

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KORONER ARTER HASTALARINDA
MİYELOPEROKSİDAZ GEN
POLİMORFİZMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Necip İLHAN

Yusuf DÖĞÜŞ

2013

ONAY SAYFASI

Pof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Nevin İLHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora

Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Necip İLHAN



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Necip İLHAN



Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAG



Prof. Dr. Mehmet AKBULUT



TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesi aşamalarında her zaman destek sağlayan, deneyim ve bilgileri ile tez çalışmamı yönlendiren Danışmanım Sayın Prof. Dr. Necip İLHAN'a, tez çalışmam sırasında tecrübelerinden faydalandığım ve manevi desteğini her zaman hissettiğim Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı; Sayın Prof. Dr. Nevin İLHAN'a, Yüksek Lisans Eğitimime katkı sağlayan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri; Sayın Prof. Dr.İhsan HALİFEOĞLU'na, Prof. Dr. Ferit GÜRSU'ya Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, Doç. Dr. Dilara KAMAN'a, Doç. Dr. Süleyman AYDIN'a, katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışması için gerekli hasta ve kontrol grubunun oluşturulmasında desteğini gördüğüm Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Başkanı; Sayın Prof Dr. Mehmet AKBULUT'a hasta ve kontrol grubunda yer alan örneklerin toplanmasında ve deneysel çalışmaların yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımız Araştırma Görevlileri Sayın Dr. Hatice Kalaycı, Dr. Mehmet Kalaycı ve Dr. Musa Yılmaz ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a teşekkür ederim. Çalışmam sırasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Sevgili ailem ile işbirliğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili arkadaşım anabilim dalımız yüksek lisans öğrencisi Solmaz SUSAM'a yardımları için teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	I
ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLO LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VII
KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
1.ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1.Koroner Arter Hastalığı	6
3.2.Ateroskleroz	7
3.2.1. Ateroskleroz ve İnflamasyon	9
3.2.2 Aterosklerozun Oluşumunda Önemli Risk faktörleri	10
3.2.2.1. Okside Lipoproteinler ve İnflamasyon	11
3.2.2.2. Hipertansiyon ve İnflamasyon	12
3.2.2.3. Dislipidemi ve İnflamasyon	12
3.2.2.4. Diyabet ve İnflamasyon	13
3.2.2.5.Obesite ve İnflamasyon	13
3.2.2.6.Enfeksiyon	14
3.2.2.7. İnflamasyon, Miyokard Nekrozu ve İskemi	14
3.2.3. Koroner Arter Hastalığı ve İnflamasyon	16
3.3. Miyeloperoksidaz	17
3.4. Matriks Metalloproteinazlar	19
3.4.1. Matriks Metalloproteinaz 9	22
3.5. Miyeloperoksidaz ve Koroner Arter Hastalığı	22
3.6. Matriks Metalloproteinaz ve Koroner Arter Hastalığı	24
4. GEREÇ VE YÖNTEM	26
4.1. Çalışma Protokolü	26
4.1.1. Hasta ve Kontrol Grupları için Örnek Seçimi	26

4.1.2. Biyokimyasal Analizler için Örnek Seçimi	26
4.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
4.1.4. Kullanılan Gereçler	27
4.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	28
4.2.1.DNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi	29
4.3. Miyeloperoksidaz 463 -G/A Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi İle Çoğaltılması	29
4.3.1. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	30
4.3.2. PCR Çalışması İçin Hazırlanan Çözeltiler	32
4.3.2.1 Tris Baz-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetik Asit Tamponu (5X)	32
4.3.2.2. Tris Baz-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetik Asit Tamponu (1X)	33
4.3.2.3. Agaroz Jel Çözeltisi	33
4.3.2.4. DNA Marker Çözeltisi	33
4.3.2.5. Primer Hazırlanması	33
4.3.2.6. PCR Ürün Karışımının Hazırlanması	34
4.3.2.7. Acil Restriksiyon Enzim Reaksiyonu	35
4.3. Biyokimyasal Analizler	37
4.4. ELISA Yöntemi	37
4.4.1. Miyeloperoksidaz ve Matriks Metalloproteinaz 9 Düzeylerinin Tayini	39
4.4.2. Plazma Matriks Metalloproteinaz 9 Düzeylerinin Tayini	39
4.4.3. Plazma Miyeloperoksidaz Düzeylerinin Tayini	41
4.5. İstatistiksel Değerlendirme	42
5. BULGULAR	43
6. TARTIŞMA	52
7. KAYNAKLAR	58
8. EKLER	69
9. ÖZGEÇMİŞ	73

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
Tablo 2.	Kullanılan Gereçler	26
Tablo 3.	PCR Ürününün Hazırlanması	32
Tablo 4.	Gradient PCR Bağlanma Sıcaklıkları	32
Tablo 5.	PCR ın Çoğalma Sıcaklık ve Döngüleri	33
Tablo 6.	Acil Kesim Enzimi Uygulama Prosedürü	33
Tablo 7.	Kontrol ve Koroner Arter Hasta Gruplarındaki Bireylerin Demografik Özelliklerin Karşılaştırması	41
Tablo 8.	Miyeloperoksidaz Gen Polimorfizmi Genotip ve Allel Frekansının Hasta ve Kontrol Grubunda Dağılımı	42
Tablo 9.	Kontrol ve Koroner Arter Hasta Gruplarında Bulunan Bireylerin Plazma Miyeloperoksidaz ve Matriks- Metalloproteinaz-9 Düzeyleri	43
Tablo 10.	Kontrol Grubu ve Koroner Arter Grubunda Lipit Sınır Değerlerinin Dağılımı	44
Tablo 11.	Kontrol Grubunda Miyeloperoksidaz Gen Polimorfizmi Varyantlarının Karakteristik Özellikleri ve Risk Faktörleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	45
Tablo 12.	Koroner Arter Hasta Grubunda Miyeloperoksidaz Gen Polimorfizmi Varyantlarının Karakteristik Özellikleri ve Risk Faktörleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	45
Tablo 13.	Kontrol Grubunda Miyeloperoksidaz Gen Polimorfizminin Risk Faktörleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	47
Tablo 14.	Koroner Arter Hasta Grubunda Miyeloperoksidaz Gen Polimorfizminin Risk Faktörleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	48

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Musküler Arter Yapısı	8
Şekil 2.	Aterokleroz Oluşum Yapısı	8
Şekil 3.	Lökosit ve Damar Duvarı Hücrelerince Üretilen Reaktif Oksijen Türlerinin Enzimatik Mekanizması	18
Şekil 4.	Matriks Metalloproteinaz Ailesi	20
Şekil 5.	Miyeloperoksidaz ve Koroner Arter Hastalığı Arasındaki İlişki	22
Şekil 6.	Primer ve Fonksiyonları	28
Şekil 7.	Polimeraz Zincir Reaksiyon Basamakları .	30
Şekil 8.	Miyeloperoksidaz -463G/A polimorfizmi için PCR jel görüntüsü	34
Şekil 9.	ELISA Yöntemi	36
Şekil 10.	MMP-9 Tayini İçin Standart Eğri	38
Şekil 11.	MPO Tayini İçin Standart Eğri	39
Şekil 12.	Kontrol ve Koroner Arter Hastalarında Plazma MPO ve MMP-9 Düzeyleri	43
Şekil 13.	Kontrol ve KAH grubunda Plazma Miyeloperoksidaz Düzeylerinin -463 G/A gen polimorfizm varyantlarına göre dağılımı	46
Şekil 14.	Kontrol ve KAH grubunda Plazma Matriks Metalloprotein-9 düzeylerinin -463 G/A polimorfizm varyantlarına göre dağılımı	46

KISALTMALAR LİSTESİ

A	: Adenin Bazı
Ang	: Anjiyotensin Ang
Acil	: Kesim Enzimi
ABC	: Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi
APO-A1	: Apolipoprotein- A1
CRP	: C- Reaktif protein
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünoabsorbent Analizi
G	: Guanin Bazı
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HOCI	: Hipoklorik Asit
HSP	: Isı Şok Proteini
IDL	: Ara Dansiteli Lipoprotein
IL-6	: İnterlökin-6
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
kDa	: Kilodalton
K₃-EDTA	: Potasyum- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
MCP-1	: Monosit Kemotatik Protein
MCSF	: Monosit Koloni Stimüle Faktörü
MMP	: Matriks-Metaloproteinaz
MMP-1	: Matriks-Metaloproteinaz-1
MMP-2	: Matriks-Metaloproteinaz-2
MMP-9	: Matriks-Metaloproteinaz-9
MPO	: Miyeloperoksidaz
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Oksidaz
NOS	: Nitrikoksit Sentaz
NOx	: Nitrojen Oksit
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon- Kesim-Parçası Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik Asit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SMC	: Düz Kas Hücreleri
SP1	: Transkripsiyon faktör
TBE	: Tris Borat EDTA
TC	: Total Kolesterol
TG	: Trigliserid
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktörü- α
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü

1. ÖZET

Koroner arter hastalığı (KAH)'in en sık görülen nedeni olan ateroskleroz lipoprotein partiküllerinin sağlam ve/veya disfonksiyone vasküler endoteli geçerek intima tabakasında birikmesiyle oluşan inflamatuvar bir olaydır. Miyeloperoksidaz (MPO), immun sistem ve inflamatuvar düzenlemede önemli rol oynayan lökosit kaynaklı bir enzim olup özellikle MPO gen polimorfizminin GG genotipinin, koroner arter hastalıkları (KAH) için önemli bir belirleyici olduğu gösterilmiştir.

Çalışma grubu; 88 Koroner Arter Hastası ve 88 kontrolden oluşturulmuştur. Miyeloperoksidaz gen polimorfizmi PCR yöntemi ile belirlenmiş olup plazma Miyeloperoksidaz (MPO) ve Matriks Metaloproteinaz-9 (MMP-9) düzeyleri ELİSA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

Deneyisel çalışmamızın sonucunda MPO gen polimorfizmine ait genotip frekansı koroner arter hasta grubunda; GG % 72.7, AG % 23.9, AA % 3.4 iken, kontrol grubunda; GG % 71.6, AG % 26.1, AA % 2.3, olarak bulunmuştur. Her iki grupta da MPO gen polimorfizmi genotip ve allel frekansları açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Koroner arter hasta grubu ve kontrol grubu demografik özellikler açısından karşılaştırıldığında; koroner arter hasta grubunda; yaş ve total kolesterol düzeylerinin arttığı ($p<0.001$) ek olarak sigara kullanımı, sistolik kan basıncı, ve LDL kolesterol düzeylerinin arttığı saptanmış ($p<0.05$) olup bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Cinsiyet, diastolik kan basıncı,

hipertansiyon, trigliserid, HDL kolesterol ve VLDL kolesterol düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Plazma MPO ve MMP-9 düzeyleri kontrol ve koroner arter hasta grubunda karşılaştırıldığında; MPO düzeylerinin, hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği bulunmuştur ($p<0.05$). Plazma MMP-9 düzeylerinin ise koroner arter hasta grubunda azaldığı ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Bu çalışma Elazığ bölgesinde yaşayan kişilerde yapılmış bir ön çalışma olup sonuçlarının bu konuda yapılacak diğer çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelime: Koroner Arter Hastalığı, MPO gen polimorfizmi, Enfeksiyon MPO, MMP-9

2. ABSTRACT

GENE POLYMORPHISM OF MYELOPEROXIDASE IN CORONARY ARTER DISEASE

Coronary artery disease (CAD) is the most common cause of atherosclerosis lipoprotein particles in a solid and / or through the intima layer of the accumulation of dysfunctional vascular endothelium is an inflammatory event. The enzyme myeloperoxidase (MPO), immune system and plays an important role in regulation of inflammatory leukocytes from MPO, an enzyme gene polymorphism and especially the GG genotype, coronary artery disease (CAD) is shown to be an important determinant.

Working group with coronary heart disease and 88 controls of 88. Plasma myeloperoxidase gene polymorphism is determined by applying PCR myeloperoxidase (MPO) and Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) was measured using ELISA method.

As a result of an experimental study of the MPO gene polymorphism genotype frequency in patients with coronary artery; GG 72.7%, AG 23.9% AA 3.4% in the control group, GG 71.6%, AG 26.1% AA 2.3%, respectively. In both groups, the MPO gene polymorphism genotype and allele frequencies were compared, no statistically significant difference was found ($p>0.05$).

Coronary artery disease and the control group in terms of demographic characteristics were compared in patients with coronary artery age and total cholesterol levels were increased ($p<0.001$), in addition to smoking, systolic blood pressure, and LDL cholesterol levels increased was found ($p <0.05$) and the changes were statistically significant. Gender, diastolic blood pressure,

hypertension, triglycerides, HDL cholesterol, and VLDL cholesterol levels did not differ significantly between the groups($p>0.05$).

Plasma MPO and MMP-9 levels in the patient group compared with the control and coronary artery; MPO levels was statistically significantly increased in the patient group ($p <0.05$). Plasma MMP-9 levels in patients with coronary artery is decreased and this change was not statistically significant ($p>0.05$).

This study is a pilot study of individuals living in Elazig is considered to contribute to the results of other studies in this subject.

Keywords: Coronary Artery Disease, MPO gene polymorphism, Infection MPO, MMP-9

3. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıkların başında gelen kalp hastalıklarına bağlı ölümler dünyada ve ülkemizde halen en sık ölüm nedeni olmaya devam etmektedir. Koroner arter hastalığı (KAH) dünyadaki tüm ölümlerin %33.50'sinin, kalp hastalıklarına bağlı ölümlerin ise % 50-75'inin nedeni olarak gösterilmektedir (1).

Koroner arter hastalığının (KAH) en sık görülen nedeni olan ateroskleroz başta Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL) olmak üzere Ara Dansiteli Lipoprotein (IDL), Çok Düşük Dansiteli Lipoprprotein (VLDL) ve Şilomikron artıkları gibi lipoprotein partiküllerinin sağlam ve/veya disfonksiyone vasküler endoteli geçerek intima tabakasında birikmesiyle oluşan inflamatuvar bir olaydır (2).

Miyeloperoksidaz(MPO), immün sistem ve inflamatuvar düzenlemede önemli rol oynayan lökosit kaynaklı bir enzimdir (3,4).

Son yıllarda ateroskleroz patogeneğinde oksidasyonun ve oksidasyon süresinde de miyeloperoksidazın önemli bir görevi olduğu düşünülmüş ve yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ateroskleroz'dan koruyucu bir molekül olduğu bilinen HDL'nin en önemli lipoproteini olan Apolipoprotein A1 (APO-A1)'in MPO tarafından nitratlanması sonucu HDL'nin proaterojenik hale geldiği bulunmuştur (3,4).

Yapılan genetik çalışmalarda da MPO gen ekspresyonu ve koroner hastalık riski arasındaki ilişki bulunmuştur. Özellikle MPO geni için birkaç polimorfizm tanımlanmış, genin promotor bölgesinde yerleşik olan ve transkripsiyonu etkileyen bir fonksiyonel polimorfizm olduğu gösterilmiştir (5). Bu polimorfizm 463.cü pozisyonda Adenin bazı yerine Guanin bazının girmesi

sonucu oluşan ve üç farklı genotipi olan AA, AG ve GG polimorfizmdir. Bu genotiplerden GG genotipi daha çok Kuzey Amerika bölgesinde % 60-66 oranında görölmektedir (6,7). Daha önce yapılan çalışmalarda genotipler karşılaştırıldığı zaman AA/AG genotiplerine göre GG genotipinin, koroner arter hastalıkları (KAH) için önemli bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (8,9).

3.1.Koroner Arter Hastalığı

Yetişkinlik çağının en önemli kronik hastalıklarından biri olan koroner arter hastalığı (KAH) tüm dünyada, özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ölkelerde mortalite ve morbiditenin en sık nedeni olup bu hastalığın beslenme alışkanlıklarının değışmesi, stres faktörlerinin artması nedeniyle gelecekte daha da ön plana çıkacağı ve 2020 yılına gelindiğinde tüm dünyada işlevsel yetersizlikler arasında ilk sırayı alacağı düşünülmektedir (10-15).

Koroner Arter Hastalığı; insan yaşamına getirdiğı kısıtlamalardan dolayı bireyin sağlığını bedensel, ruhsal ve çevreye uyum yönünden etkilediğı için bu tür hastalar beklenenden daha kısa sürede hastaneye tekrar yatmakta, taburcu olduktan sonra yaşamının sonuna kadar bu hastalık ile yaşamaktadırlar (16-18).

Hastalar özellikle yürüme, koşma, merdiven çıkma, eğilme, doğrulma gibi fiziki güç gerektiren aktivitelerde güçlük çekmekte, fonksiyonel bağımlılığın olması, çeşitli kısıtlamalar ve günlük yaşam aktivitelerinde yardıma gereksinim duymaktadırlar. Bu olay hastaların yaşam kalitelerini olumsuz yönde etkilemektedir. Kronik hastalıkların her türü fonksiyonel güçsüzlüğe ve fiziksel iyilik halinde bozulmalarına yol açarak yaşam kalitesinin olumsuz etkilenmesine yol açar (19).

Başka bir ifadeyle yaşam kalitesi, bireyin tüm gereksinimlerini karşılaması, yaşamdan doyum alması, sosyal davranışlarda yeterli olması, eğlenmeye zaman ayırması, emosyonel ve fiziksel durumunun üst düzeyde olması ve kişiler arası ilişkilerinin devam edebilmesi gibi özellikleri kapsamaktadır (20,21).

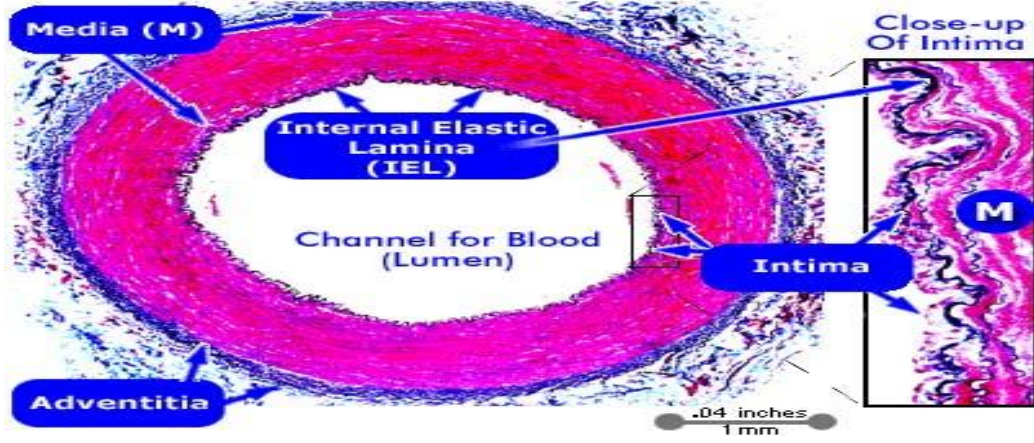
Koroner kalp hastalığı, kalp kaslarına kan akışının azalması sonucu miyokard iskemisi ile oluşan bir hastalıktır. İskemi genellikle ateroskleroz tromboz, spazm gibi nedenlerle kanın kalbin bir bölümüne az ulaşması ya da anemi, karboksihemoglobinemi ya da hipotansiyon gibi nedenlerle kan akımının azalmasıyla oluşan ve doku hasarıyla devam eden patolojik bir durumdur. En sık görülen nedeni ise bir veya daha fazla damarın daralmasına neden olan aterosklerozdur (22).

3.2.Ateroskleroz

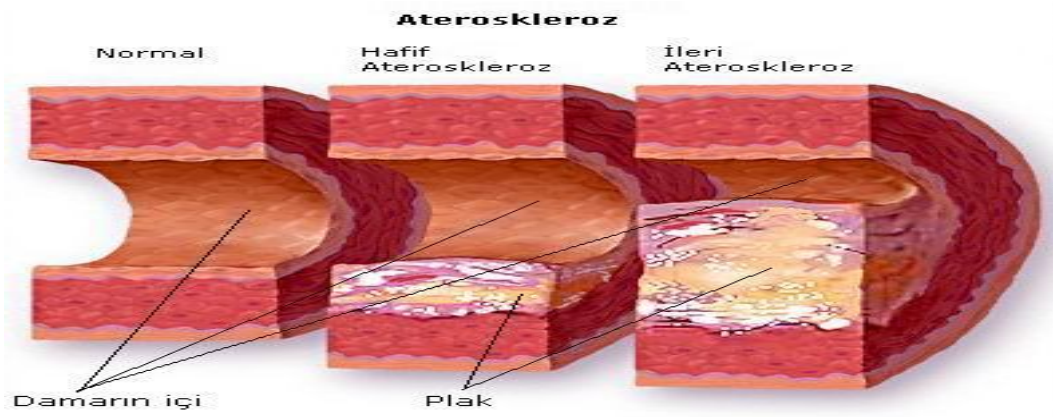
Ateroskleroz çocukluk döneminde başlayan, orta ve ileri yaşlarda klinik belirtiler gösteren musküler arterin yavaş seyreden progresif bir hastalığıdır (23). Ateroskleroz, damar çapı daralması sonucu atardamarların duvarlarında bir takım olaylar meydana geldikten sonra ortaya çıkan bir durumdur. Özellikle; kalp, beyin, böbrek, boyun ve organların atardamarlarında oluşturduğu olaylarla hayati öneme sahip birçok hastalığın oluşmasında rol oynar. Ateroskleroz oluşumuna bağlı olarak damar duvar yapısının bozulması yetersiz kan akımının ortaya çıkmasına neden olur (24).

Ateroskleroz; elastik damarların, koroner ve popliteal arterler gibi orta boy musküler damarların intima tabakasının lipid partikülleri, düz kas hücreleri ve

inflamatuvar hücreler tarafından infiltrasyonu sonucu ortaya çıkan kronik bir hastalıktır. Ateroskleroza bağlı gelişen olaylar, plağın büyümesinden ziyade mevcut plağın hasarı ve rüptürü sırasında tetiklenen inflamatuvar ve trombojenik yapı sonucu oluşur (25)(Şekil 1).



Şekil 1. Musküler Arter Yapısı (26)



Şekil 2. Aterokleroz Oluşum Yapısı (27)

Ateroskleroz gelişim sürecinde; Yağlı çizgilenmeler, Fibröz plaklar, Komplike plaklar olmak üzere üç tip aterosklerotik plak tanımlanmıştır (Şekil 2).

Yağlı Çizgilenmeler: Aterosklerozun en erken safhasında ortaya çıkan plak şeklidir. Makrofajların oluşturduğu köpük hücrelerinin intima tabakasında toplanmasıyla oluşurlar (28).

Fibröz plaklar: Köpük hücreleri ve intima tabakasındaki ekstrasellüler matriks içerisinde lipid partikülleri birikmesiyle oluşur (29).

Komplike plaklar: Aterosklerotik plakların akut komplikasyonlardan sorumlu tipidir. İçeriğinde lipid partikülleri, inflamatuvar hücreler ve fibrin dokusunun bulunduğu yırtılmış bir aterom plağı üzerine hematoma ve trombotik partiküllerin toplanması ile oluşur. Komplike plakların oluşumunda fibröz tabakanın kalınlığı, plağın şekli, yapısı, lipid içeriği gibi önemli yapılar içerir (29).

3.2.1. Ateroskleroz ve İnflamasyon

Aterosklerozun çeşitli canlı modellerinde, damar duvarında erken evrede oluşan lipid birikimi ile inflamasyon bulgularının eş zamanlı olarak etkin oldukları bulunmuştur. Normal endotele lökositlerin bağlanması oldukça zordur.

Aterosklerozda ilk olarak vasküler endotel hücrelerinin yüzeyinde değişik lökosit gruplarının bağlanmasına yardımcı olacak selektif adezyon molekülleri sentezlenir. Nedeni, okside LDL molekülünün bir sinyal molekülü gibi davranıp endotel hücrelerini aktive etmeleridir (30). İnsan aterom plaklarında çeşitli lökositlerin yerleşebileceği Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1) bulunmuştur. İlginç olan adezyon moleküllerinin artmış ekspresyonunun olduğu vasküler bölgeler aterosklerotik plak gelişimine uygundur (31). VCAM-1 ve benzeri adezyon moleküllerinin artmış üretiminden sorumlu olan endotel hasarı sonrası antiinflamatuvar özellikleri bilinen endotel kaynaklı nitrik oksit düzeyleri azalmıştır (32). Endotele yapışan lökositler, intima içine doğru nüfuz ederler. Lökositlerin bu yapıda göçünden kemoatraktan molekülleri sorumludur. Monosit Kemotatik Protein (MCP-1) isimli bir proteinin aterom plağı gelişim alanında

monositlerin intima içine göçüne neden olduğu gösterilmiştir. Monosit Koloni Stimüle Faktörü (MCSF), mediatörün intima içindeki monositleri makrofajlara dönüştürdükleri; bu yapılarında lipoproteinleri bağlayarak köpük hücrelerini oluşturdıkları yapılan çalışmalarda bulunmuştur (33,34).

3.2.2 Aterosklerozun Oluşumunda Önemli Risk faktörleri

Ateroskleroz gelişiminde rol oynayan risk faktörleri aşağıda belirtilmiştir (35).

1. Hiperlipidemi
2. Hipertansiyon
3. Sigara
4. Diabetes Mellitus

Altta yatan kolaylaştırıcı faktörler:

1. Obesite
2. Fiziksel hareketsizlik
3. Yağlı, kolesterol açısından zengin diyet
4. Genetik

Yardımcı risk faktörleri:

1. Trigliserit artışı
2. LDL artışı
3. Lipoprotein (a)
4. Homosistein
5. Koagulasyon faktörleri

Değiştirilemeyen aterosklerotik risk faktörleri:

1. Yaş
2. Cinsiyet
3. Genetik
4. Psikososyal faktörler

Bilinen aterosklerotik risk faktörleri kapsamında yeni risk faktörleri olarak;

1. Homosistein

2. Lipoprotein
3. Fibrinogen
4. Fibrinolitik fonksiyon
5. İnflamasyon sayılabilir.

3.2.2.1. Okside Lipoproteinler ve İnflamasyon

Aterosklerozun gelişmesinde lipidlerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalar ile aterogenez için lipid ve inflamasyonu içeren bir oksidasyon modeli açıklanmıştır. Oksidasyon modeline göre, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) proteoglikanlara bağlanarak kısmen intimada muhafaza olur ve oksidatif modifikasyona uğrar (36,37). Lipit hidroperoksitler, lizofosfolipidler, karbonil bileşikler ve diğer biyolojik olarak aktif parçalar ateroskleroz lipit fraksiyonuna yerleşirler (38). Bu modifiye yağlar, kemokinler, pro-inflamatuar sitokinler, makrofaj ve damar duvarı hücreleri inflamasyonu ve mediatörleri uyarabilirler. Lipoproteinlerdeki apoprotein gruplarında, damar duvarında değişiklik geçirebilmektedir.

Yapılan deneysel çalışmalarda; antioksidanların kullanımının hiperlipidemiye bağlı olarak, gelişen aterosklerotik lezyonların ilerlemesini geciktirdiği gösterilmiştir. Buna rağmen insan aterosklerozu için LDL oksidasyonu hipotezinin uygunluğu kanıtlanmamıştır. İnsan aterosklerozunda elde edilen modifiye lipid ve proteinlerin türlerinin inflamasyonu sonucu oluşan okside lipoproteinleri bağlayan çok sayıda kanıt ileri sürülmüş ama in vitro ortamda okside lipoproteinlerin, kimyasal analiz sonucunda elde edilen bileşiklerin karşılığı olmadığı saptanmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında LDL'nin geçiş metalleri ile oksidasyonu sağlanmıştır. Bu oksidasyon sonucu oluşan oksidatif LDL'nin insan ateroskleroza ile yakından ilişkisi olduğu bulunmuştur (39, 40).

3.2.2.2. Hipertansiyon ve İnflamasyon

Hipertansiyon, ateroskleroz için lipid risk faktörleri ile yakından ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda, ateroskleroz ve inflamasyon arasındaki fizyopatolojik ilişkinin hipertansiyon aracılığı ile olduğu düşünülmektedir.

Anjiyotensin II (Ang II), vazokonstriktör özelliklerine ek olarak intimal inflamasyonu teşvik edebilir. Örneğin Anjiyotensin II; endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinden bir reaktif oksijen türevi olan süperoksit anyonunu ortaya çıkarır (41). Anjiyotensin II, endotel hücrelerinde bulunan proinflamatuvar sitokinler, İnterlökin (IL-6) ve Monosit Kemoatrak Protein-1 (MCP-1) ve lökosit adhezyon molekülü (VCAM-1) gibi moleküllerin arteriyal düz kas hücreleri aracılığı ile ekspresyonunu artırır (42-44). Anjiyotensin konverting enzim inhibitör tedavisinin klinik faydalarından biri bu proinflamatuvar yolları kesintiye uğratması sonucu oluşur (45).

3.2.2.3. Dislipidemi ve İnflamasyon

Diğer lipoprotein partikülleri gibi çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) ve orta dansiteli lipoproteinler önemli aterojenik potansiyele sahiptir. Bu lipoprotein partiküllerinde LDL de olduğu gibi oksidatif değişikliğe uğrayabilir. Buna ek olarak Beta VLDL parçacıkları kendi kendine vasküler endotel hücrelerinin inflamatuvar işlevlerini etkinleştirdikleri düşünülmektedir (46,47). Yüksek dansiteli lipoproteinler ateroskleroz için koruyucu bir role sahiptir. Tersine kolesterol taşıma işlemi, kolesterolün bazı olası ateroprotektif fonksiyonu

için HDL kolesterol tarafından yapılmaktadır. HDL parçacıkları; okside yağları yıkmak ve proinflamatuvar etkileri oradan kaldıran, trombosit aktive edici faktör asetilhidrolaz ve paraoksonaz gibi antioksidan enzimleri aynı anda taşıma yapabilmektedir (45).

3.2.2.4. Diyabet ve İnflamasyon

Diyabet ateroskleroz için önemi yeni artan bir risk faktörüdür. Diyabet ile ilişkili hiperglisemi ileri glikozilasyon son ürünlerinin oluşmasına bağlı olarak makromoleküllerin modifikasyonuna yol açar (48). Bir yüzey bağlayıcı reseptör olan RAGE (AGE reseptörü) aracılığı ile AGE modifiye proteinler, vasküler endotel hücrelerinde proinflamatuvar sitokinlerin ve diğer inflamatuvar yolların üretimini artırır. Hiperglisemi dışında diyabetik durum; reaktif oksijen türleri ve karbonil grupları aracılığıyla oksidatif stresi arttırmaktadır (49). Hipertansiyonda olduğu gibi ateroskleroz için inflamasyon diyabet ile ilişkilidir (45).

3.2.2.5.Obesite ve İnflamasyon

Obesite; insülin direnci ve diyabet eğilimini arttırdığı gibi aterojenik dislipideminin artmasına da neden olmaktadır. Visseral yağ kaynaklı yüksek seviyede serbest yağ asitleri, portal dolaşım yoluyla karaciğere ulaşabilir ve hepatositlerle trigliserit bakımından zengin lipoprotein olan VLDL sentezini uyarır. Oluşan bu yüksek kolesterol ester transfer proteini HDL'den VLDL için değiş tokuşu arttırarak HDL kolesterolü düşürebilir. Adipoz doku Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve İnterlökin-6 (IL-6) gibi sitokinleri sentezleyebilir (50). Obesite inflamasyonları arttırmaktadır. Obesite ayrıca insülin ve lipoproteinler üzerindeki etkisinden bağımsız olarak aterogenezi arttırmaktadır (45).

3.2.2.6.Enfeksiyon

Enfeksiyon ajanları, inflamatuvar uyaranlara sahip aterogeneze fayda sağlayabilir (51,52). Akut enfeksiyonlar iskemik olayları hızlandırabilir. Örneğin; hemodinamik, pıhtılaşma ve fibrinolitik sistemleri değiştirebilir. Kronik ekstrasvasküler enfeksiyonlar (gingivitis, prostatit, bronşit) aterosklerotik lezyonların gelişimini hızlandırabilir ve aynı zamanda inflamatuvar sitokinlerin ekstrasvasküler üretimini arttırır. İntravasküler enfeksiyonlar bölgesel inflamatuvar bir uyarıcı aracılığı ile aterogenezi hızlandırır. Birçok insan aterom plaklarında bir mikrobiyal ajan olan Chlamydia pneumoniae enfeksiyonları görülür. Arteriyal plakda Chlamydia varlığı; lipopolisakkarit (endotoksin) ve ısı şok proteini (HSP) salınımına neden olur bu durum vasküler endotel hücreleri ve düz kas hücreleri aracılığı ile proinflamatuvar mediatörlerin üretimini artırır lökosit infiltrasyonu yapar (53). Enfeksiyon konusunda yapılan epidemiyolojik çalışmalar Helicobacter pylori, Herpes simplex virüsü ya da cytomegalovirusa karşı direk antikor kullanımı vasküler riski tahmin etmek için çok küçük kanıtlar sunmuş ve karmaşık sonuçlar vermiştir (45).

3.2.2.7. İnflamasyon, Miyokard Nekrozu ve İskemi

Liuzzo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada unstabil anginalı seçilmiş hastalarda kısa süreli prognoz ile erken dönemde artmış CRP düzeyleri arasında ters bir ilişki gösterilmiştir. Braunwald III-b sınıflandırmasına göre miyokard nekroz bulgusu olmayan kişiler CRP düzeyleri artmamış hastalar ile benzer iskemik yüke sahiptir (56). Koroner arter hastalarının yarısı taburcu olduktan sonra kalıcı bir CRP artışı göstermekte olup bu bulgu infarktüs ve stabil olmayan tekrarlayan episodlar ile ilişkilidir (54). Variant angina, büyük iskemik

hastalığı ya da stabil angina ve ileri düzeyde koroner arter hastalığı olan hastalar, çok düşük bir artmış CRP insidansına sahiptir. Akut koroner sendromlu hastalarda sistemik olarak aranan inflamasyonun spesifitesi doğrulanmıştır (55). Unstabil anginalı hastalarda CRP'nin artışı aterosklerozun çeşitliliği ve şiddeti hakkında bilgi vermemektedir. Ayrıca kronik stabil anginalı ve çoklu damar hastalığı prevalansı yüksek olan hastaların sadece yaklaşık %20'si ile Unstabil anginası olan hastaların %70'i karşılaştırıldığında; kronik stabil angina ve çoklu damar hastalığı prevalansı yüksek olan kişilerin CRP değerlerinin arttığı bulunmuştur (56). Ayrıca periferel vasküler hastalığı olan kişilerdeki CRP düzeylerinin ciddi bir revaskülarizasyon gerektirmedikçe unstabil anginalı ve tek damar hastalığı olan kişilerde gözlenen CRP değerlerinden anlamlı bir farklılık göstermediği bulunmuştur (57). Unstabil anginalı kişilerde yüksek CRP düzeyleri görülmez. Fakat unstabil angina aracılı infarktüs geçiren tüm kişilerde kabul edilebilir bir şekilde CRP düzeyleri artmıştır. Artan koroner vazoreaktivite ya da protrombotik zayıflık kalıcı koroner arter tıkanmasına neden olabilir (58). İnflamasyon sadece infarktüs riskini arttırmaz aynı zamanda damar tıkanmasının etkilerini artırır. Bununla beraber; CRP inflamasyonu belirlemede uygun bir marker olup fibrinojen ve plazminojen aktivatör inhibitör 1 gibi akut faz cevabını oluşturan diğer proteinlerin düzeyini artırır. İnflamasyon; endojen fibrinolizisi inhibe ederek pıhtı stabilitesini artırır ve trombus oluşumunu düzenler (45).

3.2.3. Koroner Arter Hastalığı ve İnflamasyon

Koroner arter hastalığı, tromboz ve vazokonstriksiyon elementlerinin aterosklerotik lezyonların üzerinde birikmesi ile oluşmaktadır. Tromboz; otopsi, anjiyoskopi ve anjiyografi ile saptanabilmektedir. Buna karşılık, vazospazm

nedeniyle geçici doğal zorluklar meydana gelmektedir. Nitrat verilme yöntemi ile stenozun azaltılması veya provokatif önlemlerin kullanımı arter spazmı için bir bulgudur (59-61). Gerçekte tromboz oluşumu vazospazma neden olur. Local trombüs gelişimi; serotonin, tromboksan A₂ ve trombin oluşturur. Bu tromboz ile ilişkili araçların her biri sadece tromboz bölgesinde vazokonstriksiyona neden olabilir. Bu şekilde, bir epikardiyal kanal koroner arterindeki bir proksimal trombüs distal küçük damarlara spazmı yayabilir. Trombüs, sistematik olarak verildiğinde vazokonstriksiyon ve vazodilatör ilaçlardan daha iyi bir tedavi olanağı sunarlar. Lokal üretilen damar daraltıcı maddelerin etkisini nadiren bertaraf eder (59). Ancak agresif trombolitik, antikoagülan ve/veya antitrombosit ajanlar alan yada girişimsel tedavi uygulanan koroner arter hastalarında hastaneden taburcu olduktan sonraki 4 ila 6 aylık bir dönem içerisinde %12 veya %16 oranında majör kardiyak olayların görüldüğü saptanmıştır (62,63). Plak istikrarsızlıkları altında yatan mekanizmaların anlaşılması daha iyi tedavi sonuçlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Artan kanıtlar akut koroner sendromlu kişilerde dolaşımda inflamatuvar markerlardan özellikle CRP düzeylerinin ateroskleroz tipinden bağımsız olarak arttığını göstermiştir (45).

3.3. Miyeloperoksidaz

Miyeloperoksidaz (MPO) ilk olarak 1941 yılında Agner adlı araştırmacı tarafından köpekten izole edilmiştir (64). Bağışıklık sisteminin bir parçası olarak esas bakterisidal bir enzim olarak görev yapar.

Miyeloperoksidaz; polimorfonüveli nötrofillerden salınan bir hem proteinidir (65). MPO'ın farklı türlerinin nötrofillerde bulunduğu ve total hücre proteinin % 2-5'ni oluşturduğu veya 106 hücrede 2-4 µg olarak bulunduğu rapor

edilmiştir (64). Enzim yeşil renkli olup cerahate rengini verir. Bu proteinin ilk ismi verdoperoksidazdır. Bu enzim nötrofillerin ilk gelişimi safhasında sentezlenir ve azurofilik granüllerde depolandığından kolayca saptanır. Azurofilik granüllerin degranülasyonu sırasındaki fonksiyonunu belirleyen enzimdir. Hafif granüllerde bu enzim bol miktarda bulunurken, ağır granüllerde miktarı biraz daha azdır (64).

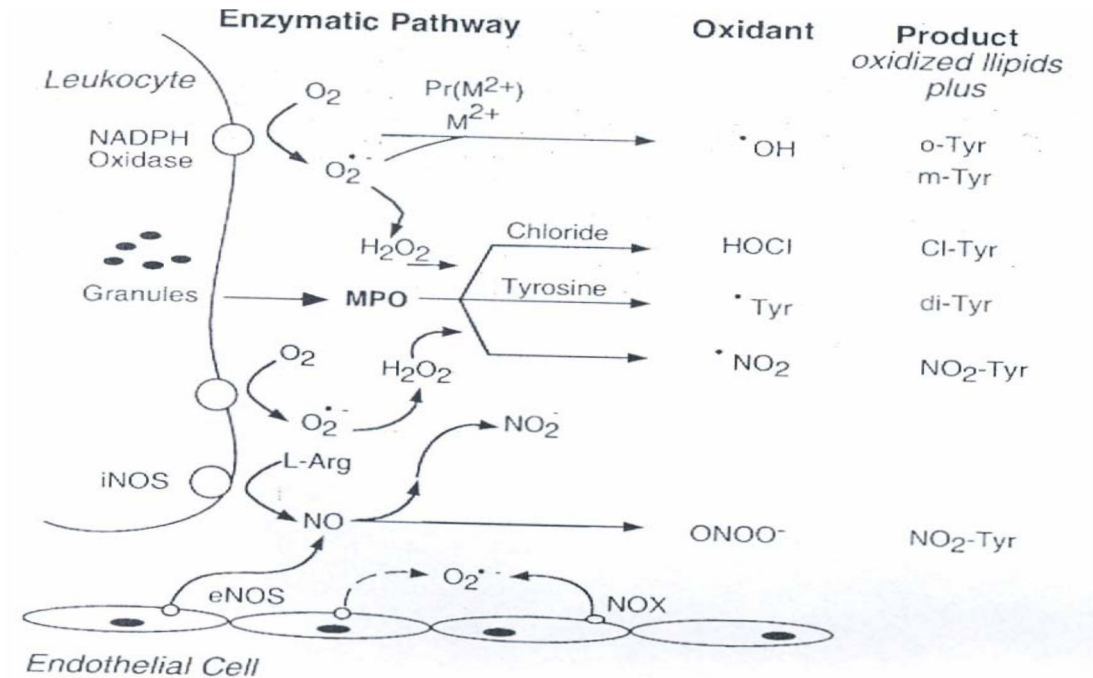
MPO; arginin aminoasidi açısından zengin, 150 kDa moleköl ağırlığında katyonik bir proteindir. Bu enzim 59 kDa'lık 1 ağır (α) ve 13,5 kDa'lık 1 hafif (β) alt ünitelerden oluşur. Bu alt üniteler promotor olarak düzenlenmiştir ve alkilenenerek hemimiyeloperoksidaza indirgenebilir. Hemimiyeloperoksidazdaki bu 2 promotor ünite enzimatik özellik taşımaktadır. Hem ve karbonhidrat parçalarının her ikisi enzimin ağır ünitesine bağlanır. Her MPO ağır alt ünitesine 2 adet demir bağlayan bir prostetik gruba sahiptir (64).

Kronik miyeloid lösemi hastalarından elde edilen MPO; Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) ile 39 kDa'lık bir bant verir. Bu banda alfa alt ünitesi adı verilir (64). Nötrofillerden başka monositlerde ve bazı doku makrofajlarında da bu bant bulunur (65). MPO polimorfonüveli nötrofillerin (PMNL) ve monositlerin azurofilik granüllerinde depo edilir. Hücresel aktivasyon ve degranülasyon sırasında MPO enzimi fagositik vakuoller içinde hücre dışı alana salınır. MPO, kemik iliğinde öncül moleköl olarak miyeloid farklılaşması sırasında sentezlenir, PMNL dolaşıma girmeden önce prosedür tamamlanır (65). Monositler makrofajlara farklılaşırken miyeloperoksidazını kaybederler.

Miyeloperoksidaz Aracılı Oksidasyon Reaksiyonları

Lökositler patojen ajanlara karşı konak savunmasının bir parçası olarak MPO'yu kullanır. MPO reaktif oksidanlar ve hipoklorik asit, tirozil radikali, nitrojendioksit gibi antimikrobiyal maddelerin üretimi aracılığı ile hidrojen peroksitin oksidatif potansiyelini güçlendirir (66) (Şekil 3). Bu reaktif ürünler hastalıklı arter duvarında hedef lipid ve proteinleri oksidatif olarak modifiye ederler. MPO tarafından üretilen oksidasyon ürünleri, insan ateromunda zenginleştirilmiştir (67). Yapılan çalışmalarda MPO ile üretilen reaktif oksijen ürünlerinin endojen lipidlerin peroksidasyonu ve LDL'nin aterojenik forma dönüşmesine yol açtıkları gösterilmiştir (68).

Lökositler dışında MPO; karaciğerde Kupffer hücrelerinde (69), mikrogliyalarda, granül içeren nöronlarda ve beyinde hippokampüsteki piramidal nöronlarda bulunur (70).



Şekil 3. Lökosit ve Damar Duvarı Hücrelerince Üretilen Reaktif Oksijen Türlerinin Enzimatik Mekanizması (66)

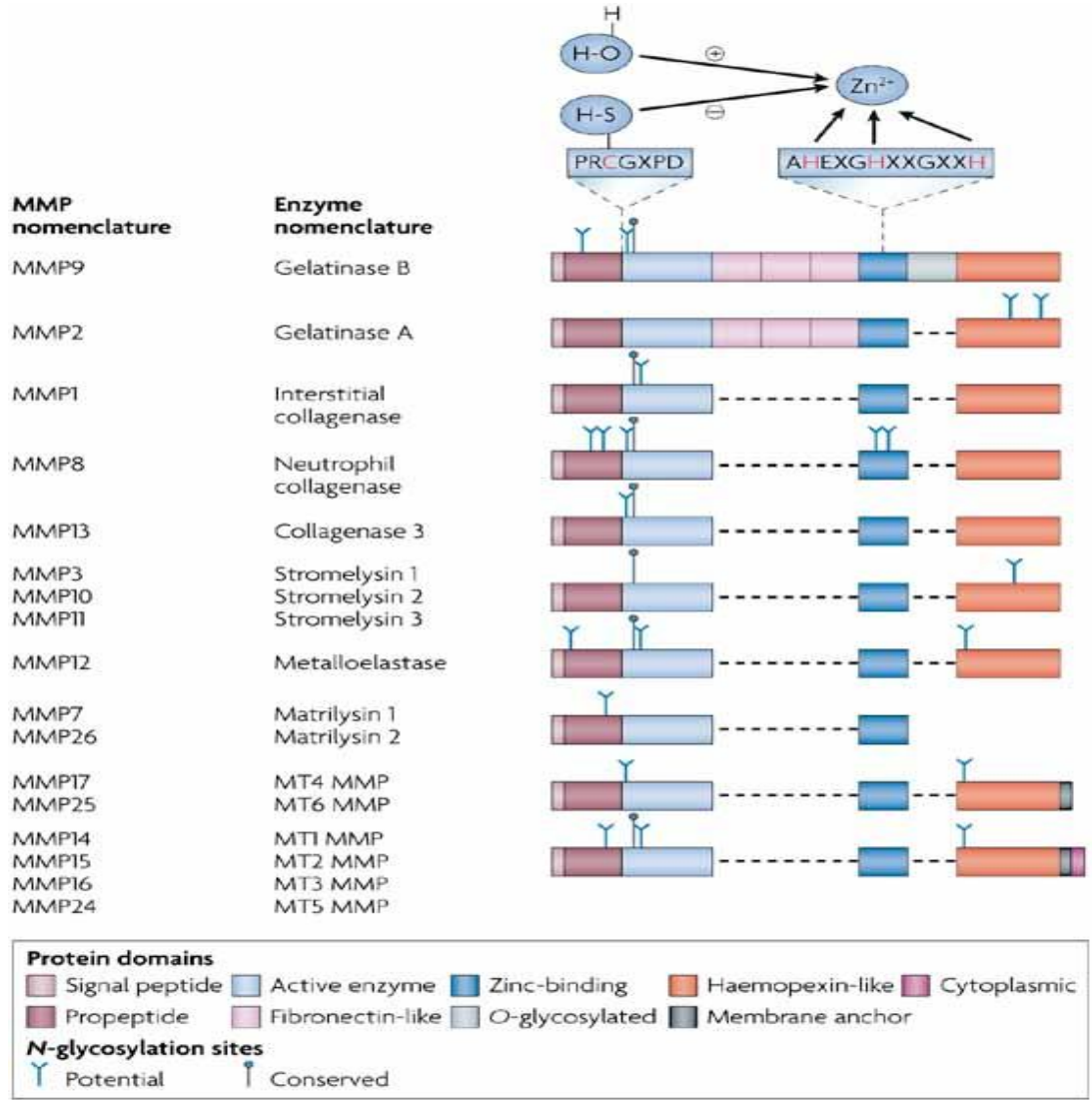
3.4. Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMP) hakkında ilk bilgi Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından 1962 yılında yayınlanmıştır. MMP'lerin moleköl ağırlıkları 19 - 92 kDa arasında değişmektedir (71).

MMP'ler yapısal olarak incelendiğinde;17-29 aminoasit içeren sinyal peptit bölgesi, 77-87 aminoasit içeren amino terminal propeptid bölgesi ve 170 aminoasit içeren katalitik bölgeden meydana gelir. Günümüzde 25 üyesi tanımlanmıştır (72-75)(Şekil 4).

Matriks metalloproteinaz (MMP) ailesi, ekstrasellüler proteinazların önemli bir üyesidir. En önemli görevleri ekstrasellüler matriksin (ECM) yıkımıdır. Birçok fizyolojik ve patolojik süreçlere katıldıkları kanıtlanmıştır. MMP'ler; emrionik gelişim, ovulasyon, kemik remodelingi ve yara iyileşmesi gibi birçok fizyolojik olayda görev alır. Aynı zamanda bu enzimlerin hücre migrasyonu, invazyon, proliferasyon ve apoptoziste rol oynadığı kanıtlanmıştır. (76-78).

MMP'ler ekstrasellüler matriksde düzenlenen endoproteinazlardır. MMP'ler kollajenaz ve jelatin aktivitesine sahip ve özellikle damardaki plağın tadilatına ve istikrarsızlığına sahip olup plağı omuzlayan ve çıkmasına izin vermeyen enzimler olarak bilinir (79,80). MMP'ler ve kardiyovasküler hastalıklar arasında fazla bilgi yoktur. Akut koroner sendromlu kişilerde MMP-1, MMP-2 ve MMP-9'un peripheral kan düzeyleri artmıştır. (81). Stabil yada stabil olmayan koroner arter hastalıklarında artan MMP-9 düzeylerinin gelecekteki kardiyovasküler ölüm risklerini artıracığı düşünülmektedir (82).



Şekil 4. Matriks Metalloproteinaz Ailesi (75).

3.4.1. Matriks Metalloproteinaz 9

Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9); keratinosit, monosit, alveollar makrofajlar, PMN lökositler ve malign hücrelerin çoğundan sentezlenir (83-85)

MMP-9, ilk olarak 1974 yılında Sapota ve Dancemicz adlı araştırmacılar tarafından polimorfonükleer lökositlerden salgılanan bir jelatinolitik enzim olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda 92 kDa'lık bir molekül olarak salgılandığı, önce 87 kDa olan bir inaktif maddeye ve sonra aktif form olan 82

kDa veya 83 kDa'luk bir moleküle dönüştürüldüğü gösterilmiştir. 45-67 kDa arasında değişen aktif formlarıda izlenebilmektedir.

MMP-9, diğer bir jelatinaz olan MMP-2 ile substrat düzeyinde bir madde ile oldukça benzerlik gösterir; MMP-9, kazeine karşı oldukça spesifiklik gösterirken MMP-2'de bu duyarlılık bulunmaz (86).

MMP-9, MMP ailesinin en büyük üyesidir. Sinyal peptidi, propeptit bölgesi, çinko atomu bağlayıcı bölüm, COOH-terminal hemopeksin benzeri bölüm olmak üzere 7 bölümden oluşur. Ayrıca katalitik bölüm ve hemopeksin benzeri bölüm arasında prolince zengin bağlayıcı bölge yer alır. C-terminal hemopeksin benzeri bölüm substrat spesifitesini belirlemede anahtar rolü oynar. Fibronektin benzeri bölüm kollajen ve jelatinlere bağlanmayı kolaylaştırır (74).

3.5. Miyeloperoksidaz ve Koroner Arter Hastalığı

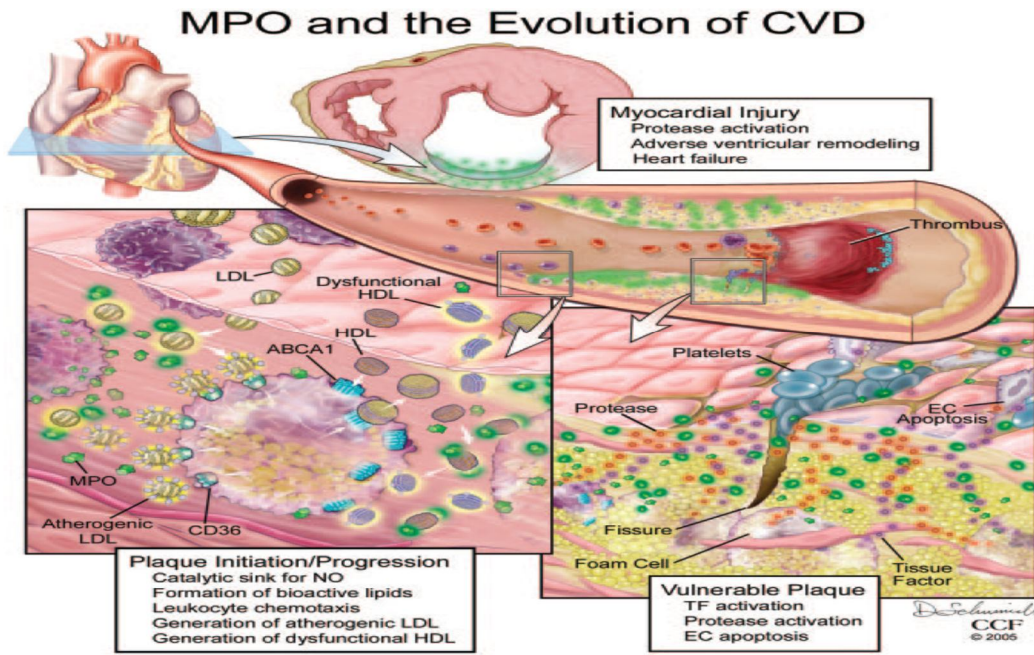
Ateroskleroz plak gelişiminin tüm safhalarında inflamatuvar olaylar etkilidir. Koroner arter hastalarında dolaşımdaki nötrofillerde artmış degranülasyon olduğu bulunmuştur (87).

MPO; lökositlerin azurofilik granüllerinde en bol bulunan enzimdir. MPO lökositin savunmasını başlatmak için katkıda bulunur (88, 89). Makrobakteriyofaj dokularda (90-92), Monositlerde ve Nötrofillerde (93) baskın bir şekilde bulunur. MPO, hidrojen peroksit substratının oksidatif potansiyelini genişletir (94, 95).

Miyeloperoksidazın ateroskleroz sürecinde oynadığı rol aşağıdaki gibidir;

Miyeloperoksidaz, LDL kolesterolü okside ederek makrofajların köpük hücrelerini oluşturmaları için uygun hale getirir (96). Miyeloperoksidazın aterosklerozun gelişiminde temel taş olan endotel fonksiyon bozukluğu

oluşumuna yararı vardır. Miyeloperoksidaz endotel kaynaklı nitrik oksidi katalize ederek tüketir ve endotel hücrelerinin vazodilatör ve antiinflamatuvar fonksiyonları bozulur (97,98). Miyeloperoksidaz aterosklerotik plak yüzeyinin destabilize ve rüptüre yatkın olmasını sağlayan metalloproteinazların aktive olmasına yardımcı olur (99) (Şekil 5).



Şekil 5. Miyeloperoksidaz ve Koroner Arter Hastalığı Arasındaki İlişki (100).

Bundan dolayı kardiyovasküler hastalıkların belirlenmesinde önemli bir belirteç olarak görülmektedir.

3.6. Matriks Metalloproteinaz Enzimi ve Koroner Arter Hastalığı

Matriks metalloproteinazların koroner arter hastalarının etiyolojisinde rol aldıkları; aterogeneze, plak rüptüründe ve tromboz da etkinliği düşünülmektedir (101). Aterosklerozun ilerlemesinde tromboz ve matriks depozisyonu yoluyla bozulmuş fibrinoliz de görev almaktadır (102). Aktif durumda olmayan düz kas hücrelerinde sadece MMP-2 eksprese edildiği ve MMP-3, MMP-7, MMP-9,

MMP-13 gibi diğerlerinin ekspresyonunun ise sadece hasarlı, transplante edilmiş yada aterosklerotik dokularda artış gösterdiği görülmüştür (103).

Ateroskleroz ve restenozun patogeneğinde vasküler şekillenmenin olmaması veya kararsızlığı da rol oynar. Aterosklerotik plaklarda MMP ekspresyonunun artışına da rastlanmıştır. Hipoteze göre; MMP'lerin aktive olması ateroskerozu, plak destabilizasyonunu ve trombosit agregasyonunu kolaylaştırmıştır. Araştırmalarda MMP'lerin bölgesel olarak fazla miktarda eksprese edilmesinin aterosklerotik plaklarda destabilizasyona ve komplikasyonlara neden olduğu bulunmuştur (104).

MMP-3 ve MMP-9'un plak büyümesini sınırlayıp, sağlam bir plak fenotipi oluşturdıkları ve koruyucu bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. MMP-12 ise lezyonun genişlemesine ve destabilizasyonuna sebep olmuştur. Ama aterosklerozda plak instabilitesinde ve yıkımında MMP-2'nin rol aldığı belirlenmiştir (104).

Akut miyokardial enfarktüs ve anstabil anjinası olan hastalarda dolaşımdaki MMP seviyeleri değişkenlik göstermektedir (104).

Bu çalışmanın amacı; Elazığ bölgesinde yaşayan ve gerek beslenme koşulları gerekse sosyal konumları açısından farklılık gösteren sağlıklı ve koroner arter hastalığı olan kişilerde Miyeloperoksidaz 463 G/A gen polimorfizm sıklığını belirlemek ve koroner arter hastalıkları ile MPO gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır. Ayrıca çalışmada koroner arter hastalıklarının patogeneğinde rol oynayan Matriks Metalloproteinaz 9 ve Miyeloperoksidaz düzeylerini her iki grupta belirlemek ve bu parametrelerin düzeyleri ile MPO gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi açıklamak amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Çalışma Protokolü

4.1.1. Hasta ve Kontrol Grupları için Örnek Seçimi

Çalışmada hasta ve kontrol grubu; Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalına başvuran hastaların; Koroner Arter Hastalıkları riski açısından değerlendirilmesine bağlı olarak oluşturuldu. Yaşları 18-80 yaş arasında değişen anjiyografik olarak koroner arter hastalığı tanısı konmuş yaklaşık 88 hasta ile yine anjiyografi sonucu koroner arter hastalığı olmadığı tespit edilmiş; herhangi bir iskemik kalb hastalığı olmayan, hipertansiyon, lipid anomali, metabolik rahatsızlık (Diabetes mellitus, böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği v.b) ve ailede iskemik kalb hastalığı bulgusu olmayan yaklaşık 88 sağlıklı bireyden hasta ve kontrol grupları oluşturulmuştur. Çalışma için; Fırat Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığına başvuru yapılmıştır. İlgili etik kurulun 12.07.2012 tarih ve 12/10 sayılı kararı ile çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna dair izin alınmıştır. Tez çalışmasına dahil edilen her birey çalışma hakkında bilgilendirilerek onay formu düzenlenmiştir. Tez çalışması için gerekli maddi destek Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimince desteklenen TF 12.87 no'lu proje ile sağlanmıştır.

4.1.2. Biyokimyasal Analizler için Numunelerin Hazırlanması

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin anamnezleri alınarak sistolik ve diyastolik kan basınçları ölçülerek aile hikayeleri yönünden sorgulandı.

Plazmada: Çalışmaya dahil edilen bireylerden, K₃-EDTA içeren tüpe 2 mL kan örneği alındı. K₃-EDTA içeren kan örneği 2500 rpm’de, +4°C’de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Miyeloperoksidaz ve Matriks Metalloproteinaz 9 düzeyleri plazmada tayin edildi.

Serumda: Çalışmaya dahil edilen bireylerden, antikoagülan içermeyen biyokimya tüpüne 3 mL kan örneği alındı. Kan örneği 2500 rpm’de, +4°C’de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Total Kolesterol, HDL Kolesterol, LDL Kolesterol, VLDL Kolesterol ve Trigliserid düzeyleri tayin edildi.

DNA İzolasyonu: Çalışmaya dahil edilen bireylerden, K₃-EDTA içeren tüpe 2 mL kan örneği alındı. K₃-EDTA içeren kan örnekleri DNA izolasyonu için tüm plazma ve serumlar çalışma gününe kadar -20°C’de saklandı.

4.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup marka ve katalog numaraları aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Üretici Firma ve Ürün Kodu
Agaroz	Vivantis AGG-431
Borik Asit	Merck A857165721
DNA Marker	Fermantas
DNTP	Vivantis
Tag DNA Polimeraz	Vivantis 2054
Yükleme boyası 6X Loading	Fermantas 00092036
Tris Baz	MeckK37574587738
Jel Red Dropper	Olerup SSP 28S
Primer 1	İnvitrogen E6907H11
Primer 2	İnvitrogen E6907H12
ACİL Kesim Enzimi	ThermoScientific 00121797
Steril Distile Su	Eczacıbaşı G1108025
DNA İzolasyon kiti	Zymo Research Katalog No: D 3073

4.1.4. Kullanılan Gereçler

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ile marka ve modelleri aşağıda verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan Gereçler

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Elektroforez sistemi ve Güç kaynağı	BİO-RAD
Analitik Terazı	Sartorius
ELİSA Cihazı	BiotekELX800
Manyetik karıştırıcı	Elektromag
Mikrodalga Fırın	Arçelik MD565S
Su banyosu	Kotterman
Bilgisayar	Queen
Jel görüntüleme sistemi	BİO-RAD
Thermal Cycler	BİO -RAD
Otomatik Pipet takımı	Brand
Vorteks	Nüve
Biospec-nano	Shimadzu Biotech 230V

4.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Üretici firmanın (Zymo Research Katalog No: D 3073) kit protokolüne uygun olarak izole edildi ve çalışma gününe kadar +4°C de bekletildi.

- Oda sıcaklığına gelen kan örnekleri 100 µL alınıp tüplere konuldu.
- Daha sonra üzerine 400 µL genomik lysis buffer eklendi. 4-6 saniye karıştırıldı ve 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Karışım Zymo-spin IIC kolonuna aktarıldı. 10000 g de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı.
- Zymo- spin IIC kolonu yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Ve üzerine 200 µL DNA pre-wash buffer eklendi 10000 g de 1 dakika santrifüj edildi toplama tüpü atıldı.

- Zymo- spin IIC kolonu yeni bir toplama tüpüne koyuldu ve üzerine 500 µL g-DNA wash buffer eklendi. 10000 g de 1 dakika santrifüj edildi.
- Zymo-spin IIC kolonu başka bir toplama tüpüne koyuldu ve üzerine 50 µL elution buffer eklendi. 2-5 dakika oda ısısında beklendi. 1 dakika 10000 g'de santrifüj edildi. Zymo-spin IIC kolonu atıldı.
- Toplama tüpüne DNA aktarıldı.

4.2.1.DNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi

DNA örnekleri Tris-EDTA çözeltisi ile 1/100 oranında sulandırıldı. Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve kansantrasyonu belirlendi. 50 µg/mL (50ng/ µL) çift iplikli DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda vermiş olduğu absorbans değerinin 1 optik yoğunluğu (OD) olduğu kabul edilmiştir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu bulunmuştur.

$$\text{DNA Konsantrasyonu: } OD_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times \text{Sulandırma oranı (100)}$$

DNA örneklerinin saflığı ise OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak bulundu. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD_{260}/OD_{280} değeri 1,7 -1,8 arasında olmalıdır. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,7'den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamındadır. Saf olmayan DNA'lara temizleme işlemi uygulandı.

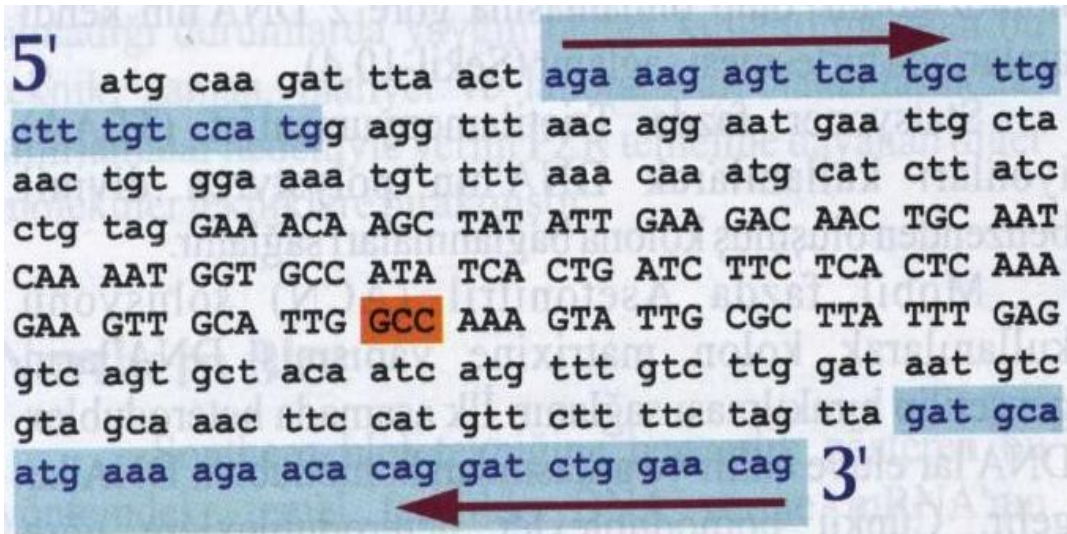
4.3. Miyeloperoksidaz 463 -A/G Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle Çoğaltılması

Çalışma grubunu oluşturan kişilerin kanından izole edilen DNA örneklerinde Miyeloperoksidaz (MPO) Gen polimorfizmi (-463 G/A genotipleri)

belirlendi. Gen polimorfizmi; Nikpoor ve arkadaşlarının (6) yöntemine göre uygun oligonukleotid primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile saptandı.

4.3.1. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, hedeflenmiş DNA veya RNA dizisinin, uygun primerler ve ortam sayesinde in vitro koşullarda klonlanması işlemidir. Bilindiği gibi, herhangi bir DNA bölgesinin hem 5' hem de 3' ucu bulunur. PCR tekniğinde de çoğaltılması istenen DNA dizisinin ilgilenilen mutasyon ve noktasının arada kalması koşuluyla kullanılan 5' ve 3' primerler, aynı bölgedeki DNA dizisine karşılık gelecek şekilde dizayn edilmiştir.



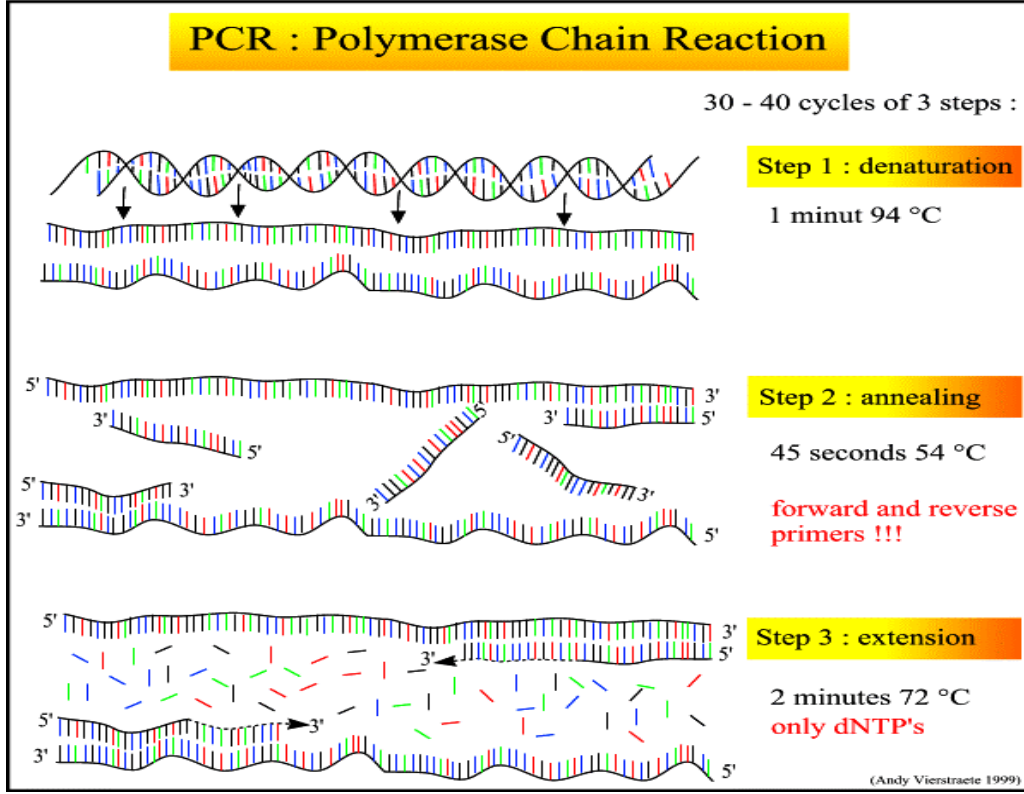
Şekil 6. Primer ve Fonksiyonları (105)

PCR tüplerine konulan genomik DNA, termal cykler olarak tanımlanan PCR cihazında ilk önce tek zincirli hale dönüştürülmek amacıyla 95 °C'ye programlanarak ısı ile denaturasyon sağlanır. Daha sonra primer hibridizasyonu ve en son basamakta ise DNA polimeraz ve uygun deoksi trinükleotidlerin ilavesiyle zincir uzaması şeklinde döngü tamamlanır.

Bu işlem yaklaşık olarak 30 kez tekrarlanacak şekilde programlanarak, çok miktarda hedeflenmiş özgün DNA klonları elde edilir. PCR reaksiyonunda çoğaltılacak DNA'ya oranla primerlerin ortama daha fazla eklenmesi gerekir. Reaksiyondaki her döngü; DNA denaturasyonu, primer bağlanması ve primerlerin uzaması olarak adlandırılan ekstension' dan oluşan 3 evreden oluşmaktadır.

Birinci evre olan DNA denaturasyonu aşamasında, çift sarmallı konumda olan DNA zincirlerini bir arada tutan hidrojen bağlarının yıkılması amacıyla 94-100 °C arasında fragmanın uzunluğuna göre değişen sürede ısıtılması gerekir. Denature olan DNA molekülü, tek zincirli hale dönüşerek hedef diziye göre hazırlanmış primerlerin bağlanacağı kalıp olarak hazır hale gelir. Seçilen primerlerin uzunluğu 18–24 baz arasında değişmekle birlikte genellikle kullanılan genomik DNA'nın başka bir bölgesiyle istenmeyen hibridizasyonu önlemek amacıyla bu uzunluk baz kompozisyonunun elverdiği oranda 20 den fazla tutulmaya çalışılır. Son zamanlarda primerlerden kaynaklanan olumsuzlukların önlenmesi amacıyla, primer dizaynı için geliştirilmiş bilgisayar programlarından yararlanılır.

PCR; hız, kullanım kolaylığı, duyarlılık gibi avantajları taşımakla birlikte, çoğaltılacak bölge dizisinin bilinme zorunluluğu, sınırlı büyüklükteki bölgelerin çoğaltılabilmesi ve PCR ürününün miktar olarak sınırlanmış olması gibi nedenlerle de dezavantajlar taşıyan tekniktir. Ancak, Real Time PCR tekniğinde, bilinmeyen mutasyonların taranması mümkündür (103).



Şekil 7. Polimeraz Zincir Reaksiyon Basamakları (105).

4.3.2. PCR Çalışması İçin Hazırlanan Çözeltiler

4.3.2.1 Tris Baz-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetik Asit Tamponu

(5X)

27,2 gram TRİS, 13,6 gram borik asit, 2,35 gram EDTA analitik terazide tartılarak 500 mL'lik bir balonjojeye konuldu üzerine bir miktar distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımı karıştırılarak maddelerin çözünmesi sağlandı ve son hacim 500 mL; pH 8 olacak şekilde ayarlandı. Bu çözelti; Tris Baz-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetik Asit tamponu (5X TBE) olarak kullanılacaktır.

4.3.2.2. Tris Baz-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetik Asit Tamponu (1X)

Hazırlanmış 500 mL'lik 5X TBE çözeltisi 1/5 oranında dilüe edilerek 1X TBE çözeltisi hazırlandı.

4.3.2.3. Agaroz Jel Çözeltisi

6 gram agaroz tartılarak bir behere konuldu üzerine 300 mL 1X TBE eklendi. Mikrodalga fırında çözülünceye kadar ısıtıldı çözülen agarozlu çözelti soğutulduktan sonra üzerine 10 damla jel red dropper damlatıldı. Taraklara yerleştirilmiş olan jel tankına agaraz jel çözeltisi döküldü. Soğuması ve donması için 1 saat bekletildi. Donan jel taraklarından çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi.

4.3.2.4. DNA Marker Çözeltisi

DNA marker çözeltisi hazırlamak için 14 μ L 1X TBE çözeltisi ile 4 μ L yükleme boyası ve 3,5 μ L marker parafilm üzerinde karıştırıldı.

4.3.2.5. Primer Hazırlanması

Primer 1 (Forward) olarak Invitrogen marka primer kullanıldı. Liyofilize şeklindeki 206.6 nmol/L olan primere 2066 μ L steril distile su eklendi iyice karıştırıldı 100 pmol/L ana stok hazırlandı daha sonra hazırlanan ana stoktan 30 μ L alınarak 100 μ L'ye tamamlandı ve 30 pmol/L'lik bir primer çözeltisi hazırlandı.

Primer2 (Reverse) olarak Invitrogen marka primer kullanıldı. Liyofilize şeklindeki 141.5 nmol/L olan primere 1415 μ L steril distile su eklendi iyice karıştırıldı 100 pmol/L ana stok hazırlandı bu ana stoktan 30 μ L alınarak 100 μ L'ye tamamlandı ve 30 pmol/L'lik bir primer çözeltisi hazırlandı.

4.3.2.6. PCR Ürün Karışımının Hazırlanması

PCR ürünü Vivantis marka Tag DNA Polimeraz enzimi kullanılarak hazırlandı.

Tablo 3. PCR Ürününün Hazırlanması

PCR Ürünleri	Miktar
Primer 1	0,5 µL
Primer 2	0,5 µL
MgCl ₂ (50mM)	1,25 µL
dNTP (2,5mM)	1,25 µL
10X Tampon	2,5 µL
Tag DNA Polimeraz	0,125 µL
Steril Distile Su	16,5 µL
DNA	2,5 µL
Toplam	25,125 µL

Tablo 4. Gradient PCR Bağlanma Sıcaklıkları

Gradient PCR °C							
50	52	54	56	58	60	62	64

Hazırlanan PCR ürünü gradient sıcaklıklarına yerleştirildi ve PCR cihazında çoğaltıldı daha sonra çoğalan PCR ürünleri agaroz jele yüklendi. Yükleme işlemi parafilm üzerine 4 µL yükleme boyası konuldu ve PCR ürününden 20 µL alındı ve parafilm üzerinde karıştırıldı. Önceden elektroforez tankına konulan agaroz jelin üzeri 1X TBE ile dolduruldu. Daha sonra parafilm üzerinde yükleme boyasıyla karıştırılmış olan PCR ürününden 20 µL alınıp kuyucuklara teker teker yüklendi en baştaki kuyucuğa DNA marker'ı konuldu ve 135 volt 75 mA de 2 saat boyunca elektroforeze tabi tutuldu. Süre sonunda jel elektroforez tankından alınarak UV Transluminatör altında incelendi ve en parlak

olan bantın sıcaklığı bizim genimizin en iyi çoğaldığı sıcaklık derecesi olarak belirlendi. Optimum sıcaklık 60°C olarak saptanarak bu sıcaklıkta örnekler çoğaltıldı. Çoğalan PCR bantları 350 bp de bant verdiler.

Tablo 5. PCR ın Çoğalma Sıcaklık ve Döngüleri

Sıcaklık (°C)	Zaman (süre)	Döngü Sayısı
94	5 dk	1
94	40 sn	35
60	40 sn	35
72	40 sn	35
72	3 dk	1

4.3.2.7. Acil Restriksiyon Enzim Reaksiyonu

Miyeloperoksidaz geninin promotor bölgesinde bulunan -463 (G/A) polimorfizminde, bireylerin genotipleri PCR'ye dayalı Acil restriksiyon enzimi ile yapılmıştır. Acil enzimi ile yapılan kesimden sonra örnekler 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

MPO -463 (G/A) promotor polimorfizmini belirlemek üzere Acil (10U/μL) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Acil enziminin tanıma dizisi aşağıdaki gibidir:

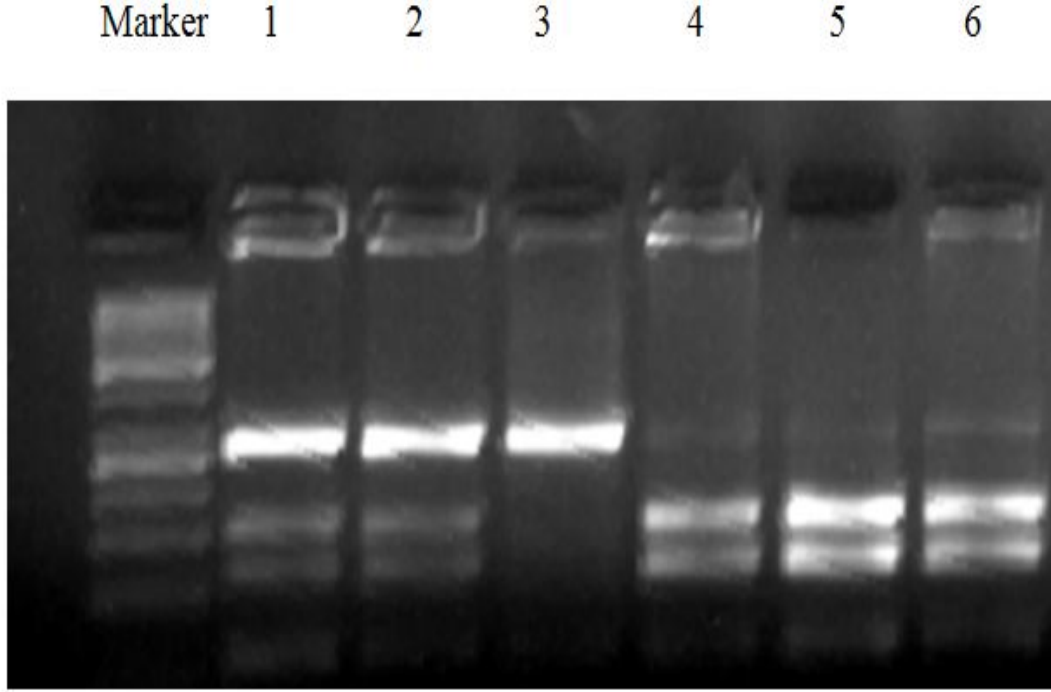
5'...C 5'CGC...3'

3'...GGC 3'G...5'

Tablo 6. Acil Kesim Enzimi Uygulama Prosedürü

Restriksiyon Prosedürü	Kesim Ürünü
Distile Su	18 μL
Emzim Tamponu	2 μL
Restriksiyon Enzimi	1 μL
PCR Ürünü	10 μL
Toplam Hacim	31μL

Bir gece 37⁰C de bekledikten sonra kesim yapılmış olan PCR ürünleri jele yüklendi ve elektroforez de yürütüldü. Aşağıdaki bantlar gözlemlendi.



Şekil 8. Miyeloperoksidaz -463G/A polimorfizmi için PCR jel görüntüsü.

(Marker 50bç' lık ilk bant)

(AA genotip 289 bç; Sıra: 3)

(GA genotipi 289bç, 169bç;120bç; Sıra: 1, 2)

(GG genotipi 169bç, 120bç; Sıra: 4, 5, 6)

4.3. Biyokimyasal Analizler

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin biyokimyasal analizleri Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapılmıştır. Analiz yapılan parametreler olan serum Total Kolesterol, HDL Kolesterol, LDL Kolesterol ile Trigliserid düzeyleri Siemens marka test kitleri kullanılarak Advia 1800 model klinik kimya analizörü yardımı ile tayin edilmiştir. VLDL Kolesterol düzeyleri ise Trigliserid düzeyleri aracılığı ile hesaplanmıştır.

4.4. ELISA Yöntemi

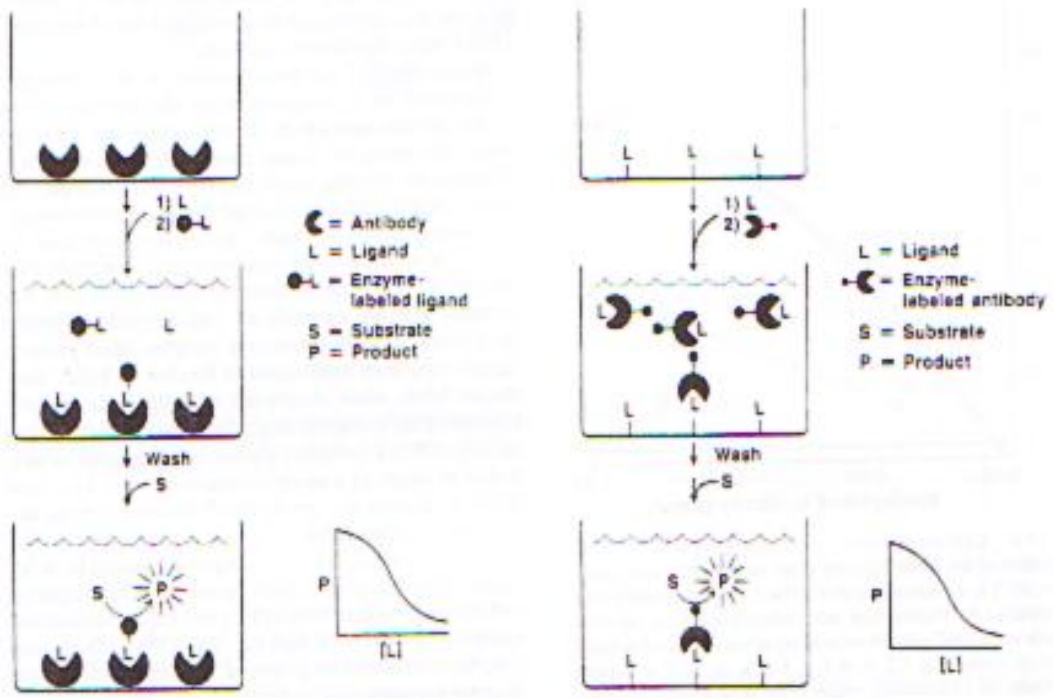
ELISA yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanması reaksiyonu ile antikorlara alkalen fosfataz veya horseradish peroksidaz gibi bir enzim bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğidir.

ELISA yönteminde özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarını, özgül antijen kullanarak örnekteki antikorum miktarını ölçebiliriz. ELISA yöntemi, çeşitli şekillerde uygulanabilir.

Kompetitif ölçümde;

Ölçüm tüpünde bir katı destek üzerine bir antijen veya antikor adsorbe edilmiştir (immobilize antijen veya antikor). Ölçüm tüpüne serum (işaretsiz ligand içerir) ve reaktif (enzim işaretli ligand* içerir) pipetlenir. Kısa inkübasyon süresince immobilize antijen veya antikora bağlanmak için işaretsiz ligand ile enzim işaretli ligand* yarışır; antijen (veya antikor)-işaretsiz ligand ve antijen (veya antikor)-enzim işaretli ligand* kompleksleri oluşur. Yıkama ile antijen (veya antikor)-işaretsiz ligand ve antijen (veya antikor)-enzim işaretli ligand* kompleksleri dışındaki ürünler ortamdan uzaklaştırılır. Enzimin substratı ortama eklenir. Renkli ürün oluşumu end-point veya kinetik ölçümle izlenerek ölçülür. Renkli ürün oluşumu, işaretsiz ligandın (serumdaki antijen veya antikor) konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Standart grafikten konsantrasyon belirlenir.

Kompetitif ELISA yöntemi, sıklıkla antikor ölçümünde kullanılmaktadır; bu durumda ölçüm tüpünün iç duvarı antijen ile kaplıdır.



Şekil 9. ELISA Yöntemi (106)

Nonkompetitif ölçümde (sandwich yöntemi);

Polistren ölçüm tüplerinin iç duvarına antijen için spesifik antikorlar fazla miktarda adsorbe edilmiştir (immobilize antikorlar). Ölçüm tüpüne örnek pipetlenir. İnkübasyon süresince örnekteki antijenlerin hepsi immobilize antikorlar tarafından bağlanırlar; antikor-antijen kompleksleri oluşur. Yıkama ile antikor-antijen kompleksleri dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır. Ölçüm tüpüne reaktif (enzim işaretli antikor* içerir) pipetlenir. İkinci inkübasyon süresince primer antikor-antijen- enzim işaretli antikor* kompleksi oluşur. Yıkama ile primer antikor-antijen- enzim işaretli antikor* kompleksi dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır.

Enzimin substratı ortama eklenir. Renkli ürün oluşumu end-point veya kinetik ölçümle izlenerek ölçülür. Renkli ürün oluşumu, işaretli ligandın

(serumdaki antijen veya antikor) konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Standart grafikten konsantrasyon belirlenir (106).

4.4.1. Miyeloperoksidaz ve Matriks Metalloproteinaz 9 Düzeylerinin Tayini

Plazma Miyeloperoksidaz (Katalog No: EK0850) ve Matriks Metalloproteinaz 9 (Katalog No: EK0465) düzeyleri ELİZA yöntemi kullanılarak Boster marka test kitleri kullanılarak tayin edildi.

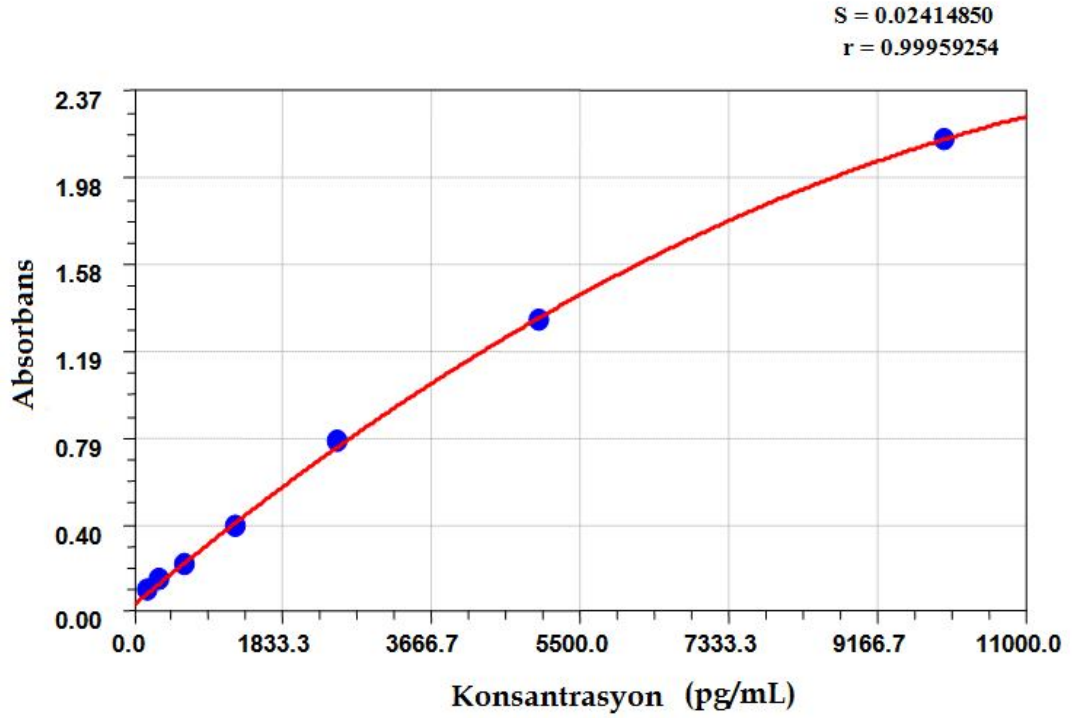
4.4.2. Plazma Matriks Metalloproteinaz 9 Düzeylerinin Tayini

Plazma örneklerinde MMP-9 düzeyleri kit protokülüne uygun olarak yapılmıştır.

Kit Çalışma Prosedürü

1. Örnekler 1/10 oranında sulandırılmıştır.
2. Kuyucuklara 100 µL örnek yüklenmiştir.
3. Plate'nin üstü kapatılıp 37⁰ de 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
4. Aspirasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
5. Her kuyucuğa 100 µL biotinli anti-human MMP-9 ilave edilip 37⁰ de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
6. Yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır.
7. Her kuyucuğa 100 µL ABC çalışma solüsyonu eklenmiş ve 37⁰ de yarım saat inkübasyona bırakılmıştır.
8. Plate 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.
9. Her kuyucuğa 90 µL TMB color developing agent eklenip 37⁰ de yarım saat inkübasyona bırakılmıştır.

10. Her kuyucuğa 90 µL TMB stop solüsyonu eklenmiştir. (Renk hemen sarıya dönüşmüştür.
11. Referans olarak 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okuma yapılmıştır.



Şekil 10. MMP-9 Tayini İçin Standart Eğri

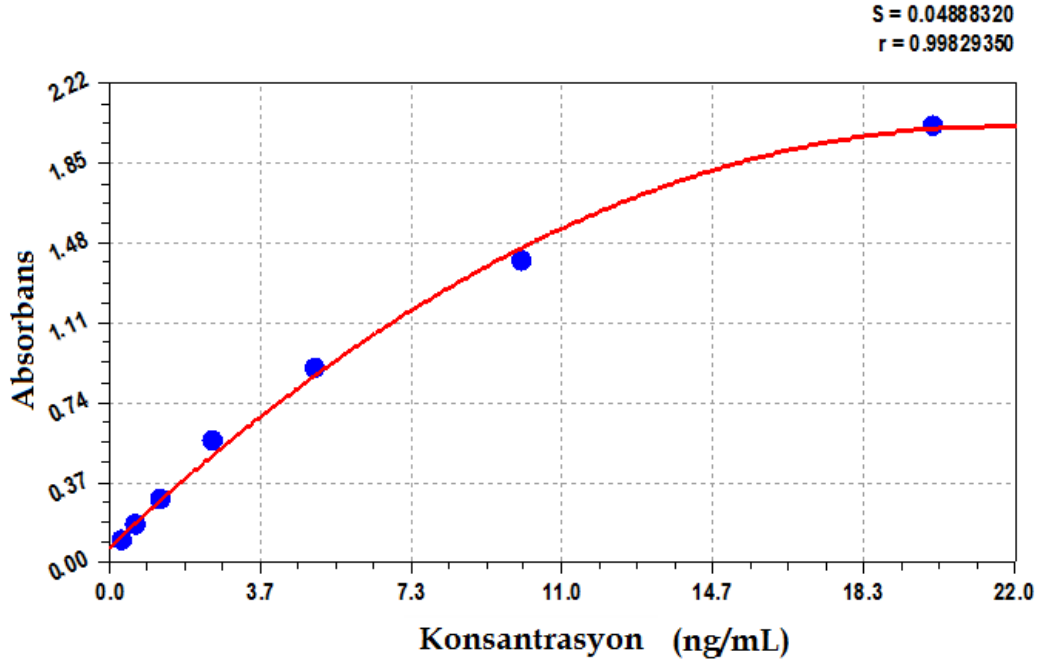
4.4.3. Plazma Miyeloperoksidaz Düzeylerinin Tayini

Plazma örneklerinde Miyeloproksidaz düzeyleri kit protokülüne uygun olarak yapılmıştır.

Kit Çalışma Prosedürü

1. Örnekler 1/10 oranında sulandırılmıştır
2. Kuyucuklara 100 µL örnek yüklenmiştir.
3. Plate'nin üstü kapatılıp 37⁰ de 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
4. Aspirasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

5. Her kuyucuğa 100 µL biotinli anti-human MPO ilave edilip 37⁰ de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
6. Yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır.
7. Her kuyucuğa 100 µL ABC çalışma solüsyonu eklenmiş ve 37⁰ de yarım saat inkübasyona bırakılmıştır.
8. Plate 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.
9. Her kuyucuğa 90 µL TMB color developing agent eklenip 37⁰ de yarım saat inkübasyona bırakılmıştır.
10. Her kuyucuğa 90 µL TMB stop solüsyonu eklenmiştir. (Renk hemen sarıya dönüşmüştür.)
11. Referans olarak 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okuma yapılmıştır.



Şekil 11. MPO Tayini İçin Standart Eğri

4.5. İstatistiksel Değerlendirme

Bu tez çalışmasında istatistiksel değerlendirme; Fırat Üniversitesi Lisanslı (193.255.124.131) IBM SPSS 21.0 paket program kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Genotip ve allellerin görülme sıklığının gruplararası farklılıklarını değerlendirmede Ki kare ve Fischer testi kullanılmıştır. Genotip ve allellerin aktivite üzerindeki etkilerini belirlemede Student's t testi ve ANOVA testleri kullanılmıştır. Allel frekansları gen sayma metodu ve Hardy-Weinberg metoduna göre yapılmıştır.

5. BULGULAR

Tez çalışma gruplarını oluşturan koroner arter hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubuna ait demografik bilgiler ve biyokimyasal parametrelere ait bulgularımız karşılaştırmalı olarak Tablo 7. de verilmiştir.

Tablo 7. Kontrol ve Koroner Arter Hasta Gruplarındaki Bireylerin Demografik Özelliklerin Karşılaştırması

Demografik Özellikler	KONTROL (n:88)	KAH (n:88)	P
Cinsiyet (Kadın/ Erkek)	43 (%48,9)/45 (%51,1)	34 (%38,6)/54 (%61,4)	0,224
Sigara Var/Yok (%)	11 (%12,10)/77 (%87,8)	34 (%38,59)/54 (%61,41)	0,008*
Hipertansiyon Var/Yok (%)	18 (%21)/60 (%79)	27 (%31)/61 (%69)	0,290
Yaş (Yıl)	50,215±11,412	62,670±11,818	0,000**
Sistolik Basınç (mmHg)	119,848±15,435	126,842±23,841	0,032*
Diastolik Basınç (mmHg)	74,848±11,489	79,473±10,423	0,332
Total Kolesterol (mg/dL)	175,443±51,174	206,545±51,013	0,000**
HDL Kolesterol (mg/dL)	45,243±9,101	42,417±14,847	0,130
LDL Kolesterol (mg/dL)	114,837±44,160	132,442±40,649	0,007*
VLDL Kolesterol (mg/dL)	32,409±27,647	31,759±22,763	0,529
Trigliserid (mg/dL)	150,056±97,378	160,170±114,772	0,529

*p<0,05, **p<0,001

İstatistiksel analizler sonrasında kontrol ve koroner arter hasta grupları demografik özellikler açısından karşılaştırıldığında (Tablo 7); bireylerin cinsiyete bağlı olarak dağılımı kontrol grubunda %48,9 Kadın ve % 51,1 Erkek; KAH grubunda ise %38,6 Kadın ve % 61,4 Erkek olarak bulunmuştur. Tez çalışmasında Kontrol grubunun yaş ortalaması 50,215±11,412; KAH grubunun yaş ortalaması 62,670±11,818 olup gruplar arası farklılık istatistiksel olarak önemlidir (p<0,001). Çalışma grubunda yer alan bireylerin cinsiyete bağımlı olarak sigara kullanım oranlarının KAH grubunda daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (p<0.05). KAH grubundaki bireylerin Sistolik Kan basınç değerlerinin Kontrol grubunda daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı

olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Buna karşılık Diastolik Kan basıncı değerleri ile Hipertansiyonun gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır (Tablo 7) ($p>0.05$). Serum Total Kolesterol düzeylerinin; KAH grubunda ($206,545\pm51,013$) kontrol grubuna göre ($175,443\pm51,174$); istatistiksel yönden anlamlı olarak arttığı saptanmıştır ($p<0,001$). Aynı şekilde Serum LDL Kolesterol düzeyleri KAH grubunda kontrol grubuna göre ($132,442\pm40,649$ & $114,837\pm44,160$) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur($p<0.05$). Serum HDL Kolesterol, VLDL Kolesterol ve Trigliserid düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 8. Miyeloperoksidaz Gen Polimorfizmi Genotip ve Allel Frekansının Hasta ve Kontrol Grubunda Dağılımı

MİYELOPEROKSİDAZ	KONTROL (%)	KAH (%)
GG Genotipi	63 (% 71,6)	64 (% 72,7)
AG Genotipi	23 (% 26,1)	21 (% 23,9)
AA Genotipi	2 (%2,3)	3 (% 3,4)
G Alleli	149 (%84,66)	149 (%84,66)
A Alleli	27 (%15,34)	27 (%15,34)

Miyeloperoksidaz gen polimorfizmine ait genotip frekansı koroner arter hasta grubunda; GG % 72,7, AG % 23,9, AA % 3,4 iken, kontrol grubunda GG % 71.6, AG % 26.1, AA % 2.3 olarak bulunmuştur (Tablo 8). Miyeloperoksidaz - 463 G/A polimorfizmi için G alel frekansı hasta grubunda ve kontrol grubunda (%84.66) olarak hesaplandı. A alel frekansı ise hasta grubunda ve kontrol grubunda (%15.34) olarak bulundu.

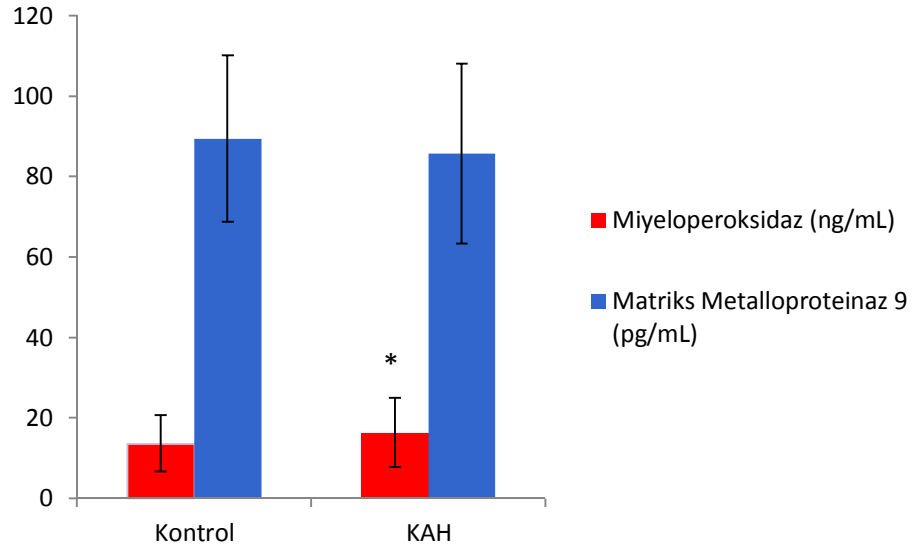
Miyeloperoksidaz gen polimorfizmi genotip frekansı yönünden değerlendirildiğinde; kontrol grubunda 63 bireyin GG, 23 bireyin AG, 2 bireyinde AA genotiplerine sahip olduğu koroner arter hastalarında ise 64 bireyin GG, 21 bireyin AG, 3 bireyinde AA genotipine sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 8).

Miyeloperoksidaz gen polimorfizmi, koroner arter hastaları ve kontrol grubunda karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($X^2=0,299$, $p=0,861$).

Tablo 9. Kontrol ve Koroner Arter Hasta Gruplarında Bulunan Bireylerin Plazma Miyeloperoksidaz ve Matriks-Metalloproteinaz-9 Düzeyleri

	KONTROL (n:88)	KAH (n:88)	p
Miyeloperoksidaz (ng/mL)	13,638±7,006	16,381±8,578	0,021*
MMP- 9 (pg/mL)	89,464±20,652	85,747±22,376	0,254

* $p<0,05$



Şekil 12. Kontrol ve Koroner Arter Hastalarında Plazma MPO ve MMP-9 Düzeyleri.

Kontrol grubu ve koroner arter hasta grubu plazma miyeleloperoksidaz düzeyleri yönünden karşılaştırıldığında (13,638±7,006 & 16,381±8,578, $p<0,05$)

KAH grubunda artmış olarak gözlemlenmiş olup aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 9).

Kontrol grubu ve koroner arter hasta grubu plazma Matriks Metalloproteinaz-9 düzeyleri yönünden karşılaştırıldığında ($89,464 \pm 20,652$ & $85,747 \pm 22,376$, $p > 0.05$) aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 9).

Tablo 10. Kontrol Grubu ve Koroner Arter Grubunda Lipit Sınır Değerlerinin Dağılımı

LİPİD DEĞERLERİ	KONTROL	KAH	p
TC<200	62 (%70,5)	47 (%53,4)	0,00**
TC>200	26 (%29,5)	41 (%46,6)	
HDL-C<35	4 (%4,5)	26 (%29,5)	0,130
HDL-C>35	84 (%95,5)	62 (%70,5)	
LDL-C<130	58 (%6,9)	46 (%52,3)	0,007*
LDL-C>130	30 (%34,1)	42 (%47,7)	
TG<100	24 (%27,3)	26 (%29,5)	0,529
TG>100	64 (%72,7)	62 (%70,5)	

* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Kontrol ve koroner arter hasta gruplarında hiperlipidemiler de sınır değer olarak kabul edilen değerlerin altında ve üstünde yer alan birey sayısı ve yüzdesi Tablo 10’de verilmiştir. KAH grubunda; Total Kolesterol düzeyleri 200 mg/dL’den büyük olan birey sayısı kontrol grubundan daha fazla olması nedeni ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0,001$). Triglicerid düzeyleri açısından değerlendirme yapıldığında; Triglicerid düzeyleri 100 mg/dL’den yüksek olan kontrol ve KAH grubunda yer alan bireyler karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$). Aynı değerlendirme LDL Kolesterol düzeyleri 130 mg/dL’den yüksek olan bireyler arasında yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık

bulunmuştur ($p<0,05$). HDL Kolesterol düzeyleri açısından gruplara arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 11. Kontrol Grubunda Miyeloperoksidaz Gen Polimorfizmi Varyantlarının Karakteristik Özellikleri ve Risk Faktörleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

KONTROL GRUBU				
	GG (n:63)	AG (n:23)	AA (n:2)	p
Sistolik Basınç (mmHg)	114,000±23,033	120,454±13,866	110,000±0,000	0,634
Diastolik Basınç (mmHg)	65,700±30,241	71,818±9,816	70,000±0,000	0,800
Total Kolesterol (mg/dL)	171,825±48,752	180,956±57,019	226,000±48,083	0,285
HDL-kolesterol (mg/dL)	45,133±9,521	44,478±7,260	57,500±10,606	0,150
LDL-kolesterol (mg/dL)	112,703±42,835	118,147±49,379	144,000±4,242	0,568
VLDL-kolesterol (mg/dL)	32,841±30,160	32,043±20,912	23,000±16,970	0,884
Trigliserid (mg/dL)	148,000±96,405	158,739±103,866	115,000±83,438	0,794

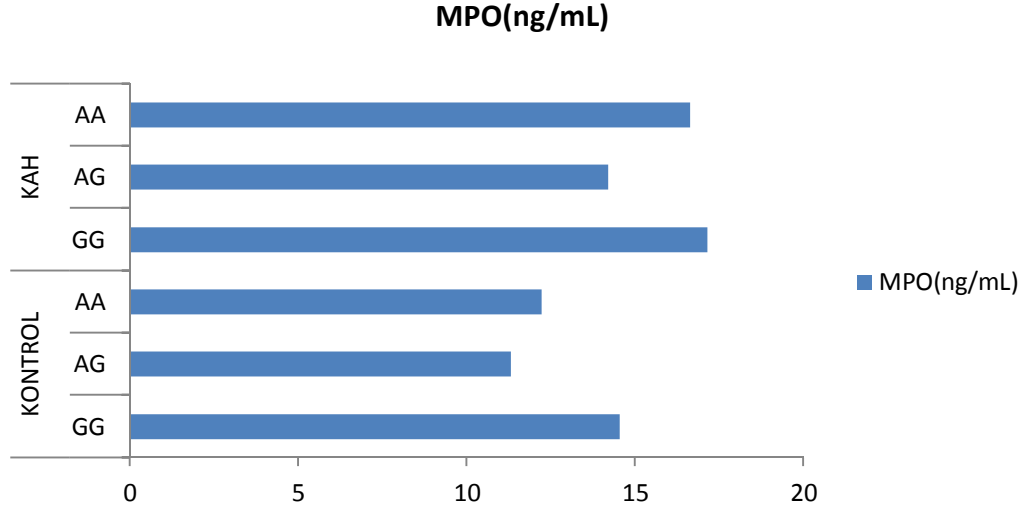
Kontrol grubunda miyeloperoksidaz gen polimorfizmine ait varyantların karakteristik özellikleri ve lipid parametreleri üzerine etkileri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 11).

Tablo 12. Koroner Arter Hasta Grubunda Miyeloperoksidaz Gen Polimorfizmi Varyantlarının Karakteristik Özellikleri ve Risk Faktörleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

KORONER ARTER HASTALIĞI GRUBU				
	GG (n:64)	AG (n:21)	AA (n:3)	p
Sistolik Basınç (mmHg)	127,111±24,459	125,833±22,343	123,436±20,489	0,871
Diastolik Basınç (mmHg)	80,222±10,332	76,666±10,730	75,333±9,248	0,298
Total-kolesterol (mg/dL)	207,265±55,281	203,761±40,552	210,666±19,218	0,955
HDL Kolesterol (mg/dL)	43,064±14,952	40,995±15,773	38,566±1,250	0,777
LDL Kolesterol (mg/dL)	132,295±41,530	131,714±41,381	140,666±17,785	0,938
VLDL Kolesterol (mg/dL)	31,637±25,290	30,190±11,413	45,333±28,041	0,563
Trigliserid (mg/dL)	160,218±127,690	150,571±57,211	226,333±138,363	0,570

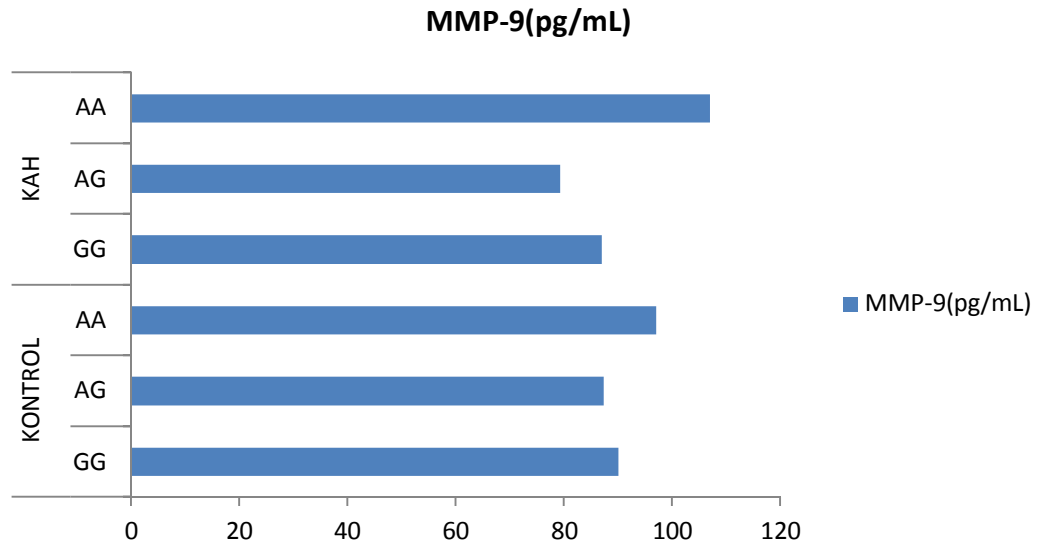
Koroner arter hasta grubunda miyeloperoksidaz gen polimorfizmine ait varyantların karakteristik özellikleri ve risk faktörleri ile lipid parametreleri

üzerine etkilerini incelediğimizde; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 12).



Şekil 13. Kontrol ve KAH grubunda Plazma Miyeloperoksidaz Düzeylerinin -463 G/A gen polimorfizm varyantlarına göre dağılımı.

Kontrol ve KAH grubunun plazma Miyeloperoksidaz düzeyleri ile -463 G/A polimorfizmi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$).



Şekil 14. Kontrol ve KAH grubunda Plazma Matriks Metalloprotein-9 düzeylerinin -463 G/A polimorfizm varyantlarına göre dağılımı

Kontrol ve KAH grubunun plazma MMP-9 düzeyleri ile -463 G/A polimorfizmi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$).

Kontrol grubunda miyeloperoksidaz gen polimorfizminin risk faktörleri üzerindeki etkilerini incelediğimizde, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0.05$) (Tablo 13).

Tablo 13. Kontrol Grubunda Miyeloperoksidaz Gen Polimorfizminin Risk Faktörleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

		KONTROL GRUBU			p
RİSK FAKTÖRLERİ		GG (n:63)	AG (n:23)	AA (n:2)	
Cinsiyet	Kadın	31 (%72,1)	12 (%27,9)	0 (%0,0)	0,365
	Erkek	32 (%71,1)	11 (24,4)	2 (%4,4)	
Sigara	(+)	2 (%40)	2 (%40)	1 (%20)	0,671
	(-)	61 (%73,5)	21 (%25,3)	1 (%1,2)	
Hipertansiyon	(+)	10 (%58,8)	6 (%35,30)	1 (%5,9)	0,691
	(-)	53 (%74,6)	17 (%23,9)	1 (%1,5)	
TC>200	(+)	16 (%61,5)	9 (%34,6)	1 (%3,8)	0,379
	(-)	47 (%75,8)	14 (%22,6)	1 (%1,6)	
HDL-C<35	(+)	4 (%100)	0 (%0,00)	0 (%0,00)	0,435
	(-)	59 (%70,2)	23 (%27,4)	2 (%2,4)	
LDL-C>130	(+)	18 (%60)	10 (%33,3)	2 (%6,7)	0,060
	(-)	45 (%77,6)	13 (%22,4)	0 (%0,00)	
TG>100	(+)	47 (%73,4)	16 (%25)	1 (%1,6)	0,688
	(-)	16 (%66,7)	7 (%29,2)	1 (%4,2)	

Koroner arter hasta grubunda miyeloperoksidaz gen polimorfizminin risk faktörleri üzerindeki etkileri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0.05$) (Tablo 14).

Tablo 14. Koroner Arter Hasta Grubunda Miyeloperoksidaz Gen Polimorfizminin Risk Faktörleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

KORONER ARTER HASTA GRUBU					
RİSK FAKTÖRLERİ		GG (n:64)	AG (n:21)	AA (n:3)	P
Cinsiyet	Kadın	25 (%73,5)	8 (%23,5)	1 (%2,9)	0,979
	Erkek	39 (%72,2)	13 (%24,1)	2 (%3,7)	
Sigara	(+)	25 (%75,8)	8 (%7,9)	0 (%0,0)	0,393
	(-)	39 (%70,9)	13 (%23,6)	3 (%5,5)	
Hipertansiyon	(+)	17 (%68,0)	7 (%28,0)	1 (%4,0)	0,821
	(-)	47 (%74,6)	14 (%22,2)	2 (%3,2)	
TC>200	(+)	29 (%70,7)	10 (%24,4)	2 (%4,9)	0,765
	(-)	35 (%74,5)	11 (%23,4)	1 (%2,1)	
HDL-<35	(+)	19 (%73,1)	7 (%26,9)	0 (%0,0)	0,496
	(-)	45 (%72,6)	14 (22,6)	3 (%4,8)	
LDL-C>130	(+)	29 (%69,0)	11 (%26,29)	2 (%4,8)	0,683
	(-)	35 (%76,1)	10 (%21,7)	1 (%2,2)	
TG>100	(+)	43 (%69,4)	16 (%25,8)	3 (%4,8)	0,383
	(-)	21 (%80,8)	5 (%19,2)	0 (%0,0)	

6. TARTIŞMA

Aterosklerotik koroner arter hastalığı çoğu ülkede en yaygın ölümcül hastalıklardan biridir. Yapılan çeşitli çalışmalarla hastalığın oluşumuna neden olan risk faktörleri ve etkileri incelenmiştir (107). Ateroskleroz gelişimine Hipertansiyon, Sigara, Total Kolesterol, HDL Kolesterol, LDL Kolesterol, VLDL Kolesterol ile Triglicerid, düzeylerinin değişimi, Ailesel Yatkınlık, Diyabet, oksidan-antioksidan faktörler neden olabilmektedir (108-112). MPO aktivitesinin değişimi endotelial hasara neden olarak nötrofil ve makrofajlarda aterosklerotik oluşumları artırır (113).

Brennan ve arkadaşları tarafından Göğüs ağrısı olan hastalarda yapılan bir çalışmada; akut miyokard infarktüsü tanısı konulan grubun MPO düzeylerinin yüksek olduğu ve kardiyovasküler olay gelişim riskinde artış gözlenmiştir (114). Çalışmamızda da plazma MPO düzeyleri kontrol grubuna göre koroner arter hasta grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Matriks metalloproteinaz (MMP) ailesinin bir üyesi olan MMP-9'ın plazma düzeyleri kontrol ve koroner arter hasta grubunda karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Miyeloperoksidaz 463 G/A gen polimorfizmi Sp1 band bölgesindeki bir bandın kaybedilmesi ve Adenin yerine Guanininin bağlanması ile oluşur. Sp1 güçlü bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmekte ve A alleli invitro ortamda düşük MPO ifadesi ile ilişkili olarak görülmektedir (115).

Asselbergs ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada artan kardiyovasküler hastalıklarının yüksek MPO düzeyleri ile ilgili olduğunu ve MPO düzeylerinin de GG genotipi ile ilgili olduğunu göstermiştir (116). Ergen ve arkadaşları ise

yaptıkları bir çalışmada koroner arter hastalığı olan kişilerde MPO düzeylerinin arttığını ve artış ile Miyeloproksidaz 463 G/A gen polimorfizmi arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığını ancak Total Kolesterol ve LDL Kolesterol düzeyleri ile sigara içiminin plazma miyeloproksidaz düzeylerindeki artışa katlı sağladığını belirtmiştir (117).

Çalışmamızda; -463 G/A gen polimorfizmi araştırılmış olup MPO genotiplerinin kontrol ve koroner arter hasta gurupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği bulunmuştur.

Stefaescua ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yüksek MPO düzeylerinin koroner arter risk profili ile çok ilişkili olduğu gösterilmiştir (118). Ayrıca Ndrepepa ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da MPO düzeylerinin, koroner arter hastalığı olan kişilerde artmış olduğu bulunmuştur (119)

Düzgünçinar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da MPO düzeyleri ile ateroskleroz arasındaki ilişki araştırılmış ve Türk popülasyonunda MPO düzeylerinin artışının Ateroskleroz derecesi ile ciddi bir ilişki gösterdiği açıklamıştır (120).

Ergen ve arkadaşları; koroner arter hastalığı olan kişileri ve sağlıklı kişileri MPO -463 G/A gen polimorfizmi açısından karşılaştırdığında; sağlıklı kişilerde, GG genotipine sahip bireylerin MPO düzeylerinin AA genotipine sahip bireylerden daha yüksek olduğunu bulmuştur. Bu çalışmada; hiperkolesterolemili kişilerde MPO düzeyleri, yüksek olarak bulunurken bu MPO artışı ile MPO -463 G/A gen polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Ayrıca Serum

Total Kolesterol, LDL Kolesterol düzeyleri ve sigara içiminin serum MPO düzeylerinin artışına katkı sağladığı gösterilmiştir (117).

Çalışmamızda da; Yaş, Sigara İçimi, Sistolik Kan Basıncı, Total Kolesterol ve LDL Kolesterol düzeylerinin Koroner arter hasta grubunda anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır. Bu parametrelerin düzeylerindeki artışların koroner arter hasta grubunda artmış olan plazma MPO düzeylerine katkı sağladığı tarafımızdan da düşünülmektedir

Nikpoor ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; MPO gen polimorfizminin A allelinin koroner arter hastalığı olan kişilerde daha az görüldüğü bundan dolayı A allelinin koroner arter hastalığını önlemede koruyucu bir özelliğe sahip olduğunu göstermiştir. Homozigot AA genine sahip kişilerin koroner arter hastalığına yakalanma şansı heterozigot AG genine sahip olan kişiler ile karşılaştırıldığında daha düşüktür (121).

Çalışmamızda A alleli ve G allelleri açısından kontrol ve koroner arter hasta gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Miyeloperoksidaz -463 G/A gen polimorfizminin SP1 transkripsiyon faktör bağlama bölgesini değiştirdiği düşünülmektedir. A alleli, SP1 transkripsiyon faktörü için gerekli olan MPO gen bağlama bölgesini yıkar, SP1 bölgesi normalde transfeksiyon deneylerindeki transkripsiyonu 25 kez arttırken bağlama bölgesi olmaksızın A alleli sadece birkaç kez transkripsiyon aktivitesi gösterebilir (122). Ayrıca MPO gene transkripsiyonundaki değişimler hücre içinde MPO enzimatik aktivitesinin azalmasına neden olur bu da serbest radikaller aracılıklı, akciğer kanseri (123), Alzheimer hastalığı (124) ve bazı komplike kronik granülomatoziz hastalıkların (125) oluşumunda önemli bir rol oynar.

Aterosklerotik plaklarda saptanan ve MPO aracılığı ile oluşan Tirosil radikalleri LDL oksidasyonunda önemli bir role sahiptir (113). Tüm bu kanıtlar koroner arter hastalığı riski ve MPO gen polimorfizmi arasında bir ilişkinin varlığını düşündürmektedir. Ek olarak MPO gen transkripsiyonu ile Koroner Arter Hastalık riski arasında önemli bir ilişkinin varlığı gösterilerek A allelinin koruyucu bir role sahip olduğu bulunmuştur.

Koroner arter hastalıklarının bağımsız risk faktörleri olan hipertansiyon hiperlipidemi, diyabet, sigara ve seksin etkisi Nikpoor tarafından yapılan bir çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmada MPO gen polimorfizmi ile risk faktörleri arasındaki ilişki araştırılmış ve hiperlipidemi ile MPO gen polimorfizmi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (121).

Rodrigo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise -463 G/A polimorfizmi ve plazma MPO düzeyleri arasında ilişki araştırılmıştır. Bulgular MPO polimorfizmi ile koroner arter hastalığı arasında ciddi bir ilişki bulunmadığını gösterirken Koroner Arter Hastalığı ile plazma MPO düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak zayıf bir ilişki bulunduğunu göstermiştir. Plazma MPO düzeylerinin alışılmış risk faktörleri varlığında yükseldiği saptanmıştır (126).

Çalışmamızda: Miyeloperoksidaz –463 G/A polimorfizmi ile koroner arter hastalığı ile arasında bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızda; Koroner Arter hastalığı olan grupta plazma MPO enzim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışmamızın bulguları diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmaların bulguları ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca Koroner arter hastaları ile kontrol grubu; yaş, sigara kullanımı, sistolik kan

basıncı, Total kolesterol ve LDL Kolesterol düzeylerinde açısından karşılaştırıldığında Koroner arter hastalık grubunda bu parametrelerin anlamlı olarak arttığı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunduğu saptanmıştır. Cinsiyet, Diastolik kan basıncı, Hipertansiyon, HDL Kolesterol, VLDL Kolesterol, Trigliserid düzeylerinin ise her iki grupta değişmediği görülmüştür. Miyeloperoksidaz gen polimorfizmi ile lipid parametre düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada koroner arter hastalarında plazma MMP-9 ve LDL kolesterol düzeylerinin anlamlı bir artış gösterdiği açıklanmıştır (127). Stabil yada stabil olmayan koroner arter hastalıklarında artan MMP-9 düzeylerinin gelecekteki kardiyovasküler ölüm risklerini artıracığı düşünülmektedir (82). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada serum MMP-9 düzeylerindeki artış okside LDL kolesterol düzeyini azaltarak aterosklerotik plak oluşumunu engellemiştir(128).

Çalışmamızda; Plazma MMP-9 düzeyleri kontrol ve koroner arter hasta gruplarında karşılaştırıldığında KAH grubunda MMP-9 düzeyi azalmış olarak bulunurken istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$).

Sonuç olarak; Bu çalışma Elazığ yöresinde yapılan bir ön çalışma olup beslenme koşulları ve sosyal konumları açısından farklılık gösteren sağlıklı kişiler ile koroner arter hastalığı olan kişilerde Miyeloperoksidaz -463G/A polimorfizm sıklığını araştırmak ve allel ve genotiplerinin dağılımını incelemek amacı ile yapılan bir çalışma olduğundan sonuçları açısından bilime katkısının olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma ile koroner arter hastalarında plazma miyeloperoksidaz düzeylerinin arttığı buna karşılık olarak okside LDL oluşumunu azaltan Matriks Metalloproteinaz 9 düzeylerinin azaldığı saptanmıştır.

Ayrıca genotip ve allel dağılımı ile plazma miyeloperoksidaz düzeyi arasındaki ilişki incelendiğinde; kontrol grubuna göre KAH grubunda AA, AG ve GG genotiplerinde plazma Miyeloperoksidaz düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Genotip ve allel dağılımı ile plazma MMP 9 düzeyleri ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KAH grubunda GG ve AG genotiplerinde azaldığı AA genotipinde ise arttığı bulunmuştur.

Bu bulgulardan da görüleceği gibi Miyeloproksidaz -463 G/A gen polimorfizminin koroner arter hastalıkları açısından önemli bir parametre olduğu hastalığın genetik temelini araştırılması ve prognozunun takibi açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla daha büyük bir popülasyon da KAH patogenezi ile ilişkili diğer parametreler ve alt gruplarında incelenerek bu çalışmanın desteklenmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Beaglehole R, Ebrahim S, Reddy S, Voüte J, Leeder S. Prevention of chronic diseases: a call to action. *Lancet* 2007; 370: 2152-57.
2. Akgül E, Aydemir K. İnflamasyon ve ateroskleroz. *Türk Kardiyoloji Seminerleri* 2003; 5: 492-505
3. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Artherosclerosis Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1102-11.
4. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary heart disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
5. Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, Reynolds WF. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroidhormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem* 1996; 271: 14412-20.
6. Nikpoor B, Turecki G, Fournier C, Theroux P, Rouleau GA. A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. *Am Heart J* 2001; 142: 336-9.
7. Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Marchlewska A, et al. A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Kidney Int Suppl* 2003: S172-6.
8. Makela R, Laaksonen R, Janatuinen T, et al. Myeloperoxidase gene variation and coronary flow reserve in young healthy men. *J Biomed Sci* 2004; 11: 59-64.
9. Asselbergs FW, Reynolds WF, Cohen-Tervaert JW, Jessurun GA, Tio RA. Myeloperoxidase polymorphism related to cardiovascular events in coronary artery disease. *Am J Med* 2004; 116: 429-30.
10. Cossu SF. The clinical spectrum of ventricular tachyarrhythmias in patient with coronary artery disease. *Cardiology In Review*. 1995; 3: 240-250
11. Yeşilbursa D, Cordan J, Serdar OA. Tek damar koroner arter hastalarında treadmill egzersiz testi ile dobutanın stres ekokardiyografinin karşılaştırılması. *MN Kardiyoloji*. 1996; 3: 313-318.
12. Öncül A. Aterosklerotik koroner arter hastalığında risk faktörlerinden primer korunma. *Hipokrat Kardiyoloji*. 1997; 1: 3-6.

13. Heper G, Boyacı B, Yiğit T. Kadınlarda koroner arter hastalığı tespitinde dobutamin stres ekokardiyografi. MN Kardiyoloji. 1996; 3: 342-349.
14. Ülgen MS, Karadede A, Altinel S. Koroner arter hastalığını belirlemede zirve egzersiz QT dispersiyonunun egzersiz testinin doğruluğuna katkısı. MN Kardiyoloji. 1998; 5: 352-356.
15. Folsom AR. Miyokart Enfarktüsünün antibiyotiklerle önlenmesi? Henüz değil. JAMA. 1999; 12: 415-416.
16. Kuzu N. Miyokart Enfarktüsünün cinsel fonksiyon üzerine etkisi ve hemşirenin cinsel danışmanlık rolü. Hacettepe Üniv. HYO Derg. 1996; 3: 19-22.
17. Revicki DA. Health related quality of life in the evaluation of medical therapy for chronic illness. J Fam Pract 1989; 29: 377-380.
18. Birol L. Kronik hastalığı olan hastaların hastalıklarına, tedavilerine ve diyetlerine ilişkin bilgileri. Hacettepe Üniv. HYO Derg 1996; 3: 1-8.
19. Akyol AD. Yaşam kalitesi ve yaklaşımları. Ege Üniv. HYO Derg. 1993; 9: 75-80.
20. Burckhardt CS, Woods SL, Schultz AA. Quality of life of adults with chronic illness: a psychometric study. Research in Nursing 1989; 12: 347-354.
21. Şengel Ö. Hemodiyaliz hastalarının yaşam kalitesini yükseltmede aminoasitlerin rolü. Çınar Derg 1998; 4: 101-108.
22. Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP. Clinical Chemistry, Principles, Procedures, Correlations. Fourth edition, New York, 2000: 426-430.
23. Gök H. Klinik Kardiyoloji. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. İstanbul: 2002: 200-214
24. Ahotupa M, Ruutu M, Mantyla E. Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. Clin Biochem 1996; 29: 139.
25. Lieberman M. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. 2.nd edn. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2005.
26. Michael C. Fishbein, Heart Attack Pathology.
http://www.medicinenet.com/heart_attack_pathology_photo_essay/article.htm.
03.11.2013

27. National Heart, Lung and Blood,
<http://www.nhlbi.nih.gov/about/directorscorner/messages/behind-the-bench-with-dr-monica-kraft-duke-university.html>. 03.11.2013
28. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001; 276: 41279-87.51
29. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Munzel T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 108 -144
30. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 421-30.
31. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1255-1262.
32. De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96: 60-68.
33. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 8264-8268.
34. Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK. Role of macrophage colony stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol* 1997; 150: 1687-1699.
35. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-43
36. Berliner J, Leitinger N, Watson A. Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action. *Thromb Haemost*. 1997; 78: 195-199.
37. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 471-474.
38. Witztum JL, Berliner JA. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 441-448.

39. Hazen SL, Hsu FF, Gaut JP. Modification of proteins and lipids by myeloperoxidase. *Methods Enzymol.* 1999; 300: 88-105.
40. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, et al. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony- stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 2001; 158: 879-891.
41. Griending KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle: new concepts. *Hypertension* 1997; 29: 366-373.
42. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1623-1629.
43. Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95: 1532-1541.
44. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999; 100: 1223-1229.
45. Peter L, Paul M, Ridker MD, Attilio M. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
46. Dichtl W, Nilsson L, Goncalves I. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor- κ in endothelial cells. *Circ Res* 1999; 84: 1085-1094.
47. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 319-324.
48. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 84: 489-497.
49. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
50. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, et al. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a

- potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 972-978.
51. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 1997; 96: 4095-4103.
 52. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 1997; 350: 430-436.
 53. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest.* 1999; 103: 571-577.
 54. Biasucci LM, Liuzzo G, Colizzi C. Clinical use of C-reactive protein for the prognostic stratification of patients with ischemic heart disease. *Ital Heart J* 2001; 2: 164-171.
 55. Horne BD, Muhlestein JB, Carlquist JF. Statin therapy, lipid levels, C-reactive protein and the survival of patients with angiographically severe coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1774-1780.
 56. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331: 417-424.
 57. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein (a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001; 285: 2481-2485.
 58. Maseri A. From syndromes to specific disease mechanisms. The search for the causes of myocardial infarction. *Ital Heart J* 2000; 1: 253-257.
 59. Hackett D, Davies G, Chierchia S. Intermittent coronary occlusion in acute myocardial infarction: value of combined thrombolytic and vasodilator therapy. *N Engl J Med* 1987; 317: 1055-1059.
 60. Bogaty P, Hackett D, Davies G. Vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation.* 1994; 90: 5-11.

61. Pristipino C, Beltrame JF, Finocchiaro ML. Major racial differences in coronary constrictor response between Japanese and Caucasians with recent myocardial infarction. *Circulation*. 2000; 101: 1102-1108.
62. Cannon CP, Weintraub WS, Demopoulos LA. Comparison of early invasive and conservative strategies in patients with unstable coronary syndromes treated with the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor tirofiban. *N Engl J Med* 2001; 344: 1879-1887.
63. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes. The MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285: 1711-1718.
64. Edwards SW. *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*. 1st ed. Press Syndicate University of Cambridge, United States. 1994.
65. Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 16-26
66. Podrez EA, Abu-soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis, *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1717-1725.
67. Abu-soud HM, Hazen SL. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidase. *J. Biochem*; 1998; 275: 5425-5430.
68. Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, Fu X, Penn MS, Sprecher DL, Hazen SL. Stains promote potent systemic antioxidant effect through specific inflammatory pathways. *Circulation* 2004; 108; 426-431.
69. Brown KE, Brunt EM, Heinecke JW. Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in kupffer cells of human liver. *Am J Pathol* 2001; 159: 2081-8
70. Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, Heinecke JW. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2004; 90: 724-33
71. De Souza AP, Line SRP. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev. FOB* 2002 ; 10: 1-6.
72. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92: 827-839.

73. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes And Development*: 2000; 14: 2123-2133.
74. Lijnen HR. Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2002; 30; 163-167.
75. Jialiang Hu, Philippe E. Van den Steen, Qing-Xiang A. Sang & Ghislain Opdenakker. Matrix Metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007; 6: 480-498.
76. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839; 2003.
77. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes And Development*: 2000; 14: 2123- 2133.
78. Lijnen HR. Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem. Soc Trans* 2002; 30; 163-7.
79. Galis Z, Sukhova G, Lark M, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94: 2493-503.
80. Creemers E, Cleutjens J, Smits J, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001; 89: 201-10.
81. Eckart R, Uyehara C, Shry E, Furgerson JL, Krasuski RA. Matrix metalloproteinases in patients with myocardial infarction and percutaneous revascularization. *J Interv Cardiol* 2004; 17: 27-31.
82. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tietz L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107: 1579-85.
83. Creemers EE, Cleutjens JP. Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001; 3; 89: 201-10.

84. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839.
85. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes And Development* 2000; 14: 2123-2133.
86. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145-2154.
87. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111: 383-389.
88. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med* 1980; 93: 480-489.
89. Rausch PG, Pryzwansky KB, Spitznagel JK. Immunocytochemical identification of azurophilic and specific granule markers in the giant granules of Chediak-Higashi neutrophils. *N Engl J Med* 1978; 298: 693-698.
90. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1994; 94: 437- 444.
91. Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, Smith RA, Nelson JR, Reynolds WF. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1997; 78: 97-107.
92. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 2001; 158: 879-891.
93. Shultz J, Kaminker K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. *Arch Biochem Biophys* 1962; 96: 465-467.
94. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1717-1725.
95. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem* 2002; 277: 46116-46122.

96. Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, et al. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 2000; 105: 1095-1108.
97. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem* 2000; 275: 37524-37532.
98. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002; 296: 2391-2394 56
99. Fu X, Kassim SY, Parks WC, et al. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of promatrilysin (MMP-7): a mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001; 276: 41279-41287.
100. Stephen J. Nicholls, Stanley L. Hazen. Myeloperoxidase and Cardiovascular Disease *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1102-1111.
101. Nanni S, Melandri G, Hanemaaijer R, Cervi V, Tomasi L, Altamari A, Van Lent N, Tricoci P, Bacchi L, Branzi A. Matrix metalloproteinases in premature coronary atherosclerosis: influence of inhibitors, inflammation and genetic polymorphisms. *Transl Res* 2007; 149: 137-144.
102. Iijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2001; 86: 324-333.
103. Iijnen HR. matrix metalloproteinases in development and progression of vascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003-2004; 33: 275-281.
104. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 346-359.
105. Somma M, Querci M. Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizler kitabından 2010; 6. Bölüm.
106. John R. Crowther, Basic Principles of ELISA. *Methods in Molecular Biolog.* Volume:42 1995; 35-61
107. Roncaglioni M, Santoro L, D'Avanzo B, Negri E, Nobili A. On behalf of GISSI-EFRIM Investigators. The role of family history in patients with myocardial infarction: an Italian case-control study. GISSI-EFRIM investigators. *Circulation* 1992; 85: 2065-2072.
108. Cambon F. Genetic prediction of myocardial infarction. *Blood Coag Fibrinol* 1999; 10: 23-24.

109. Karaali ZE, Sozen S, Yurdum M, Cacina C, Toptas B, Gok O, Ağaçhan B. Effect of genetic variants of chemokine receptors on the development of myocardial infarction in Turkish population. *Mol Biol Rep* 2010 :Oct;37(7):3615-9
110. Zhong C, Luzhan Z, Genshan M, Jiahong W, Xiaoli Z, Qi Q. Monocyte chemoattractant protein-1-2518 G/A polymorphism, plasma levels, and premature stable coronary artery disease. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 7-12
111. Chen LL, Zhu TB, Yin H, Huang J, Wang LS, Cao KJ, Yang ZJ. inhibition of MAPK signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through reduction of inflammation. *Mol Biol Rep*. 2010 Oct;37(7):3067-72
112. Pasalic D, Marinkovic N, Grskovic B, Ferencak G, Bernat R, Stavljenic- Rukavina A. C-reactive protein gene polymorphisms affect plasma CRP and homocysteine concentrations in subjects with and without angiographically confirmed coronary arter disease. *Mol Biol Rep* 2009; 36 (4): 775-780
113. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 20: 1716-1723
114. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med* 2003; 349: 1595-604
115. Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, Reynolds WF. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem* 1996; 271: 14412-14420
116. Asselbergs FW, Reynolds WF, Cohen- Tervaert JW, Jessurun GAJ. Myeloperoxidase polymorphism related to cardiovascular events in coronary arter disease. *Am J Med* 2004; 116: 429-430
117. Ergen A, İsbir S, Timirci Ö, Tekeli A, İsbir S, Effect of myeloperoxidase 463 G/A gene polymorphism and plasma levels on coronary artery disease. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 887- 891.
118. Stefanescua A, Braun S, Ndrepepa G, Kopara T, Pavaci H, Mehilli J schömig A, Kastrati A. Prognostic value of plasma myeloperoxidase concentration in patients with stable coronary artery disease. *Am Heart J* 2008; 155: 356-360

119. Ndrepepa G, Braun S, Mehilli J, von Beckerath N, Schömig A, Kastrati A. myeloperoxidase level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndroms *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 147-152
120. Duzguncinar O, Yavuz B, Hazirolan T. Plasma myeloperoxidase is related to the severity of coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2008; 63: 147-152
121. Borzoo N, Gustavo T, Caroline F, Pierre T, Guy AR, Montreal Q, A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French- Canadians. *Am Heart J* 2001; 142: 336-339
122. Piedrafita FJ Molander RB, Vansant G, et al. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem* 1996; 271: 14412-20.
123. London SJ, Lehman TA, Taylor JA. Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Res* 1997; 57: 5001-3.
124. Reynolds WF, Rhess J, Maciejewski D. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp Neural* 1999; 155: 31-41
125. Foster CB, Lehrnbecher T, Mol F, et al. Host defense molecule polymorphism influences the risk for immune-mediated complication in chronic granulomatosis disease. *J Clin Invest* 1998; 102: 2146-55
126. Wainstein RV, Wainstein MV, Ribeiro JP, Dorrelles LV, Tozzati P, Ashton-prolla P, et al. Association between myeloperoxidase polymorphisms and its plasma levels with severity of coronary artery disease. *Clin Biochem* 2010; 43: 57-62
127. Wang KF, Huang PH, Chiang CH, Hsu CY, Leu HB, Chen JW, Lin SJ. Usefulness of plasma matrix metalloproteinase-9 level in predicting future coronary revascularization in patients after acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 2013; 24: 23-28.
128. You Y, Duan Y, Zhang XL, Kang J, Yan CH, Zhang XL, et al. Effects of astragali radix extract on matrix metalloproteinase 9 expression and atherosclerotic plaque formation in aorta of apolipoprotein E deficient mice fed with high fat diet. 2012; 40: 522-526.

8. EKLER

GÖNÜLLÜ FORMU

Sayın Gönüllü;

Koroner arter hastalığı ile ilgili yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmamızın ismi ‘Koroner Arter Hastalarında Miyeloperoksidaz gen polimorfizmi ’dir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Araştırmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Araştırmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Koroner arter hastalığı günümüzde en sık görülen ve en önemli sağlık sorunlarından biridir. Koroner arter hastalığı, kalp kasını besleyen koroner arterlerin tıkanıklığına verilen addır ve nedeni “ateroskleroz” denilen damar sertliğidir. Bu hastalığın en önemli özelliği ileri evrelerde hayatı tehdit edebilen miyokard enfarktüsüne yol açabilmesidir. Bu hastalığa yol açan risk faktörlerinin bilinerek koruyucu önlemlerin alınması, hastalığın tedavisinden daha da önemlidir.

Koroner arter hastalığı ateroskleroz nedeniyle koroner arterlerin daralması sonucunda ortaya çıkar. Kesin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, etkisi gösterilmiş risk faktörleri vardır. Bu risk faktörlerini ikiye ayırabiliriz, birinci grupta düzeltilebilir risk faktörleri yer alır. Bunlar, sigara içilmesi, hipertansiyon, yüksek kolesterol düzeyi, fiziksel aktivite azlığı ve alkol tüketimi ve strestir. Düzeltilemeyen risk faktörleri ise ileri yaş, erkek cinsiyeti, ailede 55 yaşından önce koroner arter hastalığı öyküsünün olmasıdır. Şüphesiz genetik faktörler koroner damar sertliğinin oluşmasında önemli bir etkidir. Bu hastalığa ait risk faktörleri kalıtsal olarak diğer aile bireylerine de geçmektedir. Kesin tanı için koroner anjiyografi gereklidir. Koroner anjiyografi damarların net bir şekilde görülmesi için damar yapısını inceleyen bir yöntemdir. Yani koroner anjiyografi lokal anestezi ile kol ya da bacak damarlarından kalp damarlarına yollanan bir kılavuzla koroner arterlerin radyolojik olarak görüntülenmesi yöntemidir.

Bu araştırmamızda; koroner arter hastalığı gelişimine neden olabilecek genetik ve bazı yeni biyokimyasal parametreler incelenerek yeni tanı ve tedavi protokollerine ne gibi katkılar sağlayabileceği araştırılacaktır. Genetik parametre olarak Miyeloperoksidaz gen polimorfizmi çalışılacaktır. Elazığ bölgesinde yaşayan ve gerek beslenme koşulları gerekse sosyal konumları açısından farklılık gösteren sağlıklı ve koroner arter hastalığı olan kişilerde Miyeloperoksidaz 463 A/G gen polimorfizm sıklığını belirlemek ve koroner arter hastalıkları ile MPO gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır. Ayrıca koroner arter hastalıklarının patogenezinde rol oynayan Matriksmetalloproteinaz 9 ve Miyeloperoksidaz düzeylerini her iki grupta belirlemek ve bu parametrelerin düzeyleri ile MPO gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi açıklamak amaçlanmıştır. Yine bu parametrelerin koroner arter hastalığının oluşmasında etkili olup olmadığı araştırılacaktır.

Size tanı amacıyla kardiyoledi anabilim dalında size koroner anjiyografi uygulanmış ve tanı almış durumundasınız. Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz anjiyografi sonrası sizin yaş, boy, kilo, kan basıncı, kulladığınız ilaçlar ve yakınmalarınız kaydedilecektir. Genetik analiz için 2 ml’lik kan, biyokimyasal analizler için 3 ml’lik kan numunesinin kolunuzdan alınması gerekmektedir.

Bu araştırma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Kardiyoledi Anabilim Dallarının ortak katılımı ile yapılacaktır.

Sizin de bu araştırmaya hasta grubunu () / sağlıklı kontrol grubunu () temsilen katılmanızı öneriyoruz. Hasta grubu gönüllüleri için araştırmanın sonucunda eğer koroner arter hastalığı grubunda kontrol grubuna göre fark tespit edilirse tanı ve tedavi amaçlı araştırmalarda faydalı olacağını düşünüyoruz. Sağlıklı gönüllüler için ise kısa vadede direkt bir fayda sağlanmayacak, ancak hayatınızın ileriki aşamalarında araştırılan bu hastalığa bağlı gelişebilecek komplikasyonlarda bu çalışmanın sonuçlarına bağlı olarak elde edilebilecek tanı ve tedavi yöntemlerindeki muhtemel bilimsel kazanımlardan faydalanılacaktır.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:

1) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz.

2) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

Bu risklerden sizi uzak tutmak için elimizden geldiğince titiz davranacağız.

Elde ettiğimiz kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden kullanılacaktır. Gerektiğinde Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Necip İLHAN'a 4242370000-4692 numaralı telefonla ulaşabileceksiniz.

Bu araştırmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecek, aynı zamanda size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Bu araştırmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Araştırmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Araştırmaya bağlı göreceğiniz olası bir zararda sorumluluğunu üstleneceğimizi ve zararın giderilmesi için her türlü müdahalenin yapılacağını ve bu durum ile ilgili tüm harcamaları üstleneceğimizi bilmenizi isteriz.

Hasta/Katılımcının Beyanı

Sayın Prof. Dr. Necip İLHAN tarafından Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Kardiyoloji Anabilim Dalı tarafından yapılacak olan tıbbi bir araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya 'katılımcı' (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin büyük bir gizlilik ile korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum, bana da bir ödeme yapılmayacaktır. Araştırma sırasında ve sonrasında araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Araştırma

sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaşırsam Prof. Dr. Necip İLHAN’a 0424 2370000-4692 nolu telefonda ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakóltesi Kardiyoloji Anabilim Dalı adresinden ulaşabileceğimi biliyorum.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir dūřünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllölük içerisinde kabul ediyorum.

Konu ile ilgili imzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı	Görüşme Tanığı	Katılımcı ile görüşen hekim
Adı, Soyadı:	Adı, Soyadı:	Adı Soyadı, ünvanı:
Adres:	Adres:	Adres:
Tel:	Tel:	Tel:
İmza:	İmza:	İmza:

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	YUSUF DÖĞÜŞ
Doğum Yılı	07/07/1987
Yazışma Adresi	Abdullahpaşa mah. Hazmet sok. Sedefkule Konutları Blok:B Kat:3 Daire:8 ELAĞIĞ/MERKEZ
Telefon	05387862605
e-posta	yusufdogus23@hotmail.com

EĞİTİM

Mezuniyet Yılı	Derece	Üniversite	Öğrenim Alanı
2010	Lisans	Fırat ÜNİVERSİTESİ	Kimya Bölümü

POSTERLER

	Poster Adı	Yıl
1	Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyonda Kaptopril, Losartan ve Novokinin'in ATI-2, ADE1-2, Renin, Aldesteron, ADMA ve NADPH Oksidaz Düzeylerine Etkileri	2013