

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SORTİLİN1 (SORT1) GEN EKSPRESYONUyla İLİŞKİLİ
KODLAMAYAN (NON-CODING) RS599839 POLİMORFİZMİNİN
LİPOPROTEİN ALTSINIFLARI İLE İLİŞKİSİNİN KORONER
KALP HASTALARINDA ARAŞTIRILMASI**

MEHTAP ATAK

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. HÜSEYİN AVNİ UYDU

TEZ JÜRİLERİ

PROF. DR. ASİM ÖREM

PROF. DR. SEMBOL YILDIRMAK

YRD. DOÇ. DR. BARBAROS DİNÇER

YRD. DOÇ. DR. ÖZLEM FAİZ

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

RİZE- 2017

Her Hakkı Saklıdır

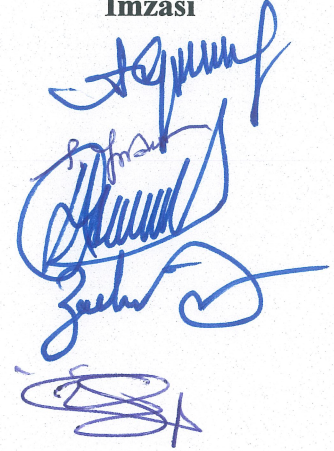
T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SORTİLİN1 (SORT1) GEN EKSPRESYONUyla İLİŞKİLİ KODLAMAYAN
(NON-CODING) RS599839 POLİMORFİZMİNİN LİPOPROTEİN
ALTSINIFLARI İLE İLİŞKİSİNİN KORONER KALP HASTALARINDA
ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU danışmanlığında, Mehtap ATAK tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 25/12/2017 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	: Prof. Dr. Asım ÖREM
Üye	: Prof. Dr. Sembol YILDIRMAK
Üye	: Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ

İmzası




Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Sortilin1 (*Sort1*) gen ekspresyonuyla ilişkili kodlamayan (non-coding) rs599839 polimorfizminin lipoprotein alt sınıfları ile ilişkisinin koroner kalp hastalarında araştırılması amacıyla yapılan bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda "Doktora Tezi" olarak hazırlandı.

Lisansüstü eğitimim boyunca her türlü maddi ve manevi destek sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren danışmam hocam Sayın Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU' ya şükranlarımı sunarım.

Çalışma esnasında numune toplama aşamasındaki yardımlarından dolayı Kardiyoloji Bölümü anjiyografi çalışanlarına ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayşe GÜMÜŞLER BAŞARAN'ave çalışmalarımın moleküler kısmında benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Hatice SEVİM NALKIRAN'a teşekkür ederim. Çalışmalarım esnasında bana destek olan arkadaşlarım Uzm. Sibel KARAKAŞ'a ve Arş. Gör. Esra PINARBAŞ'a teşekkür ederim. Bu süreçte bana varlıklarıyla güç veren sevgili arkadaşlarım Uzm. Nebahat EJDER'e, Uzm. Erva ESMER'e ve Arş. Gör. Zehra TOPAL SUZAN'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyerek bugünlere gelmemde büyük emek harcayan değerli aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Hazırlanan bu Doktora tezi RTEÜ-BAP birimi tarafından 2014.106.01.01 nolu proje ile desteklenmiştir.

Mehtap ATAK

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Sortilin1 (*Sort1*) Gen Ekspresyonuyla İlişkili Kodlamayan (Non-Coding) Rs599839 Polimorfizminin Lipoprotein Altsınıfları İle İlişkisinin Koroner Kalp Hastalarında Araştırılması” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim.

25. 12. 2017



Mehtap ATAK

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

SORTİLİN1 (*SORT1*) GEN EKSPRESYONU İLE İLİŞKİLİ KODLAMAYAN (NON-CODING) RS599839 POLİMORFİZMİNİN LİPOPROTEİN ALTSINIFLARI İLE İLİŞKİSİNİN KORONER KALP HASTALARINDA ARAŞTIRILMASI

Mehtap ATAĞ

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

Danışmanı: Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU

Bu çalışmada *Sort1* gen ekspresyonunun lipoprotein alt sınıfları ve KAH ile ilişkisini incelendi. Ayrıca *Sort1* ile aynı lokusta yer alan ve genin ekspresyonunu etkileyen rs599839 polimorfizmi çalışıldı. Çalışma grupları; anjiyografi sonucu çeşitli düzeylerde damar tıkanıklığı tespit edilen 162 hasta ve 49 sağlıklı bireylerden oluşturulmuştur. Çalışma gruplarında lipit profilleri (TAG, TK, LDL, HDL), serum apolipoprotein seviyeleri ve CRP değeri otoanalizörde çalışıldı. Lipoprotein alt sınıfları Qantimetrix lipoprint sistem kullanılarak analiz edildi. *Sort1* gen ekspresyonu düzeyi ise Human Sortilin TaqMan Gene Expression Assays kullanılarak qRT-PCR metoduyla ile belirlendi. Genomik DNA tam kandan izole edildi ve rs599839 polimorfizminin belirlenmesi için genotipleme Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) metodu ile çalışıldı. Kontrol grubuna göre KAH grubunda *Sort1* gen ekspresyonu anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,001$). Ancak rs599839 tek nükleotiddeki polimorfizim (SNP) varyant allel grupları arasında gen ekspresyonunda fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Çalışma grubunda lipoprotein alt sınıfları karşılaştırıldığında; kontrol grubuna göre KAH'da aterojenik altfraksiyonlar (SdLDL-K ve SHDL) istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,01$). KAH olan hastalar kontrol grubu ile kıyaslandığında, plazma aterojenik indeks (AIP) ve TG / HDL-K, Apo B / Apo AI, SdLDL / LbLDL ve düşük LDL-K / Apo B oranları bakımından anlamlı derecede yüksek değerlere sahipti ($p < 0,05$). Sonuç olarak; *Sort1* gen ekspresyonunun özellikle hem aterojenik LDL fenotipi ile hem de KAH ile lineer bir ilişki gösterdiği tespit edilmiştir.

2017, 116 sayfa

Anahtar kelimeler: Lipoprotein Alt sınıfları, *Sort1*, KAH, rs599839 polimorfizmi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN A NON-CODING RS599839 VARIANT ASSOCIATED WITH SORTILIN (*SORT1*) GENE REGION AND LIPOPROTEIN SUBFRACTIONS IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE

Mehtap ATAK

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Ph. D. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU

In this study, the relationships between *Sort1* gene expression and lipoprotein subclasses and CAD were investigated. In addition, the rs599839 polymorphism which is located in the same locus with *Sort1* gene and its effects on *Sort1* gene expression was identified. The study population included 162 patients with various levels of vascular occlusion detected by the angiography result and 49 healthy subjects. Lipid profiles (TAG, TK, LDL, HDL), serum apolipoprotein levels and CRP level were measured by autoanalyzer in routine biochemistry laboratory. Lipoprotein subclasses were analyzed by the Quantimetrix lipoprinting system. The *Sort1* gene expression level was determined by qRT-PCR using Human Sortilin TaqMan Gene Expression Assays. Genomic DNA was extracted from whole blood and the genotyping was performed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) to detect rs599839 polymorphism. Expression of the *Sort1* gene was found significantly increased ($p < 0.001$) in the CAD group compared to the control group. However, no significant differences ($p > 0.05$) were identified in *Sort1* gene expression between variant allele groups of rs599839. When the lipoprotein subclasses were evaluated in the study groups; atherogenic subfractions (SdLDL-K and SHDL) were found to be statistically higher in CAD than control group ($p < 0.01$). Patients with CAD had significantly higher levels of plasma atherogenic index (AIP), TG / HDL-C, Apo B / Apo AI, SdLDL / LbLDL and low LDL-C / Apo B levels compared to the controls ($p < 0.05$). In conclusion, it has been found that *Sort1* gene expression particularly has a linear relationship with both the atherogenic LDL phenotype and CAD.

2017, 116 pages

Keywords: Lipoprotein subfractions, *Sort 1*, CAD, rs599839 polymorphism

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. İnsan Genomu.....	4
1.3. Transkripsiyon ve Translasyon.....	7
1.4. İnsan Genomundaki Varyasyonlar.....	9
1.4.1. Çerçeve Kayması (frame-shift).....	11
1.4.2. Anlamsız (nonsense) mutasyon.....	11
1.4.3. Yanlış anlamlı (missense) mutasyon.....	11
1.4.4. Nötr (neutral) mutasyon.....	11
1.4.5. Sessiz (silent) mutasyon.....	12
1.5. Tek Nükleotitdeki Polimorfizm (Single Nükleotid Polymorphism, SNP).....	12
1.6. Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları (Genome-Wide Association Study, GWAS).....	13
1.7. GWAS ve Koroner Arter Hastalığı.....	14
1.7.1. Koroner Arter Hastalığı.....	18
1.7.2. Koroner Arter Hastalığının Fizyopatolojisi.....	19
1.7.3. Ateroskleroz.....	19
1.8. Lipoproteinler ve Metabolizması.....	21
1.8.1. Şilomikron.....	23
1.8.2. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Very Low Density Lipoprotein, VLDL).....	25
1.8.3. Ara Yoğunluklu Lipoprotein (Intermediate Density Lipoprotein, IDL).....	

	ILD).....	26
1.8.4.	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Low Density Lipoprotein, LDL).....	26
1.8.5.	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (High Density Lipoprotein, HDL).....	28
1.8.6.	Lipoprotein (a).....	31
1.9.	Lipoprotein Alt sınıfları.....	32
1.9.1.	HDL Alt sınıfları.....	32
1.9.2.	LDL Alt sınıfları.....	33
1.10.	Sortilin'in Yapısı ve Fonksiyonu.....	35
1.11.	Lipoprotein Metabolizmasında Sortilin'in Rolü.....	39
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	41
2.1.	Materyal.....	41
2.2.	Yöntem.....	41
2.2.1.	Kullanılan Cihazlar.....	41
2.2.2.	Kullanılan Kimyasallar.....	43
2.2.3.	Kullanılan Sarf Malzemeler.....	44
2.2.4.	DeneySEL Çalışmalar.....	45
2.2.4.1.	Otoanalizörde Tayin Edilen Parametreler.....	45
2.2.4.2.	Genomik DNA izolasyonu.....	45
2.2.4.2.1.	Kullanılan çözeltiler.....	45
2.2.4.2.2.	DNA İzolasyonu.....	46
2.2.4.3.	Kodlamayan Rs599839 Bölgesinin Gen Amplifikasyonu.....	47
2.2.4.4.	PZR Ürünlerinin Kontrolü.....	49
2.2.4.5.	Kodlamayan Rs599839 Bölgesindeki SNP'nin Belirlenmesi.....	49
2.2.4.6.	RNA İzolasyonu.....	50
2.2.4.7.	cDNA Sentezi.....	51
2.2.4.8.	qRT-PCR Yöntemiyle <i>Sort1</i> Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	52
2.2.4.9.	LDL ve HDL Alt sınıflarının Analizi.....	53
2.2.4.9.1.	Lipoprint Sistem Bileşenleri.....	54
2.2.4.9.2.	LDL ve HDL Alt sınıf Tayin Kiti Bileşenleri.....	54
2.2.4.9.3.	Deneyin Çalışma Prensipleri.....	54

2.2.4.9.4. LDL Altsınıf Tayini.....	56
2.2.4.9.4.1. Deneýin Yapılışı.....	56
2.2.4.9.4.2. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	56
2.2.4.9.5. HDL Altsınıf Tayini.....	58
2.2.4.9.5.1. Deneýin Yapılışı.....	58
2.2.4.9.5.2. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	58
2.2.5. İstatistik Analiz.....	60
3. BULGULAR.....	61
4. TARTIŞMA.....	82
5. SONUÇLAR.....	95
6. ÖNERİLER.....	98
KAYNAKLAR.....	99
EKLER.....	113
ÖZGEÇMİŞ.....	115

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Nükleotit yapısı.....	5
Şekil 2.	DNA'nın çift sarmal yapısı.....	6
Şekil 3.	Hüresel bilginin aktarılması.....	7
Şekil 4.	Ökaryotlarda tipik protein-kodlanması.....	8
Şekil 5.	Amino asitleri kodlayan mRNA kodonları.....	9
Şekil 6.	İki DNA molekülü arasındaki polimorfizm.....	12
Şekil 7.	Ateroskleroz oluşumu.....	20
Şekil 8.	Lipoprotein yapısı.....	22
Şekil 9.	Lipoprotein sınıfı.....	23
Şekil 10.	Şilomikron metabolizması.....	25
Şekil 11.	VLDL metabolizması.....	26
Şekil 12.	LDL'nin yıkımı.....	28
Şekil 13.	HDL metabolizması.....	31
Şekil 14.	Nöronlarda sortilin-ligand (nörotrofin) modellemesi.....	35
Şekil 15.	LDL reseptör ve VSP10P domain reseptör ailesi.....	36
Şekil 16.	Sortilinin hücre içi trafiği.....	37
Şekil 17.	Sortilinin fonksiyonu.....	38
Şekil 18.	Sortilin-PCSK9 arasındaki ilişki.....	38
Şekil 19.	Lipoprint jel tüpünün görünümü.....	55
Şekil 20.	Lipoprint jel tüpünün ve HDL bantlarının şematik görünümü.....	55
Şekil 21.	Elektroforez sonrası jel tüplerinde bantların görünümü.....	56
Şekil 22.	Beş farklı bireyin lipoprotein alt grup dağılımları.....	57
Şekil 23.	KAH açısından düşük riskli lipoprotein alt sınıf profili.....	58
Şekil 24.	KAH açısından yüksek riskli lipoprotein alt sınıf profili.....	58
Şekil 25.	KAH açısından koruyucu HDL profili.....	59
Şekil 26.	KAH açısından daha az koruyucu HDL profili.....	60
Şekil 27.	KAH ve sağlıklı kontrol gruplarına ait serum lipit profillerinin grafiksel gösterimi.....	63
Şekil 28.	Çalışma gruplarına ait lipoprotein alt sınıflarının grafiksel gösterimi.....	65

Şekil 29. Çalışma gruplarının LDL boyutları ve fenotip özellikleri.....	66
Şekil 30. Çalışma gruplarının aterositenite indeksinin grafiksel gösterimi.....	68
Şekil 31. Çalışma gruplarının CRP seviyelerinin grafiksel gösterimi.....	69
Şekil 32. PZR ürünleri.....	70
Şekil 33. Kontrol ve kesim ürününün jel görüntüsü.....	71
Şekil 34. Rs599839 genotipinin katılımcılarda bulunma sıklığı.....	72
Şekil 35. <i>Sort1</i> mRNA ekspresyon değerlerinin grafiksel gösterimi.....	77
Şekil 36. Farklı çalışma gruplarında rs599839 genotiplerine göre <i>Sort1</i> mRNA ekspresyon değerlerinin grafiksel gösterimi.....	79
Şekil 37. Farklı çalışma gruplarında rs599839 de yer alan risk alleline göre <i>Sort1</i> ekspresyonu.....	80

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	GWAS ile belirlenen Koroner arter hastalığı/Mİ risk lokusları.....	15
Tablo 2.	Ailesel KAH için tanımlanan genler ve mutasyonlar.....	21
Tablo 3.	Lipoprotein Sınıfı	23
Tablo 4.	HDL sınıflandırılması	29
Tablo 5.	Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları	42
Tablo 6.	Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları	43
Tablo 7.	Çalışma sırasında kullanılan sarf malzemeler ve markaları.....	44
Tablo 8.	PZR kullanılan reaktifler ve miktarları	48
Tablo 9.	PZR koşulları	48
Tablo 10.	Kesim ortamı ve koşulları	50
Tablo 11.	cDNA senzinde kullanılan malzemeler ve miktarları	52
Tablo 12.	Real-Time PCR reaksiyon karışımı.....	53
Tablo 13.	qRT- PCR sıcaklık koşulları	53
Tablo 14.	KAH ve sağlıklı kişilere ait demografik bulgular.....	61
Tablo 15.	Çalışma gruplarının rutin lipit parametreleri ve serum apoprotein seviyeleri.....	62
Tablo 16.	Çalışma gruplarının lipoprotein alt sınıf seviyeleri.....	64
Tablo 17.	KAH ve sağlıklı kişilerin LDL boyutlar ve fenotip özellikleri.....	66
Tablo 18.	Çalışma gruplarının lipidik parametreleriyle ilişkili aterosjenite indeksleri	67
Tablo 19.	Rs 599839'un genotip sıklığı.....	72
Tablo 20.	Çalışmada yer alan katılımcıların taşıdıkları allele göre lipit, lipoprotein ve apoprotein profili.....	73
Tablo 21.	KAH grubunun genotiplerine göre lipit, lipoprotein ve apoprotein profilleri.....	73
Tablo 22.	Çalışmada yer alan bütün katılımcıların allele göre lipoprotein alt fraksiyon seviyeleri.....	74
Tablo 23.	KAH grubunun buldukları allele göre lipoprotein alt fraksiyon seviyeleri.....	75
Tablo 24.	Taşıdıkları risk ve koruyucu allele göre aterosjenite indeksleri.....	76
Tablo 25.	<i>Sort1</i> mRNA ekspresyon değerleri	77

Tablo 26.	Farklı çalışma gruplarında rs599839 genotiplerine göre <i>Sort1</i> mRNA ekspresyon değerleri.....	79
Tablo 27.	Farklı çalışma gruplarında rs599839 de yer alan risk alleleline göre <i>Sort1</i> ekspresyonu.....	81



SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
kb	Kilo baz
dk	Dakika
dL	Desilitre
Da	Dalton
K	Kilo
mL	Mililitre
mm	Milimetre
μ L	Mikrolitre
Apo	Apoprotein
AP1	Adaptör Protein 1
AP2	Adaptör Protein 2
CETP	Ester Kolesterol Transfer Proteini
cDNA	Komplementer DNA
CRP	C- Reaktif Protein
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELB	Eritrosit Parçalama Tamponu
EK	Ester Kolesterol
ENCODE	DNA Elementleri Ansiklobedisi
FL	FosfoLipit
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları

HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HDL-C	High Density Lipoprotein Cholesterol
HDL-K	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
HTGL	Hepatik Trigliserit Lipaz
IDL	Orta Yoğunluklu Lipoprotein
KAH	Koroner Arter Hastalığı
KE	Kolesterol Esteri
KDH	Kalp Damar Hastalığı
KKH	Koroner Kalp Hastalığı
Lb	Büyük geniş
LCAT	Lezitin Kolesterol Açıl Transteraz
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LDL-C	Low Density Lipoprotein Cholesterol
LDL-K	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol
LDLR	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü
LHDL	Büyük Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
LPL	Lipoprotein Lipaz
Lp (a)	Lipoprotein a
LRP	Lipoprotein Reseptör Proteini
Mİ	Miyokard İskemisi
mRNA	Mesajcı RNA
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PACS 1	Fosfofürin Asit Küme Sorting Protein 1
PAGE	Poli Akrilamit Jel Elektforezi

PBS	Fosfat-tuz tamponu
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCSK9	Proprotein Konvertaz Subsülin/Keksin Tip 9
PLTP	Fosfolipit Transfer Proteinini
PSRC1	Prolin / serin bakımından zengin sarmal bobin proteini 1
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAP	Reseptör İlişkili Protein
RCT	Ters Kolesterol Transferi
RES	Retikulo Endotelial Sistem
RNA	Ribo Nükleik Asit
SD	Standart Sapma
SdLDL	Küçük yoğun LDL
SHDL	Küçük Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
SK	Serbest Kolesterol
SNP	Tek Nükleotitdeki Polimorfizm
<i>Sort1</i>	Sortilin 1 proteinin kodlayan gen
SR-B1	Çöpçü Reseptör B1
SYA	Serbest Yağ Asidi
ŞM	Şilomikron
TAG (TG)	Triaçil Gliserol
TE-9	Tris EDTA-9 Tamponu
TGN	Trans Golgi Ağı
TK	Toplam Kolesterol
VKİ	Vücut Kitle İndeksi
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Ülkemizde ve dünyada aterosklerotik damar hastalığı ve komplikasyonların özellikle erişkin bireyler için mortalite ve morbidite sebeplerinin en önemlisidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre yılda 9 milyon ölüm sebebinin hipertansiyon ya da hiperkolesterolemiye bağlı semptomlar olduğu tespit edilmiştir (Coutinho vd., 2013). Ülkemizde Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması (TEKHARF) verilerine göre, koroner arter hastalığı (KAH) prevalansının: 45-54 yaş grubunda %6, 55-64 yaş grubunda %17, 65 yaş ve üzerindeki bireylerde ise %28 düzeyinde olduğu görülmektedir. Söz konusu prevalansların 1990 yılındakilere kıyasla 50 yaş üstü kesimde %80 oranında arttığı vurgulanmaktadır. Yine aynı çalışmanın verilerine göre tüm ölümlerin %42'si KAH, % 10'u da serebrovasküler hastalıklara bağlı olduğu belirtilmiştir (Onat, 2009). Bu verilere bakıldığında aterosklerozdan kaynaklanan ölümler tüm ölümlerin yarısından sorumlu gibi gözükmektedir.

Ateroskleroz patogenezi açıklamaya yönelik birçok hipotez (lipit, endotel, zedelenmeye enflamatuar cevap, tutulmaya yanıt ve oksidatif modifikasyon hipotezleri) ileri sürülmektedir (Çobanoğlu, 2011). Arteriyal lümendeki aterom plak yapısının majör bileşenini kolesterol kristalleri oluşturduğu için, şu ana kadar öne çıkan ve ayrıntılı olarak üzerinde durulan hipotez lipit hipotezidir. KAH'lı bireylerin %50'sinden fazlasının LDL-K (Düşük yoğunluklu lipoprotein- kolesterol) ve HDL-K (Yüksek yoğunluklu lipoprotein-kolesterol) düzeyleri kabul edilebilir aralıklarda olması aterogenez fizyolojisini etkileyen multifaktörel unsurların birlikte değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Bu bağlamda, kardiyovasküler olayların patogenezi lipit hipotezi açısından irdelerken, değiştirilebilir faktörlerin (yüksek LDL-K, düşük HDL-K, diyabet, hipertansiyon, sigara, alkol tüketimi, hareketsiz yaşam gibi çevresel faktörler) yanı sıra genetik faktörler gibi değiştirilemeyen faktörlerin de hesaba katılması gerektiği ileri sürülmektedir (Strong vd., 2012a). Dislipidemi (kan lipit düzeyindeki bozulma) bu hastalık riskinin ortaya çıkmasında en yaygın semptom olmasına rağmen, vasküler olaylarla ilgili hastalık (koroner arter hastalığı, miyokard enfarktüsü, inme) risklerinin değerlendirilmesinde plazma kolesterol seviyelerinin

yetersiz kaldığı iddia edilmektedir (Shuldiner ve Pollin, 2010; Uydu vd., 2014). Geleneksel lipit ve lipoprotein düzeylerinin analizinden ziyade onların alt sınıflarının araştırılmasının daha önemli olduğu ve bu parametrelerin kalp-damar hastalığı riskinin ortaya konması açısından daha fazla katkı sağlayabileceği belirtilmektedir (Mohan vd., 2005). Bu bilgilerin ışığında pro- (LDL-K) ve anti-aterojenik (HDL-K) lipoprotein altfraksiyon analizlerinin önemi giderek artmaktadır. LDL alt sınıf dağılımındaki değişikliklerin ateroskleroz ile yakından ilişkili olduğu ve kolesterol içeriği bakımından daha zengin olan Sd-LDL-K (küçük çaplı düşük yoğunluklu lipoprotein-kolesterol) fraksiyonlarının proteoglikanlara daha sıkı bağlandığı ve oksidatif strese hassasiyetinin daha yüksek olduğu için daha aterojenik olduğu, bundan dolayı koroner arter hastalığı (KAH) için daha kritik bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Ito ve Pharm, 2002). Bu alt fraksiyonun artan plazma trigliserid seviyesi, azalan HDL-K ile yüksek hepatik lipaz aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bir çok deneysel modellerde partikül çapı büyük, lipit içeriği ise zengin olan LbLDL-K'e (büyük geniş düşük yoğunluklu lipoprotein-kolesterol) göre SdLDL-K'ün aterosklerozun patofizyolojisinde daha etkili olduğu gösterilmiştir (Diffenderfer vd., 2014). Warnick ve arkadaşlarının KAH, metabolik sendrom ve diyabet gibi çeşitli metabolik hastalık modellerinde gerçekleştirdiği çalışmalarda, plazma SdLDL seviyesinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir (Warnick vd., 2007). Diğer bir lipoprotein altfraksiyonu olan HDL ise, oldukça heterojen bir dağılım göstermekte ve büyük boyutlu HDL alt sınıfları [LHDL (büyük yüksek yoğunluklu lipoprotein), HDL₂] kardiyovasküler kalp hastalık riskini azaltma yönünde etki gösterirken, küçük boyutlu HDL alt sınıflarının [SHDL (küçük yüksek yoğunluklu lipoprotein), HDL₃] ise, hastalık riskini artırma yönünde etki ettiği bulunmuştur (Asztalos vd., 1997; Ramirez and Hu, 2015).

Yeni sekanslama teknolojilerindeki gelişmeler, genetik temelli risk faktörlerinin belirlenmesini hızlandırmıştır ve karmaşık hastalıkların genetik temeli için geniş toplum taramalarına imkan sağlamıştır. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile plazma LDL-K seviyelerini etkileyen yeni Deoksiribo Nükleik asit (DNA) varyantları tanımlanmıştır (Coutinho vd., 2013). İnsan genomunda LDL-K ile güçlü ilişkisi olan bölgenin 1p13 lokusu olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu bölgenin sadece LDL-K ile değil aynı zamanda KAH ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bölgede bulunan SNP varyantlarından homozigot majör allel veya minör allel bulunma durumuna göre

LDL-K seviyesinde önemli değişime yol açtığı bildirilmiştir (Strong vd., 2012). Kromozom 1p13 bölgesinde bulunan ve kodlamayan (non-coding) DNA (rs599839, rs646776, rs629301 ve rs12740374) dizilerindeki SNP varyantları aynı bölgede yer alan sortilin proteinin kodlayan *Sort1* geninin ekspresyonunu önemli ölçüde etkileyebileceği öne sürülmektedir (Linsel-Nitschke vd., 2010a). Yapılan literatür taramasında, 1p13 lokusunda yer alan kodlanmayan bu 4 bölgedeki varyantların minör allel varlığı gen ekspresyonun artırdığı bulunmuştur (Musurunu vd., 2010; Linsel-Nitschke vd., 2010a). Plazma LDL-K düzeyleri ve KAH risk prevelansı açısından diğerlerine göre daha öne çıkan kodlamayan bölgenin rs599839 olduğu gösterilmiş ve KAH açısında risk allelinin (major) “A” olduğu ortaya konmuştur. Yüksek LDL-K seviyesi ile risk alleli “A” arasında bir korelasyon olduğu ve AA aleli taşıyan kişilerde LDL-K, LDL-Trigliserid ve Apo B düzeylerinde değişiklik olduğu tespit edilmiştir (Samani vd., 2010). Rs599839’daki SNP ile LDL partikül yarı çapı arasında da bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur (Linsel-Nitschke vd., 2010b; Kleber vd., 2010). Ayrıca hepatosit hücre kültüründe rs599839’daki SNPlerin *Sort1* ekspresyonunu doğrudan etkilediği gösterilmiştir (Kleber vd., 2010).

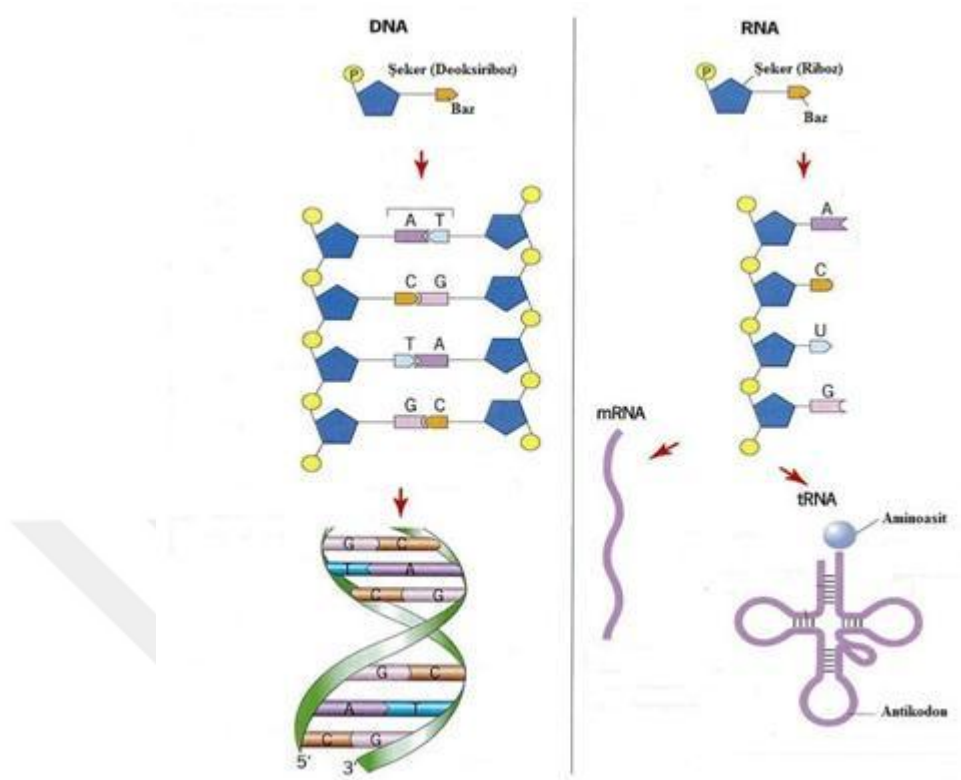
Yapılan literatür taramalarında *Sort1* geni tarafından kodlanan sortilin proteininin hem plazma LDL-K hem de KAH riski üzerinde etkisini araştırmak için yapılan çalışma verilerinin çelişkili olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu proteinin etkisini açıklamak için değişik mekanizmalar önerilmiş ve bu mekanizmaların çoğu hepatosit hücre kültüründen elde edilmiş bulgulara dayanmaktadır. Bu mekanizmalar iki farklı çalışma grubunun aynı yıl içinde (2010) sortilin ile lipoprotein metabolizması arasındaki ilişkiyi aydınlatmaya yöneliktir. Önerilen ilk mekanizmalardan biri, hepatositlerde sortilinin LDL reseptörü gibi davranarak dolaşımdaki LDL-K’ün karaciğer tarafından alınmasına aracılık ettiği, dolayısıyla da bu genin ekspresyonundaki artışın düşük LDL-K seviyesi ve azalan KAH riski ile ilişkili olduğu yönündedir (Musunuru vd., 2010). Buna karşılık diğer mekanizma ise; sortilinin karaciğerde LDL-K öncülü olan VLDL sekresyonunu artırdığı ve böylece hem plazma LDL-K miktarını hem de KAH riskini yükselttiği ile ilişkilidir (Kjolby vd., 2010). Ayrıca sortilin karaciğerde Proprotein Konvertaz Subsilsin/Keksin Tip 9 (PCSK9) salgılanmasını artırdığı ve PCSK9’da LDL reseptörünü bağlayarak lizozomal degradasyonuna sebep olduğu başka bir çalışma grubu tarafından öne sürülen diğer bir mekanizmadır (Schmidt ve Willnow, 2016).

Bunların dışında sortilin'in hepatik lipoprotein metabolizmasındaki fonksiyonundan bağımsız olarak, damar duvarlarında arterosklerotik sürecin hızlandığı bunu da immün hücrelerde pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanmasını uyararak yerine getirdiği ortaya konulmuştur (Patel vd., 2015; Mortensen vd., 2014).

Son yıllarda, KAH riskinin değerlendirilmesinde plazma kolesterol (toplam kolesterol, LDL-K ve HDL-K) düzeylerinin belirlenmesinin yetersiz kaldığı ileri sürülmekte bu nedenle lipoprotein alt sınıf analizinin daha tatmin edici sonuçlar verebileceği yapılan literatür taraması sonucunda tespit edilmiştir. Diğer taraftan *Sort1* gen ekspresyonu ile LDL-K ve KAH riski arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda deney modellerinin hem *invitro* olması hem de bulguların birbiriyle çelişkili olması mevcut çalışmanın planlanmasında etkili olmuştur. Bu çalışmada; lökosit *Sort1* gen ekspresyon düzeyleri ile lipit profili, lipoprotein alt fraksiyonları ve KAH risk öngörüsü arasındaki muhtemel ilişkiyi aynı lokustaki rs599839 polimorfizmi eşliğinde ortaya konması amaçlanmıştır.

1.2. İnsan Genomu

İnsan genomu, insan yaşam için gerekli olan tüm Deoksiribo Nükleik asit (DNA) materyalidir. DNA, genetik bilgi hazinesini içeren bir molekül olarak tüm biyolojik makromoleküller içinde en önemli yeri tutar. Tüm hücrel Ribo Nükleik asit (RNA)'lerin, proteinlerin ve enzimlerin birincil yapılarını şifreleyen DNA, böylece diğer hücrel bileşenlerin de sentezlerini dolaylı yoldan etkilemiş olur (Nelson ve Cox, 2005). Kimyasal anlamda DNA, nükleotit denilen yapı taşlarından oluşan bir zincirdir. Bir nükleotit bir bazdan (adenin, guanin, sitozin veya timin), beş karbonlu bir şekerden (deoksiriboz) ve fosfat grubundan oluşur (Allison, 2014). Nükleotiti oluşturan temel bileşenlerin kimyasal yapıları Şekil 1'de verilmiştir.

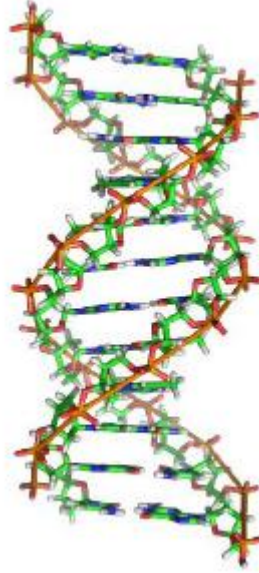


Şekil 1. Nükleotit yapısı (Bolye ve Senior, 2008).

Nükleotitler iki tür nükleobaz içerir: pürinler [Adenin (A), Guanin (G)] ve pirimidinler [Sitozin (C), Timin (T)]. Çift sarmal olarak isimlendirilen DNA yapısının stabilizasyonu için spesifik hidrojen bağları adeninle timin ve sitozinle de guanin arasında oluşur. Chargaff kurallarına göre, tüm DNA örneklerinde adenin bazlarının sayısı timin bazlarının sayısına eşittir, dolayısıyla guanin bazlarının sayısında sitozininkine eşittir. DNA'nın baz kompozisyonu türler arasında değişir fakat tür içindeki bir organizmanın tüm hücrelerinde sabit olduğu belirtilmiştir (Allison, 2014). Pürin ve pirimidin bazları üzerindeki hidrojen alıcı ve verici atomlar belirli pozisyonlara sahiptir. Bundan dolayı adenin sitozinle guaninde timinle eşleşemez. Adenin timin ile iki, guanin de sitozinle üç hidrojen bağı yapar. Bazlar arasında kuvvetli bir etkileşme elde etmek için, bu hidrojen bağlarının uzaklıkları ve düzenlenmeleri en az enerji hali sağlayacak şekildedir. Yani yaklaşık doğrusal hidrojen bağları yapacak tarzda düzenlenmişlerdir (Keha ve Köfrevioğlu, 2007).

Bir nükleotidin 5' hidroksil grubu ile bunu takip eden diğer nükleotidin 3' hidroksil grubu arasında fosfoester bağı oluşur. Birbirini takip eden deoksiriboz şekeri

ve fosfat grupları DNA'nın omurgasını oluşturmaktadır. Bazlar şekerlere bağlıdır ve zincirin uzun eksenine boyunca dikey uzanan DNA zincirlerinin omurgası arasına yerleşmiştir. İki zincirin omurgası birbiri etrafında döndüğü için bir çift sarmal şeklindedir (Boyle ve Senior, 2008) DNA'nın çift sarmal yapısı Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. DNA'nın çift sarmal yapısı (Ghosh ve Bansal, 2003).

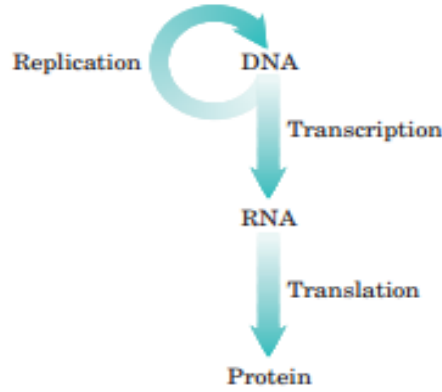
HücreSEL yaşamın moleküler süreçleri genellikle sulu çözeltilerde gerçekleşmektedir ve hücre içi bileşenler suda kolayca çözünebilir oldukça büyük moleküllerdir. Azotlu bazlar apolardır ve bu nedenle hidrofobik oldukları için istisnadır. Polar su molekülü üzerindeki yüklerin asimetrik dağılımı DNA'nın yapısı için önemlidir. Bazlar nükleotit oluşturmak üzere bir şeker ve bir fosfata kovalent olarak bağlandığında suda çözünebilir hale gelirler. Ama DNA'nın çözünürlüğü konformasyonundan dolayı sınırlıdır. Eşleşmiş bazlar sarmal dönüş sebebiyle birbirlerinin üzerine istiflenme eğilimindedir. Çift zincirli DNA'nın bu özelliği 'baz istiflenmesi' olarak bilinir. Bu istiflenme bazlar arasındaki boşluğu ortadan kaldırır ve çift sarmal içerisindeki suyu dışarı çıkarır.

İnsan genomunda yaklaşık 3.2 milyon baz çifti 46 kromozom içinde dağılmış durumdadır. Biyolojik bilgileri bu şekilde taşıdığı için DNA sekansında nükleotidlerin sırası oldukça önemlidir. DNA tarafından taşınan bilgi gen adı verilen blok şeklindeki baz sıralarında tutulur. Bu genler insan yaşamının sürdürülmesi için spesifik proteinleri kodlar ve hücreSEL aktivitelerini düzenler. İnsan genomunda proteinin kodlandığı alan insan genomunun sadece yaklaşık %2'sini oluşturur ve geriye kalan kısım kodlama

yapmayan alan olarak adlandırılır. ENCODE (DNA elementleri ansiklopedisi) projesi kapsamında yapılan çalışmalar da tüm genomun %80'ninin biyolojik, yapısal ya da düzenleyici fonksiyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer çalışmalar genomik dizileri fonksiyonel elemanları ve genomik fonksiyonlar düzenleyen bu elemanlar arasındaki etkileşimleri daha iyi anlamak için hala devam etmektedir (Yip vd., 2012; the ENCODE Project consortium, 2012).

1.3. Transkripsiyon ve Translasyon

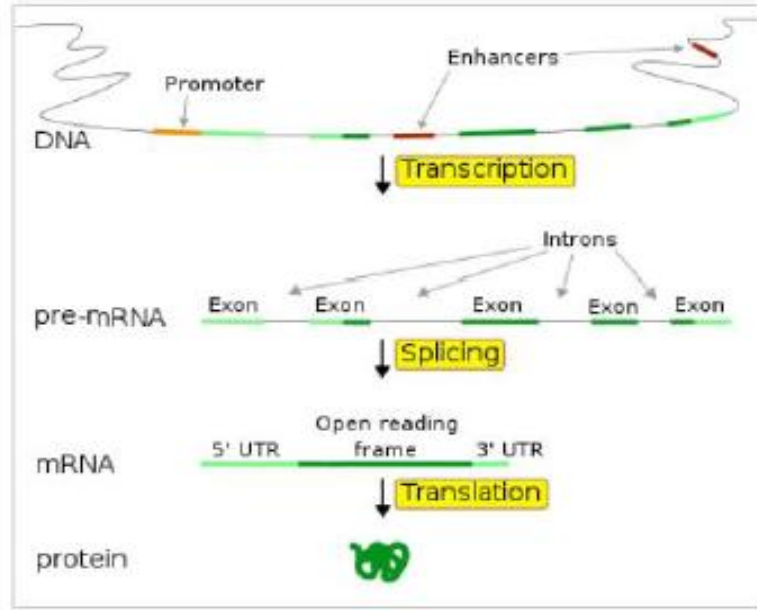
Genetik bilginin hücresel kullanımı üç önemli basamaktan oluşmaktadır. Bunlardan ilki replikasyondur ve atasal DNA benzer nükleotit dizilimli kardeş DNA molekülünü oluşturmak için kopyalanır. İkincisi transkripsiyon, DNA'da kodlanmış genetik mesaj bölümlerinin tam olarak RNA'ya kopyalanma sürecidir. Üçüncüsü translasyon, mRNA'da kodlanmış genetik haberin ribozomlarda özel amino asit dizilimli bir polipeptide dönüştürülmesidir (Nelson ve Cox, 2005). Hücresel bilgi aktarılması Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Hücresel bilginin aktarılması (Nelson ve Cox, 2005).

Transkripsiyon ilk olarak 1977 de Amerikalı biyolog Phillip Sharp ve İngiliz biyolog Richard Roberts tarafından keşfedilmiştir. Gen transkripsiyonun kontrolü, hücrenin fonksiyonu ve canlılığın devamı için büyük öneme sahiptir. Yüksek organizasyonlu organizmalarda farklı hücre tipleri, morfolojik ve fonksiyonel açıdan farklılık gösterir (Üstünkar, 2011).

Transkripsiyon gen ekspresyonunun ilk basamağıdır. Transkripsiyon boyunca RNA, DNA dizisinin kodlanan alanının komplementeri olarak oluşur. İkinci basamak transkripsiyondan sonra RNA’da bir modifikasyonla intronların uzaklaştırılması ve ekzonların birleştirilmesidir. Son basamak ise, transkripsiyonla üretilen mRNA’nın spesifik amino asit zincirine dönüşmesidir (Üstünkar, 2011). Ökaryotlarda tipik protein kodlanması aşamaları Şekil 4’de verilmiştir.



Şekil 4. Ökaryotlarda tipik protein-kodlanması (Üstünkar, 2011).

İnsan hücrelerinde proteinlerin yapımı için 20 farklı amino asit kullanılır. Kodon olarak isimlendirilen her üç nükleotit (örneğin TTT, CAG) genetik kodda bir amino asite dönüşür. Her kodon üç nükleotid bulundurduğu için, 64 kodon kombinasyonu oluşabilir. Bu kombinasyonlar insan hücresindeki 20 standart amino asiti kodlar. 64 kodon olmasına rağmen yalnızca 20 amino asit var. Bazı amino asitler sadece bir kodonla kodlanırken bazı amino asitler birden fazla kodon tarafından kodlanırlar. Örneğin metiyonin sadece AUG kodonu ile kodlanır, oysaki lösin altı farklı kodon tarafından kodlanabilir. AUG kodonu başlangıç kodonudur ve protein sentezinin başlaması için sinyal oluşturur. UAG, UGA ve UAA kodonları ise stop kodonlarıdır ve her hangi bir amino asiti kodlamazlar. Bunun yerine transkripsiyonu durdurmak için sinyal oluştururlar (Nelson ve Cox, 2005). Amino asitleri kodlayan mRNA kodonları Şekil 5’de gösterilmiştir.

UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys
UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys
UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop → Sel
UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop → Pyr	UGG Trp
CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg
CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg
CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg
CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser
AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser
AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg
AUG Met (Başlama)	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg
GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly
GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly
GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly
GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

Şekil 5. Amino asitleri kodlayan mRNA kodonları (Allison, 2014).

DNA dizisinin bazlarının sırası değiştiğinde bir varyasyon meydana gelir. Varyasyon tek bazda veya birden fazla bazda oluşabilir. Bunun biyolojik fonksiyonda hiçbir etkisi olmadığı gibi, bir proteinde önemli fonksiyon bozuklukları meydana gelmesinde yol açabilir. Böylece DNA zincirindeki mutasyon veya kodlanan alandaki tek nükleotitteki polimorfizm (SNP) sentezlenen proteinin şeklinde veya fonksiyonunda önemli bir değişiklik yapma potansiyeline sahiptir.

1.4. İnsan Genomundaki Varyasyonlar

İnsan genomu yaklaşık 3,2 milyon nükleotid içerir ve her birey için genomun %99,9'u benzerdir. Yalnızca %0,1'lik kısım insanlar arasındaki farklılıktan sorumludur. Genomdaki bu varyasyon tekrar edilen kısımlar, mutasyonlar veya SNP'ler ile sonuçlanabilir (Shastri, 2002).

Gen sekansındaki varyasyonlar protein üretimini ve biyolojik süreçteki özelliklerini doğrudan etkileyebilir. Fiziksel özellikler karakteristiktir ve bir kişinin kalp hastalığı, diyabet ve kanser gibi yaygın kronik durumlarının yanı sıra saç rengi, göz

renge, ten rengine, boy ve kilo gibi fiziksel görünüşünü oluşturur. Davranışsal özellikler bir kişinin kişisel ve psikolojik durumuyla karakteristiktir (Shastry, 2002).

Bireylerin genetik varyasyon verilerini elde etmek amacıyla yapılan genotipleme analizleri mikro-array ya da gelişmiş sekans teknolojileri ile ele alınabilir. Düşük maliyetli ve yüksek verimli sonuçlar elde edilmesini sağlayan bu yeni gelişen teknolojiler klinik araştırmalar tasarlamaya ve bireylerdeki binlerce genetik varyasyonu çalışılmasına imkan veren kapsamlı vaka kontrol veri analizlerine izin verir (Shastry, 2002).

Genetik kodun yer aldığı DNA’da kendiliğinden veya çeşitli etkenlere bağlı olarak meydana gelen kalıtsal değişiklik mutasyon olarak tanımlanır (Yıldırım vd., 2010). Nükleotid sırasındaki bu değişiklik bireyin özelliklerini ve fenotipini etkileyebilir. Mutasyonlar kalıtsal olabilir veya X-ışınları, ultraviyole (UV) ışınlar ya da toksik kimyasallar gibi zararlı ajanların DNA’yı dışardan etkilemesiyle meydana gelebilir (Allison, 2014).

Mutasyonlar, DNA’nın nükleotid dizisindeki değişikliklerin veya delesyonların, insersiyonların ya da genomdaki DNA dizilerinin yeniden düzenlenmesi sonucunda oluşurlar. Tek nükleotid çiftinde değişen mutasyonlar nokta mutasyonlar olarak adlandırılır. Transisyon mutasyonları, bir pürin bazının başka bir pürin bazı ile ya da bir pirimidin bazının başka bir pirimidin bazıyla yer değişimi sonucu meydana gelir. Transversiyon mutasyonları, bir pürinin başka bir pirimidinle veya tersinin olduğu baz değişim mutasyonudur. Bu tür yanlış eşleşmeler DNA replikasyonu sırasında kalıcı hale gelir. Nükleotid yer değiştirmelerinin (substitüsyonların) fenotipik bir etki oluşturup oluşturmaması ise kritik nükleotid değişimlerinin genin regülatör bölgesinde, fonksiyonel RNA için kalıp olan zincirde veya protein kodlayan genin kodonlarında olup olmasına bağlıdır. Bir genom üzerinde birçok mutasyon yer alabilir. Bu mutasyonlar protein sekansı üzerindeki etkisine bağlı olarak beş tip olarak sınıflandırılır (Allison, 2014).

1.4.1. Çerçeve Kayması (frame-shift)

DNA'daki bazlar üç ve üçün katları olmayan sayıda insersiyon ya da delesyonlar sonucunda tripletlerin değişmesine yol açan mutasyonlardır. Bu tip mutasyonlar eklenen-eksilen baz sayısına bağlı olarak son derece dramatik sonuçlar doğurabilir. Çerçeve kayması mutasyonu şifrenin tümüyle değişmesine yol açabilir. Ayrıca herhangi bir noktada dur anlamına gelen bir tripletin ortaya çıkmasına ve erken zincir sonlanmasında neden olabilir (Yıldırım vd., 2010).

1.4.2. Anlamsız (nonsense) mutasyon

Gen mutasyonları bazen bir tripletin hiçbir amino asiti şifrelemeyip, dur anlamına gelen UAA, UAG ve UGA stop kodonlarına dönüşmesine neden olabildiği mutasyonlardır. Anlamsız mutasyonun bir gen dizisinin özellikle başlangıç ve orta kısımlarında meydana gelmesi erken zincir sonlanmasına yani proteinin bir kısmının üretilmesine neden olur (Yıldırım vd., 2010).

1.4.3. Yanlış anlamlı (missense) mutasyon

Tripletlerin anlamlarının değişmesine ve proteinin yapısına farklı bir amino asit katılmasına neden olan bir mutasyondur. Yanlış anlamlı mutasyonların proteinler üzerindeki etkileri değişkendir. Şöyle ki; kabul edilebilir, kısmen kabul edilebilir veya kabul edilemez olmak üzere üç farklı nitelikte etki ortaya çıkabilir (Yıldırım vd., 2010).

1.4.4. Nötr (neutral) mutasyon

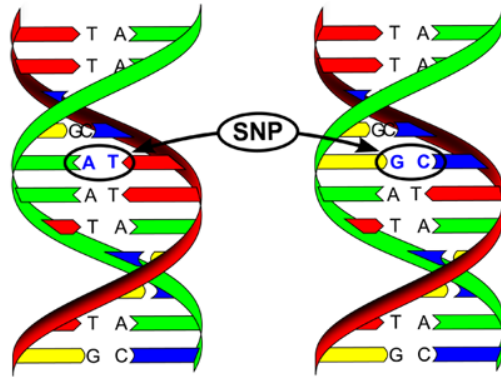
Genin kodlanan alanında meydana gelir. Gen ürünün yapısını ve aktivitesini değiştirmeyen mutasyondur. Nötr mutasyon oluşumu genetik şifrenin dejenere özelliğinden, yani tripletlerin ilk iki bazı son derece spesifik iken üçüncü bazındaki (wobble) farklılığın tolere edilebilmesinden kaynaklanmaktadır (Yıldırım vd., 2010).

1.4.5. Sessiz (silent) mutasyon

Proteinin amino asit dizisinde hiç bir değişime yol açmayan mutasyon çeşididir. Kodlanmayan bölgede ya da kodlanan bölgede meydana gelebilir. Fakat amino asit sekansında hiçbir değişim olmaz (Yıldırım vd., 2010).

1.5. Tek Nükleotitdeki Polimorfizm (Single Nükleotid Polymorphism, SNP)

İnsan genomundaki %0,1'lik bölümün bazı farklılıkları ya da varyasyonları içerdiği düşünölmektedir. Bu varyasyon polimorfizm olarak isimlendirilir. Tek nükleotitdeki polimorfizimler oldukça yaygın bir genetik varyasyondur. Bireyler arasındaki DNA varyasyonunun en basit formu toplumda homolog alanında birinde farklı diğerinde farklı bir nükleotidin yer almasıdır. Bu tip değişiklikler tek nükleotitte polimorfizm olarak adlandırılırlar. Şekil 6'da iki DNA molekülü arasındaki polimorfizm gösterilmiştir. SNP'nin meydana geldiği pozisyondaki nükleotit allel olarak adlandırılır. Populasyonda baskın olarak görölen allele majör allel denir. Daha az sıklıkta var olan allel ise minör allel olarak adlandırılır (Shastry, 2002).



Şekil 6. İki DNA molekülü arasındaki polimorfizm (URL-1, 2017).

Bir varyasyonun bir SNP kabul edilmesi için, populasyonun en az %1'inde olmalıdır. Uluslararası HapMap Projesi, milyonlarca SNP tanımlanmış ve populasyonlarda ortaya çıkma oranlarını karakterize edilmiştir. Tüm insan populasyonunda en az %5 populasyon sıklığı olan en azından 7 milyon ortak SNP ile birlikte 15 milyondan daha fazla SNP olduğu tahmin edilmektedir. Allel sıklığı %1-5 arasında olan ilave 4 milyon SNP vardır. En az değişkenlik cinsiyet kromozomlarında

meydana gelir (X ve Y). Şimdiye kadar nitelenen her üç SNP'den ikisinde sitozinin yerine timin vardır. SNP'ler genomun hem kodlayan hem de kodlamaya bölgelerinde ortaya çıkabilir. Farklı bireylerin DNA'larını kullanarak genomun belli bölgelerinin tek dizi analizi ile SNP haritaları oluşturulur. Bu harita, araştırmacılar tarafından yaygın hastalıklarla ilişkili haplotipler (dizi varyasyonları) için insan genomunu taramakta kullanılır. SNP'ler mutlaka hastalık sebebi olmaz ama birinin belirli hastalıkları geliştirme ihtimalini belirlemeye yardımcı olduğu söylenebilir (Allison, 2014). Halen SNP profiliyle ilişkili hastalıkları tanımlamak için büyük emekler harcanmaya devam edilmektedir ve ayrıntılı genom çalışmaları araştırmacılara hem genetik varyasyonları farklı bir bakış açısıyla daha ayrıntılı tespit etmek için imkan sağlar hem de klinik uygulamalarda yardımcı olur (Döm, 2013).

1.6. Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları (Genome-Wide Association Study, GWAS)

Genetik hastalıklar, bir bireyin genetik materyali yani genomundaki bozukluklar sonucu ortaya çıkan hastalıklardır. Bu hastalıklar içerisinde en yaygın olarak karşılaşılan karmaşık hastalıklarla ilişkili genetik değişimlerin araştırılması, insan genomu üzerindeki güncel araştırma konularından bir tanesidir. Birçok genomda ilişkilendirme araştırmalarıyla karmaşık hastalıklarla ilişkili olabilecek genetik değişimler belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu genetik değişimlerin büyük çoğunluğunu SNP'ler oluşturduğu için bu çalışmalarda öncelikli olarak kullanılmaktadır. En yaygın insan özellikler ve hastalıkları çok genle bir sonraki nesle aktarılır. Bu da birçok genetik lokustaki DNA dizi farklılıklarının fenotipi etkilediği manasına gelir. GWAS ile 150 insan karakteriyle ilişkili 3000'den fazla değişken tanımlanmıştır. Örneğin, GWAS ile en az 180 lokustaki yüzlerce genetik değişkenin yetişkin boyunu etkilediği gösterilmiştir. Kanser ve diyabet, Alzheimer hastalığı, Kron hastalığı, koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve diğer bozuklukların genomlarını araştıran projeler devam etmektedir. Her polimorfizmin belirli bir karakterle olan ilişkisini bulmak için, bu tip meta-analizler, SNP veritabanlarını veya bazen değişkenlerin kopya sayısını tarar. En önemli hedef, hastalığa sebep olan genetik değişkenlikleri daha iyi anlamak ve bireylerin kendine özgün genotipine dayalı kişisel ilaçların geliştirilmesini sağlamaktır (Allison, 2014).

1.7. GWAS ve Koroner Arter Hastalığı

Kardiyovasküler hastalıklar gelişen dünyada ölümün ve hastalıkların başlıca sebebidir. 2010 yılında Amerika Bileşik Devletlerinde her altı ölümden yaklaşık birinin sebebi KAH dır (Dai vd.,2016). Yaşam tarzı ve çevresel faktörler hastalığın gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca bu kompleks hastalığın önemli genetik sebeplerinden dolayı ailesel olabileceği düşünülmektedir. Bir çok genin yoğun bir şekilde araştırılmasıyla birlikte, koroner arter hastalığıyla ilişkili güçlü genetik kanıtların elde edilmesine yönelik çalışmalar öne çıkmaktadır (Samani vd., 2007). Epidemiyolojik çalışmalar ile genetik yatkınlığın, koroner arter hastalığı riski üzerine etkisinin %40-60 arasında olduğu gösterilmiştir (Roberts ve Stewart, 2012). Genetik varyant sıklığı yüksek olan hastalıklarda SNP'ler hastalık riskinin tahmininde ciddi katkı sağladığı görülmüştür (Ozaki ve Tanaka, 2016). Moleküler tekniklerin yetersizliğinden dolayı 2005 yılına kadar bu genetik risk faktörlerinin ortaya çıkarılması oldukça sınırlıydı. DNA'nın markır olarak kullanıldığı 500.000 SNP'ye sahip ilk mikroarrayler geliştirilerek yapılan çalışmadan 160 hastada toplamda 1.319 üzerinde genetik varyantın artan hastalık riskiyle ilişkisi ortaya konulmuştur (Roberts ve Stewart, 2012). GWAS araştırmalarında 1.000.000'dan fazla SNP kullanılmış ve yaygın görülen hastalıklara sahip bireyler ile kontrol grubu bireylerin genetik varyantlarının frekansı karşılaştırıldığında hastalarda daha yüksek frekansta genetik varyantlar belirlenmiştir (Roberts ve Stewart, 2012). Mİ/KAH ile önemli derecede ilişkisi olan yaklaşık 50 gen bölgesi GWAS aracılığıyla tanımlanmıştır (Rader, 2016). Koroner arter hastalığı için risk faktörü olduğu tartışılan 51 lokus Tablo 1'de verilmiştir (Ozaki ve Tanaka, 2016; Roberts ve Stewart, 2012).

Tablo 1. GWAS ile belirlenen Koroner arter hastalığı/Mİ risk lokusları (Roberts ve Stewart, 2012).

Kromozomal Bölge	SNP	Yakınındaki Gen	Risk Alleli Frekansı (alel)
Kolesterolle ilişkili lokus			
1p32.3	Rs11206510	PCSK9	0,82 (T)
1p13.3	Rs599839	SORT1	0,78 (A)
2p21	Rs4299376	ABCG8	0,33 (G)
2p24-p23	Rs515135	APOB	0,83 (G)
6q25.3	Rs3798220	LPA	0,02 (C)
8q24.13	Rs17321515	TRIB1	0,54 (A)
8p22	Rs264	LPL	0,86 (G)
9q34.2	Rs579459	ABO	0,21 (C)
10q11.1	Rs501120	CXCL12	0,87 (T)
11q23.3	Rs964184	ZNF259, APOA5-A4-C3-A1	0,13 (G)
15q26.1	Rs17514846	FURIN-FES	0,44 (A)
19p13.2	Rs1122608	LDLR	0,77 (G)
19p13.32	Rs2075650	APOE-APOC1	0,14 (G)
Hipertansiyonla ilişkili lokus			
4q31.1-q31.2	Rs273909	GUCY1A3	0,81 (G)
10q24.32	Rs12413409	CYP17A1,CNNM2, NT5C2	0,89 (G)
12q24.12	Rs3184504	SH2B3	0,44 (T)
Bilinen risk faktörleri ile ilişkisi olmayan lokus			
1p32.2	Rs17114036	PPAP2B	0,91 (A)

Tablo 1 (Devam). GWAS ile belirlenen Koroner arter hastalığı/Mİ risk lokusları

Kromozomal Bölge	SNP	Yakınındaki Gen	Risk Alleli Frekansı (alel)
1q21	Rs4845625	IL6R	0,47 (T)
1q41	Rs17465637	MIA3	0,74 (C)
2p11.2	Rs1561198	VAMP5-VAMP8-GGCX	0,45 (A)
2q22.3	Rs2252641	ZEB2-ACO74093.1	0,46 (G)
2q33.1	Rs6725887	WDR12	0,15 (C)
3q22.3	Rs2306374	MRAS	0,18 (C)
3p24.3	Rs4618210	PLCL2	0,42 (G)
4q31.22	Rs1878406	EDNRA	0,15 (T)
5p15.3	Rs11748327	IRX1	0,76 (C)
5q31.1	Rs2706399	IL5	0,52 (G)
6p22.1	Rs6929846	BTN2A1	0,06 (T)
6p21	Rs10947789	KCNK5	0,76 (T)
6p24.1	Rs6903956	C6orf105	0,07 (A)
6p24.1	Rs12526453	PHACTR1	0,67 (C)
6p21.31	Rs17609940	ANKS1A	0,75 (G)
6q23.2	Rs12190287	TCF21	0,62 (C)
6p26	Rs4252120	PLG	0,73 (T)
7q22.3	Rs10953541	BCAP29	0,75 (C)
7q32.2	Rs11556924	ZC3HC1	0,62 (C)
7p21.1	Rs2023938	HDAC9	0,10 (G)
9p21.3	Rs4977574	CDKN2A, CDKN2B, ANRIL	0,46 (G)

Tablo 1 (Devam). GWAS ile belirlenen Koroner arter hastalığı/Mİ risk lokusları

Kromozomal Bölge	SNP	Yakınındaki Gen	Risk Alleli Frekansı (alel)
10p11.23	Rs2505083	KIAA1462	0,42 (C)
10q11.21	Rs1746048	CXCL12	0,87 (C)
10q23.31	Rs1412444	LIPA	0,34 (T)
11q22.3	Rs974819	PDGF	0,29 (T)
12q24	Rs671	BRAP-ALDH2	0,28 (A)
13q12	Rs9319428	FLT1	0,32 (A)
13q34	Rs4773144	COL4A1, COL4A2	0,44 (G)
14q32.2	Rs2895811	HHIPL1	0,43 (C)
15q25.1	Rs3825807	ADAMTS7	0,57 (A)
17p13.3	Rs216172	SMG6, SRR	0,37 (C)
17p11.2	Rs12936587	RASD1, SMCR3, PEMT	0,56 (G)
17q21.32	Rs46522	UBE2Z, GIP, ATP5G1, SNF8	0,53 (T)
19p13.3	Rs3803945	AP3D1-DOT1L-SF3A2	0,19 (C)
21q22.11	Rs9982601	MRPS6	0,15 (T)

İlk KAH risk varyantı olarak 9p21 2007 yılında tespit edilmiştir ve 2 yıl içerisinde KAH riskini artıran 11'den fazla yeni genetik varyant tanımlanmıştır (Samani vd., 2007). KAH'nin genetik risk faktörlerinin genel özelliği şu şekilde sıralanmaktadır:

- 13' ü lipitler, 3' ü hipertansiyon ve geriye kalan 35' i ise bağımsız risk faktörleri ile ilişkilidir.
- KAH için her bir risk faktöründeki artış %6-92 arasında değişmekte, risk faktöründeki ortalama artış %18 dir.
- Toplumda bu varyantların sıklığı %2-91 arasındadır ve ortalama frekans %47 dir.

- Çoğu genetik risk varyantları geç başlangıçlı KAH göre erken başlangıçlı olan kişilerde daha yüksek risk göstermektedir.
- %10'un üstünde KAH için yaklaşık 1,88 oranında, daha düşük yüzdelerde ise yaklaşık oran 0,55' tir.
- KAH için genetik risk faktörlerinin çoğu DNA dizisinde kodlamayan alanda yer almaktadır.

Bu alandaki en büyük zorluk ise yeni lokusların her birinde yer alan etkili geni tanımlamak ve bu nedensel genlerin KAH'ın gelişiminde, ilerlemesinde ve klinik sonuçlarında hangi molekülleri etkilediği ve patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılmasıdır (Rader vd., 2016). Böylece risk varyantlarının tespiti, tedavi için yeni hedefler sağlayabilecektir. Risk varyantların biyobelirteçler ile karşılaştırıldığında KAH için daha zayıf bir belirteç olmasına rağmen cinsiyet, yaş, diyet veya ilaç kullanımı tarafından etkilenmemesi ve kişinin yaşamı boyunca değişmeden kalması ona üstünlük sağlamaktadır (Roberts ve Stewart, 2012).

1.7.1. Koroner Arter Hastalığı

Koroner arter hastalığı, arterlerin duvarlarında oluşan plaklardan dolayı ortaya çıkan bir hastalıktır. Koroner kalp hastalığı çok faktörlü olduğundan bireyin bütün risk faktörlerinin birlikte değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Tedavi planlanırken de amaç, bütün risk faktörlerini birlikte düzenlemeye çalışmak olmalıdır. Epidemiyolojik çalışmalar, dislipidemi, hipertansiyon, sigara, tip 2 diyabet, obezite ve inflamasyonların koroner risk faktörleri olduğunu ortaya koymuştur (Ozaki ve Tanaka, 2016). Koroner kalp hastalığının günümüzde kabul edilen önemli risk faktörleri şunlardır: Yaş (erkeklerde ≥ 45 , kadınlarda ≥ 55 veya erken menopoz), aile öyküsü (birinci derece akrabalarından erkekte 55, kadında 65 yaşından önce koroner arter hastalığının bulunması), sigara kullanımı, durağan yaşam, hipertansiyon (kan basıncı $\geq 140/90$ mmHg veya antihipertansif tedavi görüyor olmak), hiperkolesterolemi (toplam kolesterol ≥ 200 mg/dL, LDL-K ≥ 130 mg/dL), düşük HDL-K (< 40 mg/dL), diabetes mellitus, obezite ve stres (Onat vd., 2006).

1.7.2. Koroner Arter Hastalığının Fizyopatolojisi

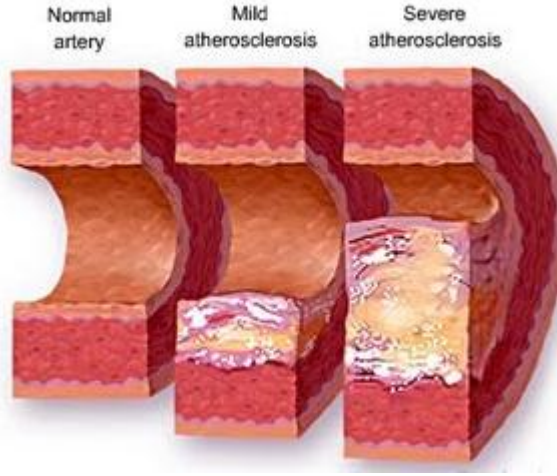
Koroner kan akımı, yeterli kardiyak fonksiyonları idame etmek için gerekli olan oksijeni ve metabolik substratları sunamayacak düzeye gelince miyokard iskemisi (Mİ) oluşur. Mİ; akımı kısıtlayan koroner arter darlığında miyokard iş yükünün dolayısıyla oksijen ihtiyacının artması veya epikardial veya mikrovasküler koroner arterlerde konstrüksiyon ya da akut trombozu ile koroner kan akımı azalmasına bağlı olabilir. Bu mekanizmalar bazı hastalarda birlikte etki edebileceği gibi aynı hastada farklı iskemik ataklarda rol alabilir (Keleş, 2014).

Aterosklerotik plağın neden olduğu koroner arter darlığı, tüm kardiyak iskemik sendromlarda en sık rastlanan anjiyografik bulgudur. Ateroskleroz damar duvarında lipit parçacıklarının birikmesiyle oluşan ve damar lümenini daraltarak normal kan akımını engelleyen patolojik bir süreçtir (Keleş, 2014).

1.7.3. Ateroskleroz

Kalp kasını besleyen koroner arterlerde oluşan lezyonlar veya plaklar nedeniyle, arterdeki kan akışının bozulmasıyla ateroskleroz başlamaktadır (Onat vd., 2006). Ateroskleroz damar duvarının kalınlaşması ve esnekliğinin kaybolması ile karakterize arteriyel hastalıktır. Aterosklerotik süreç, primer olarak arter duvarının intiması ile sınırlıdır. Lezyonlar arter duvarı endoteli ve düz kasların hasarına karşı aşırı inflamatuvar fibroproliferatif yanıtla ortaya çıkar. Çok sayıda büyüme faktörü, sitokinler ve damar düzenleyici moleküller bu olaya katkıda bulunur. Ateroskleroz, spesifik hücresel ve moleküler cevapların yer aldığı inflamatuvar bir süreçtir (Onat vd., 2006).

Ateroskleroz gelişiminin ilk basamağı endotel disfonksiyonudur. Endotelde fonksiyonel bir hasar meydana gelmekte ve gelişen inflamasyonun her aşamasında aterosklerotik lezyonun bir tipi ortaya çıkmakta ve en sonunda da komplike aterosklerotik plak oluşmaktadır. Ateroskleroz, erken lezyon (yağlı çizgilenmeler), ilerlemiş lezyon (fibroz plak) ve komplike olmuş lezyon (plak ülserasyonu, kalsifikasyon ve hemoriji) aşamalarına sahiptir (Hergenç, 2012). Arterde aterosklerozun aşamaları Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Ateroskleroz oluşumu (URL-2, 2017).

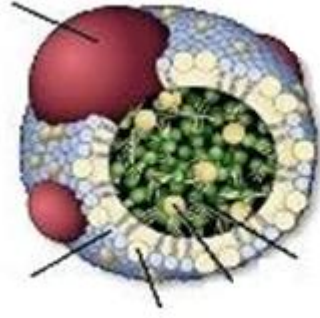
Aterosklerotik KAH'nın gelişmesinde serum lipit seviyeleri özellikle de artmış LDL-K ve azalmış HDL-K önemli bir risk faktörüdür. Yapılan araştırmalarda lipit metabolizmasında yer alan genlerde mutasyonlar tespit edilmiş ve dislipidemi, aterosklerotik KAH ve Mİ için sebep genleri olarak kabul edilmiştir. KAH ve Mİ ile ilişkili mutasyonların yer aldığı genler Tablo 2'de gösterilmiştir (Dia vd., 2016).

Tablo 2. Ailesel KAH için tanımlanan genler ve mutasyonlar (Dia vd., 2016).

Kategoriler	Genler	Kromozom	Mutasyon
Monogenik KAH genleri	ST6GALNAC5	1p31.1	G295A
	CYP27A1	2p35	G674A
	MEF2A	15q26.3	21-bp delin ekon11
	LRP6	12p13.2	G1079A, T1298C
Yüksek LDL neden olan gen mutasyonları	LDL reseptörü	19p13.2	>1000 Varyant
	PCSK9	1p32.3	9 fonksiyon kazancı mutasyonu
	ApoB-100	2p24.1	C10580G, C10800T, rs515135
	LDLRAP1, ARH	1p36.11	ARH1:432ins A, ARH2: G65A
Düşük HDL'ye sebep olan mutasyonlar	ABCA1	9q31.1	Birçok ABCA1 loF allelleri, rs2230806 > A
	LCAT	16q22.1	>80 mutasyon, Rs5923 ↑ KAH
Yüksek TG sebep olan mutasyonlar	Apo C-II	19q13.2	ApoCII _{St.Michael} , p.Gln70Pro

1.8. Lipoproteinler ve Metabolizması

Organizma için gerekli olan kolesterol ve trigliserid gibi lipitler suda çözünmedikleri için kanda proteinle birlikte taşınırlar. Bu lipit ve proteinin bir arada yer aldığı yapıya lipoprotein adı verilir. Lipoprotein merkezinde kolesterol ester ve trigliseridler gibi hidrofobik molekülleri, dışa bakan yüzeylerinde ise kolesterol ve fosfolipid gibi daha hidrofilik lipitler ve apolipoproteinler yer almaktadır (Hergenç, 2012). Bir lipoproteinin genel görünümü Şekil 8'de verilmiştir.



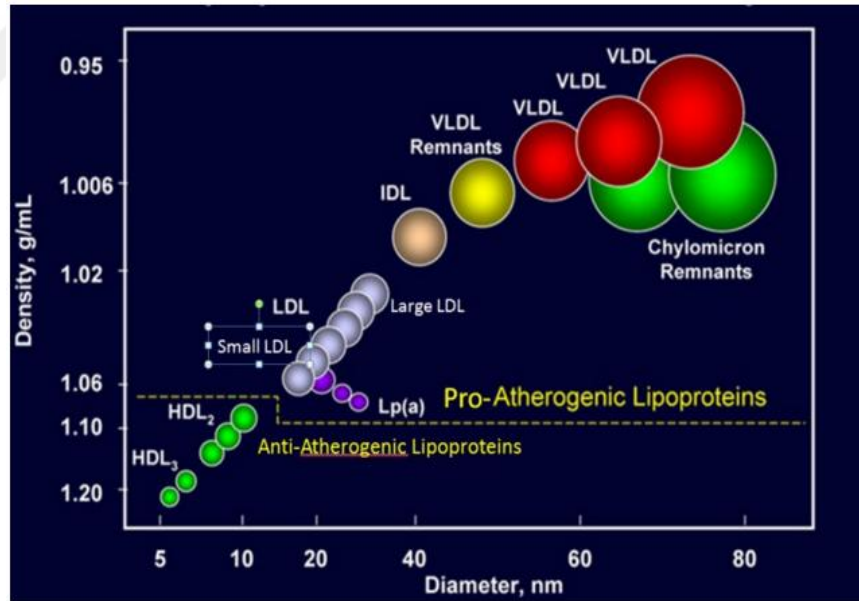
Şekil 8. Lipoprotein yapısı (URL-3, 2017).

Lipoproteinler diyetle alınan yağların ince bağırsak tarafından emilip karaciğere gelmesinde, karaciğerde sentezlenen lipitlerin de periferal dokulara taşınmasında ve periferal dokulardan karaciğer ile ince bağırsağa (ters kolesterol taşınımı) lipit taşınmasında kilit rol oynamaktadır. Günümüzde, lipit ve lipoprotein'in doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçası olarak konak savunmasında önemli bir rol oynadığı da kabul edilmektedir. Örneğin; lipoproteinler gram negatif bakterileri, lipoteikoik asit ve virüsleri bağlar ve etkisiz hale getirir. Böylece lipoproteinlerin ikincil görevi inversiyon ve enfeksiyon alanlarından bakteriyel endotoksin gibi hidrofobik ve amfipatik yabancı toksik bileşikleride taşımaktır (Feingold ve Grunfeld, 2012).

Plazma lipoproteinler büyüklüklerine, lipit içeriğine ve apolipoproteinlerine göre altı sınıflara ayrılmaktadır. Bunlar Tablo 3'de ve Şekil 9'da verilmiştir.

Tablo 3. Lipoprotein Sınıfı (Feingold ve Grunfeld, 2012).

Lipoprotein	Yoğunluk(g/mL)	Çap(nm)	Başlıca Lipitleri	Başlıca proteinleri
Şikomikron	<0,930	75-120	Trigliserit	A (I,II,IV,V), B-48, C (I,II) ve E
VLDL	0,940-1,006	30-90	Trigliserit	B-100, C (I,II,III) ve E
IDL	1,006-1,019	25-30	Trigliserit ve kolesterol esteri	B-100, C ve E
LDL	1,019-1,063	18-25	Kolesterol esteri	B-100
HDL	1,063-1,210	7-20	Fosfolipit ve kolesterol	A (I,II), D C (I,II,III) ve E
Lp(a)	1,055-1,085	30	Kolesterol	B-100, Apo(a)



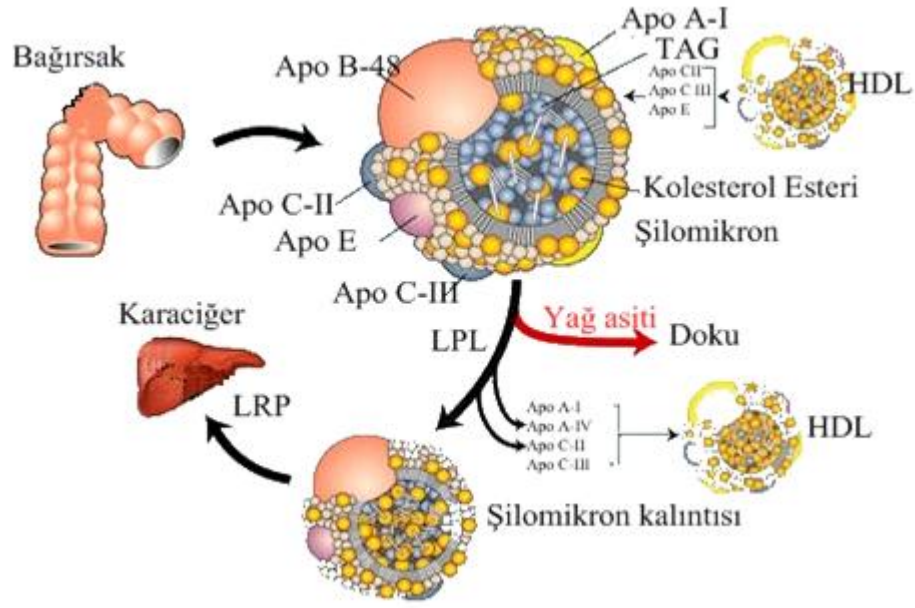
Şekil 9. Lipoprotein sınıfı (Feingold ve Grunfeld, 2012).

1.8.1. Şilomikron

Lipitlerin sindirimi sonrası bağırsak mukoza hücrelerinin, endoplazmik retikulum lümeninde yağ asitlerinin aktifleşmesi ve tekrar esterleşme reaksiyonları ile triaçilgliseroller (TG) ve kolesterol esterleri (EK) sentezlenir. Bu nötral lipitler çok

hidrofobik oldukları için, protein, fosfolipit (FL) ve serbest kolesterolün (SK) oluşturduğu ince bir polar lipit tabakası içinde toplanmış bir yapı oluşturur. Bu yapıya şikomikron (ŞM) adı verilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2007). ŞM'lar diyetle alınan lipitleri periferel dokulara ve karaciğere taşır. Yapısında %98-99 lipit bulunur ve bu lipitlerin %85- 92'si trigliserit (TG) ve monogliserid, %1-3'ü serbest ve ester kolesterol, %6-12'si fosfolipit ve yağ asiti kalıntılarında oluşur. ŞM yapısında %1- 2 oranında apoprotein bulunur (apolipoproteinler A I,II,IV,V, B-48, C I,II ve E). ŞM yapısında yer alan Apo B-48 bu lipoprotein sınıfına özgüdür ve ŞM sentezinde, bir araya toplanmasında ve sekresyonunda kritik rol oynar. Açlık durumunda serum Apo B-48 seviyesi oldukça düşüktür ve birçok kişide tespit dahi edilemez. Apo B mRNA'sı apobec-1 enzimi tarafından düzenlenir ve apobec-1 enzimi apobec 1 geni tarafından kodlanır. Bu gen ince bağırsakta yüksek düzeyde eksprese olurken karaciğerde eksprese olmamaktadır. Yani ince bağırsakta üretilen Apo B'ler öncelikli olarak Apo B-48'e tekabül etmektedir (Julve vd., 2016).

ŞM'lar bağırsakta enterositlerden sentezlenip salınmakta ve ilk olarak lenf dolaşımına verilmektedir. ŞM içerisindeki TG'ler dolaşımında kapiller endotele bağlı lipoprotein lipazın Apo C-II tarafından aktive edilmesiyle hidrolizlenir. TG'lerini kaybeden ve yapısındaki Apo A'ları ve Apo C'leri HDL'ye transfer eden ŞM'den geriye kalan kısma şilomikron kalıntısı denir. Şilomikron kalıntısı kolesterolce zengindir ve karaciğerde bulunan Apo E reseptörü ve LRP'ye bağlanarak endositozla içeriye alınır. Yapısındaki kolesterolü karaciğere bıraktıktan sonra lizozomlarda parçalanır (Keleş, 2014). ŞM metabolizması Şekil 10'da verilmiştir.

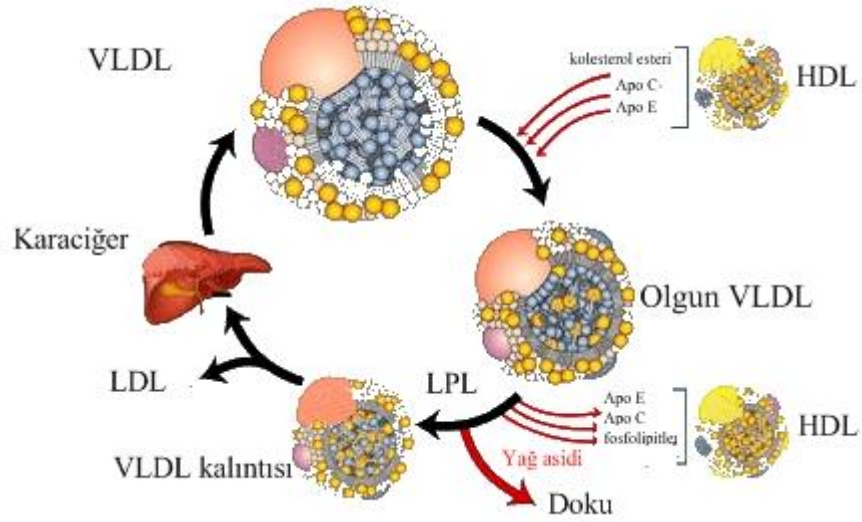


Şekil 10. Şilomikron metabolizması (URL-4, 2017).

1.8.2. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Very Low Density Lipoprotein, VLDL)

Diyetle vücudun ihtiyacından fazla yağ asidi alınmışsa, bunlar karaciğerde trigliseride çevrilir ve spesifik apoproteinlerle çok düşük yoğunluklu lipoproteinlere paketlenir. Diyetteki karbohidrat fazlası da karaciğerde trigliseride çevrilir ve VLDL olarak ihtiyaç durumunda periferik dokulara gönderilir (Nelson ve Cox,2005). VLDL karaciğer tarafından üretilir ve açlık durumunda endojen kaynaklı lipidlerin periferik dokulara taşınmasından sorumludur. Ayrıca bazı VLDL'ler ince bağırsakta sentezlenir ve safra kökenli yağ asitleri ile endojen kolesterolün yeniden emiliminde rol oynar. Yapı ve içerik bakımından şilomikronlara benzese de TG içeriği daha az, kolesterol, fosfolipit ve protein içeriği daha fazladır. VLDL yapısında apolipoprotein olarak Apo B-100, Apo C'leri ve Apo E bulundurur. Apo B-100 ana proteindir ve bütün VLDL partikülleri bir Apo B-100 içerir (Hergenç, 2012; Keleş, 201; Feingold ve Grunfeld, 2015).

VLDL'de tıpkı ŞM'ler gibi kapillerde bulunan lipoprotein lipaz enzimini Apo C-II tarafından aktifleştirerek bu lipoprotein yapısında yer alan TG'lerin hidrolizlenmesini sağlar. VLDL metabolizması Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11. VLDL metabolizması (URL-5, 2017).

Lipoprotein lipaz ile reaksiyon sonucu TG'lerin yaklaşık %90'ni kaybeden VLDL yapısında yer alan Apo C'leri tekrar HDL'ye geri verir. Geriye kalan kolesterolce zengin VLDL kalıntısı (IDL) ya karaciğer tarafından reseptörler aracılığı ile alınarak lizozomda parçalanır veya LDL'ye dönüşerek ekstrahepatik dokularda ya da karaciğerde metabolize edilir.

1.8.3. Ara Yoğunluklu Lipoprotein (Intermedia Density Lipoprotein, ILD)

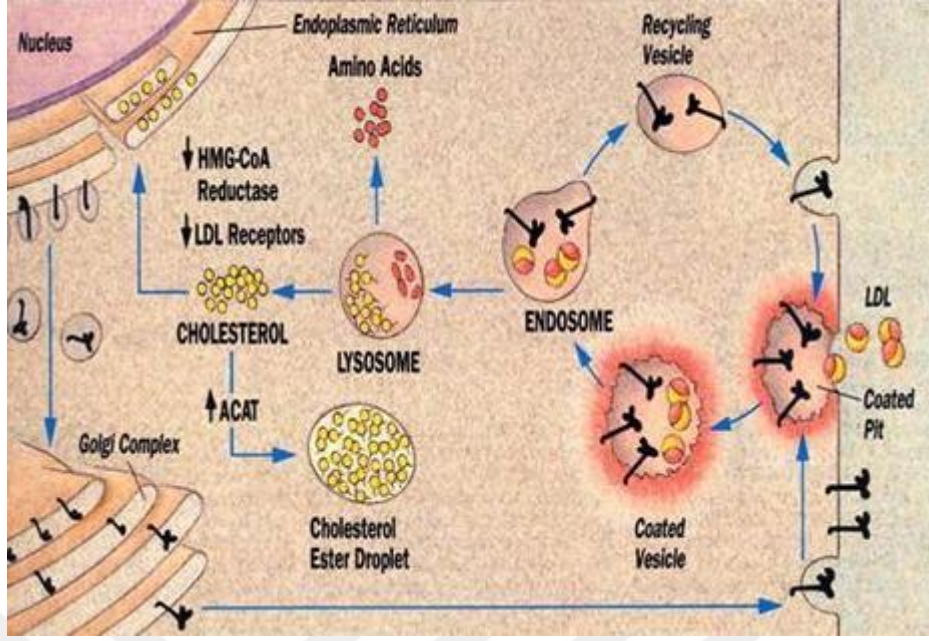
TG'lerin lipoprotein lipaz enzimi ile VLDL'den uzaklaştırılması ve VLDL yapısında yer alan FL'leri ve Apo C'leri HDL'ye vermesi sonucunda kolesterolce zengin IDL partikülü oluşur. Bu partikülün yapısında apoprotein olarak Apo B-100 ve Apo E yer alır. IDL pro-aterojenik bir lipoproteindir ve dolaşımdan ya LDL reseptörünce temizlenir ya da hepatik lipoprotein lipaz enzimi ile yapısında yer alan TG'lerin parçalanmasıyla LDL'ye dönüşür (Feingold ve Grunfeld, 2015).

1.8.4. Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Low Density Lipoprotein, LDL)

VLDL ve IDL'nin yapısındaki TG'leri kaybetmeleri sonucu oluşan kolesterolce çok zengin lipoproteindir. İnsanlarda kan kolesterolünün %60-75'i LDL ile ilişkilidir ve LDL plazmadaki ana kolesterol taşıyıcısıdır. Ana apoproteini Apo B-100'dür ve her bir LDL partikülü bir Apo B-100 molekülü içerir. Eser miktarda da Apo E taşır. LDL

partikülünün merkezinde EK ve TG dış kısmında ise FL, SK ve Apo B-100 bulunmaktadır. Ağırlığının yaklaşık dörte biri protein, dörte üçü ise lipittir. LDL yapısında yer alan lipitlerin %60'ı SK ve EK, %25'i FL ve %10'u da TG dir. LDL'nin β -elektroforetik mobilitesi bulunmaktadır (Hergenç, 2012; Keleş,2014; Feingold ve Grunfeld, 2015). LDL'nin %75'i karaciğer hücreleri tarafından kullanılırken, %25'i de ekstrahepatik dokularca kullanılır. LDL'nin dokular tarafından alınmasının 2/3'si LDL reseptörü aracılığıyla gerçekleşir (Hergenç, 2012).

Plazmadaki lipoproteinlerin temizlenme hızı Apo B, Apo E ve reseptör sayısına bağlıdır. VLDL'nin plazmadan temizlenmesi birkaç saat iken LDL'nin temizlenmesi birkaç günü bulmaktadır. Apo E lipoproteinlerin reseptöre bağlanmasına aracılık eder. Her lipoproteinin birden fazla reseptörle veya bir reseptör üzerinde birçok bölge ile reaksiyona girebilen çok sayıda Apo E molekülü bulundurmaktadır. Bu durum bağlanma yetisini artırmakta ve dolayısıyla bu partiküllerin, plazmadan daha büyük bir hızla temizlenmesini sağlamaktadır. LDL'nin temizlenmesi işlemine Apo B-100 aracılık eder. Apo B-100'ün LDL reseptörüne bağlanma eğilimi Apo E'ninkine göre çok daha düşüktür ve dolayısıyla LDL çok daha yavaş temizlenir. Apo E içeren lipoproteinlerin LDL reseptörüne karşı afinitesi, Apo B-100 içeren LDL'ye göre 20 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir (Mahley, 1993). LDL reseptöre bağlandıktan sonra reseptörle birlikte endositoz ile hücre içine alınır. Taşıdığı SK ve EK bağlandığı hücreye verir. Aynı zamanda yapısında yer alan apoproteinler hücrenin lizozomal enzimleri tarafından sindirilir. Fakat reseptör tekrar kullanılmak üzere plazma zarına geçer (Keleş, 2014). LDL'nin hücre içine alınımın Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 12. LDL'nin yıkımı (URL-6, 2017).

Plazmadaki LDL düzeylerini etkileyen faktörler; VLDL biyosentezinin artması ve LDL katabolizmasının azalmasıdır. Bu katabolizma düşüşünün sebepleri ise, hepatik ve ekstrahepatik dokularda ortaya çıkan LDL reseptörü sayısının azalması, Apo B-100 ile normal reaksiyona giremeyen kusurlu LDL reseptörleri ve LDL reseptörü ile normal reaksiyona giremeyen kusurlu Apo B-100 dür (Mahley, 1993).

1.8.5. Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (High Density Lipoprotein, HDL)

Plazmadaki en küçük lipoprotein olan HDL'nin %50'si lipit %50'si proteinden oluşmaktadır. Yapısında bulundurduğu lipitlerin %25'i FL, %15'i EK, %5'i SK ve %5'i TG dir. HDL'nin başlıca Apoproteini ise % 65 ile Apo A-I'dir ve %25 Apo A-II, geriye kalan %10 da Apo A-IV, Apo C'ler ve Apo E'dir. Apo E HDL₁'de bulunur ve diğer HDL sınıflarında Apo E yer almamaktadır. Buna rağmen plazmadaki Apo E'nin yaklaşık %50'si HDL'de bulunmaktadır. HDL bir Apo E ve Apo C deposu olarak fonksiyon gösterir. HDL'nin α -elektroretik mobilitesi bulunmaktadır (Mahley, 1993). HDL partikülü oldukça heterojendir ve yoğunluğuna, büyüklüğüne, yüküne yada apoprotein bileşimine göre sınıflandırılır (Feingold ve Grunfeld, 2015). Bu sınıflandırma da Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. HDL sınıflandırılması (Feingold ve Grunfeld, 2015).

Sınıflandırma Metodu	HDL Tipleri
Yoğunluk gradient ultrasantifüjleme	HDL ₂ , HDL ₃ ve oldukça yüksek yoğunluklu HDL
Nükleer manyetik rezonans (NMR)	Büyük, orta ve küçük
Gradient jel elektroforezi	HDL 2a, 2b, 3a, 3b ve 3c
2-boyutlu jel elektrofozi	Per- β 1, per- β 2, α 1, α 2, α 3 ve α 4
Apoprotein içeriği	A-I içeren, A-I:AIİ içeren ve A-I:E içeren

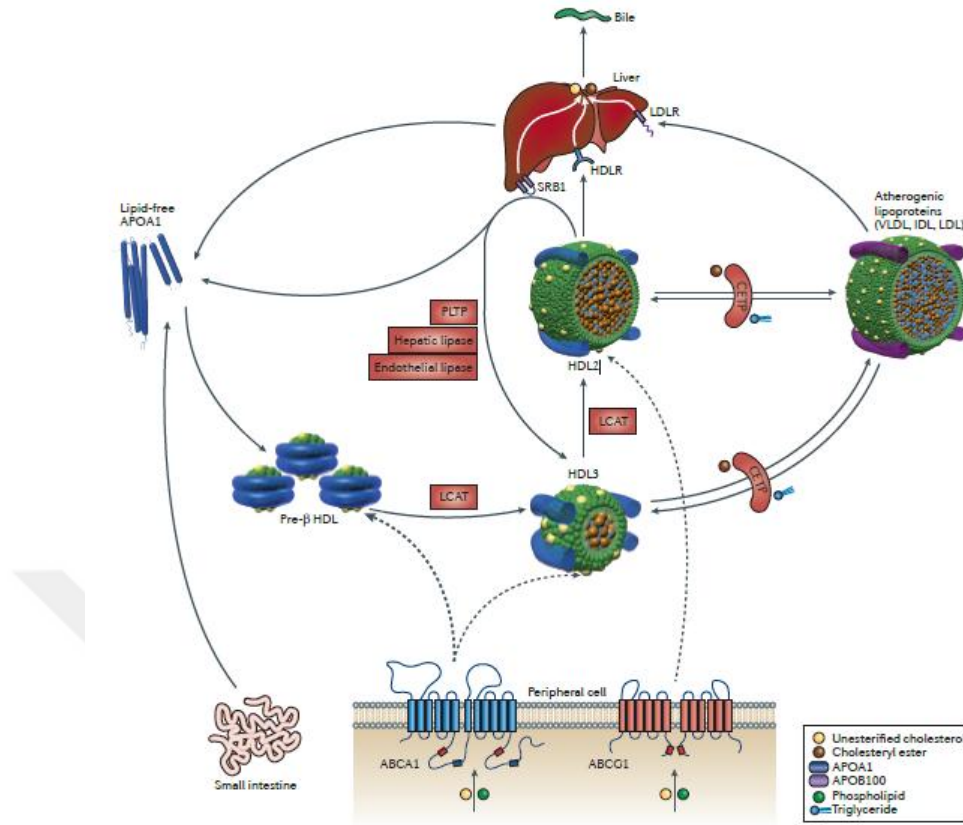
HDL başlıca üç kaynaktan sentezlenmektedir; karaciğer, olgunlaşmamış HDL adı verilen bir Apo A-I fosfolipit diski salgılar, bağırsaklar da küçük bir Apo A-I, HDL partikülünü doğrudan sentezler ve HDL ŞM'lerden ve VLDL'den gelen yüzey maddesinde türetilir. ŞM ve VLDL lipoprotein lipazlarca TG'ler hidroliz olur ve bu şekilde oluşan FL ve SK yüzey maddesi Apo A-I ile birlikte küçük HDL diskini şekillendirir (Mahley,1993).

Öncelikle karaciğer ve bağırsaktan sentezlenen Apo A-I salgılanarak ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcısı 1 (ABCA1) yardımıyla kolesterol ve fosfolipitlerle bir araya gelir. Böylece HDL diskleri hücreden ve diğer lipoproteinlerden lipit (özellikle SK) toplarlar. Yeni oluşan HDL partikülü ŞM ve VLDL'den kolesterol ve fosfolipit alabilir. Fosfolipit transfer proteini (PLTP) fosfolipitlerin lipoproteinler arasında hareket etmesine imkan sağlar. Kolesterol hücrelerden HDL'ye SK halinde geçer ve HDL partikülünün yüzeyinde yer alır. Bu SK'ün HDL yüzeyinden HDL merkezine alınabilmesi için esterleşmesi gerekir. Bu durumda SK bakımından zengin partikül Lesitin: Kolesterol açıltransferaz enzimi (LCAT) aracılığıyla kolesterol esterleştirilir. Böylece HDL'nin nötral çekirdeği oluşmaya başlar ve daha fazla kolesterol esterleştirildikçe disk HDL, HDL₃ adı verilen küresel küçük bir partikül haline dönüşür. HDL₃ SK mükemmel alıcısıdır, alınan ve esterleştirilen SK miktarı arttıkça partikülün boyutu büyür ve HDL₂ meydana gelir (Mahley, 1993; Feingold ve Grunfeld, 2015).

Bazı hayvanlarda ve daha az ölçüde insanlarda HDL₂, EK yönünden daha da zenginleşebilir ve aynı zamanda Apo E edinebilir. Apo E içeren HDL₁ aslında HDL'nin küçük bir ögesini oluştursa da metabolik olarak aktif bir alt sınıfıdır. Apo E'nin varlığı

Apo E içeren HDL'yi LDL reseptörü bulunan hücelere yönlendirir. Bu durum LDL reseptörü ile reaksiyona girmeyen tipik HDL ile zıtlık oluşturur. HDL₁ insanlarda belirli genetik bozukluklar da (apolipoproteinemi ve CETP eksikliği) başlıca HDL sınıfını oluşturur (Mahley,1993).

HDL yapısındaki kolesterol esterleri, dolaşımında Apo B içeren lipoproteinler ile TG'lere karşılık değiş tokuş yapar. Bu olaya kolesterol ester transfer proteini (CETP) aracılık eder. Böylece HDL TG'ce zengin hale gelir ve daha sonra lipazlarla metabolize olur. HDL yapısında bulunan hem TG'ler hem de FL'ler hepatik lipaz ile hidrolizlenir ve küçük HDL partikülü oluşur. Hepatik lipaz aktivitesi, insülin direnci durumlarında artar ve bununla ilişkili olarak HDL kolesterol seviyesi azalır. Endotel hücelerde bulunan fosfolipaz da HDL yapısındaki fosfolipitleri hidrolizler. HDL kolesterolünü ilk olarak karaciğere çöpçü reseptör B1 (SR-B1) aracılığıyla verir ve doluşuma tekrar geri döner. HDL yapısındaki Apo A-I kolesterolden bağımsız bir şekilde metabolize olur. Apo A-I'in büyük çoğunluğu böbrekler tarafından, kalan kısım ise karaciğerde katabolize edilir. Apo E bulunduran HDL ise LDL reseptörü aracılığı ile karaciğere alınır ve parçalanır (Feingold ve Grunfeld, 2015). Ayrıca HDL henüz tanımlanamamış bir HDL reseptörü (HDLR) aracılığıylada karaciğere alınarak katabolize edilir (Kingwell vd.,2014). HDL metabolizması Şekil 13'de gösterilmiştir.



Şekil 13. HDL metabolizması (Kingwell vd., 2014).

1.8.6. Lipoprotein (a)

Lipoprotein (a), lipit ve protein yapısı bakımından LDL'ye çok benzeyen bir lipoproteindir. Yapısında karbohidrat bakımından zengin oldukça hidrofilik bir protein olan Apo (a)'yı bulundurur. Apo B-100 tek bir disülfid köprüsü ile Apo (a)'ya bağlanmıştır. Tıpkı Apo B-100 gibi apo (a)'da hepatositler tarafından sentezlenir. Lp (a) elektroforezde pre- β mobilitesi gösterir, ultrasantrifügasyonda ise LDL ve HDL arasındaki bölgesindedir. Lp (a)'nın dolaşımdan temizlenme mekanizması belirli değildir, LDL'nin dolaşımdan temizlenmesini artıran ve LDL seviyesini düşüren tedavilerin Lp (a) seviyesini etkilemediği için LDL reseptörlerin bu sürece dahil olmadığı düşünülmektedir. Lp (a)'nın temizlenmesinde böbreklerin önemli bir rol oynadığı tahmin edilmektedir. Çünkü böbrek hastalığı Lp (a) temizlenmesindeki geçikme ve Lp (a) seviyesindeki artışla ilişkilidir. Lp (a)'nın bilinen fizyolojik bir fonksiyonu tespit edilmemiştir. Fakat plazmada Lp (a) miktarının 40 mg/dL'den fazla olması koroner arter hastalık riskini 2-3 kat arttırdığı, LDL ile birlikte yüksek olması da

KAH riskini beş kat yükselttiği belirtilmiştir (Hergenç, 2012; Keleş,2014; Feingold ve Grunfeld, 2015).

1.9. Lipoprotein Alt sınıfları

KAH'ın değerlendirilmesinde serum kolesterol seviyelerinin belirlenmesinin hatta bu kolesterolün aterojenik (LDL kolesterol) ve antiaterojenik (HDL kolesterol) şeklindeki fraksiyonlarının tayin edilmesinin bile zaman zaman yetersiz kaldığı belirtilmektedir. Plazma lipoprotein düzeyinin tayininden daha ziyade onun alt sınıflarının tespit edilmesinin, kalp-damar hastalık riskinin ortaya konması açısından daha açıklayıcı olacağı birçok çalışmada rapor edilmiştir (Krauss, 2005). Bu sebeple lipoproteinlerin alt sınıflarının tayininin son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Lipoprotein alt sınıflarının tayininde çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Kullanılan temel metotlar ultrasantifüj, jel elektroforezi, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kromatografidir (Kontush ve Chapman, 2012).

1.9.1. HDL Alt sınıfları

Plazmada bulunan HDL partikülünün fizikokimyasal özellikleri, intravasküler metabolizması ve biyolojik aktivitesi oldukça heterojendir. Birden fazla HDL alt sınıfı amniyotik sıvının yanı sıra periferik lenf, foliküler sıvı ve beyin omurilik sıvısında benzer miktarlarda bulunmaktadır. HDL alt sınıflarının şekilleri, apoprotein içerikleri, yoğunluk ve büyüklükleri ve elektroforetik hareketleri farklıdır. Bunlar agaroz jel elektroforezi, immüno afinite kromatografisi, NMR, poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve yoğunluk gradient ultrasantifügasyonu ile tespit edilmektedir. Agaroz jel elektroforezi kullanılarak HDL, diskoidal (pre- β HDL) ve küresel (α -HDL) olarak ikiye ayrılabilir. İmmüno afinite kromatografisine göre de A-I HDL ve A-I/A-II HDL olarak ayrılır. NMR ile HDL toplam 5 alt fraksiyona ayrılır, bunlar çap büyüklüğüne göre PAGE ve yoğunluk gradient ultrasantifügasyonuna göre de beş sınıfa ayrılır: ya HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b} ve HDL_{3c} ya da α -1, α -2, α -3, α -4 ve pre- β -1'dir (Kontush ve Chapman, 2012). İki boyutlu elektroforezle ise HDL büyüklük ve yüküne göre 10 alt sınıfa ayrılır ve baskın olarak küresel α -HDL'dir. HDL ilk olarak agaroz jel ile pre- β HDL ve pre- α HDL olmak üzere iki alt sınıfa ayrılır. PAGE ile de 5

altsınıf olarak tanımlanmıştır: çok küçük diskoidal pre- β -1 HDL (Apo A-I ve FL içerir), çok küçük diskoidal α -4 HDL (Apo A-I, FL ve SK), küçük küresel α -3 HDL ile orta küresel α -2 HDL (Apo A-I, Apo A-II, FL, SK, EK ve TG) ve büyük küresel α -1 HDL (Apo A-I, FL, SK, EK ve TG içerir). İki boyutlu elektroforez ile ise HDL, çok küçük HDL, büyük HDL, çok büyük HDL ve küçük HDL şeklinde sınıflandırılır. Çok küçük HDL pre- α partiküldür ve Apo A-II içermez, büyük HDL pre- β -2 ve çok büyük HDL pre- β -1 dir ve Apo A-I olmaksızın Apo E bulundurlar ve küçük HDL ise yapısında Apo A-I bulundurmaksızın Apo A-IV'e sahiptir. Daha detaylı karakterizasyonda pre- β HDL partiküllerinin Apo A-I ve FL bulundurmalarını yanı sıra SK, LCAT, CETP ve Apo D içerir fakat Apo E ve Apo A-II bulundurmazlar (Kontush ve Chapman, 2012).

Yapılan araştırmalar HDL altsınıflarının ateroskleroz üzerine farklı etkiye sahip olduğunu göstermektedir. HDL'nin anti-aterojenik özelliğinin plazmadaki toplam seviyesinden daha ziyade HDL altsınıflarının fonksiyonel ve biyolojik özelliklerinden kaynaklandığı kabul edilmektedir. Karaciğer ve bağırsak tarafından sentezlenen pre- β 1-HDL formu, çoğunlukla fosfolipit ve çok az kolesterolle birlikte ApoA1 bulundurur. Bundan dolayı pre- β 1- HDL, hücrelerden kolesterol taşınımında öncülük ederler, HDL'lerin dolaşımı esnasında CETP, PLTP, LCAT, LPL ve HTGL gibi çeşitli enzimler ve transfer proteinleri ile disk şeklinden, küresel hale dönüşmektedir (Yang vd., 2005). Yapılan çalışmalar büyük boyutlu HDL altsınıflarının kardiyovasküler kalp hastalıkları riskini azalttığı, küçük boyutlu olanların ise hastalık riskini arttırdığını ileri sürülmektedir (Xu ve Fu, 2003).

1.9.2. LDL Altsınıfları

LDL altsınıfları farklı büyüklüğe ve yoğunluğa, farklı fizikokimyasal bileşime, metabolik davranışa ve aterosjenik potansiyele sahip heterojen partiküllerdir. LDL altsınıfları yoğunluk gradientli ultrasantifüleme, NMR, gradient jel elektroforezi ve poliakrilamid jel elektroforezi gibi değişik analitiksel metotlarla birbirinden ayrılır. LDL; gradient jel elektroforezi ile partikül çapına göre, ultrasantrifüj ile de yoğunluğuna göre gruplandırılır. Rizzo ve Berneis'e göre LDL en az dört altsınıfa ayrılmaktadır. Büyük LDL-1, orta LDL-2, küçük LDL-3 ve çok küçük LDL-4'tür. Partikül çap piki ya da ultrasantrifügasyon yoğunluğuna dayalı ölçümlerde LDL iki alt grupba ayrılmıştır;

büyük ya da orta boyutlu LDL (LDL tipA) ve daha küçük boyutlu LDL (LDL tipB). Plazmada LDL fenotipi belirlenmesi, genellikle gradyan jel elektroforeziyle tespit edilir ve LDL partikül çapı 258-263 Å ya da daha fazla ise “Tip A”, bunun altında ise “Tip B” olarak değerlendirilir (Rizzo ve Berneis, 2006a). Fenotip veya tip A çoğunlukla büyük hafif LDL (LbLDL) partikülü ve fenotip veya tip B ise genellikle küçük yoğunluklu LDL (SdLDL) partikülü olarak tanımlanır (Diffenderfer ve Schaefer, 2014).

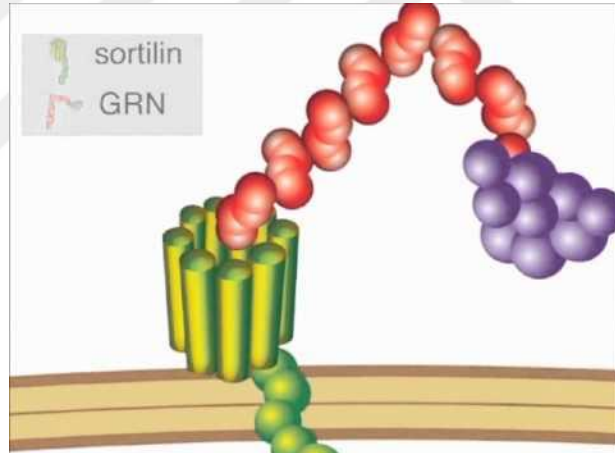
Yoğunluklarına göre ise Stalenhoef vd (2000) dansite gradient ultrasantrifüj yöntemi ile LDL’yi 5 alt gruba ayırmışlardır: LDL-1 (1,030-1,033 g/mL), LDL-2 (1,033-1,040 g/mL), LDL-3 (1,040-1,045 g/mL), LDL-4 (1,045-1,049 g/mL) ve LDL-5 (1,049-1,054 g/mL). Başka bir çalışmada ise LDL 3 alt sınıfına ayrılmıştır: LDL-1 (büyük boyutlu LDL, 1,025-1,034g/mL), LDL-2 (orta yoğunluklu LDL, 1,034-1,044 g/mL) ve LDL-3 (daha küçük yoğunluklu LDL, 1,044-1,060 g/mL) (Hirayama ve Miida, 2012).

LDL’nin büyüklüğü arttıkça çekirdek TG miktarı artarken, büyüklüğü azaldıkça Apo B’nin miktarı azalır ve EK’ce zenginleşir. SdLDL’nin artması plazmada TG ve HDL-K’de düşüş ile ilişkilidir. İnsulin direnç sendromu ve viseral adipositenin varlığına artmış SdLDL eşlik etmektedir. Ayrıca SdLDL oksidasyona daha yatkın olduğundan reseptöre ilgisi daha düşüktür (Hergenç, 2012).

SdLDL partikülü ile koroner arter hastalığı arasında ilişkinin varlığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Krauss, 2010). SdLDL’nin koroner arter hastalığı riskini yaklaşık 3 kat arttırdığı ileri sürülmüştür (Rizzo ve Berneis, 2006b). SdLDL’nin aterosklerolit oluşunun birçok sebebi vardır. LbLDL’ye göre arterial dokuya daha kolay alınır ve daha küçük partikül olduğu için subendotelyal alana daha fazla geçer. Ayrıca daha küçük LDL partikülleri reseptör aracılı endositozu azalttığı, proteoglikanlar ile bağlanmayı artırdığı ve sialik asit içeriğini düşürdüğü tespit edilmiştir. Ayrıca LDL boyutu azaldıkça oksidatif duyarlılığın arttığı ve antioksidan konsantrasyonunun azaldığı gösterilmiştir (Rizzo ve Berneis, 2007; Uydu vd., 2014).

1.10. Sortilinin Yapısı ve Fonksiyonu

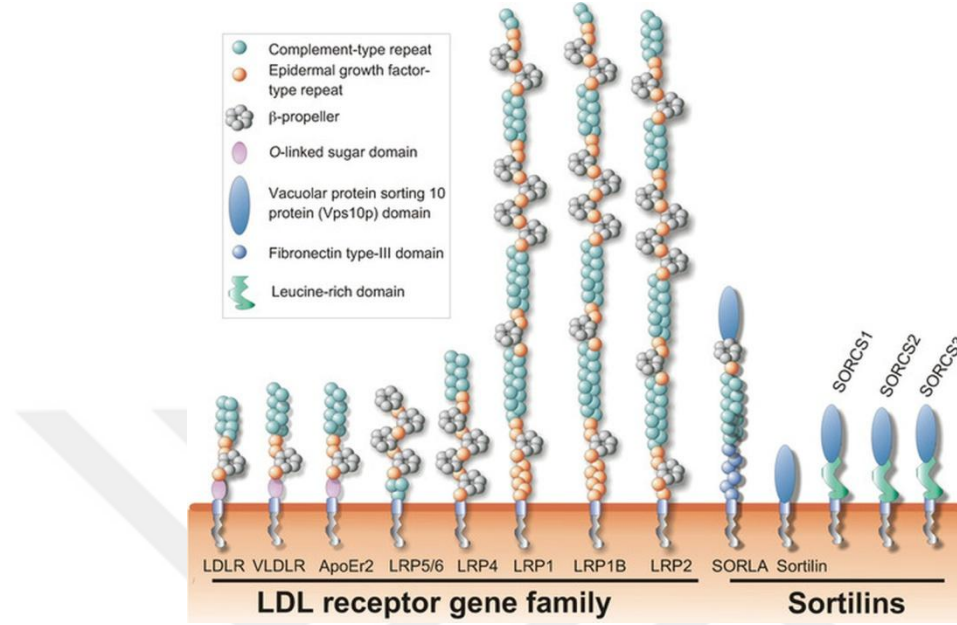
Sortilin proteini 1p13 lokusunda yer alan *Sort1* geni tarafından kodlanan 95 kDa ağırlığındaki tip1 transmembran proteinidir. Bir çok hücrede eksprese olan sortilin en çok merkezi ve periferel sinir sisteminde, hepatositlerde ve beyaz kan hücrelerinde (T hücreleri ve makrofajlar) sentezlenmektedir (Carlo vd., 2014). Sortilin, hücrenin genellikle trans-golgi ağı (TGN) bölgesinde ve erken endozomda lokalize olmuştur ve TGN’de bol miktarda bulunan bir multi ligandlı reseptördür (Mortensen vd., 2015). Vakuolar protein sorting 10 protein (VSP10P) domain reseptör ailesinin, beş üyesinden biri olan sortilinin reseptör bölgesi olan amino terminal ucu 700 amino asitten oluşur. 10 kanatlı β pervaneli yapıdan meydana gelmekte ve bu bölge ligand bağlama bölgesi olarak fonksiyon göstermektedir (Willnow vd., 2011; Carlo vd., 2014). Sortilinin ligand bağlama bölgesi Şekil 14’de verilmiştir.



Şekil 14. Nöronlarda sortilin-ligand (nörotrofin) modellemesi (URL-7, 2017).

Reseptör ilişkili protein olarak da tanımlanan sortilin 5 kısımdan oluşur: Furince zengin N-terminal propeptidi, ekstraselüler VSP10P ligand bağlama domeini, tek transmembran domeini, katyon bağımsız mannoz-6-fosfat reseptörüyle sıkı benzerliği olan bir C terminal sitoplazmik kuyruk ve dilösin bağlı sorting reseptörü ile tirozin bağlı sorting reseptörü olmak üzere iki endozomal sorting motifidir (Strong vd., 2012). VSP10P domain reseptör ailesi Şekil 15’de gösterilmiştir. Sortilin hücrelerde inaktif prekürsor olarak sentezlenir. Bu inaktif prekürsor 40 amino asitlik propeptitten dolayı ligand bağlayamaz. Bu propeptid trans-golgede konvertazla parçalanarak kaldırılır. Böylece reseptör ligand bağlayabilecek aktif forma dönüşür. Bu düzenleyici

adım,hücrede ilk biyosentetik yolda ligantlar ile erken etkileşimi engelleyerek verimsiz ligant bağlanmasını önlemiş olur (Dube vd., 2011; Kjolby vd., 2010).

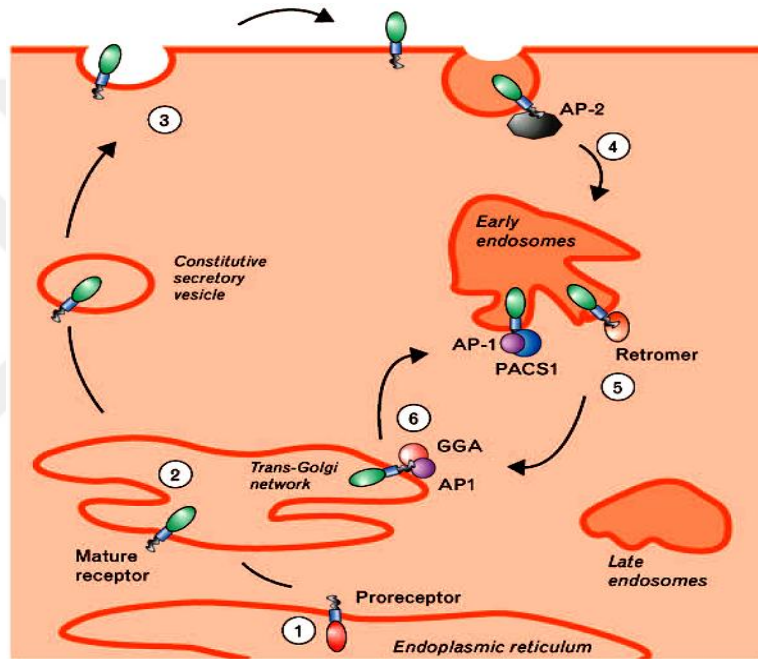


Şekil 15. LDL reseptör ve VSP10P domain reseptör ailesi (URL-8, 2017).

Sortilin çok ligantlı bir protein olarak lipoprotein lipaz (LPL), Apo A-V, nörotensin, Apo B-100, PCSK9 ve reseptör ilişkili protein (RAP) gibi proteinleri bağlayarak hücre içi protein trafiğine aracılık eder. Ayrıca lizozomal proteinlerden bazılarının sfingolipit aktivatör proteinleri, asit sfingomiyalinaz, katepsin H ve katepsin D golgiden lizozoma yolculuğunda sağlar (Mortensen vd., 2015; Christoffersen ve Tybjaerg-Hansen, 2015; Coutinho vd., 2013). Sortilin proteinlerin hücre içi sortinginde görevlidir yani bağladığı ligandların golgiden lizozoma geçişini sağlar. Ayrıca plazma membranının kltrin kaplı çukurlarda da bulunur ve progranulin, Apo A-V ve LPL için internalizasyon reseptörü olarak fonksiyon gösterir (Strong vd., 2012).

Hücre içinde yeni sentezlenen öncü sortilin reseptörleri, endoplazmik retikulumdan furin proteazıyla aktiveleştirildikleri trans-golgi ağına taşınırlar. Normalde golgiden hücre yüzeyine taşınırlar ya da ileri düzenleme sonucu adaptör protein-1 (AP-1) ve GGA adaptörleriyle erken endozomlara yönlendirilirler. Sortilin ligandını bağladıktan sonra kltrinle kaplı endozom halinde hücre içine alınır. Sortilinin sitoplazmik kuyruğunda (N-terminal) standart bir YXXL (Y:tirozin, X:herhangi bir a.a.ve L:lösin) motifi bulunur ve bu motif sayesinde ligandını bağlar. Daha sonra

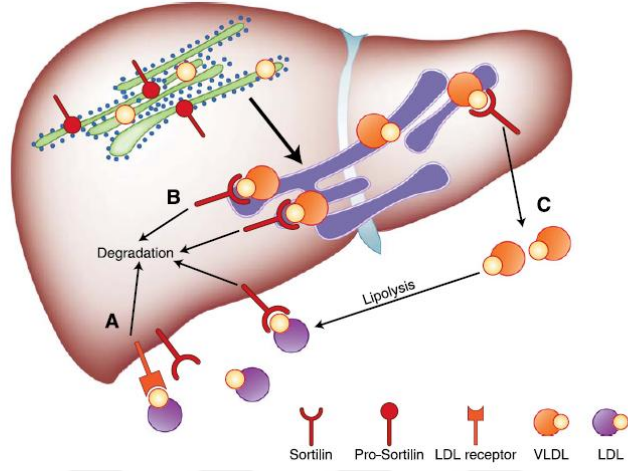
endositozla hücre içine alınmadan önce adaptör protein (AP-2) kompleks yapısına katılır. Hücre içine alınan reseptör kompleks geç endozoma uğramaksızın erken endozom üzerinden trans-golgi ağına getirilirler. Bunun için kompleksden AP-2 ayrılarak yapıya retromer, AP-1 ve PACS1 proteinleri dâhil olur. Böylece sortilin trans-golgi bölgesinden tekrar plazma zarına yönelerek döngü tamamlanır. Yine proreseptör halinde ER’de sentezlenerek golgiye geçen sortilin olgunlaştırıldıktan sonra AP-1 ve GGA adaptör proteinlerle birlikte erken endozoma dahil olur (Willnow vd., 2011). Sortilinin hücre içi trafiği Şekil 16’da gösterilmiştir.



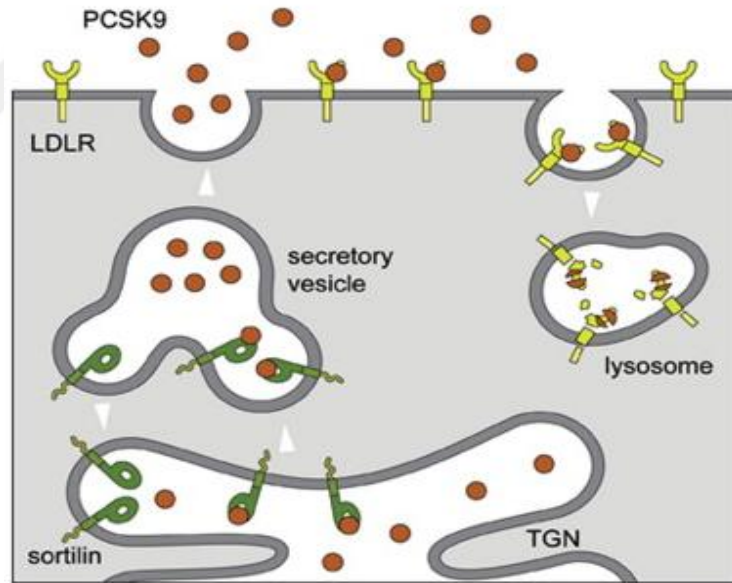
Şekil 16. Sortilinin hücre içi trafiği (Willnow vd., 2011).

Sortilinin plazma lipoprotein seviyesi üzerine olan etkisi birçok araştırma grubu tarafından incelenmiştir. Hepatik sortilinin, Apo B’yi bağlayarak bir hücre yüzeyi LDL reseptörü olarak görev yaptığını ortaya konulmuştur (Linsel-Nitschke vd., 2010b). Böylece LDL reseptöründen bağımsız bir mekanizma ile LDL’nin hücre içine alınmasını ve lizozomal degradasyonunu sağlar (Christoffersen vd., 2015). Diğer taraftan sortilinin VLDL sekresyonu üzerine etkileri tartışmalıdır. Bazı çalışmalar VLDL sekresyonunu baskıladığını (Musurunu vd., 2010) bazıları ise artırdığını böylece artmış plazma LDL-K’üne neden olduğunu ileri sürmektedir (Kjolby vd., 2010). Hepatik sortilin ile ilgili öne sürülen bu fonksiyonlar Şekil 17’de gösterilmiştir. Ayrıca sortilinin hepatositlerden PCSK9 salgılanmasını kolaylaştırarak LDL-R degradasyonuna

yol açtığı ve böylece dolaşımdan LDL-K temizlenmesini engellediği düşünülmektedir. Sortilin'in PCSK9 üzerindeki etkisi Şekil 18'de gösterilmiştir (Gustafsen vd., 2014).



Şekil 17. Sortilin'in fonksiyonu (Strong and Rader, 2012).



Şekil 18. Sortilin-PCSK9 arasındaki ilişki (Gustafsen vd., 2014).

1.11. Lipoprotein Metabolizmasında Sortilinin Rolü

Başlangıçta, lipit metabolizmasının anlaşılmasında Mendelian bozukluğu ile ilgili çalışmalar akla gelmektedir. Ancak toplumun plazma lipit düzeylerindeki farklılığın Mendelian bozukluğundaki nadir mutasyonlarla açıklanması oldukça güçtür. Lipitmetabolizmasıyla ilgili GWAS çalışmaları toplumdaki lipit çeşitliliğine sebep olan yaygın varyantların tanımlanması için bağımsız bir araç olarak geliştirilmiştir. Mendelian, lipit bozukluğuna sebep olduğu bilinen yaygın genetik varyantlar GWAS ile tanımlanmaktadır. LDL-K için bu genler *LDLR*, *PCSK9*, *APOB*, *LDLRAP* ve *IBCG5/8* dir. Ayrıca GWAS ile çok sayıda yeni gende tanımlanmıştır. LDL-K ile güçlü ilişkisi olduğu *Sort1*, *PSRC1* ve *CELSR2* genlerinin yer aldığı 1p13 lokusu tespit edilmiştir (Strong and Rader, 2012). Bu lokusunun sadece LDL-K ile değil aynı zaman da kardiovasküler hastalıkların klinik değerlendirilmesi ile de ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. *Sort1* geni tarafından kodlanan sortilin, LDL-K ve ateroskleroz arasında güçlü bir ilişki olduğu ortaya çıkarılmıştır. Hepatik sortilinin LDL reseptörü gibi davranabildiği ve sortilinde azalma olduğunda dolaşımda ki LDL' de artış olabileceği kabul edildi. Böylece de ateroskleroz ile sortilin arasında bir ilişki olduğu görüşü ortaya konulmuştur (Sparks vd., 2015).

1p13 lokusu ile KAH riski arasındaki ilişki ilk olarak 2007 yılında ortaya konulmuştu. Kısa süre sonra aynı genetik varyantın serum LDL-K seviyesini artırdığı bulunmuş, böylece 1p13 lokusundaki varyantlar ile LDL-K seviyesi ve koroner risk arasında çok fonksiyonel bir bağ olduğu kanısına varılmıştır (Linsel-Nitschke vd., 2010b). Musurunu ve arkadaşlarının yapmış oldukları araştırmada, 1p13 kromozomunda yer alan yeni SNP'lerin (rs599896, rs646776, rs12740374 ve rs629301) LDL-K ile güçlü ilişkisi olduğunu belirlemişlerdir. Bu SNP'ler genomun kodlama yapmayan (non-coding) bölgesinde bulunduğu ve yapısındaki allele göre, çevresinde yer alan genlerin ekspresyon düzeyini etkilediği belirlenmiştir (Musurunu vd., 2010). 1p13 kromozom bölgesinde prolin/ serin zengin sarmal bobin protein 1 (*PSRC1*), kaderin EGF LAG yedi- pass G-tip reseptör 2 (*CELSR2*), miyozin bağlayıcı H- (*MYBPHL*) ve sortilin 1 protein (*Sort1*) kodlayan dört gen yer almaktadır (Kleber vd., 2010). Bu bölgede yer alan diğer genlerin, plazma LDL-K seviyesini *Sort1* kadar etkilemediği gösterilmiştir (Coutinho vd., 2013).

Karaciğer rs646776, rs12740374 ve rs599839’da minör allel varlığında *Sort1*’in daha yüksek miktarda transkripsiyona uğradığı gösterilmiştir. (Musurunu vd., 2010).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Bu çalışmaya Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Polikliniğine başvuran KAH tanısı konmuş 244 hasta alınmış ve aynı anabilim dalınının anjiyografi ünitesinde anjiyografi uygulanmıştır. Anjiyografi sonrası bu hastaların 82'sinde herhangi bir anjiyografik bulguya sahip olmadığından çalışmadan çıkarılırken çalışmaya anjiyografi bulgularına sahip 162 hasta dâhil edilmiştir. Kardiyoloji polikliniğince alınan anamnez bilgilerine ve alınan kan örneklerinin analizi sonucuna göre hasta grubuyla benzer demografik özelliklere sahip sağlıklı 49 gönüllülerden de kontrol grubu oluşturuldu. Yine hastanede yapılan klinik ve laboratuvar değerlendirmeleri sonucunda (anamnez, fizik muayene, rutin klinik laboratuvar incelemeler) herhangi bir endokrin, renal, karaciğer bozukluğu olmayan hastalar çalışmaya dâhil edilmiştir. Kan örnekleri 12 saatlik açlık dönemini takiben sabah, brakıyal venden venopunktur yöntemiyle alınmıştır. Lipit, lipoprotein, apoprotein ve lipoprotein altfraksiyonlarının düzeylerini belirlemek için kanlar antikoagülanlı düz tüplere, moleküler analizler için ise EDTA'lı tüplere alınmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan tüm cihazlar, marka ve modelleri Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz Adı	Marka	Model
Thermocycle	Techne	TC5000
Real Time PCR Cihazı	Bio-RAD	CFX96
Santrifüj	ThermoFisher Scientific	Heraeus Multifuge 3 SR+ Centrifuge
Saf Su Cihazı	GFL	2104
Nanodrop spektrofotometre		
Lipoprint sistem	Quantimetrix	48-9150
pH Metre	Hanna	HI2210
Otoklav	Wisd laboratory instrument	WiseClave
Etüv	Wisd laboratory instrument	WiseCube
Buz Makinesi	Scotsman	AF-80
Vorteks	Velp Scientifica	ZX Classic
Terazi	Acculab	Atilon
Mikrosantrifüj	Beckman Coulter	Microfuge 16
Isı bloğu	HLC	MHR 13
Manyetik karıştırıcı	Wisd laboratory instrument	WiseSbir
Elektroforez ünitesi	Thermo Scientific	EC 1000 XL
Görüntüleme cihazı	Bio-imaging systems	Mini Lumi
Buzdolabı	Bosch	
-20 °C derin dondurucu	Bosch	
-80 °C freezer	New brunswick scientific	4570 premium
Mikro dalga fırın	Arçelik	MD564

2.2.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6.Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları

Kimyasal Adı	Üretici firma
Sükroz	Merck
Sodyum-Etilen diamin tetra asetikasit (Na-EDTA)	Himedia
Etilen diamin tetra asetikasit(EDTA)	Himedia
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	Himedia
Triton X-100	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Tris-Baz	Sigma
Sodyum dodesil sülfat	Sigma
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Himedia
Proteinaz K	Merck
Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Merck
Asetik asit	Merck
2-Merkaptoetanol	Sigma
Agaroz	Sigma
Etilyum Bromür	Amresco
3 orange G	Sigma
dNTP seti	Promega
Taq polimeraz seti	Promega
TaqI kesim enzimi	Promega
Gen ekspresyon master mix	Taqman (4369016)

Tablo 7 (Devamı). Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları

Kimyasal Adı	Üretici firma
<i>Sort1</i> prob	Taqman (HS00907094_MI FAM)
18S prob	Taqman (4319413E VIC)
RNA izolasyon kiti	Qiagen
cDNA sentez kiti	Promega
Lipoprotein alt fraksiyon kiti	Quantimetrix

2.2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Çalışma kapsamında kullanılan sarf malzemelerin isimleri ve markaları Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Çalışma sırasında kullanılan sarf malzemeler ve markaları

Sarf Malzemenin Adı	Markası
Otomotik pipet seti	Brand
DNAaz, RNAaz free pipet uçları (0,5-10, 1-200, 100-1000 µL)	Axygen, Greiner
Pipet uçları (0,5-10, 1-200, 100-1000 µL)	İsolab
Mikrosantrifüj tüpü (1,5 mL’lik ve 0,5 mL’lik)	İsolab
DNAaz, RNAaz free mikrosantrifüj tüpü (1,5mL’lik)	BioBasic
Microseal B adhesive sealer	Bio-Rad
Multiplate-low profile 96 well unskrited PCR plate	Bio-Rad
PCR tüpü	BioBasic

2.2.4. Deneysel Çalışmalar

Anjiyografi öncesi deneklerden alınan kan örnekleri RTEÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimler Bölümü Tıbbi Biyokimya araştırma laboratuvarında deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere ön işleme tabi tutuldu. Kan örnekleri 3.000 rpm’de 10 dk. santrifüj edildi ve serum örnekleri 500 µL’lik hacminde alıgotlandı. Yapılacak analizlerde kullanılmak üzere -80 °C’lik derin dondurucuda saklandı.

2.2.4.1. Otoanalizörde Tayin Edilen Parametreler

Toplam kolesterol (TK), TAG, LDL-K ve HDL-K düzeyleri günlük kalite kontrollerini takiben Abbot Architect C16000 otoanalizöründe yapıldı. TAG ve TK tayini için enzimatik kolorimetrik yöntemler kullanıldı. HDL-K tayini için dekstran sülfat ile çöktürme işleminden sonra enzimatik kolesterol yöntemi kullanıldı. LDL-K Friedewald formülüyle hesaplandı [$LDL-K = TK - (TAG/5 + HDL-K)$]. Bu denklem TAG seviyesi 400 mg/dL’den küçük olduğunda geçerlidir. Plazma TAG seviyesi 400 mg/dL’nin üzerinde olan numunelerde LDL-K düzeyleri cihazın orijinal tayin kitiyle direkt ölçüldü. Apo A, Apo B ve Apo E konsantrasyonları da Siemens BN 2 ile nefelometrik yöntemle orijinal kitler kullanılarak belirlendi.

2.2.4.2. Genomik DNA izolasyonu

Tam kanda genomik DNA izolasyonunda; önce hipotonik ortamda eritrositler parçalanıp uzaklaştırıldı sonra sodyum dodesil sülfat (SDS) ve proteinaz K ilave edilmesi ve yüksek tuz konsantrasyonu (NaCl-Tris-EDTA) ile muamele edilerek lökositlerden genomik DNA elde edildi.

2.2.4.2.1. Kullanılan çözeltiler

1. Eritrosit liziz tampon (ELB): 109,536 g sükröz, 2,922 g EDTA ve 0,476 g MgCl₂ tartıldı ve bir miktar saf suda çözündürüldü. Üzerine 9,3 mL Triton X-100 ilave edildi. Maddeler tamamen çözüldükten sonra hacmi 1000 mL’lik bir balon jöje ile 1000 mL’ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

2. Fizyolojik tampon: 2,192 g NaCl ve 3,653 g EDTA tartıldı ve bir miktar saf suda çözdürüldükten sonra hacmi 500 mL'lik bir balon jodede 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otaklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.
3. TE-9 tamponu: 78,800 g Tris HCl, 5,845 g EDTA ve 0,584 g NaCl tartıldı ve 800 mL saf suda çözdürüldü. Çözeltinin pH'sı pH metre yardımıyla 9'a ayarlandı. Çözeltinin hacmi 1000 mL'lik balon jodede 1000 mL'ye saf su ile tamamlandı. Çözelti otaklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.
4. %10'luk SDS: 10 g SDS tartıldı 80 mL saf suda çözdürüldü ve son hacmi 100 mL'lik balon jodede 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan SDS çözeltisi 45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.
5. Proteinaz K seyreltme tamponu: 0,7880 g Tris-HCl ve 0,011 g CaCl₂ tartılır ve 80 mL saf suda çözünür. Hacmi 100 mL'lik balon joje ile 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otaklavlandı ve 4 °C'de saklandı.
6. Proteinaz K çözeltisi: 100 mg proteinaz K tartılıp 10 mL proteinaz K seyreltme tamponunda çözüldü. 500 µL hacminlerde alıgotlandı ve -20 °C'de saklandı.
7. Derişik tuz çözeltisi (6M NaCl): 35 g NaCl tartılıp 100 mL saf suda çözdürülüp otaklavlandı ve 4 °C'de saklandı.
8. TE tamponu (pH 8) :
 - A. 3,722 g NaEDTA tartılıp 80 mL saf suda çözdürülür ve hacmi 100 mL'lik balon jodede 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otaklavlandı ve 4 °C'de saklandı.
 - B. 15,76 g Tris-HCl tartılıp 80 mL saf suda çözdürülür, pH 7,4'e ayarlandı ve son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otaklavlandı ve 4 °C'de saklandı.A çözeltisinden 5 mL ve B çözeltisinden 5 mL alıp son hacim saf su ile 50 mL tamamlandı. Hazırlanan çözelti otaklavlandı ve 4 °C'de saklandı.
9. % 70'lik Etanol çözeltisi: % 99,9'luk etil alkolden 70 mL alıp son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.

2.2.4.2.2. DNA İzolasyonu

1. 0,5 mL tam kan üzerine 1 mL ELB ilave edilerek oda sıcaklığında 3-5 dk. bekletildi. 3.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Geriye kalan pellet üzerine 1,5 mL ELB ilave edilip tekrar aynı hızda 10 dk. santrifüjlendi. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.

2. Hücre pelleti üzerine 1 mL fizyolojik çözelti ilave edilerek çözüldü, 3.000 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Eğer hücre pelleti beyaz renkli değilse işlem tekrar edilir.
3. Pellet üzerine 350 µL lizis tamponu (250 µL TE-9 tamponu, 80 µL SDS ve 20 µL proteinaz K) ilave edildi ve parmak darbeleri ile pellet iyice çözüldü. 56 °C'de ısı bloğu üzerinde 40 dk. inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon işleminden sonra 150 µL 6 M tuz çözeltisinden ilave edilerek kuvvetlice karıştırıldı ve 14.500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı.
5. Aynı hızda 5 dk. tekrar santrifüj edilip süpernatant temiz tüpe aktarıldı ve üzerine 1 mL soğuk saf etanol ilave edilerek DNA yoğunlaştırıldı.
6. 14.500 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve DNA molekülünün çökmesi sağlandı.
7. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine %70'lik etil alkol çözeltisinden 1 mL ilave edilip DNA yıkandı. 14.500 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi 2-3 defa tekrar edilir.
8. En son yapılan yıkama işleminden sonra tüpler temiz bir kurutma kağıdı üzerine ters çevrilip 5-10 dk. bekletilerek alkolün tamamen uzaklaştırıldı.
9. Pellet büyüklüğüne göre 100-300 µL TE ilave edilir. Olası DNAz kontaminasyonuna karşı 70 °C'de 15-20 dk. bekletildi. İzole edilen DNA örneği 4 °C'de saklandı.

2.2.4.3. Kodlamayan Rs599839 Bölgesinin Gen Amplifikasyonu

Tris-EDTA ile süspanse edilen ve rs599839'a özel bir çift sentetik primer yardımıyla PZR cihazında genin amplifikasyonu sağlandı. Kullanılan primer dizisi; forward primer: GGGCACCAAGAACA AAAACTC, reverse primer: TACTGGACTCTGGCCTGCTT şeklindedir. Yüksek ısıda DNA'ların denatürasyonu, düşük ısıda annealing işlemi ve taq polimeraz, deoksinükleotid trifosfat (dNTP) kullanarak da DNA zincirinin sentezi (extension) sağlandı. PZR işleminde promega taq polimeraz kullanıldı ve yapılan pipetlemeler Tablo 9'da verildi.

Tablo 9. PZR kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaksiyon ortamı	Kullanılan miktarlar (μL)
5 X taq tampon	10,0
MgCl ₂ (25 mM)	3,0
dNTP (10 mM)	1,0
Primer F (10 pmol)	1,0
Primer R (10 pmol)	1,0
Taq polimeraz (5 U/ μL)	0,4
Genomik DNA	2,0
dH ₂ O	31,6

Pipetleme işlemi buz üzerinde gerçekleştirildi ve hazırlanan tüpler gen bölgesinin çoğalması için PZR cihazına yerleştirildi ve PZR için gerekli program ayarlandı. PZR koşulları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. PZR koşulları

Sıcaklık Değeri ($^{\circ}\text{C}$)	Bekleme Zamanı	Döngü Sayısı	Uygulanan İşlem
94	5 dk.	1	Başlangıç denatürasyonu
94	45 sn		Denatürasyon
53,5	1dk.	36	Primer bağlanması
72	1 dk.		Zincir uzaması
72	10 dk.	1	Son uzama
4	∞		Bekleme

2.2.4.4. PZR Ürünlerinin Kontrolü

PZR ürünlerinin kontrolü agaroz jel elektroforezi ile yapıldı ve bunun için %1'lik agaroz jel kullanıldı. Agoroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler;

1. Yürütme tamponu: 50X'lik Tris Asetit asit EDTA çözeltisi (TAE) için 242,0 g Tris-Base ve 18,6 g Na₂EDTA tartıldı ve 800 mL saf suda çözüldü. Üzerine 57,1 mL asetik asit çözeltisi ilave edilip karıştırıldıktan sonra pH 8'e ayarlandı. Son hacmi 1000 mL'lik balon joje yardımıyla 1000 mL'ye tamamlandı. 50X'lik stok çözeltiden 20 mL alınıp 1000 mL'ye tamamlanarak 1X'lik yürütme tamponu hazırlandı.
2. 10 mg/mL'lik Etidyum Bromür (Et-Br) çözeltisi: 1 g Et-Br tartıldı, 10 mL saf suda çözdürüldü ve amber şişede saklandı.
3. % 1'lik Agoroz jel hazırlanması: 1 g agaroz tartıldı üzerine 1X'lik TAE'den konuldu ve mikrodalga fırında 2 dk. kaynatılarak çözüldü. Çözelti soğutuldu, çözelti üzerine 10 mg/mL'lik Et-Br çözeltiden 3 µL ilave edildi.
4. Tarak yerleştirildikten sonra hazırlanan çözelti dikkatli bir şekilde elektroforez tankına döküldü. Jel donduktan sonra tarak çıkarıldı ve tank elektroforez ünitesine yerleştirildi. DNA örnekleri yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve 60 voltta 45 dk. yürütüldü.

2.2.4.5. Kodlamayan Rs599839 Bölgesindeki SNP'nin Belirlenmesi

Rs599839'da majör allel olarak A aleli minör allel olarak ise G alleli bulunmaktadır. Sekansın A alleli mi yoksa G alleli bulundurduğunu tespit etmek için *Taq I* kesim enzimi kullanıldı. Kesim ortamı ve koşulları Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Kesim ortamı ve koşulları

İçerik	Miktar(μ L)
Multi-Core 10X tampon	2,0
BSA (10 μ g/mL)	0,2
PZR örneği	17,3
Dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldı	
Enzim (10 u/ μ L)	0,5
65 °C'de 2,5 saat inkübasyona bırakıldı.	

Kontrol olarak plazmit puC 18 kullanıldı. İnkübasyon işleminden sonra tüple kısa bir süre santrifüj edildi ve % 1'lik agarozaya yüklenerek yürütüldü. Görüntüleme yapılarak polimorfizmler tespit edildi.

2.2.4.6. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu tam kan örneklerinden yapıldı ve izolasyonda Qiagen QIAmp RNA Blood Mini kit kullanıldı. İzolasyonun yapılışı:

1. Eppendorf tüpe 200 μ L kan kondu (lökosit) ve üzerine 1000 μ L EL tampon ilave edildi.
2. 10-15 dk. buz üzerinde inkübasyona bırakıldı, inkübasyon esnasında iki kere kısa vorteks yapıldı.
3. 4°C de 400 g'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant tamamen uzaklaştırıldı ve geriye lökosit pelleti elde edildi.
4. Pellet üzerine 1000 μ L EL tampon eklendi. Kısa aralıklarla vortekslenerek hücreler tekrar çözüldü.
5. 4°C de 400 g de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant tamamen uzaklaştırıldı.
6. 4 ve 5. basamaklar tekrar edildi.
7. Lökosit pelleti üzerine 600 μ L RLT tampon ilave edildi ve vorteks veya pipet ile karıştırıldı.

8. Lizat mor kapaklı spin kolon tüpüne pipetlendi. 2 dk. 14.500 rpm'de santrifüj edildi ve kolon atıldı.
9. Homojenat  zerine 600  L %70'lik etanol ilave edildi ve pipetaj yapıldı.
10. Homojenat beyaz kapaklı kolonlara dikkatli bir Şekilde pipetlendi. Kolona yükleme hacmi 700  L'dir. 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve toplama tüpündeki s pernatat tamam uzaklaştırıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
11. Kalan homojenat tekrar kolona dikkatlice yüklendi ve 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj edildi, s pernatat atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
12. Kolon  zerine 700  L RW1 tamponundan ilave edildi ve 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj edildi, toplama tüpü atıldı.
13. Kolon yeni bir t p üzerine yerleştirildi ve üzerine 500  L RPE tamponundan eklendi 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
14. Toplama tüpündeki sıvı döküldü. Kolonun aŐzı dikkatli bir Şekilde aŐıldı ve 500  L RPE tamponundan eklendi 3 dk. en yüksek hızda santrifüj edildi.
15. Kolon yeni bir tüpe aktarıldı ve en yüksek hızda 1 dk. santrifüj edildi.
16. Toplama tüpü atıldı ve kolon 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
17. Kolon  zerine 50  L RNase free su ilave edildi ve 1 dk. 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
18.  zole edilen RNA'nın konsantrasyonu nanodrop ile 260 nm de  l ld .
19. cDNA sentezi iÇin izolat -80  C bir ay saklanabilmektedir.

2.2.4.7. cDNA Sentezi

 zole edilen RNA'dan reverse transkripsiyon kiti ile cDNA sentezi yapıldı. Sentez sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. cDNA senzinde kullanılan malzemeler ve miktarları

İçerik	Miktar(μ L)
5X reaksiyon tamponu	4,0
MgCl ₂ (son konsantarsyon 1,5-8 mM olmalı)	4,8
dNTP (0,5 mM)	1,0
Ribonükleaz inhibitörü (reaksiyon ortamında 20 U olmalı)	0,5
Reverse traskriptaz	1,0
Ultra saf steril su	3,7

Bütün pipetlemeler buz üzerinde yapıldı. Hazırlanan karışım mikrosantrifüj tüpüne kondu ve üzerine toplam hacim 20 μ L olacak şekilde RNA ile random primer ilave edildi. Tüpler ilk olarak ısı bloğu üzerinde 25 °C'de 5 dk. bekletildi ve sonra 42 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlandığında sentezlenen cDNA'lar real-time PZR'de kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

2.2.4.8. qRT-PCR Yöntemiyle *Sort1* Ekspresyonunun Belirlenmesi

Sort1'in gen ekspresyonunun Real-Time PCR'da ölçümü için Bio-RAD CFX96 cihazı kullanıldı. Amplifikasyonlar 20 μ L toplam reaksiyon hacmi içerisinde, cDNA, *Sort1* TagMan probu ve TagMan master mix kullanılarak gerçekleştirildi. *Sort1* gen ekspresyonunu normalize etmek içinde 18S TagMan prob kullanıldı. Real-Time PCR için yapılan pipetlemeler Tablo 13'de verilmiştir ve qRT- PCR cihazının çalıştırıldığı sıcaklık koşulları ise Tablo 14'de verimiştir.

Tablo 13. Real-Time PCR reaksiyon karışımı

Kullanılan Malzemeler	Miktar(μ L)
Rnase-Free su	6
2X TaqMan universal PCR MasterMix	10
20X <i>Sort1</i> primer ve probu (HAM)	1
20X 18S primer ve probu (VIC)	1
cDNA örneği	2
Toplam hacim	20

Tablo 14. qRT- PCR sıcaklık koşulları

qRT-PCR	Sıcaklık ($^{\circ}$ C)	Zaman	Döngü sayısı
UDG inkübasyonu	50	2 dk.	1
AmpliTaq Gold, UP Enzim Aktivasyonu	95	10 dk.	1
Denatürasyon	95	15 sn	
Uzama	60	1 dk.	40

$\Delta\Delta$ CT metodu ile ekspresyon analizi CFX Manager software üzerinde gerçekleştirildi.

2.2.4.9. LDL ve HDL Alt sınıflarının Analizi

Lipoproteinler ve lipoprotein alt grupları LIPOPRINT sistemi (Quantimetrix 48-9150) ve Lipoprint sistem LDL ve HDL alt grupları tayin kitleri (Quantimetrix 48-7002) kullanılarak belirlendi. LIPOPRINT sistemi ilk ve tek FDA onaylı, LDL ve HDL alt gruplarında kolesterol tayini için kullanılan, kullanıma hazır reaktifleri, hardware ve software donanımı ile bütün bir sistemdir. Bu sistem her bir lipoprotein alt grubundaki kolesterol düzeyini 1 mg/dL sınırına kadar ölçebilmektedir. Kolesterol miktarı tayinine

ek olarak partiküllerin tanecik büyüklüğü ve yoğunluğu da belirlenmektedir. LIPOPRINT sistemi jel gradienti kullanılmadan, lineer poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile çalışan bir sistemdir.

2.2.4.9.1. Lipoprint Sistem Bileşenleri

Bilgisayar, Lipoware Analiz Programı içermektedir. Renkli yazıcı, dijital tarayıcı, elektroforez çemberi, güç kaynağı, jel tüpleri için rak vefotopolimerizasyon için ışık kaynağından oluşan bir sistemdir.

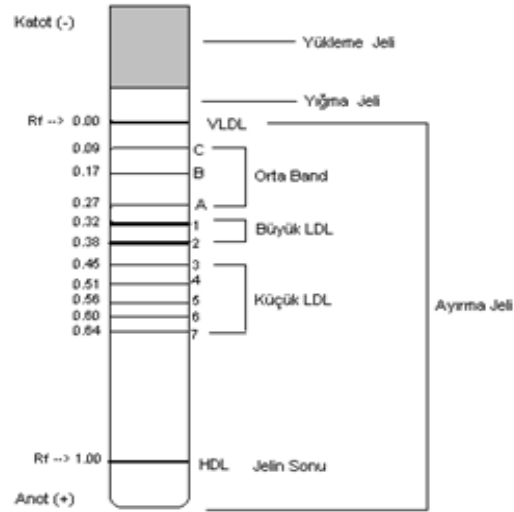
2.2.4.9.2. LDL ve HDL Altsınıf Tayin Kiti Bileşenleri

Jel tüpleri; lineer poliakrilamid jel (yığıma jeli ve ayırma jeli) ile dolu cam tüpler. Yükleme jeli; akrilamid, N, N-metilenbisakrilamid, lipofilik boya, tampon. Tampon; tris (hidroksimetil) aminometan, borik asitten oluşmaktadır.

2.2.4.9.3. Deneyin Çalışma Prensibi

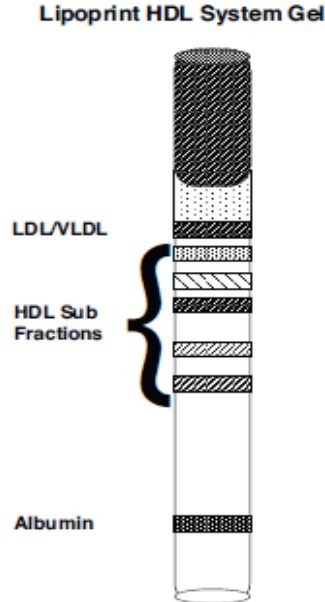
Yükleme jeli bileşeni olan lipofilik boya her bir lipoproteindeki kolesterol miktarı ile doğru orantılı olarak bağlanır ve daha sonra boyanan lipoproteine elektroforez işlemi uygulanır. Elektroforezin ilk aşamasında, lipoprotein partikülleri yükleme ve yığıma jeli yardımı ile tek bir bantta yoğunlaşır. Sonraki aşamada ise lipoprotein partikülleri ayırma jelinde partikül büyüklüklerine göre en büyükten en küçüğe doğru hareket ederek bantlar oluştururlar.

LDL altsınıf tayininde jelde en hızlı HDL, arkasından da sırası ile küçük-yoğun LDL, büyük- az yoğun LDL, esas olarak IDL' den oluşan orta bantlar ve son olarak da VLDL ilerler. Eğer numunede şilomikron varsa yığıma jelinin üst kısmında görünür ya da yükleme jelinde kalır. Elektroforez tamamlandıktan sonra farklı yoğunluklarda boyanan lipoprotein alt grupları (bantlar), başlangıç referans noktası olarak VLDL (VLDL=0) ve ileri referans noktası olarak HDL (HDL=1) alınarak relatif mobilitelerine (R_f) göre belirlenir (Şekil 19).



Şekil 19. Lipoprint jel tüpünün görünümü.

HDL alt sınıfı tayininde ise jelde en hızlı albümin, ardından da sırasıyla küçük, orta ve büyük HDL hareket eder. LDL/VLDL istif halinde kalır ve jelin üst kısmındadır. Elektroforez işleminden sonra farklı yoğunluklarda boyanan HDL alt sınıfları (bantlar), başlangıç referans noktası olarak LDL/VLDL ($LDL/VLDL=0$) ve ileri referans noktası olarakda albümin ($Albümin=1$) alınarak R_f göre belirlenir (Şekil 20).



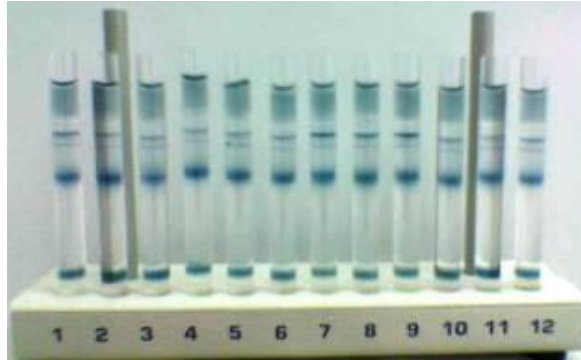
Şekil 20. Lipoprint jel tüpünün ve HDL bantlarının şematik görünümü.

Her bir lipoprotein için bant alanı belirlenir ve otoanalizörde ölçülen total kolesterol miktarı ile çarpılarak her bir banttaki kolesterol miktarı mg/dL olarak bulunur. Bütün bu hesaplama işlemleri elektroforez tamamlanıp, jel tüpleri dijital tarayıcıda tarandıktan sonra Lipoware analiz programı kullanılarak yapılmaktadır.

2.2.4.9.4. LDL Altsınıf Tayinin

2.2.4.9.4.1. Deneyin Yapılışı

Analiz için 12 saatlik açlık sonrası elde edilen serumlar kullanıldı. Analiz yapılmadan önce kit oda sıcaklığına gelmesi için buzdolabından çıkarılıp 30-45 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Jel tüpüne 25 µL serum ve 200 µL yükleme jeli pipetlendikten sonra tüpler alt-üst edilerek karışması sağlandı. Tüpler 35 dk. boyunca florasan ışığa maruz bırakılarak jelin polimerize olması sağlandı. Polimerizasyon işleminden sonra tüp başına 3 mA voltaj olacak şekilde 1 saat elektroforez işlemi uygulandı. Elektroforez sonrası jel tüplerinde bantların görünümü Şekil 21'de görülmektedir. Jel tüpleri dijital tarayıcıda tarandı ve Lipoware analiz programı ile değerlendirildi.

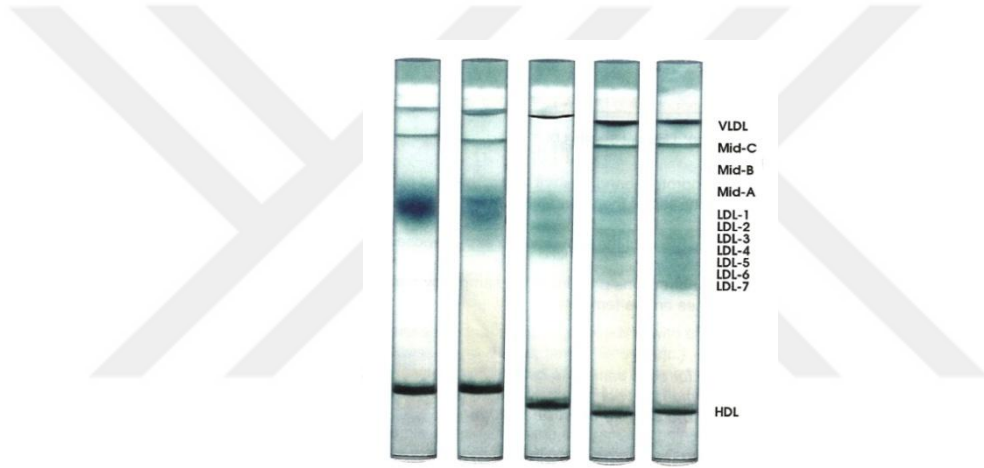


Şekil 21. Elektroforez sonrası jel tüplerinde bantların görünümü.

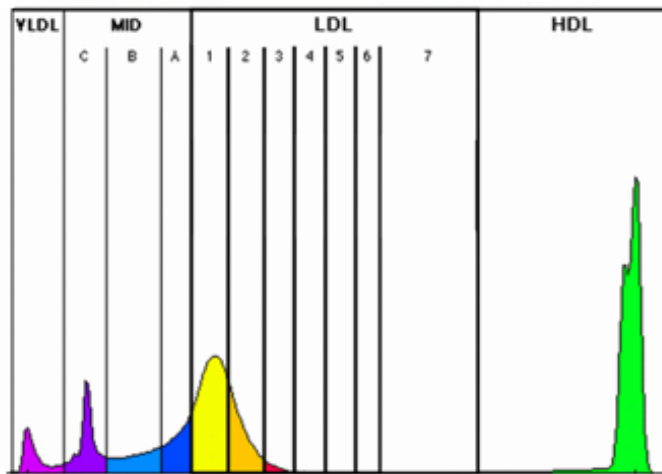
2.2.4.9.4.2. Sonuçların Değerlendirilmesi

LIPOPRINT sistem ile lipoproteinler 12 alt grupta sınıflandırılabilir: VLDL, orta bantlar C, B, A; IDL, kalıntı lipoproteinler ve lipoprotein (a), LDL alt grupları, HDL. LIPOPRINT sistem ile LDL en fazla 7 alt gruba ayrılır, LDL alt grupları en büyük partikülleri içeren LDL-1'den, en küçük partikülleri içeren LDL-7'ye kadar

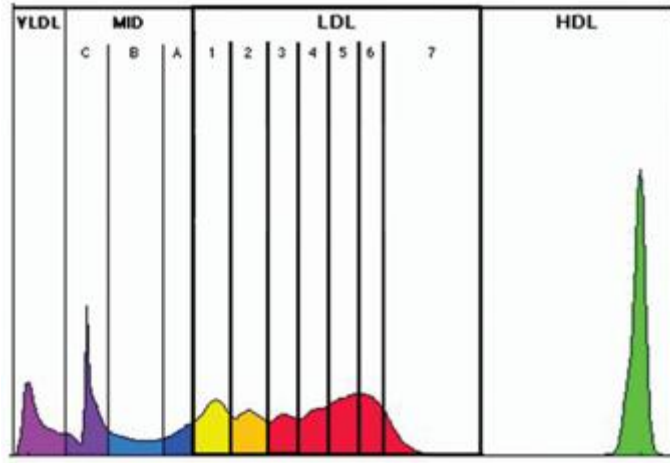
gruplandırılabilir. Lipoprotein alt grup profilleri, ortalama LDL partikül büyüklükleri esas alınarak “Tip A” (pattern A, normal) ve “Tip B” (pattern B, aterojenik) olarak sınıflandırılmıştır. Ağırlıklı olarak büyük ve az yoğun LDL alt gruplarına (LDL-1 ve LDL-2) sahip bireyler “Tip A”, küçük ve yoğun LDL alt gruplarına sahip bireyler “Tip B” olarak nitelendirilmektedir (Rizzo and Berneis, 2006a; Rizzo and Berneis, 2006b; Auatin vd., 1988). Normal bir lipoprotein profili (Tip A) VLDL, orta bantlar C, B ve A, LDL ve HDL bantlarına sahiptir, homojen LDL dağılımı (LDL-1 ve LDL-2) gösterir (Şekil 22 ve Şekil 23). Aterojenik bir lipoprotein profilinde (Tip B) ise heterojen LDL dağılımı görülür, yukarıdaki bantlara ek olarak LDL-3’ten LDL-7’ye kadar beş farklı LDL alt grubu görülmektedir (Şekil 22 ve Şekil 24).



Şekil 22. Beş farklı bireyin lipoprotein alt grup dağılımları.



Şekil 23. KAH açısından düşük riskli lipoprotein alt sınıfı profili.



Şekil 24. KAH açısından yüksek riskli lipoprotein alt sınıfı profili.

2.2.4.9.5. HDL Alt sınıfı Tayini

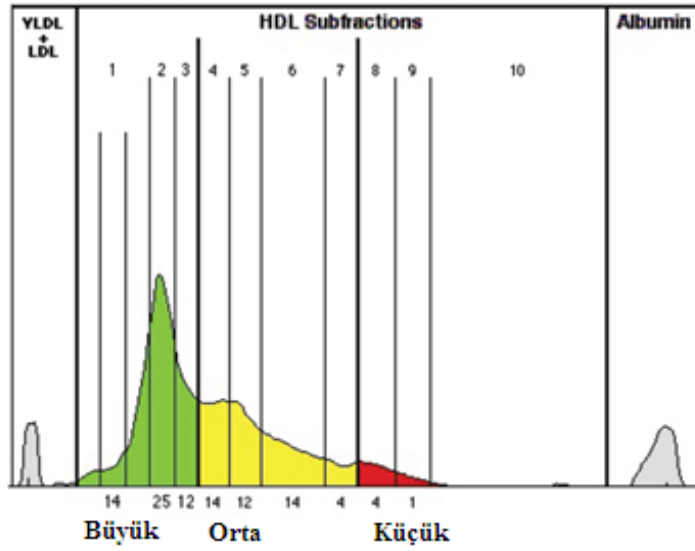
2.2.4.9.5.1. Deneyin Yapılışı

HDL alt sınıfı analizinde de tıpkı LDL alt sınıfı analizinde olduğu gibi 12 saatlik açlık sonrası elde edilen serumlar kullanıldı. Analiz yapılmadan önce kit oda sıcaklığına gelmesi için buzdolabından çıkarılıp 30-45 dk. oda sıcaklığında bekletildi. İlk olarak jel tüplerine 25 µL serum ve 300 µL yükleme jeli pipetlendi. Tüpler alt-üst edilerek karışması sağlandı ve tüpler 30 dk. boyunca florasan ışığa maruz bırakılarak jelin polimerize olması sağlandı. Süre bitiminde tüp başına 3 mA voltaj olacak şekilde 50 dk. elektroforez işlemi uygulandı. Jel tüpleri dijital tarayıcıda tarandı ve Lipoware analiz programı ile değerlendirildi.

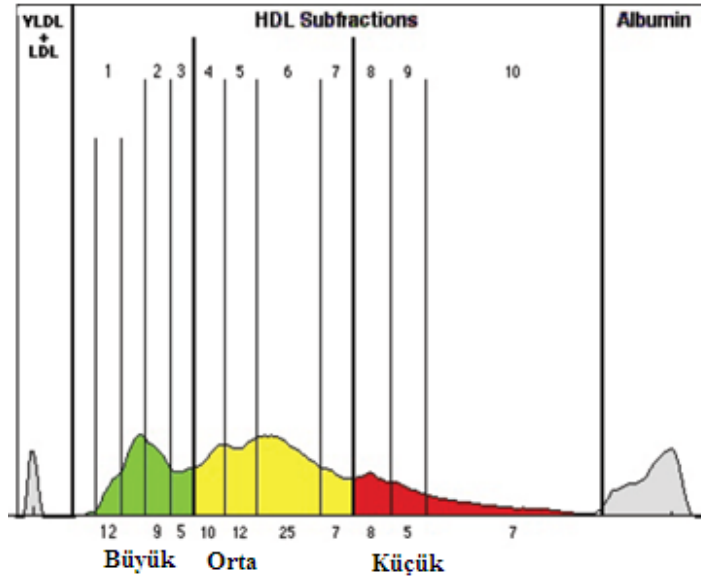
2.2.4.9.5.2. Sonuçların Değerlendirilmesi

Lipoprint HDL sistemi ile HDL büyük, orta ve küçük şeklinde gruplandırılarak 10 alt sınıfa ayrılabilir. Bantların sayısı ve her bir bantın boyama yoğunluğu hastadan hastaya değişir. KAH riskini tahmin etme bakımından HDL alt sınıfları toplam HDL-K daha değerli olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda büyük HDL alt sınıfının ateroskleroza karşı daha koruyucu olduğu belirtilmiştir (Bostan, vd., 2015). HDL alt sınıflarının anti-aterojenik rolü oldukça tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda küçük HDL alt sınıflarının daha koruyucu olduğu öne sürülürken bazı epidemiyolojik

çalışmalarda ise küçük HDL'nin daha yüksek seviyede ve büyük HDL'nin daha düşük seviyede olmasının bireyleri KAH'na daha yatkın hale getirdiğni ortaya koymuştur (Lagos vd., 2009). KAH riski bakımında daha koruyucu HDL profili Şekil 25'de daha az koruyucu olan HDL profili ise Şekil 26'da gösterilmektedir.



Şekil 25. KAH açısından koruyucu HDL profili.



Şekil 26. KAH açısından daha az koruyucu HDL profili.

2.2.5. İstatistik Analiz

Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov–Smirnov testine göre belirlendi. Sayısal olan verilerin merkezi eğilimleri parametrik olanlar aritmetik ortalama (\bar{X}) ve standart sapma (SD), nonparametrik olanlar ortanca ve çeyrekler arası aralık [ortanca (%25-%75)] şeklinde ifade edildi. Kategorik değişkenler yüzde (%) olarak verildi. Normal dağılım gösteren verilerin gruplar arası varyans analizi ANOVA testine göre, nonparametrik olanlar ise Kruskal-Wallis (ikili karşılaştırılması Mann-Whitney U testi) testine göre yapıldı. Parametrik dağılım gösteren 2 grubun varyans analizi Student t-testine göre analiz edildi. Gruplar arası kategorik değişkenlerin farklılığı ise ki-kare testine göre tespit edildi. Gruplardaki değişkenler arasındaki ilişki Spearman korelasyon testine göre tespit edildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışma; anjiyografi sonucu çeşitli düzeylerde damar tıkanıklığı tespit edilen 162 hasta ve 49 sağlıklı bireylerden oluşturulmuştur. Çalışma gruplarının demografik bulguları karşılaştırıldığında; yapılan istatistik analiz sonucunda yaş, hipertansiyon ve DM karşılaştırıldığı zaman gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0,001$). Benzer şekilde dislipidemi ve sigara bakımından da gruplar arasında ($p<0,01$) anlamlı bir farklılık gösterilmiştir. Ancak cinsiyet, VKİ ve bel çevresi açısından fark olmadığı belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 15’de verilmiştir.

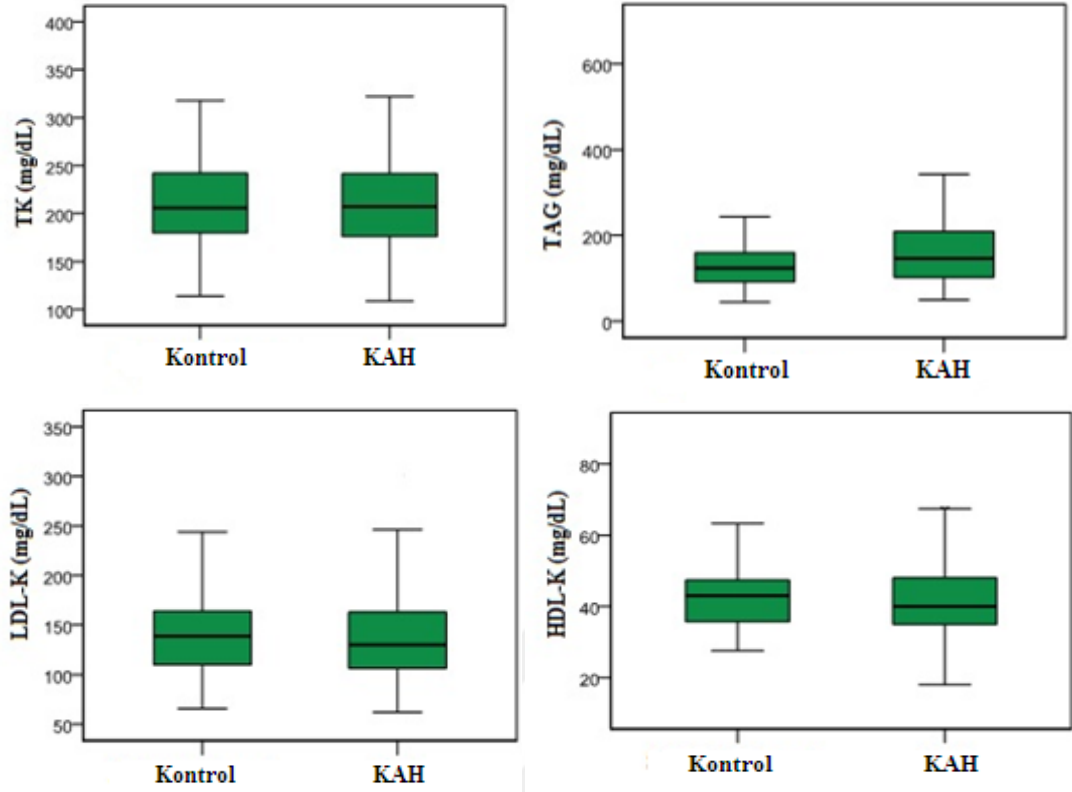
Tablo 15. KAH ve kontrol grubuna ait demografik bulgular

Parametreler	Kontrol (n=49)	KAH (n=162)	P değeri
Yaş (yıl)	56 ± 6	61 ± 10	<0,001
Cinsiyet , ♂,% (n)	71 (34)	74 (119)	>0,050
VKİ (kg/m ²)	30 ± 5	30 ± 5	>0,050
Bel Çevresi (cm)	106 ± 25	103 ± 13	>0,050
Hipertansiyon, % (n)	0 (0)	66 (107)	<0,001
DM, % (n)	0 (0)	32 (52)	<0,001
Dislipidemi, % (n)	59 (29)	73 (116)	<0,050
Sigara, % (n)	20 (10)	39 (63)	<0,010
Tıkalı Damar Sayısı			
1 Damar tıkalı, % (n)	-	29 (47)	-
2 Damar tıkalı, % (n)	-	44 (71)	-
3 Damar tıkalı, % (n)	-	27 (44)	-

Çalışma gruplarının lipit profilleri karşılaştırıldığında, yapılan istatistik analizde gruplar arasında TAG açısından bir fark olduğu fakat bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Ayrıca gruplar arasında TK, LDL-K ve HDL-K düzeyleri bakımından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Serum apoprotein seviyeleri istatistiksel olarak analiz edildiğinde; KAH da Apo A ve Apo E düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu ($p<0,05$) gösterilirken Apo B seviyelerinde herhangi bir anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Serum lipit profili ve apoprotein seviyeleri ile ilgili sonuçlar Tablo 16’da verilmiştir. Yine çalışma gruplarının lipit profilinin grafiksel gösterimi Şekil 27’de verilmiştir.

Tablo 16. Çalışma gruplarının lipit parametreleri ve serum apoprotein seviyeleri

Ölçülen parametreler	Kontrol (n=49)	KAH (n=162)	P değeri
TAG (mg/dL)	125 (116-162)	151 (156-193)	>0,050
TK (mg/dL)	215 ± 47	210 ± 48	>0,050
LDL-K (mg/dL)	145 (132-157)	130 (128-143)	>0,050
HDL-K (mg/dL)	41 (40-45)	40 (40-44)	>0,050
Apo A (mg/dL)	129 (124-138)	108 (108-115)	<0,001
Apo B (mg/dL)	100 (96-113)	109 (109-116)	>0,050
Apo E (mg/dL)	4,40 (4,10-5,30)	4,00 (3,97-4,46)	<0,050

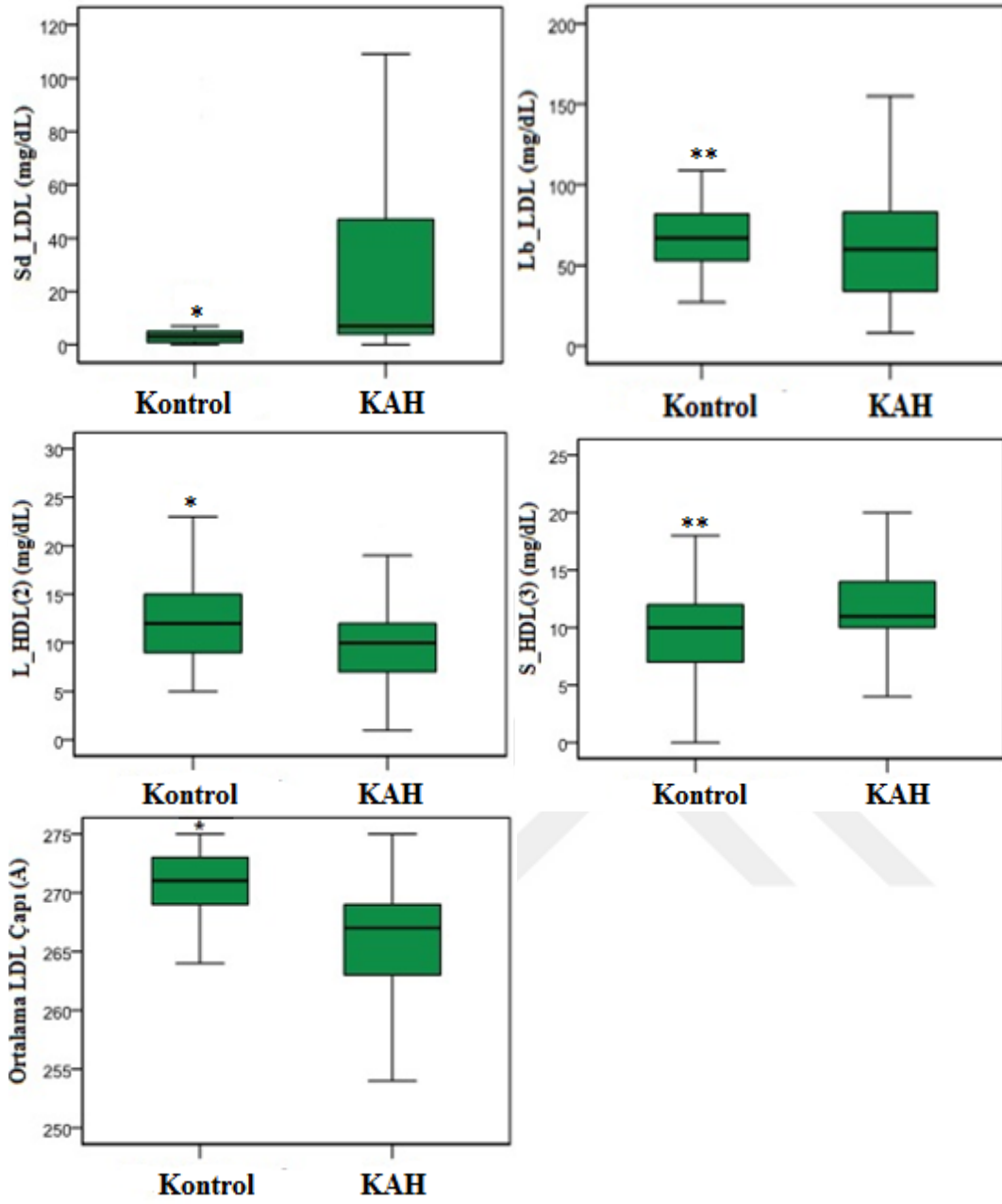


Şekil 27. KAH ve kontrol gruplarına ait serum lipit profillerinin grafiksel gösterimi.

Çalışma gruplarının lipoprotein alt sınıf analizi lipoprint sistemi ile yapıldı ve sonuçlar Tablo 17’de verilmiştir. Kontrol grubuna göre KAH’da SdLDL düzeyleri belirgin bir şekilde daha yüksek, ortalama LDL çaplarının ise daha küçük olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Yine LbLDL düzeylerinin ise daha düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Benzer şekilde çalışma gruplarının HDL alt sınıflarına istatistiksel analiz uygulandığında, hem L-HDL’de hem de S-HDL’de istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmıştır ($p < 0,05$). KAH sağlıklı kişilere göre anlamlı düzeyde daha düşük L-HDL ve daha yüksek S-HDL fraksiyonlarına sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak M-HDL düzeylerinde gruplar arası herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir ($p > 0,05$). Lipoprotein altfraksiyon verilerinin grafiksel gösterimi Şekil 28’de belirtilmiştir.

Tablo 17. Çalışma gruplarının lipoprotein alt sınıf seviyeleri

Ölçülen parametreler	Kontrol (n=49)	KAH (n=162)	P değeri
Ortalama LDL çapı (A°)	271(270-271)	267 (264-266)	<0,001
Sd-LDL (mg/dL)	3 (2-13)	7 (19-28)	<0,001
Lb-LDL (mg/dL)	67 (63-74)	60 (56-66)	<0,050
L-HDL (mg/dL)	12 (11-14)	10 (10-11)	<0,001
M-HDL (mg/dL)	20 (19-22)	20 (19-21)	>0,050
S-HDL (mg/dL)	10 (9-11)	11 (11-12)	<0,010



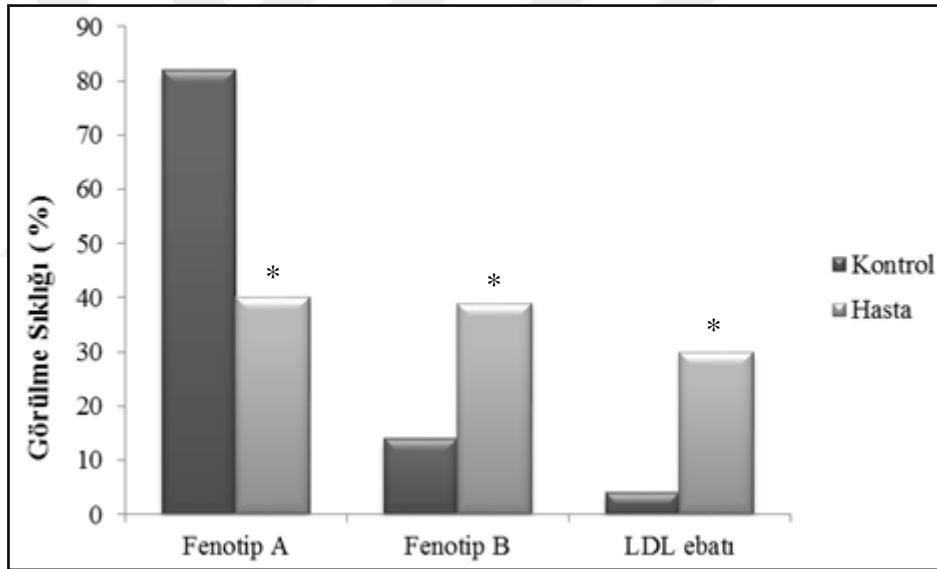
Şekil 28. Çalışma gruplarına ait lipoprotein altsınıflarının grafiksel gösterimi (*: $p < 0,001$ ve **: $p < 0,05$).

Ayrıca çalışmaya alınan katılımcıların LDL altfraksiyonları fenotipik olarak aterojenik ve anti-aterojenik şekilde nitelendirilerek, kontrol grubuna göre KAH'da daha yüksek sıklıkta aterojenik fenotip (fenotipB) ve daha düşük anti-aterojenik fenotip (fenotipA) sıklığı gözlemlenmiştir ($p < 0,001$). Ayrıca LDL-K'ün aterojenitesi LDL çapı ile ters orantılıdır. Bu sebeple LDL boyutu 263A° altında olan kontrol ve hasta grupları kıyaslandığında, KAH grubu istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük boyutlu

LDL'ye sahip olduğu belirtilmiştir ($p<0,001$). Bu analizlerin sonuçları Tablo 18'de ve Şekil 29'da gösterilmiştir.

Tablo 18. KAH ve kontrol grubunun LDL boyutlar ve fenotip özellikleri

Ölçülen parametreler	Kontrol (n=49)	KAH (n=162)	P değeri
LDL boyutu (< 263A°), % (n)	4 (2)	30 (49)	<0,001
Fenotip A, % (n)	82 (40)	40 (64)	<0,001
Ara Fenotip (IM), % (n)	4 (2)	21(34)	<0,001
Fenotip B, % (n)	14 (7)	39 (63)	<0,001



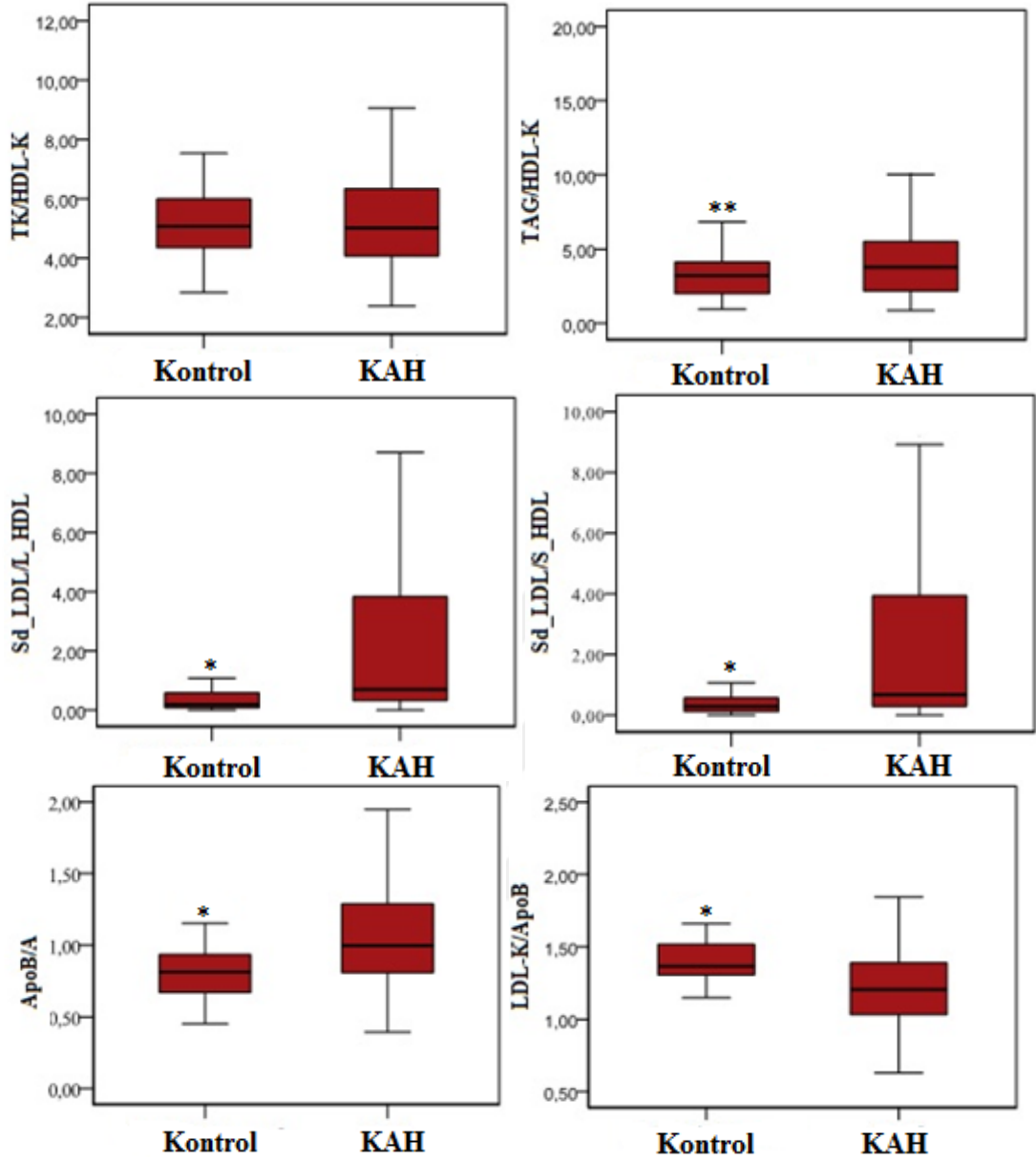
Şekil 29. Çalışma gruplarının LDL boyutları ve fenotip özellikleri (* : $p < 0,001$).

Kardiyovasküler hastalık riskini ortaya koymada lipoprotein ve altfraksiyonları önemli katkı sağlayan belirteçlerdir. Ancak hastalık riskini belirlemede; lipit, lipoprotein ve apoprotein değişkenlerinin birbirleriyle oranları, bunların plazma seviyelerinden daha etkili olduğu ileri sürülmektedir (Walldius, 2012). Bu oranlar daha çok pro/antiaterojenite ile ilişkili lipidik parametrelerinden oluşmakta ve bu sayısal değerlerin büyüklüğü aterojenite eğilimlerini işaret etmektedir. Gruplar arasında TK/HDL-K oranında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Çalışma gruplarının TG/HDL-K oranı karşılaştırıldığında ise, bu oran hasta grubunda kontrol grubuna göre

daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Çalışma gruplarının ApoB/ApoA oranları incelendiğinde, hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Bu oranların aterojenite üzerine olan etkisinden yola çıkarak mevcut çalışmada da alt fraksiyonların pro ve anti aterojenik fraksiyon şekillerinin (Sd-LDL/S-HDL ve Sd-LDL/L-HDL) oranları incelenmiştir. Buna göre de sayısal büyüklüğün aterojenite ile lineer olduğu düşünülen Sd-LDL/L-HDL ve Sd-LDL/L-HDL oranları hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Bunların yanı sıra LDL-K/ApoB oranı da aterojenitenin bir göstergesi olan LDL çapının tahmin edilmesinde kullanılmaktadır. Hasta grubunda bu oran kontrol grubuna göre daha yüksektir ve sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p<0,001$). Çalışmadaki grupların aterojenite indeksi Tablo 19’da ve Şekil 30’da verilmiştir.

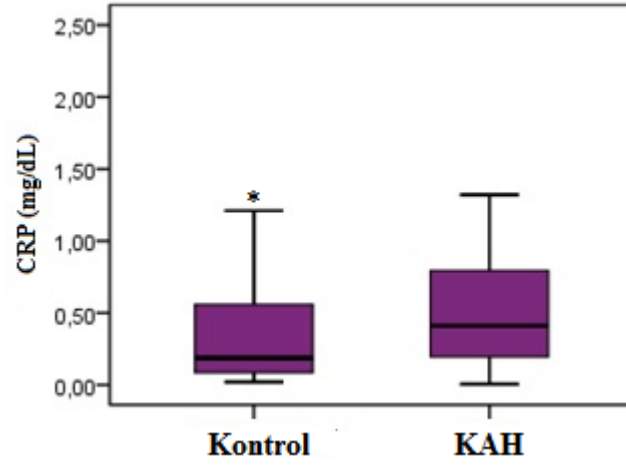
Tablo 19. Çalışma gruplarının lipidik parametreleriyle ilişkili aterojenite indeksleri

Aterojenite indeksleri	Kontrol (n=49)	Hasta (n=162)	P değeri
TK/HDL-K	5,11 (4,77-5,54)	5,10 (5,01-5,59)	>0,050
TAG/HDL-K	3,29 (2,77-4,25)	3,81 (4,08-5,49)	>0,050
Sd-LDL/L-HDL	0,20 (0,80-1,68)	0,55 (2,29-6,31)	<0,001
Sd-LDL/S-HDL	0,31 (0,21-0,89)	0,58 (1,58-2,65)	<0,001
LDL-K/Apo B	1,37 (1,34-1,43)	1,18 (1,17-1,28)	<0,001
Apo B/Apo A	0,80 (0,74-0,85)	0,96 (0,97-1,09)	<0,001



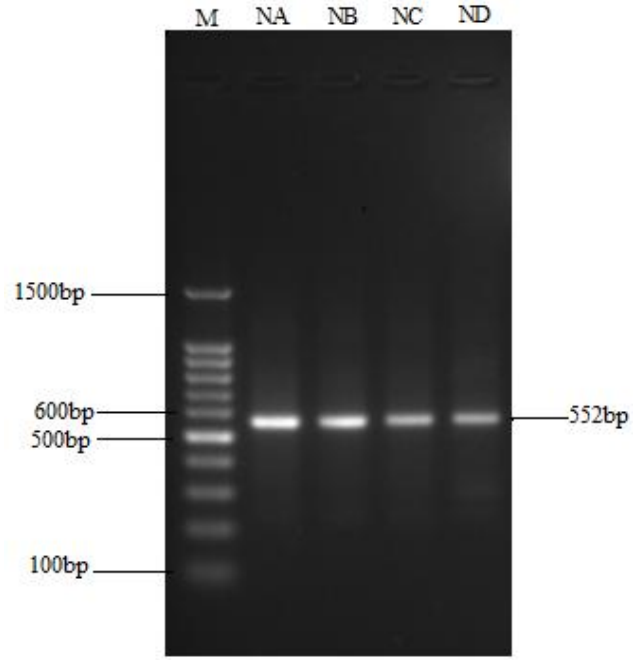
Şekil 30. Çalışma gruplarının aterojenite indeksinin grafiksel gösterimi (* : p < 0,001 ve **: p < 0,05).

Ateroskleroz patofizyolojisi basit bir lipit birikiminin yanı sıra inflamatuvar araçların da önemli bir yer tuttuğu multifonksiyonel bir hastalıktır. CRP doku enflamasyonunda non-spesifik olarak yükselen önemli bir inflamatuvar markıdır. Bu sebeple mevcut çalışmada enflamasyonla ilişkili olan aterom plak oluşumunu değerlendirmek için CRP değerleri de incelenmiştir. Kontrol grubunda 0,19 (0,28-0,89) mg/dL olan CRP değeri hasta grubunda 0,40 (0,48-0,92) mg/dL'ye yükseldiği saptanmıştır. Gruplar arasındaki fark ise istatistiksel olarak p<0,001 düzeyinde farklı bulunmuştur. Kontrol grubu ile hasta grubunun CRP düzeyleri arasındaki farklılığın grafiksel gösterimi Şekil 31'de verilmiştir.



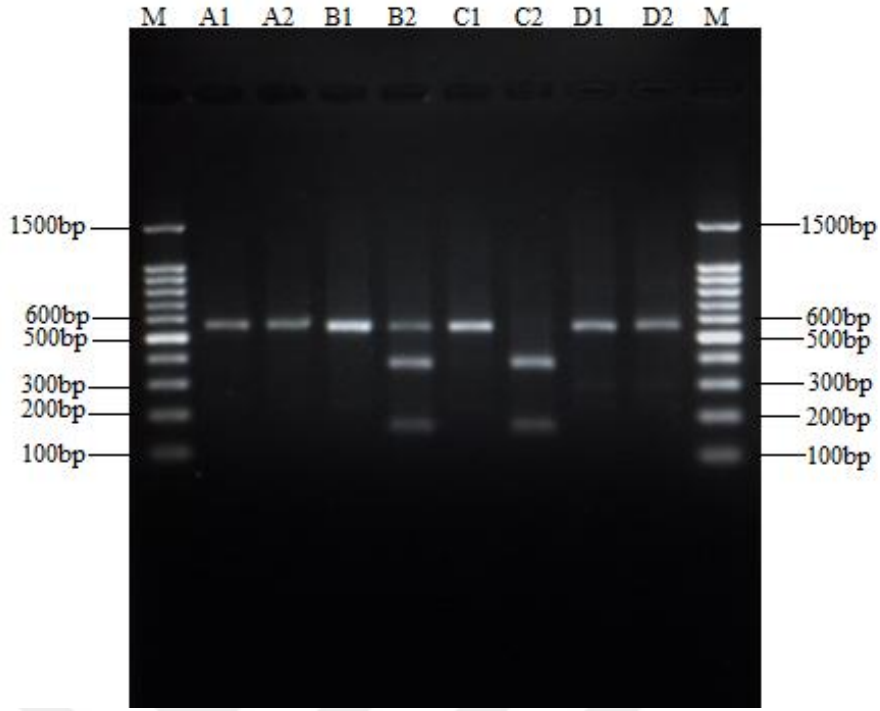
Şekil 31. Çalışma gruplarının CRP seviyelerinin grafiksel gösterimi (* $p < 0,001$).

Lipit metabolizmasında meydana gelen bozukluklar KAH için de bir risk faktörüdür. Lipit fonksiyon bozukluğu ve KAH riskinin genetik yatkınlığını değerlendirmek amacıyla kromozom 1p13’de kodlamayan alanda yer alan rs599839 gen bölgesindeki tek nükleotiddeki polimorfik dağılım (polimorfizm) incelenmiştir. Bu analiz için ilk olarak rs599839 gen bölgesi PZR işlemi ile çoğaltılmış ve PZR ürünü agaroz jel elektroforez tekniği ile incelenmiştir. PZR işlemi sonucu oluşan ürünün elektroforez görüntüsü Şekil 32’de verilmiştir.



Şekil 32. PZR ürünleri (M: 100bp DNA markır, NA: A kodlu deneğin PZR ürünü, NB: B kodlu deneğin PZR ürünü, NC: C kodlu deneğin PZR ürünü ve ND: D kodlu deneğin PZR ürünü.).

PZR ürünleri *taqI* kesim enzimi ile kesilerek varyantlar tespit edilmiştir. Rs599839’da A alleli var ise enzim ile kesilmezken G alleli varlığında kesilmektedir. Kesim işlemi sonrası oluşan ürünler % 2’lik agaroz jelde kontrol edildi ve ürünün elektroforez görüntüsü Şekil 33’de verilmiştir.

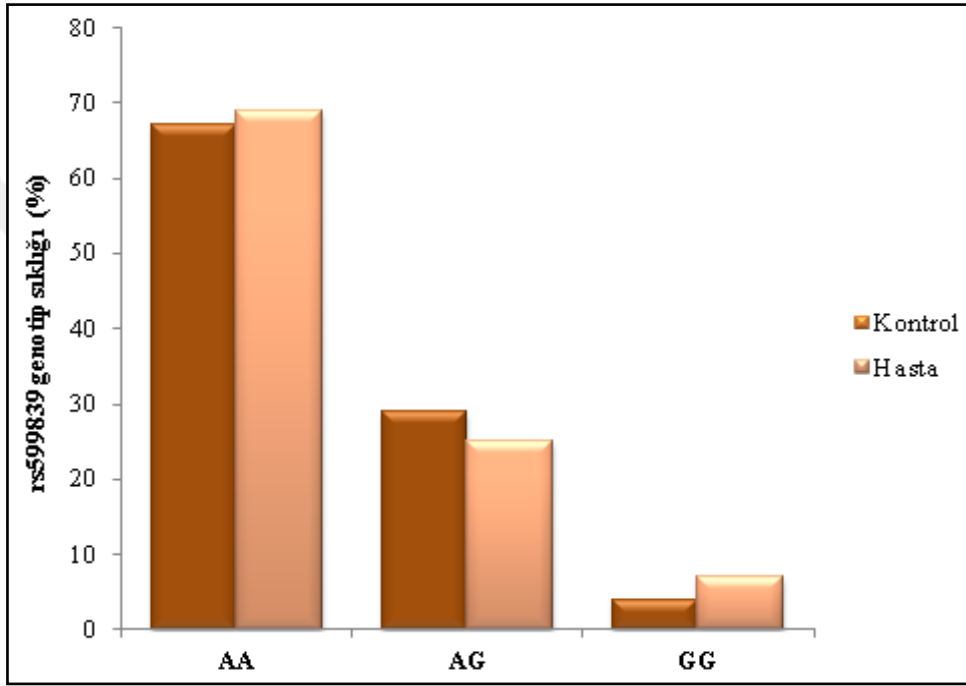


Şekil 33. Kontrol ve kesim ürününün jel görüntüsü (M: 100 bp DNA markırı, A1, B1, C1 ve D1: bu kod numarasına sahip deneklerin kesim enzimi olmadan kesim işlemi yapıldıktan sonraki jel görüntüleri A2, B2, C2 ve D2 kesim enzimi varlığında gerçekleşen kesim işlemi sonucu oluşan jel görüntüsü).

Çalışma gruplarından elde edilen bulgulara istatistiksel analiz uygulandığında; rs599839'da majör (A) allelinin (minör (G) alleli) görülme sıklığı sağlıklı kontrol grubuna göre hasta grubunda ciddi bir fark bulunmamıştır (hasta grubunun %69, sağlıklı kontrol grubunda %67). Benzer şekilde koruyucu (AG + GG) allelinin; kontrol grubunun % 35'ini, hasta grubunun ise % 32'sini oluşturduğu belirlenmiştir. Çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Çalışma gruplarının rs599839 genotip sıklığı Tablo 20'de ve bulundukları allellerin % değerinin grafiksel olarak gösterimi Şekil 34'de verilmiştir.

Tablo 20. Rs 599839'un genotip sıklığı

	Kontrol (n=49)	KAH (n=162)
AA, % (n)	67 (33)	68 (111)
AG,% (n)	29 (14)	25 (40)
GG, % (n)	4 (2)	7 (11)



Şekil 34. Rs599839 genotipinin katılımcılarda bulunma sıklığı.

Çalışma grupları risk ve koruyucu allel bulundurma durumlarına göre sınıflandırılması; lipit, lipoprotein, ve apoprotein seviyeleri de bu gruplandırmaya göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 21'de verilmiştir. Gruplar arasında farklılık bulunduğu ancak bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Ayrıca sadece KAH grubundaki bireyler rs599839'da buldukları allel durumuna göre lipit, lipoprotein ve apoprotein seviyeleri analiz edilmiştir ve istatistik analiz sonucunda anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0,05$). Analiz sonuçları Tablo 22'de gösterilmiştir.

Tablo 21. Çalışmada yer alan katılımcıların taşıdıkları allele göre lipid, lipoprotein ve apoprotein profili

Ölçülen parametreler	Risk aleli (AA) (n=144)	Koruyucu alel (AG + GG) (n=68)
TAG (mg/dL)	139 (145-176)	136 (143-208)
TK (mg/dL)	212 (202-218)	207 (199-226)
LDL-K (mg/dL)	132 (129-144)	135 (128-151)
HDL-K(mg/dL)	42 (41-44)	39 (39-44)
Apo A (mg/dL)	114 (112-119)	107 (109-120)
Apo B (mg/dL)	111 (105-115)	105 (103-120)
Apo E (mg/dL)	4,00 (3,98-4,44)	4,40 (4,05-5,17)

Tablo 22. KAH grubunun genotiplerine göre lipid, lipoprotein ve apoprotein profilleri

Ölçülen parametreler	AA (n=111)	AG (n=40)	GG (n=11)
TAG (mg/dL)	146 (148-186)	153 (147-258)	151 (113-203)
TK (mg/dL)	210 (199-218)	217 (193-233)	209 (168-265)
LDL-K (mg/dL)	129 (126-144)	125 (120-154)	138 (101-183)
HDL-K(mg/dL)	41 (40-44)	38 (38-47)	40 (34-46)
Apo A (mg/dL)	109 (107-116)	104 (104-121)	97 (90-121)
Apo B (mg/dL)	111 (105-117)	107 (97-124)	103 (82-137)
Apo E (mg/dL)	3,90 (3,87-4,41)	4,10 (3,82-5,06)	4,10 (3,04-5,46)

Çalışmaya katılan denekler ister risk alleli isterse koruyucu allel buldursun lipoprotein altfraksiyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). Bu analizle ilişkili sonuçlar Tablo 23’de verilmiştir.

Tablo 23. Çalışmada yer alan bütün katılımcıların allele göre lipoprotein altfraksiyon seviyeleri

Ölçülen parametreler	Risk aleli (AA) (n=144)	Koruyucu alel (AG + GG) (n=68)
Ortalama LDL çapı (A°)	268 (265-268)	269 (266-269)
Sd-LDL (mg/dL)	6 (14-24)	4 (9-24)
Lb-LDL (mg/dL)	63 (58-68)	65 (56-70)
L-HDL (mg/dL)	11 (10-12)	10 (9-12)
M-HDL (mg/dL)	20 (19-21)	19 (18-21)
S-HDL (mg/dL)	11 (10-12)	11 (10-12)

Sadece KAH grubunda yer alan kişilerin rs599839’da bulundukları genotip çeşidine göre lipoprotein altfraksiyonları değerlendirildiği zaman, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Analiz sonuçları Tablo 24’de verilmiştir.

Tablo 24. KAH grubunun bulundurdukları allele göre lipoprotein altfraksiyon seviyeleri

Ölçülen parametreler	AA (n=111)	AG (n=40)	GG (n=11)
Ortalama LDL çapı (A°)	267 (263-267)	269 (264-268)	268 (260-270)
Sd-LDL (mg/dL)	7 (16-28)	5 (10-32)	5 (2-66)
Lb-LDL (mg/dL)	61 (55-68)	61 (51-73)	54 (33)
L-HDL (mg/dL)	10 (10-12)	8 (8-13)	10 (8-11)
M-HDL (mg/dL)	20 (19-21)	20 (18-22)	19 (16-23)
S-HDL (mg/dL)	11 (11-12)	12 (11-14)	12 (9-14)

Lipoprotein altfraksiyon değerleri çok geniş aralıklarda dağılım gösterdiği için elde edilen sonuçlara log transformasyonu uygulanmıştır ve bu işlem sonrası istatistik analiz yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda sd-LDL'nin risk alleli grubunda istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Risk alleli taşıyanlarda log sd-LDL 0,85 (0,87-1,07) mg/dL iken koruyucu allel taşıyanlarda 0,60 (0,69-1,00) mg/dL dir ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Risk alleli ve koruyucu allel taşıyan bireylerin aterojenite indeksleri değerlendirildiğin de, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gösterilmiştir ($p>0,05$). Hesaplanan aterojenite indeksleri Tablo 25'de verilmiştir.

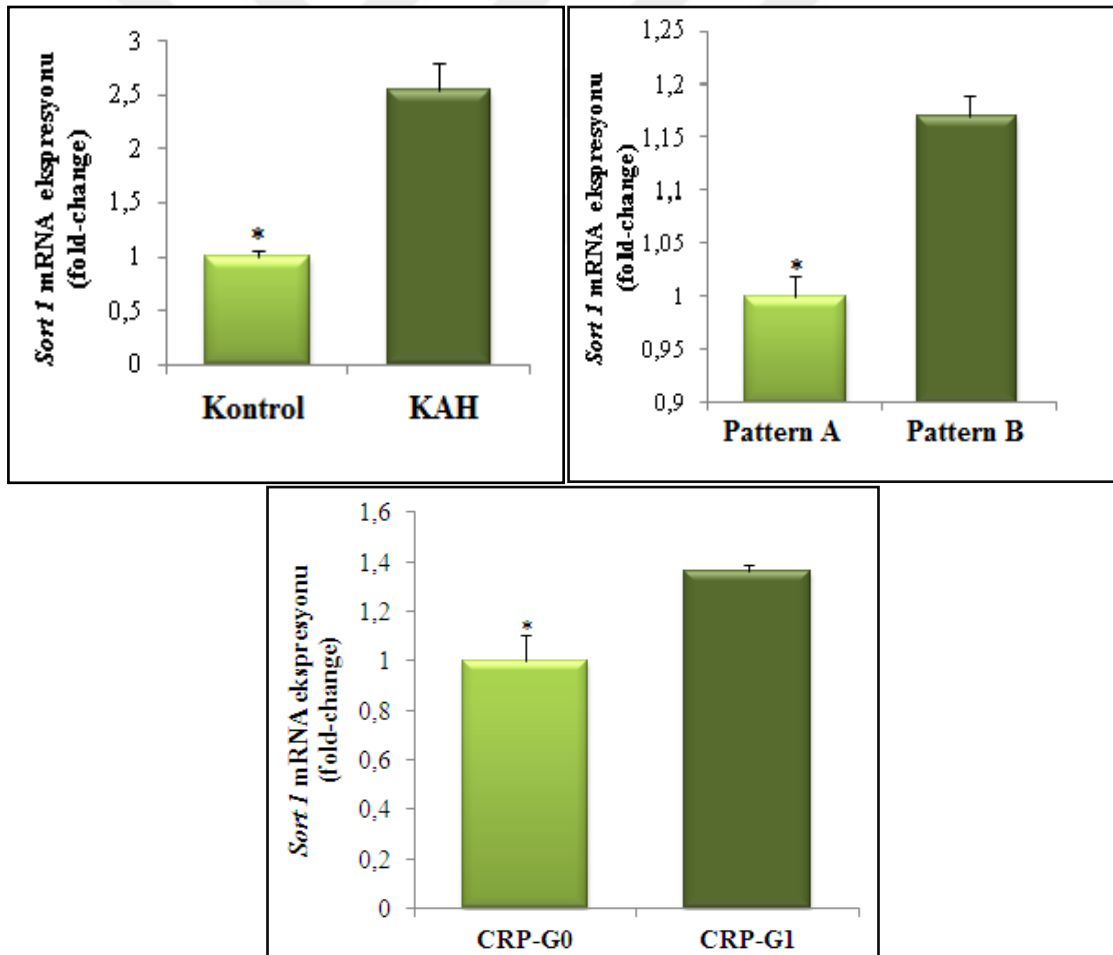
Tablo 25. Taşıdıkları risk ve koruyucu allele göre aterojenite indeksleri

Aterojenite indeksleri	Risk aleli (AA) (n=144)	Koruyucu alel (AG + GG) (n=68)
TK/HDL-K	5,06 (4,92-5,51)	5,26 (4,97-5,77)
TG/HDL-K	3,58 (3,62-4,85)	3,65 (3,75-6,12)
Sd-LDL/L-HDL	0,53 (1,42-4,56)	0,38 (1,39-4,95)
Sd-LDL/S-HDL	0,50 (1,18-2,22)	0,40 (0,99-2,45)
LDL-K/Apo B	1,23 (1,21-1,31)	1,34 (1,21-1,37)
Apo B/Apo A	0,93 (0,91-1,03)	0,92 (0,88-1,06)

Sortilin proteini *Sort1* geni tarafından kodlanan çok sayıda ligand bağlama özelliğine sahip bir sorting proteinidir. Yapılan birçok çalışmada sortilinin lipoprotein metabolizmasıyla rol oynayan bazı enzim ve protein ile ilişkili olduğu dolayısıyla KAH üzerinde etkili olabileceği öne sürüldüğü için *Sort1* mRNA ekspresyonunu çalışma gruplarında nasıl bir değişim gösterdiği araştırılmış ve ekspresyon düzeylerinin lipoprotein fenotipi ve rs599839'daki risk alleli varlığından nasıl etkilendiği incelenmiştir. Hasta grubunda *Sort1* gen ekspresyonu kontrol grubundan daha yüksek olduğu tespit edilmiş ve bu farklılığın istatistiksel olarak yüksek anlamlılık düzeyinde olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). Benzer şekilde *Sort1* gen ekspresyonu fenotip A ve fenotip B'ye sahip bireylerde karşılaştırılmış ve fenotip B'ye sahip bireylerde gen ekspresyonu daha yüksek tespit edilmiştir. Gruplar arasındaki bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Ayrıca yapılan ROC analizi sonucunda CRP'nin cut-off değeri 0,25 mg/dL olarak belirlendi ve buna göre CRP düzeyleri gruplandırılarak (CRP-G0 ve CRP-G1) *Sort 1* gen ekspresyonu ile ilişkisi karşılaştırılmıştır. CRP-G0 (CRP düzeyi 0,25 mg/dL altında olanlar) ile karşılaştırıldığında CRP-G1'de (CRP düzeyi 0,25 mg/dL üstünde olanlar) gen ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Yapılan analiz sonucunda *Sort1* mRNA ekspresyon değerleri Tablo 26'da ve Şekil 35'de verilmiştir.

Tablo 26. *Sort1* mRNA ekspresyon değerleri

Gruplar	<i>Sort1</i> mRNA ekspresyonu (fold-change)	P değeri
Kontrol	1,0 ± 0,05	
KAH	2,5 ± 0,25	0,001
Fenotip A	1,0 ± 0,02	
Fenotip B	1,2 ± 0,03	0,001
CRP-G0	1,0 ± 0,03	
CRP-G1	1,4 ± 0,01	0,001



Şekil 35. *Sort1* mRNA ekspresyon değerlerinin grafiksel gösterimi (* : p < 0,001).

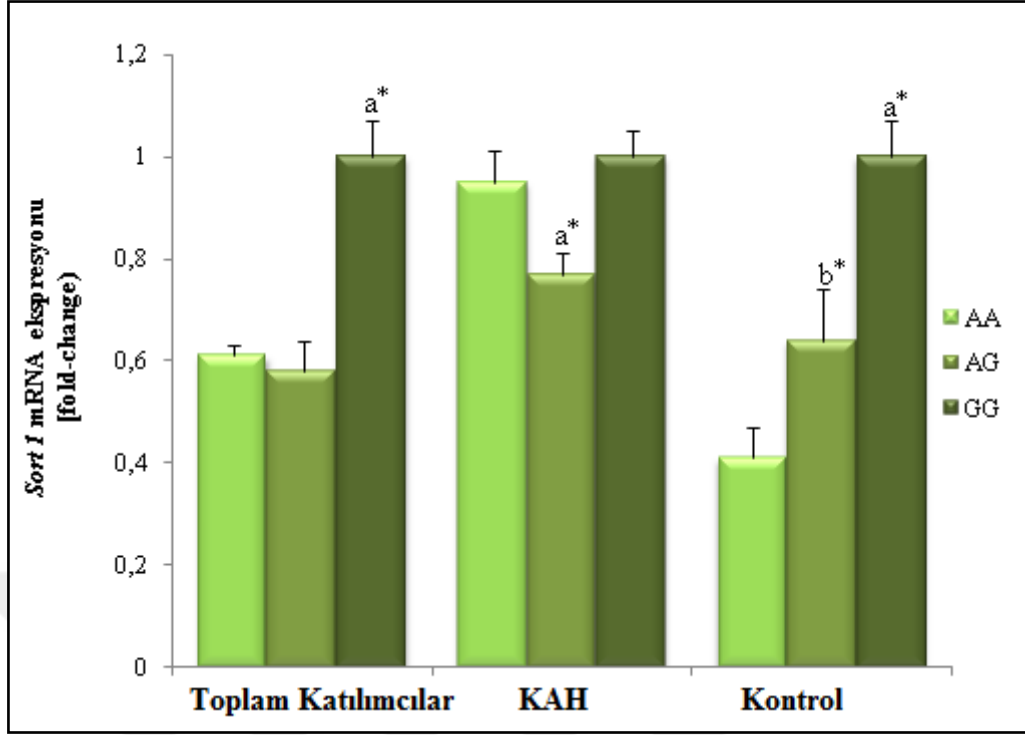
Sort1 gen ekspresyonu ile rs599839'daki SNP arasındaki ilişki incelendi. Çalışmada yer alan toplam katılımcılarda, rs599839'da homozigot A alleli bulunduranlarda homozigot G allele göre gen ekspresyonu daha düşük seviyede gözlemlenmiş ve bu farklılığın istatistiksel olarak $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Ancak heterozigot A alleli varlığında *Sort1* gen ekspresyonu, homozigot G alleli bulunduranlardan düşük, homozigot A alleli bulunduranlar ile benzer düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Heterozigot A alleli ile homozigot G alleli arasındaki farklılıkta istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$). Sadece KAH grubu katılımcılarında polimorfizm ve gen ekspresyonu arasındaki ilişki incelendiğinde, homozigot A ve G allel varlığında gen ekspresyonunda istatistiksel açıdan anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p > 0,001$). Fakat AG alleli bulunduran bireylerde, hem AA hem de GG alleli taşıyanlara kıyasla *Sort 1* gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlemiştir ($p < 0,001$). Yalnızca kontrol grubunda yer alan katılımcılar ele alındığında ise, homozigot G alleli bulunduranlarda hem homozigot hem de heterozigot A alleli taşıyanlara göre gen ekspresyonunun $p < 0,001$ düzeyinde anlamlılıkla arttığı saptanmıştır. Çalışma sonuçları Tablo 27'de ve Şekil 36'da verilmiştir.

Tablo 27. Farklı çalışma gruplarında rs599839 genotiplerine göre *Sort1* mRNA ekspresyon değerleri

Çalışma Grupları	rs599839	<i>Sort 1</i> mRNA ekspresyonu (fold-change)
Toplam Katılımcılar	AA	0,61 ± 0,02
	AG	0,58 ± 0,06
	GG	1,00 ± 0,07 a*
KAH	AA	0,95 ± 0,06
	AG	0,77 ± 0,04 a*
	GG	1,00 ± 0,05
Kontrol	AA	0,41 ± 0,06
	AG	0,64 ± 0,10 b*
	GG	1,00 ± 0,07 a*

a* : diğer gruplar ile p<0,001 düzeyinde farklılık göstermektedir.

b* : AA genotipine göre p< 0,001 düzeyinde farklılık göstermektedir.

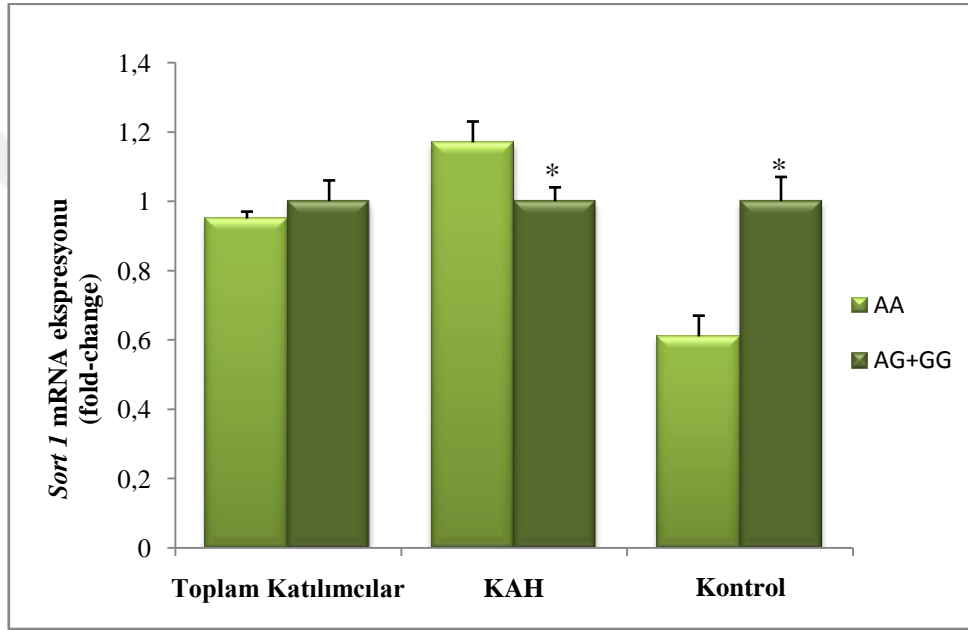


Şekil 36. Farklı çalışma gruplarında rs599839 genotiplerine göre *Sort1* mRNA ekspresyon değerlerinin grafiksel gösterimi (a* : diğer gruplar ile $p < 0,001$ düzeyinde farklılık göstermektedir, b* : AA genotipine göre $p < 0,001$ düzeyinde farklılık göstermektedir).

Rs599839'daki allelleri KAH riski açısından koruyucu (AG + GG) allel ve risk (AA) alleli olarak sınıflandırıp, bu sınıflandırmaya göre *Sort1* gen ekspresyonundaki değişim analiz edilmiştir. Toplam katılımcılarda risk alleli veya koruyucu allel varlığında gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$). KAH'da risk alleli bulunduranlar ile koruyucu allel bulunduranlar kıyaslandığında, AA ya sahip olanlarda *Sort1* gen ekspresyonunun daha yüksek olduğu saptanmıştır. Gruplar arasındaki bu farklılığın istatistiksel olarak $p < 0,01$ seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde sadece kontrol grubunda bu alleller karşılaştırıldığında ise, koruyucu allel taşıyanlarda gen ekspresyon istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek düzeyde bulunmuştur ($p < 0,001$). Risk ve koruyucu allel varlığına göre *Sort1* gen ekspresyonundaki farklılığın analiz sonuçları Tablo 28'de ve Şekil 37'de verilmiştir.

Tablo 28. Farklı çalışma gruplarında rs599839 de yer alan risk alleleline göre *Sort1* ekspresyonu

<i>Sort1</i> mRNA ekspresyonu (fold-change)	Toplam Katılımcılar		KAH		Kontrol	
	AA	AG + GG	AA	AG + GG	AA	AG + GG
	0,95 ± 0,02	1,00 ± 0,06	1,17 ± 0,06	1,00 ± 0,04	0,61 ± 0,06	1,00 ± 0,70
P değeri	>0,05		<0,01		<0,001	



Şekil 37. Farklı çalışma gruplarında rs599839 de yer alan risk alleleline göre *Sort1* ekspresyonu (* : p < 0,001).

4. TARTIŞMA

Yeni milenyumda öne çıkan en önemli projelerden biri insan genom projesidir ve bu projede elde edilen sonuçların hastalıkların genetiğiyle ilgili paradigmaların yeniden gözden geçirilmesine, dolayısıyla hastalığın etyolojisini tanımlamada yeni yaklaşımlara neden olduğu ileri sürülmektedir. Artık günümüzde hastalıkların yalnızca tek gene ile ilişkili Mendelyan kalıtımla yeni nesillere aktarılmadığı toplumun büyük bir kısmını etkileyen hastalıkların (kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser, obezite ve mental bozukluklar gibi) birçok genin belli oranda birlikte katkısı sonucu oluştuğu ortaya çıkmıştır. Özellikle kardiyovasküler hastalıklarda olduğu gibi çevresel faktör ve ilerleyen yaş gibi etkenler dâhil olduğunda, kompleks kalıtımla oluşan poligenik hastalıkların ortaya çıktığı belirtilmektedir. Genetiğin hastalıklara katkısını anlamak ve hastalık patofizyolojik mekanizmalarını çözmek tedavi stratejilerinin en önemli aşamasıdır. İnsan genom özelliklerinin benzerlik düzeyi bireyler arasında %99,9'dur dolayısıyla bireyleri farklı yapan DNA'nın sadece %0,1'lik küçük bir kısmıdır (3 milyar DNA yapı taşının 3 milyonu). Kompleks hastalığın temelinde bireyler arasındaki bu çeşitlilik yatar ve bu çeşitliliğin iki ana türü vardır; SNP ve CNV (Copy Number Variation). Genom dizisindeki tek nükleotidlerin değişimiyle karakterize olan SNP'ler benzer fizyolojik şartlarda neden bazı bireylerin sağlıklı iken, diğerlerinin hastalığa yatkın olmasına, dahası aynı hastalığın farklı bireylerde farklı klinik tablo göstermesine ve hatta bazı bireylerin tedaviye olumlu yanıt verirken, diğerlerinin vermemesine büyük oranda açıklık getirmektedir. SNP'ler genomlar arası %0.1'lik yapısal değişikliğin büyük bir kısmını oluşturur ve bu farklılıkların bazıları zararsızken bazıları metabolik bozuklukla öne çıkan çeşitli hastalıklara (diyabet, kanser, koroner arter hastalığı) neden olur. Yaklaşık 15-30 milyon civarında SNP olduğu tahmin edilmekte ve bunların büyük bir kısmı gen kodlamayan bölgelerde (non-coding) yer aldığı belirtilmektedir (Manalio ve Collins, 2007; Goldstein, 2009; Hardy ve Singleton, 2009).

Genom boyu bağlantı çalışmaları (GWAS) olarak da isimlendirilen çalışma yöntemi SNP ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve diyabet gibi majör kompleks hastalıkların konusunu edinmektedir. Bu çalışmalarda hasta ve sağlıklı bireylerin DNA'ları karşılaştırılmaktadır. Böylece farklı bireylerdeki genetik varyantların herhangi bir varyant ile kalımsal özellikler bakımından ilişkili olup olmadığını göstermek mümkün

olmaktadır. GWAS çalışmalarına göre; bulunan varyantların hastalığı taşıyan kişilerde daha sık olması, SNP ile hastalığın ilişkili olduğunu ve ilişkili SNP'nin hastalık riskini etkileyen genom bölgesini işaretlediğini göstermektedir.

Son on yıldır yapılan GWAS çalışmaları ile metabolik ve kardiovasküler hastalıklarla ilişkili gen bölgeleri tanımlanmıştır. Başta *LDLR* ve *PCSK9* gibi genlerin kardiovasküler hastalıkta önemli rol oynadığı ortaya konmuştur. Bu genlerin yanı sıra birçok genin (*APOB*, *LDLRAP*, *LPL*, *APO E* ve *APO CI*) etkili olduğu tespit edilmiştir. Bunlar içerisinde en dikkat çekici olanlarda biri ise VSP10P domain reseptör ailesidir. VSP10P domain reseptör ailesi nörodejeneratif hastalıklarda sebepsel ajan olarak uzun süredir kabul görmektedir. Ancak metabolik bozukluklar ve kardiovasküler hastalıklar için sebep geni olması oldukça şaşırtıcı bulunmuştur. VSP10P domain reseptörlerinin yapısının LDLR benzer olması, bu reseptörün yeni bir lipoprotein reseptörü olabilir mi fikrini uyandırmıştır. Özellikle VSP10P domain reseptör ailesinin beş üyesinden biri olan sortilin'in kardiovasküler hastalıklar ve lipoprotein metabolizması ile yakından ilişkisi olduğunu gösteren çok az çalışmalarla ortaya konmuştur (Schmidt ve Willnow, 2016).

Yapılan mevcut çalışmada, gönüllü kontrol ve anjiyografi sonucu KAH tanısı konan hastalarda, hem sortilin gen ekspresyonu hem de sortilin ekspresyonunu etkilediği ileri sürülen kodlamayan (non-coding) rs599839 bölgesinin SNP sıklığı çalışılmış ve bu parametrelerin özellikle LDL altfraksiyonlarıyla ilişkisi ortaya konmuştur. Çalışma gruplarının *Sort1* gen ekspresyonu karşılaştırıldığında; kontrol grubuna göre KAH grubunda gen ekspresyonunun 2,5 kat arttığı tespit edilmiştir. Rs599839 SNP sonuçlarında ise gruplar arasında fark olmadığı, her iki grubun major (AA) ve minör (GG) alleli bulundurma yüzdelerinin aynı olduğu belirlenmiştir. Risk (AA) ve koruyucu (AG+GG) allelerinin *Sort1* gen ekspresyonu üzerine etkisi incelendiğinde toplam çalışma grubunda ekspresyonda dikkate değer farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Ancak her iki grup ayrı ayrı analiz edildiğinde ise; KAH grubunda risk alleli varlığında *Sort1* ekspresyonu artar iken kontrol grubunda risk alleli varlığında *Sort1* ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir.

Sortilin 1p13 kromozomunda yer alan *Sort1* geni tarafından eksprese edilen trans1 membran proteindir. Başta hepatositler olmak üzere birçok hücrede bulunan sortilinin lipoprotein metabolizması ve KAH üzerine etkileri tartışmalıdır. Yapılan literatür taraması sonucunda sortilinin özellikle hepatik lipoprotein metabolizmasındaki rolünün çok yönlü olduğu ve dolaşımdaki LDL-K seviyesini artıran veya azaltan birçok mekanizma içerdiği belirtilmiştir (Mortense vd., 2015). Sortilinin kardiovasküler hastalıklar ve lipoprotein metabolizması ile olan ilişkisini ortaya koyan ilk çalışma 2010'de Linsel-Nitschke ve arkadaşları tarafından karaciğer hücre kültüründe yapılmış ve bu çalışmada *Sort1* aşırı ekspresyonun dolaşımdaki LDL partikülünün azalmasını yol açtığını ortaya koymuşlardır (Linsel-Nitschke vd., 2010b). Ancak en kapsamlı çalışma iki farklı araştırma grubu tarafından gerçekleştirilmiştir: Bunlardan ilki Musunuru vd (2010) transjenik fare modellerinde yapmış oldukları çalışmadır. Bu çalışmada hepatositlerde sortilini kodlayan *Sort1* gen ekspresyonunun artışıyla plazma LDL-K düzeyleri arasında negatif bir korelasyon olduğunu ve dolayısıyla artmış sortilin seviyelerinin KAH riskini azaltabileceği öngörüsünde bulunmuşlardır (Musunuru vd., 2010). Gerek Linsel-Nitschke gerekse Musunuru'nun farklı çalışma modellerinde elde ettikleri benzer sonuçlarını şu şekilde açıklamışlardır; deney modellerinde LDL reseptörünü susturmuşlar ve buna rağmen LDL kolesterolün azaldığı bulgularından yola çıkarak sortilinin karaciğerde LDL reseptörü gibi davrandığını ortaya koymuşlardır. Sonuçta her iki araştırma grubu sortilinin plazma LDL-K düzeylerinde azalmaya neden olduğunu dolayısıyla KAH riskini düşürücü yönde etkisi olabileceğini ileri sürmektedirler. Yine Strong vd (2012) ise yapmış oldukları çalışmada sortilinin Apo B100 bağladığını ancak bu bağlanmanın lizozomal degradasyon ile sonuçlandığını tespit etmişlerdir. Sonuçta hepatik *Sort1* ekspresyonu artıkça plazma LDL-K düzeyinin azaldığı belirtilmiştir (Strong vd., 2012). Ancak diğer bir kapsamlı çalışmada ise, karaciğerde artmış *Sort1* ekspresyonunun plazma LDL-K düzeyinde artışa yol açtığı ve böylece KAH riskini yükseltebileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu araştırma grubu sortilinin LDL-K öncülü olan VLDL sekresyonunu artırdığını bu nedenle bu etkinin plazma LDL-K düzeylerindeki artışı şeklinde yansıdığını öne sürmüşlerdir (Kjolby vd., 2010). Benzer sonuç bir başka araştırma grubu (Gustafan ve ark.) tarafından da teyit edilmiştir. Gustafsen vd (2014) yaptığı çalışmada; sortilinin hepatositlerde PCSK9 sekresyonunu uyararak LDLR düzeylerini azalttığını öne sürmüşlerdir. Kısaca *Sort1* ekspresyonu artıkça plazma LDL-K seviyesi arttığını bildirmişlerdir (Gustafsen vd., 2014). Ancak

sortilinin PCSK9 üzerinden LDLR degradasyonunu uyardığı dolayısıyla dolaşımdaki LDL-K düzeylerini etkilemediğini gösteren çalışmalar da vardır (Butkinaree vd., 2015). Diğer taraftan Musunuru'nun sonuçlarına karşın Kjolby ve arkadaşlarının elde ettikleri bulgular arasında bir zıtlık söz konusudur. Bu farklılığın hem çalışmadaki fare modellerinin farklı olmasından hem de *Sort1* gen aktivasyonunda (aşırı eksprese olması ve susturulması) kullanılan tekniklerin farklılığından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Tallve Ai, 2011).

Sortilin ateroskleroz ile olan ilişkisi ise daha da karmaşıktır. Mortense vd (2014) yaptıkları çalışmada sortilinin lipoprotein metabolizmasındaki düzenleyici rolünden bağımsız olarak aterogenezisi doğrudan etkilediği gösterilmiştir. Sortilin ile ateroskleroz arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla yapılan bu araştırmada; LDL reseptör yolunu etkisizleştirmek üzere Apo E^{-/-} transjenik fareler kullanılmış ve bu farelerde ateroskleroz patogenezinin önemli hücrel faktörleri olan makrofaj ve T helper hücreleri tercih edilmiştir. Sortilin geni aşırı eksprese edilmiş (*sort1^{+/+}*) ve susturulmuş (*sort1^{-/-}*) bu transjenik fareler (Apo E^{-/-}) arasında lipoprotein boyutu veya plazma kolesterol açısından herhangi bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Ancak uyarılmış *Sort1* gen ekspresyonuna bağlı olarak yüksek ilgiyle inflamatuvar sitokinlerin (interlökin-6 ve interferon- γ) hücre içi trafiğinde (sorting) bir artış belirlenmiştir. Bu veriler ışığında sortilinin aterogenez lehine etkisinin lipit metabolizmasından ziyade enflamatuvar mekanizmayla ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Apo E^{-/-} transjenik farelerde *Sort1* gen ekspresyonunun baskılanmasının aterosklerotik lezyonda azalma ile sonuçlanması da bu öngörüye teyit etmiştir (Mortense vd., 2014). Bizim çalışmamızda da sortilin gen ekspresyon düzeylerinin analizi lökosit örneklerden elde edildiği için Mortense ve arkadaşlarının çalışma modeliyle benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla kontrol grubuna göre yüksek sortilin ekspresyon değerlerine sahip hasta grubunun lipit profillerinde herhangi bir anlamlı fark tespit edilmemiş olmasına rağmen çalışmamızın tek inflamatuvar parametresi olan CRP değerlerinin anlamlı bir şekilde daha yüksek çıkması Mortense'nin sonuçlarıyla uyumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca ROC analizi sonucu CRP için belirlenen cut-off değerine göre iki grup oluşturulmuş ve cut-off değerinin üzerinde olan grupta *Sort1* gen ekspresyonunun daha yüksek belirlenmesi sortilinin inflamasyonu artırıcı etkisi olabileceğini desteklemektedir. Ancak Patel vd (2015) LDLR^{-/-} fareler kullanarak immün hücrelerde sortilinin pro-aterosklerotik

etkisinin makrofajlar tarafından LDL-K'ün temizlenme yetersizliğinden kaynaklandığını öne sürmüşler ve böylece lipoproteinlerle ilişkili farklı bir yaklaşım sunmuşlardır. Ayrıca bu araştırmacı makrofajlarda *Sort1* gen aktivasyonunun sitokinlerden bağımsız olarak vasküler inflamasyonunu kolaylaştırarak ateroskleroz gelişimini doğrudan artırdığını da göstermişlerdir (Patel vd., 2015). Bütün bu bilgilerin ışığında; sortilinin hepatositlerde LDL reseptörü gibi davranarak plazma LDL-K düzeylerinin azalması lehinde etki gösterirken makrofajlarda ise CD36 ile SR-A reseptörlerden bağımsız ancak çöpçü reseptör gibi davranarak modifiye LDL'nin makrofajlarca uzaklaştırılmasına dolayısıyla köpük hücre oluşumuna neden olduğu görülmektedir. Sortilinin lipit metabolizması üzerine birbirine zıt yönde ikili davranış şekli aterojenik lipoprotein fraksiyonlarına karşı geliştirilecek tedavi stratejilerine ışık tutma potansiyeli olduğu düşünülmektedir (Patel vd., 2015).

Aterogenez üzerine etkileri düşünüldüğünde; lipoprotein ve altfraksiyonları pro- ve anti-aterojenik olarak sınıflandırılması son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Rizzo ve Berneis., 2006b). Bu bağlamda lipidik değişkenlerin değerlendirilmesi *Sort1* gen ekspresyonuna göre yapılmıştır. Mevcut çalışmada gruplar arasında lipit ve lipoproteinler düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını belirledi. Ancak lipoprotein alt sınıf analiz sonuçları; hasta ve kontrol grupların hem LDL hem de HDL alt sınıflarında anlamlı farklılık göstermiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak özellikle LDL alt sınıflarının fenotiplenmesi sonucunda oluşturulan pro- (pattern B) ve anti-aterojenik (pattern A) gruplar arasında *Sort1* gen ekspresyonu düzeyleri karşılaştırılmış, pattern B'de daha yüksek *Sort1* ekspresyonunu bulunmuştur. Yapılan literatür taramaları sonucunda *invivo* olarak elde ettiğimiz bulgularımızın tez konusu olan genin LDL altfraksiyonuyla ilişkisini ortaya koyan ilk çalışma olması açısından önemli olduğunu düşünmekte ve bundan sonra yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmaların bu konuyu daha ayrıntılı bilgi vereceği kanaatindeyiz. Transjenik farelerden elde edilen hücre kültürü çalışma sonuçları; gelecekte kurgulanacak insan çalışmalarına model olacağından sortilin-lipoprotein metabolizma ilişkisini ortaya konması açısından elde edilen sonuçların doğru irdelenmesi gerekliliğine inanmaktayız.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; sortilinin lipoprotein metabolizması ve aterogenez üzerine olası mekanistik etkilerine yönelik bazı ön

görülerde bulunulmuştur (Mortensen vd., 2015; Westerteps ve Tall, 2015). Sortilin makrofaj hücrelerde LDL reseptörü gibi davrandığı ve CD36 ile SR-A'dan bağımsız olarak köpük hücrenin en majör bileşeni olan modifiye LDL alınımına aracılık ettiği gösterilmiştir. Ayrıca sortilin ekspresyonu baskılandığında IL-6, TNF α ve IFN γ sekresyonunun inhibe olmasından dolayı enflamasyonunun azaldığı belirlenmiştir. Hepatositlerde ise sortilin LDL öncülü olan VLDL sekresyonuna aracılık ettiği dolayısıyla plazma LDL düzeyinde artışa yol açtığı öne sürülmüştür. Önerilen bir diğer mekanizma ise hepatositlerde sortilin PCSK-9 salınımını tetiklediği ve artan PCSK-9'un da LDL reseptörünün lizozomal degradasyonuna yol açarak dolaşımdaki LDL-K karaciğer hücreleri tarafından alınımını blokladığı iddia edilmektedir. Lipoprotein metabolizması ve ateroskleroz üzerinde sortilin etkisinin olumsuz yönde olduğu ile ilgili görüşler şuanda baskın iken sortilin anti-aterojenik etkisinin olduğu görüşü de halen geçerliliğini yitirmiş değildir (Westertep ve Tall 2015; Charles vd., 2016; Christoffersen ve Tybjaerg-Hansen, 2015).

Sort1 geninin yer aldığı 1p13 kromozomunda bulunan kodlamayan bölgelerde (non-coding) önemli SNP'ler tespit edilmiştir. Bu bölgelerle ilgili SNP'lerin sortilin ekspresyonu üzerine etkileri olduğu için LDL-K ve ateroskleroz ile güçlü ilişkisi olduğu belirlenmiştir. Bu varyantlar özellikle rs599839, rs646776, rs12740374, rs629301 ve rs4970834 olmak üzere kodlamayan 5 bölgede bulunmuştur. Belirtilen bu bölgelerdeki SNP'lerin koroner arter hastalığı, miyokart enfarktüsü, abdominal aort anevrizması, koroner kalsifikasyon ve koroner arter darlığı gibi birçok kardiyovaskular olaylarla yakından ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Kathiresan vd., 2008). *Sort1* gen ekspresyonu üzerine etkisi bakımından öne çıkan kodlamayan bölgelerden biri rs599839 dizisi olup bu bölgenin sortilin gen aktivasyonu ile ilişkisi oldukça ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır (Musunuru vd., 2010). Yine Schadt ve arkadaşlarının 400'den fazla otopsi karaciğerinde yapmış oldukları çalışmada koroner arter hastalığı ile ilişkili 7 tane SNP tespit etmişlerdir. Bu SNP'lerden sadece rs599839'un *Sort1* ekspresyonu ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşler ve bu varyantın majör allelinin (A) *Sort1* ekspresyonunun azalmasına dolayısıyla LDL-K düzeylerinin artışına neden olduğunu bildirmişlerdir (Schadt vd., 2008). Bu nedenle biz de araştırmamıza kodlamayan dizi olarak rs599839 bölgesini seçtik ve bu bölgedeki SNP'leri analiz ederek *Sort1* ekspresyonu ile rs599839 varyantları arasındaki ilişkiyi ortaya koyduk. Elde ettiğimiz sonuçlar; rs599839'da

majör allel varlığında *Sort1* ekspresyonunun azaldığını fakat bu azalmanın LDL-K düzeylerinde herhangi bir değişiklikle sonuçlanmadığını göstermiştir. Majör allel ve *Sort1* gen ekspresyonu arasındaki ilişkiyle ilgili bulgularımızın diğer araştırma gruplarının (Schadt vd., 2008; Musunuru vd., 2010) sonuçlarıyla uyumlu olmasına rağmen plazma LDL-K düzeyleriyle ilgili sonuçların farklı olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar arasındaki bu farklılık nedeninin rs599839'daki minör allel frekansının düşük olması ve mevcut çalışmaya kıyasla diğer araştırma grupları tarafından yapılan çalışmalarda daha fazla sayıda katılımcının yer almasıyla (kohort çalışması) ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca hem toplum farklılığı hemde SNP analiz metodundaki farklılıktan dolayı sonuçlarda farklılık olabileceği düşünülmektedir. Kardiyovasküler olaylar açısından koruyucu allel olarak kabul edilen minör allel (GG) frekansın yüksekliğine göre katılımcılar gruplandırıldığında ise; GG allel sıklığı yüksek olan grupta *Sort 1* gen ekspresyonunun artmış olduğu belirlenmiştir. Muandlein ve arkadaşları rs599839 varyantının koroner arter stenozuyla yakından bağlantılı olduğunu göstermişler ve minör allel varlığında MI riskinin azaldığını ileri sürmüşlerdir. Bu araştırma grubu majör (A alleli) allelin karaciğerde *Sort1* ekspresyonunda azalmaya, aortik damar duvarında ise artışa yol açtığını öne sürmüştür (Muandlein vd., 2012). Jones ve arkadaşları ise rs599839 SNP'i ve *Sort1* ekspresyonu ile abdominal aort anevrizması arasında ilişkiyi araştırmışlar ve kontrol grubuna göre hastalarda SNP'den bağımsız olarak *Sort1* ekspresyonunun yükseldiğini ortaya koymuşlardır (Jones vd., 2013). Diğer bir benzer çalışmada ise rs599839 minör allel (G alleli) varlığının azalan LDL-K düzeyi ve Mİ riski ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Wang vd., 2011). Diğer bir çalışmada, bu kodlamayan bölgenin minör allel varlığının koruyucu olduğu hem plazma LDL-K seviyesi hem de KVH riskinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca homozigot minör allel (GG) bulunduran bireylerin periferal lökositlerinden hazırlanan kültürlerde *Sort1* ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Linsel-Nitschke vd., 2010b). Çalışmamızda *Sort1* gen ekspresyonunun homozigot GG allel varlığında artması Linsel-Nitschke'nin bulgularıyla uyumludur. Ancak bu araştırmacı *Sort1* artışın hastalık riskinde azalmaya yol açabileceğini vurgularken biz araştırmamızda hasta grubunda gen ekspresyonunun daha yüksek olduğunu tespit ettik. İki çalışma sonuçları arasındaki farklılığın çalışma örneğinin tabiatından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Zira Linsel-Nitschke ve arkadaşları bulgularını periferal lökositlerin hücre kültüründen elde etmiş iken bizler KAH katılımcıların lökositlerinden elde ettik. Çalışma

modelimizin *in vitro* karakterinden dolayı elde ettiğimiz sonuçların daha gerçekçi olduğu kanaatindeyiz.

Samani ve arkadaşlarının sağlıklı bireyler üzerinde yaptıkları kohort çalışmada; rs599839 allel sıklıklarını homozigot G için % 6, homozigot A için % 62 ve heterozigot alleler için ise % 33 bulmuşlardır. Bu araştırma grubu majör (A) allelini risk alleli olarak niteleyerek her bir risk allele karşılık serum kolesterol düzeyinde yaklaşık 6,5 mg/dL'lik bir artış tespit etmişlerdir (Samani vd., 2008). Mevcut çalışmada da yukardaki sıraya göre allel sıklıkları % 4, % 67 ve % 29 şeklinde bulunmuştur ve bu bulgu Samani ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyumludur. Kleber ve arkadaşları ise kontrol grubuna göre KAH grubunda rs599839 AG ve GG allel sıklığının istatistiksel olarak daha düşük olduğunu belirtmişlerdir (Kleber vd., 2010). Fakat mevcut çalışmada kontrol ve hasta grubu arasında % allel sıklığı bakımından bir farklılık tespit edilememiştir. Kleber ve arkadaşları çalışmaya katılan bireyleri taşıdıkları allellere göre gruplandırıp plazma lipit, lipoprotein ve apolipoprotein seviyelerini analiz etmişlerdir. Homozigot A alleli taşıyan bireyler G alleli taşıyanlara göre plazma LDL-K, LDL-TG ve Apo B seviyelerinin daha düşük olduğunu ve LDL yarıçapının da azaldığını bulmuşlardır. Yine homozigot G alleli taşıyanlarda plazma TG düzeyinin de düştüğü gösterilmiş ve G allelinin KAH riski açısından koruyucu olduğunu belirtmişlerdir (Kleber vd., 2010). Benzer şekilde Samani ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada rs599839 varyantındaki allel sıklığı ile serum kolesterol ve LDL-K seviyeleri arasında bir farklılık belirlemiş olsa da HDL-K düzeyinde bir farklılık bulamadıklarını bildirmişlerdir (Samani vd., 2008). Yapılan mevcut çalışmada katılımcıları allel sıklığına göre sınıflandırarak rutin lipit parametreleri karşılaştırıldığında lipit, apoprotein, lipoprotein ve altfraksiyonlarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ancak SdLDL-K log transformasyonu yapılmış ve homozigot G alleli taşıyanlarda SdLDL-K'ün istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir ki bu sonuç Kleber'in azalmış LDL-K çapı bulgusuyla uyumludur. Bulgularımızın farklı olması Kleber ve Samani'nin konu edindiği çalışma modelinden (kohort çalışması) farklı olmasından yani bu katılımcı sayısının daha kısıtlı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Son yıllarda serum kolesterol seviyelerinin belirlenmesi hatta bu kolesterolün KAH açısından pro-aterojenik (LDL-K) ve anti-aterojenik (HDL-K) fraksiyonlarının tayin edilmesi bile hastalık riskinin değerlendirilmesinde yetersiz kaldığı belirtilmektedir (Rizzo ve Berneis, 2007; Krauss ve Dreon, 1995). Geleneksel serum lipit profili tayininden ziyade lipoprotein alt sınıflarının incelenmesi, hastalık riskinin ortaya konulması bakımından daha açıklayıcı olacağı birçok çalışmada bildirilmiştir (Krauss vd., 2005; Rizzo ve Berneis, 2006a; Ramirez ve Hu, 2015). Mevcut çalışmada da kontrol ve KAH grupları arasında plazma lipit ve lipoprotein seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Diğer tarafından grupların lipoprotein LDL-K altfraksiyon analizi sonucunda; sağlıklı gönüllülere göre KAH grubunda pro-aterojenik özellikli SdLDL-K miktarının daha yüksek olduğu buna karşılık anti-aterojenik fraksiyon olan LbLDL-K düzeylerinin ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Koba vd (2008) yapmış olduğu çalışmada; kontrol grubuna göre hastalarda SdLDL seviyesinin yüksek olduğunu tespit etmiş ve SdLDL partikülü ile onun yüksek konsantrasyonu KAH için kuvvetli bir risk faktörü olduğunu öne sürmüşlerdir (Koba vd., 2008). Yine bir diğer araştırma grubu da, koroner arter hastalarında SdLDL'nin daha yüksek oranda, LbLDL'nin ise daha düşük oranda olduğunu belirtmişlerdir (Hoogeveen vd., 2014). Bulgularımız bu araştırma gruplarının verileriyle uyum göstermektedir. Benzer şekilde bir başka çalışma ekibi de plazma LDL-K, HDL-K ve TG seviyelerinin normal sınırlarda olmasına rağmen hastaların üçte birinden daha fazlasının fenotip B'ye sahip olduklarını belirlemişler ve sadece LDL-K miktarının analiz edilmesi KAH riskini değerlendirmede yetersiz kalacağını vurgulamışlardır (Malhotra vd., 2012). Mevcut çalışmada da sağlıklı gönüllü ile KAH grubunun plazma LDL-K, HDL-K, TK ve TG düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa da hasta grubunda fenotip B'nin daha yüksek seviyede olduğu gösterildi ve bu sonuçlarımızda Malhotra ve arkadaşlarının bulguları ile uyumludur. Ayrıca Xu ve arkadaşları ortalama LDL partikül çapının KAH grubunda daha küçük olduğunu tespit etmişler (Xu ve Fu, 2015). Yine benzer diğer bir çalışmada Manocha ve arkadaşları tarafından yapılmış ve onlarda kontrol grubuna göre KAH grubunda ortalama LDL çapını istatistiksel olarak anlamlı derecede daha küçük bulmuşlar (Manocha vd., 2014). Mevcut çalışmamızda da ortalama LDL çapı koroner arter hastalarında daha düşük olduğu belirlenmiş ve bu bulgular diğer araştırma gruplarının sonuçları ile uyumludur. Hirano ve arkadaşları SdLDL'nin daha büyük

fraksiyonlara göre reseptörüne (LDL-R) ilgisinin düşük olduğunu dolayısıyla daha uzun plazma yarı ömürlü olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca SdLDL, oksidatif strese karşı daha hassas olduğundan onun okside şekillerinin arter duvarına daha kolay yapıştığını belirtmişlerdir. (Hirano vd., 2005). Bu da LbLDL'ye göre SdLDL'nin daha aterojenik olmasına dolayısıyla KAH riski ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir.

Plazma kolesterolünün HDL fraksiyonu yalnızca kolesterol içermediği, protein muhtevasının çok zengin olmasının yapısında yer alan enzim ve proteinlerden kaynaklandığı uzun zamandır bilinmektedir. Dolayısıyla HDL'nin anti-inflamatuar/oksidant/trombotik/ fibrotik ve NO salınımını uyarma gibi pek çok fonksiyonu vardır (Navab vd.,2011). Kardiovasküler riski ve aterosklerotik süreci değerlendirmede HDL alt sınıflarının plazma HDL-K'ye göre daha tatmin edici kanıtlar sunabileceği öne sürülmektedir. Ancak HDL altfraksiyonlarının anti-aterojenik rolünün tartışmalı olduğu bildirilmiştir. Çoğu araştırma sonuçları LHDL seviyesinin düşük ve SHDL düzeyinin yüksek olması KAH riskini artırdığını öne sürerken (Zeljkoic vd., 2008 ;Muth vd., 2010; Goliasch vd., 2012; Fendler., 2014) bazı çalışmalar plazma LHDL partikülünün artmış KAH riskiyle yakından ilişkili olduğunu ileri sürmüştür (Gugliucci vd., 2013; Watts vd., 1993). HDL altfraksiyonlarının KAH riski ile ilişkisindeki farklı sonuçların sebebinin HDL altfraksiyon analizinde uygulanan metotların farklılığından kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Bostan vd., 2015). Altfraksiyon analizinde kullanılan % 3'lük PAGE elektroforez yardımıyla yapılan çalışmalarda da kontrol grubuna göre KAH grubunda LHDL konsantrasyonunu düşük, SHDL seviyesini yüksek bulurken MHDL seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır (Xu ve Fu, 2015; Gao vd., 2016). Mevcut çalışmada kontrol grubuna göre KAH'larda daha düşük LHDL-K ve daha yüksek SHDL-K düzeylerini tespit ettik. Elde ettiğimiz bu bulgularda literatür sonuçlarıyla uyumludur. Apo AI'in LHDL yapısında daha fazla yer aldığı ve LHDL'nin kardiovasküler koruyucu etkisinin yapısındaki Apo AI ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Gao vd., 2016). Bu açıdan bakıldığında mevcut çalışmada da plazma Apo A düzeyinin KAH grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma gruplarında apoprotein değişimleri değerlendirildiğinde; Apo A ve E kontrol grubunda daha yüksek bulunurken plazma Apo B düzeyleri arasında istatistiksel

olarak her hangi bir fark bulunmadı. Apo E'nin VLDL ve şilomikron kalıntılarını hepatik temizlenmesinde ve HDL'nin karaciğer tarafından tanınmasında önemli rol oynadığı ve böylece de plazma kolesterol ve TAG seviyeleri ile dolaşımdaki lipoprotein konsantrasyonunu etkilediği dolayısıyla plazmada artmış Apo E düzeyi ile artmış kardiyovasküler ölüm riski arasında ciddi bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (Mooijaart vd., 2006).

Kardiyovasküler olay risklerinin değerlendirilmesinde geleneksel lipit ve lipoprotein profillerinden ziyade lipoprotein alt sınıflarının analiz edilmesi gerektiği yaklaşımı giderek ağırlık kazanmakla beraber lipoprotein alt sınıflarını analiz eden metotların [ultrasantrifüj, NMR, iki boyutlu jel elektroforezi, PAGE elektroforezi (lipoprint sistem)] çok uzun olan analiz süresi, uzman ekip gerekliliği ve yüksek maliyeti nedeniyle klinik alanlarda kullanımı son derece sınırlıdır. Bu sebeple aterosklerotik indeks hesaplaması yapılarak özellikle LDL boyutunun belirlenmesi KAH riskinin ön görüşünde (prediktivite) önem arz ettiği ileri sürülmektedir (Mora vd., 2009). Bu düşünceden yola çıkarak aterosklerotik indeks hesaplamasını yaptık ve çalışma grupları arasındaki farklılıkları araştırıldı. Kontrol grubuna göre KAH grubunda TAG/HDL-K ve Apo B/Apo A oranlarının daha yüksek olduğu ve LDL-K/Apo B oranı ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Özellikle LDL-K/Apo B oranı LDL çapının bir göstergesi olduğu için bu oranın LDL çapının öngörülmesinde önemli bir indekstir (Tanı vd., 2011). Lipoprint sistemi ile tespit edildiği düşük LDL çapının hastalarda daha yüksek olmasına benzer şekilde bu oranın da hasta grubunda daha düşük bulunmuştur. Çalışmaya katılanların tümü dikkate alındığında ise LDL-K/Apo B oranıyla ortalama LDL çapı arasında pozitif belirgin bir korelasyon görülmüştür ($r=0,274$, $p<0,001$). Bu sonuç; LDL-K/Apo B oranının LDL çapının göstergesi olduğu ve KAH grubunda bu oranın yüksek olduğu gösteren çalışma sonuçlarıyla uyumludur (Tanı vd., 2011). Dolayısıyla aterosklerotik tartışmasız olan LDL çap büyüklüğünü rutin ölçümlerle elde edilen lipit parametreleriyle değerlendirilmesinin daha az maliyetli olacağı ve daha kısa sürede elde edileceğinden dolayı çok değerli olduğunu düşünmekteyiz. Apo B/apo AI oranı pro- ve anti-aterosklerotik partiküller arasındaki dengeyi gösterdiği ve artmış kardiyovasküler risk profilli kişilerde bu oranın da yüksek olduğu ortaya konmuştur (Walldius, 2012). Bu çalışmada da kontrol grubuna göre KAH'larda Apo B/Apo AI oranı yüksek bulunmuştur. Diğer bir indeks olan TAG/HDL-K oranı ise sağlıklı gönüllü

grubu göre hasta grubunda daha yüksek bulunmuş ve da Luz ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma sonuçlarıyla uyumludur (Da Luz vd., 2008). Ayrıca Hanak yaptığı çalışmada TAG/HDL-K oranı ile fenotip B arasında pozitif bir ilişki tespit etmişlerdir (Hanak, 2004). Mevcut çalışmada da TAG/HDL-K oranı ile plazma SdLDL seviyesi arasındaki pozitif korelasyon ($r= 0,254$, $p<0,01$) belirlenmiştir ve bu bulgumuz Hanak'ın araştırma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. CETP aracılığı TAG'ce zengin VLDL fraksiyonundan HDL fraksiyonuna TAG transferi olurken aynı anda ester kolesterolün VLDL'ye geçişi sonucu kolesterolce zengin LDL fraksiyonundaki (özellikle SdLDL) artış bu aterojenik oran ile SdLDL-K arasındaki pozitif ilişkiyi açıklayabileceği düşünülmektedir. Koroner arter hastalık riskini değerlendirilmesinde ve uygulanan tedavilerin takibinde yukarıda belirtilen aterojenik indekslerin kullanılabilirliğini düşünülmekte ve bu bulgular ışığında acaba SdLDL/L-HDL ve SdLDL/S-HDL oranlarının hastalık risk öngörüsünde ne kadar etkilidir sorusuna cevap bulmaya çalışıldı. Yapılan analiz sonucunda sağlıklı kontrol grubuna göre KAH grubunda her iki oranda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi. Ancak yapılan tarama sonrasında SdLDL/L-HDL ve SdLDL/S-HDL oranlarını konu eden çalışmayla karşılaşmadığımız için sonuçlarımızı karşılaştırma olanağı bulamadık. Katılımcılar risk allele göre sınıflandırılıp bu indeksler karşılaştırıldığında ise; bu indekslerde herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Yine literatürde rs599839 risk allele göre sınıflandırıp aterojenik indeks hesaplamalarını konu edinen araştırmalara rastlanmadığından dolayı sonuçlarımızı karşılaştıramadık.

Bu çalışmada kromozom 1p13 gen bölgesinde yer alan sortilin proteinini kodlayan *Sort1* gen ekspresyonunun lipoprotein metabolizması üzerindeki etkisi aynı gen bölgesinde kodlamayan alanda yer alan rs599839 SNP'i eşliğinde değerlendirildi. Benzer demografik özelliklere sahip sağlıklı gönüllü ve koroner arter hastaları arasındaki bu değişkenler karşılaştırıldı. Hasta grubunda sortilin gen ekspresyonu daha yüksek çıkmış ancak bu farklılığa lipoprotein altfraksiyonları eşlik ederken plazma lipit profilinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Diğer taraftan *Sort1* gen ekspresyonuyla ilişkili kodlanmayan bölgenin varyant sıklıkları hasta-kontrol grubunda benzer bulunmuştur. Ayrıca risk (AA) veya koruyucu (AG + GG) allel bulundurmalarına göre gruplandırılıp karşılaştırıldığında plazma lipit, lipoprotein, apolipoprotein ve lipoprotein alt sınıflarında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Bu

allellerin homozigot A varlığında KAH grubunda *Sort1* gen ekspresyonunun arttığı, kontrol grubunda ise azaltığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar sortilin düzeylerinin farklı mekanizmalarla (aterojenik lipoprotein fraksiyonu ve inflamatuvar mediatörler) koroner arter hastalığı ile yakından ilişkisi olabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışması, *Sort1* gen ekspresyonunun KAH riski ve LDL fenotipleri üzerindeki etkilerini değerlendiren ilk *invivo* çalışmadır. Ancak rs599839 SNP değişiminin, gerek plazma lipit seviyeleri gerekse KAH riskini değerlendirme üzerine olan etkisini ortaya koymak için daha fazla katılımcıyla çalışılması gerekliliği aşikar şekilde ortadadır. Hem literatür bilgilerine bakıldığında hem de bu çalışma sonucu elde edilen bulguların; sortilin protein etkisi üzerinden koroner arter hastalığı tedavisinde kullanılabilir yeni terapötik ajanların geliştirilmesine ışık tutacak yeni hedefleri ortaya çıkartabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

1. Çalışma grupların demografik bulguları karşılaştırıldığında; yaş, hipertansiyon, DM, dislipidemi ve sigara bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0,01$). Ancak cinsiyet, VKİ ve bel çevresi açısından fark olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

2. Lipit ve apoprotein profilleri karşılaştırıldığında ise;

a. Gruplar arasında TAG açısından bir fark olduğu fakat bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Ayrıca gruplar arasında TK, LDL-K ve HDL-K düzeyleri bakımından da herhangi bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$).

b. Serum apoprotein seviyeleri incelendiğinde ise, kontrol grubuna göre KAH grubunda Apo A ve Apo E düzeylerinin anlamlı düzeyde daha düşük olduğu ($p<0,05$) gösterilirken Apo B seviyelerinde herhangi bir anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

3. Çalışma gruplarının lipoprotein alt sınıfları analiz edildiğinde;

a. Kontrol grubuna göre hasta grubunda SdLDL düzeyleri belirgin bir şekilde daha yüksek, ortalama LDL çaplarının daha küçük ve LbLDL seviyelerinin ise daha düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

b. Çalışılan diğer bir lipoprotein alt fraksiyonu olan HDL alt sınıfları ise; KAH'ların kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük L-HDL ve daha yüksek S-HDL fraksiyonlarına sahip olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$). Buna karşın M-HDL seviyelerinde herhangi bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$).

c. Çalışmada yer alan katılımcıların LDL alt fraksiyonlarını fenotiplerine göre değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre KAH'da daha yüksek sıklıkta fenotip B ve daha düşük fenotip A sıklığı gözlemlenmiştir ($p<0,001$).

d. Grupların LDL çapı karşılaştırıldığında ise KAH grubu daha küçük boyutlu LDL'ye sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

4. Çalışma gruplarının lipidik parametreleriyle ilişkili ateroskleroz indeksleri incelendiğinde;

a. KAH grubunda TG/HDL-K, LDL-K/ApoB ve ApoB/ApoA oranları daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

b. Yine kontrol grubuna göre KAH grubunda Sd-LDL/L-HDL ve Sd-LDL/S-HDL oranlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,001$).

c. Fakat gruplar arasında TK/HDL-K oranında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

5. KAH gösterilmesinde inflamatuvar marker olarak çalışılan CRP değerleri incelendiğinde; kontrol grubuna göre KAH grubunda arttığı belirlenmiştir ($p<0,001$).

6. Çalışma gruplarının rs599839 bölgesindeki SNP analiz edildiğinde;

a. Kontrol grubuna göre hasta grubunda risk (AA) allelin görülme sıklığı daha yüksek belirlenmiştir. Aynı şekilde koruyucu (AG + GG) allel sıklığı da kontrol grubunda artmış ancak bütün bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

b. Çalışmaya alınan katılımcılar risk ve koruyucu allel bulundurma durumlarına göre sınıflandırıldığında; lipit, lipoprotein ve apoprotein seviyelerinde farklılık bulunduğu ancak bu farklılığın da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

c. KAH grubundaki bireyleri aynı şekilde risk allel durumuna göre gruplandırarak lipit, lipoprotein ve apoprotein seviyeleri analiz edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

d. Ayrıca çalışmaya katılan kişiler allel türüne bağımlı olarak lipoprotein alt sınıfları arasında bir değişim gözlemlenmemiştir ($p>0,05$).

e. Benzer şekilde sadece KAH grubundaki kişilerin rs599839'daki genotipine göre lipoprotein alt sınıfları incelendiğinde bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). Ancak sonuçlara log transformasyonu uygulandığında, Sd-LDL'nin risk alleli (AA) grubunda istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

f. Yine risk (AA) ve koruyucu (AG+GG) allel taşıyan bireylerin ateroskleroz indeksleri değerlendirildiğinde de, gruplar arasında bir farklılık olmadığı gösterilmiştir ($p>0,05$).

7. Çalışma gruplarının *Sort1* gen ekspresyon değerleri analiz edildiğinde;

a. Kontrol grubuna göre KAH grubunda *Sort1* gen ekspresyon değeri 2,5 kat daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

b. Katılımcıları LDL fenotiplerine göre sınıflandırıldığında; fenotip B'ye sahip bireylerde *Sort1* gen ekspresyonu daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$).

c. Rs599839 bölgesindeki SNP sıklığına göre hem homozigot hem de heterozigot A alleli bulunduran bireyler ile karşılaştırıldığında, homozigot G alellilikte gen ekspresyonunu daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

d. Sadece KAH grubundaki katılımcıların SNP'leri incelendiğinde ise risk (AA) allele göre koruyucu (AG+GG) allel varlığında gen ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$). Sadece kontrol grubunda ise risk allele göre koruyucu allel bulunduranlarda gen ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir ($p<0,001$). Aynı şekilde bütün katılımcıları değerlendirildiğinde ise risk ve koruyucu allelin varlığında *Sort1* gen ekspresyonunda farklılık olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

6. ÖNERİLER

1. Sortilin protein miktarı düzeylerinin ölçümü lipoprotein metabolizması hakkında daha sağlıklı ve tatmin edici bilgi vereceğinden dolayı *Sort1* gen ürünün plazma formu çözünür sortilin (sSortilin) miktarı bakılabilir.

2. Sortilinin çözünebilir forma gelmesinde etkili olan ADAM proteazlar (10 ve 17) analiz edilerek bu metaloproteazların lipoprotein metabolizması üzerine muhtemel etkileri aydınlatılabilir.

3. Aterogenez patofizyolojisinin en önemli araçlarından olan inflamatuvar markırlar özellikle IL-6, TNF α ve interferon- γ 'nin plazma düzeyleri belirlenerek sortilin gen ekspresyonu ile olabilecek muhtemel etkileri incelenebilir.

4. *Sort1* geninin yer aldığı 1p13 kromozomundaki diğer kodlamayan bölgelerin (rs646776,rs12740374, rs629301 ve rs4970834) varyantları analiz edilerek *Sort1* ekspresyonu üzerine olan etkileri araştırılabilir.

5. Son zamanlarda lipoprotein metabolizmasının önemli oyuncularında biri olduğu öne çıkan PCSK9'un plazma seviyesi analiz edilerek sortilin proteini ile olan ilişkisi ortaya konulabilir.

6. Rs599839'daki minör (G) alleli sıklığı yaklaşık % 6-7 civarında olduğu için çalışma grubundaki katılımcıların sayısı artırılabilir.

7. Yine koroner arter hastalığının değerlendirilmesinde aterojenik indekslerin etkisini ortaya çıkarmak için daha fazla sayıdaki hastanın lipid, lipoprotein ve apolipoprotein seviyeleri analiz edilebilir.

8. Sortilin inhibitör adayları sentezleyip (kimyasal ajan ve antikor) hayvan deneylerinde sortilin ile ilişkili lipoproteinlerin endositik mekanizması incelenebilir.

KAYNAKLAR

- Allison, L.A., 2014.** Fundamental Molecular Biology. Palme yayıncılık, 14142, 2 baskıdan çeviri, ISBN: 978-605-355-256-7., Beldüz, A. (Çeviri Editörü), 17-25.
- Asztalos, B., Zhang, W., Roheim, P.S. and Wong, L., 1997.** Role Of Free Apolipoprotein A-I In Cholesterol Efflux. Formation Of Pre-Alpha-Migrating High-Density Lipoprotein Particles.Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 17, 1630–1636.
- Austin, M.A., Breslow, J.L., Hennekens, C. H., Buring, J. E., Willet, W.C. and Krauss, R.M., 1988.** “Low-density lipoprotein subclass pattern and risk of myocardial infarction”. Journal of the American Medical Association, 260: 1917-1921.
- Bostan, M., Uydu, H.A., Yildirmis, S., Malkoç, M., Atak, M., Demir, A., Yılmaz, A., Uğurlu, Y., Karadağ, Z., Duman, H. and Satiroğlu, O., 2015.** Pleiotropic effects of HDL subfractions and HDL associated enzymes on protection against coronary artery disease. Acta Cardiology, 70 (3), 33-40.
- Boyle, M. and Senior, K., 2008.** Human Biology. Harper Collins Publishers, 3th edition, ISBN 13 978-0-00-726751-4, 620p.
- Butkinaree, C., Canuel, M., Essalmani, R., Poirier, S., Benjannet, S., Asselin, M.C., Roubtsova, A., Hamelin, J., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Guillemot, J., Mayer, G., Sisodia, S.S., Jacob, Y., Prat, A. and Seidah, N.G., 2015.** Amyloid Precursor-like Protein 2 and Sortilin Do Not Regulate the PCSK9 Convertase-mediated Low Density Lipoprotein Receptor Degradation but Interact with Each Other. The Journal of Biological Chemistry, 24;290 (30),18609-18620, DOI: 10.1074/jbc.M115.647180.

- Carlo, A.S., Nykjaer, A. and Willnow, T.E., 2014.** Sorting receptor sortilin—a culprit in cardiovascular and neurological diseases. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*, 92 (9), 905-1011, DOI: 10.1007/s00109-014-1152-3.
- Christoffersen, M. and Tybjaerg-Hansen, A., 2015.** Novel genes in LDL metabolism—a comprehensive overview. *Current Opinion of Lipidology*, 26 (3), 179-187, DOI: 10.1097/mol.0000000000000175.
- Coutinho, M.F., Bourbon, M., Prata, M.J. and Alves, S., 2013.** Sortilin and the risk of cardiovascular disease. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 32 (10), 793-799, DOI: 10.1016/j.repc.2013.02.006.
- Çobanoğlu, S., 2011.** Deneysel Ateroskleroz Oluşturulmuş Sıçanlarda L-Argininin Tos Ve Oksidatif Stres İndeksine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne, Türkiye, 93 s.
- Dai, X., Wiernek, S., Evans, J.P. and Runge, M.S., 2016.** Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. *World Journal of Cardiology*, 8 (1), 1-23, DOI: 10.4330/wjc.v8.i1.1.
- Da Luz, P.L., Favarato, D., Faria-Neto, J.R.Jr., Lemos, P. and Chagas, A.C., 2008.** High ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics (Sao Paulo)*, 63 (4), 427-432.
- Diffenderfer, M.R. and Schaefer, E.J., 2014.** The composition and metabolism of large and small LDL. *Current Opinion in Lipidology*, 25 (3), 221-226, DOI: 10.1097/mol.0000000000000067.
- Dubé, J.B., Johansen, C.T. and Hegele, R.A., 2011.** Sortilin: an unusual suspect in cholesterol metabolism: from GWAS identification to in vivo biochemical analyses, sortilin has been identified as a novel mediator of human lipoprotein metabolism. *Bioessays*, 33 (6), 430-437, DOI: 10.1002/bies.201100003.

- ENCODE Project Consortium, 2012.** An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 6;489 (7414), 57-74, DOI: 10.1038/nature11247.
- Feingold, K.R. and Grunfeld, C., 2015.** Introduction to Lipids and Lipoproteins. Endotext, NCBI Bookshelf.
- Gao, F., Ren, Y.J., Shen, X.Y., Bian, Y.F., Xiao, C.S. and Li, H., 2016.** Correlation between the High Density Lipoprotein and its Subtypes in Coronary Heart Disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38 (5), 1906-1914, DOI: 10.1159/000445552.
- Ghosh, A. and Bansal, M., 2003.** "A glossary of DNA structures from A to Z". *Acta Crystallography Journals Online* D59: 620-626.
- Goldstein, D.B., 2009.** Common Genetic Variation and Human Traits. *The New England Journal of Medicine*, 360 (17): 1696-1698.
- Goliasch, G., Oravec, S., Blessberger, H., Dostal, E., Hoke, M., Wojta, J., Schillinger, M., Huber, K., Maurer, G. and Wiesbauer, F., 2012.** Relative importance of different lipid risk factors for the development of myocardial infarction at a very young age (≤ 40 years of age). *European Journal of Clinical Investigation*, 42, 631–6.
- Gugliucci, A., Caccavello, R., Kotani, K., Sakane, N. and Kimura, S., 2013.** Enzymatic assessment of paraoxonase 1 activity on HDL subclasses: a practical zymogram method to assess HDL function. *Clinica Chimica Acta*, 415, 162-168, DOI: 10.1016/j.cca.2012.10.044.
- Gustafsen, C., Kjolby, M., Nyegaard, M., Mattheisen, M., Lundhede, J., Buttenschon, H., Mors, O., Bentzen, J.F., Madsen, P., Nykjaer, A. and Glerup, S., 2014.** The Hypercholesterolemia-Risk Gene *SORT1* Facilitates PCSK9 Secretion. *Cell Metabolism*, 19, 310-318, DOI: 10.1016/j.cmet.2013.12.006.

- Halle, M., Berg, A., Baumstark, M.W., Konig, D., Huonker, M. and Keul, J., 1999.** Influence of mild to moderately elevated triglycerides on low density lipoprotein subfraction concentration and composition in healthy men with low high density lipoprotein cholesterol levels. *Atherosclerosis*, 143: 185-192, DOI: [org/10.1016/S0021-9150\(98\)00278-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(98)00278-0).
- Hanak, V., Munoz, J., Teague, J., Stanley, A. Jr. and Bittner, V., 2004.** Accuracy of the triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio for prediction of the low-density lipoprotein phenotype B. *The American Journal of Cardiology*, 15; 94 (2), 219-222.
- Hardy, J. and Singleton, A., 2009.** Genomewide Association Studies and Human Disease. *The New England Journal of Medicine*, 360 (17): 1759-1768.
- Hergenç, G., 2012.** Kan Yağları, Kolesterol, Ateroskleroz ve Risk Faktörleri. Nobel Tıp kitapevi, ISBN: 978-975-420-924-2, 344 s.
- Hirayama, S. and Miida, T., 2012.** Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*, 24; 414, 215-224, DOI: [10.1016/j.cca.2012.09.010](https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.010).
- Hirano, T., Ito, Y. and Yoshino, G., 2005.** Measurement of small dense low-density lipoprotein particles. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 12 (2), 67-72.
- Hoogeveen, R.C., Gaubatz, J.W., Sun, W., Dodge, R.C., Crosby, J.R., Jiang, J., Couper, D., Virani, S.S., Kathiresan, S., Boerwinkle, E. and Ballantyne, C.M., 2014.** Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 34 (5), 1069-1077, DOI: [10.1161/ATVBAHA.114.303284](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303284).
- Döm, H.A., 2013.** Investigation Of Schizophrenia Related Genes And Pathways Through Genome Wide Association Studies., yüksek lisans tezi., 5.

- Ito, M.K. and Pharm, D., 2002.** Niacin-Based Therapy for Dyslipidemia: Past Evidence and Future Advances. *The American Journal of Managed Care*, 8, 315-322.
- Johnsen, S.H., Mathiesen, E.B. and Fosse, E., 2005.** Elevated High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels Are Protective Against Plaque Progression: A Followup Study Of 1952 Persons With Carotid Atherosclerosis The Tromsø Study. *Circulation*, 112, 498–504.
- Jones, G.T., Bown, M.J., Gretarsdottir, S., Romaine, S.P., Helgadottir, A., Yu, G., Tromp, G., Norman, P.E., Jin, C., Baas, A.F., Blankensteijn, J.D., Kullo, I.J., Phillips, L.V., Williams, M.J., Topless, R., Merriman, T.R., Vasudevan, T.M., Lewis, D.R., Blair, R.D., Hill, A.A., Sayers, R.D., Powell, J.T., Deloukas, P., Thorleifsson, G., Matthiasson, S.E., Thorsteinsdottir, U., Golledge, J., Ariëns, R.A., Johnson, A., Sohrabi, S., Scott, D.J., Carey, D.J., Erdman, R., Elmore, J.R., Kuivaniemi, H., Samani, N.J., Stefansson, K. and Van Rij, A.M., 2013.** A sequence variant associated with sortilin1 (*SORT1*) on 1p13.3 is independently associated with abdominal aortic aneurysm. *Human Molecular Genetics*, 22 (14), 2941-247, DOI: 10.1093/hmg/ddt141.
- Julve, J., Martín-Campos, J.M., Escolà-Gil, J.C. and Blanco-Vaca, F., 2016.** Chylomicrons Advances in biology, pathology, laboratory testing and therapeutic. *Clinica Chimica Acta*, 1, 455, 134-4,. DOI: 10.1016/j.cca.2016.02.004.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005.** *Biyokimya. Aktif* Yayınevi, 5. Baskı, ISBN: 978-975-8986-20-0, 197-208.
- Keleş, İ., 2014.** *Lipid Bozuklukları ve Ateroskleroz.* Akademi yayınevi, ISBN 978-605-5013-04-2, 232 s. 44.
- Kjolby, M., Andersen, O.M., Breiderhoff, T., Fjorback, A.W., Pedersen, K.M., Madsen, P., Jansen, P., Heeren, J., Willnow, T.E. and Nykjaer, A., 2010.** *Sort1*, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell Metabolism*, 8; 12 (3): 213-23, DOI: 10.1016/j.cmet.2010.08.006.

- Kingwell, B.A., Chapman, M.J., Kontush, A. and Miller, N.E., 2014.** HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13 (6), 445-464, DOI: 10.1038/nrd4279.
- Kleber, M.E., Renner, W., Grammer, T.B., Linsel-Nitschke, P., Boehm, B.O., Winkelmann, B.R., Bugert, P., Hoffmann, M.M. and März, W., 2010.** Association of the single nucleotide polymorphism rs599839 in the vicinity of the sortilin1 gene with LDL and triglyceride metabolism, coronary heart disease and myocardial infarction. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*, 209 (2), 492-497, DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.09.068.
- Koba, S., Hirano, T., Ito, Y., Tsunoda, F., Yokota, Y., Ban, Y., Iso, Y., Suzuki, H. and Katagiri, T., 2008.** Significance of small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations in relation to the severity of coronary heart diseases. *Atherosclerosis*, 189 (1), 206-214, DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.12.002.
- Kontush, A. and Chapman, M.J., 2012.** HIGH-DENSITY LIPOPROTEINS Structure, Metabolism, Function and Therapeutics. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, ISBN 978-0-470-40821-6, 605p.
- Krauss, R.A. and Dreon, D.M., 1995.** Low-Density-Lipoprotein Subclasses And Response To A Low-Fat Diet In Healthy Men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 478-487.
- Krauss, R.M., 2005.** Dietary and genetic probes of atherogenic dyslipidemia. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 25 (11), 2265-2272.
- Lagos, K.G., Filippatos, T.D., Tsimihodimos, V., Gazi, I.F., Rizos, C., Tselepis, A.D., Mikhailidis, D.P. and Elisaf, M.S., 2009.** Alterations in the high density lipoprotein phenotype and HDL-associated enzymes in subjects with metabolic syndrome. *Lipids*, 44 (1), 9-16, DOI: 10.1007/s11745-008-3251-9.

- Linsel-Nitschke, P., Samani, N.J. and Schunkert, H., 2010a.** Sorting out cholesterol and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 363 (25), 2462-2463, DOI: 10.1056/nejmcibr1010765.
- Linsel-Nitschke, P., Heeren, J., Aherrahrou, Z., Bruse, P., Gieger, C., Illig, T., Prokisch, H., Heim, K., Doering, A., Peters, A., Meitinger, T., Wichmann, H.E., Hinney, A., Reinehr, T., Roth, C., Oertlepp, J.R., Soufi, M., Sattler, A.M., Schaefer, J., Stark, K., Hengstenberg, C., Schaefer, A., Schreiber, S., Kronenberg, F., Samani, N.J., Schunkert, H. and Erdmann, J., 2010b.** Genetic variation at chromosome 1p13.3 affects sortilin mRNA expression, cellular LDL-uptake and serum LDL levels which translates to the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 208 (1), 183-189, DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.034.
- Mahley, R.W., 1993.** Aterogenezin hücresel ve moleküler biyolojisi. Kolesterol taşınması ve lipoprotein metabolizması. Merck Sharp & Dohme, Gökdemir, O. ve Palaoğlu E., (çeviri editörleri).
- Manolio, T.A. and Collins, F.S., 2007.** Genes, Environment, Health, and Disease: Facing up to Complexity. *Human Heredity*, 63 (2): 63-66.
- Mooijaart, S.P., Berbée, J.F., van Heemst, D., Havekes, L.M., de Craen, A.J., Slagboom, P.E., Rensen, P.C. and Westendorp, R.G., 2006.** ApoE plasma levels and risk of cardiovascular mortality in old age. *PLoS Medicine*, 3 (6), e176.
- Mora, S., 2009.** Advanced lipoprotein testing and subfractionation are not (yet) ready for routine clinical use. *Circulation*, 119 (17), 2396-2404, DOI: 10.1161/circulationaha.108.819359.
- Mortensen, M.B., Kjolby, M., Gunnarsen, S., Larsen, J.V., Palmfeldt, J., Falk, E., Nykjaer, A. and Bentzon, J.F., 2014.** Targeting sortilin in immune cells reduces proinflammatory cytokines and atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 124 (12), 5317-5322, DOI:10.1172/JCI76002.

- Mortensen, M.B., Kjolby, M. and Bentzon, J.F., 2015.** Sortilin and atherosclerosis. *Oncotarget*, 6 (23), 19352-19353, DOI: 10.18632/oncotarget.5098.
- Muendlein, A., Geller-Rhomberg, S., Saely C.H., Winder, T. Sonderegger, G., Rein, P., Beer, S., Vonbank, A. and Drexel, H., 2009.** Significant impact of chromosomal locus 1p13.3 on serum LDL cholesterol and on angiographically characterized coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 206, 494–499, DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.040.
- Musunuru, K., Strong, A., Frank-Kamenetsky, M., Lee, N.E., Ahfeldt, T., Sachs, K.V., Li, X., Li, H., Kuperwasser, N., Ruda, V.M., Pirruccello, J.P., Muchmore, B., Prokunina-Olsson, L., Hall, J.L., Schadt, E.E., Morales, C.R., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., Wong, J., Cantley, W., Racie, T., Ejebe, K.G., Orho-Melander, M., Melander, O., Kotliansky, V., Fitzgerald, K., Krauss, R. M., Cowan, C. A., Kathiresan, S. and Rader, D., 2010.** From noncoding variant to phenotype via *SORT1* at the 1p13 cholesterol locus. *Nature*, 466 (7307), 714-719, DOI: 10.1038/nature09266.
- Muth, N.D., Laughlin, G.A., von Mühlen, D., Smith, S.C. and Barrett-Connor, E., 2010.** High-density lipoprotein subclasses are a potential intermediary between alcohol intake and reduced risk of cardiovascular disease: the Rancho Bernardo Study. *The British Journal of Nutrition*, 104 (7), 1034-1042, DOI: 10.1017/S0007114510001595.
- Navab, M., Reddy, S.T., Van Lenten, B.J. and Fogelman, A.M., 2011.** HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nature Reviews Cardiology* 8, 222–232, DOI: 10.1038/nrcardio.2010.222.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005.** Principles of Biochemistry, W.H. Freeman and Company, 4th edition , New York s. 343-365.
- Onat, A., 2009.** TEKHARF çalışması 2009. Figur grafik ve matbaacılık Tic. Ltd. Şti. İstanbul. 24.

- Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, E., 2006.** İnsan Biyokimyası. Palme yayıncılık, yayın no:211, 2. Baskı, ISBN: 975-8624-20-2, 813 s.
- Ozaki, K. and Tanaka, T., 2016.** Molecular genetics of coronary artery disease. *Journal of Human Genetics*, 61 (1), 71-77, DOI: 10.1038/jhg.2015.70.
- Patel, K.M., Strong, A., Tohyama, J., Jin, X., Morales, C.R., Billheimer, J., Millar, J., Kruth, H. and Rader, D.J., 2015.** Macrophage sortilin promotes LDL uptake, foam cell formation, and atherosclerosis. *Circulation Research*, 116 (5), 789-796, DOI: 10.1161/circresaha.116.305811.
- Rader, D.J., 2015.** Human genetics of atherothrombotic disease and its risk factors. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 35 (4), 741-747, DOI: 10.1161/atvbaha.115.305492.
- Ramirez, A. and Hu, P.P., 2015.** Low High-Density Lipoprotein and Risk of Myocardial Infarction. *Clinical Medicine Insights Cardiology*, 9, 113-117, DOI: 10.4137/CMC.S26624.
- Rizzo, M. and Berneis, K., 2006a.** The Clinical Relevance of Low Density-Lipoproteins Size Modulation by Statins. *Cardiovasc Drugs Therapy*, 20 (3), 205-217, DOI: 10.1007/s10557-006-8283-x.
- Rizzo, M. and Berneis, K., 2006b.** “Should we measure routinely the LDL peak particle size?”. *International Journal of Cardiology*, 107, 166-170, DOI: 10.1016/j.ijcard.2005.02.035
- Rizzo, M. and Berneis, K., 2007.** Small, dense low-density-lipoproteins and metabolic sendrome. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 23 (1), 14-20, DOI: 10.1002/dmrr.
- Roberts, R. and Stewart, A.F., 2012.** Genes and coronary artery disease: where are we? *Journal of American College of Cardiology*, 60 (18), 1715-1721, DOI:10.1016/j.jacc.2011.12.062.

- Samani, N.J., Braund, P.S., Erdmann, J., Götz, A., Tomaszewski, M., Linsel-Nitschke, P., Hajat, C., Mangino, M., Hengstenberg, C., Stark, K., Ziegler, A., Caulfield, M., Burton, P.R., Schunkert, H. and Tobin, M.D., 2008.** The novel genetic variant predisposing to coronary artery disease in the region of the PSRC1 and CELSR2 genes on chromosome 1 associates with serum cholesterol. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*, 86 (11), 1233-1241, DOI: 10.1007/s00109-008-0387-2.
- Samani, N.J., Erdmann, J., Hall, A.S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., Dixon, R.J., Meitinger, T., Braund, P., Wichmann, H.E., Barrett, J.H., König, I.R., Stevens, S.E., Szymczak, S., Tregouet, D.A., Iles, M.M., Pahlke, F., Pollard, H., Lieb, W., Cambien, F., Fischer, M., Ouwehand, W., Blankenberg, S., Balmforth, A.J., Baessler, A., Ball, S.G., Strom, T.M., Braenne, I., Gieger, C., Deloukas, P., Tobin, M.D., Ziegler, A., Thompson, J.R., Schunkert, H.; WTCCC and the Cardiogenics Consortium., 2007.** Genomewide association analysis of coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 357 (5), 443-453, DOI: 10.1056/nejmoa072366.
- Schmidt, V. and Willnow, T.E., 2016.** Protein sorting gone wrong-VSP10P domain receptors in cardiovascular and metabolic diseases. *Atherosclerosis*, 245, 194-199, DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.027.
- Shastri, B.S., 2002.** SNP alleles in human disease and evolution. *Journal of Human Genetics*, 47: 561-566.
- Shuldiner, A.R. and Pollin, T.I., 2010.** Genomics: Variations in blood lipids. *Nature*, 5; 466 (7307) :703-704.
- Sparks, C.E., Sparks, R.P. and Sparks, J.D., 2015.** The enigmatic role of sortilin in lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 26 (6), 598-600, DOI: 10.1097/mol.0000000000000244.
- Stalenhoef, A.H.F., Graaf, J., Wittekoek, M.E., Bredie, S.J.H., Demacker, P.N.M. and Kastelein, J.J.P., 2000.** The effect of concentrated n-3 fatty acids versus

gemfibrozil on plasma lipoproteins, low density lipoprotein heterogeneity and oxidizability in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*, 153, 129-138, DOI: org/10.1016/S0021-9150(00)00381-6.

Strong, A., Ding, Q., Edmondson, A.C., Millar, J.S., Sachs, K.V., Li, X., Kumaravel, A., Wang, M.Y., Ai, D., Guo, L., Alexander, E.T., Nguyen, D., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., Morales, C.R., Tall, A.R., Kathiresan, S., Fisher, E.A., Musunuru, K. and Rader, D.J., 2012. Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and LDL catabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, 122 (8), 2807-2816, DOI: 10.1172/JCI63563.

Strong, A. and Rader, D.J., 2012. Sortilin as a regulator of lipoprotein metabolism. *Current Atherosclerosis Reports*, 14 (3), 211-228, DOI: 10.1007/s11883-012-0248.

Strong, A., Patel, K. and Rader, D.J., 2014. Sortilin And Lipoprotein Metabolism: Making Sense Out Of Complexity. *Current Opinion Lipidology*, 25 (5), 350-357. DOI: 10.1097/mol.0000000000000110.

Tall, A.R. and Ai, D., 2011. Sorting out sortilin. *Circulation Research*, 21; 108 (2), 158-160, DOI: 10.1161/RES.0b013e31820d7daa.

Tani, S., Saito, Y., Anazawa, T., Kawamata, H., Furuya, S., Takahashi, H., Iida, K., Matsumoto, M., Washio, T., Kumabe, N., Nagao, K. and Hirayama, A., 2011. Low-density lipoprotein cholesterol/apolipoprotein B ratio may be a useful index that differs in statin-treated patients with and without coronary artery disease: a case control study. *International Heart Journal*, 52 (6), 343-347.

URL-1, 2017. <http://www.viagenefertility.com/photos/snp.png>. İki DNA molekülü arasındaki polimorfizm (20 Ekim 2017).

URL-2, 2017. <http://blog.cc.net.my/2015/makanan-yang-membantu-rendahkan-kolesterol/ateroskleroz-oluşumu> (20 Ekim 2017).

URL-3, 2017. <http://www3.uah.es / mapa/seminarios/activos /U.Mayores/Lipoproteinas /pages/lipoproteina .jpg. Htm> (20 Ekim 2017).

- URL-4, 2017.** <http://www.myhealthywaist.org/documentation-centre / chylomicron metabolism: the fate of dietary fat> (20 Ekim 2017).
- URL-5, 2017.** <http://www.myhealthywaist.org/the-concept-of-cmr/intra-abdominal-adipose-tissue-the-culprit/complications-of-intra-abdominal-obesity / atherogenic dyslipidemia/page/2/print.html> (20 Ekim 2017).
- URL-6, 2017.** <http://slideplayer.com/slide /4208057/14/images/22/LDL+Cellular+Metabolism.jpg> (20.Ekim 2017).
- URL-7, 2017.** <https://i.ytimg.com/vi/mlYocPgAemE/hqdefault.jpg> (10 Kasım 2017).
- URL-8, 2017.** https://www.mdc-berlin.de /37995319/ en/research/ research_teams/ molecular cardiovascular research/images/w1.jpg (10 Kasım 2017).
- Uydu, H.A., Bostan, M., Atak, M., Yılmaz, A., Demir, A., Akçan, B., Sümer, F., Baltaş, N., Karadağ, Z., Uğurlu, Y. and Orem, A., 2014.** Cholesterol forms and traditional lipid profile for projection of atherogenic dyslipidemia lipoprotein subfractions and erythrocyte membrane cholesterol. *Journal of Membrane Biology*, 247 (2), 127-134, DOI: 10.1007/s00232-013-9611-2.
- Üstünkar, G., 2011.** An Invegrative Approach to Structured SNP Prioritizaon and Representative SNP Selection for Genome-Wide Association Studies, Doktora Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 149s., 9.
- Walldius, G., 2012.** The apoB/apoA-I Ratio is a Strong Predictor of Cardiovascular Risk. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, ISBN 978-953-51-0773-6.
- Wang, A.Z., Li, L., Zhang, B., Shen, G. and Kenneth, Q., 2011.** Association of SNP rs17465637 on chromosome 1q41 and rs599839 on 1p13.3 with Myocardial Infarction in an American Caucasian Population. *Ann Human Genetics*, 75 (4), 475–482, DOI:10.1111/j.1469-1809.2011.00646.x.
- Warnick, G.R., Remaley, A.T., Boggess, C.N., Mallori, T. and Chao-Shern, C., 2007.** Lipoprotein Subclasses İn Cardiovascular Disease Risk Assessment And Patient Management. *Cardiovascular Disease*, 31, 28-30.

- Watts, G.F., Mandalia, S., Brunt, J.N., Slavin, B.M., Coltart, D.J. and Lewis, B., 1993.** Independent associations between plasma lipoprotein subfraction levels and the course of coronary artery disease in the St. Thomas' Atherosclerosis Regression Study (STARS). *Metabolism*, 42 (11), 1461-1467.
- Westerterp, M. and Tall, A.R., 2015 .** SORTILIN: A Many Headed Hydra. *Circulation Research* 116 (5), 764–766, DOI:10.1161/circresaha.115.306036.
- Willnow, T.E., Kjolby, M. and Nykjaer, A., 2011.** Sortilins: new players in lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 22 (2), 79-85, DOI: 10.1097/mol.0b013e3283416f2b.
- Xu, Y. and Fu, M., 2003.** Alterations of HDL subclasses in hyperlipidemia. *Clinica Chimica Acta*, 332 (1-2): 95-102.
- Yang, Y., Yan, B., Fu, M., Xu, Y. and Tian, Y., 2005.** Relationship between plasma lipid concentrations and HDL subclasses. *Clinica Chimica Acta*, 354 (1-2), 49-58.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B., 2010.** Moleküler Biyoloji. Nobel yayın dağıtım, ISBN 978-9944-77-184-9, 686 s.
- Yip, K.Y., Cheng, Chao., Bhardwaj, N., Brown, J.B., Leng, J., Kundaje, A., Rozowsky, J., Birney, E., Bickel, P., Snyder, M. and Gerstein, M., 2012.** Classification of human genomic regions based on experimentally determined binding sites of more than 100 transcription-related factors. *Genome Biology*, 13 (9), R48. DOI: 10.1186/gb-2012-13-9-r48.
- Zeljko, A., Spasojevic-Kalimanovska, V., Vekic, J., Jelic-Ivanovic, Z., Topic, A., Bogavac-Stanojevic, N., Spasic, S., Vujovic, A. and Kalimanovska-Ostic, D., 2008.** Does simultaneous determination of LDL and HDL particle size improve prediction of coronary artery disease risk? *Clinical and Experimental Medicine*, 8 (2), 109-116, DOI: 10.1007/s10238-008-0165-z.

Zhang, Y., Xu, R.X., Li, S., Zhu, C.G., Guo, Y.L., Sun, J. and Li, J.J., 2015.
Lipoprotein subfractions partly mediate the association between serum uric acid
and coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta*, 20 (441), 109-114, DOI:
10.1016/j.cca.2014.



EKLER

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU BAŞKANLIĞI KARAR FORMU
(Approval Form of The University of Recep Tayyip Erdoğan Ethics Committee for Clinical Research)

ÇALIŞMANIN ADI (Project Title)	Koronar Arter Hastalarında Sortilin Gen Bölgesiyle İlişkili Non-coding rs599839 Gen Polimorfizimin Lipoprotein Alt Fraksiyonlar İle Olan İlişkisinin İlişkisi			
SORUMLU ARAŞTIRMACI (Principal Investigator)	Doç.Dr.Hüseyin Avni UYDU			
DiĞER ARAŞTIRMACILAR (Other Researchers)	1. Mehtap ATAK	2. Mehmet BOSTAN		
	3. Hatice SEVİM	4. Esra PINARBAŞI		
	5. Merve HÜNER	5-Kerimali AKYILDIZ		
SOR. ARAŞT. BULUNDUĞU MERKEZ/BÖLÜM/AB.D (Division/Unit of PI)	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER (Participating Centers)	TEK MERKEZ. One (Establishment) <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ (Multicentre) <input type="checkbox"/>	ULUSAL (National) <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI (International) <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER (Documents Assessed)	BELGE ADI (Documentations)	TARİHİ (Date)	NO (Number)	DİLİ (Language)	
	Araştırma Protokolü (Study Protocol)	24.04.2014	97	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	English <input type="checkbox"/>
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Volunteer Approval Form)	Var (Available) <input checked="" type="checkbox"/>	Yok (None) <input type="checkbox"/>	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	English <input type="checkbox"/>	
Olgu Rapor Formu (Clinical Evaluation Form)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	English <input type="checkbox"/>	
Araştırma Broşürü (Research Pamphlet)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	English <input type="checkbox"/>	
VARSA DEĞERLENDİRİLEN DiĞER BELGELER (Other Assessed Documents, if available)	BELGE ADI (Nature of Documents)				
	Türkçe Etiket Örneği (Label Example in Turkish)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
	Sigorta (Insurance)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
	Araştırma Bütçesi (Project Cost)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
	Biyolojik Materyel Transfer Formu (Biologic Material Transfer)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
	Hasta Kartı/Günlükleri (Patient Record/Logs)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
	İlan (Declaration/Announcement)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
	Yıllık Bildirim (Annual Feedback)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
	Sonuç Raporu (Reporting of Results)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Çalışmanın bitiminden en geç üç ay içerisinde bildirilmelidir (Must be reported within three months of the end of the study)	
Güvenlik Bildirimleri (Safety Documents)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer: Other	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:
İmza:

Doç.Dr. Aynur KIRBAŞ
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU BAŞKANLIĞI KARAR FORMU
(Approval Form of The University of Recep Tayyip Erdoğan Ethics Committee for Clinical Research)

ÇALIŞMA ESASI (Essence of Study)	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu (Guidance for Clinical Trials and Good Clinical Laboratory Practice Guidelines)						
BAŞKAN Y. UNVANI / ADI / SOYADI: (President)	Doç. Dr. Aynur KIRBAŞ						
KARAR BİLGİLERİ (Decision Explanations)	Karar No/ Decision No: 2014/77	Tarih (Date): 30.06.2014					
	Yakında bilgileri verilen Doç. Dr. İlhanın Avai ÜYDÜ sorumluluğunda yönetilen (97) "Koronar Arter Hastalarında Sorbitin Gen Bölgesiyle İlgili Non-coding rs59839 Gen Polimorfizminin Lipoprotein Alt Fraksiyonlar İle Olan İlişkisinin İncelenmesi (Investigation of Relationship Between a Non-coding rs59839 variant Associated with Sorbitin Gene Region and Lipoprotein Subfractions in Patients with Coronary Artery Disease)" başlıklı klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği, amaç, yaklaşım ve yöneticinin dikkate alınarak incelemeli çalışmaları başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul Üye tam sayısının oy birliğiyle çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						
VARSA ŞERH GEREKÇESİ (Declaratory Clause)							
DECISION INFORMATION	The above study has been approved by The University of Recep Tayyip Erdoğan Medical School Ethics Committee for Clinical Research						
	Kabul <input checked="" type="checkbox"/> Accepted			Kabul edilmedi <input type="checkbox"/> Rejected			
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile İlgili		Katılım *		İmza
Doç. Dr. Aynur KIRBAŞ	Tıbbi Biyokimya	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Zilmi ACAR YAZICI	Tıbbi Mikrobiyoloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Durdu ALTUNER	Tıbbi Farmakoloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Başç UZUNOK	Fizyoloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Kültür ve Spor	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Aziz GÖMÜŞ	Göğüs Hastalıkları	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Selim DERELİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Kemal TÜRKYILMAZ	Göz Hastalıkları	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Orhan Ünal ZORBA	Üroloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İbrahim ŞEHİTOĞLU	Patoloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Celile HATİPOĞLU	Halk Sağlığı	Rize Halk Sağlığı Müdürlüğü Halk Sağlığı Merkezi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Av. Melek YAŞAR	Hukuk	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Hemşire Melek KAMACI	Hemşirelik	Rize Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Hemşire Aynur YILMAZ	Hemşirelik	Rize Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Recep KOYUNCU	Sivil Üye	Rize İl Mühürüğü	E <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	

*Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:
İmza:

Doç. Dr. Aynur KIRBAŞ
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

ÖZGEÇMİŞ

30.04.1983 yılında Erzincan'ın Tercan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise Mercan'da tamamladı. 2001 yılında başladığı lisans eğitimini 2005 Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde tamamladı. 2007 yıl KTÜ Kimya Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisansa başladı, 2008 yılında Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne yatay geçiş yaptı ve 2010 yılında mezun oldu. Aynı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda başladığı doktora eğitimi halen devam etmektedir. 2014 yılı Aralık ayından beri Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzman yapmakta olan Mehtap ATAK evli ve bir çocuk annesidir.

Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları;

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Bostan, M., Uydu, H.A., Yildirmis, S., Malkoç, M., **Atak, M.**, Demir, A., Yılmaz, A., Uğurlu, Y., Karadağ, Z., Duman, H. and Satiroğlu O., 2015. Pleiotropic effects of HDL subfractions and HDL-associated enzymes on protection against coronary artery disease. *Acta Cardiologica*, 70(3), 333-340.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler:

1. Uydu, H.A., **Atak, M.**, Bostan, M., Sevim, Nalkıran, H., Malkoç, M., Hüner, M., Pınarbaş, E., Akyıldız, K., Karakaş, S., Yılmaz, A. ve Efe, H., Investigation Of Effect Of Variant rs599839 Associated With *SORT1* On LDL Subfractions And Severity Of Coronary Artery Disease. 3rd World Congress on Clinical Lipidology, Brisbane, Australia, 10-12 February 2017.

2. Uydu, H.A., **Atak, M.**, Bostan, M., Sevim Nalkıran, H., Malkoç, M., Pınarbaş, E., Karakas, S., Huner, M., Akyıldız, K. ve Yılmaz, A., Effect of Sortilin Gen Expression on LDL Subfractions and Severity Of Coronary Artery Disease. 85th EAS Congress, 23-26 April 2017, Prague, Czech Republic.

Uluslararası Katılımlı bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:

1. Uydu, H.A., Bostan, M., Yıldırım, S., Demir, A., **Atak M.**, Yılmaz, A., Karadağ Z, Gendöre, R., Efe H. ve Hüner, M. Distruption of Lipoprotein Subfractions in projection of Coronary Artery Disease Severity. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği Uluslar Arası Katılımlı Kongre& Lab Expo, 16-20 Eylül 2014 İzmir.
2. Uydu, H.A., **Atak, M.**, Sevim Nalkıran, H., Malkoç, M., Şatıroğlu, Ö. ve Arpa M. Koroner Arter Hastalarında LDL Alt Fraksiyonlarının *SORT1* Gen Ekspresyonu İle İlişkisi 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum.
3. **Atak, M.**, Uydu, H.A., Pınarbaş, E., Şatıroğlu, Ö., Malkoç, M. ve Demir, A., Koroner Arter Hastalığını ve Şiddetini Klinik Gösterimde Plazma Aterojenik İndeksler, 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum.

Projeler

1. Koroner Arter Hastalarında Sortilin Gen Bölgesiyle İlişkili Non-coding rs599839 gen polimorfizmini Lipoprotein Alt Fraksiyonları ile Olan İlişkisinin İncelenmesi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (RTEÜBAP), Proje Kod No: 2014.106.01.01 Araştırmacı (Devam Etmekte).