

# KORONER KALP HASTALIĞINDA ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ RS1799983 (GLU298ASP) VARYASYONUNUN METABOLİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

*METABOLIC EFFECTS OF THE RS1799983 VARIATION (GLU298ASP) OF THE  
ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE IN CORONARY HEART DISEASE*

Serap İlikay<sup>1</sup>, Zehra Buğra<sup>2</sup>, Oğuz Öztürk<sup>1</sup>, Hülya Yılmaz-Aydoğan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul;

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kardiyoloji Bilim Dalı, İstanbul

**Başlıca Yazar :** Hülya Yılmaz Aydoğan

**Yazının Kategorisi :** Orijinal Deneysel Çalışma

**Yazının İlişkili Olduğu Tıp Disiplini :** Kardiyoloji, Genetik, Biyokimya

**Yazışma adresi :** Prof. Dr. Hülya Yılmaz Aydoğan

İstanbul Üniversitesi

Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

Moleküler Tıp AD.

Vakıf Gureba C. Çapa, 34390, İstanbul, Türkiye

**E-mail adres :** hulyayilmaz6@gmail.com

**Telefon :** (212) 635 19 59

**Faks :** (212) 532 41 71

## ÖZET

**Amaç.** Koroner kalp hastalığı (KKH) dünyada ölüm nedenlerinin başında gelen genetik ve çevresel etkenlerin yol açtığı kompleks bir hastalıktır. KKH'na yol açan ateroskleroz patogeneğinde, endotel-yal fonksiyon bozukluğu önemli bir anahtardır. Endotel hücreleri vasküler homeostaz ve nitrik oksit üretimi gibi temel işlevlerini yerine getiremediğinde gelişen endotelial disfonksiyon, aterosklerotik plak oluşumuna neden olur. Bu amaçla çalışmamızda eNOS (NOS3) geni rs1799983 (Glu298Asp) varyasyonunun KKH riski açısından incelenmesi ve metabolik etkilerinin gösterilmesi hedeflenmiştir.

**Gereç ve Yöntem.** Çalışma gruplarımız 75 KKH ve 73 gönüllü sağlıklı kontrolden oluşturulmuştur. NOS3 rs1799983 genotipleri PZR-RFLP teknikleri kullanılarak belirlenmiştir.

**Bulgular.** KKH hasta ve kontrol gruplarında eNOS rs1799983 genotip ve allel dağılımları benzerdir ( $p>0.05$ ). Çalışma gruplarında rs1799983 genotiplerinin metabolik parametreler üzerine etkileri incelendiğinde, kontrol grubunda eNOS nadir TT (Asp/Asp) genotipi taşıyan bireylerde G (Glu) alleli (GG+GT genotipleri) taşıyanlara kıyasla vücut kitle indeksleri artmış bulundu. Ancak KKH hastalarında eNOS rs1799983 varyasyonu metabolik ve biyokimyasal parametrelerle ilişkili gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ).

**Sonuç.** Bulgularımız eNOS rs1799983 varyasyonunun yüksek vücut kitle indeksi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** eNOS, Gen, vücut kitle indeksi, metabolizma, Koroner kalp hastalığı

## ABSTRACT

**Objective.** Coronary heart disease (CHD) is a complex disease caused by genetic and environmental factors, being one of the major causes of death in the world. Endothelial dysfunction is important key for atherosclerosis patogenesis leading to CHD. Endothelial dysfunction causes the formation of atherosclerotic plaque when endothelial cells do not perform ultimate functions such as vascular homeostasis and nitric oxide (NO) production. In our study, we purposed to investigate Endothelial NO synthase (eNOS, NOS3) rs1799983 variation (Glu298Asp) in CHD patients and determine its metabolic effects on CHD development.

**Material and Methods.** This study was carried out using a sample of 75 CHD patients and 73 healthy controls. eNOS rs1799983 genotypes were determined by polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism and agarose gel electrophoresis.

**Results.** The eNOS rs1799983 genotype distributions were the same between study groups ( $p>0.05$ ). When the effects of the rs1799983 genotypes were examined on metabolic parameters in the study groups, the body mass index was found to be increased in the subjects with the TT (Asp/Asp) genotypes as compared to G (Glu) allele (GG+GT genotypes). However, eNOS rs1799983 was not associated with metabolic and biochemical parameters in patients with CHD ( $p>0.05$ ).

**Conclusion.** Our findings indicate that the eNOS rs1799983 genotypes may be associated with elevated body mass index.

**Key Words:** eNOS, Gene, body mass index, Metabolism, Coronary heart disease

## GİRİŞ

Ateroskleroz erken yaşlarda arter duvarında yağlı çizgilenmelerle başlayan, köpük hücre ve sonrasında fibröz plak oluşumuyla devam eden bir süreçtir. Endotel fonksiyon bozukluğu (endotelyal disfonksiyon) bu süreçte önemli rol oynamaktadır (1).

Endotelyal fonksiyon bozukluğu, endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin ürettiği nitrik oksit (NO)'ın hücrelerdeki yararlanımının azalmasıyla gelişen bir durumdur. Bütün bilinen kardiyovasküler risk faktörleri (dislipidemi, arteriyel hipertansiyon, hiperglisemi ve diyabet) endotel disfonksiyonla ilişkilidir (2,3). Kan akış gerilimi, fizyolojik ve metabolik sinyallerle uyarılan endotel hücre membranında yer alan eNOS enzimi kataliyle üretilen NO vasküler düz kas hücresinde reseptörü olan çözülmüş haldeki guanilat siklaz (sGC)'a bağlanarak etkisini gösterir. sGC'yi aktive ederek siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretimini arttıran NO, düz kas hücrelerinde gevşemeye neden olurken, aynı zamanda vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir. NO'nun ayrıca platelet agregasyonunu ve lökosit adezyonunu engelleyici etkileri de bilinmektedir (4).

eNOS geni (*NOS3*) 7. kromozomun q35-36 bölgesinde bulunan 26 ekzonluk 21kb büyüklüğünde bir gendir. Gen protein ürünü 1203 aminoasitli 135-kDa büyüklüğündedir (5). *NOS3* geni tarafından kodlanan eNOS proteini "N-terminal oksijenaz" ve "C-terminal redüktaz" olmak üzere iki bölgeye sahiptir (6). Bu iki domen arasında  $Ca^{2+}$ /Kalmodulin (CaM)-bağlanma bölgesi bulunur (7). Farelerde yapılan çalışmalar eNOS genindeki modifikasyonların endotel disfonksiyonuna yol açtığını göstermiştir (4). Buna ek olarak, eNOS gen ekspresyonunda azalma, L-Arginin eksikliği (8), endotelyumdaki mekanik hasar ve NO'nun birlikte üretildiği superoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) ile hızlı reaksiyonunun da endotelyal fonksiyon bozukluğuna neden olabileceği bildirilmiştir (9).

eNOS geninde çok sayıda varyasyon tanımlanmış ve çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. En yaygın araştırılan genetik varyasyonlar arasında yer alan 7.ekzondaki G>T değişimi (Glu298Asp, rs1799983) 298.kodonda glutamin aminoasidinin aspartat aminoasidine dönüşmesine neden ol-

maktadır (10). eNOS Glu298Asp varyantı çeşitli populasyonlarda araştırılmış ve çelişkili bulgular bildirilmiştir. Çalışmaların bir kısmı varyasyonun koroner arter hastalığı ve miyokard infarktüsü için bir risk faktörü olduğunu bildirirken (10-18), kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olmadığını savunan çalışmalar da mevcuttur (19-27).

Bu nedenle çalışmamızda kardiyovasküler hastalıklardaki etkileri hem bizim toplumumuzda hem de diğer popülasyonlarda tam olarak aydınlatılmamış eNOS geni rs1799983 varyasyonunu koroner kalp hastalarında ve sağlıklı kontrollerde inceleyerek, bu varyasyonun hem hastalığın gelişiminde risk etmeni olarak hem de metabolik parametreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Seçilen Örneklerin Tanımı

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kardiyoloji Kliniği'nde takip edilen klinik kriterlere uygun 75 Koroner kalp hastası (KKH) ile kalp rahatsızlığı ve yüksek tansiyon hikayesi olmayan 73 sağlıklı kontrolden oluşturulan iki grupta eNOS geni rs1799983 (Glu298Asp) varyasyonu ve metabolik parametrelerle ilişkileri incelenmiştir.

Bu çalışma, Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi'ne (28) uygun olarak düzenlenmiş olup çalışmaya dahil edilen gönüllülerden yazılı onay alınmıştır. Çalışmanın etik onayı, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

### DNA İzolasyonu ve Genotipleme

Araştırılan eNOS geni rs1799983 gen varyasyonunun incelenmesi için hasta ve kontrol örneklerine ait periferik kan örnekleri steril EDTA'lı tüplere alınmış ve DNA izolasyon kiti kullanılarak genomik DNA izole edilmiştir (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Almanya). rs1799983 gen varyantının gözlemlendiği bölgenin çoğaltılması için hazırlanan PZR karışımına elde edilen DNA örneklerinden 1,5 µl (150-200 ng) eklenmiştir. Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizm analizi için elde edilen PZR ürünleri, rs1799983

bölgesinde normal homozigot GG genotipi varlığında selektif kesim yapan BanII restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilmiştir. Normal GG genotipi olan PZR ürünleri 198 bç ve 122 bç büyüklüğünde iki bant verirken, homozigot nadir TT genotipli PZR ürünleri, enzim muamelesi sonrası kesilmeksizin 320 bç uzunluğunda tek bant vermiştir (29).

### İstatistiksel Analiz

Çalışmamızın istatistiksel analizleri SPSS paket programı (version 20,0) kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasında niceliksel verilerin karşılaştırılmasında Student's t testi, ikiden fazla değişkenin olduğu genotip karşılaştırmalarında ANOVA testi kullanılmıştır. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise (genotip ve allel karşılaştırmaları, Hardy-Weinberg dengesine uyum ile klinik/ klinik olmayan parametrelerin allellerle karşılaştırılması) Ki kare ( $\chi^2$ ) testi kullanılmıştır. eNOS geni

rs1799983 allel frekansı hesaplamalarında gen sayma yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar istatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0.05$  olarak ve %95 güven aralığında değerlendirilmiştir.

### BULGULAR

Koroner kalp hasta ve kontrol gruplara ait demografik ve metabolik özellikler Tablo 1'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizde hasta ve kontrol grupları arasında yaş ortalaması ve cinsiyet dağılımı benzer gözlenmiştir ( $p > 0,05$ ). Gruplararası ayrıca serum trigliserid, VLDL-kolesterol (VLDL-K), vücut kitle indeksi (VKİ) ve aile koroner arter hastalığı hikayesi açısından istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). KKH grubunu oluşturan bireylerin % 44'ünün hipertansif, % 44'ünün tip 2 diyabetik olduğu ve hastaların % 40,4'ünde sol ventrikül hipertrofisi bulunduğu tespit edilmiştir.

	Gruplar		p değeri
	Kontrol (n=73)	KKH Hasta (n=75)	
Yaş (yıl)	58,85±9,93	59,75±12,25	0,626
Cinsiyet (Kadın/Erkek) (n)	31/42	24/51	0,188
SKB (mmHg)	123,16±12,61	136,30±32,45	0,002
DKB (mmHg)	74,73±8,83	84,18±17,22	0,000
Total-K (mmol/L)	4,74± 0,94	5,28± 1,41	0,007
TG (mmol/L)	1,45± 0,65	1,77± 1,81	0,119
HDL-K(mmol/L)	1,24± 0,36	1,04± 0,21	0,000
LDL-K(mmol/L)	2,88± 0,83	3,22± 0,81	0,014
VLDL-K(mmol/L)	0,69± 0,40	0,72± 0,32	0,627
VKİ (kg/m <sup>2</sup> )	25,66± 2,48	25,58± 4,19	0,999
Sigara Kullanımı (%)	%21,7	%58,9	0,000
Alkol kullanımı (%)	%4,3	%16,9	0,04
Aile koroner arter hastalığı hikayesi varlığı (%)	%19,0	%34,5	0,262
Hipertansiyon varlığı (%)	-	%44,0	-
Tip 2 Diabet varlığı (%)	-	%44,0	-
SVH varlığı (%)	-	%40,4	-

**Tablo 1. Çalışma Gruplarının Karakteristik Özellikleri**

Tablodaki yaş, serum lipid, VKİ ve kan basınçları değerleri X±SD olarak verilmiştir. Gruplararası önemlilik derecesi student's t testi ile incelenmiştir. KKH: Koroner kalp hastalığı, SKB: Sistolik kan basıncı; DKB: Diastolik kan basıncı; Total-K: total-kolesterol, TG: Trigliserid, HDL-K: HDL-kolesterol, LDL-K:LDL-kolesterol, VLDL-K:VLDL-kolesterol, VKİ : Vücut kitle indeksi,SVH: sol ventrikül hipertrofisi, n : örnek sayısı.

Hasta ve kontrol grubu arasında sistolik ve diastolik kan basınçları ile total-kolesterol, LDL-kolesterol (LDL-K) ve HDL-kolesterol (HDL-K) değerleri açısından anlamlı farklılık gözlenmiştir. KKH hasta grubunda sistolik ( $p=0,002$ ) ve diastolik kan basıncı ( $p=0,000$ ) düzeyleri ile total-kolesterol ( $p=0,007$ ) ve LDL-K ( $p=0,014$ ) değerleri kontrol grubuna kıyasla yüksek iken, HDL-K değeri düşük bulunmuştur ( $p=0,000$ ).

Sigara ve alkol tüketimi açısından hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında; KKH grubunda kontrol grubuna göre sigara ve alkol kullanımı yüksek gözlenmiştir (Sigara kullanımı: hasta grubunda %58,9, kontrol grubunda %21,7,  $p=0,000$ ; alkol kullanımı; hasta grubunda %16,9, kontrol grubunda %4,3,  $p=0,04$ ).

Koroner kalp hasta ve kontrol gruplarında eNOS geni rs1799983 (Glu298Asp) varyasyonuna ait genotip, allel dağılımları ve Hardy-Weinberg

Eşitliği (HWE)'ne uyumları Tablo 2'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda NOS3 rs1799983 normal G allel frekansı %69,9, nadir T allel frekansı %30,1 iken KKH hasta grubunda yine kontrol grubu değerlerine yakın olarak sırasıyla %66,6 ve %33,3 bulunmuştur. Kontrol ve KKH hasta gruplarında eNOS rs1799983 genotip dağılımı HWE'ne uyumludur ( $p>0,05$ ).

eNOS rs1799983 genotiplerinin çalışma gruplarında serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi incelendiğinde; kontrol grubunda TT genotipli bireylerde VKİ değerleri GG ve GT genotiplerine (her iki karşılaştırma için  $p=0,003$ ) ve G alleli taşıyanlarla karşılaştırıldığında yüksek gözlenmiştir ( $p=0,002$ ). KKH hasta grubunda ise eNOS rs1799983 genotiplerinin incelenen klinik ve biyokimyasal parametreler üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir etkisi gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 3).

**Tablo 2. Çalışma gruplarında eNOS Genotiplerinin Dağılımı**

NOS3 rs1799983	Çalışma Grupları	
	Kontrol (n=73)	KKH Hasta (n=75)
<b>Genotipler</b>		
<b>GG</b>	35 (%47,9)	33 (%44)
<b>TT</b>	6 (%8,2)	8 (%10,7)
<b>GT</b>	32 (%43,8)	34 (%45,3)
<b>HWE</b>	$p=0,726$ ( $p>0,05$ )	$p=0,862$ ( $p>0,05$ )
<b>Alleler</b>		
<b>G</b>	102 (%69,9)	100 (% 66,6)
<b>T</b>	44(%30,1)	50 (% 33,3)

n : örnek sayısı, HWE: Hardy-Weinberg Eşitliği.

**Tablo 3. eNOS rs1799983 Genotiplerinin Çalışma Gruplarında Serum lipid profili, kan basınçları ve vücut kitle indeksi üzerine etkisi**

GRUP	rs1799983				
	GG	GT	TT	GG/GT	TT/GT
<b>KONTROL</b>	n=35	n=32	n=6	n=67	n=38
Yaş	58,49±9,96	59,66±9,66	56,67±12,48	59,04±9,76	59,18±10,02
Glikoz	97,06±11,96	94,73±12,62	99,00±7,53	95,80±12,20	95,48±11,87
Total-K (mmol/L)	4,65±1,15	4,80±0,64	4,95±1,00	4,72±0,94	4,82±0,69
TG (mmol/L)	1,35±0,49	1,48±0,78	1,36±0,81	1,41±0,64	1,46±0,76
HDL-K (mmol/L)	1,29±0,35	1,20±0,38	1,15±0,31	1,25±0,36	1,19±0,37
LDL -K(mmol/L)	2,84±0,99	2,94±0,62	2,80±0,95	2,89±0,83	2,91±0,67
VLDL -K(mmol/L)	0,62±0,25	0,74±0,42	0,85±0,82	0,67±0,34	0,76±0,49
VKİ (kg/m <sup>2</sup> )	25,44±1,99	25,35±2,70	<b>28,59±2,19*</b>	<b>25,40±2,34<sup>‡</sup></b>	25,86±2,89
SKB (mmHg)	122,72±11,80	125,13±13,14	113,60±10,71	120,03±12,50	123,48±13,33
DKB (mmHg)	72,40±7,65	77,03±9,37	72,60±9,15	74,92±8,86	76,40±9,34
<b>KKH HASTA</b>	n=33	n=34	n=8	n=67	n=42
Yaş	61,09±11,84	59,24±13,63	56,38±6,93	60,15±12,72	58,69±12,61
Glikoz	194,48±134,92	191,19±140,49	135,50±71,01	192,86±136,36	180,75±131,22
Total-K (mmol/L)	5,29±1,64	5,24±1,27	5,35±1,07	5,27±1,45	5,27±1,23
TG (mmol/L)	1,65±0,81	1,94±2,54	1,50±0,67	1,80±1,90	1,85±2,31
HDL-K (mmol/L)	1,01±0,23	1,05±0,19	1,12±0,17	1,02±0,21	1,06±0,18
LDL -K(mmol/L)	3,26±0,95	3,20±0,72	3,15±0,59	3,23±0,84	3,19±0,69
VLDL -K(mmol/L)	0,74±0,36	0,68±0,27	0,75±0,34	0,72±0,32	0,70±0,28
VKİ (kg/m <sup>2</sup> )	26,16±4,48	24,98±4,00	26,46±4,03	25,53±4,23	25,32±4,00
SKB (mmHg)	142,34±31,90	134,09±33,66	121,25±26,42	138,15±32,82	131,59±32,49
DKB (mmHg)	86,72±16,29	83,18±16,85	78,13±22,35	84,92±16,55	82,20±17,86

\*, p=0,003; <sup>‡</sup>, p=0,002;

## TARTIŞMA

Koroner kalp hastalığı (KKH), damarlarda hasar ve enfeksiyona cevap olarak kronik inflamasyonla seyreden bir süreçtir. KKH etyopatogenezi ateroskleroz ve endotelial fonksiyon bozukluğu yer almaktadır (1). Kolesterol yüklü-LDL'lerin endotel hücrelerden geçip çeşitli kimyasal modifikasyonlara uğradıktan sonra makrofajlar tarafından alınıp, köpük hücreye dönüşümüyle başlayan ateroskleroz patogenezi, kolesterol ve esterlerinin ekstrasellüler alanda artması ve böylece fibröz plakların oluşumuyla ilerlemektedir (30).

Endotel hücre membranındaki eNOS enzimi tarafından L-arginin kullanılarak üretilen NO,

ateroskleroz patogenezi engelleyen önemli bir etkidir. eNOS enzim aktivitesi birçok basamakta düzenlenir; transkripsiyonel olarak, substrat varlığıyla -kalsiyum, kalmodulin-, FAD, FMN, NADPH ve BH4 gibi enzim kofaktörleri ile ve hsp90 ve kaveolinler gibi proteinlerle etkileşimiyle düzenlenir (4). Fonksiyonu bozulmuş endotel hücrelerindeki yetersiz NO üretimi ateroskleroz patogenezi kilit noktalardandır. Endotel disfonksiyon ve ateroskleroz patogenezi eNOS'un etkisini araştırmak amacıyla eNOS geni susturulmuş farelerde yapılan araştırmalarda; eNOS yokluğunun farelerde EDRF (Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör) aktivitesi eksikliğine ve hipertansiyona (31), platelet agregasyonunda artışa (32) lökosit -endotel adezyonuna ve

tromboz eğiliminde artışa (33) vasküler düz kas hücre proliferasyonunda artışa (34), felç (35,36) ve ateroskleroz (37) eğiliminde artışa yol açtığı gösterilmiştir.

Çeşitli populasyonlarda eNOS geni rs1799983 (Glu298Asp) varyasyonunun kardiyovasküler hastalıklarla ilişkileri incelenmiştir (Tablo 4). Bu araştırmaların bazılarında eNOS rs1799983 minör TT genotipinin kardiyovasküler disfonksiyonla ilişkili olduğu bildirilirken (10-18), bazı araştırmalarda herhangi bir risk oluşturmadığı bildirilmiştir (19-27). Meta-analiz çalışmalarında bu varyasyon kardiyovasküler hastalıklarda artan riskle ilişkilendirilmiştir. Luo ve ark. me-

ta-analiz çalışmalarında, eNOS rs1799983 varyantı Asya populasyonunda miyokard enfarktüsü için risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir (11). Souza-Costa ve ark.(2004) da 26 çalışma ve toplamda 23028 kişiyi inceledikleri meta-analiz çalışmalarında, eNOS geninin Asp298 ve intron-4a homozigot genotiplerini birlikte taşıyan bireylerde iskemik kalp hastalığı riskinin arttığını ileri sürmüşlerdir (16). Türkiye populasyonunda kardiyovasküler hasta gruplarında yapılan eNOS rs1799983 varyasyonu çalışmalarının sonuçları da çelişkilidir. Bazı çalışmalarda bu varyasyonun risk artışı ile ilişkili olduğu bildirilirken (10,17,18); bazılarında ilişkili olmadığı rapor edilmiştir (21,22,26,27).

**Tablo 4. Çeşitli populasyonlarda kardiyovasküler hastalıklarla eNOS rs1799983 (Glu298Asp) varyasyon çalışma sonuçları**

Yazar	Yıl	Toplum	eNOS gen varyasyonu	Sonuç
<i>Kardiyovasküler hastalıklarla eNOS rs1799983 varyasyonunu n ilişkili olduğunu" öne süren çalışmalar</i>				
Yalçın ve ark.(10)	2014	Türkiye	Glu298Asp	Koroner arter ektazi riski artmış
Luo ve ark.(11)	2014	Meta-analiz	Glu298Asp	Asya populasyonunda miyokard enfarktüsü riski
Fedele ve ark.(12)	2013	Kafkasya	Glu298Asp	Koroner mikrovasküler disfonksiyon
Heltianu ve ark.(13)	2005	Romanya	Glu298Asp	Endotelial disfonksiyon
Hingorani ve ark.(14)	1999	Birleşik Krallık	Glu298Asp	Koroner arter hastalığı risk artışı
Colombo ve ark.(15)	2003	İtalya	Glu298Asp	Koroner arter hastalığı risk artışı
Sauza-Costa ve ark.(16)	2004	Meta-analiz	Glu298Asp ve intron-4	Asp298 ve intron-4a homozigot genotiplerini birlikte taşıyan bireylerde iskemik kalp hastalığı riski
Berdeli ve ark. (17)	2005	Türkiye	Glu298Asp	Koroner arter hastalığı risk artışı
Cam ve ark. (18)	2005	Türkiye	Glu298Asp	Koroner arter hastalığı risk artışı
<i>Kardiyovasküler hastalıklarla eNOS rs1799983 varyasyonunun "ilişkili olmadığını" öne süren çalışmalar</i>				
Granath ve ark. (19)	2001	Avustralya, beyaz ırk	Glu298Asp	Koroner arter hastalığı riski yok
Çağlayan ve ark.(20)	2009	Türkiye	Glu298Asp	Yavaş koroner akımı riski yok
Güldiken ve ark.(21)	2008	Türkiye	Glu298Asp	İskemik felç riski yok
Afrasyap ve ark.(22)	2004	Türkiye	Glu298Asp	Koroner arter hastalığı riski yok
Ragia ve ark.(23)	2010	Yunanistan	Glu298Asp	Koroner arter hastalığı riski yok
Andrikopoulos ve ark.(24)	2008	Yunanistan	Glu298Asp	Akut miyokard enfarktüsü riski yok
Karvonen ve ark.(25)	2002	Finlandiya	Glu298Asp	Kardiyovasküler değişim riski yok
Aras ve ark.(26)	2002	Türkiye	Glu298Asp	Koroner arter hastalığı riski yok
Alp ve ark.(27)	2009	Türkiye	Glu298Asp	Koroner arter hastalığı riski yok
İlikay ve ark (Bizim çalışmamız)	2016	Türkiye	Glu298Asp	Koroner kalp hastalığı riski yok

Bizim çalışmamızda da eNOS rs1799983 varyasyonunun koroner kalp haslığı için risk oluşturmadığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmaların birbirinden bulgularının farklı olmasının, populasyonlar arasındaki etnik farklılıklardan ve G894T polimorfizminin diğer polimorfizmlerle ilişkisinden kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz. Ek olarak, eNOS enzim aktivitesini belirleyen diğer etkenler, populasyonlar arasında farklılık gösterebileceğinden, çalışmalar arasında farklı bulgular elde edilmesine neden olabilir.

Obezite ve adipoz doku ile eNOS düzeylerinin ilişkili olduğu son yıllarda gösterilmiştir. eNOS transgenik fareler (eNOS-TG) kullanılarak adipozitenin düzenlenmesi sürecinde eNOS kaybının nedeni araştırılmıştır. eNOS-TG fareler endotel yumularında transgenik olarak pre-proendotelin promoteri ile eksprese ettikleri eNOS'u üretmekte ve bu şekilde doku ve vasküler hasardan korunmaktadır. Buna karşın bu farelerde ateroskleroz gelişiminin arttığı bildirilmiştir (38,39). eNOS-TG farelerde adiposit dokunun endotel yumusunda eNOS eksprese edilmektedir (40). Sansbury ve ark. adipositenin düzenlenmesinde eNOS-kökenli nitik oksitin aktif olarak katıldığını göstermişler, yabancı farelerde yüksek yağlı diyetle beslenmeleri sonucu adipositenin arttığını ve adiposit fraksiyonlarında eNOS protein düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir (41). Yüksek yağlı diyetle beslenen eNOS-TG farelerde normal farelerin aksine, adipoz dokuda eNOS düzeylerinin azalmaması ve bu fareler yüksek yağlı diyetin neden olduğu kilo artışından önemli ölçüde korunmaları nedeniyle -adipoz dokuda eNOS düzeylerinin devam ettirilmesi veya artırılmasıyla adipoz doku metabolizmasının düzenlenebileceği- önerilmiştir. Bu durumun eNOS-TG fareler normal farelerle benzer yiyecek tükettikleri ve aktivite sergiledikleri koşulda da olduğu gözlenmiştir. Adipozitedeki azalmanın yanında eNOS-TG farelerde yüksek yağlı diyet hiperinsülinemiye veya plazma trigliserid ve yağ asitlerinde yükselmeye neden olmamakta ancak normal farelere göre insülin direnci göstermektedirler. Mekanistik olarak eNOS aşırı ekspresyonunun metabolomu değiştirerek hem dallı zincirli aminoasitlerin ve yağ asitlerinin metabolizmasını arttırdığı hem de mitokondrial biyogenezi uyardığı gösterilmiş ve bu etkilerin sonucu oksijen

tüketiminde artışa ve obeziteye dirence neden olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca eNOS'u olmayan fareler iskelet kası ve adipoz dokularında mitokondri sayıları azalması nedeniyle, eNOS-kökenli NO'nun mitokondrial biyogenezi uyardığı bildirilmiştir (42,43).

Yaptığımız literatür araştırmasında eNOS gen varyasyonları ile vücut kitle indeksi veya obezite ilişkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma yapıldığını gözlemledik. Malhotra ve ark. 235 Afrika-kökenli Amerikalı ve 262 Avrupa kökenli Amerikalıdan oluşan genç yetişkinlerde yaptıkları araştırmada eNOS G894T varyasyonunun dinlenme ve stres koşullarında nitrik oksit metabolitlerinin hemodinamiklerle ilişkisini incelemişler ve obez Asp alleli (T alleli) taşıyanlarda kardiyak outputun arttığı ve stress etmenlerine karşı NO metabolitlerinin azaldığını bildirmişlerdir (44). Souza-Costa ve ark. ise Brezilya'da 175 sağlıklı kontrol, 110 mormotensif obez ve 73 hipertansif obez çocuk ve adolesan dönemdeki bireylerden oluşan çalışma gruplarında eNOS Glu298Asp AspAsp (TT) genotipinin normotensif obezlerde kontrollere kıyasla daha az yaygın iken ( $p < 0.02$ ); normal Glu298 varyantın hipertansif obezlerde hem normotansif obezlerden hem de kontrol grubundan yüksek sıklıkta olduğunu rapor etmişlerdir ( $p < 0.01$ ) (45). Hingorani ve ark. nın çalışmalarında ise eNOS rs1799983 (Glu-298Asp) varyasyonunun eNOS proteininde değişime neden olduğu ve eNOS aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (46).

Bizim çalışmamızda eNOS rs1799983 varyantının hem kontrol grubunda hem de hasta grubunda serum lipid profili, kan basınçları gibi risk parametreleri üzerinde etkisi gözlenmemiştir. Bu parametrelerden bağımsız olarak sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubumuzda minör TT genotipli bireylerin vücut kitle indeksinin normal G alleli taşıyan bireylere göre artmış olduğu gözlenirken, KKH hasta grubunda ise bu ilişki saptanmamıştır. Bu bağlamda biz de hem daha önceki çalışma sonuçlarından hem de kendi çalışma bulgularımızdan yola çıkarak eNOS rs1799983 minör TT genotipi taşıyanlarda gözlemlediğimiz yüksek vücut kitle indeksi değerlerine bu varyasyonun eNOS düzeylerinde azalmaya neden olarak katkı sağladığını düşünüyoruz. Bu ilişkinin



sadece sağlıklı kontrol grubunda gözlenmesinin ise KKH hasta grubunda uygulanan diyet veya diğer lipid düşürücü tedaviler sonucu bu etkileşimin maskelenmesinden kaynaklandığı kanaatindeyiz. Çalışmamızı daha büyük ölçekli bir araştırmayla devam ettirerek bulgularımızı güçlendirmeyi hedeflemekteyiz.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37310

## KAYNAKLAR

- Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Miñana M, de las Heras N, Cachofeiro V, Luño J. Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem* 2007;14(2):243-248.
- Tritto I, Ambrosio G. The multi-faceted behavior of nitric oxide in vascular "inflammation": catchy terminology or true phenomenon? *Cardiovasc Res* 2004;63:1-4.
- Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P, Picano E, Cortigiani L, Bevilacqua M, Milazzo L, Cusi D, Barlassina C, Sarzi-Puttini P, Turiel M. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 2010;9(12):830-834.
- Atochin DN, Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction. *Pflugers Arch* 2010;460:965-974.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993;268:17478-17488.
- Chen PF, Tsai AL, Berka V, Wu KK. Endothelial Nitric-oxide Synthase Evidence for Bidomain Structure and Successful Reconstitution of Catalytic Activity from Two Separate Domains Generated by A Baculovirus Expression System. *J Biol Chem* 1996;271:14631-14635.
- Venema RC, Sayegh HS, Kent JD, Harrison DG. Identification, Characterization and Comparison of the Calmodulin-binding Domains of the Endothelial and Inducible Nitric Oxide Synthases. *J Biol Chem* 1996;271:6435-6440.
- Bode-Boger SM, Boger RH, Kienke S, Junker W, Frolich JC. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:598-603.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:1424-1437.
- Arif Yalcin A, Faruk Akturk I, Celik O, Erturk M, Sabri Hancer V, Yalcin B, Isiksacan N, Uzun F, Ozbey Ozyilmaz S, Biyik I. Coronary artery ectasia is associated with the c.894G>T (Glu-298Asp) polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Tohoku J Exp Med* 2014;232(2):137-44.
- Luo JQ, Wen JG, Zhou HH, Chen XP, Zhang W. Endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and myocardial infarction: a meta-analysis of 34 studies involving 21,068 subjects. *PLoS One* 2014;9(1):e87196.
- Fedele F, Mancone M, Chilian WM, Severino P, Canali E, Logan S, De Marchis ML, Volterrani M, Palmirotta R, Guadagni F. Role of genetic polymorphisms of ion channels in the pathophysiology of coronary microvascular dysfunction and ischemic heart disease. *Basic Res Cardiol* 2013;108(6):387.
- Heltianu C, Costache G, Gafencu A, Diaconu M, Bodeanu M, Cristea C, Azibi K, Poenaru L, Simionescu M. Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. *J Cell Mol Med* 2005;9(1):135-142.
- Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major

- risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 1999;100(14):1515-1520.
15. Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Biagini A, Clerico A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 2003;49(3):389-395.
  16. Souza-Costa DC1, Belo VA, Silva PS, Sertorio JT, Metzger IF, Lanna CM, Machado MA, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004;109:1359-1365.
  17. Berdeli A, Sekuri C, Sirri Cam F, Ercan E, Sagan A, Tengiz I, Eser E, Akin M. Association between the eNOS (Glu298Asp) and the RAS genes polymorphisms and premature coronary artery disease in a Turkish population. *Clin Chim Acta* 2005;351(1-2):87-94.
  18. Cam SF, Sekuri C, Tengiz I, Ercan E, Sagan A, Akin M, Berdeli A. The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population. *Thromb Res* 2005;116(4):287-292
  19. Granath B, Taylor RR, van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J Cardiovasc Risk* 2001;8(4):235-241.
  20. Caglayan AO, Kalay N, Saatci C, Yalcın A, Akalın H, Dundar M. Lack of association between the Glu298Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase and slow coronary flow in the Turkish population. *Can J Cardiol.* 2009;25(3):e69-72.
  21. Guldiken B, Sipahi T, Guldiken S, Ustundag S, Budak M, Turgut N, Ozkan H. Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in Turkish patients with ischemic stroke. *Mol Biol Rep* 2009;36(6):1539-1543.
  22. Afrasyap L, Ozturk G. NO level and endothelial NO synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in the patients with coronary artery disease from the Turkish population. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2004;36(10):661-666.
  23. Ragia G, Nikolaidis E, Tavridou A, Arvanitidis KI, Kanoni S, Dedoussis GV, Bougioukas G, Manolopoulos VG. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms 786T > C and 894G > T in coronary artery bypass graft surgery patients. *Hum Genomics* 2010;4(6):375-383.
  24. Andrikopoulos GK, Grammatopoulos DK, Tzeis SE, Zervou SI, Richter DJ, Zairis MN, Gialafos EJ, Sakellariou DC, Foussas SG, Manolis AS, Stefanadis CI, Toutouzas PK, Hillhouse EW; GEMIG study investigators. Association of the 894G>T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with risk of acute myocardial infarction. *BMC Med Genet* 2008;9:43.
  25. Karvonen J, Kauma H, Kervinen K, Rantala M, Ikäheimo M, Päivänsalo M, Savolainen MJ, Kesäniemi YA. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and blood pressure, left ventricular mass and carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort. *J Intern Med* 2002;251(2):102-110.
  26. Aras O, Hanson NQ, Bakanay SM, Tsai MY, Gulec S. Endothelial nitric oxide gene polymorphism (Glu298Asp) is not associated with coronary artery disease in Turkish population. *Thromb Haemost* 2002;87(2):347-349.
  27. Alp E, Menevse S, Tulmac M, Kan D, Yalcin R, Erkan AF, Cengel A. Lack of association between matrix metalloproteinase-9 and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in Turkish population. *DNA Cell Biol* 2009;28(7):343-350.
  28. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013;310(20):2191-2194.
  29. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hyper-

- tension. *Hypertension* 1998; 32(1): 3-8
30. Chilton RJ. Pathophysiology of Coronary Heart Disease: A Brief Review. *JAOA* 2004; (Supplement 7);104(9):S5-S8.18
  31. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995;377:239-242.
  32. Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL, Loscalzo J. Deficient platelet derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res*1999;84:1416-1421.
  33. Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 1999;276:H1943-H1950.
  34. Huang PL. Lessons learned from nitric oxide synthase knockout animals. *Semin Perinatol* 2000;24:87-90.
  35. Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:981-987.
  36. Atochin DN, Wang A, Liu VW, Critchlow JD, Dantas AP, Looft-Wilson R, Murata T, Salomone S, Shin HK, Ayata C, Moskowitz MA, Michel T, Sessa WC, Huang PL. The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia in vivo. *J Clin Invest* 2007;117:1961-1967.
  37. Kuhlencordt PJ, Rosel E, Gerszten RE, Morales-Ruiz M, Dombkowski D, Atkinson WJ, Han F, Preffer F, Rosenzweig A, Sessa WC, Gimbrone MA Jr, Ertl G, Huang PL. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C1195-C1202.
  38. Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, Sakoda T, Kurihara H, Yazaki Y, Yokoyama M. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1998; 102(12):2061-2071.
  39. Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Ohashi Y, Azumi H, Inoue N, Hirata K, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M. Endothelial nitric oxide synthase overexpression inhibits lesion formation in mouse model of vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:201-207.
  40. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, Hirata K, Yasui H, Sakurai H, Yoshida Y, Masada M, Yokoyama M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2002;110(3):331-340.
  41. Sansbury BE, Cumins TD, Tang Y, Hellman J, Holden CR, Harbeson MA, Chen Y, Patel RP, Spite MR, Bhatnager A, Hill BG. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet induced obesity and regulates adipocyte phenotype. *Circ Res* 2012;111(9):1176-1189.
  42. Sessa WC. A new approach to weight loss: Just activate eNOS! *Circ Res*. 2012;111(9):1111-2.
  43. Valerio A, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Pisconti A, Palomba L, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO, Nisoli E. Tnf-alpha downregulates enos expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J Clin Invest* 2006;116:2791-2798.
  44. Malhotra S, Poole J, Davis H, Dong Y, Pollock J, Snieder H, Treiber F. Effects of NOS3 Glu-298Asp polymorphism on hemodynamic reactivity to stress: influences of ethnicity and obesity. *Hypertension* 2004;44: 866-871.
  45. Souza-Costa DC, Belo VA, Silva P S, Metzger IF, Lanna CM, Machado MA, Tanus-Santos JE. eNOS haplotype associated with hypertension in obese children and adolescents. *Int J Obes* 2011;35:387-392.
  46. Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2003; 5:19-25.

