15
Şekil 6. Testisküler Anjiyotensin Konverting Enzim izoenzimi.....	16
Şekil 7. İnsan Anjiyotensin Konverting Enzim geni ve PCR ile genotipleme.....	20
Şekil 8. Anjiyotensin Konverting Enzimindeki çeşitli polimorfik bölgeler.....	21
Şekil 9. Homosisteinin metabolizması.....	27
Şekil 10. Plazminojen Aktivatör Sistemi.....	33
Şekil 11. Fibrinolitik sistemin temel elemanları.....	34
Şekil 12. Anjiyotensin Konverting Enzim ile fibrinolitik denge arasındaki ilişki	35
Şekil 13. Agaroz jel elektroforezinde saptanan Anjiyotensin Konverting Enzim gen polimorfizmine ait bir örnek.....	42
Şekil 14. Light Cycler ile saptanan Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizmine ait bir örnek.....	43
Şekil 15. Plazma Anjiyotensin Konverting Enzim düzeyi ile Anjiyotensin Konverting Enzim gen polimorfizminin genotipleri arasındaki ilişki.....	46
Şekil 16. Plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ile plazma Anjiyotensin Konverting Enzim düzeyi arasındaki ilişki	49
Şekil 17. Plazma Doku Plazminojen Aktivatör ile plazma Anjiyotensin Konverting Enzim düzeyi arasındaki ilişki	49
Şekil 18. Plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ve Doku Plazminojen Aktivatör düzeylerinin Anjiyotensin Konverting Enzim genotiplerine göre değişimi.....	50
Şekil 19. Kontrol ve hasta gruplarında plazma homosistein düzeyi.....	51
Şekil 20. Plazma homosistein düzeyi ile plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 düzeyi arasındaki ilişki	52
Şekil 21. Plazma homosistein düzeyi ile plazma Anjiyotensin Konverting Enzim düzeyi arasındaki ilişki	53

KISALTMALAR

KAH: Koroner Arter Hastalığı
ACE: Anjiyotensin Konverting Enzim
ANG I: Anjiyotensin I
ANG II: Anjiyotensin II
ANG III: Anjiyotensin III
ANG IV: Anjiyotensin IV
MI: Myokard infarktüsü
I: İnsersiyon
D: Delesyon
PAI-1: Plazminojen Aktivator Inhibitor Tip 1
t-PA: Doku Plazminojen Aktivatörü
u-PA: Ürokinaz plazminojen aktivatörü
MTHFR: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
RAS: Renin Anjiyotensin Sistemi
NO: Nitrik Oksit
PGI₂: Prostatiklin
AT₁: Anjiyotensin Tip 1 Reseptör
AT₂: Anjiyotensin Tip 2 Reseptör
PDGF: Platelet Aracılı Büyüme Faktörü
FDGF: Fibroblast Aracılı Büyüme Faktörü
TGF: Transforming Growth Factor
MGDF: Makrofaj Aracılı Büyüme Faktörü
ApA: Aminopeptidaz A
SAM: S-adenozilmetiyoninin
SAH: S-adenozilhomosistein
5-metil THF: N⁵-metiltetrahidrofolat
5,10-metilen THF: N^{5,10}-metilentetrahidrofolatın
THF: Tetrahidrofolat
CBS: Sistationin β-sentaz
LC: Light Cycler
EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetat

1.ÖZET

Koroner Arter Hastalığının (KAH) patogeneğinde çeşitli genetik ve çevresel risk faktörlerinin önemli olduğu bilinmektedir. Renin Anjiyotensin Sisteminin anahtar bir enzimi olan Anjiyotensin Konverting Enziminin (ACE) I/D polimorfizmi ile ilgili yapılan çalışmalar kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinin aydınlanmasında önemli bir rol oynar. Bu çalışmada; Koroner arter hastalarında ACE gen polimorfizmi ile hastalığın etyolojisinde önemli rol oynayan diğer risk faktörleri (homosistein ve hemostatik faktörler) arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Bu çalışmaya koroner anjiyografi ile KAH tanısı alan 118 hasta ile 70 sağlıklı birey dahil edilmiş olup tüm bireylerin serum lipid, plazma total homosistein, ACE, doku plazminojen aktivatör (t-PA) ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca çalışmaya katılan tüm bireylerin ACE gen polimorfizmi belirlenmiş, bu gen polimorfizminin serum lipid düzeyleri ile plazma t-PA ve PAI-1 düzeyleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre; KAH olan bireylerde ACE gen polimorfizminin II genotip frekansı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.05$). Plazma ACE düzeyleri, DD genotipine sahip bireylerde II genotipine sahip bireyler ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$). Plazma PAI-1 ve t-PA düzeyleri ise KAH'na sahip bireylerde kontrol grubuna göre artmış olup bu parametrelerin düzeylerinde görülen artış plazma PAI-1 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı iken ($p<0.05$), t-PA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$). Ayrıca ACE gen polimorfizminin plazma PAI-1 ve t-PA düzeylerine olan etkileri incelendiğinde DD genotipine sahip bireylerde plazma PAI-1 düzeylerinin

yüksek olduğu ($p<0.05$), buna karşılık plazma t-PA düzeyleri üzerine etkisinin bulunmadığı görülmüştür. Plazma homosistein düzeyleri koroner arter hastalarında sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Sonuç olarak; KAH'nın etyolojisinde genetik faktörlerden ACE gen polimorfizmi ile plazma homosistein ve hemostatik faktörlerden plazma PAI-1 düzeyleri arasında önemli bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ACE gen polimorfizmi, Homosistein, Hemostatik faktörler

2. SUMMARY

ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME GENE POLYMORPHISM IN CORONARY ARTERY DISEASE

Several genetic and environmental factors have been known to play important roles in the pathogenesis of the coronary artery disease (CAD). Studies about the polymorphism of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) I/D, a key enzyme of Renin-Angiotensin system, have important roles in the determination of the pathogenesis of cardiovascular diseases. In the present study, the relationship between ACE gene polymorphism and other risk factors (homocysteine and hemostatic factors) which play important roles in the etiology of CAD, were assessed.

A total of 118 patients with CAD diagnosed by coronary angiography and 70 healthy subjects were included into the study. Serum lipid, plasma total homocysteine, ACE, t-PA and PAI-1 levels were measured in all patients. Additionally, ACE gene polymorphism in all subjects were determined and the effects of this polymorphism on serum lipid levels and plasma t-PA ve PAI were assessed.

The results of this study; revealed that the frequency of the two types of genotype evaluated by ACE gene polymorphism in patients with CAD were significantly decreased when compared to control group. Plasma PAI-1 and t-PA levels were higher in patients with CAD than control group and the increase in plasma PAI-1 was statistically significant ($p<0.05$), whereas the increase in plasma t-PA was not statistically significant ($p>0.05$). In the evaluation of the effects of ACE gene polymorphism on plasma PAI-1 ve t-PA, it was determined that patients with DD genotype had higher levels of PAI-1 ($p<0.05$) whereas, this had no effect on the levels of

t-PA levels. Plasma homocysteine levels in patients with CAD were found to be statistically significantly higher than control subjects ($p < 0.001$).

The results of our study revealed an important relationship between ACE gene polymorphism and plasma levels of homocysteine and PAI-1.

Key words: ACE gene polymorphism, Homocysteine, Hemostatic factors



3.GİRİŞ

Koroner Arter Hastalığı (KAH), çeşitli genetik ve çevresel risk faktörlerinin sebep olduğu, aterosklerozis ve onun trombotik komplikasyonlarını içeren multifaktöriyel bir hastalık olup endüstrileşmiş toplumlarda morbidite ve mortalitenin en önemli sebebidir (1). Hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara içimi ve diabetes mellitusun koroner kalp hastalıklarının seyrini değiştirebilen risk faktörleri olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (2).

Anjiyotensin Konverting Enzim (ACE) bir karboksipeptidazdır. Bilinen etkilerinin yanı sıra ACE, Anjiyotensin I'in (ANG I) Anjiyotensin II'e (ANG II) dönüşümünü; bradikininin ise kinine dönüşümünü katalizler. Kardiyovasküler sistem üzerine birçok akut ve kronik etkileri olan bradikinin ve ANG II güçlü vazoaktif moleküllerdir. Kardiyovasküler hormonal düzenlemede önemli bir rol oynayan ACE; renin-anjiyotensin ve kallikrein-kinin sistemine olan etkileri ile kardiyovasküler yapı ve fonksiyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (3). Son zamanlarda ACE gen polimorfizmi ile miyokard infarktüsünün (MI) oluşumu arasındaki ilişkinin gösterilmesi oldukça dikkat çekicidir (4). Plazma ACE düzeyi bireyler arasında yaklaşık olarak % 50 oranında bir farklılık gösterir ve bu farklılık major bir genin etkilerine bağlanmıştır. İnsan ACE gen polimorfizmi; 16. intronda Alu tekrar bölgesinde 287 baz çiftinin olması (insersiyon, I) veya olmamasına (delesyon, I) bağlı olarak 3 genotip ile sonuçlanır (DD, ID, II) (5).

Birçok biyolojik etkileri bulunan ACE; iskemik kalp hastalığının patogenezinde rol oynamaktadır. Anjiyotensin I'in aktivasyonu ve bradikininin inaktivasyonu doku perfüzyonunun azalması ile sonuçlanır, plazminojen aktivator inhibitör tip 1'in (PAI-1) anjiyotensin aracılığı ile sitümülasyonu tıkcayıcı koroner trombusün oluşumunu artırabilir

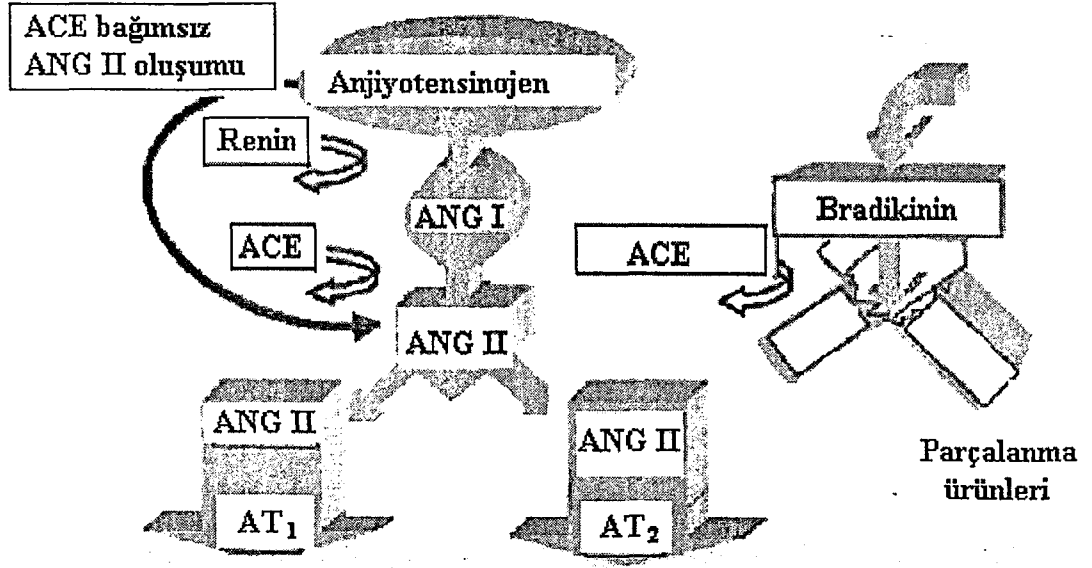
(6). Son zamanlarda Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) enziminin A225V polimorfizmi plazma homosistein konsantrasyonunda artışa neden olarak vasküler duvarda lezyon oluşumuna yol açtığından dolayı bu polimorfizmin kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (7).

3.1. RENİN ANJİYOTENSİN SİSTEMİ

Kardiyovasküler ve böbrek fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve bu organlar ile ilgili hastalıklarının fizyopatolojisinde anahtar bir rol oynayan renin anjiyotensin sistemi (RAS); plazma, kalp ve böbrekleri içeren birçok dokuda ANG II'nin oluşumu ile sonuçlanan enzimatik reaksiyonları içerir. Renin; renal afferent arteriollerin jukstaglomerüler hücrelerinden salgınır ve karaciğerden sentezlenip salınan anjiyotensinojene etki ederek inaktif bir dekaeptid olan ANG I'i oluşturur. Peptidaz aktivitesi olan ACE; ANG I'i, RAS'de santral düzenleyici rol oynayan bir oktaeptid olan ANG II'e dönüştürür (8,9). Anjiyotensin II, RAS'nin ana molekülü olup sistemik bir hormon veya lokal olarak oluşmuş bir faktör olarak etki eder.

Anjiyotensin II, damar düz kaslarında kasılmaya neden olup bundan dolayı sistemik vasküler rezistansı artırır, aldosteron sekresyonunu stimüle ederek böbreklerde sodyum reabsorbsiyonunu artırır, renal tübüloglomerüler feed-back mekanizmasına kritik bir düzenleyici olarak etki eder (11).

Anjiyotensin Konverting Enzimi; Substans P, bradikinin gibi çeşitli biyolojik önemi olan peptidlerin inaktif metabolitlere katabolizmasını sağlar. Anjiyotensin II oluşumu için ACE'den bağımsız alternatif bir yol da mevcuttur. Doku plazminojen aktivatörleri, katepsin G gibi enzimler ile anjiyotensinojen direk olarak ANG II'e dönüşebilir (10) (Şekil 1).



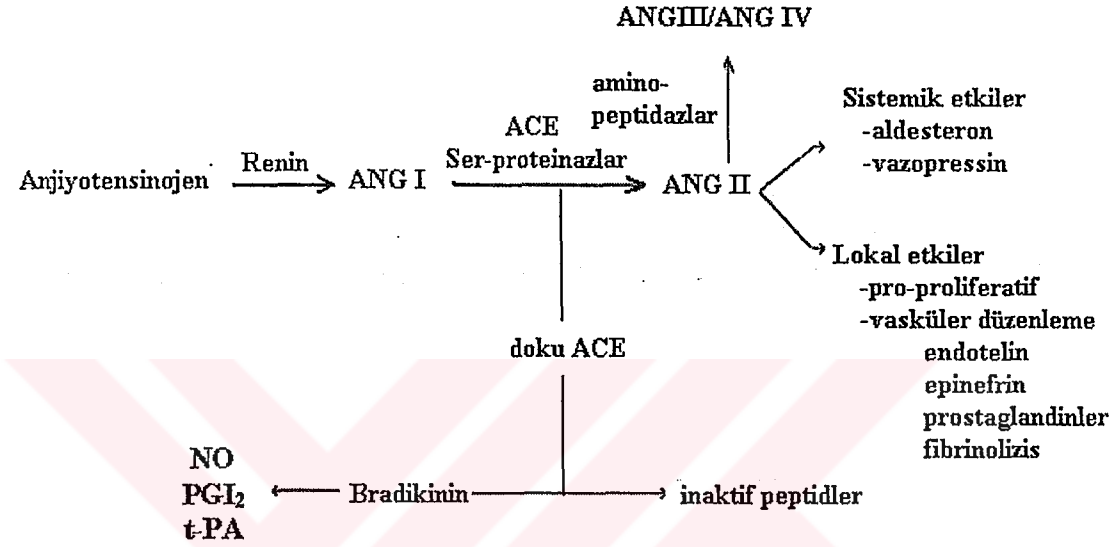
Şekil 1. Renin Anjiyotensin Sistemi

Fonksiyonel olarak birbirine benzeyen iki farklı RAS saptanmıştır (12):

- a) Endokrin RAS
- b) Lokal RAS

Her ikisinde de renin, inaktif prekürsörü olan pro-reninden oluşur. Endokrin RAS'de bu olay nefronların jukstaglomerular aparatlarında meydana gelirken, lokal RAS'de endotelial düzeyde meydana gelir. Renin oluşumu RAS'de hız kısıtlayıcı basamağı oluşturur. Renin'in substratı olan anjiyotensinojen lokal veya sistemik olarak bulunabilir. Anjiyotensinojen'in dekaeptid ANG I'e dönüşümünden sonra, ACE ve diğer serin proteazlar ikiden fazla aminoasiti potent vazokonstrüktör bir oktaeptid olan ANG II oluşturmak üzere ayırırlar. Anjiyotensin Konverting Enzim; nitrik oksit (NO), prostasiklin (PGI₂), doku plazminojen aktivatörü (t-PA) gibi önemli vasküler

medyatörlerin salınımını sağlayan bradikinin de inaktive eder (13). Bu yol ile ACE vasküler hemostazisin sağlanmasında önemli bir role sahiptir (Şekil 2).



Şekil 2. Renin- Anjiyotensin-Kinin Sistemi

Anjiyotensinin dört farklı peptid formu (ANG I, II, III ve IV) bulunur. Anjiyotensin III (ANG III) ve Anjiyotensin IV (ANG IV), ANG II'den aminopeptidazlar tarafından oluşturulur. Bunlar ANG II'nin 2-8 hepta- ve 3-8 hekza peptid fragmanlarını temsil eder. Anjiyotensin III ve IV, ANG II'den daha az vazokonstrüktör etkili olmakla beraber, bütün bu peptidler vazokonstrüktör etkiye sahiptirler (14).

Anjiyotensin II'nin biyokimyasal ve farmakolojik özelliklerine göre farklı reseptör subtipleri bulunur ve bu reseptör subtiplerinden Tip 1 (AT₁) ve Tip 2 (AT₂)'nin hücre büyümesi ve kan basıncı düzenlenmesinde birbirlerine zıt etki gösterdikleri bulunmuştur (14). Anjiyotensin peptidlerine kontraktıl cevap anjiyotensin reseptör tip 1 (AT₁R)

aracılığı ile olur. AT₁R'ü ANG II'nin vazokonstrüktif, proliferatif ve hipertrofiyi iletici etkilerine aracılık ederken, AT₂R sitümülasyonu, (ekstraselüler kinazın inaktivasyonu, NO salınımı, potasyum kanallarının açılımı, kalsiyum akımının inhibisyonu yolu ile) düz kas hücre büyüme inhibisyonuna ve fenotipik farklılaşmaya, vazodilatasyona ve ekstraselüler matriks üretiminde azalmaya neden olur. AT₁R'ü tercihen ANG II'yi bağlarken, AT₂R'ü ANG III'ü bağlar (14). Anjiyotensin reseptör tip 4 (AT₄R) molekülü ise ANG IV'ü bağlar. ANG IV, diğer klasik anjiyotensin reseptörlerinden (AT₁ ve AT₂) farmakolojik olarak farklı olup, bilinen agonist ve antagonistlere düşük affinite gösteren spesifik bağlanma bölgelerine sahiptir. AT₄R'ü serebral dokuda önemli bir yere sahip olup periferel dokuda da geniş dağılım gösterir (15). Spesifik bir endotelial reseptör olduğu bilinen AT₄, PAI-1'in endotelial ekspresyonuna aracılık etmesine rağmen, AT₄ reseptör subtipinin fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (16).

3.1.1. Renin Anjiyotensin Sisteminin Fonksiyonları

Endokrin RAS'i feedback regülasyona tâbi olup, primer stimulus hipotansiyondur. Benzer olarak volüm eksikliğinde de hipovolemik durum süresince aktive olur. Aynı zamanda, lokal RAS aktivasyonunu hem kısa hem de uzun dönemde düzenleyici bir role sahiptir.

Anjiyotensin II'nin büyümeyi düzenleyici etkisi için artmış gen ekspresyonu ve platelet aracılı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast aracılı büyüme faktörü (FDGF) ve sırasıyla vasküler düz kas hücrelerinde artmış mRNA ve protein sentezine aracılık eden diğer sitokinlerin oluşumu gibi birçok mekanizma açıklanmıştır (17,18). Anjiyotensin II'nin bilinen etkilerine ek olarak anjiyotensinin pro-proliferatif etkilerini nötralize eden ANG II aracılı transforming growth faktör (TGF) üretimini arttırdığı gösterilmiştir (19).

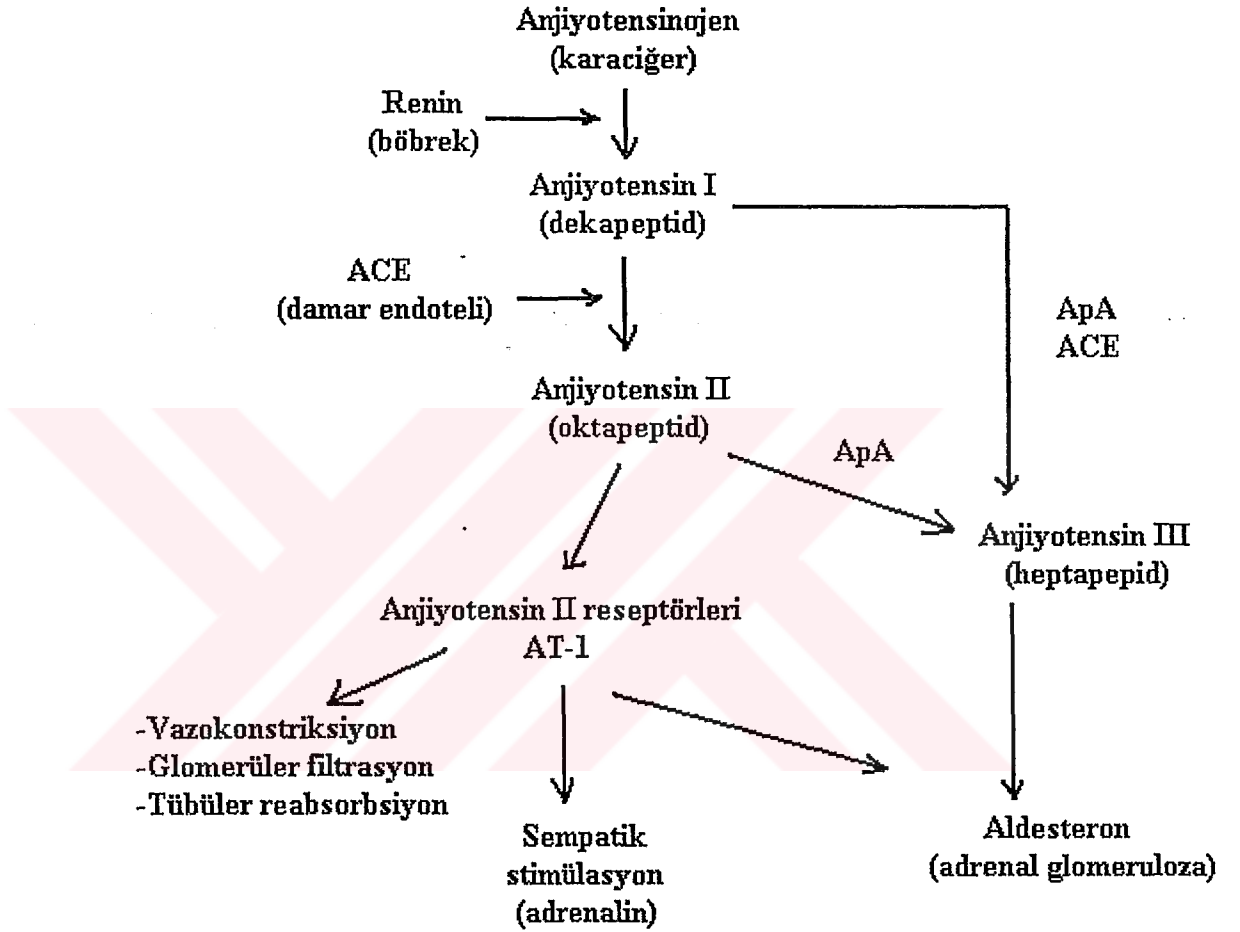
Anjiyotensin II ayrıca lokal sempatik sinir sistemi ile de ilişkili olup, norepinefrinin salınımını kolaylaştırır ve periferik sinir uçlarından onların geri alınımını bloke eder. Anjiyotensin II ayrıca endotelyumdan vazodilatatör eikosanoidlerin oluşumunu içeren diğer vazoaaktif substanslar ile de ilişkili olup bundan dolayı vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (20).

ACE'nin inhibisyonu sadece anjiyotensin II'nin oluşumunu azaltmayıp ayrıca kininaz II benzeri bir aktivite de göstererek potent bir vazodilatatör ve büyümeyi inhibe eden bir peptid olan bradikininin düzeylerini artırır. Bradikinin; spesifik endotelyal β_2 reseptörlerin stimülasyonu aracılığı ile vazodilatatör özellik gösterir ve PGI_2 , NO ve endotelyal aracılı hipopolarize edici faktör salınımına neden olur. ACE inhibisyonunun bradikinin yolu ile NO ve PGI_2 salınımını stimüle ettiğine dair kanıtlar vardır.(21,22) Bradikininin; ayrıca nötrofil kemotaksisi, fagositoz, lenfoproliferatif sitokin salınımını artıran birçok immünolojik ve nonimmünolojik olaylarda da yer aldığı gösterilmiştir (21-23).

3.1.2. Anjiyotensin-Konverting Enzim

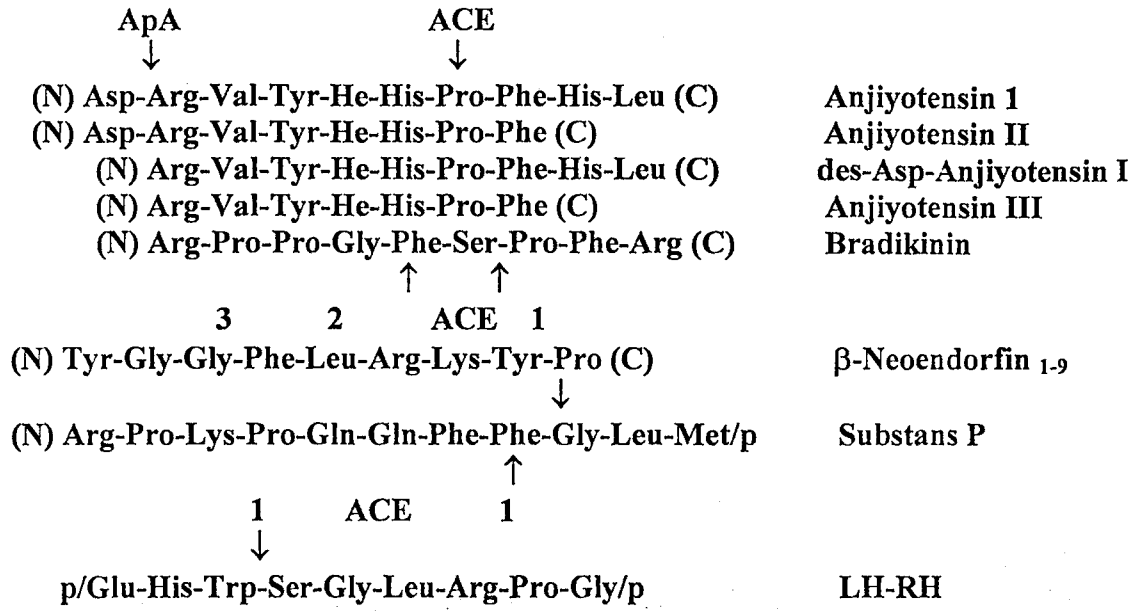
Anjiyotensin Konverting Enzim (peptidil-dipeptidaz A, EC: 3, 4, 15, 1) ANG I'i, ANG II'e dönüştürür. ANG II; sodyum iyon retansiyonunu stimüle eden aldosteronun adrenal korteksten salınımını sağlayan potent bir vazokonstriktördür. ANG II, aminopeptidaz A (ApA) (veya anjiyotensinaz) tarafından ANG III'e hidroliz olur. Aminopeptidaz A ayrıca ANG I'den; desaspartil-anjiyotensin I'i üretir. Sonra ACE tarafından ANG III'e hidroliz olur. Ayrıca ACE; C-terminal dipeptidini uzaklaştırarak vazodilatatör olan bradikininin inhibe eder ve kininaz etkisi gösterir (24) (Şekil 3).

Anjiyotensin Konverting Enzimi'nin kan basıncını ve elektrolit hemeostazisini düzenlemedeki bu çift yönlü etkisinden dolayı ACE'nin inhibisyonu hipertansiyon ve konjestif kalp hastalığının tedavisinde önemli bir role sahiptir.



Şekil 3. Renin Anjiyotensin Sisteminin Fonksiyonları

ACE; enkefalin, nörotensin, substans P-serbest asiti gibi nöropeptidlerden, asetil-seril-aspartil-lisil-prolinden ve bradikinininden (hematopoezisin negatif düzenleyicisi) C-terminal dipeptidini uzaklaştırarak, bu peptidlerin yıkımını inhibe eder (25) (Şekil 4).



Şekil 4. ACE'nin etki ettiği bölgeler ve primer dizilimler.

3.1.2.1. Anjiyotensin Konverting Enzim ve Karboksipeptidazlar

Anjiyotensin Konverting Enzim; doğal substratlara etki eden, damar duvarında yerleşmiş bir dipeptidil karboksipeptidazdır. ACE saf bir dipeptidil karboksipeptidaz olmayıp bradikinin des-Arg₉'dan C-terminal tripeptidini uzaklaştırarak bir peptidil-tripeptidaz olarak da etki eder. Ayrıca bir endopeptidaz olarak da düşünülebilir çünkü substans P gibi bir molekülden C-terminal dipeptid veya tripeptidi uzaklaştırabilir veya luteinize hormon salgılatıcı faktör (LH-RH)'den bir N-terminal tripeptid uzaklaştırabilir (26) (Şekil 4).

3.1.2.2. Anjiyotensin Konverting Enzimin Dağılımı

Anjiyotensin Konverting Enzimi; geniş bir doku ve hücresel dağılıma sahip olup her zaman RAS'nin diğer komponentleri ile birlikte bulunmaz. ACE; N-terminal veya ekstraselüler ortam tarafında katalitik bölgesi ile kısmen vasküler endotel hücre

yüzeyinde bulunan hücre yüzey integral membran glikoproteini (sınıf I membran proteini)'dir (27). Memeli dokularının bütün endotelial hücrelerinin luminal yüzeylerinde ACE ekspresyonu olduğu görülmüştür. Akciğer ve beyin mikrovasküler ve kapiller hücreleri ACE yönünden kısmen zengindir (28). Böbrek tübülüs hücrelerinin fırçası kenarı, ACE yönünden zengin ekstra-vasküler bölgelerden biridir, böylece böbrek, bağırsak ve koroid pleksusda ACE hem epitelyal hem de endotelial bölgede çift lokalizasyonlu şekilde bulunur (29). Santral sinir sisteminin diğer bazı bölgeleri, hem kapiller hem de nöronal hücreler (kısmen striato-nigral yolda) yüksek ACE aktivitesine sahiptir, adrenal bezde ise ACE ekspresyonu hem damarlarda hem de kromaffin hücrelerindedir. Erkek üreme sisteminde ACE seminifer ve epididimal tüplerde bulunur ve spermilerden sekrete edilir (30). ACE ayrıca plazmada endotelial hücrelerde de bulunur (31).

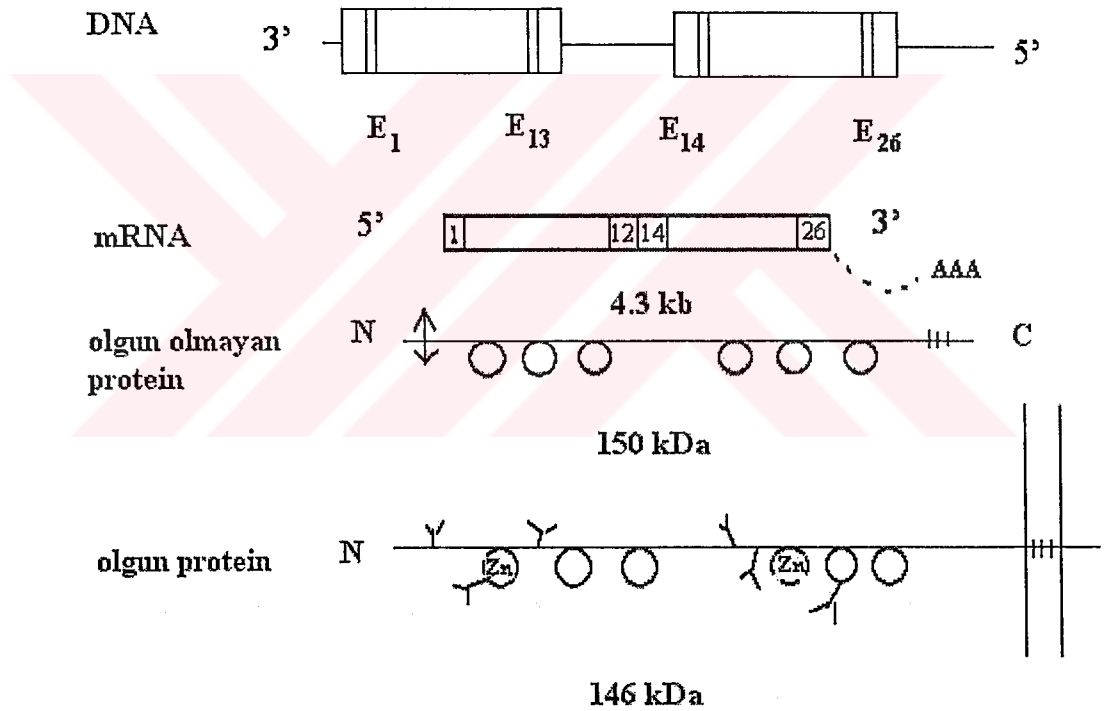
3.1.2.3. İnsan Anjiyotensin Konverting Enziminin Yapısı

Anjiyotensin Konverting Enzim geninin klonlanması ile primer olarak endotelial hücrelerde ekspresse edilen somatik ACE ile erkek üreme sisteminde ekspresse olan testisküler ACE olmak üzere 2 farklı izoenzimi saptanmıştır. Bu endotelial ve testisküler ACE'nin cDNA'larının klonlanması bu enzimlerin primer yapılarının tanınmasını sağlamakla birlikte enzimlerin aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları ve ACE geninin evrimsel gelişimi ile ilgili bir çok soruyu da beraberinde getirmiştir. İnsanlarda ACE enzimini kodlayan gen çift olup bu genlerdeki DNA polimorfizmlerinin tanımlanması bu genin genotipi ve serum ACE düzeylerindeki farklılıklara yol açan fenotipi arasında bir ilişki kurulmasını sağlamıştır (32,33).

İnsan ACE geni 26 ekzondan oluşur fakat olgun endotelyal ACE geninin transkripti 13. ekzonun ayrılması nedeni ile 25 ekzondan oluşur. Olgun testisküler ACE ise 13. ekzondan 26. ekzona kadar transkribe edilir (mRNA'ya dönüştürülür). Endotelyal mRNA'ı transkribe eden promotor 1. ekzonda bulunurken (-132. pozisyonda) testisküler mRNA'yı transkribe eden promotor 12. ekzona karşılık gelmektedir (-42. ve -62. pozisyonlar arası). Endotelyal ACE cDNA'sındaki internal homoloji ACE geninin bir tür gen duplikasyonundan oluştuğunu akla getirmektedir. Bu durum 4. ve 11. ekzonlar arasında (proteinin N ucunu kodlayan bölge) ve 17. ile 24. ekzonlar arasında (ACE'nin C ucunu kodlayan bölge) büyük bir homolojinin görülmesi ile ortaya konulmuştur. Dolayısıyla endotelyal tip ACE proteininin molekülü iki adet yüksek oranda homolog bölgeden oluşmaktadır. Bu her homolog bölge, olası bir aktif merkez taşımaktadır. Bu aktif merkezlerde çinko metalloproteazlar için korunmuş bölge olan His-Glu-X-X-His motifi bulunmaktadır (32-34). Kimyasal analizler net bir şekilde somatik ACE'nin iki çinko atomu taşıdığını göstermiştir (35). Testisküler ACE somatik ACE'nin C ucu ile aynıdır, fakat N ucu farklıdır ve sadece bir aktif merkez ve dolayısıyla sadece bir çinko atomu ihtiva eder. Testisküler ACE, 711 aminoasit uzunluğunda ve 80 kDa moleküler ağırlıkta olmasına karşın endotelyal ACE, 1277 aminoasit uzunluğunda ve 146 kDa 'dur (36) (Şekil 5,6).

Enzimin N ucunda bulunan hidrofobik peptid dizisi olgun olmayan formunda bulunmayıp cDNA analizi bunun ayrılan bir sinyal peptidi olduğu gösterilmiştir. Bir başka hidrofobik bölge de C ucuna yakın bulunmuştur ve bu da enzimi hücre membranına bağlayan bölge olarak tanımlanmıştır (32,33). Uzun yıllar boyunca endotelyal ACE'nin çözünür olabilmesi için bir proteaza gereksinimi olduğu

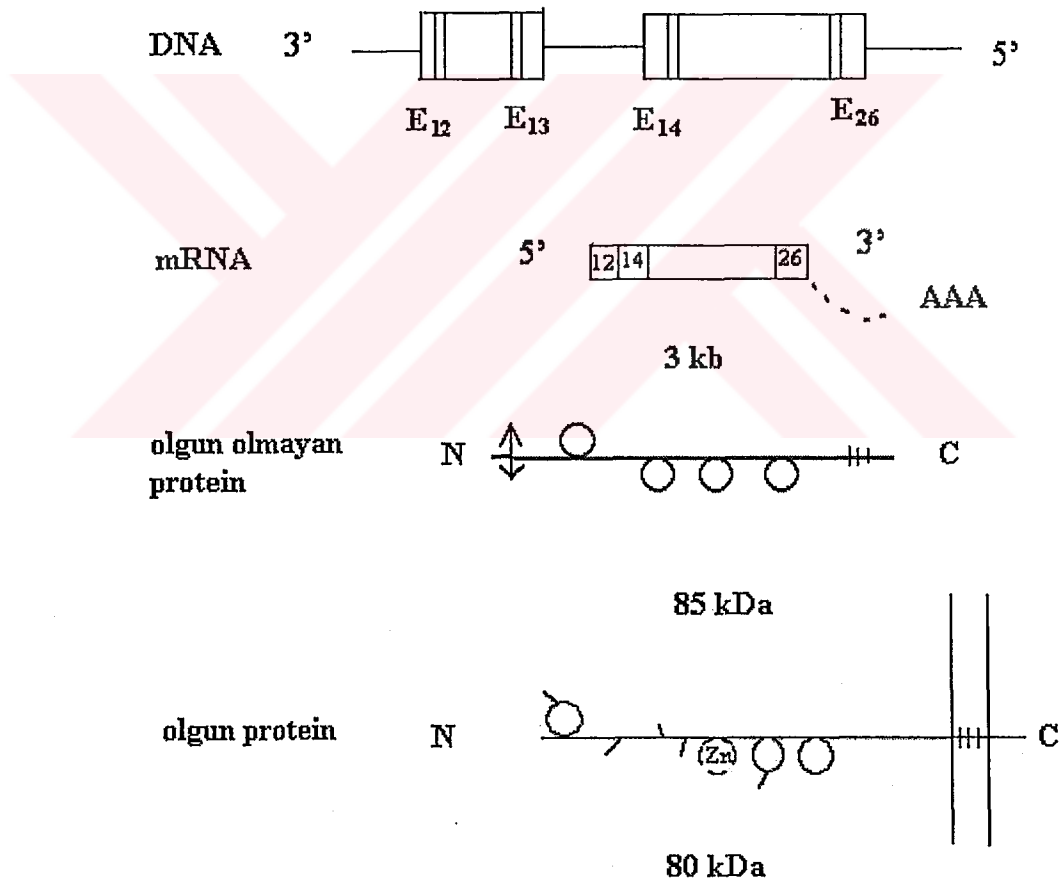
sanılıyordu, ancak şimdilerde ise post-translasyonel bir modifikasyon ile çözünür formun serbestleştiği kabul görmektedir. Bu işlemin; ACE-sekretaz denen ve ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) familyasında bulunan bir metalloproteaz sayesinde olduğu düşünülmektedir. Bu metalloproteaz hücre membranına bağlanmış olup bulunduğu yerde ACE molekülünü spesifik olarak Arg-1137 ile Leu-1138 arasında böler, böylece proteinin C ucundan membrana bağlanmasını sağlar (37,38).



Şekil 5. Endotelyal ACE izoenzimi. (E-ekzon; AAA- 3' adenilasyon)

Endotelyal hücrelerde ACE gen ekspresyonu; glukokortikoidler, büyüme faktörleri, β -adrenerjik uyarımlar, G proteinleri, adenilsiklaz ve protein kinazları içine alan mekanizmalar ile arttırılmaktadır. Testislerde androjenler ACE ekspresyonu üzerine

direk pozitif bir etki gösterebilirler (30). Çözünür plazma ACE'i muhtemelen endotelial membranin damar cidarına bakan yüzeyine bağlı olarak bulunan enzimden köken almaktadır ve yukarıda bahsedilen proteolitik mekanizma ile serbestleşmektedir. Özellikle; dokudan, serum veya plazmadan saflaştırılan ACE'ler arasında immünolojik ve fizikokimyasal farklılıkları tespit etmek çok zordur (39). Phorbol-myristate-acetate denen forbol esterleri ACE'ye yakın yerleşmiş olan ACE sekretazı stimüle ederek endotelial hücrelerden ACE sekresyonunu arttırmaktadır (40).



Şekil 6. Testisküler ACE izoenzimi (E, ekzon; AAA, 3' adenilasyon)

Çözünür ve membrana bağlı ACE'lerin her ikisi de asidik olup çözünür ACE'nin pH'sı 4.3-4.6 ve membrana bağlı ACE'nin pH'sı ise 4.5-4.8'dir. Bu farklılığın nedeni çözünür ACE'de daha fazla bulunan sialik asitten kaynaklanmaktadır (31). Her iki ACE glikozillenmiş proteinler olmakla birlikte testiküler ACE; o-glikozillenmiş ve endotelial ACE ise n-glikozillenmiş türevlerdir. Bu glikozillenmenin rolünün ne olduğu bilinmemekle birlikte enzimin çözünebilirliğini arttırabileceği ve enzimin yapısal özelliklerini korumasında etkili olabileceği düşünülmektedir (31,32,41). Enzimin glikozilasyonu; özellikle N ucunu tripsin gibi proteazlara karşı korumakta ancak enzimin katalitik özelliklerine herhangi bir etkileri bulunmamaktadır (42).

3.1.2.4. Anjiyotensin Konverting Enzim Aktivitesinin Tayini

ACE aktivitesinin tayini için çeşitli bilinen yöntemler spektrofotometrik, immunolojik, HPLC (yüksek performanslı likit kromatografisi) ve radyoaktif yöntemlerdir. ACE ölçümünde; indirek olarak radyoaktif işaretli spesifik ACE inhibitörleri veya direk olarak spesifik anti-insan ACE antikorlarının bir radyoimmünoassay veya ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) metodu ile tayini gibi yöntemler bulunmaktadır (43-46).

3.1.3. Renin Anjiyotensin Sistemi ve Ateroskleroz

Ateroskleroz, orta ve büyük kan damarlarının heterojen ve multifaktöryel bir hastalığı olup patogenezi için bir çok mekanizma ileri sürülmüştür. Birçok araştırmacı tarafından anjiyotensin-aldesteron sisteminin aterosklerozun patogenezinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Anjiyotensin II'nin, aterosklerozun gelişiminde önemli rolü olan makrofaj aracılı büyüme faktörü (MGDF), FDGF ve PDGF içeren birçok büyüme faktörlerini sitümüle ettiği gösterilmiştir. Anjiyotensin II; nötrofiller, monositler ve T lenfositler için kemotaktik özelliğe sahiptir (47). Anjiyotensin Konverting Enzim,

inflamatuvar ve immünolojik cevapta görevli olan bradikinin ve substans P'yi hidrolize eder. Lokal ANG II ayrıca sitozolik ve hücre içi mekanizmalar tarafından düzenlenen düz kas hipertrofisi ve hiperplazisinin gelişmesine yardımcı olur. Anjiyotensin II, LDL kolesterol partiküllerini okside eder ve endotelyumun içine alınımını sağlar (48).

Hastalığın histopatolojik özelliklerini etkilemesi yanısıra ANG II, endotelyumun fizyolojik fonksiyonlarında da önemli rol oynar. Endotelial disfonksiyon; anjiyografik daralmaya sahip kan damarlarının ve KAH için risk faktörlerine sahip hastaların normal koroner damarlarında gözlenen önemli bir karakteristiktir. Veriler, endotelial disfonksiyonda, ANG II'nin ve nitrik oksit salınımının azalmasının rolü olduğunu göstermiştir (49).

Renin Anjiyotensin Sistemi sonucu üretilen aldosteronun da aterosklerozisin gelişimde önemli etkisi olduğu gösterilmiştir. Aldosteron düzeyi ile HDL kolesterolün düzeyi arasında ters bir ilişkinin olduğu görülmüş olup RAS'nin inatçı aktivasyonunda azalmış HDL düzeylerine karşın aldosteron düzeyi artmıştır (50). Azalmış HDL kolesterol düzeyleri, ateroskleroz ve kardiyak hastalıkların oluşumu ile ilişkilidir. ACE inhibisyon çalışmalarından elde edilen indirekt kanıtlar ANG II'nin aterosklerotik etkileri olduğunu göstermiştir. ACE gen polimorfizminin sebep olduğu artmış doku ACE aktivitesi, yüksek lokal anjiyotensin II düzeylerinin sebebini açıklayabilir. Aynı zamanda aşırı doku ACE ekspresyonu, bradikinin /doku kallikrein sistemini nötralize ve bloke eder, NO salınımında ve vazodilatatör prostaglandinlerde azalma görülür (50,51).

3.1.4. Anjiyotensin Düzeylerinin Genetik Regülasyonu

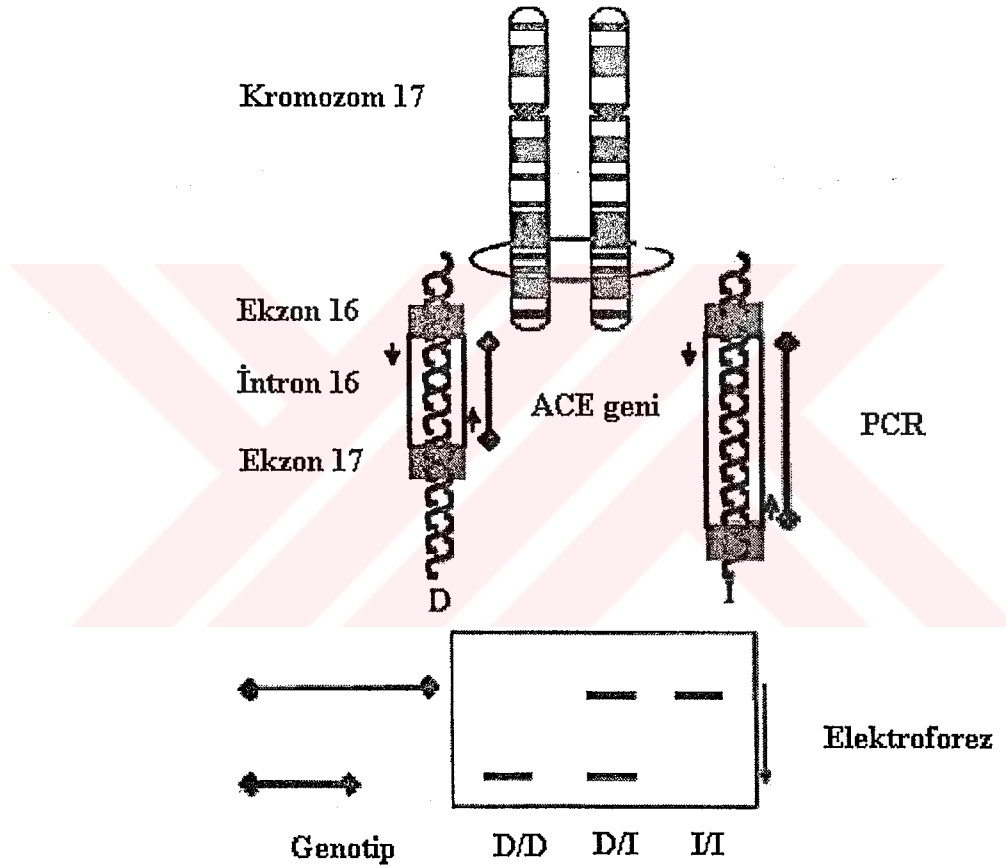
Anjiyotensin II'nin dolaşımdaki ve dokudaki düzeyleri; ANG I'nin düzeylerine ve doku ACE aktivitesi ile diğer serin-proteazların aktivitelerine bağlıdır. ACE; endotel hücrelerinin yüzeyinde ve epitel hücrelerin birçok tipinde membran bağımlı bir enzim

olmasının yanı sıra plazmada da bulunur. Plazma ACE'nin hücre orijini açık değildir fakat endotel hücrelerinin ACE'yi sekrete ettiği öne sürülmüş ve bu plazma enziminin vasküler endotelden köken alabileceği tahmin edilmiştir (52). Normal bireylerin büyük bir kısmında plazma ACE düzeyinin kişiden kişiye değişebildiği, hatta bazen 5 kat farklı sonuçların bulunduğu, ancak aynı bireyden tekrarlayan ACE ölçümlerinin sabit olduğu gösterilmiştir (5). Genetik analiz sonuçları, plazma ACE düzeyinin ailesel olarak belirlendiğini göstermiş ve major bir genin plazma ACE düzeyinin bireyler arası değişkenliği etkileyebileceğini öne sürmüştür (53).

İnsan genomunda ACE geni lokalize edilip tanımlanmış ve klonize edilmiştir. 21 kilobaz uzunluğunda ve 26 ekzonlu olan bu gen kromozom 17'de (17q23) lokalizedir (54) (Şekil 7,8). Bu lokusda birkaç polimorfik bölge saptanmıştır (55). Bu polimorfizmlerden en önemlisi, intron 16'da lokalize olan 287 baz çiftlik (bp) DNA fragmanının (Alu tekrar bölgesi) varlığı (insersiyon, I) veya yokluğu (delesyon, D) ile tanımlanmıştır (Şekil 7) (3). Yapılan aile çalışmalarında bu uzunluk polimorfizminin analizi ile iki allelin mendelyan bir kalıtım izlediği gösterilmiştir. Bu polimorfizm serum ACE düzeylerinin total değişkenliğinin yaklaşık %45'ini açıklar (53,56). Allellerin kodominant olması ve plazma ACE düzeyleri üzerine katkı göstermeleri yanı sıra, D alleli için homozigot olanlarda enzimin yüksek düzeyleri, I alleli için homozigot olanlarda en düşük ve heterozigot bireylerde ise ara bir düzey görülmüştür.

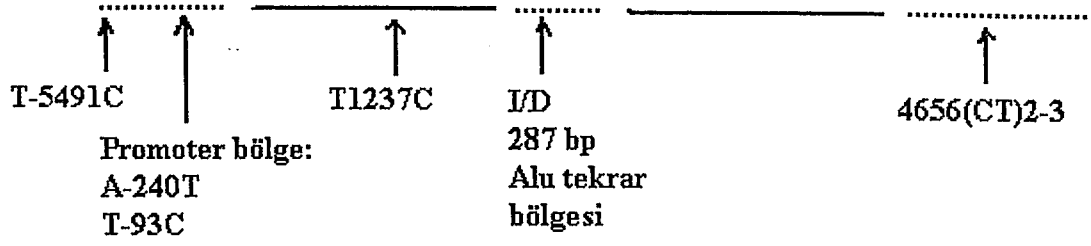
I/D polimorfizminin benzer bir genetik etkisi insan T lenfositlerinde ACE'nin membran bağımlı formunun ekspresyonu için saptanmıştır (57). ACE düzeyinin endotelial ekspresyonunun aslında bu polimorfizme göre değiştiği bildirilmiştir. I/D polimorfik bölgesi pratik olarak ACE ekspresyonunu etkileyen tek faktör olarak bilinir. Diğer polimorfik bölgeler hem ekzonda (kodlayan bölge) ve intronda (kodlamayan

bölge), hem de promotor bölgede identifiye edilmiştir (Şekil 8). Promotor bölgede lokalize bazı genetik varyantların ACE düzeyi ile ilişkili olabileceği saptanmıştır (55). Bundan dolayı artmış bir gen ekspresyonunun, DD genotipi ile ilişkili olarak ANG II'nin oluşumunu düzenleyerek erken iskemik olaylara yatkınlık yarattığı düşünülmüştür.



Şekil 7. İnsan ACE geni ve PCR ile genotipleme

I/D polimorfizminin, bir intron içinde olmasından dolayı ACE düzeyini direk olarak etkileyemeyeceği, bundan dolayı bu bölgenin ACE düzeyini kontrol eden major bir gen lokusu ile güçlü bir bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) içinde olduğu düşünülmüştür (4).



Şekil 8. Anjiyotensin Konverting Enzimindeki çeşitli polimorfik bölgeler.

3.1.5. Hipertansiyon ve Renin Anjiyotensin Sistemi

Esansiyel hipertansiyon, multifaktöryel bir hastalık olup patogenezisinde birçok genin rol oynadığı düşünülmektedir. Renin Anjiyotensin Sistemi, sıvı ve elektrolit dengesinde ve hipertansiyonun patogenezinde önemli bir rol oynar. Renovasküler hipertansiyonun patogenezinde RAS'nin aktivasyonu iyi şekilde gösterilmiştir. Esansiyel hipertansiyonlu hastaların önemli bir kısmında yükselmiş renin düzeyleri görülmüştür. Bundan dolayı RAS'nin komponentlerinden birindeki genetik farklılığın kan basıncındaki değişikliklere veya hipertansiyonun patogenezine yol açabileceği ileri sürülmüştür (52). Yüksek kan basıncının karşısında RAS'nin sürekli aktivasyonunun paradoksal olduğu ve bozulmuş bir negatif feed-back sisteminin olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan yüksek kan basıncı karşısında oluşan artmış RAS ekspresyonu ve aktivasyonu paradoksal ilişkiyi açıklayabilir (52).

RAS enzimlerinden birinin ekspresyonundaki genetik farklılık, kan basıncındaki değişikliğe yol açıp yüksek kan basıncında önemli bir aracı olabilir. RAS'de her bir protein için kodlanan genler belirlenmiş, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklarla bir ilişkisi olup olmadığı araştırılmıştır. İlk olarak renin geni ve onun polimorfizmleri gösterilmiştir. Reninin substratı olan anjiyotensinojenin plazma konsantrasyonu, plazma ANG II düzeyinin başka bir belirleyicisidir ve ANG II'nin artmış konsantrasyonları

hipertansiyon ile ilişkilidir. Bu nedenle teorik olarak yüksek ANG II düzeyleri anjiyotensinojenin yüksek düzeylerine bağlıdır (58)

Sistemin üçüncü proteini olan serum ACE düzeyi ile hipertansiyon arasında henüz bir ilişki gösterilememiştir. Daha önceden de bahsedildiği gibi ACE; ANG II'nin oluşumuyla ilgili tek enzim değildir, ve ACE aktivitesinin doku ekspresyonu serumdakinden bağımsız olabilir. Anjiyotensin Konverting Enziminin hem plazma hem de hücresel düzeyleri ACE genindeki I/D polimorfizmine göre değişiklik gösterir. Yüksek doku ACE düzeyine sahip DD genotipliler yüksek anjiyotensin II oluşumuyla uyum gösterir, bu da vasküler tonusda ve yapısında kısa ve uzun dönemli değişikliklere neden olur. ACE ekspresyonunun artışı, vasküler rezistansda bir artışa, bu da kan basıncında yükselmeye katkıda bulunur; böylece bu tehlikeli döngü yüksek kan basıncının sürmesine neden olur (59).

3.1.6. Renin Anjiyotensin Sistemi ve Miyokard İnfarktüsü

Kronik stabil anjından unstabil iskemik sendromlara geçiş, plak dayanıksızlığını, ülserasyonunu ve plak trombozisini içerir. ANG II, aterosklerozda önemli bir role sahip olup plak dayanıksızlığını da düzenlemektedir (59).

Düz kas kasıcısı olan lokal endotelin ve norepinefrinin oluşumunda ANG II'nin rolünü *in-vivo* veriler desteklemektedir. Ayrıca şiddetli vazokonstriksiyona bağlı olarak yumuşak doku fissürleşmesi ve bunun sonucu olarak platelet agregasyonu ve pıhtılaşma siklusu aktive olur. Hem deneysel hem de klinik çalışmalarda, ANG II'nin PAI-1 salınımını sitümüle ettiği gösterilmiştir (60). PAI-1 ise endojen plazminojen aktivatörünü nötralize eder, nötral fibrinolitik yolda bir bloka yol açar, böylece inhibe edilmemiş trombozise katkıda bulunur (60)

Anjiyotensin II muhtemelen erken iskemik olayları birden fazla mekanizma ile birçok yönden etkiler. Anjiyotensin II'nin oluşumu ACE'ye bağlı olduğu için DD genotiplilerde olduğu gibi artmış ACE ekspresyonunda koroner olaylara insidans diğer subpopulasyonlardan daha fazladır (56).

3.2. HOMOSİSTEİN

Gelişmiş ülkelerde belirti veren atero-trombotik vasküler hastalıkların yaklaşık 2/3'ü genetik ve çevresel vasküler risk faktörlerine bağlıdır. Artmış plazma homosistein düzeyleri de vasküler risk faktörlerinden biridir (61).

Homosistein, protein sülfür atomlarının ana kaynağı olan metiyonin aminoasidinden oluşur (Şekil 9). S-adenozilmetiyoninin (SAM) S-adenozilhomosisteine (SAH) demetilasyonu (Şekil 9-reaksiyon 2) ATP tarafından metiyoninin aktivasyonu sonucu meydana gelir (Şekil 9-reaksiyon 1). Bu aktivasyon kreatin, fosfotidilkolin, DNA, RNA ve nöromediyatörlerin geniş bir kısmının metilasyonuna izin veren yaşamsal önemi olan metilasyon reaksiyonlarıdır. Glisinin sarkozine metilasyonu SAM'nin alternatif demetilasyonuna izin verir (Şekil 9-reaksiyon 3). Homosistein ve adenzinin düşük hücre içi konsantrasyonlarında SAH, transmetilasyon reaksiyonları ile oluşur (Şekil 9-reaksiyon 4).

Sistationine katabolize olma veya metiyonine remetilasyon homosistein ile sonuçlanır. Homosisteinin remetilasyonu N⁵-metiltetrahidrofolatı (5-metilTHF) metil vericisi olarak ve kobalamini ko-faktör olarak kullanan metiyonin sentaz tarafından katalizlenir (Şekil 9-7.reaksiyon). 5-metilTHF'in oluşumu tetrahidrofolat'dan (THF) elde edilen N^{5,10}-metilentetrahidrofolatın (5,10-metilen THF) redüksiyonunu katalizleyen 5,10-metilen THF redüktaza bağlıdır (Şekil 9-reaksiyon 9,10). Folat ve kobalaminden bağımsız çalışan minor bir remetilasyon yolu betainin N,N-dimetilglisine

dönüşümünü kullanır (Şekil 9-reaksiyon 8). Betain-homosistein metiltransferaz tarafından katalizlenen bu yol karaciğerde oluşur. Folat ve/veya kobalamin eksikliğinde bu yol SAM sentezi için gerekli metiyoninin doku konsantrasyonunu sürdürür. Homosisteinin katabolizması, homosisteinin serin ile kondansasyonuna izin veren piridoksal-5-fosfat bağımlı bir enzim olan sistationin β -sentaz (CBS) tarafından yapılır (Şekil 9-reaksiyon 5). Sistein, sonuç olarak idrarla atılan sülfatlara dönüşür.

3.2.1. Homosistein Metabolizmasının Düzenlenmesi

SAM, homosistein metabolizmasının düzenlenmesinin en önemli belirleyicisidir. Yapılan çalışmalarda SAM'nin homosisteinin remetilasyonunu ve katabolizmasını düzenlediği gösterilmiştir (61,62). Doku SAM düzeyleri yaşamsal önemi olan transmetilasyon reaksiyonlarını sürdürmek için yeterli olduğunda, SAM; homosisteinin metionine remetilasyonu oranını MTHFR aktivitesini inhibe ederek azaltmaktadır (Şekil 9-reaksiyon 10) (63).

S-adenozilmetiyonin homosisteinin hepatik remetilasyonunu betain-homosistein metiltransferaz aktivitesini inhibe ederek düzenler (Şekil 9-reaksiyon 8). SAM kendi sentezini tip I ve tip II ekstrahepatik metiyonin S-adenoziltransferaz aktivitesini inhibe ederek sınırlar (Şekil 9-reaksiyon1). SAM, hepatik metiyonin S-adenoziltransferaz III ve glisin metiltransferazı aktive ederek alternatif transmetilasyon yolunu sitümüle eder (Şekil 9-reaksiyon 3). SAH, çoğu diğer SAM-bağımlı transmetilazları inhibe eder (Şekil 9-reaksiyon 2) (61). Ek olarak potansiyel olarak toksik olan homosistein yüklenmesinden kaçınmak için SAM homosistein katabolizmasının CBS aktivitesini (Şekil 9-reaksiyon 5) ve γ -sistationaz aktivitesini (Şekil 9-reaksiyon 6) arttırarak stimüle eder (61,63).

Metiyoninden zengin hayvansal proteinlerin diyetle fazla alınması doku SAM konsantrasyonunda bir artış meydana getirir ve homosisteinin %70'i CBS tarafından transsülfirasyon yolu ile katabolize edilir (Şekil 9-reaksiyon 5). Zıt olarak kısıtlanmış protein alımında MTHFR-bağımlı folat mobilizasyonunun hızlanması ile remetilasyon yolu kullanılır (Şekil 6-reaksiyon 10). Uzun süreli yüksek metiyonin alımı transsülfirasyon yolunun saturasyonuna yol açabilir. Bu saturasyon, remetilasyonun inhibisyonu ile ilişkilidir. Metioninden zengin dietlerin veya akut metiyonin yüklemesinin homosisteinin hücrelerden dışarı atılmasına ve böylece plazma homosistein düzeylerinde yükselmeye neden olduğu gösterilmiştir (64).

3.2.2. Homosistein Metabolizmasını Etkileyen Faktörler

Genetik defektler

Şiddetli hiperhomosisteineminin ve klasik homosisteinürinin (konjenital homosisteinüri) en yaygın genetik sebebi homozigot CBS eksikliğidir (1/100.000 canlı doğum). Total homosistein konsantrasyonunda yaklaşık 40 kat artışa yol açan bu durum otozomal resesif olarak geçiş gösterir. Klinik olarak lens dislokasyonu ve diğer oküler komplikasyonlar, iskelet deformiteleri, prematüre aterosklerozis ve prematüre vasküler (aterotrombotik) olaylar görülür (65).

Total homosistein düzeyinde ılımlı yüksekliğe yol açan en yaygın enzim defekti MTHFR genini kodlayan bölgede bir nokta mutasyonu (677 C-T)'dur. MTHFR 677 C→T mutasyonu MTHFR kodlayan genin 677. nükleotid pozisyonunda sitozinin yerine timinin gelmesiyle oluşan, dolayısıyla alanin ile valinin yer değiştirmesi ile sonuçlanan bir nokta mutasyonu olup enzim aktivitesinde bir düşüklük ile sonuçlanır. Özellikle plazma folik asit düzeyleri düşük olduğu zaman TT için homozigotluk ılımlı

hiperhomosisteineminin en yaygın sebebidir. Son yıllarda KAH ile MTHFR TT genotipi arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapılan bazı çalışmalarda pozitif bir ilişki bulunmuş (66,67), iken diğer bazı çalışmalarda ise aynı ilişki saptanamamıştır (68,69). Sonuçların bu şekilde farklılıklar göstermesi, KAH ile hiperhomosisteineminin etyolojisindeki farklı genetik-çevresel ilişkiye bağlanmıştır. Beyaz popülasyonunun %10-13'ü bu mutasyon için (TT genotipi) homozigot olup suboptimal folat alımı durumunda total homosisteinde hafif bir yükseklik ile birliktedir (70,71).

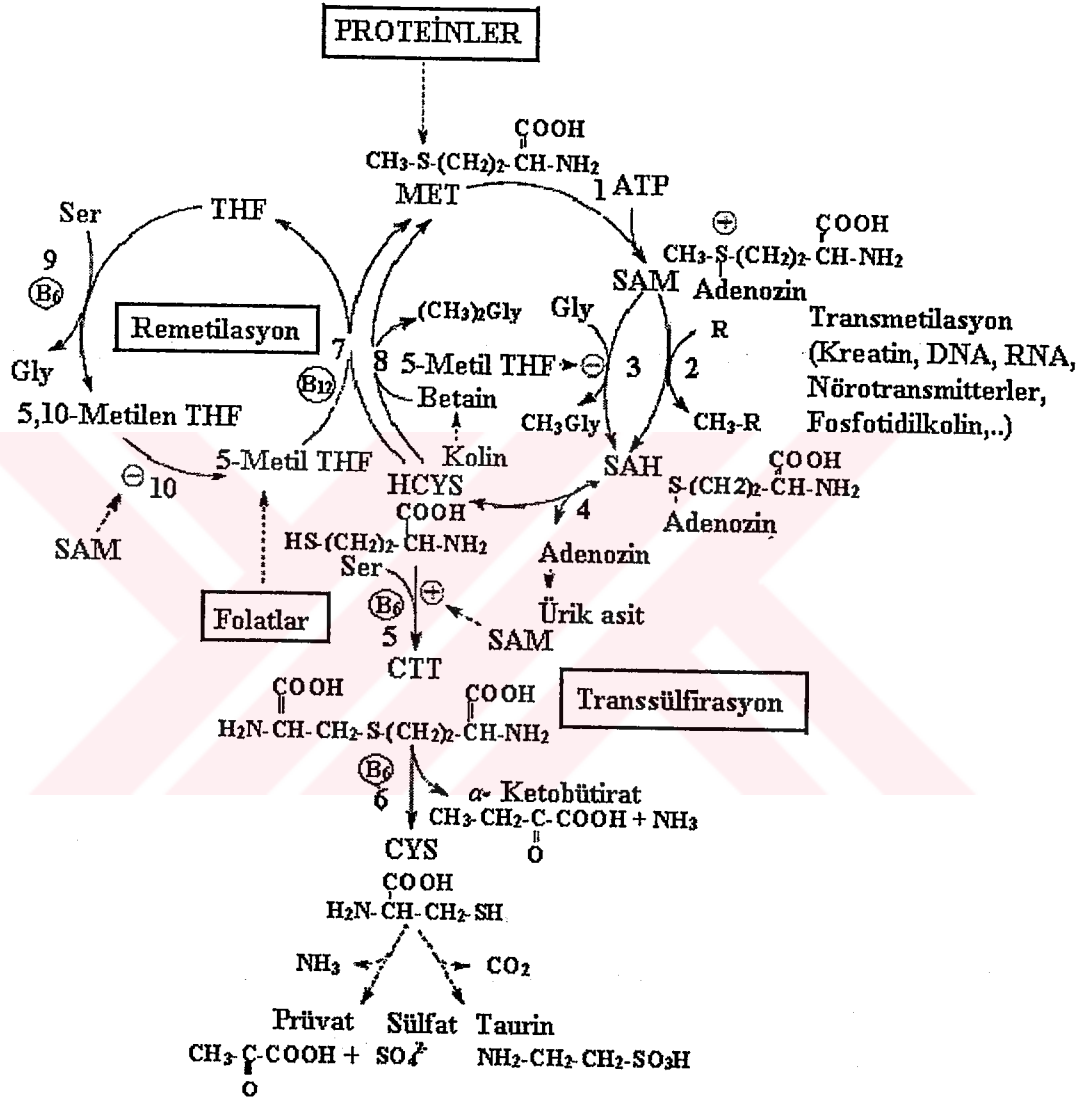
MTHFR geninin 7. ekzonunda A1298C ve T1317C olmak üzere 2 yeni polimorfizm de saptanmıştır (72). T1317C polimorfizmi sessiz olup aminoasit sırasında bir değişikliğe yol açmazken, A1298C polimorfizmi glutamatin alanin ile yer değiştirmesi ile sonuçlanır. Bu varyant ayrıca enzimin aktivitesinde bir düşüklüğe de yol açar. (73).

Nutrisyonel Eksiklik

Folik asit, B₁₂ vitamini veya B₆ vitaminin düşük kan konsantrasyonları hiperhomosisteinemi riskinde bir artışa yol açar. Hiperhomosisteineminin yaklaşık 2/3'nin bu vitamin kofaktörlerinden bir veya daha fazlasının eksikliğinden ileri geldiği öne sürülmüştür (74-76).

Diğer Nedenler

Renal hastalıklar sıklıkla hiperhomosisteinemiye neden olur. Serum kreatinin düzeyindeki yükselmeye olduğu gibi total homosistein düzeyindeki yükselme azalmış üriner atılım nedeni ile olmayıp homosisteinin böbreklerde bozulmuş metabolizması ile ilişkilidir (77). Kronik böbrek yetmezlikli hastalarda total homosistein düzeyi aterosklerotik vasküler hastalığı olan hastalardan daha yüksektir ve bu durum kronik böbrek yetmezlikli hastalarda yüksek vasküler komplikasyonlara yol açar (77)



Şekil 9. Homosisteinin metabolizması

Plazma homosistein konsantrasyonu; folik asit, B₁₂ ve B₆ vitaminin metabolizmasını etkileyen çeşitli ilaçlar ve hastalıklarla yükselebilir (78). Homosistein yüksekliğine yol açan nedenler Tablo 1’de gösterilmiştir.

3.2.3. Homosistein ve Aterotrombotik Vasküler Hastalıklar

Ateroskleroz; düz kas hücre proliferasyonu, lipid depositleri ve fibroz oluşumu nedeni ile arteriyel duvarda kalınlaşma ile karakterizedir. Lipid içeren aterosklerotik plakların rüptürü trombozisle sonuçlanır, miyokard infarktüsü ve inmeye yol açar (79). Zıt olarak homosistinürinin arterlerden daha sık olarak venleri etkileyen primer trombotik hastalıkla ilişkili olduğu görülmüştür (79). Homosistinürik hastalarda inme genellikle intra-kraniyal venöz tromboz nedeni ile olur (80). Homosisteinin primer olarak arteriyel ve venöz tromboza neden olan faktörler ile ilişkili olduğu görülmüştür.

1969’da McCully; aterosklerozun homosistein teorisini öne sürmüştür (81). Bu teori CBS eksikliği nedeniyle homosistinürlü bir infandaki arteriyel değişikliklerin remetilasyon defektine sahip homosistinürlü bir infandaki arteriyel değişiklikler ile benzer olması üzerine kurulmuştur. Arteriyel duvardaki değişiklikler lipid depositlerinden yoksun olup arteriyoskleroz olarak sınıflandırılmıştır. Bu iki farklı hastalık yenidoğanın metabolik hastalığı olarak tanımlanmıştır. Artmış metiyonin, homosistein ve türevlerinin arteriyel hasara önderlik ettiği düşünülmüştür (81).

Homosistinüride çok yüksek homosistein konsantrasyonlarının trombogenik olduğuna dair kanıtlar vardır. Ancak hem CBS eksikliğinde hem de homosisteinin remetilasyon defektine sahip yenidoğanlarda homosisteinin prekürsörü olan SAH birikmektedir. S-adenozilhomosistein birikiminin bazı esansiyel komponentlerin hipometilasyonuna önderlik etmesi mümkün gözükmektedir (82).

3.2.4. Homosisteinin Neden Olduğu Vasküler Hasarın Patofizyolojisi

Homosisteinin biyokimyasal olarak kardiovasküler hastalıklar ile ilişkili olduğuna dair birçok mekanizma vardır. Hızlanmış aterosklerozda plak formasyonunun oluşumu 4 evrede incelenebilir (83):

- 1) Derin intimal hasar,
- 2) Kan hücrelerinin ilişkisi (plateletler, monositler, lenfositler) ve daha önemlisi erken trombozis,
- 3) Düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu,
- 4) Plak rüptürüne ve geç trombozise yol açan lipid kümelenmesi.

Tablo 1. Hiperhomosisteinemi Nedenleri

A. Enzim eksikliği
Sistationin β -sentaz
Metiyonin sentetaz
5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz
B. Vitamin eksikliği
Folik Asit
Vitamin B ₆
Vitamin B ₁₂
C. İlaçlar
Dihidrofolat redüktaz inhibitörleri (Metotreksat)
Folik asit antagonistleri (fenitoin, karbamazepin)
Metiyonin sentaz inhibitörleri (Nitröz oksit)
Vitamin B ₁₂ antagonistleri (Nitröz oksit)
Vitamin B ₆ antagonistleri (Teofilin, 6-aza-üridin triasetat)
L-DOPA
Kolesterol düşürücü ilaçlar (Kolestiramin, Niasin)
D. Hastalıklar
Kronik Böbrek Yetmezliği
İnme
Koroner Arter Hastalığı
Derin Ven Trombozu
Hipertansiyon
Akut Lenfoblastik Lösemi
Hipotiroidizm

Homosisteinin endotel hücre fonksiyonlarında bozukluğa ve arterlerdeki endotel hücrelerde hasara yol açabileceği öne sürülmüştür. Endotelyum; vasküler tonusu ve permeabiliteyi, koagülasyon ve fibrinolizis arasındaki dengeyi, subendotelyal matriksin bileşimini, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu düzenler (84). Bu özelliklerden bir veya birkaçının değişiklikleri endotelyum disfonksiyonunun erken belirtilerine yol açar. İlmli diyet indüksiyonu ile hiperhomosisteinemi yapılan bir hayvan modelinde hipertansiyon ve aort dilatasyonu ile karakterize mega-arter sendromunun geliştiği gösterilmiştir (85). Bu hayvanların arteriyel ağaçlarında major elastik lamina dislokasyonu, hipertrofi ve düz kas hücrelerinin re-oryantasyonu gözlenmiştir. Bu da yükselmiş homosistein düzeylerinin damar düz kas hücre proliferasyonunu kolaylaştırdığını göstermektedir. Hiperhomosisteinemik hayvan ve insanlarda endotelyumun endotelyum aracılı relaksasyon faktörlerini (nitrik oksit) yeterli miktarda üretmediği bulunmuştur (86).

Homosistein plazmaya geçtiği zaman homosistin oluşumuna yol açacak şekilde kolaylıkla okside olur. Sülfidril gruplarının oksidasyonu sırasında süperoksit anyon radikalleri ve hidrojen peroksit oluşur. Bu radikaller endotel hücre yüzeyinde ve plazmada lipoprotein partiküllerinde lipid peroksidasyonunu başlatır (87). Ek olarak homosistein, hidrojen peroksit ve lipid peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidazların üretimini ve sentezini inhibe edebilir (88).

Plazma homosistein düzeylerindeki ılımlı yükseklikler ($>16 \mu\text{mol/L}$) özellikle koroner, iliak, femoral ve karotid arterlerin vasküler hastalıkları ile ilişkilidir (83). Yükselmiş homosistein konsantrasyonları vasküler hücrelerin protrombolitik ve

antikoagulan aktivitelerini değiştirir. Homosistein ayrıca endotelial hücrelerde doku faktörlerinin aktivasyonunu arttırır (89).

Homosisteinin neden olduğu kardiyovasküler hastalıkların patogenezi tam olarak açıklanamamıştır. Homosistein, nitrik oksit sentazı inhibe ederek kan damarlarının relaksasyonunda bir azalmaya yol açar. Bu da kan basıncında bir artışa ve endotelial hücrelerde fiziksel hasara yol açar. Bu hasar diğer homosistein ile ilişkili mekanizmalar (düz kas hücre proliferasyonu, lipid peroksidasyonu, glutatyon peroksidaz üretiminde inhibisyon, trombin oluşumunda artış) için bir fırsat sağlar. Endoteliumda oluşan bu değişiklikler vasküler hastalıkların oluşumuna yol açar (81,87-89).

Sonuc olarak hücre içinde bulunan homosistein metabolik olarak aktif olan form olup metiyonine veya sistationine çevrilemez. Fazla olan homosisteinin ekstraselüler boşluğa çıkartılması ile hücre içi kompartmanın homeostazisi sağlanmış olur. Yetersiz vitamin veya aşırı substrat alımı ile homosisteinin hücre içi metabolizması azalır ise, hücreler hızla homosistein için kritik bir konsantrasyona yükselir ve bunu da plazmada yükselmiş homosistein düzeyleri takip eder. Her ne kadar hücre içi homosistein için kritik konsantrasyonlar henüz tam olarak bilinmese de bunun bilinmesi yükselmiş hücre içi homosisteinin yol açtığı zararlı hücresel ve biyokimyasal olayların azaltılmasına yardımcı olabilir (90).

3.3. DOKU PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR ve PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖR-1

3.3.1. Plazminojen Aktivatör Sistemi

Fibrinolitik sistem olarak da adlandırılan plazminojen aktivatör sistemi, inaktif zimojen olan plazminojenin t-PA veya ürokinaz plazminojen aktivatörü (u-PA) gibi serin proteazlarla, fibrin yıkım proteazı olan plazmine dönüşümü ile başlar (şekil 10)

(91). Plazminin oluşumu; plazmada predominant bir aktivatör olan t-PA ve plazminojen için selektif bağlanma yüzeyini sağlayan fibrinin varlığında artar (92).

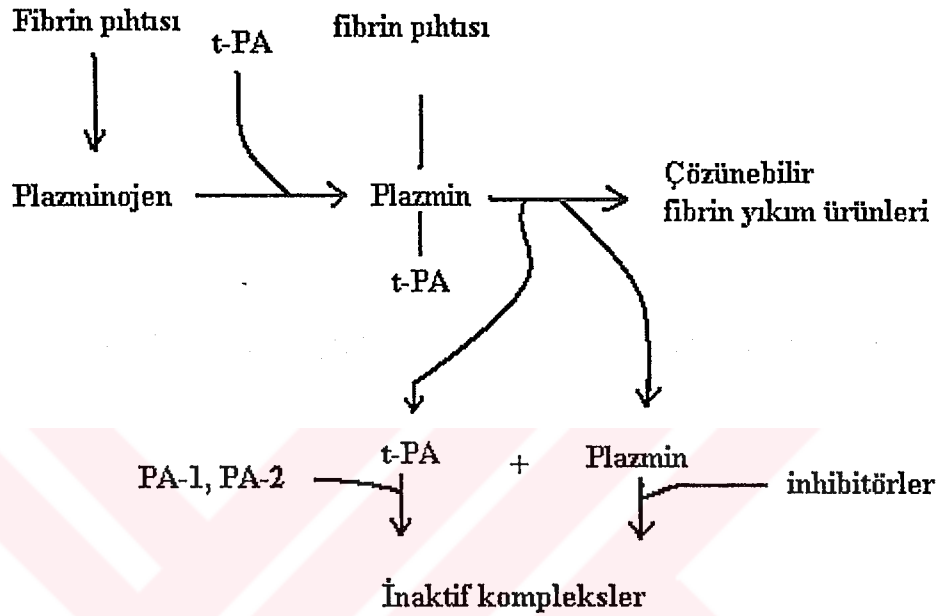
Fibrinolitik sistemin en önemli düzenleyicilerinden biri PAI-1 olup serin proteaz inhibitör (SERPIN) ailesine aittir. Plazminojen Aktivator İnhibitör Tip 1 molekülü t-PA'yı inhibe ederek plazminojen ile etkileşmesini önler (94).

Dolaşımda bulunan Plazminojen Aktivatör İnhibitör molekülü PAI-1 olarak bilinir. Plazminojen aktivatör inhibitör-2 (PAI-2) molekülü daha çok lökositlerde, plasentada ve hamile kadınların plazmasında bulunan hücre içi plazminojen aktivatör inhibitör molekülüdür. Plazminojen aktivatör inhibitör-3 (PAI-3) molekülü ise protein C inhibitör olarak bilinir. Son zamanlarda yapılan filogenetik adlandırma sistemine göre PAI-1-Serpin E1; PAI-2-Serpin B2; ve PAI-3- Serpin A5 olarak adlandırılmıştır (95).

PAI-1 molekülü t-PA ve u-PA tarafından yapılan plazminojen aktivasyonunun major inhibitörüdür. t-PA'nın intravasküler plazminojenin aktivasyonu için bir cevap olduğu ve aktivasyonunun fibrin varlığında düzenlendiği düşünülmektedir. u-PA, migrasyon hücrelerindeki major plazminojen aktivatörüdür ve aktivitesi farklı hücrelerdeki u-PA reseptörlerinin (u-PAR) varlığı ile düzenlenir. Bundan dolayı PAI-1 molekülü sadece intravasküler fibrinolizisin değil ayrıca hücre ilişkili proteolizisin inhibisyonu ile de yakından ilişkilidir (96).

Plazminojen Aktivator İnhibitör Tip 1'in aktivitesi transkripsiyon düzeyinde düzenlenir. PAI-1 ekspresyonunun ve dolaşımdaki lokal PAI-1 aktivitesinin major düzenleyicisi sitokin TGF- β 'dır. Diğer yandan TGF β 'nın aktivitesi de PAI-1 tarafından düzenlenir. Fizyolojik koşullarda PAI-1 dolaşıma ve ekstraselüler boşluğa sadece

karaciğer hücreleri, düz kas hücreleri, adipositler, plateletler gibi hücrelerden salınır (96).



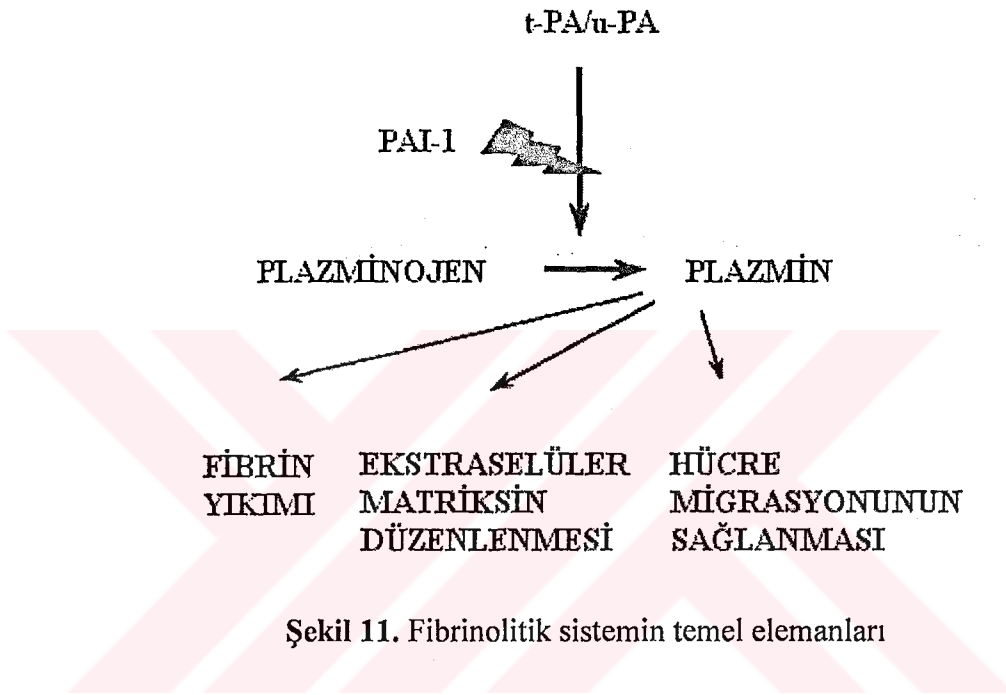
Şekil 10. Plazminojen Aktivatör Sistemi

Patolojik koşullarda ise tümör hücreleri, inflamatuvar sitokinlere cevap olarak endotel hücreleri ve inflamasyonun aktive ettiği diğer hücrelerden PAI-1 salınır. Plazma PAI-1'in düzeyleri devamlı bir şekilde şiddetli sepsisli hastalarda ayrıca akut veya aterosklerozis gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda artar (96).

3.3.2. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 Molekülünün Yapısı

Plazminojen Aktivatör İnhibitör Tip 1 molekülü tek zincirli bir glikoprotein olup moleküler ağırlığı yaklaşık 50.000 daltonudur. Bu inhibitörün salgılanmış matür formu 379 aminoasitden oluşur ve yaklaşık %13 oranında karbonhidrat içerir, bu form sistein rezidülerini kaybeder fakat birçok metiyonin rezidülerini içerir (97).

Plazminojen Aktivator İnhibitör Tip 1 molekülü hem t-PA hem de u-PA'nın tek, hızlı ve spesifik inhibitörüdür ve in-vivo plazminojen aktivasyonunun primer regülatörü olarak bilinir. Ek olarak PAI-1'in plazmin ve tripsin'i de inhibe ettiği bilinmektedir (98) (Şekil 11).

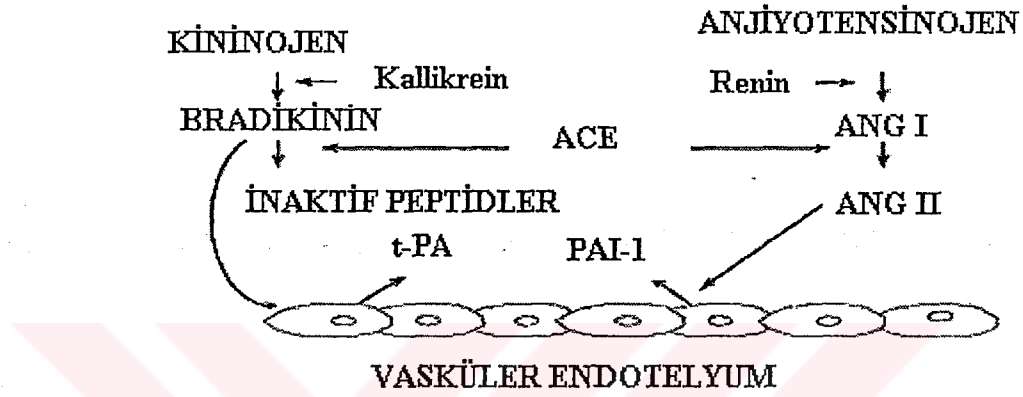


Şekil 11. Fibrinolitik sistemin temel elemanları

3.3.3. Renin Anjiyotensin Sistem Aktivitesi ve Fibrinolitik Denge

Fibrinolitik dengenin RAS'nin kontrolü altında olduğuna dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Anjiyotensin II hem *in-vivo* hem *in-vitro* olarak PAI-1'in salınımına neden olur böylece fibrinolizisi inhibe eder (99,100). Bradikinin tarafından indüklenen t-PA fibrinolizis döngüsünü başlatır. Bu etkiler ANG II ve bradikinin tarafından indüklenen hemodinamik değişikliklerden bağımsızdır (101) (Şekil 12). Bradikininin yıkımının ve ANG I'in ANG II'ye dönüşümünün sağlanması ile artmış ACE aktivitesi teorik olarak t-PA'nın azalması ve PAI-1'in artmasını sağlar. İn vivo olarak bu mekanizmaların aktive olduğuna dair kanıtlar ACE inhibitörlerinin PAI-1 antijen

düzeylerini, PAI-1 aktivitesini ve PAI-1 / t-PA oranını düşürdüğünü gösteren çalışmalar ile gösterilmiştir (102,103). Böylece ACE inhibitörlerinin fibrinolizisi sağlaması ve iskemik olaylarda azalmaya yol açması sürpriz değildir.



Şekil 12. ACE ile fibrinolitik denge arasındaki ilişki

Nitrik oksit aracılı vazodilatasyon birçok kardiovasküler hastalıkta bozulmuştur. N^ω-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) gibi nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin kronik alımı sistemik arteryal hipertansiyonu ve koroner arterlerin perivasküler fibrozisini içeren çeşitli kardiovasküler patolojileri indükler. Sonuçta plazminojen aktivatör sistem intravasküler trombozise karşı önemli bir savunma sistemi olup bu sistemin bozulması iskemik kardiovasküler olayların riskinde bir artış ile ilişkilidir. Koroner dolaşımın azalmış fibrinolizisin patolojik sonuçlarından oldukça etkilendiği görülmüştür (94,95).

Bu tez çalışmasının amacı; ACE gen polimorfizmi, plazma t-PA, PAI-1 ve homosistein düzeylerinin koroner kalp hastalığının etyolojisindeki rolünü incelemek ve ACE gen polimorfizminin plazma ACE düzeyi ile PAI-1 ve t-PA düzeyleri üzerine olan etkilerini saptamaktır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Hasta Populasyonunun Seçimi ve Kan Örneklerinin Alınması

Çalışma; Fırat Tıp Merkezi Kardiyoloji Kliniğine başvuran, anjiyografik olarak koroner arter hastalığı tanısını ilk kez alan, tedavi almamış, yaşları ortalama 58.02 ± 9.8 olan toplam 118 hasta üzerinde yapılmıştır. Anjiyografik olarak normal koroner arter saptanan yaşları ortalama 55.54 ± 10.5 olan 70 sağlıklı birey çalışmanın kontrol grubunu oluşturmaktadır. Tüm hastaların koroner anjiyografileri değerlendirilerek damar tıkanıklığı sayısı, lezyon yerleri ve uzunluğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunun onayı (Onay No:15) alınarak hem kontrol grubunu hem de hasta grubunu oluşturan bireylere çalışmanın amacı, yapılacak işlemler anlatılarak yazılı izinleri alınmıştır. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin anamnezleri alınarak sistolik ve diyastolik kan basınçları ölçülmüş ve aile hikayeleri yönünden sorgulanmıştır. Çalışmada sistolik kan basıncı >140 mmHg, diyastolik kan basıncı >90 mmHg olan bireyler hipertansiyonlu hasta olarak değerlendirildi.

Çalışmaya dahil edilen bireylerden K_3 -EDTA içeren 2 ayrı tüpe 2'şer mililitre kan örnekleri alınırken antikoagülan içermeyen biyokimya tüpüne ise 3 mililitre kan örneği alındı. K_3 -EDTA içeren kan tüplerinin birinden DNA izolasyonu yapılırken diğer K_3 -EDTA içeren kan örneği $1500 \times g$ 'de, $+4^\circ C$ 'de 10 dakika santrifüj edilerek plazması ayrıldı ve -20° 'de saklandı. Plazma örneklerinde homosistein, t-PA ve PAI-1 düzeyleri tayin edildi. Biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri de aynı işlemlere tabi tutularak serumları ayrıldı ve serum örneklerinde lipid parametrelerinden Total Kolesterol, HDL-Kolesterol, LDL-Kolesterol ve Trigliserid düzeyleri ölçüldü.

Çalışmaya alınan hastaların seçiminde kullanılan anket formu Ek-1'de sunulmuştur.

4.2. Plazma Lipid Düzeylerinin Ölçülmesi

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin plazma lipid düzeylerinin ölçülmesinde Olympus AU 600 (Olympus Optical Co Ltd, Japan) marka klinik kimya otoanalizörü kullanıldı. Serum lipidlerinden; Total Kolesterol (Katalog No: OSR 6516) HDL-Kolesterol (Katalog No: OSR 6133), LDL-Kolesterol (Katalog No: OSR 6133) ve Trigliserid (Katalog No: OSR 6133) düzeyleri Olympus marka kitler kullanılarak kit içeriğine uygun enzimatik yöntemler ile ölçüldü.

4.3. Plazma Homosistein Düzeylerinin Ölçümü

Plazma homosistein düzeyleri; HPLC (Yüksek Performanslı Likid Kromatografisi, Shimadzu 10 AVP, Japonya) yöntemi ile Chromsystems marka kitler (Chromsystems, Instruments & Chemicals Germany–Katalog No: 45000) kullanılarak ölçüldü.

4.4. Plazma Doku Plazminojen Aktivatör ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 Düzeylerinin Ölçümü

Plazma t-PA (Katalog No: 860) ve PAI-1 (Katalog No: 822) düzeylerinin ölçümü ADI (American Diagnostica Incorporation, USA) marka İmubind ELISA kitleri kullanılarak ,kit prosedürüne uygun olarak yapıldı.

4.5. Anjiyotensin Konverting Enzim Düzeyinin Ölçülmesi

Plazma örneklerinden ACE düzeyinin ölçülmesi için Chemicon International marka ELISA kiti (Katalog No: ACE100, USA) kullanılmıştır.

4.6. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için K₃-EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden 200 µl tam kan alındı ve Roche marka High Pure PCR Template Preparation kiti (Katalog No:1 796 828) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı ve -20°C'de saklandı.

4.7. Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Saptanması

ACE gen polimorfizminin saptanması için İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) imkanlarından faydalanılmıştır.

4.7.1. Termal Cycler ile Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Saptanması

4.7.1.1. Agaroz Jel Elektrofrezinde kullanılan çözeltiler

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma firmasından temin edilmiştir.

i) Etidyum Bromür (10 mg/ml)

10 gram etidyum bromür tartılarak steril ddH₂O ile 10 mililitreye tamamlandı.

ii) Agaroz Jel Yükleme Tamponu

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS (sodyum dodesil sülfat), 0.2 mililitre 0.5 molarlık Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA), 1 mililitre 1 molarlık Tris (pH 8.0), 200 miligram Brom Fenol Blue, 200 miligram Xylen Cyanol tartılarak steril ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlandı ve oda ısısında saklandı. Bu tampon 5 kat konsantredir.

iii) Tris-Asetik asit-Etilen diamin tetra asetat (TAE) Tamponu

242 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 57.1 mililitre Glasiyal asetik asit ve 100 ml 0.5 molarlık EDTA ve 800 mililitre ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15

dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı. Bu tampon 50 kat konsantredir.

iv) Tris-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TBE)

54 gram Tris baz ve 27.5 gram borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0.5 molarlık EDTA (pH 8.0) ve 800 ml ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcı kullanılarak çözüldü. Çözelti balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı ve 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

4.7.1.2. Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Saptanması

DNA örneklerinden ACE gen bölgesinin çoğaltılması için 50 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. Karışım; 31.9 µl ddH₂O, 0.1 ünite Taq polimeraz enzimi, 5 µl Taq polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10x Reaksiyon çözeltisi, ACE gen bölgesine özgü 10 pmol primer çifti, 200 mM deoksiniükleotid trifosfat (dNTP) içermektedir. DNA örnekleri yaklaşık 1 µl olacak şekilde PCR karışımına eklendi.

Buharlaştırmanın engellenmesi için karışımın üzerine 50 µl mineral yağ damlatılarak örneklerin Stratagene Mini Termal Cycler'da PCR'ları yapıldı.

4.7.1.3. Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Bölgesi İçin Kullanılan Amplifikasyon Koşulu

94°C'de 1 dakika denatürasyon, 56°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 2 dakika uzama olmak üzere 30 döngü olarak gerçekleştirilmiştir (3).

4.7.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi:

PCR sonrası oluşan amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi için %3'lük agaroz jel hazırlandı. Örnekler agaroz jel elektroforezinde hazırlanmış olan jele tatbik edilerek 100 volt'luk elektrik akımında yürütüldü.

4.7.2. Light Cycler ile Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin

Saptanması

Light Cycler (LC) sisteminin diğer PCR cihazına göre en büyük avantajı amplifikasyon ürün oluşumunun anında (Real-Time) izlenebilmesidir. Bunu, fluoresansa dayanan iki metodla gerçekleştirir:

DNA bağlayıcı boya SYBR Green I

Hibridizasyon problemleri

ACE gen polimorfizminin LightCycler (Roche Diagnostic GmbH, Germany) ile saptanması için DNA bağlayıcı boya SYBR Green I kullanıldı. LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green (Roche Diagnostic, Katalog No: 3 003 230) kiti Taq DNA polimeraz, reaksiyon buffer, dNTP karışımı, 10mM MgCl₂ ve SYBR Green I boyasını içerir. SYBR Green I boyası uzun süre dayanıklıdır. Uyarılma ve ışık saçma dalga boyları LC'nin optik filtre setine uymaktadır. Bağlanmamış olan boya az miktarda fluoresans yayarak, daha sonraki bilgisayar analizlerinden çıkartılan, minimum arka fon fluoresans sinyali oluşturur. Primerlerin tutunmasıyla az sayıdaki boya moleküllü çift sarmal DNA'ya bağlanır. DNA'ya bağlanma, SYBR Green I moleküllerinin uyarılması sonucu ışık saçılmalarının etkili şekilde artmasına neden olur. Uzama aşaması esnasında çift sarmal DNA oluştuğunda, daha fazla sayıda boya molekülleri bağlanır. Reaksiyon devamlı denetlenerek, fluoresansdaki artış real-time olarak izlenir. Diğer döngünün ısıtma basamağında DNA denatüre edildiğinde boya molekülleri serbest kalır ve fluoresans sinyali düşer. Erime eğrisinin incelenmesiyle spesifik fluoresans sinyalleri, spesifik olmayan sinyallerden ayırt edilebilir.

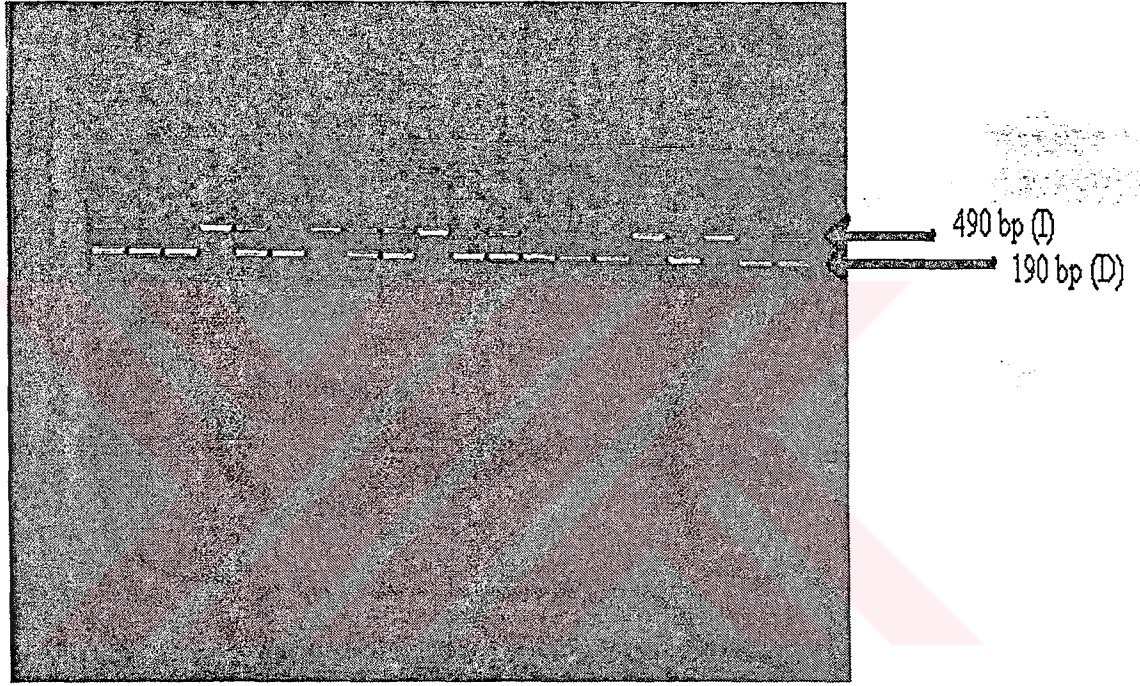
Light Cycler cihazı, amplifikasyon aşamasından sonra oluşan PCR ürünlerinin ayrıntılı erime eğrisi analizini yürütebilmektedir. Bir DNA fragmanının erime noktası

uzunluğuna ve G/C içeriğine bağlı olarak değişir. Buna göre DNA fragmanlarına özel erime noktaları tayin edilerek, amplifikasyon ürünleri karakterize edilebilir.

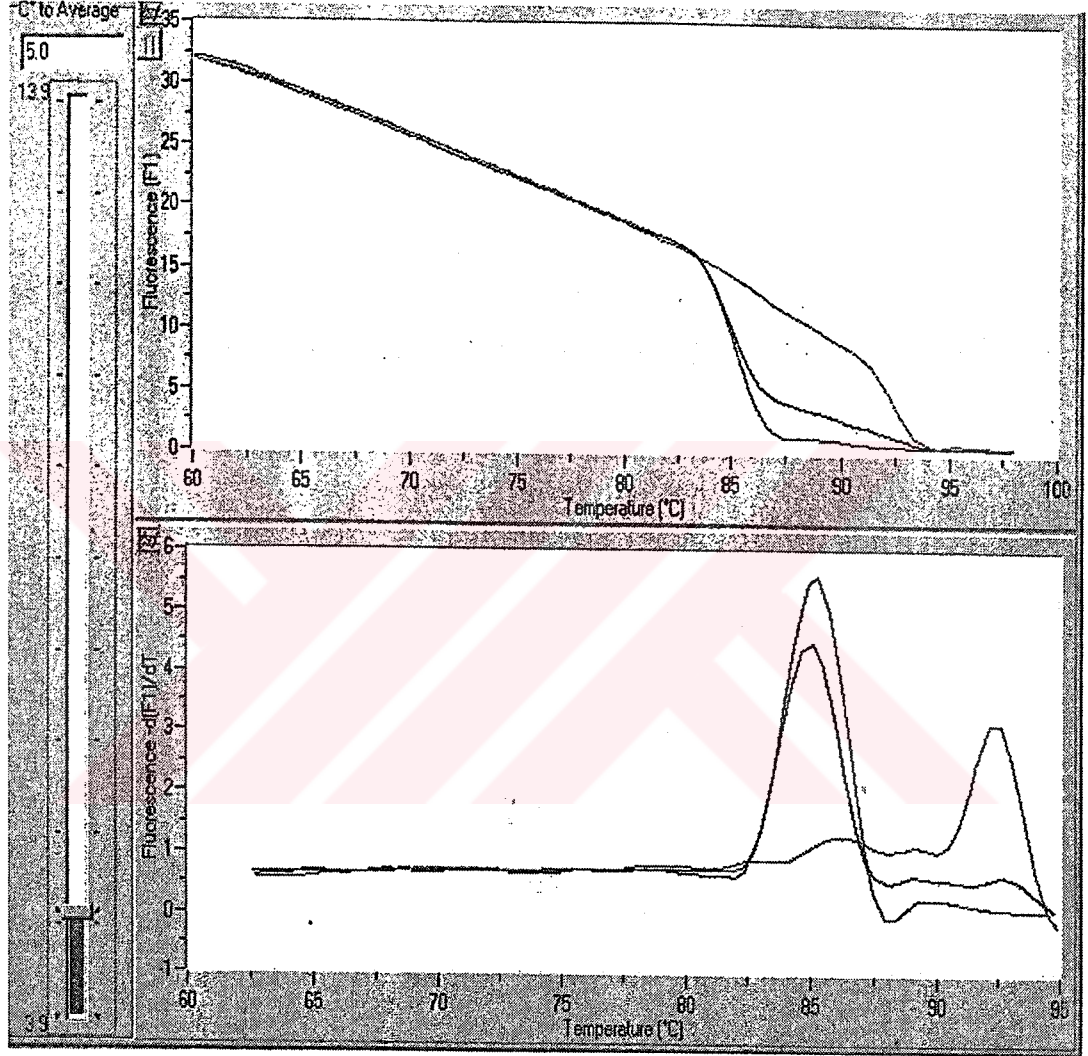
Light Cycler cihazı 530, 640 ve 710 nm dalga boyundaki yayılan ışıkları saptayabilen  kanal fluorimetre'ye sahiptir. Kullanılan fluorescein, LC Red 640, ve LC Red 705'in yaydıkları ışınlar sırasıyla 530, 640, ve 710 nm'deki filtrelerden geçerler.

4.8.Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Çalışmada kullanılan biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirilmesinde Student's t testi, korelasyon analizlerinde ise Pearson Korelasyon Analizi kullanılmıştır. ACE genotip ile allellerinin görülme sıklığının ve gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde χ^2 testi kullanılmıştır. $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (104).



Şekil 13. Agaroj jel elektroforezinde saptanan ACE gen polimorfizmine ait bir örnek.



Şekil 14. Light Cycler ile saptanan ACE Gen Polimorfizmine ait bir örnek

5. BULGULAR

5.1. Çalışma Gruplarının Karakteristik Özellikleri

Çalışmaya katılan hasta ve sağlıklı bireylere ait karakteristik özellikler Tablo 2’de gösterilmiştir. Koroner arter hastalığına sahip bireylerde Total Kolesterol ve LDL-Kolesterol düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükselmiş olup HDL-kolesterol düzeyleri ise anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Serum trigliserid düzeyleri ise KAH’ında kontrol grubu değerlerine göre yüksek bulunmuş olup bu düzeyler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Tablo 2. Koroner Arter Hastaları (KAH) ile Kontrol Grubuna Ait Özellikler

	KAH (+)	Kontrol	P değeri
n	118	70	
Yaş (yıl)	58.02 ± 9.84	55.54 ± 10.53	$p>0.05$
Cinsiyet (K/E)	19/99	20/50	$p<0.05$
Sigara içenler (%)	53.4	32.9	$p<0.01$
Hipertansiyon (%)	52.5	42.9	$p>0.05$
Total Kolesterol (mg/dl)	217.97 ± 49.30	199.77 ± 44.03	$p<0.01$
Trigliserid (mg/dl)	167.59 ± 79.74	155.81 ± 64.55	$p<0.05$
HDL Kolesterol (mg/dl)	44.16 ± 10.40	51.60 ± 12.42	$p<0.001$
LDL Kolesterol (mg/dl)	149.22 ± 34.32	137.01 ± 38.11	$p<0.05$

5.2. Anjiyotensin Konverting Enzim Geninin Genotip ve Allel Frekansları

Tablo 3’de hasta ve kontrol grubunda ACE gen polimorfizmine ait genotiplerin frekansları verilmiştir.

Tablo 3. Hasta ve Kontrol Grubunda Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Genotip Dağılımları

ACE genotipi	KAH (+) n:118	KONTROL n:70	P değeri
DD	51 (%43.2)	25 (% 35.7)	p>0.05
II	15 (%12.7)	19 (%27.1)	p< 0.05
ID	52 (%44.1)	26 (%37.1)	p>0.05

Tablo 4’de ise KAH ve kontrol grubunda incelenen ACE gen polimorfizmine ait allellerin frekansı görülmektedir.

Tablo 4. Hasta ve Kontrol Grubunda Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Allel Dağılımları

ALLEL	KAH(+)	KONTROL
D	% 65.3	% 54.3
I	%34.7	% 45.7

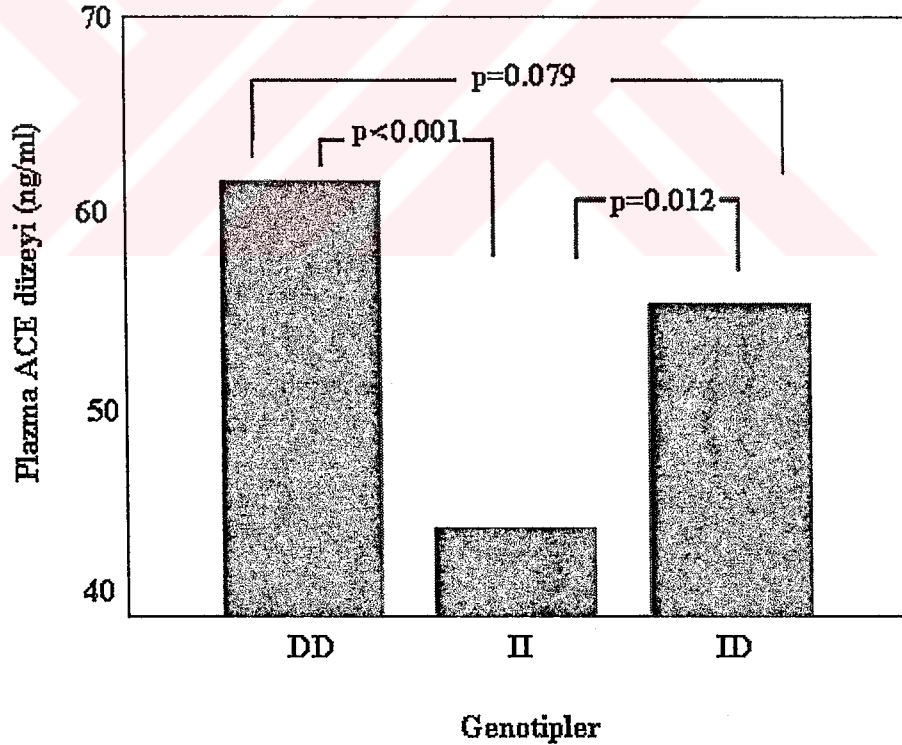
Koroner arter hastalığına sahip bireylerde DD, ID ve II genotiplerinin frekansı sırasıyla % 43.2 (n=61), % 44.1 (n=52) ve %12.7 (n=15) olarak bulunmuştur. D allelinin koroner arter hastalarında frekansı % 65.3 olup I alleli için bu değer % 34.7 olarak bulundu. ACE gen polimorfizminin II genotipinin frekansı koroner arter hastalarında anlamlı olarak düşük bulunmuştur (p< 0.05). Koroner arter hastalarında D allelinin frekansı istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p< 0.05).

5.3. Anjiyotensin Konverting Enzimin Plazma Düzeyleri

Koroner kalp hastalarında ve kontrol grubunda plazma ACE düzeylerinin ACE gen polimorfizminin genotiplerine göre değişimi Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Çalışmaya Katılan Tüm Bireylerin ACE Gen Polimorfizminin Genotiplerine Göre Plazma ACE Düzeyi

	DD n:76	II n:34	ID n:78
ACE düzeyi (ng/ml)	610.75 ± 90.05	440.59 ± 70.51	550.59 ± 180.83



Şekil 15. Plazma ACE düzeyi ile Anjiyotensin Konverting Enzim gen polimorfizminin genotipleri arasındaki ilişki

Çalışmaya katılan tüm bireylerin plazma ACE düzeyleri genotiplerine göre karşılaştırıldığında DD genotipine sahip bireylerin ACE düzeyleri II genotipine sahip bireylere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$), II genotipine sahip bireyler ID genotipine sahip bireyler ile plazma ACE düzeyleri açısından karşılaştırıldığı zaman ID genotipine sahip bireylerin plazma ACE düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). DD genotipli bireyler; ID genotipli bireyler ile karşılaştırıldığında ise DD genotipine sahip bireylerin plazma ACE düzeylerinin daha yüksek olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Sonuç olarak, en düşük plazma ACE düzeyleri II genotipli bireylerde görülürken, en yüksek düzeyler ise DD genotipine sahip bireylerde saptanmıştır (DD>ID>II).

5.4. Plazma Lipid Düzeylerinin Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Genotiplerine Göre Dağılımı

Çalışmaya katılan tüm bireylerin ACE gen polimorfizminin DD, ID, II genotiplerine göre Total Kolesterol, HDL-Kolesterol, LDL-Kolesterol ve Trigliserid düzeylerinin değişimi Tablo 6'da verilmiştir. ACE gen polimorfizminin genotiplerine göre plazma lipid düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Tablo 6. Çalışmaya Katılan Tüm Bireylerin Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Genotiplerine Göre Plazma Lipid Düzeyleri

	DD	II	ID
Total kolesterol (mg/dl)	214.32 ± 50.04	209.41 ± 47.06	208.83 ± 47.10
HDL kolesterol (mg/dl)	46.41 ± 11.60	44.85 ± 11.26	48.32 ± 11.90
LDL kolesterol (mg/dl)	146.25 ± 35.85	141.01 ± 34.15	144.71 ± 37.61
Trigliserid (mg/dl)	171.38 ± 74.18	172.60 ± 95.91	151.10 ± 62.48

5.5. Plazma Doku Plazminojen Aktivatör ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 Düzeyleri

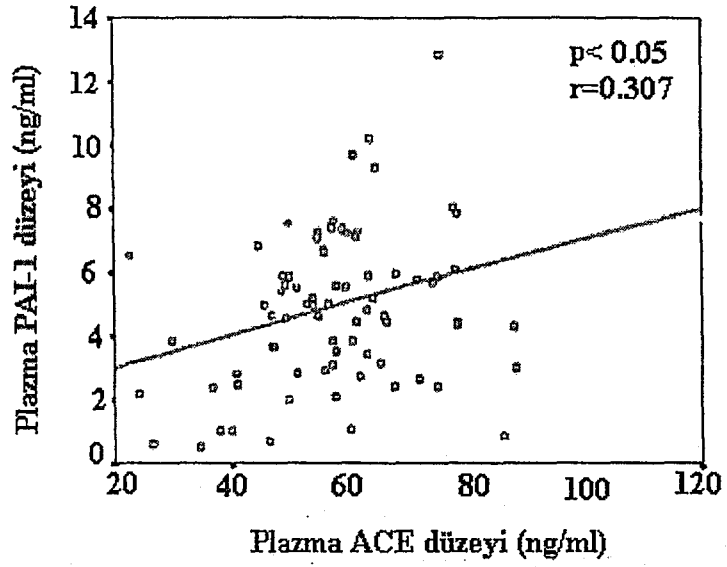
Koroner arter hastalarında plazma PAI-1 düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PAI-1 düzeyi hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Plazma t-PA düzeyleri ise koroner arter hastalarında sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (Tablo 7).

Tablo 7. Hasta ve Kontrol Grubunda Plazma PAI-1 ve t-PA Düzeyleri

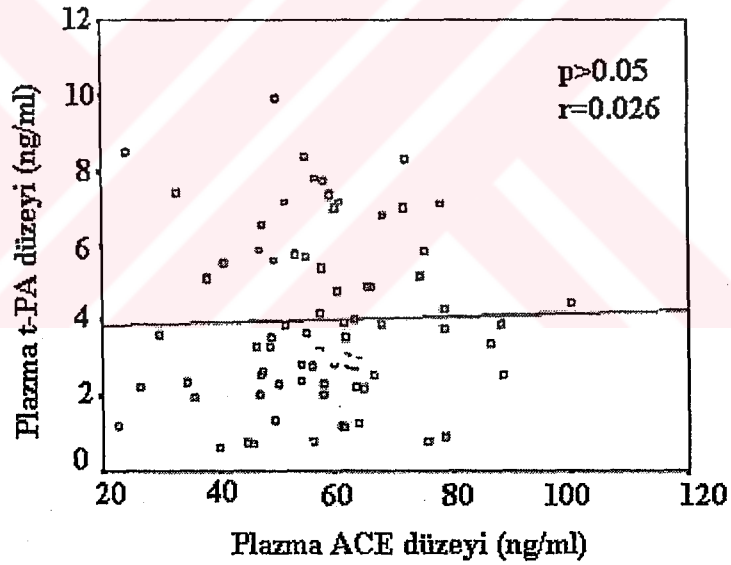
	KAH (+) n:118	Kontrol n:70	P değeri
PAI-1 (ng/ml)	5.26 ± 2.51	4.26 ± 1.82	$p < 0.05$
t-PA (ng/ml)	4.11 ± 2.24	3.39 ± 2.23	$p > 0.05$

5.6. Plazma Anjiyotensin Konverting Enzim Düzeyi ile Plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ve Doku Plazminojen Aktivatör Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

Çalışmaya katılan tüm bireylerin plazma PAI-1 ve ACE düzeyi ile plazma t-PA ve ACE düzeyi arasındaki korelasyon şekil 16 ve 17’de görülmektedir. Plazma PAI-1 ile plazma ACE düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunurken ($p < 0.05$, $r=0.307$) plazma t-PA ile plazma ACE düzeyi arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir ($p > 0.05$, $r=0.026$).



Şekil 16. Plazma PAI-1 ile plazma ACE düzeyi arasındaki ilişki



Şekil 17. Plazma t-PA ile plazma ACE düzeyi arasındaki ilişki

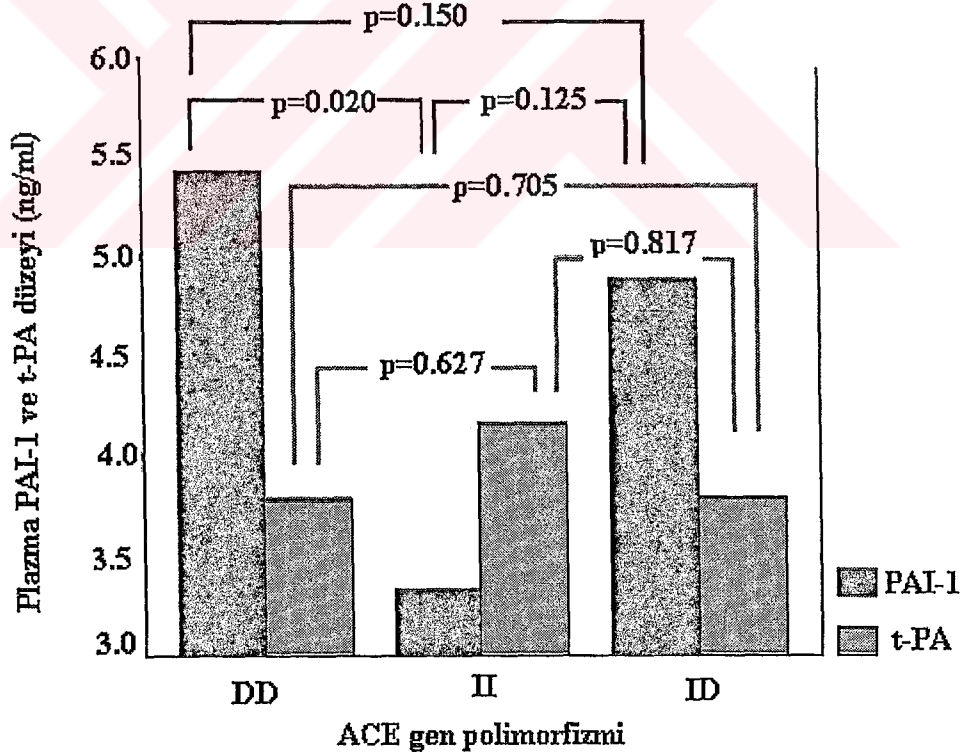
5.7. Plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ve Doku Plazminojen Aktivatör Düzeylerinin Anjiyotensin Konverting Enzim Genotiplerine göre Değişimi

Plazma PAI-1 ve t-PA düzeylerinin ACE gen polimorfizminin genotiplerine göre karşılaştırılması Tablo 8'de gösterilmektedir. Plazma PAI-1 düzeyi DD genotipinde II

genotipi ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yüksek iken ($p < 0.05$), ID genotipi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0.05$). Plazma t-PA düzeyleri açısından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Tablo 8. Çalışmaya Katılan Tüm Bireylerin Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Genotiplerine Göre Plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ve doku Plazminojen Aktivatör Düzeyi

	DD n:76	II n:34	ID n:78
PAI-1 (ng/ml)	5.50 ± 2.18	3.32 ± 2.21	4.75 ± 2.52
t-PA (ng/ml)	3.75 ± 2.31	4.15 ± 2.08	3.96 ± 2.32



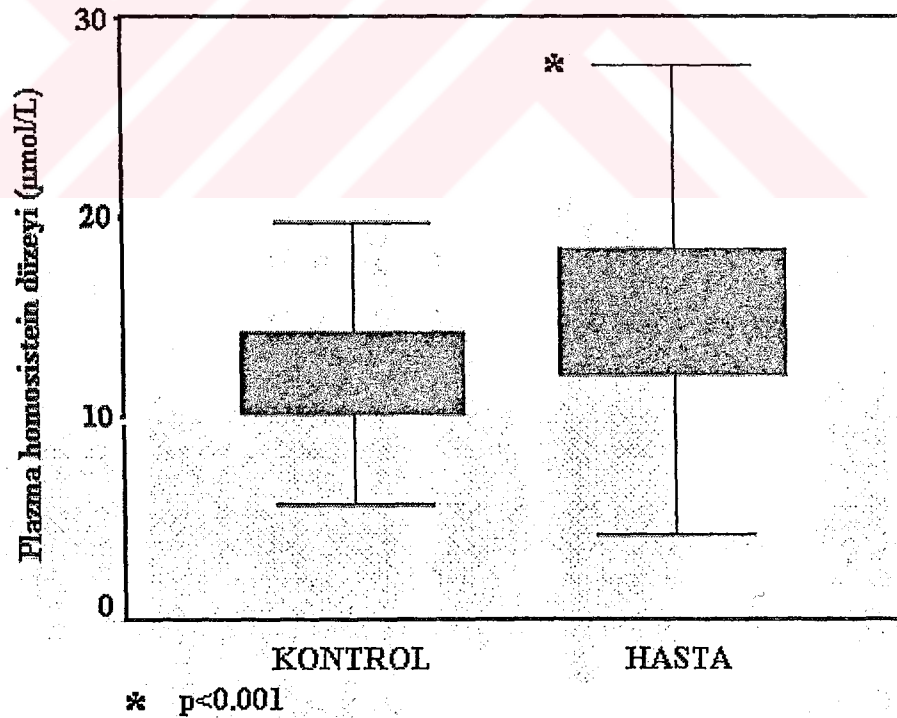
Şekil 18. Plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ve Doku Plazminojen Aktivatör düzeylerinin Anjiyotensin Konverting Enzim genotiplerine göre değişimi

5.8. Plazma Homosistein Düzeyleri

Plazma homosistein düzeyleri koroner arter hastalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında koroner arter hastalarının plazma homosistein düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseklik bulunmuştur ($p < 0.001$) (Tablo 9, Şekil 19).

Tablo 9. Koroner Arter Hastaları ve Kontrol Grubunda Plazma Homosistein Düzeyleri

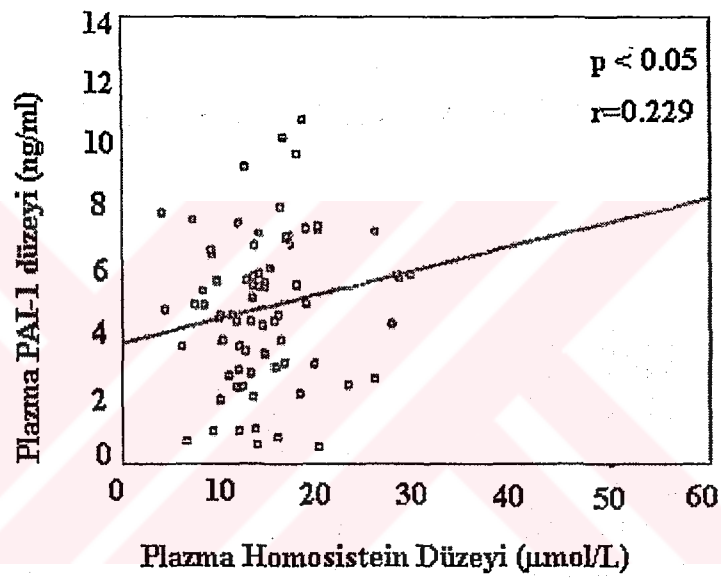
	KAH (+) n:118	Kontrol n:70	P değeri
Homosistein ($\mu\text{mol/L}$)	16.05 ± 7.01	13.05 ± 4.11	<0.001



Şekil 19. Kontrol ve hasta gruplarında plazma homosistein düzeyi

5.9. Plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 ile Plazma Homosistein Düzeyleri Arasındaki İlişki

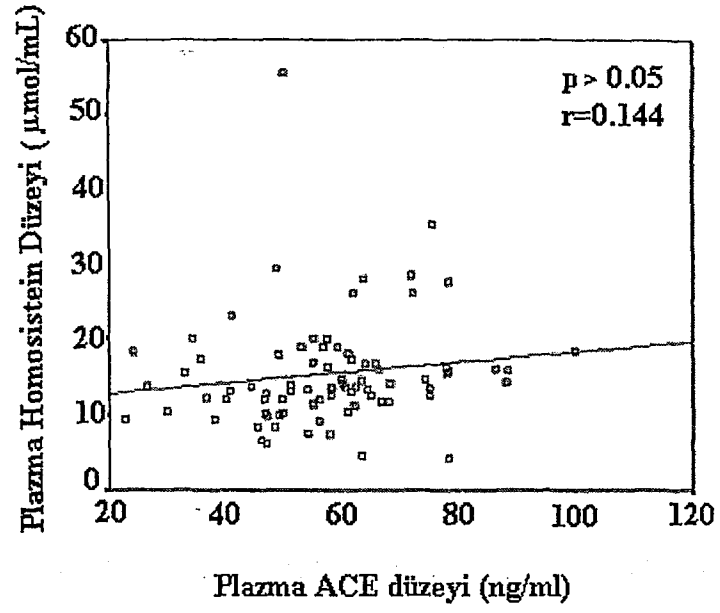
Çalışmaya katılan bireylerin plazma PAI-1 ve plazma homosistein düzeyleri arasındaki korelasyon Şekil 20’de görülmektedir. Plazma PAI-1 ile plazma homosistein düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.05$, $r=0.307$).



Şekil 20. Plazma homosistein düzeyi ile plazma Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 düzeyi arasındaki ilişki

5.10. Plazma Anjiyotensin Konverting Enzim düzeyleri ile Plazma Homosistein Düzeyleri Arasındaki İlişki

Çalışmaya katılan bireylerin plazma ACE düzeyleri ile plazma homosistein düzeyleri arasındaki korelasyon Şekil 21’de görülmektedir. Plazma homosistein ve ACE düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p > 0.05$, $r=0.144$).



Şekil 21. Plazma homosistein düzeyleri ile plazma Anjiyotensin Konverting Enzim düzeyleri arasındaki ilişki

6. TARTIŞMA

Bilinen risk faktörleri ile birlikte ırk ve etnik gruplara bağlı olarak farklılık gösteren genetik faktörler de KAH'nın patogeneğinde önemli bir rol oynar. Kardiovasküler hastalıkların patoloji ve terapisinde biyolojik yaklaşım önemli bir rol oynamakta, hastalık ile DNA (genetik kodu taşıyıcı) ve RNA (çekirdek ve sitoplazma arasında haberci, genetik kod taşıyıcı) gibi proteinler arasında sıkı bir ilişki kurulmaktadır. Her bir gen bir veya birkaç ilişkili protein için kod içermektedir. Klonlamaya ek olarak her bir gen, genin ekspresyon düzeyini kontrol eden düzenleyici DNA sırasına sahiptir. Farklı hücre tiplerindeki genlerin ekspresyonu çeşitli genlerin düzenleyici DNA sırasının nükleer proteinler ile ilişkisine bağlıdır. Bu nükleer proteinler transkripsiyon faktörleri olarak da adlandırılır ve düzenleyici DNA sırasını tanıyabilir, transkripsiyonun düzeyini düzenleyebilir. Örneğin endotel hücrelerinin çekirdeği karaciğer parankimal hücrelerinden farklı transkripsiyon faktörlerini içerir ve sonuç olarak iki tip hücrede farklı genler ve farklı proteinlerin üretimiyle sonuçlanır (105).

1988'de Soubrier ve arkadaşları tarafından insan ACE'nin cDNA'sının sırası saptanmıştır (32). Aynı yıl içinde Cambien ve arkadaşları tek bir polimorfik genin serum ACE aktivitesinin major saptayıcısı olduğunu açıklamışlardır (5). Bu araştırmalardan 2 yıl sonra ACE geninin 16. intronundaki delesyon/insersiyon (D/I) polimorfizminin serum ACE aktivitesi ile yakın ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (56). Rigart ve arkadaşlarının 80 birey üzerinde yaptığı bu çalışmada dolaşımdaki ACE aktivitesinin bireyler arasında gösterdiği varyansın yaklaşık olarak %50'sinin bu polimorfizm ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (56). Ancak ilginç olarak intronik polimorfizm, promotor bölgenin bir parçası değildir. Bu nedenle I/D polimorfizmi ile ACE aktivitesi arasındaki ilişki için en iyi açıklama delesyon alleli ile dolaşımdaki ve doku ACE'nin up-

regülasyonuna yol açan genin diğer varyantları arasındaki bağlantı dengesizliği olmuştur (53). Daha sonra yapılan diğer çalışmalarda da ACE I/D polimorfizmi ile enzim aktivitesi arasındaki ilişki kanıtlanmıştır (106-108). Çalışmamızda ACE aktivitesi ile ACE gen polimorfizmi karşılaştırıldığında; DD genotipine sahip bireylerde ACE aktivitesi II genotipine sahip bireylere göre daha yüksek bulunmuş olup diğer araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalar ile uyumludur ($p < 0.001$). ACE aktivitesi açısından alleller karşılaştırıldığında D alleleline sahip bireylerde ACE aktivitesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

Yapılan çalışmalarda ACE I/D polimorfizmi ile KAH arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır. Cambien ve arkadaşlarının 1992’de yaptığı bir çalışmada MI hikayesine sahip hastalarda ACE DD genotipinin prevalansının arttığı bulunmuştur (4). MI geçirmiş 610 hastayı içeren ECTIM (Etude Cas-Temoins sur l’Infarctus du Myocarde) çalışmasında ACE DD genotip frekansının 733 kişiden oluşan kontrol grubuna göre arttığı bulunmuştur ($p < 0.007$). Anjiyotensin Konverting Enzimi DD genotipi ile MI arasındaki ilişki özellikle düşük vücut kitle indeksine sahip bireylerde ($< 26 \text{ kg/m}^2$) ve düşük apolipoprotein B düzeylerine ($< 125 \text{ mg/dl}$) sahip hastalarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde gösterilmiştir ($p < 0.0001$) (4). Ancak bu bulgular; Lindpainter ve arkadaşlarının 1982 ile 1992 yılları arasında Physician Health Study’in üyeleri arasında yaptığı çalışmadaki bulgular ile tezat oluşturmaktadır (109). Miyokard İnfarktüsü veya KAH’nın diğer bulgularının geliştiği 1250 erkek doktor 2340 kontrol birey ile karşılaştırılmış ancak DD, II veya ID genotipleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (109). Ayrıca Cambien ve arkadaşlarının (4) yaptığı gibi düşük vücut kitle indeksli ve düşük apolipoprotein B

düzeylerine sahip bireylerde de ACE DD genotipi ile MI arasındaki ilişki gösterilmeye çalışılmış ancak MI riskinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (109).

Raynolds ve arkadaşlarının son dönem iskemik kardiomyopati 102 hasta üzerinde yaptığı çalışmada ACE DD genotipinin kontrol grubuna göre daha yüksek frekansa sahip olduğu gösterilmiştir (110). Benzer olarak Evans ve arkadaşlarının 213 ölümle sonuçlanan MI'lı vakalarda yaptığı çalışmada da DD genotipinin frekansının arttığı saptanmıştır (111). Nakai ve arkadaşları ile Kamitani ve arkadaşlarının iskemik kalp hastalığı olan 188 japon bireyde yaptıkları çalışmada DD genotip frekansının önemli ölçüde arttığı bulunmuştur ($p<0.001$) (103,104). Beohar ile Bockxmeer ve arkadaşları da koroner anjioplasti geçiren 389 hastada DD genotipinin sıklığını 474 kontrol ile karşılaştırmış ve DD genotipinin anjioplasti geçiren hastalarda daha sık olduğu gösterilmiştir (114,115). Benzer bulgular Ludwig ve arkadaşlarının anjiyografi ile tanı konulan 159 koroner arter hastalığı olan birey üzerinde yaptığı çalışmada da bulunmuştur (116). Leatham ve arkadaşlarının 216 MI'lı hasta üzerinde yaptığı çalışmada da ACE DD genotip frekansının kontrol grubuna göre önemli bir artış gösterdiği saptanmıştır (117). Bu çalışmada ayrıca serum ACE aktivitesinin MI veya KAH ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

Cambien ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyumlu olmayan ilk çalışma Bohn ve arkadaşları tarafından yapılmış ve 234 MI'lı hastada ACE DD genotipinin frekansının daha düşük olduğu gösterilmiştir (118). Miettinen ve arkadaşları ile Samani ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda MI ile DD genotip frekansı arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır (119,120). ACE D alleli ile KAH arasında ilişkinin olmadığını gösteren bundan başka bir çok çalışma da mevcuttur. Örneğin; Friedl ve arkadaşları ve

Winckelmann ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda da KAH ile ACE genotipi arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı gösterilmiştir (121,122). Katsuya ve arkadaşları da anjiotensinojen M235T genotipi için homozigot olanlarda KAH için yükselmiş bir risk saptamalarına rağmen ACE DD genotipi için böyle bir ilişki gösterilmemiştir (123).

Bu tartışmalı sonuçlar ACE DD genotipinin KAH ile ilişki olup olmadığına dair soruları da beraberinde getirmiştir. Bu amaçla Samani ve çalışma arkadaşları yukarıda belirtilen bir çok çalışmayı da içeren bir meta-analiz uygulamış ve ACE D alleleline sahip bireylerin MI için artmış bir risk taşıdığını göstermişlerdir (124). Yapılan subgrup çalışmaları da bu tartışmalı sonuçları çözmek amacı ile uygulanmıştır. Böylece düşük risk grubuna sahip bireylerde ACE DD genotipinin daha önemli olabileceği vurgulanmıştır. Lindpainter ve arkadaşlarının bulgularına zıt olarak yapılan diğer çalışmalar Cambien ve arkadaşlarının (4) ACE DD genotipinin düşük risk grubunda daha önemli olduğunu saptayan çalışmasını doğrular nitelikte bulunmuştur (116,125-127).

Yapılan çalışmaların birçoğunda erkeklerde ACE DD genotipinin MI ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (4,98,109,127). Bazı çalışmalarda ACE DD genotipinin sadece erkekler için bir risk olduğu vurgulanmışsa da diğer bazı çalışmalarda kadınlar için de önemli olabileceği gösterilmiştir (116, 128).

Miyokard İnfarktüsünde pozitif aile hikayesinin kalıtsal risk faktörleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Tiet ve arkadaşlarının ECTİM çalışmasının üyelerinde pozitif aile hikayesine sahip ölümle sonuçlanan MI olguları üzerinde yaptığı çalışmada ACE DD genotipinin yüksek frekansı gösterilmiştir (129). Aynı biçimde Bohn ve arkadaşları ile Badenhof ve arkadaşları da anne-baba veya büyükanne-büyükbabalarında

MI hikayesi olan çocuklarda yaptıkları çalışmada DD genotipinin yüksek frekansını göstermişlerdir (118,130).

Sadece yapılan birkaç çalışmada MI riski için ACE ve diğer genler arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Tiret ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ACE ve ANG II tip 1 reseptör geni arasında bir sinerjizm bulunmuştur (131). Kamitami ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ACE DD ve anjiyotensinojen TT genotipinin kombinasyonunun MI riskini 11 kat arttırdığı görülmüştür (113). Zıt olarak Katsuya ve arkadaşları da ACE ve anjiyotensinojen genlerini beyaz ırk popülasyonunda çalışmışlar ve RAS'nin bu komponentleri arasında bir ilişki saptayamamışlardır (123).

İlginç bir subgrup çalışması da Diabetes Mellituslu hastalarda yapılmış olan çalışmalardır ve bu çalışmaların tümünde diabetik hastalarda ACE DD genotipini taşıyanların MI için artmış risk taşıdıkları gösterilmiştir (126,132,133). Ek olarak Nomura ve arkadaşları da hemodiyalize giren hastalarda yaptıkları çalışmada ACE DD genotipi taşıyan hastaların MI için yüksek bir risk taşıdığını göstermiştir (134).

Tokgözlü ve arkadaşlarının Türk popülasyonunda ACE gen polimorfizmi ile ilgili olarak yaptıkları geniş kapsamlı bir araştırmada koroner arter hastalığı olan 393 hastanın %35'inde DD, %54'ünde ID ve %11'inde II polimorfizmi saptanmıştır (135). İşbir ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise koroner arter hastalarında ACE D allelinin frekansı %62, I allelinin frekansı ise %37.73 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ACE D allelinin hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ileri sürülmüştür (136). Bizim yaptığımız çalışmada da KAH'na sahip bireylerde DD, II, ID genotip frekansları sırasıyla % 43.2, % 12.7 ve % 44.1 olup allellerin frekansı D alleli için %65,3, I alleli için ise %34,7 olarak bulunmuştur. KAH'na sahip bireylerde

D alleli frekansı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

Yapılan çalışmaların sonuçlarındaki bu farklılıklar seçilen hasta ve kontrol grubundaki bireylerin kriterlerindeki farklılıklar ve incelenen bireylerdeki etnik kökenlerin farklılıklarına bağlanmıştır.

I/D polimorfizminin intronik olmasından dolayı bu polimorfizmin hastalığa sebep olan bir mutasyon olması muhtemel değildir. Bu durum, ancak ACE geninden başka bir yerde bulunduğu farz edilen patogenetik bir mutasyon ile bağlantı dengesizliği içinde olması ile açıklanmıştır.

‘Vasküler veya endotel’ hipotezine göre ACE polimorfizmi vasküler düzeyde rol oynar. Artmış vasküler enzim konsantrasyonu ile ilişkili olarak D alleli; ANG II’nin oluşumunda ve bradikininin yıkılmasında bir lokal artışa yol açar. Bu da neointimal proliferasyonda, hücresel matriks oluşumunda ve vazospazmda bir artış ile sonuçlanır. ‘Miyokardial’ hipotez ise D alleli ile kardiyak hipertrofi arasındaki ilişkiyi açıklayan bir alternatif hipotezdir. ACE; kalpte, fibroblastlar veya diğer interstisyel hücreler tarafından ekspresse edilir ve ANG II’nin dokusal oluşumu için önemlidir (137,138). Büyümeyi ilerletici etkilerinin yanı sıra ANG II, vazokonstriksiyona sekonder oluşan aritmilere karşı miyokardiyumu daha kolay etkilenir hale getiren adrenerjik sistemi de içeren otokrin/parakrin düzenleyici mekanizmalarda da rol alır. ACE polimorfizminin kardiovasküler hastalıklar üzerinde direk etkileri olan başka bir gen ile birlikte bir genetik marker olması da başka bir hipotezdir (139).

Yüksek ACE, hasarlanmış dokunun tamirini düzenlemede, neoplaziye, enfeksiyona karşı direnci arttırmada ve antijen tanımada etkilidir. DD genotipinin

yaşlanmış nöronlarda faydalı etkileri olabilir. DD genotipi veya yüksek ACE konsantrasyonları ölüm oranları üzerinde etkili olabilen diğer genetik lokuslar üzerindeki diğer polimorfizmler ile ilişkili olabilir (140). ACE; kolleteral kan damarlarının gelişiminde etkilidir ve ACE aktivitesi veya ACE gen polimorfizmi de ayrıca kolleteral kan dolaşımı ile de ilişkili olabilir (141).

Plazminojen aktivatör sistem, intravasküler trombozise karşı en önemli defans mekanizması olup bu sistemde herhangi bir bozukluk iskemik kardiovasküler olayların artmış riski ile ilişkilidir. Fibrinolitik denge büyük ölçüde RAS'nin kontrolü altında olup fibrinolitik aktivite primer olarak t-PA ve PAI-1'in düzeyleri arasındaki denge ile düzenlenir. ACE; Anjiyotensin I'i Anjiotensin II'e çevirir. Anjiyotensin II ise ardından Anjiyotensin 4'e dönüşür. Anjiyotensin 4, PAI-1'in endotelial hücrelerden üretimini AT₄ reseptörleri aracılığı ile artırır. Yine ACE; t-PA üretimini bradikinin yıkılımını artırarak azaltır. Sonuç olarak, artmış ACE aktivitesi; bradikinin yıkımını ve anjiyotensin I'in anjiyotensin II'e dönüşümünü sağlayarak teorik olarak t-PA düzeyini azaltıp PAI-1 düzeyini artırabilir. Bu mekanizma için kanıtlar ACE inhibitörlerinin PAI-1 antijen düzeylerini, aktivitesini ve PAI-1 / PA oranını azalttığını gösteren *in vivo* çalışmalardan sağlanmıştır (142,101).

İnsanlarda *in vivo* artmış bradikinin yıkılımı ile ACE D alleli arasındaki ilişki Murphey ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (143). t-PA salınımı için potansiyel bir stimulus olan bradikininin ACE ile yıkımı bradikininin inaktif metaboliti olan bradikinin 1-5'in (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe) bradikinine oranı ile ölçülmüştür. Bu oran en fazla ACE DD genotipine sahip bireylerde görülürken, II genotipine sahip bireylerde en az, heterozigotlarda (ID) ise ara bir seviyede olup D allelinin bradikinin metabolizmasında önemli etkileri vurgulanmıştır. Bradikinin konsantrasyonu ACE II

genotipine sahip bireylerde yüksek bulunmasına rağmen bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Nakamura ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı çalışmada ratlarda ANG II'nin PAI-1 ekspresyonuna güçlü etkileri gösterilmiştir (101). Anjiyotensin II'nin, PAI-1 ekspresyonunun artışı kalpte 5 kat, böbrekte 10 kat, aortada 10 kat ve karaciğerde 30 kat indüklediği saptanmıştır.

Margaglione ve arkadaşlarının (144) yaptığı bir çalışmada ACE I/D polimorfizmi ile PAI-1 4G/5G polimorfizmleri ve bunların PAI-1 antijen düzeylerine etkileri çalışılmıştır. DD genotipinde plazma PAI-1 antijen düzeyi II genotipi ile karşılaştırıldığında, DD genotipinde plazma PAI-1 antijen düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte bir artış bulunmuştur.

ACE I/D polimorfizminin D alleli plazma ACE'sinin immünoreaktif düzeyi ve aktivitesi ile ilişkilidir. ACE'nin kardiovasküler sistemi birçok yerden ve birçok basamaktan etkilediği bilinmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada ACE geni için homozigot delesyon genotipine sahip bireyler (DD), homozigot insersiyon (II) genotipine sahip bireyler ile karşılaştırıldığında PAI-1'in düzeyinin DD genotipinde daha yüksek olduğu, ID genotipinde ise ara düzeyde olduğu görülmüştür (PAI-1 düzeyleri açısından DD> ID> II). Sonuç olarak çalışmamızda ACE geninin I/D polimorfizminin plazma PAI-1 düzeyi ile ilişkili olduğu bulunmuş olup bu da muhtemelen DD genotipinde artmış ACE aktivitesinin artmış PAI-1 düzeyi ile ilişkisinden kaynaklanmaktadır. Ancak bizim çalışmamızda plazma t-PA düzeyi ile ACE genotipleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Kardiyovasküler hastalıkların etiyolojisinde önemli diğer bir faktör de yükselmiş plazma homosistein düzeyi olup bir çok çalışmada yüksek plazma homosistein

düzeylerinin kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (64,145,146). Koroner arter hastalarında anormal homosistein metabolizması ilk olarak 1976 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (147). 1990'lı yıllara kadar koroner arter hastalarında homosisteinin rolü üzerine yapılmış birkaç çalışma vardır (87,103). 1990'lardan sonra ise homosisteinin koroner arter hastalığına etkisi üzerine yapılan çalışmalarda bir artış gözlenmektedir (145,146,148-151).

2000 hastayı içeren 20 vaka-kontrol çalışmasından elde edilen epidemiyolojik kanıtlarda yükselmiş plazma homosistein konsantrasyonunun aterosklerozis ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (64,150). Physicians' Healty Study'in aterosklerozis olup olmadıkları bilinmeyen 14.919 erkek doktorda yaptıkları bir çalışmada homosistein düzeyleri ölçülmüş ve normalin %12'sinden yüksek homosistein düzeylerine sahip bireylerde MI riskinde 3 kat bir artış saptanmıştır (150). Tromso (152) tarafından yapılan çalışma ve diğer prospektif çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (153). Finlandiyada yapılan bir çalışmada ise homosisteinin MI ve inme ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (154). Boushey ve arkadaşlarının 4000 hastayı içeren 27 çalışmanın derlemesinden oluşturdukları bir çalışmada homosisteinin koroner, serebral ve periferel damarlarda aterosklerozis için bir risk olduğu sonucuna ulaşılmıştır (145). Meta-analizi kullanarak yaptıkları bu çalışmada genel popülasyonda koroner arter hastalığı riskinin %10'unun homosisteine bağlı olduğunu ve plazma homosistein konsantrasyonunda her 5 $\mu\text{mol/L}$ bir artışın koroner arter hastalığı riskini kolesterol konsantrasyonunda her 20 mg/dl artışı kadar arttırdığı bulunmuştur.

Anjiyografik olarak koroner arter hastalığı tanısını alan 587 hastayı içeren bir prospektif çalışmada başlangıç homosistein düzeyleri ölçülmüş ve ortalama 4.6 yıl boyunca takip edilmiştir (155). Bu çalışmada plazma homosistein konsantrasyonunda 15 $\mu\text{mol/L}$ üzerindeki değerler ile mortalite arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur. 15 $\mu\text{mol/L}$ ve üzeri homosistein konsantrasyonu 10 $\mu\text{mol/L}$ homosistein konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında ise mortalite oranı 1.6 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda; koroner arter hastalarında ve kontrol grubunda plazma homosistein düzeyleri sırasıyla 16.05 ± 7.0 $\mu\text{mol/L}$ ve 13.0 ± 4.11 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Koroner arter hastalarının homosistein düzeyi sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında görülen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).

Endotelial hücre disfonksiyonu veya hasarı, aterosklerozis'in hasar hipotezi ile ilişkilidir (156). Homosistein endotel hücreleri üzerine toksik olup endotel hücre hasarı homosistein tarafından üretilen serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile olabilir (157,158). Homosisteinin sülfidril gruplarının demir ve bakır iyonları ile birlikte oksidasyon sisteminde hidrojen peroksit, serbest oksijen radikalleri ve homosistein radikalleri oluşturmak üzere katalitik olarak etkili olduğuna inanılmaktadır. Bakır iyonları varlığında hücre kültür ortamında homosistein, muhtemelen tiol oto-oksidasyonu aracılığı ile oluşan oksijen radikalleri nedeni ile hücrelere direk toksiktir (159). Homosistein plazmada disülfidler ve homosistein tiolaktat oluşturmak üzere hızla oto-oksidasyona uğrar (160,161). Süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit homosisteinin oto-oksidasyonu sırasında üretilir ve hidrojen peroksidin hiperhomosisteineminin vasküler hasarında etkili olduğu belirtilmiştir (162). Homosisteininin neden olduğu endotel hücre hasarı büyük ölçüde hidrojen peroksidin

oluşumuna bağlıdır. Homosisteinin oto-oksidasyonu süperoksit anyon, hidroksil radikalleri gibi diğer sitotoksik oksijen radikallerinin üretimine de neden olur (163).

Homosisteinin tek başına veya bakır ile birlikte toksik etkileri lipid peroksidasyonunda artış ile ilişkilidir. Homosistein, LDL'nin (düşük dansiteli lipoprotein) oksidasyonu aracılığı ile de vasküler hasara yol açabilir (164). Bir çok çalışmada homosistein gibi sülfür içeren aminoasitlerin geçiş metalleri varlığında (demir veya bakır) LDL'nin oksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (164-166).

Homosistein sadece oksijen radikalleri üretimine aracılık ederek değil ayrıca antioksidan kapasiteyi azaltarak da endotel hasarına neden olabilir. Metiyonin'in neden olduğu aterosklerozis oluşturulan tavşanlarda plazma antioksidan enzimlerinde [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px)] bir azalma görülmüştür (88).

Homosistein aterosklerozise nitrik oksit aracılığı ile de neden olabilir. NO, oksijen varlığında homosistein ile birlikte S-nitroso-homosistein oluşturur (167). Homosisteinin sülfidril gruplarının nitrozasyonu hidrojen peroksidin sülfidril bağımlı oluşumunu inhibe eder. S-nitroso-homosistein potent bir vazodilatatör ve anti-platelet'dir (168). NO'nin koruyucu etkileri, homosisteinin endotelyumu NO üretimini kısıtlayarak hasar oluşturması ile azaltılır. Bu modele göre vasküler hasara disfonksiyonel endotelyumdan NO üretimi ile homosistein düzeyleri arasındaki dengenin bozulması yol açar.

Homosistein, aterosklerozisin gelişimine düz kas hücre proliferasyonuna neden olarak da aracılık edebilir. Homosisteinin hücre kültürlerinde damar düz kas hücrelerinin proliferasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (169).

Bunlara ek olarak araştırmacılar tarafından düz kas hücrelerinin platelet aracılı proliferasyonunun hiperhomosisteineminin aterojeniteye yol açmasında bir potansiyel hücrel mekanizma olduğu gösterilmiştir. Homosistein, endotel hücrelerine direk toksik etki göstermesinin yanısıra endotelyumun anti-trombotik özelliklerini de değiştirir. Her ne kadar veriler prostasiklinin (PGI₂) sentezinin homosistein ile inkübe edilen endotel hücreler tarafından sentez edildiğini gösterse de bu, homosisteinin bu hücrelerin platelet agregasyonunu inhibe etme yeteneğini (muhtemelen nitrik oksit üretimini azaltma yolu ile) bozması ile elde edilen veriler ile tezat oluşturmaktadır. (170). Monositlerin homosisteine maruz kalması, doku faktörü (TF) ekspresyonunu indükler ve endotel hücrelerin homosisteine maruz kalması TF ekspresyonunu ve FV'in FVa'a aktivasyonunu artırır, böylece trombin oluşumu ile koagülasyon kaskadının başlayıp ilerlemesini sağlar (171). Fibrinolitik süreç ile ilgili olarak homosisteinin varlığında endotel hücre yüzeyinde t-PA bağlanma ve aktivasyonunun bozulması endotel bağımlı fibrinolizisi inhibe eder (172). Bütün bu gözlemler hiperhomosisteineminin trombogenezise yol açtığını gösterir.

Ayrıca yaptığımız çalışmada plazma homosistein düzeyi ile plazma PAI-1 düzeyi arasında da pozitif bir ilişki bulunmuş olup ($p<0.05$) bu pozitif ilişkisini nedeni de muhtemelen homosisteinin doku plazminojen aktivatörünün endotelyuma bağlanmasını bozmasına ve böylelikle aterosklerozisin patogeneze katkıda bulunmasına bağlıdır. Homosisteinin yüksek düzeyleri PAI-1 sentezini artırarak homeostatik dengenin trombotik yönde bozulmasına yol açar.

Homosistein ile PAI-1 arasındaki pozitif ilişkiyi gösteren başka bir yayın da Kural ve arkadaşlarının psöriazisli hastalarda yaptıkları çalışmada da görülmektedir

(173). Midorikawa ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada da insan vasküler endotelial ve düz kaslarında homosisteinin PAI-1'in mRNA ekspresyonunu ve salınımını stimüle ettiği gösterilmiştir (174). Başka çalışmalarda da plazma homosistein konsantrasyonlarının plazma PAI-1 antijen düzeyleri ile ilişkili olduğu ve homosisteinin t-PA reseptör aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (172, 175, 176).

Homosistein endotel hücrelerinin platelet agregasyonunu inhibe etme özelliğini muhtemelen nitrik oksit üretimini azaltma aracılığı ile sağlar. Bizim çalışmamızda plazma ACE düzeyi ile plazma homosistein düzeyi arasında bir korelasyon gösterilememiştir ($p>0.05$). Ancak ACE inhibitörlerinin alımının aterosklerotik hastalıkların insidansını azalttığı bilinmektedir. Anjiyotensin II oluşumunun supresyonu, bradikinin yıkımının inhibisyonu veya diğer mekanizmalar aracılığı ile ACE inhibitörleri, koroner arterlerin endotelial nitrik oksit aracılı vazodilatasyonunu düzeltir (177,178). Nitrik oksit ACE inhibitörlerinin etkisinde önemli bir role sahiptir. ACE inhibitörlerinin, hiperhomosisteinemisinin indüklediği düz kas hücre hiperplazisi ve migrasyonunu engellediği gösterilmiştir. Bu da düz kas hücre hiperplazisine yol açan ANG II'nin oluşumunu azaltmasına, kinin veya nitrik oksitlerin büyümeyi durdurucu etkisini arttırmaları nedeni ile açıklanmıştır (179,180).

Sonuç olarak;

1. Koroner Arter Hastalarında D alleli frekansı sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. DD genotipine sahip bireylerde ACE düzeyi en yüksek olup II genotipine sahip bireylerde en düşük, ID genotipine sahip bireyler de ise ara düzeydedir.

2. Plazma PAI-1 düzeyi koroner arter hastalarında yüksek olup, ACE geninin I/D polimorfizmi ile de ilişkili bulunmuştur. DD genotipine sahip bireylerde PAI-1

düzeyinin daha yüksek olması da muhtemelen DD genotipinde artmış ACE aktivitesi ile ilişkilidir.

3. ACE geninin I/D polimorfizmi ile serum lipidleri arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır.

4. Plazma homosistein düzeyindeki yükseklik KAH ile yakından ilişkilidir.

5. Plazma homosistein düzeyi ile plazma PAI-1 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif korelasyon bulunmaktadır.

Bu çalışmada; koroner arter hastalığı ile Anjiyotensin Konverting Enzim gen polimorfizmi ve bu polimorfizmin koroner arter hastalığı risk faktörleri ile ilişkisi açıklanmaya çalışılmıştır. Yakın bir gelecekte genetik faktörlerin saptanması ve bu faktörlerin diğer risk faktörleri ile ilişkisinin belirlenmesi özellikle koroner arter hastalığının gelişimi için yüksek risk taşıyan hastaların belirlenmesine imkan sağlayacaktır. Ayrıca genetik faktörlerin belirlenmesinin; bilinen klinik biyokimya test parametreleri ile birlikte çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinin daha spesifik olarak yapılmasına neden olacağı düşünüldüğünden konu ile ilgili daha fazla çalışmanın yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- 1) Marian AJ. Genetic markers: genes involved in atherosclerosis. *J Cardiovasc Risk*. 1997; 4:333-9.
- 2) Castelli W.P. Lipids, risk factors and ischaemic hearth disease. *Atherosclerosis* 1996;124 Suppl.: S1-S9.
- 3) Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human Angiotensin 1 converting enzyme gene (DCPI). *Nucleic Acids Res*. 1992; 20:1433.
- 4) Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, et al. Deletion polymorphism in the gene for anjiotensin-convering enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359:641-44
- 5) Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakatovao R, Gonzales MF, et al. Familial resemblance of plazma Angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. *Am J Hum Gener*. 1988; 43:774-780.
- 6) Britton S, Di Salvo J. Effects of Angiotensin I and Angiotensin II on hindlimb and coronary vascular resistance. *Am J Physiol* 1973;225:1226-31.
- 7) Wilcken DE, Wang XL, Sim AS, McCredie RM. Distribution in healthy and coronary populations of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C667T mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:878-82.
- 8) Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res*. 1999;85:643-650.
- 9) Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*.1990;70:1067-1116.
- 10) Johnston CI, Risvanis J. Preclinical pharmacology of Angiotensin II receptor antagonists: update and outstanding issues. *Am J Hypertens*. 1997;10:306S-310S.
- 11) Bernstein KE, Berk BC. The biology of Angiotensin II receptors. *Am J Kidney Dis* 1993;22:745-754.
- 12) Danser AH, Schalekamp MA. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart* 1996; 76 (Suppl. 3):28-32.
- 13) Dzau VJ. Cell biology and genetics of Angiotensin in cardiovascular disease. *J Hypertens Suppl* 1994; 12:S3-10.
- 14) Stroth U, Unger T. The renin-Angiotensin system and its receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33 (Supl. 1):S21-8

- 15) Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW. The Angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol* 1995;16:23-52.
- 16) Kerins DM, Hao Q, Vaughan DE. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *F Clin Invest* 1995;96:2515-20.
- 17) Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by Angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83:1419-24.
- 18) Itah H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to Angiotensin II. *J Clin Invest* 1993;91:2268-74.
- 19) Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to Angiotensin II. *J Clin Invest* 1992; 90:456-61.
- 20) Khairallah PA. Action of Angiotensin on adrenergic nerve endings: inhibition of norepinephrine uptake. *Fed Proc* 1972;31:1351-7.
- 21) O'Kane KPJ, Webb DJ, Collier JG, Vallance PJT. Local $-L-N^G$ -mono-methyl-arginine attenuates the vasodilator action of bradykinin in the human forearm. *Br J Clin Pharmacol* 1994;38:311-5.
- 22) Mombouli JV, Illiano S, Nagoo T, Scott Burden T, Vanhoutte PM. Potentiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by Angiotensin-I converting enzyme inhibitors in canine coronary arteries involves both endothelium derived relaxing and hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1992;71:137-44.
- 23) Barrow SE, Dollery CT, Heavey DJ, Hickling NE, Ritter JM, Mial J. Effect of vasoactive peptides on prostacyclin synthesis in man. *Br J Pharmacol* 1986; 87:243-7.
- 24) Erdös EG, Skidgel RA. The Angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 1987;56:345-8.
- 25) Rousseau- Plasse A, Lenfant M, Potier P. Catabolism of the hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro: a new insight into the physiological role of the angiotensin I-converting enzyme N-active site. *Bioorg Med Chem* 1996; 4:1113-9.
- 26) Skidgel RA, Erdös EG. Novel activity of human angiotensin I-converting enzyme: release of the NH_2 - and $COOH$ -terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:1025-9.

- 27) Ramchandran R, Sen I. Cleavage of Angiotensin converting enzyme by a membrane-associated metalloprotease. *Biochemistry* 1995; 34:12645-52.
- 28) Hooper MN. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. *Int J Biochem* 1991; 23:641-7.
- 29) Krulewitz AH, Fanburg BL. Stimulation of bovine endothelial cell Angiotensin I-converting enzyme activity by cyclic AMP-related agents. *J Cell Physiol* 1986;129:147-50.
- 30) Velletri PA. Testicular angiotensin I-converting enzyme. *Life Sci* 1985;36:1597-608.
- 31) Baudin B, Alves N, Pilon A, Bèneteau-Burnat B, Giboudeau J. Structural and biological roles of glycosylations in pulmonary Angiotensin I-converting enzyme. *Glycobiology* 1997;7:565-70.
- 32) Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85:9386-90.
- 33) Alhenc-Gelas F, Soubrier F, Hubert C, Allegrini J, Lattion AL, Corvol P. The Angiotensin I-converting enzyme (kininase II): progress in molecular and genetic structure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;15 (Suppl.6):S25-S29.
- 34) Bernstein KE, Martin BM, Edwards AS, Berstein EA. Mouse Angiotensin I-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J Biol Chem* 1989;264:11945-51
- 35) Baudin B, Mario N, Gaba S, Giboudeau J. Spectroscopic studies on Angiotensin I-converting enzyme. *Enzym Protein*. 1994-5; 48:265-74.
- 36) Ehlers MRW, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF. Molecular cloning of human testicular angiotensin I-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin I-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:7741-5.
- 37) Ramchandran R, Sen I. Cleavage of angiotensin converting enzyme by a membrane-associated metalloprotease. *Biochemistry* 1995;34:12645-52.
- 38) Parvathy S, Karran EH, Turner AJ, Hooper NM. The secretases that cleave Angiotensin converting enzyme and amyloid precursor protein are distinct from tumour necrosis factor-alpha convertase. *FEBS Lett*. 1998;431:63-5.
- 39) Bull HG, Thornberry NA, Cordes EH. Purification of angiotensin converting enzyme from rabbit lung and human plasma by affinity chromatography. *J Biol Chem*. 1985;260:2963-72.

- 40) Santhamma KR, Sen I. Specific cellular proteins associate with angiotensin I-converting enzyme and regulate its intracellular transport and cleavage-secretion. *J Biol Chem.* 2000; 275:23253-8.
- 41) Kost OA, Bovin NV, Chemodanova EE, Nasonov VV, Orth TA. New feature of Angiotensin-converting enzyme: carbohydrate-recognizing domain. *J Mol Recognit.* 2000;13:360-9.
- 42) Schwager SL, Chubb AJ, Scholle RR, Brandt WF, Mentele R, Riordan JF, et al. Modulation of juxtamembrane cleavage (shedding) of angiotensin converting enzyme by stalk glycosylation: evidence for an alternative shedding protease. *Biochemistry* 1999;38:10388-97.
- 43) Beneteau-Burnet B, Baudin B. Angiotensin-converting enzyme: clinical applications and laboratory investigations on serum and other biological fluids. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1991;28:337-56.
- 44) Chiu AT, Ryan JW, Ryan US. A sensitive radiochemical assay for angiotensin-converting enzyme (kininase II). *Adv Exp Med Biol.* 1986;198A:427-33.
- 45) Lanzillo JJ, Fanburg BL. Development of competitive enzyme immunoassays for human Angiotensin I-converting enzyme: a comparison of four assay configurations. *Anal Biochem* 1982;126:156-64.
- 46) Alhenc-Gelas F, Weare JA, Johnson RL, Erdos EG. Measurement of human converting enzyme level by direct radioimmunoassay. *J Lab Clin Med.* 1983;101:83-96.
- 47) Farber HW, Center DM, Rounds S, Danilav SM. Components of the Angiotensin system cause release of a neutrophil chemoattractant from cultured bovine and human endothelial cells. *Eur Heart J.* 1990;11(suppl B):100-7.
- 48) Keidar S, Brook JG, Aviram M. Angiotensin II enhanced lipid peroxidation of low-density lipoprotein. *J Am Physiol Soc.* 1993;8:245-8.
- 49) Finta KM, Fischer MJ, Lee L, Gordon D, Pitt B, Webb RC. Ramipril prevents impaired endothelium-dependent relaxation in arteries from rabbits fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis* 1993; 100: 149-56.
- 50) Lind L, Lithell H, Wide L, Ljunghall S. Metabolic cardiovascular risk factors and the renin-aldosterone system in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 1992;6:27-9.
- 51) Chobanian AV, Haudenschild CC, Nickerson C, Drago R. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension.* 1990; 15:327-31.

- 52) Dzau V, Pratt R. Renin-Angiotensin system. In: Fozzard HA, Haber HE, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, editors. *The Heart and Cardiovascular System*. New York; Raven Pres: 1991;p.1817-50.
- 53) Tiret L, Rigat B, Visvikis S. Evidence from combined segregation and linkage analysis that a variant of ACE gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet*. 1992;51:197-205.
- 54) Mattei M, Hubert C, Ahlenc-Gelas F, Roeckel N, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin I converting enzyme gene is on chromosome 17. *Cytogenet Cell Genet*. 1989;51:1041-4.
- 55) Foy CA, Rice GI, Ossei-Gerning N, Manfield MW, Grant PJ. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in patients characterized by coronary Angiography. *Hum Genet*. 1997;100 (3-4):420-5.
- 56) Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990;86:1343-6.
- 57) Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. ACE in human circulating mononuclear cells:genetic polymorphism of expression in T lymphocytes. *Biochem J*. 1993 ;290:33-40.
- 58) Walker WG, Whelton PK, Saito H, Russell RP, Herman J. Relation between blood pressure and renin, renin substrate, angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension*. 1979;1: 287-91.
- 59) Malik FS, Lavie CJ, Mehra MR, Milani RV, Re RN. Renin-angiotensin system: Genes to bedside. *Am Heart J*. 1997;134:514-26.
- 60) Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation* 1993; 87:1969-73.
- 61) Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228–237.
- 62) Selhub J and Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: Interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr*. 1992; 55:131–138
- 63) Fowler B. Disorders of homocysteine metabolism. *J Inherited Metab Dis*. 1997;20:270–285.

- 64) Ueland PM and Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: Plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989;114:473–501.
- 65) Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;37:1–31.
- 66) Kluijtmans LA, Van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996;58:35–41.
- 67) Ou T, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T, Amemiya H, Fujiwara H, Kawata K, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphism are independent risk factors for coronary heart disease in Japanese: A case-control study. *Atherosclerosis* 1998;137:23–8.
- 68) Adams M, Smith PD, Martin D, Thompson JR, Lodwick D, Samani NJ. Genetic analysis of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for myocardial infarction. *QJM*. 1996;89:437–44.
- 69) Wilcken DE, Wang XL, Sim AS, McCredie RM. Distribution in healthy and coronary populations of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:878–82.
- 70) Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10 : 111–13 .
- 71) Malinow MR, Nieto FJ, Kruger WD, Duell PB, Hess DL, Gluckman RA et al. The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1157–62 .
- 72) Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. *Circulation* 1996;94:1812–4.
- 73) van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044–51.
- 74) Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169–72.

- 75) Kang SS, Wong PW, Norusis M. Homocysteinaemia due to folate deficiency. *Metabolism*. 1987;36:458–62.
- 76) Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270:2693–98.
- 77) Bostom AG, Lathrop L. Homocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int*. 1997;52:10–20.
- 78) Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinants for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 1994; 96:239–46.
- 79) Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 1996;94:2013–20.
- 80) Visy JM, Le Coz P, Chadeaux B, Fressinaud C, Woimant F, Marquet J, et al. Homocystinuria due to 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase deficiency revealed by stroke in adult siblings. *Neurology* 1991;41:1313–5
- 81) McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111–28.
- 82) Langman LJ, Cole DE. Homocysteine. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999; 36:365–406.
- 83) Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J. Am. Coll. Cardiol*. 1990;15: 1667–1687.
- 84) de Jong SC, van den Berg M, Rauwerda JA, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia and atherothrombotic disease. *Semin Thromb. Hemost.* 1998; 24: 381–385.
- 85) Rolland PH, Friggi A, Barlatier A, Piquet P, Latrille V, Faye MM, et al. Hyperhomocysteinemia induced vascular damage in the minipig. Captopril-hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. *Circulation*. 1995;91: 1161–1174.
- 86) Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin. Investig*. 1996;98: 24–29.
- 87) Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin. Investig*. 1996;98: 5–7.

- 88) Toborek M, Kopieczna-Grzebieniak E, Drozd M, Wieczorek M. Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1995;115:217–224.
- 89) Fortin LJ, Genest J Jr. Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis. *Clin. Biochem.* 1995;28: 155–162.
- 90) Stamm EB, Reynolds RD. Plasma Total Homocyst(e)ine May Not Be the Most Appropriate Index for Cardiovascular Disease Risk. *J. Nutr.* 1999;129: 1927–1930.
- 91) Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J: Type 1 plasminogen activator inhibitor. *Prog Hemost Thromb* 1989;9:87–115.
- 92) Higgins DL, Vehar GA: Interaction of one-chain and two-chain tissue plasminogen activator with intact and plasmin-degraded fibrin. *Biochemistry* 1987;26:7786–7791.
- 93) Wagner OF, de Vries C, Hohmann C, Veerman H, Pannekoek H: Interaction between plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) bound to fibrin and either tissue-type plasminogen activator (t-PA) or urokinase-type plasminogen activator (u-PA). Binding of t-PA/PAI-1 complexes to fibrin mediated by both the finger and the kringle-2 domain of t-PA. *J Clin Invest* 1989;84:647–655.
- 94) Brown NJ, Agirbasli M, Vaughan DE. Comparative effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on plasma fibrinolytic balance in humans. *Hypertension* 1999;34:285–290.
- 95) Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse pro-teins: evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001;276: 33293-6.
- 96) Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, et al. Plasminogen Activator Inhibitor 1: Physiological and Pathophysiological Roles. *News Physiol Sci* 2002;17: 56-61.
- 97) Lawrence D, Strandberg L, Grundstrom T, Ny T. Purification of active human plasminogen activator inhibitor 1 from *Escherichia coli*. Comparison with natural and recombinant forms purified from eucaryotic cells. *Eur J Biochem* 1989 ;186: 523-533.
- 98) Hekman CM and Loskutoff DJ. Kinetic analysis of the interactions between plasminogen activator inhibitor 1 and both urokinase and tissue plasminogen activator. *Arch Biochem Biophys* 1988;262: 199-210

- 99) Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE: Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of Angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation* 1993;87:1969–1973.
- 100) Brown NJ, Gainer JV, Stein CM, Vaughan DE: Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature. *Hypertension* 1999;33:1431–1435.
- 101) Nakamura S, Nakamura I, Ma L, Vaughan DE, Fogo AB: Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the Angiotensin type 1 receptor in vivo. *Kidney Int* 2000;58:251–259.
- 102) Baylis C, Mitruka B, Deng A: Chronic blockage of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992;90:278–281.
- 103) Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R: Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992;20:298–303.
- 104) Prof. Dr. Kazım Özdamar. Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi. 4. baskı, Eskişehir: ETAM A.Ş Matbaa tesisleri , 2002:358-364, 481-501.
- 105) Doevendans PA. The human genome project is ready for us, but are we ready for the human genome project. *Cardiologie* 1998;5:595–9.
- 106) Harrap SB, Davidson HR, Connor JM, Soubrier F, Corvol P, Fraser R, et al. The Angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 1993;21:455–460
- 107) Cambien F, Costerousse O, Tiret L, Poirier O, Lecerf L, Gonzales MF, et al. Plasma level and gene polymorphism of Angiotensin converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 1994;90:669–676
- 108) Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensin converting enzyme in the human heart: Effects of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995;92:1388–1389.
- 109) Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, et al. A prospective evaluation of an Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995;332:706–711.

- 110) Raynolds MV, Bristow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, et al. Angiotensin converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1993;342:1073–1075.
- 111) Evans AE, Poirier O, Kee F, Lecerf L, McCrum E, Falconer T, et al. Polymorphisms of the Angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease. *Q J Med* 1994;87:211–214.
- 112) Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, et al. Deletion polymorphism of the Angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 1994;90:2199–2202.
- 113) Kamitani A, Rakugi H, Higaki J, Ohishi M, Shi SJ, Takami S, et al. Enhanced predictability of myocardial infarction in Japanese by combined genotype analysis. *Hypertension* 1995;25:950–953.
- 114) Beohar N, Damaraju S, Prather A, Yu QT, Raizner A, Kleiman NS, et al. Angiotensin-I converting enzyme genotype DD is a risk factor for coronary artery disease. *J Investig Med* 1995;43:275–280
- 115) Bockxmeer FM, Mamotte CDS, Gibbons FA, Burke V, Taylor RR. Angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein E genotypes and restenosis after coronary Angioplasty *circulation* 1995;92:2066–2071
- 116) Ludwig E, Corneli PS, Anderson JL, Marshall HW, Lalouel JM, Ward RH. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction but not with development of coronary stenosis. *Circulation* 1995; 91:2120–2124
- 117) Leatham E, Barley J, Redwood S, Hussein W, Carter N, Jeffery S, et al. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) polymorphism in patients presenting with myocardial infarction or unstable Angina. *J Hum Hypertens* 1994; 8:635–638.
- 118) Bohn M, Berge KE, Bakken A, Erikssen J, Berg K. Insertion/deletion (I/D) polymorphism at the locus for Angiotensin I-converting enzyme and myocardial infarction. *Clin Genet* 1993; 44:292–297.
- 119) Miettinen HE, Korpela K, Hamalainen L, Kontula K. Polymorphisms of the apolipoprotein and Angiotensin converting enzyme genes in young North Karelian patients with coronary heart disease. *Hum Genet.* 1994; 94:189–192.
- 120) Samani NJ, O'Toole L, Martin D, Rai H, Fletcher S, Lodwick D, et al. Insertion/deletion polymorphism in the Angiotensin-converting enzyme gene and risk of and prognosis after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:338–244.

-
- 121) Friedl W, Krempler F, Paulweber B, Pichler M, Sandhofer F. A deletion polymorphism in the Angiotensin converting enzyme gene is not associated with coronary heart disease in an Austrian population. *Atherosclerosis* 1995;112:137–143.
 - 122) Winkelmann BR, Nauck M, Klein B, Russ AP, Bohm BO, Siekmeier R, et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with increased plasma angiotensin-converting enzyme activity but not with increased risk for myocardial infarction and coronary artery disease. *Ann Intern Med.* 1996;125:19–12525.
 - 123) Katsuya T, Koike G, Yee TW, Sharpe N, Jackson R, Norton R, et al. Association of Angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 1995;345:1600–1603.
 - 124) Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94:708–712
 - 125) Gardemann A, Weiß T, Schwartz O, Eberbach A, Katz N, Hehrlein FW, et al. Gene polymorphism but not catalytic activity of Angiotensin I-converting enzyme is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in low-risk patients. *Circulation* 1995; 92: 2796–2799
 - 126) Keavney BD, Dudley CRK, Stratton IM, Holman RR, Mathews DR, Ratcliffe PJ, Turner RC Association of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism with myocardial infarction in NIDDM. *Diabetologia.* 1995;38(8):948-52.
 - 127) Mattu RK, Needham EW, Galton DJ, Frangos E, Clark AJ, Caulfield M. A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary heart disease in the Caerphilly Heart Study. *Circulation* 1995; 91:270–274.
 - 128) Schuster H, Wienker TF, Stremmler U, Noll B, Steinmetz A, Luft FC. An angiotensin-converting enzyme gene variant is associated with acute myocardial infarction in women but not in men. *Am J Cardiol* 1995;76:601–603.
 - 129) Tiret L, Kee F, Poirier O, Nicaud V, Lecerf L, Evans A, et al. Deletion polymorphism in Angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. *Lancet* 1993; 341:991–992.
 - 130) Badenhop RF, Wang XL, Wilcken DE. Angiotensin converting enzyme genotype in children and coronary events in their grandparents. *Circulation* 1995;91:1655–1658.

-
- 131) Tired L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A, et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994; 344:901-902.
- 132) Ruiz J, Blanche H, Cohen N, Velho G, Cambien F, Cohen D, et al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:3662-3665.
- 133) Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen FS, Hansen BV, Lecerf L, et al. Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-I-converting enzyme gene is associated with coronary heart disease in IDDM patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1995;38:798-780..
- 134) Nomura H, Koni I, Michishita Y, Morise T, Takeda R. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in haemodialysis patients. *Lancet* 1994;343:482.
- 135) Tokgözlü SL, Alikışifoğlu M, Atalar E, Tunçbilek E, Övünç K, Aksoyek S, et al. Angiotensin converting enzyme gen polymorphism and the risk and extent of ischemic heart disease among Turkish patients. *Coronary Artery Disease*, 1997;8:137-141.
- 136) İsbir T, Yılmaz H, Ağaçhan B, Aydın M, İspir CS. An association between Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and coronary artery disease. *IUBMB Life* 1999; 48:1-3.
- 137) Soubrier F, Nadaud S, Williams TA. Angiotensin I converting enzyme gene: regulation, polymorphism and implications in cardiovascular diseases. *Eur Heart J*. 1994; 15: 24-9.
- 138) Singer DRJ, Missouris CG, Jeffery S. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. What to do about all the confusion? *Circulation*. 1996;94:236-9.
- 139) Lechin M, Quinones MA, Omran A, Hill R, Yu QT, Rakowski H, et al. Angiotensin I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1995; 92:1808-12.
- 140) Morris BJ, Zee R, Schrader A. Different frequencies of angiotensin-converting enzyme in genotypes in older hypertensive individuals. *J Clin Invest*. 1994;94: 1085-9..
- 141) Sharma P, Carter ND, Barley J, Lunt R, Seymour CA, Brown MM. Polymorphism in the gene encoding Aangiotensin converting enzyme and relationship to its post-translational product in cerebral infarction. *J Hum Hypertens*. 1994;8:633-4.

- 142) Vaughan DE, Rouleau JL, Ridker PM, Arnold JM, Menapace FJ, Pfeffer MA. Effects of ramipril on plasma fibrinolytic balance in patients with acute anterior myocardial infarction. HEART Study Investigators. *Circulation* 1997;96:442-447.
- 143) Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism Modulates the Human In Vivo Metabolism of Bradykinin. *Circulation*. 2000;102:829-832.
- 144) Margaglione M, Grandone E, Celentano E, Mancini FP, Panico S, Di Minno G. Plasma PAI-1 levels in subjects attending a metabolic ward. Relation to a common single base pair insertion (5G)/deletion (4G) polymorphism in the promoter of the gene. *Circulation*. 1995;92(suppl I):I-623.
- 145) Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assn* 1995;274:1049-1057.
- 146) Mayer EM, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:517-527.
- 147) Wilcken DE, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role of methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976;57:1079-1082.
- 148) Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324:1149-1155.
- 149) Coull BM, Malinow MR, Beamer N, Sexton G, Nordt F, de Garmo P. Elevated plasma homocyst(e)ine concentration as a possible independent risk factor for stroke. *Stroke* 1990; 21:572-576.
- 150) Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *J Am Med Assn* 1992;268:877-881.
- 151) Ellis JM, McCully KS. Prevention of myocardial infarction by vitamin B6. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1995;89:208-220.
- 152) Arnesen E, Refsum H, Bonaa KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary artery disease. *Int J Epidemiol* 1995;24:704-709.
- 153) Taylor LM Jr, DeFrang RD, Harris EJ Jr, Porter JM. The association of elevated plasma homocyst(e)ine with progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 1991; 13:128-136.

- 154) Alfthan G, Pekkanen J, Jauhiainen M, Pitkaniemi J, Karvonen M, Tuomilehto J, et al. Relation of serum homocysteine and lipoprotein (a) concentrations to atherosclerotic disease in prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis* 1994;106:9–19.
- 155) Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337:230–236.
- 156) Ross R . The pathogenesis of atherosclerosis—an update. *N Engl J Med* 1986;314:488–500.
- 157) Blundell G, Jones BG, Rose FA, Tudball N. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Atherosclerosis* 1996;122:163–172.
- 158) Sacks T, Moldow CF, Craddock PR, Bowers TK, Jacob HS. Oxygen radical mediates endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes: an in vitro model of immune vascular damage. *J Clin Invest* 1978;61:1161–1167.
- 159) Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocystein-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980;18:113–121.
- 160) Velury S, Howell SB. Measurement of plasma thiols after derivitization with monobromobimane. *J Chromatogr* 1988;424:141–146.
- 161) Anderson A, Lindgren A, Hultberg B. Effects of thiol oxidation and thiol export from erythrocytes on determination of redox status of homocysteine and other thiols in plasma from healthy subjects and patients with cerebral infarction. *Clin Chem* 1995;41:361–366.
- 162) Welch GN, Upchurch GR, Keaney JF. Homocyst(e)ine decreases cell redox potential in vascular smooth muscle cells. *J Am Coll Cardiol* 1996;27(SupplA):163A (abstract).
- 163) Rowley DA, Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of thiol compounds. *FEBS Lett* 1982;138:33–36.
- 164) Heinecke JA, Rosen H, Suzuki LA. The role of sulfur containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987;262:98–103.
- 165) Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1984;74:1890–1894.

- 166) Parthasarathy S. Oxidation of low-density lipoprotein by thiol compounds leads to its recognition by the acetyl LDL-receptor. *Biochem Biophys Acta* 1987;917:337–340.
- 167) Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993;91:308–318.
- 168) Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:444–8.
- 169) Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6369–6373.
- 170) Graeber JE, Slott JH, Ulane RE, Schulman JD, Stuart MJ. Effect of homocysteine and homocystine on platelet and vascular arachidonic acid metabolism. *Pediatr Res.* 1982;16: 490–493.
- 171) Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1327–1333.
- 172) Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 1993;91:2873–2879.
- 173) Kural BV, Örem A, Çimsit G, Uydu HA, Yandı YE, Alver A. Plasma homocysteine and its relationships with atherothrombotic markers in psoriatic patients. *Clinica Chimica Acta* 2003; 332:23–30.
- 174) Midorikawa S, Sanada H, Hashimoto S, Watanabe T. Enhancement by Homocysteine of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Expression and Secretion from Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;272: 182–185.
- 175) Van den Berg M, Boers GH, Franken DG, Blom HJ, Van Kamp GJ, Jakobs C, et al. Hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 1995;25, 176–181.
- 176) Bienvenu T, Ankri A, Chadeaux B, Montalescot G, Kamoun P. Elevated total plasma homocysteine, a risk factor for thrombosis. Relation to coagulation and fibrinolytic parameters. *Thromb. Res.* 1993;70:123–129.
- 177) Rajagopalan S, Harrison DG. Reversing endothelial dysfunction with ACE inhibitors: a new TREND? *Circulation.* 1996;94:240–243.

- 178) Anderson TJ, Elstein E, Haber H, Charbonneau F. Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease (BANFF Study). *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:60–66.
- 179) Rolland PH, Souchet T, Friggi A, Berenger FP, Bodard H, Faye MM, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition-induced changes in patterns of hemodynamics, aorta viscoelasticity, arterial histo-pathology and endothelial cholesterol fluxes of atherosclerotic Pitman-Moore mini-pigs. *J Hypertens.* 1991;9:S178-S179.
- 180) Benevenga NJ. Amino acid metabolism in swine: applicability to normal and altered amino acid metabolism in humans. In: Tmumbleson ME, ed. *Swine in Biomedical Research.* New York, NY: Plenum Press; 1986:1017-1030.



8. EK-1: Hasta Anket formu

**KORONER KALB HASTALIKLARINDA ACE GEN POLİMORFİZMİ İLE
RİSK FAKTÖRLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dermografik Bilgiler

Hastanın Adı Soyadı:

Cinsiyet:

Yaş:

Boy:

Ağırlık:

Vücut Kitle İndeksi:

Koroner Kalp Hastalığı Risk Faktörleri:

Sigara:

Aile Hikayesi:

Hipertansiyon:

Sistolik Kan Basıncı:

Diyastolik Kan Basıncı:

Diabetes Mellitus.

Miyokard İnfarktüsü Durumu:

Anjioplasti Durumu.

Hiperkolesterolemi:

Biyokimyasal Analizler:

Total Kolesterol:

Trigliserid:

HDL-kolesterol:

LDL-kolesterol:

Anjiyotensin konverting Enzim Gen polimorfizmi:

Homosistein düzeyi:

t-PA düzeyi:

PAI-1 düzeyi:

9. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında İstanbul’da doğdum. İlköğretimimi Elazığ’da yaptım. 1994’de Ankara Gazi Anadolu Lisesinden, 2000 yılında da Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum. 2001 Nisan döneminde yapılan TUS sınavında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim dalında ihtisası kazanarak görevime başladım ve halen devam etmekteyim. İngilizce biliyorum.

