

Ateroskleroz ile il-1 α (interleukin-1 α -889 c/t) gen polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırılması

Ateroskleroz ile il-1 α (interleukin-1 α -889 c/t) gen polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırılması

Hasan Başçıl*, Erhan Atahan, Müslim Gül, Serdal Arslan, Nil Özbilum, Öcal Berkan

Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı (Dr. H. Başçıl, Dr. E. Atahan, Dr. Ö. Berkal), Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Dr. S. Arslan), Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (Dr. N. Özbilum), Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi, TR-58140 Sivas, Kalp Damar Cerrahisi Kliniği (Dr. M. Gül), Sivas Devlet Hastanesi, TR-58030

Özet

Amaç. Genetik ve çevresel faktörler arasındaki ilişki sonucu ortaya çıkan kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde inflamasyon anahtar rol oynamaktadır. İnterlökin-1 α (IL-1 α) nın proinflamasyon regülasyonunda önemli rolü vardır. Bu çalışmada IL-1 α -889 C/T polimorfizmi ile ateroskleroz arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. **Yöntem.** Bu çalışma popülasyonu 117 hasta (Grup I) ve 117 sağlıklı (Grup II) bireyden oluşmuştur. Grup I ve Grup II deki bireylerin genomik DNA'sı izole edildi. IL-1 α genotipleri rastgele seçilen örneklerden direkt dizi analizi yapılarak doğrulandı. **Bulgular.** Grup I 78 erkek ve 39 kadın bireyden, Grup II ise 49 erkek ve 68 kadın bireyden oluşmaktadır. Grup I bireylerin yaş ortalaması 61,06; Grup II bireylerin yaş ortalaması ise 59,47'dir. Grup I'de 43 bireyde, Grup II'de ise 28 bireyde yüksek kolesterol (total kolesterol>200 mg/dL) bulundu. Grup I'de 62 bireyde, Grup II'de 51 bireyde sigara içiciliği bulundu. Grup I'de 81 bireyde yüksek tansiyon (sistolik kan basıncı>140 mmHg ve/veya diyastolik kan basıncı >90 mmHg), 42 bireyde diyabet, Grup II'de 32 bireyde yüksek tansiyon, 41 bireyde diyabet bulundu. Aterosklerotik Grup I'de CC genotip taşıyan bireyler grubun %54,70'ini, CT genotip taşıyan bireyler %35,04'nü ve TT genotip taşıyan bireyler ise %10,25'ini oluşturmaktadır. Grup II'de ise bu oranlar CC genotip taşıyanlarda %59,82; CT genotip taşıyanlarda %30,76 ve TT genotip taşıyanlarda %9,40 olarak saptanmıştır. IL-1 α polimorfizmi için C allel frekansı Grup II'de %75,21 ve Grup I'de %72,22'dir. T allel frekansı dağılımı Grup II'de %24,78 ve Grup I'de ise %27,77'dir. **Sonuç.** Koroner Arter hastalığı olan Grup I ile, kontrol grubu olan Grup II arasında yaş, cinsiyet dağılımı, hipertansiyon ve hiperkolesterolemi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Grup I ile Grup II arasında IL-1 α -889 C/T gen polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Anahtar sözcükler: Koroner ateroskleroz, IL-1 α gen polimorfizmi, risk faktörleri

Abstract

Aim. Atherosclerosis is regarded as a chronic inflammatory disease developing in response to injury in the vessel wall. Inflammation plays a key role in the development of atherosclerosis. Interleukin-1 α (IL-1 α) has a critical role on regulation of proinflammation. The aim the study was to assess the relationship between the IL-1 α -889 C/T polymorphism and the atherosclerosis. **Method.** The study population was composed of 117 patients (Group I) and 117 healthy adults (Group II). Genomic DNA of case and control was extracted from blood leukocytes. IL-1 α genotype were further confirmed by direct sequencing of randomly selected samples. **Results.** 78 male and 39 female individuals in the group I, 49 men and 68 women in Group II. The average age of individuals in the Group I 61.06, the average age of individuals in the Group II 59.47 years old. The Group I 43 and the Group II were detected in 28 individuals with high cholesterol(total cholesterol>200 mg/dL). 62 individuals in the Group I and 51 individuals in the Group II was smoking. The Group I 81 individuals with high blood pressure(systolic blood pressure>140 mmHg and / or diastolic blood pressure>90 mmHg), 42 individuals with diabetes, the Group II 32 individuals with high blood pressure, diabetes was found 41 individuals. In the atherosclerotic coronary artery patients of %54.70 individuals carrying the CC genotype, %35.04 individuals carrying the CT genotype and %10.25 individuals carrying the TT genotype constitutes. In the

healty control group, %59.82 individuals carrying the CC genotype, %30.76 individuals carrying CT genotype and %9.40 individuals carrying TT genotype. IL-1 α polymorphism of C allele frequency is %75.21 in the Group II and %72.22 in the Group I. T allele frequency distribution of %24.78 in the Group II and %27.77 in the Group I. **Conclusion.** Those with coronary artery disease group between the Group II age, sex distribution, hypertension and hypercholesterolemia were found statistically significant relationship. There was no statistically significant difference between groups according to the IL-1 α -889 C/T gene polymorphism.

Keywords: Coronary atherosclerosis; IL-1 α gene polymorphism; risk factors

Geliş tarihi/Received: 29 Mart 2014; **Kabul tarihi/Accepted:** 02 Haziran 2014

***İletişim adresi:**

Dr. Hasan Başçıl, Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, TR-58140 Sivas. E-posta: hasanbascil@hotmail.com

Giriş

Dünyada ve ülkemizde ateroskleroz ve komplikasyonları en önde gelen ölüm nedenidir [1]. Uzun zamandır aterosklerozun damar yüzeyinde pasif bir lipid depolanması olduğu ve zaman içinde birikimin artması ile bu damarların tamamen tıkanacağı varsayılmıştır [2].

Son yıllarda aterosklerozda kronik bir inflamatuvar sürecin söz konusu olduğu güçlü kanıtlarla gösterilmiştir [3]. Günümüzde ateroskleroz; multifaktöriyel, başlangıçtan progresyona kadar her basamağında kronik inflamasyonun rol oynadığı ve her risk faktörünün altta yatan inflamatuvar süreci hızlandırarak patogeneze katkıda bulunduğu bir hastalık olarak tanımlanmaktadır [2]. İnflamatuvar süreçte rol alan genlerin, ateroskleroz gelişimine direkt ve dolaylı olarak katkıda bulunabileceği gösterilmiştir [4].

Aterosklerozun her aşamasında rol alan makrofaj ve T-lenfositleri tarafından İnterlökin (IL-1) adı verilen sitokin salgılır [5,6]. IL-1 makrofaj ve düz kas hücrelerinin hareketi, göç ve proliferasyonlarına yol açan mitojenik ve kemotaktik gelişme faktörlerinin (GF) ekspresyonlarına neden olur [7]. Buna ek olarak köpük hücrelerinin oluşmasına neden olan okside olmuş LDL'nin [8] ve makrofaj ile T lenfositlerin arasındaki haberleşmeyi sağlayan CD-40'un IL-1 ekspresyonuna neden olması IL-1'in ateroskleroza katkısını desteklemektedir [9].

Zheng Zhang ve ark. [10] yaptığı bir çalışmada inflamasyon ve aterosklerozun rol oynadığı iskemik inmede IL-1 α 'nın -889 C/T gen polimorfizimi anlamlı bulunmuştur. Bu çalışmada da aynı gen polimorfizimi ile koroner arter aterosklerozu arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüş ve çalışma planlanmıştır.

Gereç ve yöntem

Örneklerin toplanması ve saklanması

Çalışma kapsamında $\alpha=0,05$ $\beta=0,90$ $(1-\beta)=0,10$ olarak alındığında herbir gruba 117 bireyin alınmasına karar verildi ve terim gücü $p=0,9010$ bulundu. Aynı bölgede yaşayan elektrokardiyografi (EKG), ekokardiyografi (EKO) ve koroner anjiyografi tetkikleri ile koroner arter hastalığı tanısı konmuş 117 bireylik hasta grubu (Grup I) ile aynı bölgede yaşayan rastgele seçilmiş EKG, EKO ve biyokimyasal tetkikleri yapılmış, aşkar koroner arter hastalığı semptomları bulunmaya kişilerden oluşan 117 bireylik kontrol grubu (Grup II) incelenmiştir. Gruplara ait kan örnekleri 2011-2012 yılı içerisinde Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda tedavi gören bireylerden alınmıştır. Bu çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Etik Kurul No: 2011-017).

DNA izolasyonu

Bireylerden total genomik DNA izolasyonu Sambrook ve ark. [11] tarafından tanımlanan standart fenol-kloroform protokolünde bazı modifikasyonlar gerçekleştirilerek uygulandı. EDTA'lı tüplerde saklanan kan örneklerinden 400 µL hacminde örnek 1,5 mL'lik ependorf tüplere aktarıldı ve üzerlerine eklenen 400 µL STE homojenizasyon tamponu (0,1 M NaCl, 0,01 M EDTA, 0,05 M Tris HCl (pH 8), %10 SDS) ile süspanse edildi. 50 µg/mL konsantrasyona sahip olacak şekilde proteinaz K eklendi ve 55°C'de belirli aralıklarla karıştırmak üzere 2-3 saat inkübasyona bırakıldı. Ekstraksiyon sonrası ekstraktlara iki kez bir hacim fenol, bir hacim kloroform-izoamil alkol (25: 24: 1) ekstraksiyonu ve bir kez daha kloroform-izoamil alkol (24: 1) ekstraksiyonu uygulandıktan sonra, alkol presipitasyonu yapılarak elde edilen genomik DNA 1xTE (10 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) tamponunda çözülerek -20°C'de saklandı.

Genomik DNA'nın belirlenmesi

Bu çalışmada IL-1α -889 C/T gen polimorfizmi agaroz jel üzerinde yürütülerek sonuçlar UV ışık altında okundu (Şekil 1)

Bireylerden izole edilen DNA örneklerinden 5 µL alınarak %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak etidyum bromid ile boyandı. İzole edilen DNA numuneleri kalite açısından (izolasyon sırasında hasar görüp görmediği) incelendi. İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu, spektrofotometre ile 260 nm'de absorbansları okunarak belirlendi. Stok DNA örneklerinden 20 µL alınarak 980 µl distile su ilave edilip 50 kat seyreltildikten sonra kvartz kuvetlerde konup spektrofotometrede absorbansı ölçüldü. Ayrıca stok DNA'nın 280 nm'de absorbansı ölçülerek protein kontaminasyonu olup olmadığı test edildi. İzole edilen DNA'nın konsantrasyonunu belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı; DNA (µg/mL)= 260 nm'deki OD (absorbans) x, sulandırma oranı x: 50. Bir absorbans 50 µg/mL çift iplikçikli DNA'ya karşılıktır.

Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon ürününden yaklaşık 5 µL alınarak, 1 µL yükleme tamponu (6X) (%50 gliserol, 0,1 M EDTA, %0,1 bromfenol mavisi, Xylen siyanol) ile karıştırıldı. TBE tamponu içerisindeki (0,089 M Tris, 0,089 M Borik Asit ve 0,011 M EDTA, pH: 8,3) %1,5'lik agaroz jelde ayrıştırıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında, 10 X TBE, distile su; 0,5 µg/mL etidyum bromid ve agaroz (sigma) kullanıldı. Elektroforezden sonra, DNA ultraviyole ışığı altında görüntülendi ve polimerize zincir reaksiyonu (PCR) ürünleri kontrol edildi.

PCR Amplifikasyonu

Polimorfizm bölgesini içine alan 194 bp'lik bölge, IL-1AF1 5'-GCA TGC CAT CAC ACC TAG TT-3' ve IL-1AR1 5'-TTA CAT ATG AGC CTT CCA TG-3' primerleri kullanılarak, daha önce tanımlandığı şekilde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı (111). PCR; 5 µL DNA şablonu, 10X tamponu içerisinde 1 U Taq polimeraz (Fermentas, Lituanya), 200 µmol dNTP, 1,5 mM MgCl₂ ve her bir primerden 20 pmol içeren 50 µL toplam hacim içerisinde gerçekleştirildi. PCR şartları şu şekilde tanımlandı: 94 °C'de 5 dak. ilk denatürasyonu takiben, denatürasyon 95 °C'de 30 sn, bağlanma 60 °C'de 1 dak. ve uzama 72 °C'de 1 dak., son denatürasyon 95 °C'de 5 dak., toplam 25 siklus.

Elde edilen PCR ürünleri, %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra, etidyum bromid ile boyanarak UV altında bantlar görüntülendi; -889'deki C allelini belirlemek için, 5 µL PCR ürünü, NcoI (Fermentas, Ottawa, ON, Canada) enzimi ile, uygun tampon içerisinde 4 saat 37 °C'de inkübe edilerek kesildi. Elde edilen kesim ürünleri %3 agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra etidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülendi. Bu işlem sonucunda üç farklı sonuç bulunmuştur: 194 bp fragmanı (TT genotip); 174 ve 20 bp fragmanları (CC genotip) ve 194, 174 ve 20 bp fragmanları (TC genotip) bulundu. 20 bp fragmanları agaroz jelde görüntülenemedi.

Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizimi (RFLP) Reaksiyonu

Hasta DNA'sında IL-1 α polimorfizminde bireylerin genotipleri PCR'a dayalı RFLP yöntemiyle belirlendi.

IL-1 α lokusu ile Kodon -889 C/T polimorfizmini belirlemek üzere NcoI restriksiyon enzimi kullanıldı. Enzim tamponu (Tris-asetat pH: 7,9; 10 mM magnezyum asetat, 66 mM potasyum asetat, 0,1 mg/mL BSA, Fermentas) 10 katı konsantrasyonda kullanıldı.

Sekans analizi

RFLP sonucu belirlenen genotipleri doğrulamak amacıyla farklı genotipe sahip bireylere ait örneklerin %5'i sekans analizi yaptırıldı. Sekans analizi sayesinde RFLP sonucu oluşması muhtemel kısmi sindirim riski elimine edildi. Bu çalışmada jelden DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak PCR ürünleri saflaştırıldı (AXYGEN). Farklı genotipteki PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Jeldeki her örneğe ait bantlar UV altında bir bistüri ile kesildi ve temiz bir zeminde küçük parçalara ayırarak 1,5 mL'lik ependorf tüplere konuldu. Her bir tüp hassas terazide darası alınarak jel parçalarının ağırlıkları ölçüldü. Jelden DNA İzolasyonu için AXYGEN in DNA jel ekstrasyon Spin Protokolu kullanıldı. PCR bantının olduğu jel parçası tüpe yerleştirildi. Hacmi belirlenen her bir tüp içerisindeki jel parçaları üzerine her hacmin 3 katı kadar Tampon DE-A (Jel çözücü) eklendi. Her bir tüp süspanse hale gelene kadar vortekslendi. Her bir tüp 6-8 dak. 75 °C'ye kadar ısıtılarak jelin tamamıyla çözülmesi sağlandı. Her 2-3 dak. bir hafifçe tüp vortekslendi ve jelin çözünmesi hızlandırıldı. Kullanılan Tampon DE-A'nın yarı hacminde Tampon DE-B (Bağlayıcı Tampon) eklendi. Örnek hacmi kadar 1x izopropanol eklendi. Ependorf tüplere filtrasyon sütunu yerleştirildi ve 1 dak. 15 000 rpm'de santrifüj edildi. Filtrasyon sütunu çıkartıldı ve tüpün dibine inen sıvı pipetle alındı. Sonra tekrar filtrasyon sütunu yerleştirildi ve üzerine 500 μ L Tampon W1 (Yıkama Tamponu) eklendi. 15 000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Filtrasyon sütunu çıkarılarak tüp dibindeki sıvı pipetle alındı ve sütun tekrar yerleştirildi. Üzerine 700 μ L Tampon W2 (Desalinize Tampon) eklendi ve 15000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Filtrasyon sütunu çıkartıldı ve tüpün dibine inen sıvı pipetle alındı. Filtrasyon sütunu yerleştirdikten sonra bir kez daha 700 μ L Tampon W2 eklendi ve bu kez 15000 rpm de 1 dak. santrifüj edildi. Filtrasyon sütunu çıkartıldı ve tüpün dibine inen sıvı pipetle alındı. Sonra tekrar filtrasyon sütunu yerleştirildi. Tüp bir kez daha 15 000 rpm de 1 dak. santrifüj edildi ve filtrasyon sütunu 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne yerleştirildi. Üzerine 65 °C de 1 dak. bekletilen çözücünden 30 μ L alarak tüpe eklendi. Daha sonra oda sıcaklığında 1 dak. bekletildi ve 15 000 rpm de 1 dak. santrifüj edildi. Filtrasyon 21 sütunu çıkartılarak, tüpün dibine inen çözünmüş DNA'nın 5 μ L'si %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Resmi çekildi ve 25 μ L'lik çözünmüş DNA örnekleri primerleriyle birlikte dizilemeye gönderildi.

İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SPSS (13,0) programı kullanılarak yapıldı. IL-1 α genotipinin çalışma ve kontroller arasındaki istatistiksel önemi ve risk katsayısı (OR) Pearson'un X² testi kullanılarak hesaplandı. Olasılık değeri (p) 0,05'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Bulgular

Çalışmamız tanısı kesinleşmiş 117 koroner arter hastalığı olan Grup I ile kardiyak tetkikleri yapılmış, aşikar koroner arter hastalığı semptomları bulunmayan 117 sağlıklı Grup II arasında yapıldı.

Grup I, 78 erkek (%66,66) ve 39 kadın (%33,33) bireyden, Grup II ise 49 erkek (%41,88) ve 68 kadın (%58,11) bireyden oluşuyordu (Tablo 1). Grup I ve Grup II arasında cinsiyete bağlı dağılımda istatistiksel olarak farklılık bulundu (p<0,05).

Tablo 1. Hasta ve kontrol popülasyonlarına ait demografik bilgiler.

	Hasta N (%)	Kontrol N (%)	p değeri	%95 OR
Örnek büyüklüğü	117 (100)	117 (100)		
Cinsiyet				
Erkek	78 (66,66)	49 (41,88)		
Kadın	39 (33,33)	68 (58,11)	0,001	0,36 (0,21-0,61)
Yaş Ortalama±SD	61,06±6,81	59,47±7,14	0,384	
Sigara durumu				
Yok	55 (47,00)	66 (56,41)		
Var	62 (52,99)	51 (43,58)	0,151	1,45 (0,87-2,44)
Yüksek kolesterol				
Yok	74 (63,24)	89 (76,06)		
Var	43 (36,75)	28 (23,93)	0,033	1,84 (1,04-3,25)
Yüksek tansiyon				
Yok	36 (30,76)	85 (72,64)		
Var	81 (69,23)	32 (27,35)	0,001	5,97 (3,39-10,51)
Diyabet				
Yok	75 (64,10)	76 (64,95)		
Var	42 (35,89)	41 (35,04)	0,89	1,03 (0,60-1,77)

- Grup I ve Grup II arasında yaşa bağlı dağılımda istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p>0,05$). (Tablo 1).
- Grup I ve Grup II arasında yüksek kolesterole bağlı dağılımda istatistiksel olarak farklılık bulundu ($p<0,05$). (Tablo 1).
- Grup I ve Grup II sigara içiciliğine bağlı dağılımda istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p>0,05$). (Tablo 1).
- Grup I ve Grup II arasında yüksek tansiyona bağlı dağılımda istatistiksel olarak farklılık bulundu ($p<0,05$). (Tablo 1).
- Grup I ve Grup II arasında diyabete bağlı dağılımda istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). (Tablo 1).

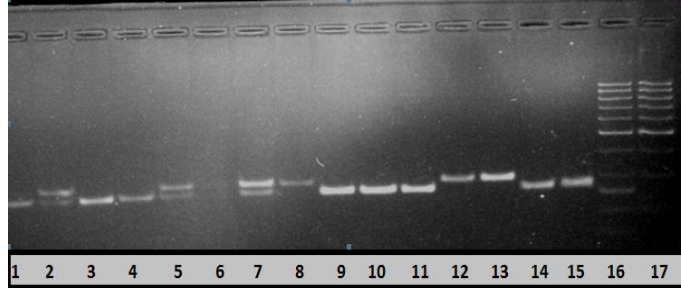
Hasta (Grup I) ve kontrol (Grup II) grubuna ait demografik bilgiler Tablo 1’de sunulmuştur.

Grup I ve Grup II popülasyonlarında IL-1 α -889 C/T polimorfizminin allel frekans dağılımları Tablo 2’de sunuldu. IL-1 α -889 C/T polimorfizmi için C allel frekansı Grup I’de %72,22 ve Grup II’de %75,21’dir. T allel frekansı dağılımı Grup I’de %27,77 ve Grup II’de %24,78 dir. Koroner arter hastalarında IL-1 α -889 C/T polimorfizminde allel T frekansı Grup I’de fazla olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Grup I ve Grup II popülasyonları arasında IL-1 α -889 C/T polimorfizminin genotip frekansına bağlı hastalık için istatistiksel riskler Tablo 2’de verilmiştir. IL-1 α -889 C/T polimorfizminde CC genotipinin CT genotipiyle karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptanmadı ($p>0,05$). TT genotipi ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç gözlenmedi ($p>0,05$). Bu çalışma sonucu gösteriyor ki; CT genotipi taşıyan bireylerin CC genotipi taşıyan bireylere göre koroner arter hastalığına yakalanma riski değişiklik göstermemektedir. TT genotipi taşıyan bireylerin ise, CC genotipi taşıyan bireylere göre aterosklerotik koroner arter hastalığına yakalanma riskinin daha fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir.

Tablo 2. Allel ve genotip frekansı dağılımları ve risk katsayıları.

Polimorfizm	Hasta n (%) (GrupI)	Kontrol n (%) (GrupII)	OR %95 CI	p değeri
IL-1				
C	169 (72,22)	176 (75,21)		
T	65 (27,77)	58 (24,78)	1,16 (0,77-1,76)	0,462
CC	64 (54,70)	70 (59,82)		
CT	41 (35,04)	36 (30,76)	1,24 (0,71-2,18)	0,443



Şekil 1. IL-1 α -889 C/T değişimini belirlemek üzere yapılan NcoI enzimi ile yapılan kesim sonuçları. CC: 9, 10, 11 nolu sütunlar, CT: 2, 5, 7 nolu sütunlar, TT: 12, 13 nolu sütunlar, marker 16 nolu sütun.

Tartışma

Nedeni bilinen ölüm vakaları arasında koroner kalp hastalığı (KAH)'na bağlı ölümler %40'lık oran ile birinci sırada yer almaktadır [12].

Ateroskleroz; serebral, kardiyak, periferik etkileri ile multisistemik bulgular verebilmesine karşın, kardiyak etkileri nedeniyle sıkça ön plana çıkmış ve diğer sistemleri etkileyen aterosklerozun kardiyak olayların da habercisi olabileceği düşünölmüştür. Ateroskleroz patogenezi multifaktöriyel olmasına rağmen inflamatuvar mekanizmalar ateroskleroz üzerinde temel bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda aterosklerozda kronik bir inflamatuvar sürecin söz konusu olduğu güçlü kanıtlarla gösterilmiştir [3].

Kalp hastalıklarının tedavisinin önemli bölümlerinden biri hastalığa ilişkin risk faktörlerinin belirlenip, kontrol altına alınarak gelişiminin engellenmesidir. National Cholesterol Education Program (NCEP) tarafından yapılan üçüncü erişkin tedavi paneli ile diğer çalışmalarda ateroskleroz için bildirilen risk faktörleri; yüksek serum total kolesterol ve düşük-dansiteli lipoprotein (LDL), yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), yükselmiş kan basıncı (kan basıncının 140/90 üzerinde oluşu veya antihipertansif ilaç kullanma), sigara içme, ileri yaş (erkekler için 45 yaş, kadınlar için 55 yaş üzerinde olma), trigliserit (TG), aile öyküsü, cinsiyet, obezite, lipoprotein (a) [Lp (a)], hipertansiyon (HT), diabetes mellitus (DM),yüksek C-reaktif protein (CRP) düzeyleri olarak bildirilmiştir [13]. Bu çalışmada etkinliği iyi bilinen cinsiyet, yaş dağılımı, kolesterol, tansiyon ve diyabet gibi demografik veriler de araştırıldı.

Aterosklerozisin erken lezyonları çocukluk çağında görülmesine rağmen, asıl hastalık insidansı her yıl artmaya devam eder; 60 yaşındaki miyokard infarktüsü insidansı, 40 yaşındakinin beş katından fazladır [14]. Bu çalışmada yaş ortalaması açısından Grup I 61,06±6,81; Grup II ise 59,47±7,14yaş ortalamasına sahip olduğu ve iki grubun yaş dağılımı açısından istatistiksel olarak benzer olduğu göröldü. Bu durum çalışmanın planlanmasında benzer yaş gruplarının çalışmaya dahil edilmesinin bir sonucu olarak yorumlanmıştır.

Erkeklerde aterosklerozis insidansı kadınlardan daha fazladır. Kadınlar menopoza kadar aterosklerotik hastalıklardan daha az etkilenirler. Menopozdan sonra kadınlarda hormonal koruma azalır ve 7 ve 8. dekadlarda miyokardiyal infarktüs insidansı erkek ve kadınlarda eşit olur; 35-50 yaş arası kadınlarda koroner arter hastalığı nedeniyle oluşan mortalite, erkek bireylerin beşte biridir [13]. Çalışmada cinsiyet dağılımı Grup I'de erkek cinsiyeti lehine istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu gözlenmiştir. Deneysel ve klinik çalışmalar, aterosklerozun önde gelen nedenlerinden birinin hiperlipidemi olduğunu göstermektedir [15,16]. Bu çalışmada, diğer önemli risk faktörü olan hiperlipidemi açısından Grup I'de 43 (%36,75) bireyde hiperkolestrolemi (>200 mg/dL) saptanırken, Grup II 'de sadece 28 (%23,93) bireyde bu risk faktörü saptandı. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı olarak belirlendi.

Sigara değişik yollarla ateroskleroza hızlandırmaktadır [17]. Bu çalışmada aktif sigara içiciliği açısından gruplar karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmadı. Framingham Heart çalışmasında yüksek tansiyonlu hasta grubunun kardiyovasküler risk oluşumu yönünden 2 kat daha fazla risk taşıdığı tespit edilmiştir [18]. Bu çalışmada da benzer sonuçlar alınmıştır.

DECODE (Diabetes Epidemiology Collaborative analysis Of Diagnostic Criteria in Europe) çalışması Avrupalı kadın ve erkeklerde yapılmıştır. Kardiyovasküler mortalite ile hiperinsülinemi, açlık insülini veya HOMAIR (Homeostasis Model Assessment of insulin Resistance) arasındaki ilişki diyabeti olmayan erkek ve kadınlarda diğer risk faktörlerine bağlı olmaksızın anlamlı bulunmuştur [19]. Bu çalışmada diyabet varlığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Güncel araştırmalarla birlikte, T ve B lenfositler, monositler, fibroblastlar, keratinositler, endotelial hücreler, astrositler, kemik iliği stromal hücreleri ve mezenkimal hücreler tarafından sentez edilen inflamatuvar sitokinler ateroskleroz patogeneğinde giderek artan bir şekilde araştırma konusu olmuştur. Bu iskemi ve reperfüzyon modellerinin de sıkça gündeme geldiği bu araştırmalarda IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α gibi sitokinler araştırılmıştır [20-22]. Ateroskleroziste genel olarak inflamatuvar sitokinler, reseptör düzeylerini azaltma eğilimindedirler, buna karşılık makrofaj gelişimi ve farklılaşmasını uyarıcı sitokinler reseptör düzeylerini artırır. Bu durum, dikkatimizin yağlı çizgilenmenin inflamatuvar/immün yönlerine odaklanmasına neden olmaktadır. İnsan aterosklerotik plağında T hücrelerinin çoğu makrofaj aktivasyonu ve inflamasyona neden olan TH1 tipindedir [23]. En önemli TH-1 sitokini, önemli vasküler aktivitesi bulunan interferon gamma (INF- γ) dir. INF- γ major makrofaj aktive edici sitokindir. Fagositozu arttırmak üzere makrofajları uyarır, TNF- α ve IL-1 gibi inflamatuvar sitokinleri salgılatır, proteolitik enzimlerin açığa çıkmasına neden olarak büyük miktarda toksik oksijen ve nitrik oksit (NO) radikalleri oluşmasına neden olur. TNF- α prokoagulan aktiviteyi uyarır. Tüm bu etkiler aterosklerozun uyarılması anlamına gelmektedir [24]. Bu inflamatuvar olayların benzer özellik göstermesine karşın, bireysel irksal veya anlık farklı davranışları bunların regülasyonundan sorumlu genlerin ortaya konması çabalarını arttırmıştır. Günümüzde artık aterosklerozis ve arteriyel tromboziste inflamasyon ve genetik iki önemli mekanizma olarak kabul görmektedir. İn vitro çalışmalar ve hayvan deneyleri klinik olarak kronik stabil anjina, anstabil anjina ve akut miyokard infarktüsünde inflamatuvar belirteçlerin belirleyici değerlerde yükseldiğini desteklemektedir. Yine çalışmalar inflamatuvar sistemdeki genetik varyasyonun koroner arter hastalığı riskini arttırdığını desteklemektedir. Genetik düzenlemedeki farklılıklar neden bazı insanlarda hastalık gelişmeyip bazılarında neden daha şiddetli inflamatuvar reaksiyon geliştiğini açıklayabilir [22, 25]. Yapılan bazı çalışmalar aterosklerozla bazı genlerin ilişkisini ortaya koymayı başarmıştır. IL-1 geni ile ilgili yapılan İngiliz çalışmasında IL-1 gen varyantlarının hastalığın varlığı ya da yaygınlığı ile anlamlı ilişki saptanmamış, ancak IL-1Ra 2 homozigotları tek damar hastalığı ile ilişkili bulunmuştur [26]. Yine bir kohort çalışmasında stent uygulanan hastalarda stent sonrası koroner restenozla IL-1 gen mutasyonu arasında istatistiksel ilişki saptanmıştır [27]. P-Selektin ve CD-14 genleri de bu konuda etkin olabileceği iddia edilen diğer genlerden bazılarıdır [28]. IL-1'in az ya da çok hastalık patogeneğinde etkisi olduğu gösterilen pek çok otoimmün hastalık ile IL-1RN VNTR Polimorfizmi incelenmiş olup bu hastalıklardan biri de KAH olarak gösterilmektedir. Francis ve ark. [29] çalışmasında IL-1RN2 allelinin tek damar hastalığı ile ilişkili olduğu ama üç damar hastalığı ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Vohnout ve ark. [30] çalışmalarında IL-1RN VNTR Polimorfizminin KAH ile ilişkisinin olmadığını gösterilmiştir. Indranil Banerjee ve ark. [31] Hindistan popülasyonunda inflamatuvar gen polimorfizmi ile koroner arter hastalığı arasındaki ilişkiyi araştırmışlar. Tek nükleotid polimorfizmi olarak CD14 (-159 C/T), TNFa (-308 G/A), IL-1a (-889 C/T), IL-6 (-174 G/C), PSMA6 (-8 C/G), ve PDE4D (SNP83 T/C) genlerine bakılmış hiç birinde anlamlı bir beraberlik gösterilememiştir.

Bütün bu sonuçlar dahilinde ateroskleroz serebral, kardiyak ve periferik damarları etkilemesine karşın, kardiyak etkilerin ön planda olması nedeniyle bizim çalışmamızda koroner ateroskleroz ve IL-1 α -889 C/T gen polimorfizminin ilişkisi araştırıldı. Bu çalışmada IL-1 α -889 C/T gen polimorfizmi agoroz jel üzerinde yürütülerek sonuçlar UV ışık altında okundu. IL-1 α -889 C/T polimorfizmi için C allel frekansı Grup I'de %72,22 ve Grup II'de %75,21 saptandı. T allel frekansı dağılımı Grup I'de %27,77ve Grup II'de ise %24,78 saptandı. Koroner arter hastalarında IL-1 α -889 C/T polimorfizminde istatistiksel olarak anlamlı değildi. IL-1 α -889 C/T polimorfizminde CC genotipinin CT genotipiyle karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptanmadı. TT genotipi ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç gözlenmedi. Bu çalışma sonucu gösteriyor ki; CC, CT ve TT genotipi taşıyan bireylerin KAH'na yakalanma riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Allel frekansının ve gruplar arasındaki genotipik dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark olamaması etkinliği gösterilen bu sitokin regülasyonunun, IL-1 α -889 C/T geni regülasyonu dışında çevresel, irksal ve anlık organizma cevabı gibi mekanizmaların da etkisi altında olabileceğini düşündürmektedir.

Tek gen polimorfizimleri sıklıkla tekrarlanan bir durum değildir. Irksal ve genotipik özellikleri her zaman fenotipik yansımalar meydana getirmeyebilir Referans çalışmalarda serum IL-1 α seviyeleri ve kardiyovasküler hastalıklar arasında ilişki olabileceği raporlanmasına karşın, bizim çalışmamızda bu sitokin regülasyonundan sorumlu gen mutasyonunun anlamlı saptanmaması, bu sitokin düzeylerinin çevresel, irksal ve anlık organizma cevabı gibi başka mekanizmalarca da regüle edilebileceğini düşündürmektedir.

Ateroskleroz yaş, cinsiyet gibi faktörlere kuvvetle bağlı olduğundan gen mutasyonları hemen bulgu vermeyip yaş, hormonal durum gibi etkenlerle baskılanıp, ortaya çıkacak sonuçların farkında olunmayabilir. Bu nedenle uygun koşullar ve multifaktöriyel özellikler göz önünde tutularak geniş tabanlı çalışmalar yapılmalıdır.

Referanslar

1. Zengin H. Ateroskleroz patogenezi J. Exp. Clin. Med 2012; 29:101-6.
2. Mallika V, Goswami B, Rajappa M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: A clinicobiochemical perspective. Angiology 2007; 58: 513-22.
3. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Lancet 1997; 349: 462-6.
4. Borish L, Steinke JW. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 460-75.
5. Lendon LC, Davies MJ, Born GVR, Richardson PD. Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased. Atherosclerosis 1991; 87: 87-90.
6. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in Acute Coronary Syndromes. Circulation 1994; 90: 775-8.
7. Tsimikas S, Witztum JL. Measuring circulating oxidized Low-Density lipoprotein to evaluate coronary risk. Circulation 2001; 103: 1930-2.
8. Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1 Ra in disease. Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13: 323-40.
9. Clay FE, Cork MJ, Tarlow JK, Blakemore AI, Harrington CI. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism associated with lichen sclerosis. Human Genetics 1996; 94: 404-10.
10. Zheng Zhang, Li-Jun Liu, Chen Zhang, Yong-Peng Yu. Association between Interleukin-1 Gene Single Nucleotide Polymorphisms and Ischemic Stroke Classified by TOAST Criteria in the Han Population of Northern China. Biomed Res Int 2013; 961039.

11. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989; 1659.
12. Onat A. Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı, yeni koroner olaylar ve kalpten ölüm sıklığı. TEKHARF (Türk erişkinlerinde kalp hastalığı ve risk faktörleri) 2009.
13. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001; 285: 2486-97.
14. Özkan Y, Koca SS, Gürsu F, Sonkaya E, Poyrazoğlu OK, Dönder E. Hiperlipidemik Hastalarda Atorvastatin Tedavisinin Serum Paraoksonaz-1 Düzeyine Etkisi. Fırat Tıp Dergisi 2004; 9: 123-6.
15. Tokgözoğlu L, Özer N. Ateroskleroz patogenezi. Özcan N. Koroner kalp hastalıkları. 1. Baskı. Ankara 1997; 129-63.
16. Gordon DJ, Probstfeld JL, Garrison RJ. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: Four prospective American study. Circulation 1989; 37: 47-53.
17. Algün E, Şekeroğlu R, Erkoç R, Özbek H, Alcı S, İlhan M ve ark. Sigara İçen Sağlıklı Gönüllülerde Çeşitli Aterosklerotik Risk Faktörlerinin Araştırılması ve Düşük Doz ACE İnhibitörü Kullanımının Bu Parametreler Üzerine Etkisi. Van Tıp Dergisi 1999; 6: 10-4.
18. Franklin SS, Gustin W, Wong ND. Hemodynamic patterns of age related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. Circulation 1997; 96: 308-15.
19. DECODE Study Group. Glucose tolerance and mortality: Comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria and European Diabetes Epidemiology Group. Lancet 1999; 354: 617-21.
20. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. Arthritis Res Ther 2006; 8: 2.
21. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. Blood 1989; 74: 1-10.
22. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable anjina and their reduction by aspirin. Circulation 1999; 100: 793-8.
23. Frostegård J, Ulfgrén AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U. ve ark. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: Dominance of proinflammatory (Th1) and macrophage stimulating cytokines. Atherosclerosis 1999; 145: 33-43.
24. Uyemura K, Demer LL, Castle SC, Jullien D, Berliner JA, Gately MK ve ark. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. J Clin Invest 1996; 97: 2130-8.
25. Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: The central role of interleukin-6. Eur Heart J 2000; 21: 1574-83.
26. Francis SE, Camp NJ, Burton AJ, Dewberry RM, Gunn J, Stephens-Lloyd A. ve ark. Interleukin -1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. Circulation 1999; 99: 861-6.
27. Kastrati A, Koch W, Berger PB, Mehilli J, Stephenson K, Neumann FJ et al. Protective role against restenosis from an interleukin -1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. J Am Coll Cardiol 2000; 36: 2168-73.
28. Shimada K, Watanabe Y, Mokuno H, Iwama Y, Daida H, Yamaguchi H. Common polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene is associated with acute myocardial infarction in Japanese men. Am J Cardiol 2000; 86: 682-4.
29. Francis SE, Camp NJ, Burton AJ, Dewberry RM, Gunn J, Stephens- Lloyd A et

- al. IL-1Ra gene polymorphism and restenosis after coronary angioplasty. *Heart* 2001; 86: 336-40.
30. Vohnout B, Di Castelnuovo A, Trotta R, D'Orazi A, Panniteri G, Montali A et al. IL-1 gene cluster polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Haematologica* 2003; 88: 54-60.
31. Banerje I, Pandey U, Hasan O, Parihar R. Association between inflammatory gene polymorphisms and coronary artery disease in an Indian population. *J Thromb Thrombolysis* 2009; 27: 88-94.