



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**COX-2 765 G>C POLİMORFİZMİNİN KORONER ARTER
HASTALIĞINDA RİSK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Eylem ASLANYÜREK SINIKÇI
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Lülüfer TAMER GÜMÜŞ**

MERSİN-2010



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**COX-2 765 G>C POLİMORFİZMİNİN KORONER ARTER
HASTALIĞINDA RİSK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Eylem ASLANYÜREK SINIKÇI
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Lülüfer TAMER GÜMÜŞ**

**Bu tez, BAP-TF-TB (EA) 2008-5TU kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir.**

MERSİN-2010

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel ve sosyal alanda yol gösteren, bilgi ve deneyimleriyle her türlü desteği veren ve bu çalışmayı yönlendirip sorunların çözümünde yardımcı olan tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Lülüfer Tamer' e saygı ve şükranlarımı sunarım.

Biyokimya eğitiminin sağladığı olanaklardan en iyi şekilde yararlanmam için beni yönlendirip destekleyen Sayın Prof. Dr. Uğur Atik, Prof. Dr. Gürbüz Polat, Doç. Dr. Gülçin Eskandari, Doç. Dr. Burak Çimen ve Yrd. Doç. Dr. Necati Muşlu'ya teşekkür ederim.

Tezime ait hasta grubu örneklerinin toplanması ve tezimin klinik sürecinde rol alan Mersin Üniversitesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Dilek Çiçek'e, Kalp Damar Cerrahisi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Nehir Sucu'ya ve şu an kardiyoloji uzmanı olarak görev yapan Dr. Ezgi Mert'e emeklerinden dolayı teşekkürlerimi bildiririm.

Kalıcı dostluklar kurduğum ve birlikte güzel günler geçirdiğim çalışma arkadaşlarım ve teknisyen arkadaşlarımla tüm Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına yardımları için teşekkür ederim.

Her zaman desteklerini yanımda hissettiğim tüm aileme teşekkür ederim.
Eşim Mehmet' e yardımları, sabrı ve sevgisi için teşekkür ederim.

Dr. Eylem ASLANYÜREK SINIKÇI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	9
Koroner Arter Hastalığının Tarihçesi	9
Koroner Arter Hastalığına Ait Risk Faktörleri	10
Aterogeneze Katılan Hücreler	11
Aterosklerozun Moleküler Komponentleri	14
Aterosklerozun Histopatolojisi; Aterosklerotik Lezyonlar	17
Aterosklerozun Patogenezi	21
Ateroskleroz ile İlişkili İnflamatuar Belirteçler	25
Aterosklerozda İnflamatuar Belirteç Olarak Siklooksijenaz Enzimi	26
Siklooksijenaz Enzimi	26
Siklooksijenaz ve Ateroskleroz ilişkisi	32
Aterosklerotik Lezyonlarda COX-2 ekspresyonu	33
COX-2 ve Aterosklerotik Plak İnstabilitesi	34
COX Enzimindeki Önemli Genetik Polimorfizm Bölgeleri	35
GEREÇ VE YÖNTEMLER	38
Araç ve Gereçler	38
Kimyasal Madde ve Çözücüler	38
Alet ve Gereçler	38
Kullanılan Kitler	38
Kullanılan Ayıraçlar	39
DNA İzolasyonunda Kullanılan Ayıraçların Hazırlanması	39
Çalışma Grubu ve Örnek Alımı	40
Yöntemler	40
Koroner Anjioplasti	40
Eritrosit Sedimentasyon Hızı Ölçümü	41
Lipid Profili Ölçümleri	41

Serum CRP Düzeyinin Belirlenmesi	42
Açlık Kan Şekeri Ölçümü.....	43
DNA İzolasyonu.....	43
Primer ve Prob Dizayını.....	44
Polimeraz Zincir Tepkimesi	44
PCR Koşulları	46
Genotip Belirlenmesi	47
İstatistiksel Analiz	48
BULGULAR	49
Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Demografik ve Tanımlayıcı Veriler	49
Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Biyokimyasal Veriler	51
COX-2 Genotiplerinin Hasta ve Kontrol Gruplarına Göre Dağılımı	52
Kontrol ve Hasta Gruplarının COX-2 Genotiplerinin Demografik ve Biyokimyasal Verilerle Karşılaştırılması	52
Hasta Grubunda COX-2 Genotiplerinin; MI Öyküsü, Hastalık Tanıları ve Tıkalı Damar Sayısı ile İlişkisi	54
TARTIŞMA	56
SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	64
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	84
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	86
TABLolar DİZİNİ	87

ÖZET

Koroner arter hastalığı dünyada ve ülkemizde en sık ölüm nedenlerinden biridir. İnsan aterosklerotik monosit/makrofajlar, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde COX-2 ekspresyonunun gösterilmiş olması, COX-2 ekspresyonunun aterogenezin inflamatuvar sürecinde rolü olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada COX-2 765G>C polimorfizminin koroner arter hastalığı olan hastalarda olası rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji ve Kalp Damar Cerrahisi polikliniklerine göğüs ağrısı ile başvuran ve koroner anjiyografi ile koroner arterlerinde %70 ve fazlası darlığı olan 95 koroner arter hastası ve özgeçmişinde herhangi bir hastalığı bulunmayan, koroner anjiyografi sonuçları normal bulunan 95 sağlıklı birey dahil edilmiştir.

COX 2 765G>C polimorfizmi, kan örnekleri alınıp DNA'ları izole edildikten sonra Real Time PCR ile, C Reaktif Protein immünotürbidimetrik metot ile, açlık kan şekeri enzimatik heksokinaz metodu ile, eritrosit sedimentasyon hızı fotometrik kinetik metot ile, total kolesterol ve HDL-kolesterol düzeyleri enzimatik kolorimetrik metot ile ve trigliserid düzeyleri enzimatik-kolorimetrik/gliserofosfat oksidaz-peroksidaz metodu ile çalışılmıştır. LDL ve VLDL-kolesterol düzeyleri Friedewald eşitliğine göre hesaplanmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, COX-2 765 GG genotipine sahip bireylerde KAH riski, GC genotipine göre 1.35 kat yüksek bulunmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aynı zamanda GC genotipine sahip hastaların kontrollere oranla, CRP düzeylerinin daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Çalışma grubumuzda CC genotipine rastlanmamıştır. MI öyküsü ile COX-2 genotipi arasında istatistiksel olarak bir ilişki saptanamamıştır.

Sonuç olarak, daha çok sayıda hastada 765 G>C polimorfizminin çalışılması, bu polimorfizm ile ateroskleroz ve KAH arasındaki ilişkinin tam olarak ortaya konulmasında yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: COX-2, Koroner arter hastalığı, Polimorfizm

ABSTRACT

The Assessment of COX-2 765 G>C Polymorphism in Patients with Coronary Artery Disease

Coronary artery disease (CAD) is one of the most common cause of death in the world and our country. COX-2 expression that has been shown in atherosclerotic human monocytes / macrophages, endothelial cells and smooth muscle cells suggests a role in inflammatory process of atherosclerosis.

In this study, we aimed to determine the exact role of COX-2 765G> C polymorphism in patients with Coronary Artery Disease.

In this study, 95 patients who applied to Mersin University Medical Faculty Cardiology and Cardiovascular Surgery Departments suffering chest pain with 70 % or more stenosis in coronary arteries detected by coronary angiography and 95 healthy person with normal coronary angiography results were included.

COX 2 765G> C polymorphism was studied by using Real Time PCR from blood samples after DNA isolation. CRP levels, fasting blood glucose and erythrocyte sedimentation rates were measured by immunoturbidimetric method, enzymatic hexokinase method and photometric kinetic method respectively. Total cholesterol and HDL-cholesterol levels were measured by enzymatic colorimetric method. triglyceride levels were measured by enzymatic colorimetric /gliserolfosfat oxidase-peroxidase method. LDL-cholesterol and VLDL-cholesterol levels were calculated according to the Friedewald equation.

Although we found the CAD risk in individuals with the COX-2 765 GG genotype is 1.35 times higher than individuals with the GC genotype, this increase is not statistically significant. In patients with GC genotype, CRP levels ($p = 0.000$) are higher than the controls with GC genotype and this increase is statistically significant. CC genotype is not detected in our study. There was no statistically significant relationship between history of MI and COX-2 genotype

As a result, a study including more patients to detect the 765 G> C polymorphism will help us to put forward the relation between this polymorphism, atherosclerosis and CAD exactly.

Key words: COX-2, Coronary Artery Disease, Polymorphism

GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner Arter Hastalığı (KAH) günümüzde mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerinden biridir. Tedavisindeki gelişmelere karşın görülme sıklığı artmaktadır. Koroner kalp hastalığı, kalp kaslarına kan akışının azalması nedeniyle oluşan miyokard iskemisi ile sonuçlanan bir hastalıktır. İskemi, genellikle ateroskleroz, tromboz, spazm ya da emboli gibi nedenlerle kan kaynağının kalbin bir bölümüne az ulaşması ya da anemi, karboksihemoglobinemi ya da hipotansiyon gibi nedenlerle kan akımının azalmasıyla gelişen ve doku hasarıyla sonuçlanan patolojik bir durumdur¹.

Koroner arter hastalığının gelişiminde sigara kullanımı, hipertansiyon, diyabet, kötü beslenme ve fiziksel olarak inaktif yaşam gibi değiştirilebilen ve yaş, cinsiyet ve genetik yatkınlık gibi değiştirilemeyen risk faktörleri vardır¹.

Koroner arter hastalığının en sık nedeni olarak bilinen aterosklerozu açıklamak amacıyla birkaç teori ileri sürülmüştür. Bunlardan en çok kabul gören teori "endotelial hasara karşı yanıt" teorisidir. Bu teoriye göre, ateroskleroz oluşumunda başlangıç basamağı endotelial disfonksiyondur. Teori, endotelial disfonksiyonun mekanik stres, toksik, immünolojik, metabolik veya enfeksiyöz olaylardan birinin veya birkaçının etkisi ile gelişebileceğini ve devamında inflamatuvar süreçlerin de ateroskleroz oluşumunda etken olabileceğini ileri sürmektedir¹.

Endotel; vasküler tonusu, hücre çoğalmasını, trombositlerin ve lökositlerin damar duvarı ile etkileşimini düzenleyen bir yapıya sahiptir. Endotel tabakasının tromboregulator moleküller ve büyüme faktörlerini sentezleyebilme özelliklerine ilaveten, fiziksel ve kimyasal uyaranlara dinamik olarak yanıt verebilme kapasitesi, bu tek sıralı yassı epitelden oluşan dokuya hayati önem kazandırır. Aktif endotel hücreleri, sellüler adezyon molekülleri, sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi doğrudan veya dolaylı bazı faktörlerin üretimine geçerler. Aterosklerotik süreçte tüm bu özellikler etkilenir ve fokal arteriyel inflamatuvar aktivite artar²⁻⁴.

KAH'ın yaklaşık yarısı yaş, cinsiyet, hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara kullanımı ve diyabet gibi genel risk faktörleri ile açıklanabilmektedir. Açıklanamayan ateroskleroz'un çoğunluğunun genetik kökenli olduğunu destekleyen çalışmalar mevcuttur⁴.

Ateroskleroz ve klinik sonuçlarında artık inflamasyonun ve genetik faktörlerin rolü ve etkinliği tartişılmazdır. Yapılan alışmalar kronik stabil anjina pektoris, stabil olmayan anjina ve akut miyokard infarktüsünde inflamatuvar belirteçlerin belirgin düzeylerde yükseldiklerini ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda inflamatuvar sistemi direkt veya indirekt olarak etkileyen genetik varyasyonların iskemik kalp hastalığı riskini artırdığı gösterilmiştir. Bu genetik farklılıklar bazı insanlarda neden hastalığın görülmeyip ya da subklinik seyredip, diğerlerinde şiddetli inflamatuvar reaksiyonlarla birlikte kötü prognostik veriler açığa çıkardığını aıklamaktadır⁵.

Yapılan son çalışmalar, inflamasyonun KAH ve aterosklerozun belirtilerinde anahtar rol oynadığını göstermiştir. İnflamasyon ve plak instabilitesi arasındaki ilişkiyi inceleyen çeşitli mekanizmalar bulunmuştur. Siklooksijenaz-2 (COX-2) pek çok fizyolojik durumda ve inflamatuvar hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalıkta anahtar rol oynayan bir enzimdir. Bu enzimin proinflamatuvar etkilerinin yanı sıra antiinflamatuvar etkileri de vardır. İnflamatuvar bir doğası olduğu düşünülen koroner arter hastalığında da COX-2 enziminin önemli bir rol oynadığı, COX-2'nin aterosklerotik plak instabilitesinde rolü olduğu düşünülmektedir. alışmalar COX-2'nin büyük oranda aktif makrofajlarda, daha az oranda ise düz kas hücrelerinde eksprese edildiğini göstermiřtir⁵.

İnflamasyon-Koroner Arter Hastalığı ilişkisini açıklığa kavuşturacak yeni belirleyici parametrelerin bulunması ve karmaşık hücresele etkileşimlerin moleküler düzeyde aydınlatılması, koroner arter hastalığının tanı ve tedavisinde çok yeni yaklaşımlar oluşmasına neden olabilir. Yapılan çalışmalarla bulunacak olan yeni belirleyici faktörler, hastalığın yeni risk faktörleri olarak literatürdeki yerlerini alacak, hem koruyucu hem de tedavi edici yöntemlere rehberlik edip işık tutacaklardır. İşte bu noktada genetik faktörlerin modifikasyonu, KAH ve KAH'ın oluşturduğu hastalıkların tedavisinde yerini alabilir⁶.

Kişilerin yaşam kalitesinin arttırılması açısından KAH'a yatkınlığının olup olmadığını erkenden öğrenebilmek ve ona göre önlem alabilmek için koroner arter hastalıklarının genetik alt yapısının belirlenmesi önemlidir.

Bu bilgilerin işığı altında çalışmamızda inflamasyonda rolü olan parametreleri kullanarak koroner arter hastalığı-inflamasyon ilişkisini ortaya koymayı ve COX-2 765 G>C polimorfizminin bu ilişkideki olası rolünü belirlemeyi hedefledik.

GENEL BİLGİLER

Koroner Arter Hastalığının Tarihçesi

Koroner arter hastalığının varlığı, 1772 yılında William Heberden tarafından Angina Pectoris adı verilen hastalığın tanımlanması ile tespit edilmiştir. Heberden'in tanımladığı KAH aslında stabil angina pectoris adı verilen, hareket ederken göğüste hissedilen ağrı ve tıkanıklıktır. 1910 yılında Rus patolog Obratzov tarafından koroner arterlerin trombozu sonucu Miyokard İnfarktüsü (MI) geliştiği saptanmıştır. 1912 yılında James B. Herrick, koroner arterlerin ileri derecede tıkanması sonucu yeterli oksijence zengin kan ile beslenemeyen kalp dokusunun uzun süre oksijensiz kalması sonucu nekrotik hal aldığını ve bu durumun zaman içinde kalp fonksiyonlarının yavaşlaması ve hatta durması sonucu görülen Miyokard İnfarktüsüne dönüştüğünü ifade etmiştir⁷.

1920 yılında Pardee tarafından MI esnasında Elektrokardiyogram (EKG) değişikliklerinin söz konusu olduğu tespit edilmiştir. 1923 yılında ise, William Heberden'in tanımlamış olduğu anginaya benzer bir göğüs ağrısının, dinlenme anında ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bu durum stabil olmayan angina pectoris olarak tanımlanmış olup miyokardın fazla oksijen ihtiyacı olmadığı durumlarda açığa çıkmaktadır⁷.

Moleküler tıbbın gelişmesi ile, KAH'ın en sık nedeni olan aterosklerozun patogenezi için, daha özel hipotezler belirtmek olası hale gelmiştir. Ross ve arkadaşları, 1974'de arteriyel zararın trombositlerden ve/veya diğer hücrelerden lokal büyüme faktörleri salınımına neden olduğunu öne sürmüştür⁸. Bu durum, düz kas hücrelerinde proliferatif bir yanıtı başlatabilir ve ateroskleroza yol açabilir. Benditt tarafından öne sürülen alternatif bir hipoteze göre, ateroskleroz selim bir tümörde görülene benzer şekilde, kontrolsüz düz kas hücresi çoğalmasına bağlıdır⁹. Brown ve Goldstein'in düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptörlerini ve kolesterol metabolizmasının mekanizmasını bulması kolesterol hipotezinin, etkin farmakolojik ve genetik araçlarla test edilmesine olanak sağlamıştır¹⁰. Deneysel modellerde ve insanlarda, serum kolesterolü (özellikle LDL) ve aterosklerozun derecesi arasında direkt bir ilişki olduğu açık bir şekilde gösterilmiştir. Bu bulgularla, ateroskleroz patogenezi ile ilgili her hipotezin, bu hastalıkta kolesterolün rolünü açıklamaya çalışması gerektiği ortaya çıkmıştır. Gen silinmesi veya inaktivasyonu (knockout) uygulanmış farelerde, lipid

metabolizması bozukluklarına dayalı, yeni genetik hastalık modelleri, patogenez basamaklarının ayrıntılı olarak incelenmesine olanak sağlamış ve son 10 yıl içinde aterosklerozun anlaşılmasında çok önemli ilerlemelere yol açmıştır¹¹.

Günümüzde artık ateroskleroz ve arteriyel trombozda, inflamasyon ve genetik iki önemli mekanizma olarak kabul görmektedir. İnvitro çalışmalar ve hayvan deneyleri klinik olarak kronik stabil angina, anstabil angina ve akut myokard infarktüsünde inflamatuvar belirteçlerin anlamlı değerlerde yükseldiğini desteklemektedir. Yine çalışmalar inflamatuvar sistemdeki genetik varyasyonun KAH'da riski arttırdığını desteklemektedir. Genetik düzenlemedeki farklılıklar neden bazı insanlarda hastalık gelişmeyip bazılarında neden daha şiddetli inflamatuvar reaksiyon geliştiğini açıklayabilir^{12,13}.

KAH, dünyada ve ülkemizde ölümün başta gelen nedenidir. Dünya Sağlık Teşkilatına (WHO) göre 2000 yılında 12 milyonun üstünde insan koroner arter hastalığına bağlı aterosklerozdan ölmüştür, 2020 yılında ise bu ölümler 24 milyon olarak beklenmektedir¹⁴.

TEKHARF çalışmasına göre ülkemizde her yıl 310 bin yeni olay olmaktadır; bunların 90 bin kadarı ölmekte 320 bin kadarı kronikleşmektedir (kronik KAH). Kronik koroner arter hastalarının ise her yıl 80 bini ölmektedir¹⁴.

ABD'de ise 2000 yılında 1,1 milyon MI hastaneye müracaat etmiştir. Tüm MI popülasyonundan yaklaşık 20 bin kişinin öldüğü sanılmaktadır (ilk saatteki ölümler %50)¹⁴.

Koroner Arter Hastalığına Ait Risk Faktörleri

1948'de KAH ile ilgili risk faktörlerini anlamak için "Framingham Heart Study" başlatılmıştır. Bugün Framingham Kalp Çalışmasına katılanların % 75'i KAH'dan ölmüştür. Bu çalışma KAH'da risk faktörlerinin tanımı için önemlidir. Framingham kalp çalışmalarına benzer diğer çalışmalarla KAH'ın risk faktörleri üzerinde bilgilerimiz artmıştır¹⁵.

KAH oluşumuna neden olduğu gösterilen risk faktörlerinin bazıları tedavi edilerek veya yaşam şekli düzenlenerek değiştirilebilirken; bazıları değiştirilemez faktörlerdir^{16,17}.

Bu nedenle KAH'a ait risk faktörleri değiştirilemeyen risk faktörleri ve değiştirilebilen bağımsız risk faktörleri olarak iki gruba ayrılmaktadır^{16,17}.

A- Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

1. İleri yaş (Erkeklerde 45, kadınlarda 55 veya erken menopoz),
2. Erkek cinsiyet,
3. Aile öyküsü (Birinci derecede erkek akrabalarda 55 yaşından, birinci derecede kadın akrabalarda 65 yaşından önce infarktüs veya ani ölüm bulunması).

B- Değiştirilebilen Bağımsız Risk Faktörleri

1. Hipertansiyon,
2. Hiperkolesterolemi (Total kolesterol > 200 mg/dl, LDL-kolesterol (LDL-K) >130 mg/dl, HDL-kolesterol (HDL-K) <35 mg/dl),
3. Sigara kullanımı,
4. Glukoz intoleransı,
5. Obesite,
6. Sedanter yaşam koşulları,
7. Oral kontraseptifler,
8. Artmış fibrinojen ve lökosit sayısı.

Yukarıda sıralanan risk faktörlerinin yanı sıra yeni tanımlanan risk faktörleri de bulunmaktadır. Bunlar arasında aterojenik diyet, subklinik aterosklerotik hastalık, lipoprotein A yüksekliği, hiperhomosisteinemi, protrombotik ve proinflamatuvar risk faktörleri sayılabilir. Bu faktörler henüz risk kategorisini belirlemede kullanılmamaktadır. Ancak bireysel tedavi yaklaşımında bu faktörlerin de araştırılması, hekime daha yoğun bir tedavi yapması için yol gösterici olabilir¹⁸.

Aterogeneze Katılan Hücreler

Dejeneratif, ilerleyici ve multifaktöriyel bir hastalık olan ateroskleroz çeşitli organlara kan akımının bozulmasına yol ačan bir hastalık sürecidir. Orta büyüklükte ve daha büyük arterlerin kalınlaşması ve sertleşmesi sonucu damar lümeninin aterosklerotik plaklarla daralması “ateroskleroz” olarak tanımlanmaktadır. Ateroskleroz terimi Yunanca “athero” (bulamaç) ve “sclerosis” (sertleşme) den köken almaktadır¹⁶.

Kalp kasını besleyen arterlerde oluşan lezyonlar veya plaklar, arterlerdeki kan akışının bozulmasına yol aarak hastalık sürecini, aterosklerozu başlatmaktadır. Lipid birikimi ve hücrenin buna reaksiyonu, arter lümeninin

daralmasına ve hücrelere oksijen ve hücre yaşamı için gerekli diğer maddelerin yetersiz oranda gitmesine neden olmaktadır¹⁹.

Bu süreçte, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, lökositler, trombositler rol oynamaktadır.

Endotel Hücreleri

Tüm dolaşımın iç yüzeyini kaplayan endotel hücreleri devamlı, kesintisiz, sık bir tabaka olan endoteli oluşturmaktadır. Endotel, vasküler tonusu, hücre çoğalmasını, trombositlerin ve lökositlerin damar duvarı ile etkileşimini düzenleyen, tromboregülatör molekülleri ve büyüme faktörlerini sentezleyebilen, fiziksel ve kimyasal uyarılara yanıt verebilen vasküler düz kas ile damar lümeni arasında uzanan bazal membran üzerinde yerleşmiş tek sıralı yassı epitel hücrelerden oluşan bir dokudur. Dolaşımdaki ürünlerin aktif transport ile girişlerini kontrol etmektedir. Kan elemanları ve lipoproteinler için iyi bir bariyer gibi davranmaktadır. Endotel hücre yüzeyleri antitrombogenik özelliğe sahiptir. Bu özellikleri ve prostasiklin (PGI₂) yardımı ile tromboz oluşumunu önlemektedirler¹⁹.

Endotelde hasara neden olan başlıca faktörler; hiperlidemi, hipertansiyon, diabetes mellitus, sigara, hiperfibrinojenemi, hiperhomosisteinemi, Herpes enfeksiyonu ve immun mekanizmalardır. Endotel hücre fonksiyonlarındaki bozuklukların ortaya çıkışı aterosklerozdaki histolojik özelliklerin bulunmasından daha önce saptanmaktadır. Endotel hücre hasarı sonunda subendotelial intimada makrofaj birikimi oluşmakta ve makrofaj ve endotel hücrelerinden açığa çıkan büyüme faktörleri sonucunda düz kas hücrelerinde aktivasyon veya proliferasyon görülmektedir²⁰.

Düz Kas Hücreleri

Arter duvarlarının asıl kitlesini oluşturan hücreler olan düz kas hücreleri, media tabakasında yer almakta olup bağ dokusu molekülleri ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörlerini üretmektedir. Endotel, T lenfositleri, trombositler ve makrofajlar ile reaksiyona giren düz kas hücreleri, değişik sitokinler, büyüme faktörlerini düzenleyen moleküller, damar gevşetici ve kasıcı maddelerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu hücreler, kolesterol birikmesine bağlı ateroskleroza özgü lipid dolu hücreler (köpük hücreler) haline gelebilmektedir¹⁹.

Düz kas hücrelerinin sentetik ve kontraktıl tip olarak iki farklı fenotipik yapısı bulunmaktadır. Kontraktıl tip vazomotor değışikliklere karşı etki gösterirken sentetik tip ise ekstraselüler moleküller için gerekli genlerin ekspresyonu ve ekstraselüler matriks sentez yeteneğine sahiptir. Kontraktıl tip, özellikle makrofajlar ve endotelden salınan sitokinlere cevap olarak sentetik tipe dönüşür. Bu tip aterosklerotik lezyonlarda görülmektedir²¹.

Lökositler

Monositler arter duvarlarına girdikten sonra makrofajlara dönüşmektedir. İnflamasyon bölgelerinde makrofajlar, hücrenin koruyucusu gibi davranarak fagositoz ve intrasellüler hidroliz ile yabancı maddelere karşı gelmektedir. Bir yandan ateroskleroza neden olan okside LDL (oxLDL) moleküllerini uzaklaştıran makrofajlar, diğer yandan lipoksigenazlar (15 lipoksigenaz) yardımıyla LDL oksidasyonuna neden olmaktadır. Oluşan oxLDL, aynı veya komşu makrofajlar tarafından alınmaktadır. Bu şekilde makrofajlar, düz kas hücrelerinde olduğu gibi köpük hücresi kaynağını oluşturabilmektedir. Makrofajlar, lökotrien B4, interlökin-1 (IL-1), diğer hücreler için toksik bir radikal olan süperoksid anyonu ve çeşitli büyüme faktörlerini de üretebilmektedir. Lenfositler de arter duvarlarına girebilmekte ve düz kas hücre gelişimi ve makrofaj oluşumuna etki edebilen birçok madde üretilmesine neden olmaktadır¹⁹. Aterosklerotik lezyonlarda T lenfositlerin bulunması ateroskleroz gelişiminde immun hatta otoimmun olayların rolü olabileceğini düşündürmüştür. T lenfositlere antijen sunan başlıca hücreler makrofajlardır. Bu yüzden T lenfositlerin intimaya göç etmesinde makrofajların önemli rolü olduğu düşünülmektedir²².

Trombositler

Trombositlerin aterogenezin her aşamasında rol aldıkları düşünülmektedir. Endotel hasarı gibi tetikleyici mekanizmalar trombositleri uyarak içerdikleri alfa granüllerden sitokinler, vasoaktif maddeler ve mitojenleri salmalarına neden olurlar. Endotel bütünlüğünün bozulduğu bölümlerdeki irreversibl adezyonda rol oynarlar. Bu adezyonda, birbirinden ayrı 2 tip trombosit reseptör rol alır. Bu reseptörler, glikoprotein kompleksi Ib/IxV, IIb/IIIa ve polimerik plazma glikoproteini von-Willebrand faktör (vWF) dür. Adezyondan sonra aktif trombositler PDGF, Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), platelet kaynaklı ve endotel hücre büyüme faktörü (PD -ECGF) açığa çıkarırlar²³.

Aterosklerozun Moleküler Komponentleri

Adezyon Molekülleri

Adezyon molekülleri, hücrelerin özgül olarak dokulara yönelmelerinde, birbirlerini tanımalarında, embriyogenez, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve inflamasyon gibi olayların düzenlenmesinde görev alırlar. Adezyon molekülleri dört sınıfta incelenmektedirler. Bunlar; integrinler, selektinler, immünglobulin süper ailesine dahil adezyon molekülleri ve kaderinlerdir. Endotel hücreleri immünglobulin gen ailesinin üyeleri olan vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1), hücre içi adezyon molekül-1 (ICAM-1) ve E-selektin sentezleyerek dolaşımdaki kan hücrelerinin trafiğini yönlendirir^{24,25}.

Normal endotel hücrelerinin yüzeyinde adezyon molekülleri çok az ya da yok gibidir. Ancak çeşitli uyarılara karşı ve endotel fonksiyon bozukluğu durumlarında hücre yüzeyinde VCAM-1 ve ICAM-1 gibi adezyon moleküllerinin sentezi artar. Bu moleküller çeşitli inflamasyon durumlarında lökositlerin ve diğer kan hücrelerinin transmigrasyonunda rol alırlar. Monositler ve T-lenfositler gibi inflamasyon hücrelerinin endotele tutunup endotel bariyerini aşmasının aterosklerozu başlatan olaylardan biri olduğu düşünülmektedir^{1,26,27}.

Bunların yanı sıra adezyon moleküllerinden biri olan E Selektinler de lökositlerin endotele geçişine aracılık ederler. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve IL-1 gibi sitokinlerin etkisi ile endotel hücre yüzeyinde artan E-selektin düzeyleri, lökositlerin hücre yüzeyine tutunmasını oradan da subendotelyal bölgeye geçişini sağlar^{1,26}.

Diğer bir adezyon molekülü grubu integrinler, hücrelerin birbirlerine ya da çevresindeki yapılara tutunmalarını sağlarlar. Dolaşımdaki lökositlerin damar endoteline tutunup, yapıştıktan sonra, inflamatuvar reaksiyonun bulunduğu alana göç etmelerinde rol alırlar²⁸. Hücre dışı sinyaller aracılığı ile haberleşmeyi sağlarlar²⁹. Hücre dışı sinyaller hücre içine ulaşarak çeşitli hücre içi olayların gerçekleşmesine aracılık ederler. "Leukocyte function associated antigen-1" (LAF-1), "macrophage antigen-1" (MAC-1), Very late antigen-4 (VLA-4), lökositlerde bu işlevi yapan integrinlerdir. Aktive olan trombositlerin endotel hücrelerine, endotel altı yapılara ve birbirlerine tutunmasında rol oynayan Glikoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) reseptörleri de integrin yapısındadır^{26,27}.

Monosit/makrofaj Kemotaktik Protein-1

Monosit/makrofaj kemotaktik protein-1 (MCP-1), makrofajlardan, düz kas hücrelerinden ve endotel hücrelerinden sentezlenir. Endotel ve düz kas hücrelerinden TNF, IL-12, interferon (IFN), okside LDL ve endotoksinlerin etkisiyle MCP-1 mRNA düzeyinde artış görülür. MCP-1 geninin endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve makrofajlarda gen ekspresyonu için gerekli olan fonksiyonel nükleer faktör KB bağlayıcı bölüm içerdiği düşünülmektedir³⁰. Son çalışmalarda minimal okside LDL'nin nükleer faktör kapp B'nin (NF-KB) potent aktivatörü olduğu gösterilmiştir. Aterosklerotik plaklarda, özellikle makrofajdan zengin bölgelerde MCP-1 mRNA artmıştır. MCP-1, adezyon moleküllerinin üretimini stimüle eder. Bu da aterosklerotik lezyonlara makrofajların katılmasını sağlar^{31,32}.

Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör

Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (M-CSF), endotel hücreleri ve düz kas hücreleri tarafından üretilirler. Dolaşımdaki monosit ve doku makrofajlarının yaşamının devamı için gereklidir. Aterogenezis sırasındaki lokal M-CSF üretimi, makrofajların hayatta kalmasına ve proliferasyonuna yardım eder veya scavenger reseptörlerinin ekspresyonunda ve apoprotein-E'nin sekresyonunda artma gibi özel makrofaj fonksiyonlarını sağlar³³.

İnterlökin-1

IL-1, hemen hemen tüm doku ve organ sistemlerinde etkili olan polipeptid yapıda bir sitokindir. Temel olarak monositler, makrofajlar, trombositler ve hasarlanmış endotel tarafından salınır. IL-1 akut ve kronik inflamasyonu indükleyen pro-inflamatuar sitokinlerin prototipidir. Yapılan çalışmalar, IL-1'in aterogenez ve trombüs oluşumunda anahtar rol oynadığını ortaya koymuştur. IL-1 aterosklerotik koroner arter hastalığında major bir role sahiptir. IL-1, aterogenez sırasında inflamatuvar cevabı düzenler. Vasküler duvara inflamatuvar hücre infiltrasyonunu artırarak lökositlerin endotele yapışmasını sağlar. IL-1'e maruz kalan endotel hücreleri adezyon molekülü sentezini artırır. IL-1 etkisiyle pro-koagülan aktivite artar, doku faktörü, PGE₂, PGI₂, trombosit aktive edici faktör (PAF), plazminojen aktivatör inhibitör üretimi artar. IL-1, vasküler alanda düz kas hücre proliferasyonunu indükler, PDGF sentezini artırır³⁴.

Tümör Nekroz Faktör- α

TNF- α , makrofajlarca üretilen pro-inflamatuar sitokindir³⁵. Kardiyovasküler sistemdeki temel etkisi; adezyon moleküllerinin ve lökosit antijen proteinlerinin ekspresyonunu sağlamak, endotelial sitokin ve nitrik oksit (NO) salınımını ve vasküler permeabilityyi artırmak, negatif inotropik etkilerde bulunmak, lipoprotein lipaz aktivitesini azaltmak, hepatik yağ asidi sentezini artırmak, plazminojen aktivatör inhibitör ekspresyonunu artırmak, von Willebrand Faktör sentezini artırmak ve antikoagülan özelliği olan Protein-C supresyonunu sağlamaktır³⁵.

Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

Trombositlerin α -granüllerinde depo edilen PDGF düz kas hücreleri için en önemli mitojendir. Düz kas hücreleri için monositler kadar kemotaktiktir. Ateroskleroz lezyonları yakınındaki makrofajlarda ve düz kas hücrelerinde PDGF gen ekspresyonu artmıştır. TGF- β ve IL-1 gibi değişik sitokinlerin etkisiyle oluşan düz kas hücrelerindeki proliferasyon PDGF tarafından düzenlenir³⁶.

Fibroblast Büyüme Faktörü

FGF, hücrelerin proliferasyonunda migrasyonunda ve farklılaşmasında rol oynar. Makrofajlar, düz kas hücreleri ve endotel hücreleri tarafından sentez edilen FGF, bu hücreler yaralandıklarında salınır³⁷.

Transforme Edici Büyüme Faktörü- β

Makrofajlar, trombositler, endotel ve bağ dokusu hücreleri tarafından salgılanan TGF- β düz kas hücrelerinde proliferasyonu düzenler. TGF- β , düşük dozlarda kas hücrelerinin sekresyon ve proliferasyonunu uyarırken yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir hücre proliferasyon inhibitörüdür²⁷. TGF- β , düz kas hücrelerini ekstrasellüler matriksin birçok komponentinin üretimi (heparan sülfat sentezi haricinde) için uyarır. Bunu da matriks materyalini normal olarak azaltan enzimleri inhibe ederek yapar. Sonuçta fibroz plakların gelişiminde ana etkiye sahiptir. TNF- α gibi TGF- β angiogenezisi indükler ve neovaskülarizasyonu da sağlar³⁸.

Nitrik Oksit

NO, hem vasküler tonusu sağlar hem de lökositlerle plateletlerin agregasyonunu ve adezyonunu etkiler. Endotel yüzeyindeki adezyon

moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek endoteli korur. NO, düz kas hücrelerinde mitogenezisi ve proliferasyonu inhibe eder³⁹.

Endotelin

Endotelin-1 (ET-1), endotel hücrelerinden salınır ve bilinen en güçlü vazokonstriktör ajandır. Diğer iki tip endotelin ET-2 ve ET-3 olup sadece ET-1 endotelden salınır. ET-1 vasküler tonus regülasyonunda primer rolü tonik vazokonstriktör etkisine bağlıdır. Vazoaktif özelliklerine ilaveten düz kas hücre proliferasyonunu uyarır, vasküler remodeling ve lökosit adezyonuna katkıda bulunur. Böylece inflamasyon ve aterogenezde önemli rol oynar⁴⁰.

ET'in aktivasyonu diğer büyüme faktörlerince potansiyalize edilir. Okside LDL ile dolaşımdaki ET düzeyleri yükselmiştir ve dolaşan monositler ve aktif makrofajlar için kuvvetli bir kemoatraktandır. Makrofajlar PDGF, IL-1 ve TNF- α oluşturarak ta endotel hasarına yol açabilir. Düz kas hücrelerinin ET ve NO gibi vazomodulatör ajanlara cevap veren kontraktıl tipi ateroskleroz durumlarında büyüme faktörleri salgılayan sentetik tipe dönüşür^{40,41}.

Aterosklerozun Histopatolojisi; Aterosklerotik Lezyonlar

Arter duvarı intima, media ve adventisya olarak 3 tabakadan meydana gelmektedir.

1) İntima

İntima bütün arterlerin lümeninde bulunan, endotel hücrelerinden oluşan tek tabakalı, kesintisiz ve matriks açısından zengin bir yapı göstermektedir. Aterosklerotik lezyonların geliştiği bölgedir¹⁹.

2) Media

Arter duvarının en geniş bölgesi olan media, kollagen elastik lifler ve glikozaminoglikanlardan oluşan bir matriks içerisinde konsantrik olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden meydana gelmektedir¹⁹.

3) Adventisya

Damarın dış yüzeyini çevreleyen gevşek bir bağ dokusundan oluşmaktadır. Bu bölgede kollagen lifler, elastik lifler, sinir lifleri, fibroblastlar ve bazı düz kas hücreleri bulunmaktadır¹⁹.

Aterom veya aterosklerotik plaklar olarak tarif edilen aterosklerotik lezyonlar, arterin en iç tabakası olan intimanın asimetric fokal kalınlaşmasıdır. Lezyonlar; inflamatuvar/immün hücreler, bağ dokusu elemanları, lipid ve debristen oluşmuştur¹⁹.

Uzun yıllar boyunca patologlar tarafından yapılmış olan morfolojik incelemelerin ışığında üç tip aterosklerotik plak tarif edilmiştir¹⁷;

1. Yağlı çizgilenmeler
2. Fibröz plaklar
3. Komplike lezyonlar

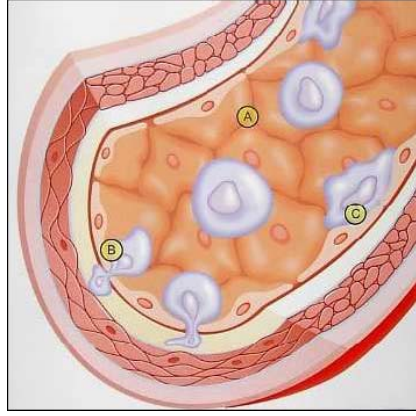
Yağlı çizgilenmeler, çok sayıda lipid içeren makrofajların intimada birikmesinden oluşur. Lipid damlacıkları, spesifik bir reseptör temizleyici ailesi tarafından alınan, okside olmuş veya toplanmış LDL'lerden kaynaklanan kolesterol esterlerinden oluşur. Makroskobik incelemede, kan akımı yönünü takip eden sarı çizgiler şeklinde görülür. Yağlı çizgilenmeler kan akımını etkilemezler¹⁷.

Fibröz plaklarda lipidler hem makrofaj köpük hücrelerinde, hem de ekstrasellüler matriks içinde bulunurlar. İntima, düz kas hücreleri ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin birikmesine bağlı olarak kalınlaşmıştır. Lipidler ve makrofajlar, çoğunlukla, T lenfositler ve bazen B lenfositler ve mast hücrelerini de içeren çekirdek bölgesinde daha sık görülür. Düz kas hücreleri ve ekstrasellüler matriks subendotelyal bölgede daha fazla miktarda bulunur ve plağın daha derin olan bölümünde lipid ve inflamatuvar hücreleri kaplayan fibröz bir başlık oluşturur¹⁷.

Komplike lezyonlar, lipidler, inflamatuvar hücreler ve fibröz dokuya ek olarak, hematoma, kanama veya trombotik depozitler de içeren plaklardır. Komplike lezyonlar daha çok fibröz plağın yırtılması sonucunda gelişirler. Adventisyal vaza vazorumdan plağa giren kapillerde kanama diğer bir neden olabilir. Fibröz başlık ve luminal yüzeyde fissürler, erozyonlar ve ülserasyonlar diğer sık görülen özelliklerdir. Koroner ateroskleroza bağlı morbidite ve mortalite, esas olarak bu lezyonlara bağlıdır. Daha yaşlı kişilerde bu lezyonlar çoğunlukla kalsiyum depozitleri içerirler, kalsiyum depozitleri plakları daha kırılabilir ve gerilme stresine yanıt olarak yırtılmaya daha eğilimli hale getirebilir¹⁷.

Amerikan Kalp Birliği Damar Lezyonları Komitesi plak tiplerini gelişimine göre sınıflamayı önermektedir. Amerikan Kalp Birliği Damar Lezyonları Komitesi 8 tip lezyon tanımlamıştır⁴²;

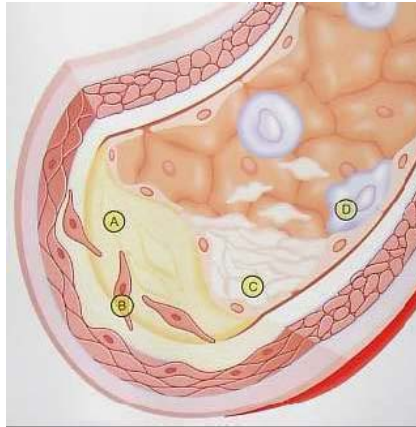
Tip I lezyon, ilk lezyon olup minör lipid birikimi ve monositlerin endotel yüzeyine yapışıp arter lümeninden intimaya geçmeleriyle oluşan seyrek makrofaj köpük hücrelerinden oluşur (Şekil 1).



Şekil 1. Tip I aterosklerotik lezyonun progresyonu⁴³

A: Endotel geçirgenliği, B: Lökosit göçü, C: Lökosit adhezyonu

Tip II lezyon, çoğunluğu monosit kökenli olan lipid yüklü köpük hücrelerinin, sağlam endotel altında bölgesel kümelenmesiyle oluşan yağlı çizgilenmelerdir. Bu lezyonlarda az miktarda T lenfositleri, mast hücreleri ve lipidle dolu düz kas hücreleri de vardır (Şekil 2)⁴³.



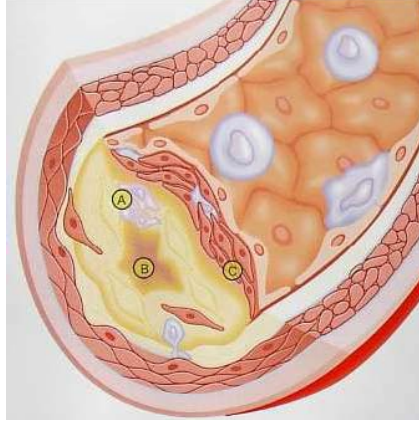
Şekil 2. Tip II aterosklerotik lezyonların progresyonu⁴³.

A: Köpük hücre gelişimi, B: Kas hücresi göçü, C: Trombosit adhezyon ve agregasyonu, D: Lökosit adhezyonu ve girişi

Tip III lezyon, ek olarak az miktarda ekstrasellüler lipid kümeleri içerir. Tip I-III lezyonlar daha sonraki lezyonların öncüleri olmasına karşılık klinik semptomaya yol açmazlar⁴³.

Tip IV lezyonda ekstrasellüler lipid kümeleri biraraya gelerek bir lipid çekirdek oluşturur. Bu lipid çekirdek inflamatuvar hücreler tarafından çevrelenmiş ve ince bir düz kas hücre tabakası ve bağ dokusu tarafından kaplanmıştır (Şekil

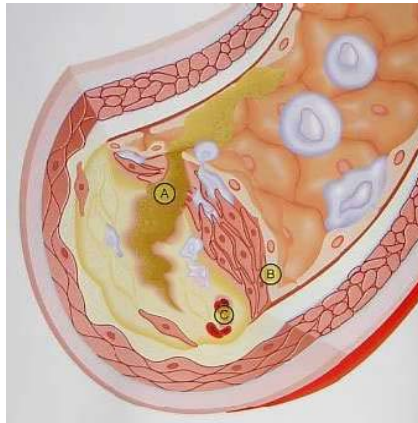
3). Tip IV lezyon genellikle yarım ay şeklindedir ve damar duvarı kalınlığını artırır. Bu evrede orjinal lümen çapını korumak için arterde yeniden yapılanma oluşur⁴³.



Şekil 3. Tip IV aterosklerotik lezyonların progresyonu⁴³.

A: Makrofaj birikimi, B: Nekrotik çekirdek oluşumu, C: Fibröz tabaka oluşumu

Tip V lezyonda yoğun bağ doku depolanması vardır ve lipid çekirdeği çevreleyen fibröz bir kapsül oluşur. Çekirdeği lümeden ayıran kapsül kısmı plak başlığıdır. Bu lezyonlar çoğunlukla çok büyüktür ve bu nedenle arter duvarında yeniden yapılanma (remodeling) ile kompensasyon gelişemediğinden lümen daralır¹⁷.



Şekil 4. Tip VI aterosklerotik lezyonların progresyonu⁴³.

A: Plak rüptürü, B: Fibröz plak kalınlaşması, C: Plak kanaması

Tip VI plaklar çoğunlukla tip V plaklarda gelişen trombozun veya kanamanın komplike ettiği plaklardır. Bu lezyonun gelişmesinin nedeni plak yırtılmasıdır ve subendotelyal fibröz dokuda fissürler, erozyonlar ve ülserasyonlar sık olarak gözlenir (Şekil 4). Akut myokard infarktüsü ve kararsız angina gibi klinik olaylar bir kaç istisna dışında tip VI lezyona bağlıdır⁴³.

Tip VII plaklarda yoğun kalsifikasyon vardır⁴³.

Tip VIII plaklar ise neredeyse tümüyle kollajen ve düz kas hücrelerinden oluşur⁴³.

Bu lezyonlar tip V ve VI lezyonlara göre daha stabildir. Bu nedenle tip V ve VI lezyonlar tip VIII lezyona dönüştürülebilirse klinik açıdan büyük bir kazanç elde edilmiş olur. Son zamanlarda statinlerin bu şekilde plak stabilizasyonu sağladığını gösteren çalışmalar vardır¹⁷.

İleri tip IV ve tip V plakların varlığı klinik semptomlara yol açar. Batı toplumlarında hemen herkeste plak bulunmasına karşılık her bireyde iskemik kalp hastalığı (İKH) gelişmez. İKH gelişenlerde risk faktörleri ile plak sayısı arasında ilişki vardır. Sigara, hiperlipidemi, hipertansiyon ve Diabetes Mellitus gibi faktörler semptoma yol açabilecek plakların sayısını artırır⁴².

Tip IV ve tip V plakların çoğu koroner anjiyografide görülemeyebilir. Çünkü aterosklerotik bir plağın gerisinde media inceliyor atrofie olarak plağın dışarı değil de içeri doğru tümsekleşmesine olanak sağlar. Ayrıca intimal bir plağın gelişmesi, arter duvarının yeniden yapılanmasına ve dış çapın kalınlaşmasına neden olarak plağın lümen boyutlarını etkilemeden yerleşmesine katkıda bulunur. İntravasküler ultrasonografi bu plakların saptanmasında yardımcıdır^{17,42}.

Tip V plakların hepsinde ortak olarak fibromüsküler bir başlık bulunur. Bu başlık göreceli olarak kalın ve uniform olabilir veya araya giren ince alanlarla kalınlık değişebilir. Lipid çekirdek plak hacminin %10- 70'ini oluşturabilir. İnflamatuvar aktivitenin derecesi de plak heterojenitesinin önemli bir parçasıdır¹⁷.

Aterosklerozun Patogenezi

Alman patolog Rudolf Virchow'a göre arter duvarında gelişen düşük dereceli hasar, arterin intimasında plazma içeriğinin artışına ve birikimine neden olan inflamasyon ile sonuçlanmaktadır⁴⁴. Rokitansky'e göre küçük mural trombozun üstüne arteriyel hasarın olduğu yerde bir tabaka meydana gelir ve

bu tabaka trombüs içine ilerleyen düz kas hücrelerinin büyümesiyle organize olur⁴⁵. Lezyonların birleşmesi ile aterosklerozun progresyonu gerçekleşir. Bu iki görüş ardından Ross tarafından 1973'de aterosklerozda "endotelial hasara karşı yanıt (response to injury)" hipotezi ortaya atılmıştır⁴⁶. Bu hipoteze göre hipertansiyon, hormonal disfonksiyon ve hiperlipidemi içeren aterogenezle ilgili risk faktörleri, sigara içme alışkanlığı ve diabetes mellitus gibi etkenler sonucu endotelial bariyerin hasar görmesi aterosklerozun başlangıcı için önemli rol oynamaktadır. Hasar verici ajanlar modifiye lipoprotein formlarının yanı sıra herpes gibi virüsler, klamidya gibi mikroorganizmalar, toksinler, mekanik ve immün faktörler olabilir. 1973'de öne sürülen monoklonal hipotezde ise aterogenez lezyonları neoplazinin bazı formları olarak kabul görmektedir⁴⁶.

Normal endotel, kan ile damar duvarı arasında yarı geçirgen bir bariyer görevi görür. Bunun dışında, endokrin ve parakrin fonksiyonu da vardır. Hemodinamik değişiklikleri algılayıp bunlara karşı vazodilatör maddeler sentezleyip salgılar, vazomotor tonusu, trombosit aktivasyonunu ve immün yanıtı kontrol eder^{47,48}. Bu etkilerinin büyük kısmını da NO aracılığıyla yapar. NO, vazodilatör etkisi dışında lökosit adezyonu, düz kas proliferasyonu ve trombosit agregasyonunu inhibe eder. Bu şekilde damar duvarına lökosit göçünü ve trombüs oluşumunu engeller, kan akışının sürdürülmesini sağlayarak endotelin antitrombotik ve antiinflamatuvar özellik kazanmasını sağlar^{48,49}. Endotel disfonksiyonuna bağlı olarak bu koruyucu fonksiyon kaybolur ve ateroskleroz başlar. Aterosklerozun basamakları; endotel geçirgenliğinin artması, adezyon kuvvet moleküllerinin sentezi, monositlerin endotel yüzeyine yapışması ve intimaya geçmesi, köpük hücre oluşumu, yağlı çizgi oluşumu, düz kas hücrelerinin göç etmesi ve plak gelişimidir⁴⁹.

Endotelde, NO sentezinin azalmasıyla endotel bağımlı vazodilatasyon bozulur. Bu olay aterosklerozun erken klinik bir göstergesi olarak görülür⁵⁰. Sonrasında endotel yüzeyinde adezyon moleküllerinin (VCAM, ICAM, E-selektin) sentezi artmaya başlar; bu da lökositlerin endotele bağlanmasını ve hücre-dışı dokuya geçişini kolaylaştırır. Doku adezyon moleküllerinin artışı ise, IL-1 β , TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler, okside LDL, IL-6'ya yanıt olarak karaciğerden salınan akut faz reaktanı CRP ve aktive olmuş T hücresi ile makrofaj arasındaki CD40-CD40 ligandı etkileşimi ile uyarılır⁵⁰.

CD40, TNF reseptör ailesinin bir üyesidir ve B lenfositler, dendritik hücreler, monositler, timik epitelyal hücreler, fibroblastlar, endotelyal hücreler, düz kas hücreleri ve T lenfositlerde sentezlenen bir hücre yüzey proteinidir. B lenfositlerin çoğalması, değişimi ve sentezlenecek immünglobulin sınıfının belirlenmesinde önemli rol oynar. CD40 ligandı ise CD40 reseptörüne bağlanarak etki gösteren, hem membrana bağlı hem çözünür kısmı bulunan bir proteindir. CD40/CD40 ligandı etkileşimi, aterosklerozun başlaması, ilerlemesi, plağın stabilitesinin bozulması ve plak komplikasyonlarının gelişmesine katkıda bulunur⁵¹⁻⁵³.

Aterosklerozun en erken evresinde görülen inflamatuvar yanıt, lökositlerin aktivasyonu, doku adezyon molekülleri ve kemokinlerin sentezinin artmasıdır⁵⁴. Lökositlerin endotele bağlanması primer olarak selektinler aracılığıyla olur. Bu geçici bağlanma sırasında lökositler endotele daha güçlü bağlanabilmek için çeşitli faktörler salgırlar. Kemokinler ve sitokinler lökositlerdeki integrin moleküllerinde biçimsel değişiklik oluşumunu uyarırlar⁵⁵. İntegrinler, hücrelerin hem çevresindeki yapılara hem de birbirlerine sıkı bir şekilde tutunmasını sağlayan glikoprotein yapısındaki moleküllerdir. Böylece lökositler endotele integrinler aracılığıyla daha yüksek afinite ile bağlanırlar⁵⁶. Proinflamatuvar sitokinlerin salınımından sonra kemokinler çeşitli hücrelerden salınırlar. İnflamasyon süresince, dokular arasındaki değişken kemokin-proteoglikan afinitesi, hücre-dışı matrikste kemokin konsantrasyon farkı yaratır ve lökositleri inflamasyon bölgesinin merkezine çeker⁵⁷. Bu kemokinlerin en önemlisi MCP-1'dir, oxLDL ve diğer inflamatuvar bileşiklerin uyarısıyla endotel hücresi tarafından sentezlenir. Monositler, aktive olmuş endotele tutunurlar ve MCP-1'in monosit reseptör CCR2 ile etkileşimi aracılığıyla konsantrasyon farkı yönünde göç ederler⁵⁸. İntimada monositler aktif makrofajlara dönüşürler. Bu arada kronik hiperlipidemi sonucunda endotel bariyerini geçerek intimada birikmiş olan LDL, endotel, düz kas hücreleri ve makrofajlar tarafından okside edilir. İntimadaki makrofajlar oxLDL'yi fagosite ederek aterosklerozun en erken lezyonu olan "köpük hücrelerini" oluştururlar. OxLDL'nin makrofajlar tarafından fagosite edilmesi, apoptotik hücreler ve çok çeşitli mikrobiyal makromolekülleri de fark edebilen çöpçü reseptörler tarafından kontrol edilir⁵⁹. OxLDL sadece köpük hücre oluşumuna katkıda bulunmanın yanı sıra endotel hücreleri ve düz kas hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterir, monosit ve lenfositler için

kemotaktiktir, endotel adezyon moleküllerinin üretimini artırır, bazı büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılanmasını uyarır^{60,61}. Makrofajlar üzerindeki reseptörlere bağlanma, lokal inflamasyonu artıran proteinlerin genetik kodlamasını uyararak NF-KB yolunu aktive eder⁶². NF-KB gerekli transkripsiyonu yaparak MCP-1 üretimini hızlandırır ve ayrıca metalloproteinaz genlerinin de etkinleşmesine neden olur⁶³. Makrofajlara ek olarak T hücreleri, dendritik hücreler ve mast hücreleri de aterom plağına katılırlar⁶⁴. Köpük hücreleri damar duvarında yağlı çizgileri oluşturur. Bu lezyonlar çocukluk çağında bile görülebilirler ama bu dönemde lipid moleküllerinin lezyona giriş ve çıkışı dengede olduğu için ilerlemezler. Lezyona giren LDL düzeyi arttıkça lezyon sonraki evrelere ilerlemeye başlar⁶⁵.

Lezyon ilerledikçe lipid çekirdek oluşmaya başlar. Hücre dışı lipidin en büyük kaynağı, köpük hücre ölümüdür. Hücre ölümünde oxLDL ve özellikle TNF- α 'nın neden olduğu apoptozis rol oynar⁶⁶. İnflamatuvar ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu, kollajen ve lipid içeriğinin artışı plağın büyümesi ile sonuçlanır⁶⁷. Düz kas hücre proliferasyonunda, PDGF ve FGF gibi aterogeneze yer alan hemen hemen tüm hücrelerden salınan büyüme faktörleri etkilidir. Bu dönemde olgunlaşmış aterom plağında lipid çekirdeğinin üstü, çoğalan düz kas hücreleri ve onların ürettiği bağ dokusu ile oluşan "fibröz kapsül" tarafından örtülür. Bu fibröz başlık, lezyonun zedelenebilirliğinin yani komplikasyon gelişimine ne kadar meyilli olduğunun en önemli belirleyicisidir^{68,69}. Çekirdek içindeki makrofajların doku faktörü (TF) eksprese etmeleri de bu alanın arter lümenine maruz kaldığında trombojenik olmasına neden olur⁷⁰. Sitokinlerin salınmaya devam etmesi, aterom plağının büyümesine neden olur, aynı zamanda düz kas hücre aktivitesini de kontrol eder⁷¹. Plak büyüklüğü artarken arter lümeni, başlangıçta kompensatuvar olarak genişler ve sonrasında arteriyel yeniden şekillenme (remodelling) ile korunur. Bu süreçte matriks metalloproteinazlar önemli rol oynar⁷². Bir süre sonra arterde daha fazla kompensasyon olmaz ve lezyon lümen içine doğru büyümeye başlar ve damarın fonksiyonunu bozar⁶⁷. Bu da kliniğe angina olarak yansır. Seri koroner anjiyografilerle yapılan çeşitli klinik çalışmalar aterom plağındaki devam eden büyümenin basamaklı olarak gerçekleştiğini göstermiştir⁷³.

İnflamatuvar hücrelerin fazla olduğu stabil olmayan plaklar ince fibröz kapsüle sahipken inflamatuvar hücrelerin daha az bulunduğu stabil plaklar kalın

fibröz kapsüle sahiptir. Yırtılan plaklarda bulunan matriks metalloproteinazların (MMP) enzimatik aktiviteleri MMP doku İnhibitörlerine bağlıdır. Bu doku inhibitörlerinden, Doku İnhibitörü-1 ve Doku İnhibitörü-2 damar duvarında MMP'lere bağlanarak MMP'lerin çalışmalarını engellerler. Ama makrofajların saldığı TNF- α , IL-1 doku inhibitörlerinin çalışmasını engeller⁷⁴.

Ciddi klinik sonuçlara neden olan koroner arter trombozu plak yırtılması ile gerçekleşse de plak erozyonu sonucu da gerçekleşebilir. Koroner arterlerde erozyona bağlı tromboz genelde gençlerde ve bayanlarda sıklıkla görölmektedir. Erozyona bağlı tromboz düz kas hücresi ve proteoglikanlarca zengin olup makrofajlar, ekstraselüler lipitçe fakir olan ve düşük kalsifikasyona uğrayan, luminal daralmaları az olan plaklarda gerçekleşir⁷⁵.

Koroner arterlerde erozyon sonucu oluşan tromboz endotel hücre yüzeyinde meydana gelirken, yırtılma sonucu oluşan tromboz ise lipitçe zengin şapkanın yırtılması ve lümendeki kanın damar duvarı içine girişı ile meydana gelir⁷⁶. Hem yırtılmaya bağlı hem de erozyona bağlı tromboza uğrayan koroner plaklarda kalsiyum depolanması görölmezken yırtılmayan stabil plaklarda kalsiyum depolanması görölür. Koroner kalsifikasyonda plakta kalsiyum depo edilmesi aterosklerozun her basamağında gerçekleşebilir. Koroner kalsifikasyon net açıklanmasa da kalsiyum birikiminin plağa mekanik destek kazandırdığı ileri sürölmektedir⁷⁷. Koroner aterosklerotik plaklarda kalsiyum, plak stabilitesine neden olsa da risk faktörleri ile ilişkisi net deđildir⁷⁸.

Ateroskleroz ile İlişkili İnflamatuar Belirteçler

İnflamasyon, akut koroner sendromların patogeneğinde de çok önemli bir role sahiptir. Bu bulgu anstabil koroner plakların histolojik olarak incelenmesi sonucu elde edilmiştir. Tromboksan ve lökotrienlerin sistemik salınımına dair kanıtlar, aktif dolaşan lökositlerin varlığı ve baskın olarak mononükleer lökositleri tutan ve devamında fibrozis ve doku dejenerasyonu birçok hastalık gibi aterosklerozun da inflamatuvar bir hastalık olduğu tezini desteklemektedir. CRP (düşük düzeyde sistemik inflamasyonun nonspesifik plazma belirteci) düzeyleri ile gelecekte kardiyak olay gelişimi ilişkili bulunmuştur. Lökosit değerleri, inflamatuvar protein olan, plazminojen aktivatör inhibitör 1, Von willebrand faktör, albumin gibi akut faz proteinleri de koroner arter hastalığında prognostik açıdan anlamlı bulunmuştur. Çeşitli sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin kardiyovasküler olaylarla ilişkisi halen araştırılmaktadır.

İnflamasyonun aterosklerozda sebep mi yoksa sonuç mu olduğu yönündeki sorular bugün birçok görüşe göre aterosklerozun sebebi olarak cevaplanmaktadır^{5,6}. Ateroskleroz ve klinik sonuçlarında artık inflamasyonun ve genetik faktörlerin rolü ve etkinliği tartışılmazdır. Yapılan çalışmalar kronik stabil anjina pektoris, stabil olmayan anjina ve akut miyokard infarktüsünde inflamatuvar belirteçlerin belirgin düzeylerde yükseldiklerini ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda inflamatuvar sistemi direkt veya indirekt olarak etkileyen genetik varyasyonların iskemik kalp hastalığı riskini artırdığı gösterilmiştir. Bu genetik farklılıklar bazı insanlarda neden hastalığın görülmeyip ya da subklinik seyredip, diğerlerinde şiddetli inflamatuvar reaksiyonlarla birlikte kötü prognostik veriler açığa çıkardığını açıklamaktadır^{5,6}.

İnflamasyona ait yeni belirteçler buldukça ve aterosklerozdaki karmaşık hücrelerarası etkileşim açıklığa kavuştukça çalışmaların bu belirteçleri bir risk faktörü olarak ya da tedavi hedefi belirlemek ya da tedavinin etkinliğini belirlemek açısından ilerleyeceği görülmektedir. Gerçekten de koroner olaylarda anlamlı paralellik gösteren belirteçlerin saptanması, örneğin koroner arter hastalığı açısından diğer risk faktörleri kuvvetli pozitif olan bireyde ileride gelişebilecek koroner sendrom açısından hem koruyucu önlemler alınmasını hem de yaşam tarzı değişikliği ve tedavi gibi opsiyonların kullanılmasını sağlayacaktır. Ya da revaskülarizasyon uygulanmış veya angioplasti uygulanmış hastaların uzun dönem mortaliteleri belirlenebilir, tedavi stratejisi yönlendirilebilir. Son olarak genetik ya da moleküler düzeyde inflamasyona müdahale edilmesi ateroskleroz ve ona bağlı hastalıkların tedavi stratejisinde yeni bir dönem açabilir^{5,6}.

Aterosklerozdaki inflamatuvar belirteçler, hücre adezyon molekülleri, sitokinler, aterojenik enzimler ve high sensitive C-reaktif proteindir. Çeşitli genlerin tek başına veya birleşerek aterosklerozun gelişimine katkıda bulunduğu açıklık kazanmıştır. COX-2 genindeki varyasyonların da ateroskleroza neden olabileceği düşünülmektedir⁷⁹.

Aterosklerozda İnflamatuvar Belirteç Olarak Siklooksijenaz Enzimi Siklooksijenaz Enzimi

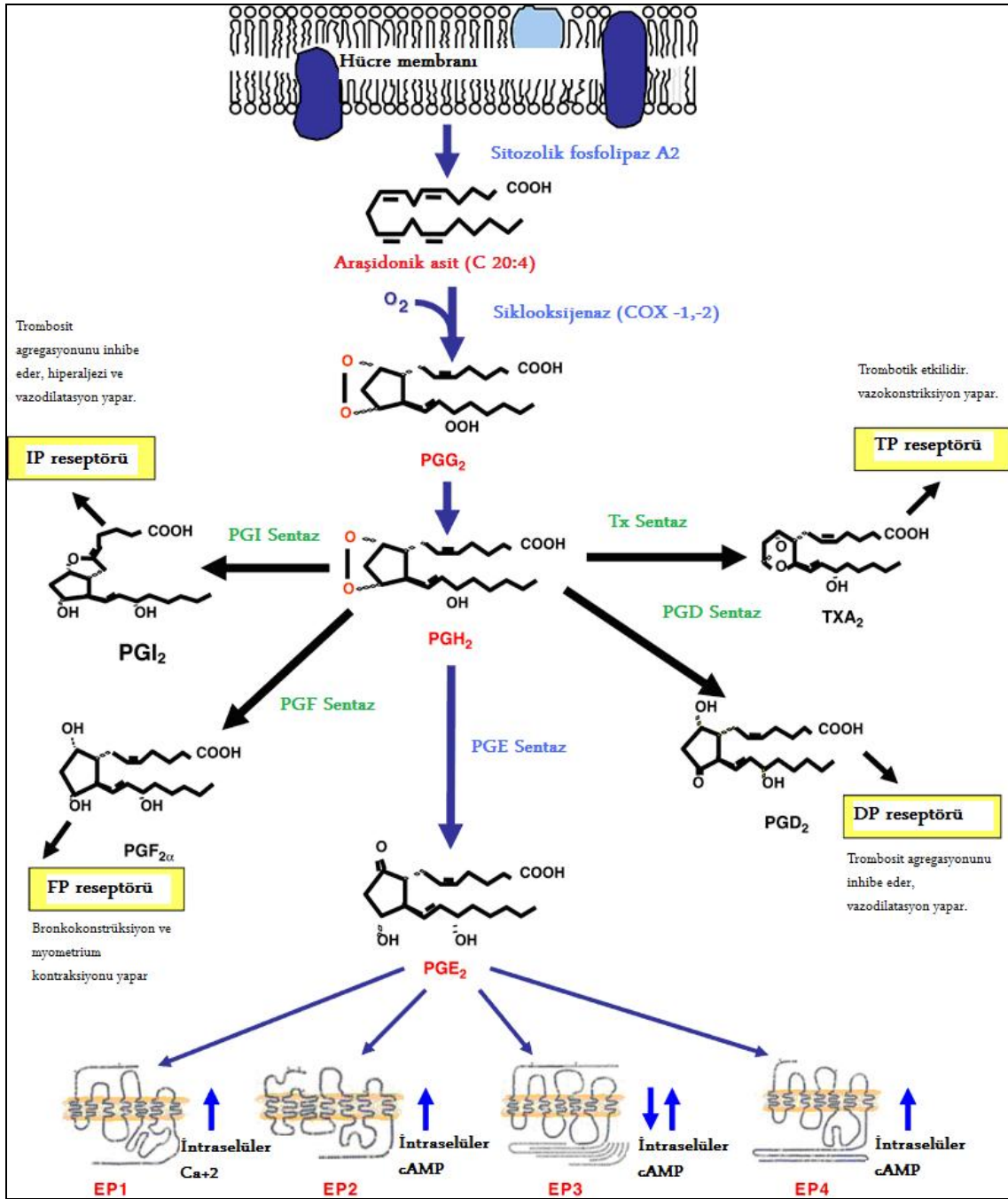
Hücreler farklı uyarılarla uyarıldıklarında ya da hasarlandıklarında hücre membran lipidleri hızla biyolojik olarak aktif mediatörlere dönüşürler. Hücre membranında bulunan fosfolipidler, Fosfolipaz-A₂ enzimi ile araşidonik

asitlere dönüştürülür. Membran lipidi olan araşidonik asitten türeyen biyolojik mediatörler inflamasyon ve hemostazis gibi değişik fonksiyonlarda görev alırlar. Bu mediatörlere ototokoidler veya lokal kısa etkili hormonlar denir. Bunlar hızla yapılırlar, lokal etki ederler daha sonra ya spontan yada enzimatik yolla ortadan kaldırılırlar^{80,81}. Araşidonik asitten türeyen mediatörler başlıca lökotirenler, prostoglandinler, lipoksinler ve tromboksanlardır. Bunlara eikozanoidler denir. Prostoglandinlerin sentezini sağlayan enzim ise siklooksijenazdır. COX aynı zamanda prostoglandin endoperoksit sentetaz, yağ asit siklooksijenaz, prostoglandin sentetaz olarak ta adlandırılır. PG yapımının anahtar enzimidir. Eikozanoidler değişik doku ve organlarda multiple inflamatuvar, mitojenik ve anjiojenik aktiviteye sahiptirler. Aynı zamanda ağrı ve ateşe neden olurlar^{80,81}.

COX enziminin COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu vardır. COX-1 Myomato tarafından 1976'da, COX-2 ise Simmons tarafından 1989'da tanımlanmıştır. Araşidonik asitten COX enzimleri aracılığıyla oluşturulan başlıca prostaglandinler, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ ve tromboksan (TXA₂). Bunların her biri spesifik downstream enzimlerin etkisiyle oluşur ve bazıları doku ve hücreye özgüdür. TXA₂ bunlara bir örnektir ve plateletler içerisinde bulunur^{81,82}.

Prostanoidlerin etkileri, hedef doku ve hücrelerdeki prostanoid reseptörler aracılığıyla olur. Bunlar hücre membranı boyunca uzanan G protein çifti reseptörleri ve beş major alt gruptan oluşmaktadır. PGD₂ için D2, PGE₂ için EP, PGI₂ için IP, PGF_{2α} için FP ve TXA₂ için TP reseptörleri bulunmaktadır. Bu reseptörlerden bazılarının birden fazla izoformu vardır. Örneğin PGE₂'nin reseptörü olan EP'nin dört farklı türü vardır ve her bir izoform farklı bir transdüksiyon yolağıyla hücre yanıtının aktivasyonu ya da inhibisyonunu sağlar⁸³ (Şekil 5).

Araşidonik asit salınımını stimüle eden sitokin ve growth faktörler aynı zamanda COX-2'nin transkripsiyonunu stimüle eder. Böylece PG'lerin sentezi artar⁸⁴.



Şekil 5: Eikazonoid Metabolizması

Siklooksijenazların iki değişik gen kodu 1991'de keşfedildikten sonra bunların tüm özellikleri ortaya çıkarılmıştır. (COX-1 ve COX-2). Bu enzimler, hücre membranından geçişi sağlayan hidrofobik oluk veya kanal oluştururlar. Araşidonic asit veya bir inhibitör bu oluğa bağlanır. İlginç olarak COX-2 proteini COX-1'den biraz daha geniş kanal oluşturur ve buraya COX-2'nin seçici inhibitörü bağlanır. Bu özellik iki enzim arasında anahtar rol oynayabilecek farklılıklardan kaynaklanır. COX-1'in aminoasit dizisinde 120. sıradaki izolösinin

yerini COX-2 de daha küçük bir aminoasit olan valin almakta, bu değişiklik COX-2'deki merkezi kanalın etrafında kullanılmayan geniş hacimli "yan cep" olarak adlandırılan bir aktif alan yaratmaktadır. Bu ek alana bağlanmak üzere tasarlanan bileşikler potent ve selektif COX-2 inhibitörleridir^{85,86}.

COX-1 ve COX-2 genleri ayrı ayrı genlerdir. Sırayla 9 ve 1 insan kromozomları üzerinde bulunur. COX-1 geni 22 kb'lık uzunluğa sahiptir ve 11 exon içerir⁸⁷. Hücre düzenleyici gendir. COX-2 geni 8,3 kb uzunlukta 10 exon içerir⁸⁸. COX-1 geni TATA kutusu içermezken COX-2 TATA kutusu içermekte olup NF-KB, nükleer faktör interleukin-6 (NF-IL-6) ve siklik adenozin monofosfat (cAMP), yanıt elementine bağlanan protein (CREB) gibi birçok transkripsiyon faktörlerini bağlama kapasitesine sahiptir. Dolayısıyla COX-2, inflamasyonda yer alan çeşitli mediatörler ile regüle edilmektedir. Lipopolisakkarid, proinflamatuvar sitokinler (interleukin-1 β , TNF) ve büyüme faktörleri COX-2'yi indüklerken glukokortikoidler, interleukin-4, interleukin-13 ve antiinflamatuvar sitokin olan interleukin-10 inhibe eder⁸⁸.

COX-1 ve COX-2 enzimleri 72 ve 74-kDa ağırlığındadırlar (Tablo 1). Hücre içindeki birçok sinyal iletimi ve metabolik yollarda önemli yerleri olan COX sisteminin, birçok fizyolojik ve patolojik oluşumda yer almaları şaşırtıcı değildir^{89,90,91}. COX-1 endoplazmik retikulumda internal membran proteinine lokalizedir. COX-2 ise hücrede perinükleer yerleşimli bir enzimdir. Sitozolik COX-1'in etkisiyle üretilen prostanoidler otokrin ve parakrin etkiye sahiptir. Perinükleer COX-2 tarafından üretilen prostanoidler ise intrakrin etkiye sahiptir. Hemen tüm memeli dokularında çoğu hücre türlerinde COX-1 enzimi devamlı olarak sentezlenir. Hücreler arası iletişim, doku hemostazisi, hücre koruma ve hücre içi düzenleme fonksiyonlarına sahiptir. Pek çok fizyolojik duruma COX-1 enzimi hızlı yanıt verir. Bunun tersine COX-2 proinflamatuvar mediatörlerce indüklenebilir bir enzimdir ve sitokinler, peroksizomal proliferatörler, tümör promoterleri, büyüme faktörleri ve gonodotropinler tarafından indüklenebilir. Uygun stimülasyon olmadan COX-2 enzimi çoğu dokuda önemsiz derecede az bulunur. Ancak yeni yayınlarda COX-2 enziminin beyin, böbrek ve trakea gibi dokuların bazı hücrelerinde sürekli sentezlendiği bildirilmektedir. COX-2 uyarımı, transkripsiyon artışı ve COX-2 mRNA'sının stabilizasyonuna yol açar⁹²⁻

97

COX-1 geninin regülasyonu henüz çok fazla anlaşılamamıştır. COX-2 mRNA'sı, COX-1 mRNA'sından daha az stabildir. Glukokortikoidler COX-2'nin ekspresyonunu transkripsiyonel düzeyde inhibe edebilir, yada stabilitesi değiştirebilir^{98,99}. COX-2'nin indüklenebilirliği COX-2 geninin 59-flanking bölgesinde çok sayıda cis-acting elemanlarının varlığı ile de kısmen açıklanabilir¹⁰⁰. COX-2 mRNA'sının instabilitesinin artması da COX-2 indüksiyonuna yol açabilir¹⁰¹.

Tablo 1: COX-1 ve COX-2' nin Temel Özelliklerin Karşılaştırılması

Özellik	COX-1	COX-2
Ekspresyon	Sürekli	İndüklenebilir
Protein Büyüklüğü	SDS-PAGE'de tek band, yaklaşık 72 kda	SDS-PAGE'de çift band, molekül ağırlıkları 72 kda ve 74 kda
Gen Büyüklüğü	22 kb	8.3 kb
Kromozom Numarası	9	1
mRNA Büyüklüğü	2.7 kb	4.5 kb; çok sayıda AU'dan zengin bölgeler içerir
Lokalizasyon	Endoplazmik retikulum, çekirdek zarı	Endoplazmik retikulum, çekirdek zarı
Hücre ve doku ekspresyonu	Trombositler, mide, böbrek, kolon, pek çok doku	Beynin bazı bölgeleri, aktive makrofajlar, inflamasyon sırasında sinoviyositler, TNF- α , interlökin 1 β , büyüme faktörleri, tümör promotörleri

SDS-PAGE: sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi,

COX-2'nin romatoid artrit, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, H. Pylori tarafından oluşturulan gastrit, kronik venöz bacak ülseri, lupus nefriti gibi pek çok kronik inflamatuvar hastalıkta yapımı artar. Bu bulgular COX-2'nin gerek akut

gerekse kronik inflammatuar olaylarda önemli rollerinin olduğunu göstermektedir¹⁰²⁻¹⁰⁵. Tablo 2'de COX-2'nin noninflammatuar dokulardaki fonksiyonları verilmiştir.

Tablo 2 : Noninflammatuar Doku Fonksiyonlarında COX-2' nin Rolü

Doku	COX-2 ekspresyonu	Olası fonksiyonlar
Böbrek	Makula densa (jukstaglomerüler aygıt)	İntravasküler volüm regülasyonu
	Henlenin kortikal kalın çıkan loopu	
Beyin	Endotelial hücreler	Ateş cevabı (?)
	Kortikal nöronlar	Nöronlar arası bağlantı
		SSS gelişimi Öğrenme ve hafıza
Kemik	Osteoblastlar	Osteoblastik diferansiasyon
		Kemik remodelling' inin regülasyonu
Uterus	Embriyo implantasyonu	
Gastrointestinal Trakt	İntestinal epitel	Mukozal sıvı salgılanması, bakterilerden temizlenme
	Gastrik ülserler	Ülser iyileşmesi

COX-2 araşidonik asitten PGH₂ oluşumunda hız sınırlayıcı enzimdir. PGH₂ nükleer eikazonoid sinyal sisteminde rol alan aralarında PGE₂, PGI₂ ve trombaksanların da bulunduğu pek çok inflammatuar bileşiğin öncülüdür¹⁰⁶⁻¹¹¹.

COX-2'nin aşırı yapımı proinflammatuar molekül olan PGE₂'nin seviyesini artırır¹⁰⁷. PGE₂ inflammatuar reaksiyonlar esnasında en bol bulunan lipid mediatörlerden birisidir ve immün fonksiyonu düzenler¹¹². PGE₂, COX-2'nin majör ürünüdür; çeşitli hücre tiplerinde bulunan cAMP-artırıcı kapasitesiyle COX-2'yi geribildirim mekanizmasıyla regüle etmektedir¹¹².

COX-2 genel olarak proinflammatuar olmakla birlikte aynı zamanda inflamasyonun gerilemesinde de rol oynar. COX-2 yokluğunda makrofaj kemotaksisi bozulur^{113,114}. Doku hasarına yanıt olarak COX-2'nin artışı bu

enzimin yara iyileşmesinde fizyolojik rolünün olduğunu düşündürmektedir. GIS'de H. pylori ilişkili ülser gelişiminde diğer dokulara benzer şekilde COX-2'nin arttığı ve iyileşmeyle birlikte azaldığı görülür¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Siklooksijenaz ve Ateroskleroz İlişkisi

Ateroskleroz ve trombozda, lökosit-endoel hücreleri adezyonu, vazorelaksasyon ve trombosit agregasyonu gibi çeşitli fizyolojik durumlarda eikazonoidler görev alır¹¹⁹. Vazokonstriksiyon ve trombosit adezyonunun önemli bir indükleyicisi olan TxA_2 üretimi COX-1 ile sağlanır¹²⁰.

PGI_2 , endotel hücreleri tarafından en çok üretilen prostaglandindir¹²⁰. PGI_2 güçlü bir vazodilatatördür, trombosit agregasyonu ve lökosit adezyonunu inhibe eder. Bu özellikleriyle aterotrombozda koruyucu bir rolü olduğu düşünülmektedir¹²⁰. COX-2, sistemik PGI_2 sentezinde belirgin bir rol almakla birlikte vasküler PGI_2 sentezinde de önemli bir role sahiptir^{121,122}.

COX-2 inhibisyonunun PGI_2 ve TXA_2 arasındaki dengeyi bozarak trombozu tetiklediği ortaya konmuştur¹²³. Daha da ötesi, COX-2 inhibitörlerinin kardiyovasküler hastalık riskini arttırdığı konusunda görüşler ortaya çıkmıştır. Ama bu konu tartışmalı olup çözmek için daha ileri klinik çalışmaların gerektiği ileri sürülmektedir¹²⁴⁻¹²⁶. Tromboz akut koroner olayların en önemli nedeni olmasına rağmen ateroskleroz bu olayların altında yatan kronik bir hastalık sürecidir. COX-2 bağımlı prostaglandin sentezi, ateroskleroza tetikleyen inflamatuvar sürece katkıda bulunur. Bu hipoteze göre COX-2 inhibisyonu ateroskleroza geciktirebilir. COX-2 eksprese eden makrofajlar, proinflamatuvar etkileri olan eikazonoidleri üretmektedir. Örneğin, PGE_2 'nin inflamatuvar bir sitokin olan IL-6 üretimini indüklediği gösterilmiştir¹²⁷. Bunun yanı sıra insan monositlerinin LDL stimülasyonu ile kemotaksisinin COX bağımlı bir yolak aracılığıyla gerçekleştiği ortaya konmuştur¹²⁸. CD40 ligasyonu, dramatik bir COX-2 indüksiyonu ve PGE_2 üretimi ile ilişkili bulunmuştur. Bu da CD40-CD40L sisteminin bazı inflamatuvar etkilerinin prostaglandinler aracılığıyla gerçekleştiğini düşündürmektedir¹²⁹. COX-2 ekspresyonu ve PGE_2 'nin, MMP'lerin salınımı ve aktivasyonunu indüklediği gösterilmiştir^{130,131}. MMP'ler makrofaj migrasyonunda önemli bir rol oynamaktadır, bu yüzden COX-2 inhibisyonu makrofaj migrasyonunu engelleyebilir¹³². Arter duvarında aktive makrofajlardan COX-2 aracılığıyla PG üretimi, bazı mekanizmalarla ateroskleroza indükler. Bu mekanizmalar, kemotaksis aktivasyonu, vasküler

geçirgenliğin artışı, inflamatuvar sitokin kaskadının sürekliliği, düz kas hücre migrasyonu ve proliferasyonunun stimülasyonu ve ekstrasellüler matriks sentezidir¹³³⁻¹³⁵.

COX 2'nin Aterosklerozda Öngörülen Roller

-Antiaterogenik (PGI₂)

- 1) Vasodilatasyon
- 2) Hücre adezyonunun inhibisyonu
- 3) Trombosit agregasyonunun inhibisyonu

-Proaterogenik (PGE₂, TXA₂)

- 1) Vasküler permeabilite artışı
- 2) Monosit adezyon artışı
- 3) Makrofaj kemotaksisinin indüksiyonu
- 4) İnflamatuvar sitokinlerin üretimi
- 5) Matriks metalloproteinazların aktivasyonu
- 6) Lökosit ve trombositlerin aktivasyonu

Aterosklerotik Lezyonlarda COX-2 Ekspresyonu

İnsan aterosklerotik monosit/makrofajlar, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde COX-2 ekspresyonunun gösterilmiş olması^{133,136}, COX-2 ekspresyonunun aterogenezin inflamatuvar sürecinde rolü olduğunu düşündürmektedir. COX-1, hem normal arterlerde hem aterosklerotik lezyonlarda eksprese edilmesine rağmen COX-2 ekspresyonu sadece aterosklerotik lezyonlarda sınırlı kalmıştır^{133,136}. Apo E deficient farelerde yapılan çalışmalarda COX-2 ekspresyonu immünohistokimya ve in situ hibridizasyon yöntemleriyle gösterilmiştir. İnsanlarda yapılan çalışmalara benzer olarak fare aterosklerotik lezyonlarında, COX-2'nin endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve monosit/makrofajlar aracılığıyla eksprese edildiği ama normal arterlerde bu ekspresyonun görülmediği saptanmıştır¹³⁷.

İlginç olarak, makrofaj kökenli köpük hücrelerin çoğu COX-2 eksprese etmezler. Ayrıca şaşırtıcı olan bu görüşün, in vitro olarak oxLDL'nin insan aterosklerotik monosit/makrofajlarda COX-2 ekspresyonunu inhibe ettiğini savunmasıdır. Ek olarak oxLDL içeren makrofajların in vitro olarak köpük hücre oluşumunu uyarması, PGI₂ ve PGE₂ üretiminin azalmasıyla ilişkili bulunmuştur¹³⁸.

oxLDL'nin monosit/makrofajlarda COX-2 ekspresyonu üzerindeki etkisi oldukça tartışmalıdır. Bazı çalışmalar, oxLDL'nin COX-2 ekspresyonunu inhibe ettiğini gösterirken farklı çalışmalar ise COX-2 ekspresyonunu indüklediğini bildirmiştir¹³⁹⁻¹⁴¹.

PGE₂, COX-2 mRNA düzeyini ve stabilitesini düzenlemektedir. Bu stabilitenin düzenlenmesi, EP4 reseptörleri p38 mitojen activated protein kinaz aktivasyonu ve PGE₂ aracılı cAMP artışı üzerinden sağlanır. Köpük hücre oluşumu sırasında PGE₂ üretimindeki bu düşüş COX-2 ekspresyonunu down regüle eder^{142,143}.

Ek olarak, in vitro koşullarda makrofaj kökenli köpük hücrelerde ve insan aterosklerotik lezyonlarında oldukça fazla miktarda eksprese edilen PPAR- γ , negatif feedback mekanizmayla COX-2 ekspresyonunu düzenler^{144,145}.

Son bulunan kanıtlara göre COX-2 ekspresyonunu düzenleyen kolesterole duyarlı transkripsiyonal yollar vasküler dokuda bulunmaktadır¹⁴⁶. Bu da kolesterol içeren makrofajlarda, COX-2 down regülasyonu için farklı bir mekanizmadır. Bu görüşe göre köpük hücre oluşumu in vivo olarak COX-2 ekspresyonunun down regülasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Oysa başka bir görüşe göre makrofaj aktivasyonunun, ateroskleroz patogeneğinde anahtar bir rolü olup COX 2 ekspresyonunun artışıyla ilişkili olduğu saptanmıştır¹⁴⁷.

İlginç olarak düz kas hücrelerinde erken dönemde COX-2 indüksiyonu hasarlı ya da disfonksiyonel endotelde PGI₂ oluşumunu sağlayarak koruyucu etki göstermektedir. Makrofajlarda COX-2 ekspresyonu ise çoğunlukla proinflamatuvar etkilere sebep olmaktadır. Çünkü bu hücrelerde COX-2, başlıca PGE sentaz (PGES) ile proinflamatuvar etkileri olan PGE₂ oluşumunu sağlar¹⁴⁸.

COX-2 ve Aterosklerotik Plak İnstabilitesi

Aterosklerozun her fazında, erken lezyonlardan plak rüptürüne kadar sistemik ve lokal inflamasyon görülür. Rüptüre eğilimi olan aterosklerotik plaklar, stabil plaklara göre farklı histolojik özellikler gösterir. Aktif makrofajlar ve T lenfositlerden oluşan inflamatuvar infiltrasyon, unstabil plaklarda stabil plaklara göre daha belirgindir. Bu durum bize plak instabilitesinde inflamasyonun ne kadar önemli rolü olduğunu göstermektedir¹⁴⁹.

İnflamasyon ve plak instabilitesi arasındaki ilişkiyi inceleyen çeşitli mekanizmalar bulunmuştur. Araşidonik asit yolağı kaynaklı bazı önemli lipid mediatörler ve inflamatuvar enzimlerin ateroskleroz patofizyolojisinde önemli bir

rolü olduğu ortaya konmuştur. Geçtiğimiz yıllarda aterosklerotik plak instabilitesinde bazı moleküler mekanizmalar tanımlanmıştır. Tüm bu çalışmalar COX'un indüklenebilir formu olan COX-2 ile ilişkilidir. Bu enzimin proinflamatuvar etkilerinin yanı sıra antiinflamatuvar etkileri de vardır^{150,151}.

Son yıllarda, COX-2'nin aterosklerotik plak instabilitesindeki rolünü açıklamak için bazı çalışmalar yapılmıştır. Endarterektomi yapılan hastaların carotid plaklarında COX-2 ekspresyonunu göstermek için yapılan bir çalışmada, The North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) (1991) sınıflamasına göre semptomatik ve asemptomatik hastalar kullanılmıştır¹⁵². Sonuçta, COX-2'nin tüm plaklarda bulunduğu ama farklı ekspresyona uğradığı görülmüştür. Semptomatik hastaların plakların asemptomatik hastalarinkine göre daha yüksek COX-2 düzeyleri içerdiği gözlenmiştir. COX-2 başlıca plak sırtında ve lipid çekirdeğin periferinde, makrofajdan zengin bölgelerde yerleşmiştir¹⁵².

Çalışmalar COX-2'nin büyük oranda aktive makrofajlarda, daha az oranda ise düz kas hücrelerinde eksprese edildiğini göstermiştir. Her nasılsa köpük hücre içeren aterosklerotik plakların birçok bölgesi COX-2 içermemektedir. Bu da makrofaj COX-2 düzeylerinin olgun köpük hücrelerde down regüle olduğunu düşündürmektedir. Bu gözlemin ardından in vitro çalışmalarda, insan monosit/makrofajlarında COX-2 ekspresyonunun oxLDL tarafından baskılandığı konusunda kanıtlar bulunmuştur^{153,154}.

Ayrıca in vitro çalışmalarda, kolesterol yüklü makrofajların köpük hücre oluşumunu indüklemesi, PGI₂ ve PGE₂ yapımında azalmayla ilişkili bulunmuştur. Makrofaj köpük hücre oluşumu sırasındaki PGE₂ üretiminde azalma, COX-2 ekspresyonunu down regüle eder. Çünkü PGE₂'nin COX-2 mRNA düzeyini ve stabilitesini pozitif geri beslenme ile düzenlediği gösterilmiştir. Aterosklerotik sürecin fazına göre COX-2'nin farklı biyolojik rolleri olduğu görülmektedir^{153,154}.

COX Enzimindeki Önemli Genetik Polimorfizm Bölgeleri

Türler arasındaki çeşitlilik genetik farklılıklarla mümkün hale gelmiştir. Genetik çeşitlilik aynı türün bireyleri arasında bireysel farklılıklara neden olur. Bu sayede kişilerin aynı hastalığa farklı yanıtlar verdikleri görülür. Çoğu kişide kronikleşmeden iyileşen ve bağışıklık gelişen bir hastalık bazılarında kronik enfeksiyonlara neden olur. Kronikleşen hastalığın seyri de kişiler arasında yine

farklılık gösterir. Bazılarında ılımlı bir seyir varken diğerlerinde son derece hızlı seyirli hastalık tablosu görülebilir. Bütün bu farklılıkların genetik çeşitliliğe bağlı olduğu düşünülmektedir¹⁵⁵.

Tek gen polimorfizmi (SNP= single nucleotid polimorfizm) insan genomunun genetik çeşitliliği içerisinde en sık rastlanan formdur¹⁵⁵. Bunların kimileri insan kanseri gelişiminde hassasiyete neden olur¹⁵⁶⁻¹⁶³. Bazı sitokinlerde gelişen polimorfizm sonucunda o sitokin fazla miktarda yapılabileceği gibi eksik olarak ta yapılabilir¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Genetik polimorfizm pek çok enzim ve sitokini kodlayan gende gösterilmiştir. Bu enzimlerden birisi de COX enzimidir^{167,168}.

Literatürde elde edilen bilgilere göre yaklaşık COX-2'de 124 tek nükleotid polimorfizmi belirlenmiştir¹⁶⁹. Bunların çok azında fonksiyonel etki görülür. COX-2 765 G>C polimorfizminde in vitro olarak COX-2 promoter aktivitesinde % 30 azalma olduğu görülmüştür¹⁷⁰. COX-1 ile ilgili bugüne kadar gösterilmiş 9 tek gen polimorfizm vardır^{167,168}. COX-1'de görülen tek gen polimorfizm noktalarından ikisi L237M, V481I' dir¹⁷¹.

COX-2 5209 ve 8473 polimorfizmi, inflamatuvar barsak hastalığında artışla ilişkili bulunmuştur¹⁷². Birkaç raporda COX-2 926 G>C polimorfizmi yüksek seviyede COX-2 artışına neden olmuştur ve in vitro olarak %30 oranında promotor aktivitede azalma olmuştur^{170,173}. V511A (lokalizasyon Exon 10) polimorfizmi Afrikalı Amerikalılar arasında % 5 oranında bulunur ve kolorektal adenom ve karsinoma karşı koruyucu özelliği vardır¹⁷⁴. Diğer tek gen polimorfizimleri ve lokalizasyonları C-162G Promoter, C645T, T10G 5'-UTR, R228H Exon 6 polimorfizimleridir¹⁷⁵.

COX-2 genindeki polimorfizimler klinik olarak daha fazla incelenmiştir. Yanıt elementine bağlanan protein (CRE) ve yanı sıra NF-KB, NF-IL6, myb gibi farklı nükleer regülatör faktörler COX-2 geninin dokuya spesifik tarzda transkripsiyonunda önemli rol oynar. Polimorfizm, COX-2'nin ekspresyonunu potansiyel olarak değiştiren faktörler için bağlanma bölgelerinin oluşumunu veya ortadan kalkmasını sağlayabilir. Böylece değişik hastalıklara karşı risk veya korunma sağlanmış olur¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. Papafili ve arkadaşları tarafından tanımlanan COX-2 765G>C polimorfizminde stimülatuar protein 1'in (Sp1) bağlanma bölgesine bağlanmasında bozukluk olduğu görülmüştür. Sp1 proteini transkripsiyon için pozitif bir aktivatör olarak çalışmaktadır. Bu polimorfizm sayesinde in vitro olarak COX-2 promoter aktivitesinde % 30 azalma

görülmüştür¹⁷⁰. COX-2'nin değişik allelleri veya haplotiplerindeki potansiyel genetik polimorfizm inflamatuvar yanıtı modüle eden proteinlerin aktivitesinde ve/veya ekspresyonunda değişikliğe neden olur¹⁶⁹. COX-2'nin 3' untranslated (UTR) ve promoter bölgesindeki tek gen polimorfizminin, prostat, meme, kolorektal, özefageal, gastrik, mesane, biliyer trakt ve non small cell AC kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir¹⁸⁰⁻¹⁹³.

Klinik ve subklinik ateroskleroz hastalarında COX-2 geninde 765G>C polimorfizmi, C alleli varlığında, düşük promotor aktivite ve düşük CRP değerleriyle ilişkili bulunmuştur. Ayrıca bu tek nükleotid polimorfizmi, gelişebilecek kardiyovasküler hastalık riskinde azalmayla ilişkili bulunmuştur^{194,195}.

Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda inflamasyonun göstergeleri olan parametreleri kullanarak koroner arter hastalığı-inflamasyon ilişkisini ortaya koymayı, son yıllarda yapılan çalışmalarla üzerinde yoğunlaşmış olan COX-2 enziminin bu ilişkideki olası rolünü belirlemeyi hedefledik.

Türkiye'de COX-2 765G>C polimorfizminin koroner arter hastalığı ile ilişkisi ile ilgili yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda COX-2 765G>C polimorfizminin etnik farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Bu çalışmada Mersin'de COX-2 765G>C polimorfizminin koroner arter hastalığı olan hastalarda rolü belirlenecek, ayrıca kontrol grubu sonuçları değerlendirilerek sağlıklı kişilerde COX-2 765G>C polimorfizminin allel sıklığı bulunarak toplumda görülme sıklığı belirlenecektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Araç ve Gereçler

Kimyasal Madde ve Çözücüler

Mutlak etil alkol (Reidel-Haen)

2-propandiol (Merck)

Bidistile su

Alet ve Gereçler

Santrifüj (Sigma k-15-1)

Etüv (Nüve EN 500)

Derin Dondurucu (Uğur)

Soğutucu (Bosch)

1,5 ml'lik kapaklı tüp (Isolab)

Otomatik ayarlanabilir pipet (Eppendorf)

Gerçek zamanlı PCR Cihazı (LightCycler 2.0, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

Distile Su Cihazı (Mini Pure)

3 ml'lik %7.5 EDTA'lı tüp (Venoject)

10 ml'lik içeriksiz biyokimya tüpü (Venoject)

Kullanılan Kitler

Açlık Kan Glukozu: (Cat. No. 2055643, Roche Diagnostics Mannheim, GmbH, Germany)

Total Kolesterol: (Cat. No. 2055643, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

HDL Kolesterol: (Cat. No. 2055937, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

Trigliserid: (Cat. No. 2144620, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

CRP: (Cat. No. 2144620, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

High Pure PCR Template Kit (Cat. No. 1 796 828, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)

LC G765C COX 2 polimorfizmi için dizayn edilen;

COX2 RealTimeFor: 5'-cattaactatttacagggtaactgcttagg-3', (product description no: 1009366, TIB MOLBIOL syntheselabor GmbH, Germany)

COX2 RealTimeRev: 5'-ccccctcctgtttcttga-3', (product description no: 1009367, TIB MOLBIOL syntheselabor GmbH, Germany)

G allele spesifik prob; probe 1, 765G: 6-FAM-5'-ctttccgcctctct-3', (product description no: 1009368, TIB MOLBIOL syntheselabor GmbH, Germany)

C allele spesifik prob; probe 2, 765C: TET-5'-ctttccccctctct-3', (product description no: 1009369, TIB MOLBIOL syntheselabor GmbH, Germany)

Kullanılan Ayıraçlar

DNA İzolasyonunda Kullanılan Ayıraçların Hazırlanması

DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Kit kullanılmıştır. Kit içeriği tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3: DNA izolasyonunda kullanılan kitin içeriği

Kimyasal	Miktarı	İçeriği
Bağlayıcı tampon	20 ml	6 M guanidin HCl, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH:4.4
Proteinaz K	90 mg	Liyofilize preparat
İnhibitör uzaklaştırıcı tampon	53 ml	5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCL pH:6.6
Yıkama tamponu	20 ml	20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH:7.5
Elüsyon tamponu	40 ml	10 mM Tris, pH:8.5

Yukarıda belirtilen kit içeriklerinden bağlayıcı tampon ve elüsyon tamponu doğrudan hiçbir işlem yapılmadan kullanılırken, diğer içerikler kit prospektüsünde verilen uygulama talimatına göre aşağıda verilen şekilde hazırlanmıştır.

Proteinaz K: Liyofilize proteinaz K (liyofilize halde oda sıcaklığında saklanmıştır) 4.5 ml steril bidistile su ile sulandırılmış ve 500 µl'lik hacimler halinde -20°C'de korunmuştur.

İnhibitör Uzaklaştırıcı Tampon: 33 ml tampona 20 ml mutlak etil alkol eklenmiştir.

Yıkama Tamponu: 20 ml yıkama tamponunun üzerine 80 ml mutlak etil alkol eklemek yolu ile hazırlanmıştır.

Ayrıca DNA izolasyon kitinin içerisinde bulunmayan fakat uygulamada gerekli olan 2-propandiol herhangi bir hazırlığa gerek duyulmadan stok çözültiden doğrudan kullanılmıştır.

Çalışma Grubu ve Örnek Alımı

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji ve Kalp Damar Cerrahisi polikliniklerine göğüs ağrısı ile başvuran ve koroner anjiyografi ile koroner arterlerinde %70 ve fazlası darlığı olan 95 koroner arter hastası ve özgeçmişinde herhangi bir hastalığı bulunmayan, koroner anjiyografi sonuçları normal bulunan 95 sağlıklı birey çalışma grubumuza dahil edilmiştir. Çalışma grubunu oluşturan bireylerin periferik venöz kanları, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içerikli tüplere ve serumları ayrılmak üzere düz biyokimya tüplerine alınmıştır.

Hastaların tam kanlarında, kan alımını takiben öncelikle eritrosit sedimentasyon hızları (ESR) çalışılmış ve sonra DNA izolasyonu yapılmak üzere çalışma gününe kadar +4°C'de saklanmıştır. Lipid profili, CRP, açlık kan şekeri (AKŞ) düzeyleri için içeriksiz biyokimya tüplerine alınmış periferik venöz kan örnekleri, 10 dakika bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmış ve otoanalizörde çalışılmıştır.

Bu çalışma Helsinki deklarasyonu özelliklerine göre yapılmış ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Yöntemler

Koroner Anjioplasti

Koroner anjioplasti standart Judkin tekniği kullanılarak femoral girişim ile gerçekleştirilmiştir. Koroner anjioplasti esnasında kontrast ajanı olarak Lopromide (Ultravist-370, Schering AG) manuel olarak (her pozisyonda 6-8 ml kontrast ajanı) kullanılmıştır. Yatay ekseninde her iki sağ ve sol yerleşimli koroner arterlerin kranial ve kavdal açıları gösterilmiştir. Koroner anjioplasti işlemi Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Anjiyografi sonrası hastaların tıkalı damar sayıları, KAH skorları ve tıkanma endeksleri yine aynı Anabilim Dalı tarafından hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

Koroner anjiyografi sonuçlarına göre koroner arterlerinden en az birinde %70 darlık belirlenen KAH hastaları ateroskleroz tanısı almıştır.

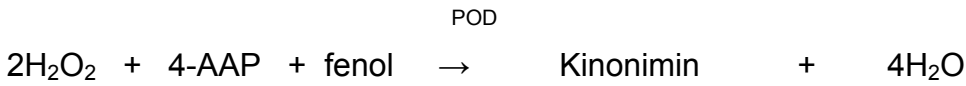
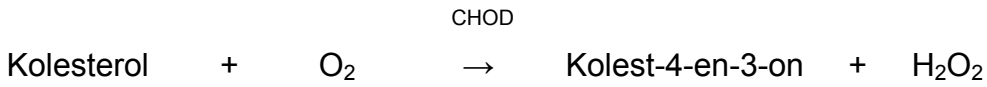
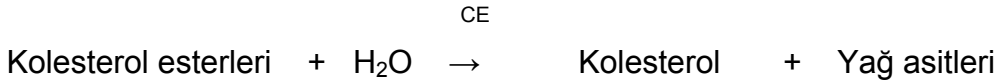
Eritrosit Sedimentasyon Hızı Ölçümü

ESR, fotometrik kinetik metot ile ölçülmüştür. Yöntemin prensibi, eritrosit agregasyon oluşumunun 20 saniye boyunca saniyede 50 defa ölçüm yapılarak belirlenmesine dayanmaktadır.

Lipid Profili Ölçümleri:

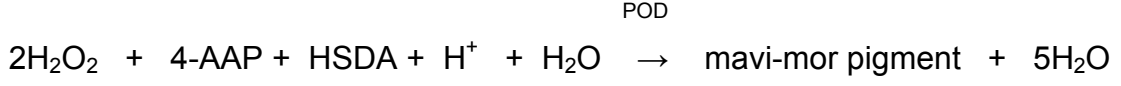
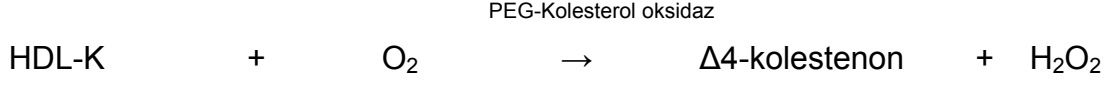
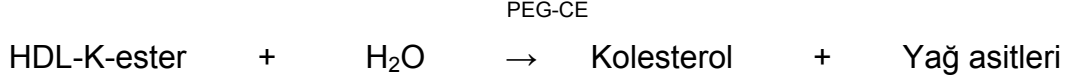
Total Kolesterol Ölçümü

Total kolesterol düzeyleri enzimatik kolorimetrik metod (kolesterol oksidaz/paraaminofenazon (CHOD/PAP)) ile çalışılmıştır. Yöntemde prensip, kolesterol esterlerinin kolesterol esteraz (CE) enzimi ile açığa çıkan serbest kolesterolün, kolesterol oksidaz varlığında hidrojen peroksit (H_2O_2) oksidasyonu ve oluşan H_2O_2 'nin ise peroksidaz (POD) ile fenol ve 4-aminoantiprin (4-AAP) varlığında kinonimine dönüşümü ve oluşan kinoniminin 520 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır. Total kolesterolün ölçümünde yer alan tepkime denklemi aşağıda verilmiştir.



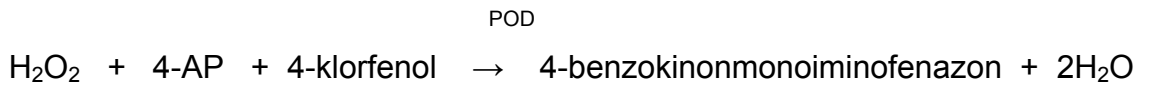
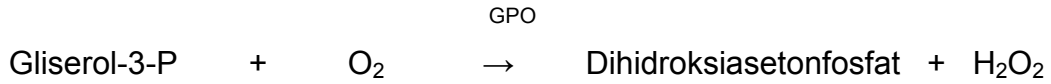
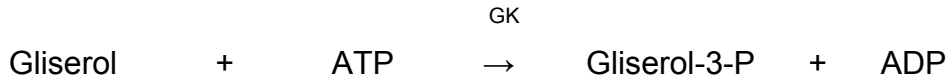
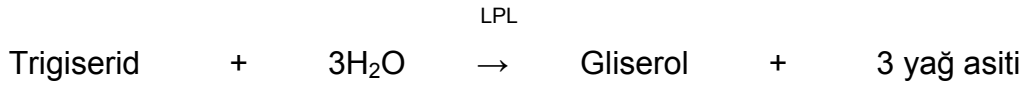
HDL-Kolesterol Ölçümü

HDL-Kolesterol ölçümünde homojen enzimatik kolorimetrik yöntem kullanılmıştır. Yöntemin prensibinde magnezyum sülfat ve dekstran sülfat varlığında, polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş enzimlere dirençli suda çözünen LDL, VLDL ve şilomikron kompleksleri oluşturulur. HDL-Kolesterolün kolesterol içeriği PEG ile modifiye edilmiş (%40 oranında) kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz tarafından enzimatik kataliz ile belirlenir. Kolesterol esterleri kolesterol esteraz tarafından serbest kolesterol ve yağ asitlerine yıkılır. Oksijen varlığında kolesterol, kolesterol oksidaz tarafından Δ^4 -kolestenon ve H_2O_2 'ye okside olur. Hidrojen peroksit, POD tarafından 4-AAP ve Sodyum-N (2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoksianilin (HSDA) varlığında mavi-mor pigment oluşturur. Oluşan mavi-mor pigmentin 582 nm dalga boyundaki absorbansı spektrofotometrik olarak belirlenir. HDL-Kolesterol ölçümünde kullanılan kimyasal tepkimeler aşağıda verilmiştir.



Trigliserid Ölçümü

TG düzeyleri enzimatik kolorimetrik (gliserolfosfat oksidaz-peroksidaz) yöntem ile ölçülmüştür. Yöntemin prensibi, trigliseridlerin lipoprotein lipaz (LPL) tarafından serbest yağ asitleri ve gliserole hidrolizini, gliserolün gliserokinaz (GK) ile gliserol-3-fosfata katalizini, gliserol-3-fosfatın da gliserol fosfat oksidaz (GPO) tarafından dihidroksiaseton fosfata (DHAP) ve H₂O₂'e oksidasyonunu ve oluşan H₂O₂'in POD katalizi eşliğinde fenol ve 4-aminofenazon ile tepkimesi sonucu 4-benzokinonmonoiminofenazon oluşumuna dayanmaktadır. Oluşan kinon bileşiğinin 520 nm'de verdiği absorbans HDL-kolesterol miktarı ile doğru orantılıdır. Trigliserid ölçümünde yer alan tepkime denklemleri aşağıda verilmiştir.



LDL ve VLDL Ölçümü

LDL ve VLDL düzeyleri oransal olarak Friedwald eşitliğine göre hesaplanmıştır. Friedwald Eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$\text{VLDL} = \text{Trigliserid} / 5$$

$$\text{LDL} = \text{Total kolesterol} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

Serum CRP Düzeyinin Belirlenmesi

Serum CRP düzeyleri partikülle güçlendirilmiş immünotürbidimetrik metot kullanılarak otoanalizör (Cobas Integra 800 cihazı) ile saptanmıştır. Yöntemin prensibi, latex partikülleri ile birlikte olan insan kaynaklı CRP'nin monoklonal

anti-CRP antikoru ile kaplanması ve oluşan presipitatın türbidimetrik olarak 552 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır.

Açlık Kan Şekeri Ölçümü

Enzimatik heksokinaz metodu ile otoanalizörde (Cobas Integra 800) çalışılmıştır.

DNA İzolasyonu

Prensip; Hücreler, tüm nükleazları hemen inhibe eden bir kaotropik tuz (guanidin HCl) varlığında proteinaz K ile kısa bir inkübasyon sonunda parçalanır. Hücresel nükleik asitler pürifikasyon filtre tüplerinde bulunan özel fiber cam yapıya seçici olarak bağlanır. Bağlı nükleik asitler kontamine edici hücresel elemanlardan hızlı yıkama ve çevirme işlemleri ile arındırılır. Bu işlemin gerçekleşmesinde çizelge 1'de içeriği verilen inhibitör temizleyici tampon ile yıkama tamponu kullanılmaktadır. Son olarak düşük tuz elüsyonu ile nükleik asitlerin fiber cam yapıdan ayrılması sağlanır.

Protokol;

1. Steril bir tüpe (1,5 ml'lik kapaklı) 200 µl tam kan alınır ve üzerine sırası ile 200 µl bağlayıcı tampon ve 40 µl proteinaz K eklenir. Proteinaz K eklenmesini takiben tüplerin kapakları kapatılarak hemen karıştırılır.
2. Tüpler 10 dakika 72°C'de inkübe edilir.
3. İnkübasyonun ardından 100 µl izopropanol eklenir, iyice karıştırılır ve karışım filtre tüpüne aktarılır.
4. Bir dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir.
5. Toplama tüpü değiştirilir ve tüpe 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon eklenir. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir ve toplama tüpü tekrar değiştirilir.
6. Ardından tüpe 500 µl yıkama tamponu eklenir ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir. Toplama tüpü değiştirilir.
7. Bu yıkama işlemi bir kez daha tekrar edilir ve toplama tüpü değiştirilir.
8. Tüpe herhangi bir çözelti eklenmeden 10 saniye 8000 rpm'de tekrar santrifüj edilir.
9. Son olarak 1.5 ml'lik kapaklı DNA saklama tüplerine filtre tüpleri yerleştirilerek içerisine 72°C'de bekletilen elüsyon tamponundan 200 µl eklenerek 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir. Bu defa DNA elüsyon

tamponunun yardımı ile 1.5 ml'lik kapaklı DNA saklama tüplerine geçtiği için filtre tüpleri uzaklaştırılır ve DNA eldesi tamamlanmış olur.

Primer ve Prob Dizaynı

Bütün amplifikasyon primerleri ve tüm flurofor-işaretli problar sentezletirilmiş ve ters-faz HPLC ile saflaştırılmıştır (Tib-Mol-Biol). Amplifikasyonda kodlama dizisinin 5' ucunda yerleşik varyantlar için olmak üzere iki set primer kullanılmıştır.

Kullanılan primerler,

COX2 RealTimeFor: 5'-cattaactatttacagggtaactgcttagg-3' ve

COX2 RealTimeRev: 5'-ccccctcctgtttcttga-3'

Kullanılan problar,

G allele spesifik prob; probe 1, 765G: 6-FAM-5'-ctttccgcctctct-3' ve

C allele spesifik prob; probe 2, 765C: TET-5'-ctttccccctctct-3'

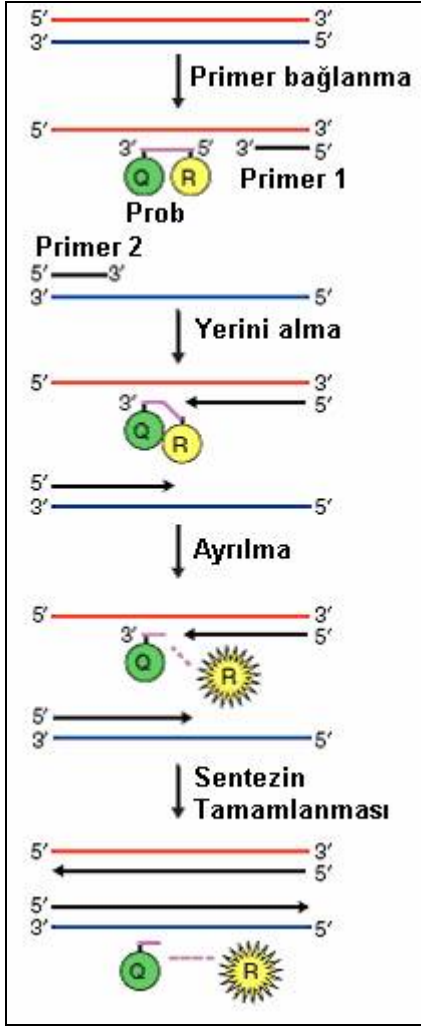
Polimeraz Zincir Tepkimesi

PCR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi in vitro koşullarda amplifiye etmek için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir.

PCR, reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyonu), zincirin uzaması (polimerizasyonu, çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanması esasına dayanır.

Real-time PCR sisteminin temelini floresan taşıyıcı moleküllerinin ışınımlarının tespiti ve miktarının belirlenmesi oluşturur. Sinyal artışı PCR ürün artışıyla direkt orantılıdır. DNA amplifikasyonunu belirlemek için değişik floresan sistemler kullanılır.

Real Time PCR'da kullanılan yöntemlerden biri, hidroliz probları kullanan TaqMan Prob yöntemi olup Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6: TaqMan real-time PCR kuantifikasyonu

PCR aşamasında üç çift primer kullanılır. 1. ve 2. primerler her bir DNA iplikçığı üzerinden replikasyonu başlatır. 3. (prob) ise aralarından bir zincire bağlanır. Prob, iki modifiye edilmiş baz içerir; 5' ucunda bulunan floresan reporter (R) ve 3' ucundaki floresan quencer (Q). Replikasyon esnasında 1. primer yönünde uzayan DNA iplikçığı, probun 5' ucunu zincirden ayırır ve polimerazın eksonükleaz aktivitesi floresan reporter molekülünü probdan ayırır. Qencerden ayrılan reporter molekülü floresan ışımaya yapar. Oluşan floresan ışınımın başlangıç miktarına göre oranı, her bir PCR döngüsünde ölçülür.

PCR Koşulları

COX-2 765 G>C polimorfizminin analizi için kullanılan materyallerin konsantrasyon ve miktarları sırasıyla Tablo 4'te, PCR koşulları ve spesifik PCR verileri Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 4: 765 G>C polimorfizminin analizinde kullanılan materyallerin konsantrasyon ve miktarları.

İçerik	Konsantrasyon	Miktar
Forward primer	0.25 µM	0.25 µL
Reverse primer	0.25 µM	0.25 µL
FAM probu	0.2 µM	1 uL
TET probu	0.2 µM	1 uL
Taqman master hibridizasyon probu 10X*		4 µl
Örnek DNA	50 ng	5 µL
Distile Su		8 µL
Toplam tepkime hacmi		20 µL

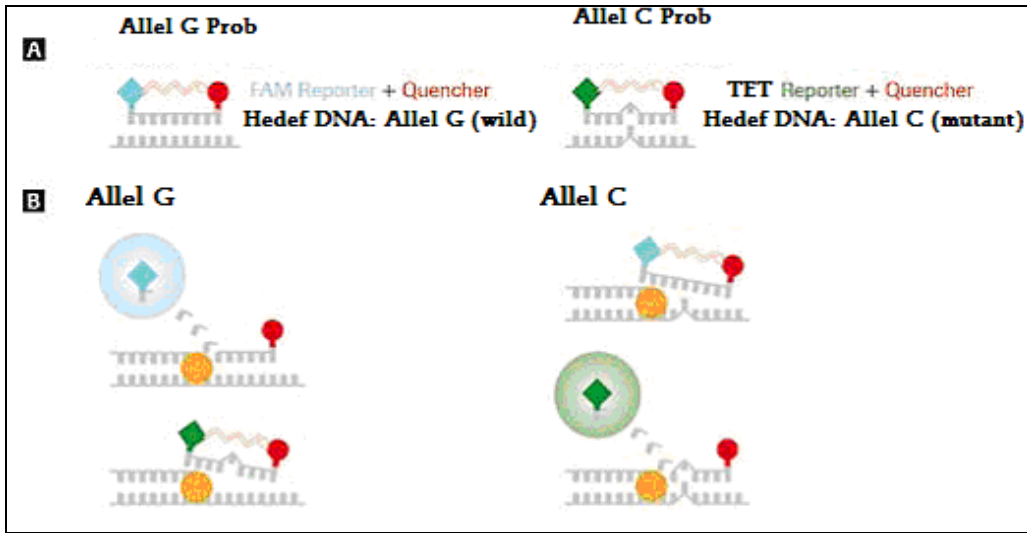
*10 kat yoğun hibridizasyon tamponu nükleotidler, Taq polimeraz, 10 mMg²⁺ içerir.

Tablo 5: 765 G>C polimorfizminin analizi için PCR koşulları

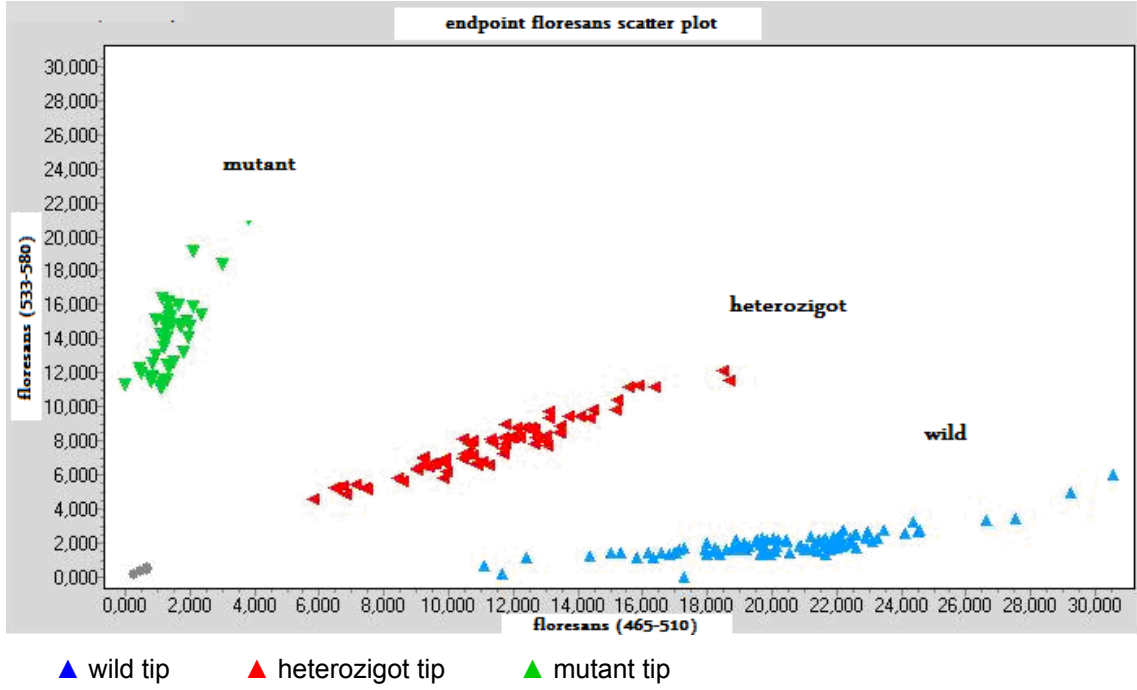
PCR aşamaları		Hedef ısı	Bekleme süresi (sn)	Isı geçiş oranı (°C/sn)	Floresan okuma
Denaturasyon		95	600	20	NONE
Amplifikasyon 45 Döngü	Denaturasyon	95	15	20	NONE
	Yapışma	60	60	20	SİNGLE
	Uzama	72	1	20	NONE
Soğuma		40	30	20	NONE

Genotip Belirlenmesi

Örnek DNA'ları, real time PCR ile amplifiye edildikten sonra Light Cycler 480 genotip software programı kullanılarak end-point analizi yapıldı. End-point genotip analizinde, wild ve mutant DNA için dizayn edilmiş ve FAM ve TET boya ları içeren, sekansa spesifik iki adet prob kullanıldı. Hidroliz problemlerinin hedef DNA'ya bağlanması (A) ve allellerin belirlenmesi (B) şekil 7'de gösterildi. Data işlemleri tarafından her iki boyanın dansite ölçümü yapılarak genotipler belirlendi. Boya dansitelerinin oranlarına göre belirlenen wild, heterozigot ve mutant örnekler Şekil 8'de gösterildi.



Şekil 7: Hidroliz problemlerinin hedef DNA'ya bağlanması (A) ve allellerin belirlenmesi (B)



Şekil 8: COX-2 765 genotiplerinin gösterilmesi

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences version) paket programı kullanılmıştır. AKŞ, T-Kol, HDL-K, LDL-K, Trigliserid (TG), ESR, CRP, BMI (vücut kitle indeksi) ve yaş değerlerinin normal dağılım gösterip göstermedikleri Sharo-Wilk testi ile incelenmiş, test sonucuna göre T. Kol, HDL-K, LDL-K ve yaş değerlerinin normal dağılım gösterdikleri; CRP, TG, ESR, BMI ve AKŞ değerlerinin ise normal dağılım göstermediği bulunmuştur. Bu sonuçlara T. Kol, HDL-K, LDL-K ve yaş değerleri bakımından grup 1 ve grup 2'nin karşılaştırılması için bağımsız iki grup karşılaştırma testlerinden Independent t testi. CRP, TG, ESR, BMI ve AKŞ değerleri için bağımsız iki grup karşılaştırma testlerinden Mann-Whitney U test kullanılmıştır. Genotiplerin olası riskleri binary lojistik regresyon analiz modeli kullanılarak belirlenmiştir. Genotiplerin diğer parametrelerle karşılaştırılması için Ki-kare testi kullanıldı. Sonuçlar için $p < 0.05$ anlamlılık değeri olarak belirlenmiştir.

BULGULAR

Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Demografik ve Tanımlayıcı Veriler

Bu çalışma 31/07/2008 tarih ve 6/69 no'lu Etik Kurul izni alındıktan sonra 2008-2010 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji ve Kalp Damar Cerrahisi polikliniklerine başvuran Stabil Angina Pektoris (SAP) ve Akut Koroner Sendrom (AKS) ön tanıları olan 190 hasta alındı. Koroner anjiyografi ile majör epikardiyal damarlarda veya dallarında çapa göre en az \geq %70 darlık tespit edilen 95 kişi hasta grubu olarak, normal koroner tespit edilen 95 kişi ise kontrol grubu olarak belirlendi. Koroner arter hastalarının tanılarına göre dağılımları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: Koroner arter hastalarının tanılarına göre dağılımları

Tanı	Hasta n (%)
Stabil Angina Pektoris	20 (21)
Akut Koroner Sendrom	75 (79)

KAH ile kontrol grubuna ait yaş, vücut kitle indeksi, cinsiyet, diyabet (Tip 2) ve hipertansiyon varlığı, sigara kullanımı, alkol kullanımı, aile öyküsü, MI öyküsü, tıkalı damar sayısı gibi demografik ve tanımlayıcı verileri Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7: Kontrol ve hasta gruplarının demografik ve tanımlayıcı verileri

		Kontrol (ort±ss)	Hasta (ort±ss)	p değeri
Yaş		56.6± 13.8	61.2±11.5	0.013 [†]
BMI[#]		27.43	27.01	
		Kontrol n (%)	Hasta n (%)	
Cinsiyet	Erkek	39 (41.1)	70 (73.7)	0.000*
	Kadın	56 (58.9)	25 (26.3)	
Diyabet (Tip 2)	Yok	73 (76.8)	66 (69.5)	0.253*
	Var	22 (23.2)	29 (30.5)	
Hipertansiyon	Yok	47 (49.5)	44 (46.3)	0.664*
	Var	48 (50.5)	51 (53.7)	
Sigara kullanımı	Yok	74 (77.9)	64 (67.4)	0.105*
	Var	21 (22.1)	31 (32.6)	
Alkol kullanımı	Yok	95 (100)	95 (100)	
	Var			
Aile Öyküsü	Yok	72 (75.8)	64 (67.4)	0.199*
	Var	23 (24.2)	31 (32.6)	
MI Öyküsü	Yok	----	17 (18)	
	Var	----	78 (82)	
Tıkalı damar sayısı				
	1 damar	----	29 (30.5)	
	2 damar	----	30 (31.6)	
	3 damar	----	30 (31.6)	
	4 damar	----	6 (6.3)	

BMI: vücut kitle indeksi (kg/m²) ,

[#]medyan,

[†] Sürekli değişkenler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

n: hasta sayısı, p: gruplar arası anlamlılık derecesi

*ki-kare testi uygulandı.

Kontrol ve Hasta Gruplarına ait Biyokimyasal Veriler

Kontrol ve hasta gruplarının açlık kan şekerleri, lipid profilleri, ESR ve CRP düzeylerine ait değerler Tablo 8’de, ilaç kullanım sıklığı ise Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 8: Kontrol ve hasta gruplarının açlık kan şekerleri, lipid profilleri, ESR ve CRP düzeylerine ait değerler

	Kontrol (Medyan)	Hasta (Medyan)	p
AKŞ (mg/dL)	93.10	100.30	0.005
Trigliserid	126.38	127.30	0.952
CRP	3.38	9.00	0.000
ESR	8.00	10.00	0.149
	Kontrol (ort±ss)	Hasta (ort±ss)	
T. Kol	175.8 ± 46.1	172.2 ± 44.9	0.588
HDL-Kol	40.9 ± 10.5	39.5 ± 13.1	0.394
LDL-Kol	104.1 ± 32.6	102.2 ± 37.1	0.744

ss: standart sapma, p: gruplar arası anlamlılık derecesi

Kontrol ve hasta gruplarının lipid profilleri ve ESR düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmamıştır. Açlık kan şekerleri, CRP düzeyleri, hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 9: Kontrol ve hasta gruplarının ilaç kullanım sıklığı

Grup	İlaç Kullanımı		p
	YOK n (%)	VAR n (%)	
Kontrol	80 (84.2)	15 (15.8)	0.268
Hasta	74 (77.9)	21(22.1)	

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

Kolesterol düşürücü etkiye sahip statin grubu ilaç kullanımından dolayı, aslında KAH için önemli risk faktörleri olan kolesterol ve TG düzeyleri açısından her iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

COX-2 Genotiplerinin Hasta ve Kontrol Gruplarına Göre Dağılımı

Kontrol ve hasta gruplarının genotiplere göre dağılımı, allel sıklığı, relatif risk (Odd's oranı) ve güven aralığı Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10: Kontrol ve hasta gruplarının genotiplerinin dağılımı ve oluşturdukları riskler

Genotip	Sıklığı n (%)		Relatif Risk (Odd's Oranı)	Güven Aralığı (%95)		p
	Kontrol	Hasta		Alt sınır	Üst sınır	
765 GG	37 (38.9)	44 (46.3)	1.352	0.760	2.408	0.305
765 GC	58 (61.1)	51 (53.7)	referans	----	----	
Allel sıklığı						
G	132 (69.5)	139 (73.2)	1.198	0.767	1.869	0.427
C	58 (30.5)	51 (26.8)	referans	----	----	

n: hasta sayısı, p: gruplar arası anlamlılık derecesi

COX-2 765 CC genotipinin görülmediği bu çalışmada 765 GG ve GC olmak üzere 2 farklı genotip belirlenmiştir. KAH ve kontrol grupları arasında 765 G>C genotipleri ve allel sıklığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmamıştır (Genotipler için Odd's Oranı = 1.352, % 95 güven aralığı 0.760 – 2.408; Allel sıklığı için Odd's Oranı = 1.198, % 95 güven aralığı 0.767-1.869).

Kontrol ve Hasta Gruplarının COX-2 Genotiplerinin Demografik ve Biyokimyasal Verilerle Karşılaştırılması

Kontrol ve hasta grubundaki kişiler GG ve GC genotiplerine göre sınıflandırıldıktan sonra, aynı genotipe sahip kontrol ve hastalar diyabet,

hipertansiyon ve sigara kullanımı gibi risk faktörlerinin karşılaştırılması Tablo 11'de ve açlık kan şekeri, lipid profilleri, ESR ve CRP düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 11: Hasta ve kontrol gruplarının COX-2 765 GG ve GC genotiplerine göre sınıflandırıldıktan sonra diyabet, hipertansiyon ve sigara kullanımı ile ilişkisi

COX-2		765 GG			765 GC		
		Kontrol n (%)	Hasta n (%)	p	Kontrol n (%)	Hasta n (%)	p
Diyabet(Tip2)	Yok	30 (81.1)	31 (70.5)	0.272	43 (75.3)	35 (68.6)	0.526
	Var	7 (18.9)	13 (29.5)		15 (24.7)	16 (31.4)	
Hipertansiyon	Yok	20 (54.1)	20 (45.5)	0.443	27 (46.6)	24 (47.1)	0.958
	Var	17 (45.9)	24 (54.5)		31 (53.4)	27 (52.9)	
Sigara kull.	Yok	29 (78.4)	13 (29.5)	0.420	45 (77.6)	33 (64.7)	0.139
	Var	8 (21.6)	31 (70.5)		13 (22.4)	18 (35.3)	

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

Kontrol ve hasta grubundaki bireyler GG ve GC genotiplerine göre sınıflandırıldıktan sonra, aynı genotipe sahip kontrol ve hastalar karşılaştırıldığında, GG ve GC genotipleriyle diyabet, hipertansiyon varlığı ve sigara kullanımı arasında ilişki saptanmamıştır.

Tablo 12: Hasta ve kontrol gruplarının COX-2 765 GG ve GC genotiplerine göre sınıflandırıldıktan sonra açlık kan şekerleri, lipid profilleri, ESR ve CRP düzeyleri ile ilişkisi

COX-2	765 GG			765 GC		
	Kontrol (medyan)	Hasta (medyan)	p	Kontrol (medyan)	Hasta (medyan)	p
AKŞ	93.00	96.41	0.599	93.38	113.60	0.000
TG	132.56	125.90	0.516	123.92	132.67	0.827
CRP	3.68	4.28	0.772	2.21	11.00	0.000
ESR	12.00	10.00	0.443	7.00	13.83	0.013
	Kontrol (ort±ss)	Hasta (ort±ss)	p	Kontrol (ort±ss)	Hasta (ort±ss)	p
T. Kol	181.8±43.6	172.3±52.1	0.380	171.8±47.7	172.1±38.1	0.966
HDL-K	41.1±10.39	37.8±12.4	0.206	40.9±10.7	40.9±13.6	0.985
LDL-K	111.3± 31.3	103.6±12.4	0.368	99.2±33.1	100.9±31.0	0.780

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

GG ve GC genotiplerine sahip kontrol ve hastaların lipid profilleri ve ESR düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. GG genotipine sahip kontrol ve hastaların AKŞ ve CRP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, GC genotipine sahip hastaların kontrollere oranla AKŞ ($p = 0.000$) ve CRP düzeylerinin ($p= 0.000$) daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu saptanmıştır (Tablo 12).

Hasta Grubunda COX-2 Genotiplerinin; MI Öyküsü, Hastalık Tanıları ve Tıkalı Damar Sayısı ile İlişkisi

GG ve GC genotiplerine göre sınıflandırıldıktan sonra hastalar , COX-2 genotipleri ile MI öyküsü (Tablo 13), hastalık tanıları (Tablo 14) ve tıkalı damar sayısı (Tablo 15) açısından karşılaştırıldı.

Tablo 13: Koroner arter hastalarının genotip ve MI öyküsü ilişkisi

Genotip	MI Öyküsü		p
	Var	Yok	
COX-2			
765 GG n (%)	9 (52.9)	35 (44.9)	0.548
765 GC n (%)	8 (47.1)	43 (55.1)	

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

Tablo 14: Koroner arter hastalarının genotip ve tanılarının ilişkisi

Genotip	Tanı		p
	SAP	AKS	
COX-2			
765 GG n (%)	11 (55.0)	33 (44.0)	0.383
765 GC n (%)	9 (45.0)	42 (56.0)	

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

Tablo 15: Koroner arter hastalarının genotip ve tıkalı damar sayısı ilişkisi

Genotip	Tıkalı damar sayısı				p
	1 damar	2 damar	3 damar	4 damar	
COX-2					
765 GG n (%)	17 (58.6)	11 (36.7)	11 (36.7)	5 (83.3)	0.655
765 GC n (%)	12 (41.4)	19 (63.3)	19 (63.3)	1 (16.7)	

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

COX-2 genotipleri ile MI öyküsü, tanıları ve tıkalı damar sayısı arasında bir ilişki bulunamamıştır.

TARTIŞMA

Koroner arter hastalığı dünyada en fazla ölüm nedenleri arasındadır. Koroner arter hastalığının en sık nedeni olarak bilinen ateroskerozu başlatan ve ilerlemesine yol açan biyokimyasal ve hücresele olaylar tümüyle açıklanabilmiş değildir. Yaş, cinsiyet, sigara içimi, ailede iskemik kalp hastalığı öyküsü, hiperkolesterolemi, diyabetes mellitus ve hipertansiyon gibi endojen ve ekzojen faktörlerin her biri ateroskleroz ve MI riskini belirgin olarak artırmaktadır. Ancak bu faktörler olguların sadece bir bölümünü açıklayabilmektedir. Bireylerin MI ile ilgili kesin riskini belirleyebilmek için konuyla ilgili başka risk faktörleri de araştırılmaktadır.

Ateroskleroz genler ve çevre arasındaki çok sayıda ve karmaşık etkileşimin bir sonucudur. Bireyin proaterojenik faktörlere yanıtını ve damar duvarının aterojen uyarıya yatkınlığını sıklıkla genetik yapı belirlemektedir. Ancak çevresel faktörler, plak oluşumu ve hastalığın ilerleme hızını belirgin şekilde etkileyerek, koroner arter hastalığı gelişip gelişmeyeceğini belirlemektedir¹⁹⁶.

Ateroskleroz ve klinik sonuçlarında artık inflamasyonun ve genetik faktörlerin rolü ve etkinliği kanıtlanmıştır. İnflamasyonun aterosklerozda sebep mi yoksa sonuç mu olduğu yönündeki sorular bugün birçok görüşe göre aterosklerozun sebebi olarak cevaplanmaktadır¹⁹⁶.

Ateroskleroz ile ilişkili inflamatuvar belirteçler arasında hücre adezyon molekülleri, sitokinler, aterojenik enzimler ve high sensitive C-reaktif protein yer almaktadır. Lipoproteinlerle ilişkili mutasyonlar (Apo AI, Apo A IV, CETP, LPL, Apo B-100, Apo CII, Apo E, LDLR), koagülasyon ile ilişkili mutasyonlar (Glikoprotein IIb/IIIa, PAI-1, Faktör V Leiden, Faktör VIII, β -Fibrinojen, Protrombin G20210A, MTHFR), kan basıncının regülasyonu ile ilişkili mutasyonlar (ACE, AT1R, eNOS), enfeksiyon ve inflamasyon ile ilişkili (MBL-2, IL-6, TNF α) mutasyonlar, koroner arter hastalıkları ile ilgili genetik risk faktörleri olarak sayılmaktadır. Çeşitli genlerin tek başına veya birleşerek aterosklerozun gelişimine katkıda bulunduğu açıklık kazanmıştır. Aterosklerotik plak instabilitesinde rolü olduğu düşünülen ve inflamatuvar hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalıkta anahtar rol oynayan COX enzimine ait genetik varyasyonların da ateroskleroza neden olabileceği düşünülmektedir⁷⁹.

Siklooksijenaz enziminin COX-1 ve COX-2 olarak iki izoenzimi mevcut olup, bu enzimler prostaglandinler ve tromboksan biyosentezinde yer alan hız sınırlayıcı enzimlerdir. COX-1, temel olarak birçok organda eksprese olup hücre fonksiyonlarının sürdürülmesine katkıda bulunmaktadır. COX-2 normal arter duvarında bulunmamakta, patolojik durumlarda eksprese olmaktadır^{197,198}. COX-1 ve COX-2 kaynaklı PGE₂, aterosklerotik plaklarda oldukça fazla eksprese olmaktadır. Matris parçalayıcı enzimler COX-2 ekspresyonu ve PGE₂ senteziyle stimule olurlar^{198,199}. Fare deneylerinde, COX-2 -/-, LDL -/- farelerin; COX-2 +/+, LDL -/- farelere göre oldukça az aterosklerotik lezyon içerdikleri saptanmıştır. Çalışmalarda, düşük doz aspirinin COX-1 ve TXA₂'yi inhibe ederek KAH ve iskemik inme oluşumunu azalttığı, selektif COX-2 inhibitörlerinin ise TXA₂'yi etkilemeden PGI₂ düzeylerini düşürdüğü, böylece vazodilatatör yanıtları engellerken trombosit agregasyonunu arttırdığı saptanmıştır²⁰⁰.

Yapılan bir çalışmada, COX-2'nin, beyin nöronlarında serebral iskemi sonrası eksprese edildiği saptanmıştır²⁰¹. Yine bu çalışmada COX-2 inhibisyonunun, orta serebral arter oklüzyonu sonrası koruyucu bir etki gösterdiği ve transgenik COX-2'nin, geniş infarkt alanlarına sebep olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar beyinde COX-2 ekspresyonunun, inflamatuvar etkileri arttırdığını ve oksidatif stresi tetiklediğini göstermiştir^{202,203}.

Rofecoxib ve lumiracoxib gibi selektif COX-2 inhibitörleri ile ilgili yapılan klinik çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar ortaya çıkmıştır. VIGOR (Vioxx Gastrointestinal Outcome Study) ve APPROVE (Adenomatous Polyp Prevention in Vioxx Trial) çalışmalarına göre, rofecoxibin kardiyovasküler hastalık riskini arttırdığı görülmüştür. Aynı zamanda rofecoxibin, sistolik kan basıncını ve lipidlerin oksidatif modifikasyonunu arttırdığı saptanmıştır^{204,205}. TARGET (Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial) çalışmasına göre lumiracoxib kardiyovasküler hastalık riskini yavaşça arttırmıştır ama istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır^{206,207}.

İnsan aterosklerotik monosit/makrofajlar, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde COX-2 ekspresyonunun gösterilmiş olması, COX-2 ekspresyonunun aterogenezin inflamatuvar sürecinde rolü olduğunu düşündürmektedir²⁰⁷.

Bu çalışmada koroner arter hastalığında COX-2, 765 G>C polimorfizminin olası rolü araştırılmıştır. Çalışmamız; Türkiyede 765 G>C

polimorfizmi incelenmesinin KAH risk faktörleri açısından önemini gösteren ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır.

Çalışmada ayrıca aterosklerozun oluşumu ve gelişiminden sorumlu tutulan hiperlipidemi, sigara kullanımı, hipertansiyon, diyabet, cinsiyet ve inflamasyon gibi birçok risk faktörleri ile COX-2 765 genotipleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen koroner arter hastalarında bu risk faktörleri özgeçmişlerinin sorgulanması ile elde edilmiş ve lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre COX-2 765 CC genotipinin görülmediği bu çalışmada 765 GG ve GC olmak üzere 2 farklı genotip belirlenmiştir. KAH ve kontrol grupları arasında 765 G>C genotipleri ve allel sıklığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmamıştır.

Kontrol ve hasta grubundaki bireyler 765 GG ve GC genotiplerine göre sınıflandırıldıktan sonra, aynı genotipe sahip kontrol ve hastalar karşılaştırıldığında, GG ve GC genotipleriyle diyabet, hipertansiyon varlığı ve sigara kullanımı arasında ilişki saptanmamıştır.

COX-2 765 GG ve GC genotiplerine sahip kontrol ve hastaların lipid profilleri ve ESR düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

GG genotipine sahip kontrol ve hastaların CRP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, GC genotipine sahip hastaların kontrollere oranla CRP düzeylerinin ($p = 0.000$) daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu saptanmıştır.

COX-2 765 genotipleri ile MI öyküsü, tanıları ve tıkalı damar sayısı arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Papafili ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada koroner arter bypass greft cerrahisi yapılan hastaların COX-2 765 G>C polimorfizmi ve COX-2 aktivitesi ile ilişkili plazma belirteçlerinin düzeyleri incelenmiştir. Cerrahi sonrası 1-4. günlerde C alleli bulunan hastalarda homozigot GG genotipi taşıyanlara göre serum CRP düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu saptanmıştır. CRP'nin cerrahi sonrası ilk 3 günde beklenen düzeylerine göre % 14'lük bir düşüklük saptanmıştır. COX-2 765 C alleli 765 G alleli ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük promotör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir^{208, 209}.

Bizim çalışmamızda COX-2 765 CC genotipi görülmemiş olup, CRP düzeyleri GC genotipine sahip hasta grubu, bu genotipe sahip kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.

Corella ve arkadaşlarının çalışmasında, COX-2 765 GC genotipin değil de CC genotipin KAH'a yatkınlığı azalttığı görülmüştür. Heterozigot tipte uyarılara yanıt olarak COX-2 promotör aktivitesinde % 30 azalmanın, düşük prostanoit üretimine neden olmadığı, bunun da diğer kompanzasyon mekanizmalarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Homozigot, CC genotipinde baskılanmış COX-2 promotör aktivitesinin KAH riskini azalttığı saptanmıştır. İnsanlarda farklı genotiplerdeki COX-2 aktivitesinin PGI₂ ve PGE₂ ile ilişkisinin incelenmesi gerektiği düşünülmüştür. Bununla birlikte, CC genotipinin koruyucu etkisi; CRP, IL-6 ve MMP gibi inflamatuvar sitokinlerin azalmış düzeyleriyle ilişkili bulunmuştur²¹⁰.

Corella ve arkadaşlarının başka bir çalışmasında, GC genotipinin sp1'e bağlanma bölgesini değiştirdiği ve promotör aktiviteyi azalttığı saptanmıştır. GC genotipi, azalmış carotid intima-media kalınlığı ve düşük inflamatuvar sitokin seviyeleriyle ilişkili bulunmuştur²¹¹.

Cuccurullo ve arkadaşlarının COX-2 765 G>C polimorfizmi üzerine yaptığı bir çalışmada MI ve inme riskinde GC genotipi taşıyanlarda % 52, GG genotipi taşıyanlarda % 67 düşme olduğu saptanmıştır. MI ve inme geçiren hastalarda C alleli varlığı kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Bu da C allelinin aterosklerotik plak rüptürüyle ilişkili kardiyovasküler olaylara karşı koruyucu olduğu görüşünü desteklemektedir. C allelinin varlığı plak makrofajlarında daha düşük COX-2 ekspresyonu ve düşük COX-2 aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur²¹².

Orbe ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada da COX-2 polimorfizminin COX-2 ekspresyonu ve prostanoit biyosentezi üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Klinik ve subklinik ateroskleroz hastalarında COX-2 geninde 765 G>C polimorfizmi, C alleli varlığında, düşük promotör aktivite ve düşük CRP değerleriyle ilişkili bulunmuştur. Ayrıca bu tek nükleotid polimorfizmi, gelişebilecek kardiyovasküler hastalık riskinde azalmayla ilişkili bulunmuştur⁷⁹.

Santovito ve arkadaşlarının çalışmasında ise COX-2 765 G>C polimorfizminin, MI ve inme riskinin düşük olmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu allelin aterosklerotik plak rüptürüne bağlı klinik durumlara karşı koruyucu rol oynadığı düşünülmüştür. COX-2 765 G>C polimorfizmi, plak makrofajlarındaki düşük COX-2 ekspresyonu ve COX-2 aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur. MI ve inmenin inflamatuvar hücrelerdeki COX-2 aktivitesi sonucu gelişebileceği düşünülmüştür. Hatta 765C genotipli, düşük MI ve inme riskine sahip hastaların serum CRP düzeylerinin anlamlı bir şekilde düşük olduğu saptanmıştır. PGE₂ bağımlı MMP'lerin aterosklerotik plak rüptürüne neden olmasıyla MI ve inme geliştiği düşünülmüştür. C alleli taşıyanlarda düşük PGE₂ sentezinin, aterosklerotik plaklarda MMP düzeylerinin azalmış olmasını açıklayabileceği düşünülmüş ve çalışmada C allelinin, endotelial PGI₂ yapımını etkilemediği ortaya konmuştur. Bu gözlem bu polimorfizmin endotelial hücrelerdeki COX-2 aktivitesini etkilemediğini düşündürmüştür. Çünkü PGI₂'nin koruyucu bir PG olduğu ve bu durumda polimorfizm nedeniyle değişen COX-2 aktivitesinin, COX-2 inhibitörleriyle olan değişiminden farklı olduğu ortaya konulmuştur. Bu polimorfizmin COX-2 aktivitesini sadece monosit/ makrofajlarda azalttığı saptanmıştır²¹³. C alleli taşıyanlarda, COX-2 inhibitörlerinin koruyucu olan COX-2'yi (endotelde) inhibe ettiği ama monosit/ makrofajlardaki COX-2'yi (proinflamatuvar etkileri olan) inhibe etmediği için kan hemostazında arteriyel tromboza neden olabilecek bir dengesizliğe sebep olduğu, bu yüzden COX-2 inhibitörlerini kullanan hastaların COX-2 genotiplerinin incelenmesinin klinik etkinlik ve güvenlik açısından faydalı olabileceği düşünülmüştür^{214,215}.

Yapılan diğer bir çalışmada COX-2 765 G>C polimorfizmi inme riskiyle ilişkili bulunmuştur. Kohsaka ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada farklı olarak, Amerika'da yaşayan Afrikalılarda Homozigot 765G alleli taşıyan kişilerle karşılaştırıldığında, 765C COX-2 alleli taşıyan kişiler inme konusunda 1,34 kat yüksek riske sahip bulunmuştur. Beyazlarda ise anlamlı bir sonuç bulunamamıştır²¹⁶.

Ani ölüm sonrası otopsi yapılan Finlilerde yapılmış, Huuskonen ve arkadaşlarının çalışmasında, MI varlığı çalışılmıştır. Koroner arterlerdeki aterosklerotik lezyonlar ve boyutları incelenmiş ve C alleli taşıyanların GG genotipli olanlara göre daha geniş komplike lezyonlar taşıdıkları ve koroner arterlerin % 50 üstündeki tıkanıklığının daha çok görüldüğü saptanmıştır. COX-

2'nin plak gelişiminde rol aldığı düşünülmüştür. Ve COX-2 polimorfizmi MI ile ilişkili bulunmamıştır²¹⁷.

Sanak ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada stabil KAH olan hastalarda; sistemik PGE₂ metabolizması, bir monosit/makrofaj aktivasyon belirteci olan soluble CD163 (sCD163) ve COX-2 765G>C polimorfizmi çalışılmıştır. Bu çalışmada, C alleli taşıyan KAH hastalarda daha büyük miktarlarda PGE₂ salgılandığı ve bu aşırı üretimin artmış sCD163 düzeyleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. İn vitro çalışmalarla C alleli taşıyanların G alleli taşıyanlara göre COX-2 uyarıcılarına daha az yanıt verdiği görülmüştür. Bunun sebebinin arter duvarında makrofajları etkinleştiren bir faktörün eksikliğine bağlı olduğu düşünülmüştür²¹⁸.

Biz de çalışmamızda daha önceki çalışmalara benzer şekilde, GG genotipine sahip bireylerde KAH riski, GC genotipine göre 1.35 kat yüksek bulunmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışma grubumuzda CC genotipine rastlanmamıştır. MI öyküsü ile COX-2 genotipi arasında istatistiksel olarak bir ilişki saptanamamıştır.

KAH'larında yapılan moleküler genetik çalışmalar; patofizyolojinin aydınlatılması, ana metabolik yolların ve yeni moleküler ve hız sınırlayıcı basamakların tanımlanması, erken koroner arter hastalığı için riskli olguların belirlenmesi, görüntüleme yöntemleri, kateterizasyon, koroner bypass cerrahi, pacemaker ve medikal tedaviler gibi pahalı tanı ve tedavi giderlerinin azaltılması ve daha az invaziv olan yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Çalışmamızın en önemli kısıtlayıcısı olan hasta sayısı genetik polimorfizm sıklığının belirlenmesini, bulgularımızın değerlendirilmesini ve yorumlanmasını güçleştirmektedir. Daha çok sayıda hastada yapılacak genetik çalışma toplumumuzda COX-2 765 G>C polimorfizmiyle ateroskleroz ve KAH arasındaki ilişkinin tam olarak ortaya konulmasında yardımcı olacaktır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

KAH, özellikle gelişmiş ülkelerde olmak üzere tüm dünyada önde gelen ölüm nedenlerindedir. Hangi durumlarla ilişkili olabileceği ve bunların nasıl önlenebileceği hakkında en fazla çalışma yapılan hastalıklardan birisidir. KAH oluşumuna yol açan en sık neden koroner arterlerin aterosklerozudur. Yapılmış çalışmalar ile endotel işlevlerinin aterosklerozda önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Mersin toplumunda COX-2 765G>C polimorfizminin KAH ile ilişkisi araştırıldığı bu çalışma sonuçlarına göre;

Kontrol ve hasta gruplarının ESR ve lipid profilleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmamıştır.

AKŞ ve CRP düzeyleri, hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Kolesterol düşürücü etkiye sahip statin grubu ilaç kullanımından dolayı, KAH için önemli risk faktörleri olan kolesterol ve TG düzeyleri açısından her iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

COX-2 765 CC genotipinin görülmediği bu çalışmada 765 GG ve GC olmak üzere 2 farklı genotip belirlenmiştir. KAH ve kontrol grupları arasında 765 G>C genotipleri ve allel sıklığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmamıştır (Genotipler için Odd's Oranı = 1.352, % 95 güven aralığı 0.760 – 2.408; Allel sıklığı için Odd's Oranı =1.198, % 95 güven aralığı 0.767-1.869).

Kontrol ve hasta grubundaki bireyler GG ve GC genotiplerine göre sınıflandırıldıktan sonra, aynı genotipe sahip kontrol ve hastalar karşılaştırıldığında, GG ve GC genotipleriyle diyabet, hipertansiyon varlığı ve sigara kullanımı arasında ilişki saptanmamıştır.

GG ve GC genotiplerine sahip kontrol ve hastaların lipid profilleri ve sedimentasyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

GG genotipine sahip kontrol ve hastaların AKŞ ve CRP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, GC genotipine sahip hastaların kontrollere oranla AKŞ ($p = 0.000$) ve CRP düzeylerinin ($p = 0.000$) daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu saptanmıştır (Tablo 6, 7).

COX-2 genotipleri ile MI öyküsü, tanıları ve tıkalı damar sayısı arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Aterosklerozun etiyopatogenezinde genetik eğilim ve birçok risk faktörü yer almaktadır. İnfeksiyonun aterosklerozdaki rolünü kesinleştirmek ve hangi hasta gruplarının tedavi ihtiyacı olduğunu tespit etmek için bu konuda daha ileri prospektif çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, Mersin bölgesinde COX-2 765 G>C polimorfizmi ile KAH arasında bir ilişki bulunamamıştır.

KAYNAKLAR

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. *Nature* 1993; 362: 801-9.
2. Ross. R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 38(5-2): 419-20
3. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(11): 2333-40.
4. Deckert V, Lizard G, Duverger N, et al. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by high-fat feeding in ApoE-deficient mice: toward normalization by human ApoA-I expression. *Circulation* 1999; 100(11): 1230-5.
5. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 1999; 100(8): 793-8.
6. Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J* 2000; 21(19): 1574-83.
7. Özcan R. Kalp hastalıkları. 3. baskı. İstanbul. Soral Matbacılık, 1988: 229-47.
8. Ross R, Glomset JA, Kariya B, Harker LA. Platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1207-11.
9. Benditt EP, Benditt JM. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques . *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 1753-6.
10. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol hemostasis. *Science* 1986; 223: 34-47.
11. Breslow JL. Mouse models atherosclerosis. *Science* 1996; 272: 685-8.

12. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, et al. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 1999; 100: 7938.
13. Woods A, Brull DJ, Humphries SE, et al. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J* 2000; 21: 1574-83.
14. Enar R. Temel Kardiyoloji. 1. baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri, 2007: 273-21.
15. Taubman MB, Beutler E, Atherosclerosis, thrombosis and coroner artery disease. In: Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (eds). *Williams Hematology*. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001: 1743-52.
16. Koylan N. Koroner kalp hastalığı epidemiyolojisi, lipid düşürücü ilaç ile ilgili büyük klinik çalışmalar. *Tür Klin Kardiol Der* 2000; 13: 9-20.
17. Hansson G, Nilsson J. Pathogenesis of atherosclerosis. In: Crawford MH, DiMarco JP, Paulus WJ (eds). *Cardiology*. 1st ed. USA: Elsevier Science Limited 2001: 1-12.
18. Hansson GK, Robertson AKL, Naucner CS. Inflammation and Atherosclerosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006; 1: 297–329.
19. Onat T. Lipitler. İn: Emerk K, Sözmen EY (eds). *İnsan Biyokimyası*. 4. baskı. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002: 346-51.
20. Lerman A, Burnett JC. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 1992; 86: 12-9.
21. Davies MG, Ramkumar V, Geetys T, et al. The expression and functional of Gprotein in experimental intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 1994; 94: 1680-9.
22. Salonen JT, Ylä-Herttua S, Yamamoto R, et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992; 339(8798): 883-7.
23. Loscalzo J. The relation between atherosclerosis and thrombosis. *Circulation* 1992; 86: 95-9.
24. Wilson PW. Established risk factors and coronary artery disease: The Framingham study. *Am J Hypertens* 1994; 7: 7-12.
25. Noll G, Lüscher TF. Influence of lipoproteins on endothelial function. *Thromb Res* 1994; 74: 45-54.

26. Braunwald E. The vascular Biology of Atherosclerosis. In: Bonow RO, Libby P, Zipes DP (eds). Braunwald's Heart Disease. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005: 480-9.
27. Sansoy EK. Aterosklerotik Kalp Hastalıkları. In: Gökhan H (ed). Klinik Kardiyoloji. 1. baskı. Ankara: Nobel, 2004: 273-321.
28. Malik AB, Lo SK. Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharmacol Rev* 1996; 48: 213-29.
29. Etzioni A. Adhesion molecules their role in health and disease. *Ped Res* 1996; 39: 191-8.
30. Lawrence R, Chang L, Seibenlist U, et al. Vascular smooth muscle cells express a constitutive NF-KB-like activity. *J Biol Chem* 1994; 46: 28913-8.
31. Porreca E, Febbo C, Reale M, et al. MCP-1 is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cell. *J Vasc Surg* 1997; 34(1): 58-65.
32. Hernandez M, Bustos C, Ortega M, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition prevent MCP-1 expression in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95(6): 1532-41.
33. Rosenfeld ME, Yia-Herttuala S, Lipton BA, et al. Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *Am J Pathol* 1992; 140: 291-300.
34. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*. 1991; 77(8): 1627-52.
35. Azzawi M, Hasleton P. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease. *Cardiovasc Res* 1999; 43(4): 850-9.
36. Pauletto P, Sarzani R, Rappelli A, et al. Differentiation and growth of vascular smooth muscle cells in experimental hypertension. *Am J Hypertens* 1994; 7: 661-74.
37. Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against bFGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 88: 3739-43.
38. Fosyth EA, Aly HM, Najjar SF, et al. TGF b inhibits the proliferative effect of insulin vascular smooth muscla cell. *J Vasc Surg* 1997; 23(5): 432-6.
39. Anggard E. Nitric oxide: Mediator, murdered, and medicine. *Lancet* 1994; 343: 1199-206.

40. Meyer GR, Herman AG. Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; 39(49): 325-42.
41. Pencera P, Minuz P, Rossi L, et al. Post ischemic hyperemia is subject with lower limbs obstructive arteriopathy: role of PGI₂ and ET. *Angiology* 1997; 48(2): 149-55.
42. Stary HC, Chandler A, Dinsmore R. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular lesions of the Council of Arteriosclerosis. *American Heart Association* 1995; 92: 1355-13.
43. Yüksel A. *Kardiyoloji Miniatlas*. 1. Baskı. AND Danışmanlık, Eğitim, yayıncılık ve Organizasyon Ltd. Şti. 2003; 155-62.
44. Virchow R. Phlogose and thrombose in gerasystem. In: Virchow R (ed). *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt. Von Meidinger Sohn, 1856; 458–636.
45. Rokitansky C. Atherosclerosis. In: Swaine WE, Sieveking SEH, Moore T T. *A manual of pathological anatomy*. Philadelphia. Blanchard and Lea, 1855: 41.
46. Ross R, Glomset JA, Kariya B, Harker LA. A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1753-6.
47. Galle J, Quaschnig T, Seibold S, Wanner C. Endothelial dysfunction and inflammation, What is the link? *California. Kidney Int Suppl* 2003; 84: 45-49.
48. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. *Circulation* 2003; 108: 1917-23.
49. Gauthier TW, ScaliaR, Murohara T, Guo JP, Lefer AM. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15(10): 1652-9.
50. Willersen J, Kereiakes D. Endothelial dysfunction. *Circulation* 2003; 108: 2060-1.
51. Schonbeck U, Libby P. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 4-43.

52. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-4.
53. Andre P, Prasad KS, Denis CV, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a α 3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med* 2002; 8: 247-52.
54. Price D, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Cardiol* 1999; 107: 85-97.
55. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-14.
56. Hillis GS, Flapan AD. Cell adhesion molecules in cardiovascular disease: a clinical perspective. *Heart* 1998; 79: 429-31.
57. Adams DH, LA R. Chemokines: leukocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 1997; 349: 490-5.
58. Boring L, Gosling J, Cleary M, et al. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 894-7.
59. Kunjathoor V, Febbraio M, Podrez E, et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified LDL leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 2002; 277: 49982-8.
60. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95: 1062-71.
61. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized LDL in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785.
62. Muzio M, Natoli G, Sacconi S, et al. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 1998; 187: 2097-101.
63. Mulvihill NT, Foley JB. Inflammation in acute coronary syndromes. *Heart* 2002; 87: 201-4.
64. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91: 281-91.
65. Fuster V, Fayad AZ, Badimon JJ. Acute coronary syndromes: biology. *Lancet* 1999; 352 (Supp II): 5-9.

66. Ball RY, Stower EC, Burton JH, Cary NR. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core atheroma. *Atherosclerosis* 1995; 91: 619-22.
67. Ross R. Mechanisms of disease: atherosclerosis, an inflammatory disease (review article). *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
68. Weissberg P, Rudd J. Acute coronary syndromes. In: Topol EJ (ed). *Textbook of cardiovascular medicine*. 3th ed. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins, 2002: 279-85.
69. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, et al. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995; 92: 1565-9.
70. Muzio M, Natoli G, Saccani S, et al. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 1998; 187: 2097-101.
71. Demer L, Tintut Y. Osteopontin: between a rock and a hard place. *Circ Res* 1999; 84: 250.
72. Galis Z, Khatri J. Matrix metalloproteinases in vascular remodelling and atherogenesis: the good, the bad and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251-2.
73. Yokoya K, Takatsu H, Suzuki T, et al. Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: a study based on four serial coronary arteriograms per year. *Circulation* 1999; 100: 903-9.
74. Libby P. Molecular bases of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 1995; 91: 2844-50.
75. Farb A, Burke AP, Tang AL, et al. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. *Circulation* 1996; 93: 1354-63.
76. Davies M.J. "Stability and instability: Two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996; 94: 2013-20.
77. Schoenhagen P, Tuzcu E.M. Coronary artery calcification and end-stage renal disease: Vascular biology and clinical implications, *Cleveland Clinical Journal of Medicine* 2002; 69: 12-20.

78. Reilly MP, Wolfe ML, Localio AR, Rader DJ. Coronary artery calcification and cardiovascular risk factors: impact of the analytic approach. *Atherosclerosis* 2004; 173: 69-78.
79. Orbe J, Beloqui O, Rodriguez JA, Belzunce MS, Roncal C, Páramo JA. Protective effect of the G-765C COX-2 polymorphism on subclinical atherosclerosis and inflammatory markers in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors. *Clin Chim Acta*. 2006; 368(1-2): 138-43.
80. Serhan CN. Lipid mediator Networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *Faseb J* 1996; 10: 1147-58.
81. Contran RS, The breast. In: Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: WB Saunders, 6th ed. 1999: 3: 70-2.
82. Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 1995; 75: 125-31.
83. Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001; 107(12): 1491-5.
84. DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1083: 121-34.
85. Dizdar Y. Kolon kanserinde COX-2 ekspresyonunun histopatolojik parametrelerle korelasyonu ve tedavideki prognostik önemi. *Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Onkolojik Biyoloji ve İmmunoloji Bilim Dalı, İstanbul 2003*
86. Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 1996; 270(3-1): 393-400.
87. Kraemer SA, Meade EA, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch. Biochem Biophys* 1992; 293: 391-400.
88. Kujubu DA, Herschman HR. Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *J. Biol. Chem* 1992; 267: 7991- 4.
89. Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immuno-biology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 71-99.
90. Fischer R, Baumert T, Blum HE. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 36.

91. Waris G, Sarker S, Siddiqui A. Two-step affinity purification of the hepatitis C virus ribonucleoprotein complex. *RNA* 2004; 10: 321-9.
92. Smith WL, DeWitt DL. Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin Nephrol* 1995; 15(3): 179-94.
93. Wilson DE. Role of prostaglandins in gastroduodenal mucosal protection. *J Clin Gastroenterol* 1991; 13(1): 65-71.
94. Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 1996; 62: 167-215.
95. O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* 1993; 330(2): 156-60.
96. John R Witherow Cyclooxygenase Deficiency, <http://www.emedicine.com/med/Article> Last Updated: 2005; Erişim tarihi 10.06.2009.
97. FitzGerald GA. Prostaglandins and related compounds. In: Wyngaarden J, Smith L. *Cecil Textbook of Medicine*. 20 th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996: 1187-8.
98. Masferrer JL, Isakson PC, Seibert K. Cyclooxygenase-2 inhibitors: a new class of antiinflammatory agents that spare the gastrointestinal tract. *Gastroenterol Clin North Am* 1996 ; 25(2): 363-72.
99. Smith WL, Meade EA, DeWitt DL. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 714: 136-42.
100. Inoue H, Yokohama C, Hara S, et al. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester and cAMP response element. *J Biol Chem* 1995; 270: 24965-71.
101. Chiu CH, McEntee MF, Whelan J. Sulindac causes rapid regression of preexisting tumors in Min/+ mice independent of prostaglandin biosynthesis. *Cancer Res* 1997; 57(19): 4267-73.
102. Kang RY, Freire-Moar J, Sigal E, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human and an animal model of rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 711-8.

103. Singer II, Kawka DW, Schloemann S, et al. Cyclooxygenase-2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 297–306.
104. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. *Am J Physiol* 1998; 274: 1061–7.
105. Zoja C, Benigni A, Noris M, et al. Mycophenolate mofetil combined with a cyclooxygenase-2 inhibitor ameliorates murine lupus nephritis. *Kidney Int* 2001; 60: 653–63.
106. Steer SA, Corbett JA. The role and regulation of Cox-2 during viral infection. *Viral Immunol* 2003; 16: 447–60.
107. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999; 18: 7908–16.
108. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL., Prostaglandin endoperoxide H synthase (Cyclooxygenases-1 and -2), *J. Biol. Chem* 1996; 271: 33157-60.
109. Appleton I, Tomlinson A, Willoughby DA. Induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Adv Pharmacol* 1996; 35: 27-78.
110. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR-gamma, *Cell* 1995; 83: 803-12.
111. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM., Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid activated transcription factor. *Cell* 1994; 79: 1147-56.
112. Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol. Today* 1991; 12: 349–52.
113. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999; 5: 698-701.
114. Langenbach R, Loftin C, Lee C, Tian H. Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 1237-46.
115. Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, et al. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis & Rheumatism* 2000; 43(1): 4-13.

116. Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1996; 98: 2076-85.
117. McCarthy CJ, Crofford LJ, Greensom J, Scheiman JM. Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1218-23.
118. Singer I, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 297-306.
119. Smith WL, Marnett LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1083: 1-17.
120. Vane JR, Botting RM. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *Am J Cardiol* 1995; 75: 3-10.
121. Wong E, Huang J, Tagari P, Riendeau D. Effects of COX-2 inhibitors on aortic prostacyclin production in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 157: 393-402.
122. Belton O, Byrne D, Kearney D, et al. Cyclooxygenase-1 and 2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 2000; 102: 840-5.
123. Vane JR. Biomedicine. Back to an aspirin a day? *Science* 2002; 296: 474-5.
124. Bombardier C, Laine L, Reicin A, et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 1520-8.
125. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* 2001; 286: 954-9.
126. FitzGerald GA, Patrono C. The Coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001; 345: 433-42.
127. Hinson RM, Williams JA, Shacter E. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4885-90.

128. Kreuzer J, Denger S, Jahn L, et al. LDL stimulates chemotaxis of human monocytes through a cyclooxygenase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1481-7.
129. Cao HJ, Wang HS, Zhang Y, et al. Activation of human orbital fibroblasts through CD40 engagement results in a dramatic induction of hyaluronan synthesis and prostaglandin endoperoxide H synthase-2 expression. Insights into potential pathogenic mechanisms of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Biol Chem* 1998; 273: 29615-25.
130. Callejas NA, Casado M, Diaz-Guerra MJ, et al. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 33(4): 860-7.
131. Shankavaram UT, Lai WC, Netzel-Arnett S, et al. Monocyte membrane type 1-matrix metalloproteinase. Prostaglandin-dependent regulation and role in metalloproteinase-2 activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 19027-32.
132. Wesley RB, Meng X, Godin D, Galis ZS. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 432-40.
133. Baker CS, Hall RJ, Evans TJ, et al. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 646-55.
134. Pomerantz KB, Nicholson AC, Hajjar DP. Signal transduction in atherosclerosis: second messengers and regulation of cellular cholesterol trafficking. *Adv Exp Med Biol* 1995; 369: 49-64.
135. Yamagata K, Anderson KI, Kaufman WE, et al. Expression of a mitogen inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 1993; 1192: 371-86.
136. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, et al. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999; 155: 1281-91.

137. Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 2002; 105: 1816-23.
138. Mathur SN, Albright E, Field FJ. Decreased prostaglandin production by cholesterol-rich macrophages. *J Lipid Res* 1989; 30: 1385-95.
139. Eligini S, Colli S, Basso F, Sironi L, Tremoli E. Oxidized low density lipoprotein suppresses expression of inducible cyclooxygenase in human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(7): 1719-25.
140. Claus R, Frynys B, Deigner HP, Wolf G. Oxidized low-density lipoprotein stimulates protein kinase C (PKC) and induces expression of PKC-isotypes via prostaglandin-H-synthase in P388D1 macrophage-like cells. *Biochemistry* 1996; 35(15): 4911-22.
141. Ardans JA, Economou AP, Martinson JM, Zhou M, Wahl LM. Oxidized low-density and high-density lipoproteins regulate the production of matrix metalloproteinase-1 and-9 by activated monocytes. *J Leukoc Biol* 2002; 71(6): 1012-8.
142. Faour WH, He Y, He QW, et al. Prostaglandin E2 regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogenactivated protein kinase in interleukin-1beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276: 31720-31.
143. Hinz B, Brune K, Pahl A. Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharidestimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E(2), and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 790-6.
144. Marx N, Sukhova G, Murphy C, et al. Macrophages in human atheroma contain PPAR-gamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferatoractivated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol* 1998; 153: 1-23.
145. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JGA, et al. PPAR-gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998; 93: 241-52.

146. Smith LH, Boutaud O, Breyer M, et al. Cyclooxygenase-2-dependent prostacyclin formation is regulated by low density lipoprotein cholesterol in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 983-8.
147. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
148. Eldor A, Falcone DJ, Hajjar DP, Minick CR, Weksler BB. Recovery of prostacyclin production by de-endothelialized rabbit aorta. Critical role of neointimal smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1981; 67(3): 735-41.
149. Shah PK. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(4): 15-22.
150. Cipollone F, Fazia M, Mezzetti A. Novel determinants of plaque instability. *J Thromb Haemost* 2005; 3(9): 1962-75.
151. Cipollone F, Fazia ML, Lezzi A, et al. Association between prostaglandin E receptor subtype EP4 overexpression and unstable phenotype in atherosclerotic plaques in human. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(9): 1925-31.
152. Cipollone F, Prontera C, Pini B, et al. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* 2001; 104(8): 921-7.
153. Eligini S, Colli S, Basso F, Sironi L, Tremoli, E. Oxidized low density lipoprotein suppresses expression of inducible cyclooxygenase in human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(7): 1719-25.
154. Banfi C, Colli S, Eligini S, Mussoni L, Tremoli E. Oxidized LDLs influence thrombotic response and cyclooxygenase 2. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 2002; 67(2-3): 169-73.
155. Hu Z, Miao X, Ma H, et al. A common polymorphism in the 3'UTR of cyclooxygenase 2/prostaglandin synthase 2 gene and risk of lung cancer in a Chinese population. *Lung Cancer* 2005; 48: 11-17.
156. Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, et al. The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the susceptibility to prostate cancer of a southern European population. *J Hum Genet* 2002; 47: 413-8.

157. Ferreira PM, Medeiros R, Vasconcelos A, et al. Association between CYP2E1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12: 205-11.
158. Ribeiro R, Vasconcelos A, Costa S, et al. Overexpressing leptin genetic polymorphism (-2548 G/A) is associated with susceptibility to prostate cancer and risk of advanced disease. *Prostate* 2004; 59: 268-74.
159. Pinto D, Vasconcelos A, Costa S, et al. HER2 polymorphism and breast cancer risk in Portugal. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13: 177-81.
160. Freitas-Silva M, Pereira D, Coelho C, Bicho M, Lopes C, Medeiros R. Angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and endometrial human cancer in normotensive and hypertensive women. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 155: 42-6.
161. Coelho A, Matos A, Catarino R, Pinto D, Pereira D, Lopes C, Medeiros R. Protective role of the polymorphism CCR2-64I in the progression from squamous intraepithelial lesions to invasive cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005; 96: 760-764.
162. Catarino R, Matos A, Pinto D, et al. Increased risk of cervical cancer associated with cyclin D1 gene A870G polymorphism. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 160: 49-54.
163. Duarte I, Santos A, Sousa H, et al. G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 588-92.
164. Pelletier R, Pravica V, Perrey C, et al. Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation. *Transplantation* 2000; 70: 674-80.
165. Tambur AR, Ortegell JW, Ben-Ari Z, et al. Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients. *Transplantation* 2001; 71: 1475-80.
166. Reviron D, Dussol B, Andre M, Brunet P, Mercier P, Berland Y. TNF-a and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients. *Transplant Proc* 2001; 33: 350-1.
167. Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73: 122-30.

168. Ulrich CM, Bigler J, Sibert J, et al. Cyclooxygenase 1 (COX1) polymorphisms in African-American and Caucasian populations. *Hum Mutat* 2002; 20: 409-10.
169. Shen J, Gammon MD, Terry MB, et al. Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-2 gene, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk *Breast Cancer Research* 2006; 8: 6.
170. Papafili A, Hill MR, Brull DJ, et al. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1631-6
171. Goodman JE, Bowman ED, Chanock SJ, et al. Arachidonate lipoxygenase (ALOX) and cyclooxygenase (COX) polymorphisms and colon cancer risk. *Carcinogenesis* 2004; 25(12): 2467-72.
172. Com DG, Crusius JBA, Peeters PHM, et al. A haplotype of prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 is involved in the susceptibility to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11(38): 6003-8.
173. Brosens LA, Lacobuzio-Donahue CA, Keller JJ, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression in duodenal compared with colonic tissues in familial adenomatous polyposis and relationship to the -765G → C COX-2 polymorphism. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4090-6.
174. Lin HJ, Lakkides KM, Keku TO, et al. Prostaglandin H synthase 2 variant (Val511Ala) in African Americans may reduce the risk for colorectal neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1305-15.
175. Fritsche E, Baek SJ, King LM, et al. Functional Characterization of Cyclooxygenase-2 Polymorphisms *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*. 2001; 299(2): 468-76.
176. Potter S, Mitchell MD, Hansen WR, Marvin KW. NF-IL6 and CRE elements principally account for both basal and interleukin-1 beta-induced transcriptional activity of the proximal 528 bp of the PGHS-2 promoter in amnion-derived AV3 cells: evidence for involvement of C/EBP beta. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 771-8.
177. Mestre JR, Rivadeneira DE, Mackrell PJ, et al. Overlapping CRE and E-box promoter elements can independently regulate COX-2 gene transcription in macrophages. *FEBS Lett* 2001; 496: 147-51.

178. Tang Q, Chen W, Gonzales MS, Finch J, Inoue H, Bowden GT. Role of cyclic AMP responsive element in the UVB induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Oncogene* 2001; 20: 5164-72.
179. Sansbury LB, Bergen AW, Wanke KL, et al. Inflammatory cytokine gene polymorphisms, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk of adenoma polyp recurrence in the polyp prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 ; 15(3): 494-501.
180. Park JM, Choi JE, Chae MH, et al. Relationship between cyclooxygenase 8473T>C polymorphism and the risk of lung cancer: a case-control study. *BMC Cancer* 2006; 6: 70.
181. Ulrich CM, Whitton J, Yu JH, Sibert J, Sparks R, Potter JD. Bigler JPTGS2 (COX-2) -765G > C promoter variant reduces risk of colorectal adenoma among nonusers of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(3): 616-9.
182. Hu Z, Miao X, Ma H, et al. A common polymorphism in the 3'UTR of cyclooxygenase 2/prostaglandin synthase 2 gene and risk of lung cancer in a Chinese population. *Lung Cancer* 2005; 48: 11-7.
183. Zhang X, Miao X, Tan W, et al. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology* 2005; 129: 565-76.
184. Ali IU, Luke BT, Dean M, Greenwald P. Allelic variants in regulatory regions of cyclooxygenase-2: association with advanced colorectal adenoma. *Br J Cancer* 2005; 93: 953-9.
185. Campa D, Zienolddiny S, Maggini V, Skaug V, Haugen A, Canzian F: Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2004; 25: 229-35.
186. Cox DG, Pontes C, Guino E, et al. Colorectal Cancer Study Group: Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS₂/COX-2) and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 339-43.
187. Koh WP, Yuan JM, va den Berg D, Lee HP, Yu MC. Interaction between cyclooxygenase-2 gene polymorphism and dietary n-6 polyunsaturated fatty acids on colon cancer risk: the Singapore Chinese Health Study. *Br J Cancer* 2004; 90: 1760-4.

188. Panguluri RC, Long LO, Chen W, et al. COX-2 gene promoter haplotypes and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2004; 25: 961-6.
189. Siezen CL, Van Leeuwen AI, Kram NR, Luken ME, van Kranen HJ, Kampman E. Colorectal adenoma risk is modified by the interplay between polymorphisms in arachidonic acid pathway genes and fish consumption. *Carcinogenesis* 2005; 26: 449-57.
190. Kang S, Kim YB, Kim MH, et al. Polymorphism in the nuclear factor kappa-B binding promoter region of cyclooxygenase-2 is associated with an increased risk of bladder cancer. *Cancer Lett* 2005; 217: 11-16.
191. Campa D, Hung RJ, Mates D, et al. Lack of association between polymorphisms in inflammatory genes and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 538-9.
192. Sakoda LC, Gao YT, Chen BE, et al. Prostaglandinendoperoxide synthase 2 (PTGS₂) gene polymorphisms and risk of biliary tract cancer and gallstones: a population-based study in Shanghai, China. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1251-6.
193. Liu F, Pan K, Zhang X, et al. Genetic variants in cyclooxygenase-2: expression and risk of gastric cancer and its precursors in a chinese population. *Gastroenterology* 2006; 130: 1975-84.
194. Papafili A, Hill MR, Brull DJ, et al. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1631-6.
195. Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, et al. A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA* 2004; 291: 2221-8.
196. Solberg LA, Strong JP. Risk factors and atherosclerotic lesions: A review of autopsy studies. *Arteriosclerosis* 1983; 3: 187-98.
197. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999; 155: 1281-91.
198. Cipollone F, Fazia M, Lezzi A, et al. Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of

- simvastatin-dependent plaque stabilization in humans. *Circulation* 2003; 107: 1479-85.
199. Cipollone F, Prontera C, Pini B, et al. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* 2001; 104: 921-7.
200. Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 2002; 105: 1816-23.
201. Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 1997; 17: 2746-55.
202. Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, et al. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-d-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1294-9.
203. Dore S, Otsuka T, Mito T, et al. Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction. *Ann Neurol* 2003; 54: 155-62.
204. Whelton A, White WB, Bello AE, Puma JA, Fort JG. Effects of celecoxib and rofecoxib on blood pressure and edema in patients > or =65 years of age with systemic hypertension and osteoarthritis. *Am J Cardiol* 2002; 90: 959-63.
205. Walter MF, Jacob RF, Day CA, et al. Sulfone COX-2 inhibitors increase susceptibility of human LDL and plasma to oxidative modification: comparison to sulfonamide COX-2 inhibitors and NSAIDs. *Atherosclerosis* 2004; 177: 235-43.
206. Fitzgerald GA. Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1709-11.
207. Andersohn F, Schade R, Suissa S, Garbe E. Cyclooxygenase-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of ischemic stroke: a nested case-control study. *Stroke* 2006; 37: 1725-30.

208. Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-Reactive Protein levels in unstable coronary artery disease. *Circulation* 1997; 96: 4204-10.
209. Papafili A, Hill MR, Brull DJ, et al. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1631-6.
210. Cipollone F, Patrono C. Cyclooxygenase-2 polymorphism: putting a brake on the inflammatory response to vascular injury? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1516–8.
211. Corella D, Gonzalez JI, Bullo M, et al. Polymorphisms cyclooxygenase-2-765G>C and interleukin-6-174G>C are associated with serum inflammation markers in a high cardiovascular risk population and do not modify the response to a Mediterranean diet supplemented with virgin olive oil or nuts. *J Nutr* 2009; 139: 128-34.
212. Cuccurullo C, Fazia ML, Mezzetti A, Cipollone F. COX-2 Expression in Atherosclerosis: The Good, the Bad or the Ugly? *Current Medicinal Chemistry* 2007; 14: 1595-605.
213. Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, et al. Identification of New Elements of Plaque Stability (INES) Study Group. A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA* 2004; 291(18): 2221-8.
214. Buerkle MA, Lehrer S, Sohn HY, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles in vivo. *Circulation* 2004; 110: 2053-9.
215. Pidgeon GP, Tamosiuniene R, Chen G, et al. Intravascular thrombosis after hypoxia-induced pulmonary hypertension: regulation by cyclooxygenase-2. *Circulation* 2004; 110: 2701-7.
216. Kohsaka S, Volcik KA, Folsom AR, et al. Increased risk of incident stroke associated with the cyclooxygenase 2 (COX-2) G-765C polymorphism in African-Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Atherosclerosis* 2008; 196(2): 926-30.

217. Huuskonen KH, Kunnas TA, Tanner MM, et al. COX-2 Gene Promoter Polymorphism and Coronary Artery Disease in Middle-Aged Men: The Helsinki Sudden Death Study. *Mediators Inflamm* 2008; 28: 9453.
218. Sanak M, Plutecka H, Szczeklik W, Piwowarska W, Rostoff P, Szczeklik A. Functional promoter polymorphism of cyclooxygenase-2 modulates the inflammatory response in stable coronary heart disease. *Pol Arch Med Wewn* 2010; 120(3): 82-8.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

4-AAP	: 4-aminoantiprin
AA	: Araşidonik asit
AKG	: Açlık kan glukozu
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CE	: Kolesterol esteraz
CHOD	: Kolesterol oksidaz
COX	: Siklooksijenaz
COXİB	: Siklooksijenaz inhibitörü
CREB	: Yanıt elementine bağlanan protein
DHAP	: Dihidroksiaseton fosfat
EKG	: Elektrokardiyogram
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
GK	: Gliserokinaz
GP IIb/IIIa	: Glikoprotein IIb/IIIa
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HDL	: High Density Lipoprotein; Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HDL-K	: HDL-Kolesterol
HSDA	: Sodyum-N (2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoksianilin
ICAM-1	: Hücre içi adezyon molekülü-1
IL-1	: İnterlökin-1
İKH İ	: İskemik kalp hastalığı
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
LAF-1	: Leukocyte function associated antigen-1
LDL	: Low Density Lipoprotein; Düşük Dansiteli Lipoprotein
LDL-K	: LDL-Kolesterol
LPL	: Lipoprotein lipaz
MAC-1	: Macrophage antigen-1
MCP-1	: Monosit/makrofaj kemotaktik protein-1

M-CSF	: Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
MI	: Miyokard İnfarktüsü
NF-IL-6	: Nükleer faktör interleukin-6
NF-KB	: Nükleer faktör Kappa B
NO	: Nitrik Oksit
OxLDL	: Okside LDL
PAF	: Trombosit aktive edici faktör
PAP	: Paraaminofenazon
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD-ECGF	: Platelet kaynaklı ve endotel hücre büyüme faktörü
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PEG	: Polietilen glikol
PG	: Prostaglandin
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PGES	: PGE sentaz
PGF_{2α}	: Prostaglandin F _{2α}
PGI₂	: Prostasiklin
POD	: Peroksidaz
SAP	: Stabil Angina Pectoris
SNP	: Tek nükleotid polimorfizm
Sp1	: Stimülatuar protein 1
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
TXA₂	: Tromboksan
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VLA-4	: Very Late Antigen-4
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein; Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
vWF	: Von-Willebrand faktör
WHO	: World Health Organization; Dünya Sağlık Teşkilatı

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller		Sayfa No
Şekil 1	(Tip I aterosklerotik lezyonun progresyonu)	19
Şekil 2	(Tip II aterosklerotik lezyonların progresyonu)	19
Şekil 3	(Tip IV aterosklerotik lezyonların progresyonu)	20
Şekil 4	(Tip VI aterosklerotik lezyonların progresyonu)	20
Şekil 5	(Eikazonoid Metabolizması)	28
Şekil 6	(TaqMan real-time PCR kuantifikasyonu)	45
Şekil 7	(Hidroliz problemlerinin hedef DNA' ya bağlanması (A) ve allellerin belirlenmesi (B))	47
Şekil 8	(COX-2 765 genotiplerinin gösterilmesi)	48

TABLULAR DİZİNİ

Tablolar		Sayfa No
Tablo 1	(COX-1 ve COX –2'nin Temel Özelliklerin karşılaştırılması)	30
Tablo 2	(Noninflamatuvar Doku Fonksiyonlarında COX-2'nin Rolü)	31
Tablo 3	(DNA izolasyonunda kullanılan kitin içeriği)	39
Tablo 4	(765 G>C polimorfizminin analizinde kullanılan materyallerin konsantrasyon ve miktarları)	46
Tablo 5	(765 G>C polimorfizminin analizi için PCR koşulları)	46
Tablo 6	(Koroner arter hastalarının tanılarına göre dağılımları)	49
Tablo 7	(Kontrol ve hasta gruplarının demografik ve tanımlayıcı verileri)	50
Tablo 8	(Kontrol ve hasta gruplarının açlık kan şekerleri, lipid profilleri, ESR ve CRP düzeylerine ait değerler)	51
Tablo 9	(Kontrol ve hasta gruplarının ilaç kullanım sıklığı)	51
Tablo 10	(Kontrol ve hasta gruplarının genotiplerinin dağılımı ve oluşturdukları riskler)	52
Tablo 11	(Hasta ve kontrol gruplarının COX-2 765 GG ve GC genotiplerine göre sınıflandırıldıktan sonra diyabet, hipertansiyon ve sigara kullanımı ile ilişkisi)	53
Tablo 12	(Hasta ve kontrol gruplarının COX-2 765 GG ve GC genotiplerine göre sınıflandırıldıktan sonra açlık kan şekerleri, lipid profilleri, ESR ve CRP düzeyleri ile ilişkisi)	54
Tablo 13	(Koroner arter hastalarının genotip ve	

	MI öyküsü ilişkisi)	55
Tablo 14	(Koroner arter hastalarının genotip ve tanılarının ilişkisi)	55
Tablo 15	(Koroner arter hastalarının genotip ve tıkalı damar sayısı ilişkisi)	55