ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sabahattin CÖMERTPAY

KRONİK HEPATİTLİ BİREYLERDE ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM (ADE) GEN POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ VE ADE AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK HEPATİTLİ BİREYLERDE ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM (ADE) GEN POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ VE ADE AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Sabahattin CÖMERTPAY

YÜKSEK LİSANS

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez ..../...../…... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....…… İmza.....…. ….. İmza.....…….

Prof.Dr S.Seyhan TÜKEL Doç.Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ Doç.Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No :

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF 2006 YL82

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KRONİK HEPATİTLİ BİREYLERDE ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM (ADE) GEN POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ VE ADE AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Sabahattin CÖMERTPAY

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL

Yıl : 2007 **Sayfa** : 50

Juri : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Bu çalışmada Çukurova Bölgesi'nde yaşayan 20 kronik hepatit hastası (15 erkek, 5 kadın) ve 29 sağlıklı yetişkin bireyin (29 erkek) plazma ADE aktiviteleri ve ADE genotipleri belirlenmiştir. Ortalama aktivite değerlerinin hasta grubu için 27,16 $\pm$ 8,55 U/L, kontrol grubu için ise 25,77 $\pm$ 6,97 U/L olduğu bulunmuştur. Her iki grup için insersiyon (I) polimorfizmi gösteren allel sayısının delesyon (D) polimorfizmi gösteren allel sayısına (I/D) oranı sırasıyla 0,43 ve 0,23 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara bakılarak genotipteki farklılığın plazma ADE aktivitesini önemli ölçüde değiştirmediği ancak, kronik hepatitli bireylerde I alleli yoğunluğunun sağlıklı bireylerde görülen I alleli yoğunluğuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.01$).

Anahtar Kelimeler : ADE, I/D Polimorfizmi, Kronik Hepatit.

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME GENE (ACE) POLYMORPHISM AND DETERMINATION OF ACE ACTIVITY ON INDIVIDUALS WITH CHRONIC HEPATITIS

Sabahattin CÖMERTPAY

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF SCIENCE
UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Year : 2007 **Pages** : 50
Jury : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Assoc. Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
Assoc. Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

In this study, plasma ACE activities and ACE genotypes were determined in 20 adult patients with chronic hepatitis (15 males, 5 males) and 29 (29 males) adult healthy controls living in Cukurova Region. Averages of ACE activities were found as 27.16 ± 8.55 U/L and 25.77 $\pm$ 6.97 U/L for patients and healthy subjects, respectively. The ratios of allele number of showing insertion polymorphism (I) to allele number of showing deletion polymorphism (D) were accounted as 0.43 and 0.23 for patients and healthy subjects, respectively. As a result, in fact that the difference in genotypes does not effect plasma ACE activity, however, frequency of I alleles in patients with chronic hepatitis is significantly higher than frequency of I alleles in healthy individuals was established ($p<0.01$).

Key Words : Angiotensin Converting Enzyme (ACE), I/D Polymorphism, Chronic Hepatitis.

TEŞEKKÜR

Tezimin her basamağında bilgisi ve tecrübesinden yararlanmamı sağlayan, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL'e, ayrıca sayın hocalarım Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e, Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e ve Doç Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULARI'na;

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazımım sırasında yardımlarını esirgemeyen ve görüşlerini bildirerek gelişimime katkıda bulunan sayın hocalarım Arş.Gör. Özlem ALPTEKİN, Hasan KARADAĞ ve Deniz YILDIRIM'a;

Başkanı olduğu İstanbul Üniversitesi Moleküler Tıp Kürsü'sünün kapılarını sonuna kadar açarak çalışmalarımın hızlanmasını sağlayan ve sunduğu imkanlarla ufkumu genişleten sayın Prof. Dr. Turgay İSPİR'e, kürsüde çalıştığım süre boyunca sorularımı sabır ve güleryüzle cevaplayan Doç. Dr. Hülya YILMAZ'a ve Dr. Arzu ERGEN'e ve maddi ve manevi desteklerinden ötürü kürsüdeki tüm eğitmenlere ve öğrencilere;

Kronik Hepatitli bireylerin kan örneklerini toplamamda kolaylık sağlayan Balcalı Hastanesi Gastroenteroloji Bölümü Başkanı Prof. Dr. Hikmet AKKIZ'a ve tüm gastroenteroloji kliniği çalışanlarına, sağlıklı insan kan örneklerini toplamamda büyük ölçüde yardımlarını gördüğüm Balcalı Hastanesi Kan Merkezi Sorumluları ve Çalışanlarına;

Projemi destekleyen Ç.Ü. Arşatırma Fonu'na ve Yurtiçi Yüksek Lisans Bursu ile öğrenimimi sürdürmemi büyük ölçüde kolaylaştıran Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK);

Sadece çalışma süresince değil hayatımın her anında bana verdikleri destek ve güvenle kendimi iyi hissetmemi sağlayan babam Mehmet CÖMERTPAY'a ve annem Semiha CÖMERTPAY'a içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ..... I
ABSTRACT..... II
TEŞEKKÜR..... III
İÇİNDEKİLER..... IV
ÇİZELGELER DİZİNİ..... VII
ŞEKİLLER DİZİNİ..... VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR..... IX
1.GİRİŞ..... 1
1.1.Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim..... 1
1.1.1. Biyokimyası..... 2
1.1.2. ADE'nin Homologları..... 3
1.1.3. Genetiği..... 4
1.1.4. Polimorfizmi..... 4
1.1.4.1. Alu Elementi..... 5
1.1.5. Görevi..... 6
1.1.5.1. Renin Anjiyotensin-Aldesteron Sistemi (RAS)..... 6
1.1.5.1.(1). RAS'nin Elemanları..... 7
1.1.5.1.(1).(a). Renin..... 7
1.1.5.1.(1).(b).Anjyotensinojen..... 8
1.1.5.1.(1).(c). Anjiyotensinler..... 8
1.1.5.1.(1).(d).Anjiyotensin Resptörleri..... 10
1.1.5.1.(2). Ang II Aracılığıyla Etkilediği Sistemler..... 10
1.1.5.1.(2).(a). Kardiyovasküler Sistem..... 11
1.1.5.1.(2).(b). Merkezi Sinir Sistemi (MSS).... 11
1.1.5.1.(2).(c). Adrenal Korteks..... 11
1.1.5.2. Kinin-Kallikrein Sistemi (KKS)..... 11
1.2. Hepatitler..... 12
1.2.1. Akut Viral Hepatitler..... 13
1.2.1.1. A Tipi Viral Hepatit..... 13

1.2.1.2. B Tipi Viral Hepatit..... 14
1.2.1.3. C Tipi Viral Hepatit..... 15
1.2.1.4. D Tipi Viral Hepatit..... 15
1.2.1.5. E Tipi Viral Hepatit..... 15
1.2.2. Kronik Viral Hepatitler..... 16
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR..... 17
3. MATERYAL VE METOD..... 22
3.1. Materyal..... 22
3.1.1. Kimyasallar..... 22
3.1.2. Araç ve Gereçler..... 22
3.1.3. ADE Gen Bölgesi İçin Kullanılan Primer Dizileri..... 22
3.2. Çözeltiler 23
3.2.1. 80 mmol/L pH=8,3 Borat Tamponu..... 23
3.2.2. 50X Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) Tamponu..... 23
3.2.3. 5XTris-Borik Asit-EDTA (TBE) Tamponu..... 23
3.2.4. 10XTris-EDTA (1 mM Tris/0,1 mM EDTA) (TE) Tamponu..... 23
3.2.5. 0,5 M EDTA Çözeltisi..... 24
3.2.6. 1 M Tris pH 8 Tamponu..... 24
3.2.7. 5X Yükleme Çözeltisi..... 24
3.2.8. Etidyum Bromür (10 mg/dL)..... 24
3.2.9. Deoksinükleosittrifosfat (dNTP) Karışımı (100 µM)..... 24
3.2.10. Primer Karışımı (10 pmol/L)..... 25
3.3. METOD..... 25
3.3.1. Kan Örneklerinin Toplanması..... 25
3.3.2. FAPGG'nin Molar Absortivitesinin Bulunması..... 25
3.3.3. Periferik Kandan Plazma Ayrılması..... 26
3.3.4. Elektroferez ve Jel Hazırlanması..... 26
3.3.5. Kandan Genomik DNA İzolasyonu Kit Kullanım Protokolu..... 26
3.3.5.1. DNA Saflığının ve Derişiminin Hesaplanması..... 27
3.3.6. Plazma ADE Aktivitesinin Belirlenmesi..... 28
3.3.7. PZR Yöntemiyle ADE I/D Polimorfizminin Belirlenmesi..... 29

3.3.7.1. ADE I/D Polimorfik Bölgesi İçin Amplifikasyon Protokolu. 29
3.3.8. İstatiksel Analizler..... 29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 30
4.1. Bulgular..... 30
4.1.1. İstatiksel Bulgular..... 36
4.2.Tartışma..... 37
5.SONUÇ VE ÖNERİLER..... 42
5.1. Sonuçlar..... 42
5.2. Öneriler..... 42
KAYNAKLAR..... 43
ÖZGEÇMİŞ..... 50

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1 ADE Geninde Biallelik Polimorfizmler..... 4
Çizelge 4.1 Hasta ve Kontrol Grubundaki Bireylerin Genotipleri ve Gösterdikleri Plazma ADE Aktivitesi Değerleri..... 34
Çizelge 4.2 Hasta ve Kontrol Gruplarında Genotipe Bağlı Olarak Görülen Ortalama Plazma ADE Aktivitesi Değerleri..... 35
Çizelge 4.3 Hasta ve Kontrol Gruplarında I ve D Alleli Sayıları ve I/D Oranları. 35
Çizelge 4.4 Hasta ve Sağlıklı Bireylerde Cinsiyete Bağlı Olarak ADE Genotipleri..... 35

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1 Anjiyotensin I'in Anjiyotensin II'ye Dönüşümü..... 1
Şekil 1.2 Bradikininin İnaktifleştirilmesi..... 1
Şekil 1.3 Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim'in 3 Boyutlu Yapısı..... 2
Şekil 1.4 Alu Elementinin Girişi ve Buna Bağlı Olarak Oluşan İki Farklı Homozigot Genotipin Elektroferez Sonrası Görünümü..... 5
Şekil 1.5 Renin Katalizörlüğünde Anjiyotensinojenden Anjiyotensin I'in Üretimi..... 8
Şekil 1.6 Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sisteminde Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) ve Onun Homoloğu ADE2'nin Katalizlediği Reaksiyonların Birlikte Gösterimi..... 10
Şekil 1.7 Bradikinin Hormonunun Kimyasal Formülü..... 12
Şekil 4.1 Standart FAPGG Grafiği..... 30
Şekil 4.2 PZR İle Çoğaltılan Gen Bölgelerinin İçerisinde Etidyum Bromür Çözünmüş Agoroz Jelle Yapılan Elektroferez Sonrası UV Işık Altındaki Görünümü..... 31
Şekil 4.3 Hasta ve Kontrol Gruplarında Görülen Genotip Yüzdelerinin Grafiksel Gösterimi..... 32
Şekil 4.4. Hasta ve Kontrol Gruplarında I ve D Allellerinin Görülme Sıklığını Gösteren Grafik..... 33

1.GİRİŞ

1.1. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE)

Anjiyotensin-I-Dönüştürücü Enzim (ADE, peptidil-dipeptidaz A ya da kininaz II olarak da bilinir, EC 3.4.15.1) monomerik, hücre zarına bağlı, çinko ve klorüre bağımlı olarak aktivite gösteren, bir dekapeptit olan anjiyotensin I'i karbonil ucundan bir dipeptit (His-Leu) koparak anjiyotensin II'ye dönüştüren bir peptidil peptidazdır (Skeeggs ve ark., 1956), (Şekil1.1). İnsandaki diğer önemli görevi bradikinini yine karbonil ucundan bir dipeptit koparak inaktif formuna dönüştürmektir (Şekil 1.2). ADE vücutta çok yaygındır, özellikle akciğer kapiller endotelinde yoğun olarak bulunur. Akciğer kapiller yatağı, dolaşımdaki Anjiyotensin (Ang) II'nin üretildiği başlıca bölgedir.

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu (Ang-I)

↓ ADE

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe | His-Leu (Ang-II)

Şekil 1.1. Anjiyotensin I'nin Anjiyotensin II'ye Dönüşümü.

Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (Bradikinin)

↓ ADE

Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro | Phe-Arg (inaktif peptid)

Şekil 1.2. Bradikininin inaktifleştirilmesi.

1.1.1. Biyokimyası

ADE, hücre zarına bağlı bir enzimdir ve bir ekto-enzim olarak çalışır. Enzimin aktif merkezi hücrenin dış yüzeyine doğru yönlenmiştir. Çinko metalopeptidaz sınıfındandır ve enzimin 3 boyutlu yapısında merkeze bir Zn atomu yerleşmiştir (Şekil 1.3). Substrat spesifikliği geniştir ancak, katalitik etkinliği özellikle iki peptid üzerinde ölçülmüştür, bunlar; anjiyotensin I ve bradikinindir. Bu iki peptid için enzim dipeptidil karboksipeptidaz olarak görev yapar; böylece anjiyotensin I'i aktif formu olan anjiyotensin II okta peptidine, bradikinini de iki aşamayla inaktif formuna dönüştürür (Erdös, 1990). ADE, dipeptidil karboksipeptidaz aktivitesi aracılığıyla in vitro koşullarda bir çok oligopeptidi hidroliz edebilir.



Şekil 1.3. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim'in Üç Boyutlu Yapısı.

1.1.2. ADE'nin Homologları

ADE geninin ortaya çıkışı, yaklaşık 300-350 milyon yıl öncelere uzanmaktadır (Cornell ve ark., 1995). Bu tarihlerden itibaren kardiyovasküler sistemi olan ya da olmayan şempanze, inek, tavşan, tavuk, at sineği, ipek böceği, *Drosophila melanogaster, Caenorhaditis elegans* ve bazı bakteriler gibi bir çok türde bulunduğu bildirilmiştir (Corvol ve Williams, 1998).

ADE'nin birçok farklı türde görülen homologları olduğu gibi insan vücudundaki dağılımı da çeşitlidir. Yaygın olarak endotelyal ve epitelyal hücrede ve erkek spermatitlerinde bulunur. Endotelyal ve epitelyal hücrelerdeki formu "somatik form" (sADE) olarak adlandırılırken, spermatitlerde bulunan form "germinal form" (gADE) olarak isimlendirilmiştir. Bu iki formun primer yapısı birbirinden farklıdır. Aynı gen bölgesinde kodlanırlar ancak alternatif promotor bölgeler aracılığıyla transkript edilirler. Somatik ADE farklı katalitik özelliklere sahip iki aktif bölgeye sahipken, germinal ADE fonksiyonları büyük oranda bilinmemekle birlikte tek bir aktif bölgeye sahiptir. sADE'nin moleküler ağırlığının 170 kDa, daha küçük olan gADE'nin moleküler ağırlığının ise 100 kDa olduğu bildirilmiştir (Wei ve ark., 1991, Wei ve ark., 1992). Yapılan çalışmalar çoğunlukla sADE üzerine olduğu için özellikle belirtilmedikçe ADE dendiğinde somatik ADE formu akla gelmektedir.

ADE'nin 2000 yılında keşfedilen ve ADE2 olarak isimlendirilen bir memeli homoloğu daha vardır (Tipnis, 2000; Donoughe, 2000). Bu enzimin gen bölgesi insan X kromozomundadır ve 805 amino asitten oluşan bir yapıyı kodlar. Enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 120 kDa'dır. ADE2'nin N ucundan başlayarak %42'lık kısmı sADE'ye özdeştir ve aktif merkezi ise ADE'ye % 61 oranında benzerlik göstermektedir (Tipnis, 2000). ADE2 de ADE gibi karboksipeptidaz aktivitesinde bulunur ancak ADE'den farklı olarak bir aminoait koparır ve en önemli substratları Ang I ve Ang II'dir. ADE2, ADE substratlarından bradikinin ve p-hidroksihippurik asiti (p-hidroksihippuril-L-Histidil-Lösin : Hip-His-Leu) yıkamaz ve ADE inhibitörleri olan lisinopril ile kaptropilden etkilenmez.

1.1.3. ADE'nin Genetiği

Her bir haploid genom üzerinde 21 kilobaz (kb) uzunluğunda tek bir ADE geni vardır ve bu gen 26 ekson ve 25 intron bölgesi içerir. sADE 1-12 ve 14-26 ekson bölgerinden transkript edilirken daha kısa form olan gADE 13-26 ekson bölgesinden kodlanır. sADE'nin promotoru genin 5' ucunun ilk eksonuna, germinal formun promotoru ise 12. intronuna yerleşmiştir (Hubert ve ark., 1991).

1.1.4. Polimorfizmi

ADE geni üzerinde konuçlanmış 10 adet biallelik polimorfik bölge bilinmektedir. Bu bölgelerin listesi Çizelge 1.1'de verilmiştir.

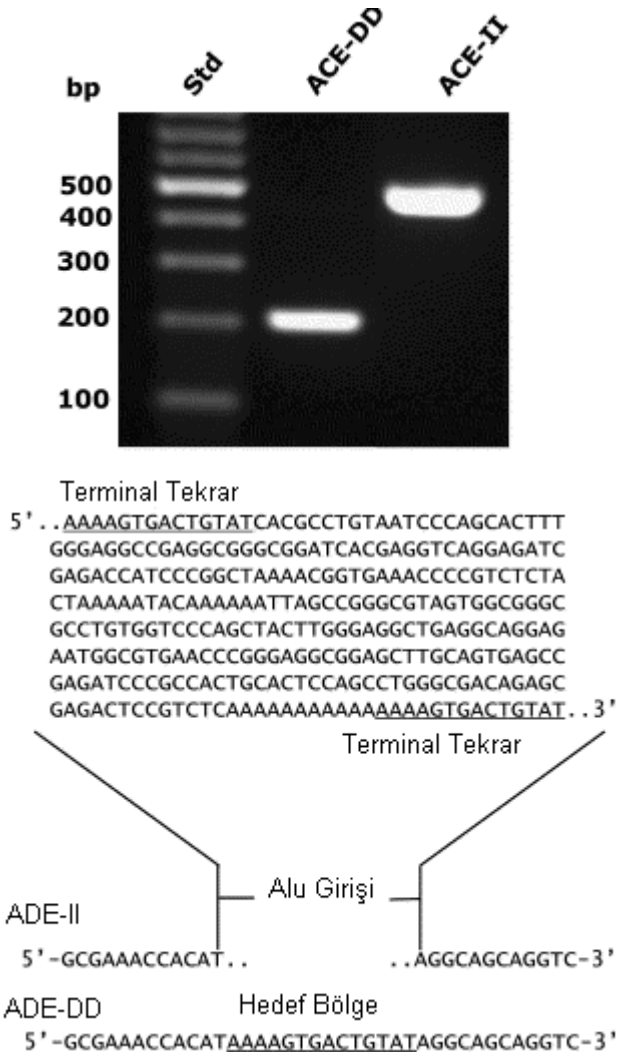
Çizelge 1.1. ADE geninde biallelik polimorfizmler (Keavney ve ark., 1998).

- T-5991C
- A-5466C
- T-3892C
- A-240T
- T-93C
- T-1237C
- G-2215A
- I/D
- G-2350A
- 4656$(CT)_{3/2}$

ADE polimorfizmleri arasında en çok çalışılanı insersiyon (I)/delesyon (D) polimorfzmidir. İnsan ADE geni 17. kromozoma yerleşmiştir ve 16. intronunda 278 baz çiftlik Alu elementinin varlığı (insersiyon) ve yokluğuna (delesyon) bağlı olarak bu polimorfizm meydana gelmektedir. Bu polimorfizmde II ve DD homozigot, ID heteozigottur (McKenzie ve ark., 2001). II, ID ve DD genotiplerinin dağılımı etnik

kökene bağlı olarak farklılık göstermektedir (McKenzie ve ark. 2001; Pasha ve ark., 2002).

Serumda ADE aktivitesinin ölçümüne dayanan çalışma sonunda ADE gen bölgesindeki I allellinin serumdaki ADE seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir. (Rigat ve ark., 1990).



Şekil 1.4. Alu Elementinin ADE Gen Bölgesine Girişi ve Buna Bağlı Olarak Oluşan İki Farklı Homozigot Genotipin Elektroferez Sonrası Görünümü (Hamdi ve Castellon, 2004).

1.1.4.1. Alu Elementi

ADE gen bölgesinde I/D polimorfizmini sağlayan Alu elementi Alu ailesine ait bir elementtir. Alu ailesi, ismini AluI restriksiyon endonükleazı tarafından kesilen özgül nükleotit dizileri bulundurmaları nedeniyle almıştır. Çalışılan tüm primat ve kemirgenlerin DNA'sında bulunduklarından dolayı Alu elementleri oldukça önemlidir. Memelilerde Alu elementi içinde özgül bir 40 baz çiftlik (bç) DNA dizisi mevcuttur.

Alu elementleri yer değiştirebilir elementlerdir. En önemli özellikleri, 200-300 bç'lik dizilerin her iki taraftan 7-20 bç'lik tekrar dizileri ile çevrelenmiş olmalarıdır. Bu bölgeler transpozisyon esnasında insersiyon işlemi ile ilgilidr.

1.1.5. ADE'nin Görevi

ADE insan metabolizmasında Renin-Anjiyotensin-Aldestoron Sistemi (RAS) ve Kinin-Kallikrein Sistemi (KKS) olmak üzere başlıca iki sistemde görev alır. Bir diğer fonksiyonu ise acının periferal sistemden merkezi sinir sistemine iletimini sağlayan P maddesi ve nörokinini inaktif formuna dönüştürmektir (Danilczyk ve ark., 2003).

1.1.5.1. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi

RAS; homeostatik birçok olayda önemli rol oynayan bir endokrin sistemdir. Özellikle su-elektrolit dengesinin, kan hacminin ve arter kan basıncının düzenlenmesinde ve fizyolojik düzeylerde devamının sağlanmasında görev alır.

Dokularda renin ve anjiyotensinojen genlerinin belirmesini (ekspresyonunu) sağlayan birçok faktör bulunmaktadır (Dzavu, 1988). Örneğin sodyum azalması böbrekte renin ve anjiyotensinojen mRNA'sının artmasına neden olur ve böbrekiçi hemodinamiği değişir. Anjiyotensinojenin Renin yardımıyla yıkılması sonucu Ang II oluşur. Ang II'nin derişiminin artması aldosteron salgılanmasını uyarır ve aldosteron miktarı artar. Aldosteron distal tübülde Na^+ iyonunun geri emilini artırır. İlginç olan

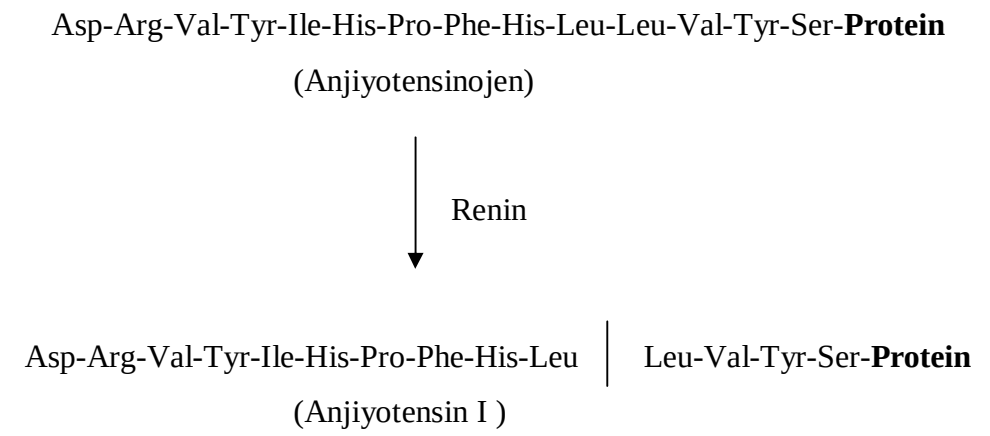
nokta renin ve anjiyotensinojen gen ekspresyonunun dokuya spesifik özellik göstermesidir. Örneğin; sodyum düzeyi düşmesinin böbrek anjiyotensinojen mRNA düzeyini arttırırken, hepatik anjiyotensinojen mRNA düzeyini etkilemediği bildirilmektedir (Ingelfinger ve ark., 1986).

1.1.5.1.(1). RAS'nin Elemanları

RAS'nin ana elemanları renin, anjiyotensinojen, anjiyotensinler ve anjiyotensin reseptörleridir. Ang II, RAS sisteminin en önemli hormonu olarak bilinmektedir ancak bugün Ang I ve Ang II'nin diğer biyolojik aktif anjiyotensinlerin ara maddeleri olabileceği düşünülmektedir. Örneğin Ang (1-7) ile yapılan deneylerde bu anjiyotensinin büyümeyi inhibe eden hücresel olaylarda görev alan prostaglandinlerin salgılanmasını uyardığı gözlenmiştir (Welches ve ark., 1993). Bunun yanında Ang (1-7) su-tuz atımını, böbrek-kan akımından bağımsız bir yolla arttırmaktadır (Benter ve ark., 1993).

1.1.5.1.(1).(a). Renin

Böbrekten salınmakta ve kan basıncını yükseltmektedir. Bir anjiyotensinojenin amino ucundaki ilk 14 aminoasitlik kısımda Leu-Leu peptid bağını kırarak 10 amino asitli Anjiyotensin I'in ortaya çıkmasını sağlar (Şekil 1.5). Böylece RAS çarkını başlatır. İki polipeptit zincirinden oluşmuştur ve belli bir substrat özgüllüğüne ve 14 aminoasitten oluşan tetra dekapeptide karşı yüksek bir ilgiye sahiptir. Başlıca bulunma yeri böbrektir ancak beyin, kan damarları, böbreküstü bezi ve genital sistemde de bulunur.



Şekil 1.5. Renin Katalizörlüğünde Anjiyotensinojenden Anjiyotensin I'in Üretimi.

1.1.5.1.(1).(b). Anjiyotensinojen (A-0)

Ang I'in öncül maddesidir ve 453 aminoasitten oluşmuştur. Yaklaşık molekül ağırlığı 60 000 Da'dır. Büyük çoğunluğu karaciğerden sentezlense de beyin ve böbreklerde de bulunmaktadır. Serin proteaz inhibitörü olan serpinler sınıfındandırlar. Renin tarafından yıkılarak Ang I'e dönüştürülür ve anjiyotensinlerin oluşumunu başlatır (Şekil 1.5). Karaciğerde anjiyotensinojen ekspresyonunun anjiyotensin II seviyesi artışına bağlı olarak arttığı bildirilmiştir (Nakamura A. ve ark., 1990).

1.1.5.1.(1).(c). Anjiyotensinler

Anjiyotensinler peptit yapılı hormonlardır ve en önemli üretim yolları Ang I'in ADE ile katabolize olmasıdır. Ancak bunun yanında selektif olmayan birçok proteaz (tonin, katepsin G ve kallikrein) yardımıyla Ang I'den veya doğrudan anjiyotensinojenden Ang II üretebilmektedir (Kohara ve ark., 1993). Ayrıca prolil-endopeptidaz aktivitesi ile Ang I'den direkt olarak Ang (1-7) üretildiği bildirilmiştir (Santos ve ark., 2000).

Ang I, anjiyotensinojenin Leu-Leu bağının renin tarafından koparılması sonucu açığa çıkan dekapeptittir. Ang (1-10). Bu dekapeptitin karboksi ucundaki

His-Leu dipeptidi ADE tarafından koparılır ve böylece bir oktapeptit olan Ang II açığa çıkar, Ang (1-8), (Şekil 1.6).

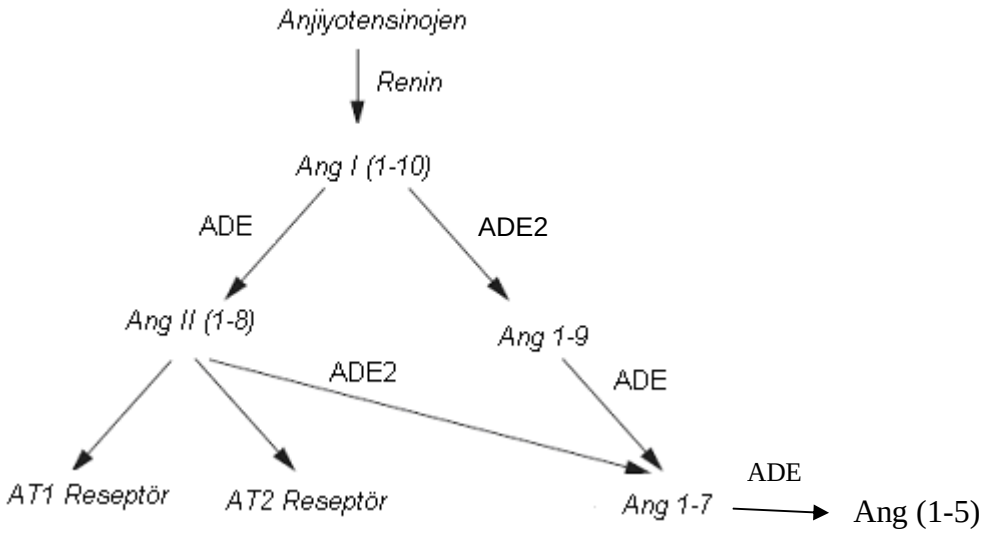
Ang II, anjiyotensinaz olarak bilinen bir grup enzim tarafından parçalanır. Bu enzim grubunda yer alan aminopeptidaz Ang II'yi amino ucundan bir aspartik asit koparak Ang III heptapeptitine dönüştürür, Ang (2-8).

Ang III'ün amino ucundan bir aminoasitin daha kopması sonucu bir hekzapeptit olan Ang IV meydana gelir, Ang (3-8).

Ang (1-9) nanopeptidi Ang I 'den ADE2 enzimi yardımıyla karboksil ucundaki bir aminoasitin koparılmasıyla oluşur. Ang (1-9)'un karboksi ucundan ADE yardımıyla His-Leu dipeptidi koparıldığında Ang (1-7) oluşur (Şekil 1.6).

Ang (1-7) heptapeptidi ise hem Ang II'den ADE2 yardımıyla karboksil ucundan Phe aminoasitinin koparılması, hem Ang (1-9)'un karboksi ucundan ADE yardımıyla Phe-His dipeptidinin koparılması sonucu oluşabilir. Ang (1-7) üretiminin bir diğer yolu da endopeptidaz sınıfı enzimler yardımıyla Ang I'in karboksi ucundaki üç aminoasitin koparılmasıdır. Ang (1-7)'nin plazma, doku ve idrardaki seviyesi ADE ile ters orantılıdır ve ADE inhibisyonunun plazma, doku ve idrarda Ang (1-7) seviyesini arttırdığı bildirilmiştir (Kohara ve ark.., 1993).

Ang II, RAS sisteminin en önemli hormonu olarak bilinir ancak bugün Ang I ve Ang II'nin diğer biyolojik aktif anjiyotensinlerin ara maddeleri olabileceği düşünülmektedir. Ang (1-7) ile yapılan deneylerde bu anjiyotensinin büyümeyi inhibe eden hücresel olaylarda görev alan prostaglandinlerin salgılanmasını uyardığı bildirilmiştir (Welches ve ark., 1993). Bunun yanında Ang (1-7) su-tuz atımını, böbrek-kan akımından bağımsız bir yolla arttırmaktadır (Benter ve ark., 1993).



Şekil 1.6. Renin-Anjiyotensin Sisteminde Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) ve onun homoloğu ADE2'nin katalizlediği reaksiyonların birlikte gösterimi.

1.1.5.1.(1).(d). Anjiyotensin Reseptörleri

Ang II fizyolojik etkilerini dokuların plazma membranlarında yerleşmiş bulunan spesifik reseptörlerine bağlanarak gösterir. Reseptörün peptit tarafından tanınmasında peptiti oluşturan aminoasitlerin sırası önemlidir. Ang II'nin iki farklı Anjiyotensin Reseptörü 1 (AT_1) ve Anjiyotensin Reseptörü 2 (AT_2) reseptörü olduğu vardır. Her iki alttip reseptörün bir çok farklı dokuda (beyin, böbreküstü, böbrek, beyin, kalp) bulunduğu bildirilmiştir (Vallotton M.B., 1987; Chinu ve ark., 1989; Heblin ve ark., 1991; Scott ve ark., 1992). Bu alt tip reseptörlerin dağılış oranları da dokudan dokuya farklılık gösterir. Reseptörlerin dokulardaki heterojen dağılımı, dokunun Ang II'ye yanıtını önemli ölçüde etkilemektedir.

1.1.5.1.(1). Ang II Aracılığıyla Etkilediği Sistemler

Anjiyotensin dönüştürücü enzimin RAS'deki görevi Ang I'i Ang II'ye dönüştürmektir. Böylece üretilen Ang II aşağıdaki hedef organlarda görev alır.

1.1.5.1.(1).(a). Kardiyovasküler sistem

Anjiyotensin II vücuttaki en güçlü vazokonstriktör maddedir ve arteriyoller üzerine direkt olarak etki eder. Sonuç kan basıncının artmasıdır.

1.1.5.1.(1).(b). Merkezi Sinir Sistemi (MSS)

Anjiyotensin II dolaşım merkezini uyararak sonuçta vazokonstriksiyona yol açar; bu durum arteriyol üzerine olan direkt etkiyi daha da artırır. Bunun ötesinde anjiyotensin II hipotalamustaki susama mekanizmasını da çalıştırır ve NaCl'e ihtiyacı düzenlemede uyarıcı rol oynar.

1.1.5.1.(1).(c). Böbrek

Burada da anjiyotensin II vazokonstriktör etkisini gösterir. Bu yolla hem renal kan akımı hem de Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFH) düşer.

1.1.5.1.(1).(d). Adrenal Korteks

Anjiyotensin II adrenal kortekste aldosteron salınımını uyarır. Aldosteron, distal tübülde Na^+ iyonunun geri emilimini artırır ve böylece GFH azalsa bile Na^+ ve H_2O tutucu etkisi artar.

1.1.5.2. Kinin-Kallikrein Sistemi (KKS)

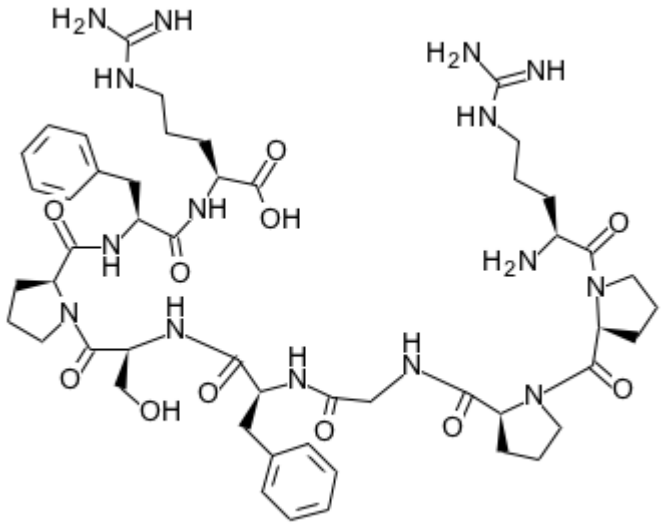
İltihaplanma, kan basıncı kontrolu, koagulasyon ve acıdan sorumlu sistemdir. Basitçe kinin sistemi olarak da bilinir.

Kininler (bradikinin ve lizilbradikinin), dokuların zarar görmesi sonucu üretilirler. Öncü molekülleri olan kininojenden oluşurlar. Kininojenler de kininojenaz denilen proteazlar tarafından aktive edilirler. 3 tip kininojen tanımlanmıştır; yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK: High Molecular Weight Kininogen) düşük

molekül ağırlıklı kininojen (LMWK: Low Molecular Weight Kininogen) ve T-kininojen. Kininojenler, iltihaplanmaya karşı hücrelerin verdiği tepkiye bağlı olarak kininlerin üretimini sağlamasının yanı sıra pıhtılaşma yolağında kofaktör olarak görev alır. Ayrıca vücuttaki toksin maddeleri temizleyen beyin ve karaciğeri de sigara ve alkolün zararlarından koruyan sisteini parçalayan sistein proteaz enziminin inhibitörüdür.

Kinin sisteminin en iyi bilinen mediatörü bradikinin'dir (Şekil 1.6.). Bu mediatör vasküler geçirgenliği artırır, düz kas kasılması yapar, kan damarlarını genişletir ve inflamasyonda ağrı duyusundan sorumludur. Bradikinin ADE'ye olan ilgisi, Ang I'den fazladır (Crisan ve Carr, 2000).

ADE'nin kinin-kallikrein sistemindeki rolu bradikinin hormonu üzerindendir. ADE, bradikininin karboksi ucundan Phe-Arg dipeptidini koparark onu inaktive eder ve bu yüzen kininaz II olarak adlandırılır.



Şekil 1.7. Bradikinin hormonunun kimyasal formülü.

1.2. Hepatitler

Hepatit, kelime anlamının akla getirdiğinden daha sınırlı biçimde kullanılan bir terimdir. Özellikle vurgulanmadıkça, bu terim karaciğerin bakteriyel ve paraziter enfeksiyonları dışındaki lezyonları düşündürür. Bu lezyonlar yaygındır, virüslere,

toksik etkenlere, metabolik zedelenmeye veya genetik nedenlere bağlı olabilirler. Sebeplerine bağlı (etyolojik) olarak sınıflanabilseler bile, değişik etkenlerle oluşan hepatitlerin morfolojileri birbirine çok benzer. Bu nedenle, yalnızca morfolojik verilere dayanılarak hiçbir hepatitin kesin etyolojik tanısı konulamaz. Başka bir deyişle, ışık mikroskobu altında izlenen bir "hepatit" görünümünden yukarıdaki etkenlerden herhangi biri sorumlu olabilir.

Kliniklerde "hepatit" sözcüğü tek başına kullanıldığında çoğu kez hepatotropizm gösteren virüslerle oluşmuş bir "viral hepatit" kastedilmektedir. Öte yandan, enfeksiyon ajanlarının kana karıştığı hemen hemen tüm koşullarda, karaciğerde de hepatit bulguları oluşabilir.

1.2.1. Akut Viral Hepatitler

Bunlar, hepatotrop virüslerle oluşurlar. Bulantı, iştahsızlık, yağlı yiyeceklerden tiksinme, kusma ve ateş ilk bulgulardır. Bunlara ağrılar ve deri döküntüleri eşlik edebilir. Sarılık, birkaç gün içinde başlayıp 10. günde en üst düzeye ulaşabilir. Sarılık, erişkinlerin akut Hepatit A Virüsü (HAV) enfeksiyonunda sık, Hepatit C Virüsü (HCV) enfeksiyonunda ise çok seyrek görülür. Bu dönemde idrar koyulaşırken dışkının rengi de soluklaşır. Ancak, sarılığın çoğu olguda hiçbir zaman oluşmayabileceği unutulmamalıdır.

1.2.1.1. A Tipi Viral Hepatit

Kötü hijyen koşullarında yaşayanlarda ve toplumun dar gelirli kesimlerinde yaygındır. Çoğu olgu asemptomatik seyreder. Tanı, serumda anti-HAV ve IgM'nin gösterilmesi ile konulabilir. Daha sonra oluşan IgG, sonraki enfeksiyona karşı koruyucu niteliktedir. Hepatit A virüsü sitopatik değildir. Taşıyıcılık veya kronikleşme söz konusu olmaz.

HAV enfeksiyonunda görülen bulgular, hastanın dinlenmesinin sağlanması ve uygun diyetin verilmesi sonrasında birkaç haftada geriler ve birkaç ay içinde hasta her bakımdan normale döner. Hastalığın iyileşmesi sonrası HAV virüsüne karşı bağışıklık gelişir.

1.2.1.2. B Tipi Viral Hepatit

Taşıyıcılık, kronikleşme, siroz ve hepatosellüler karsinoma oluşturabilme riskleri bulunan Hepatit B Virüsü (HBV) enfeksiyonunun viral hepatitler içinde ayrı bir yeri vardır. Hepatit B virüsünün saptanabilen antijenleri arasında yüzey antijeni (surface:s), çekirdek (core:c) antijeni ve enfektivite (e) antijeni bulunur. Serumda bunlara ve HBV DNA'sına bakılarak hastalığın durumu hakkında değerlendirme yapılabilir. Olguların %90 kadarında akut enfeksiyondan birkaç ay sonra anti Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ve IgG gelişir. Enfeksiyonda görülen karaciğer hasarı enfekte hücrelerinin bağışıklık sistemi aracılığıyla tahrip edilmesinden oluşur. Bağışıklık sistemi zayıf olan hastalar, hemodiyaliz hastaları, hemofili hastaları, Down sendronlu hastalarda kronikleşme oranı daha yüksektir.Yenidoğanlarda bağışıklık sistemi yeterince gelişmediğinden enfeksiyon kronikleşme ile sonuçlanır. Hastalığın kronikleşmesine yol açan koşullar tam olarak bilinmemektedir.

Taşıyıcılar, serumlarında anti Hepatit B çekirdek antijeni (HBcAg) bulunan ancak, serolojik olarak anti-HBsAg oluşturmamış kişilerdir. Taşıyıcıların biyopsilerinde hepatositlerin sitoplazmalarında çok miktarda üretilen HBsAg'nin neden olduğu buzlu cam görünümü izlenir. İmmunohistokimyasal olarak, bu hücrelerde sitoplazmik HBsAg, gösterilebilir. Kronik hepatitli olguların bir kısmında bunlara ek olarak Hepatit B enfektivite antijeni (HBeAg) de serumda bulunur. Hastalığı bulaştırabilen bu kişilerde HBV DNA'sı ve DNA polimerazı da serumda saptanabilir. Taşıyıcılık oranı ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde taşıyıcılık oranları %1'in çok altındadır. Afrika'da %20'yi geçebilen bu oran ülkemizde %5-10 olarak bildirilmektedir (Andre, 2000; Mıstık ve Balık, 2001; Tasyaran, 2001).

Anti-HBsAg, koruyucu niteliktedir; aşılar, bunun oluşmasını sağlamaya yöneliktir. Bulaşma doğum sırasında anneden bebeğe olduğunda (vertikal geçiş), taşıyıcılık ve kronikleşme olasılığı %90'ı geçmektedir. Bu bebeklerde çocukluk ve gençlik döneminde hepatosellüler karsinomaya varan düzeyde komplikasyonlar da görüldüğünden, anne adaylarının HBV enfeksiyonu geçirip geçirmediklerinin saptanmasında ve bebeğin özel yöntemlerle korunmasında büyük yarar vardır.

1.2.1.3. C Tipi Viral Hepatit

Kronikleşme olasılığı %70'in üzerinde olan bu tür hepatitin en başta gelen bulaşma yolu kan naklidir. Tanısı, Hepatit C Virüsü (HCV) RNA'sına karşı antikorların serumda gösterilmesiyle konulur. Bu antikorlar koruyucu nitelikte değildir. Akut dönemi hemen her zaman asemptomatik olan bu enfeksiyon, siroz ve hepatosellüler karsinoma gelişmesi riskleri açısından HBV enfeksiyonundan çok daha tehlikelidir. Taşıyıcılığının HBV'ye göre daha düşük oranda olması, bu virüs ile karşılaşıp asemptomatik kalabilmenin daha zor olduğunun göstergesidir. HCV için kullanılan bir aşı henüz yoktur. Kronik Hepatit C'li bireylerde ADE inhibitörü ile interferonun beraber uygulanmasının interferonun HCV'ye karşı etkisini güçlendirdiği bildirilmiştir (Yoshiji ve ark., 2006).

1.2.1.4. D Tipi Viral Hepatit

Yalnızca HBV ile enfekte kişilere bulaşabilen ve hepatosit çekirdeğine yerleşen bu defektif RNA virüs, HBV enfeksiyonunun seyrini ağırlaştırıcı niteliktedir. Enfeksiyon, HBV ile aynı anda (koenfeksiyon) veya onun üzerine eklenme biçiminde (süperenfeksiyon) olabilir. Koenfeksiyonun aksine, süperenfeksiyon, mevcut hastalığın ağırlaşmasına ve/veya kronikleşmesine neden olur. HBV için yapılan tedavi ve korunma dolaylı olarak Hepatit D Virüsü (HDV) tedavisini de sağlamaktadır.

1.2.1.5. E Tipi Viral Hepatit

Asya ve Afrika'da epidemik olarak görülen bu enfeksiyon; hamilelerde oluşturduğu yüksek mortalite dışında, HAV enfeksiyonuna benzer özellikler sergiler. Özellikle az gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Kronik hastalığa yol açmaz. Hepatit E Virüsü (HEV) için geliştirilmiş bir aşı yoktur.

1.2.2. Kronik Hepatitler

Karaciğer hastalığının semptomatik, biyokimyasal veya serolojik bulgularının 6 aydan uzun sürmesi kronik hepatit olarak kabul edilir. HBV ve HCV enfeksiyonu dışında, otoimmün nedenlerle ve ilaçlarla da kronik hepatit oluşabilir. Kronik hepatitlerin tanısında klinik gözlem ve laboratuar verilerinin önemli yeri olmakla birlikte; kesin tanı için biyopsi ile inflamasyon ve nekrozun gösterilmesi çoğu kez gereklidir.

Kronik hepatitleri çok önemli yapan, bu olgularda karaciğerin geri dönüşsüz bir hastalığı olan sirozun gelişebilmesidir. Sirozun gelişip gelişmeyeceğini ve hangi olguda ne zaman ortaya çıkabileceğini kestirmek çoğu kez mümkün olmaz. Yine de, hastaların hangilerinin daha riskli grupta yer aldığının, hangilerinde hastalığın göreceli olarak durağan seyrettiğinin bilinmesi olanağı vardır. Bu olanağı, histopatolojik inceleme sağlar. Histopatolojik inceleme ile, kronik hepatitlerdeki nekroinflamatuar aktivitenin ve fibrozisin derecesi saptanır. Nekroinflamatuar aktivitenin belirgin olduğu olgularda bunu azaltıcı etkisi olduğu bilinen bazı interferon türleri (HBV enfeksiyonunda gama interferon, HCV enfeksiyonunda alfa interferon gibi) kullanılmaktadır. Fibrozis genellikle geri dönüşsüzdür; rejenerasyon ile birlikte olduğunda siroza dönüşür.

Bireylerin Kronik hepatite genetik yatkınlığı olabileceği düşünülmektedir (Page ve ark., 1975). Kronik karaciğer hasarı olan farelerde ve insanlarda ADE2 mRNA ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğu ve ADE2 seviyesinin belirgin bir şekilde arttığı bildirilmiştir (Paizis ve ark. 2005).

Bu bilgilerin ışığında çalışmanın amacı ADE I/D polimorfizmi ve plazma ADE aktivitesi ile kronik hepatit arasında bir ilişki olup olmadığını saptamaktır. Bunun için kronik hepatitli ve sağlıklı bireylerde ADE I/D polimorfizmini belirlemek ve plazmadaki ADE aktivitesini ölçmek bu çalışmanın temelini oluşturmuştur.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADE (ACE) **:** Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim

ADE-I **:** Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü

Ang **:** Anjiyotensin

AT : Anjiyotensin Reseptörü

bç **:** Baz çifti

BDL **:** Safra Kanalı Bağlama (Bile Duct Ligation)

D **:** Delesyon Polimorfizmi

DNA **:** Deoksiribonükleik asit

HAV **:** Hepatit A Virüsü

HBV **:** Hepatit B Virüsü

HBcAg **:** Hepatit B Çekirdek (core) Antijeni

HBeAg **:** Hepatit B Enfektivite (infectivity) antijeni

HBsAg **:** Hepatit B Yüzey (surface) antijeni

HCV **:** Hepatit C Virüsü

HL-A **:** İnsan Lökosit Antijeni (Human Leucocyte Antigen)

I **:** İnsersiyon Polimorfizmi

IFN **:** İnterferon

IgA **:** İmmünglobülin A

IgG **:** İmmünglobülin G

IgM **:** İmmünglobülin M

kb **:** Kilobaz

KKS **:** Kinin Kallikrein Sistemi

mRNA **:** Mesajcı ribonükleik asit

PCR **:** Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

RAS **:** Renin-Anjiyotensin-Aldestoron Sistemi

RNA **:** Ribonükleik asit

U **:** Enzim Ünitesi

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Page ve ark. (1975), 21 kronik hepatit hastası ve 216 sağlıklı birey üzerinde yaptıkları çalışmada bireylerin (Human Leucocyte Antigen) HL-A tiplerini ve HL-A genotiplerini belirlemişlerdir. Hasta bireylerde sırasıyla HL-A8 ve HL-A1 antijenlerinin baskın olduğunu bulmuşlardır. Çalışma sonunda HL-A1'in hastaların % 48'inde sağlıklı bireylerin ise % 24'ünde görüldüğünü, HL-A8'in ise hastaların % 62'sinde ve sağlıklı bireylerin %18'inde görüldüğünü bildirmişlerdir. Yaptıkları genetik analizde HL-A8 homozigotun hastaların % 28,5'inde sağlıklı bireylerin % 2.8'inde, HL-A1 homozigotun ise hastaların %19'unda, sağlıklı bireylerin ise % 0,9'unda görüldüğünü saptamışlardır. Bu sonuçlara göre HL-A tipini kodlayan gen bölgesinin kronik hepatit için bir risk faktörü olabileceği sonucuna varmışlardır.

Cambien ve ark. (1988), bireyleri sağlıklı 87 aile üzerinde yaptıkları çalışmada babalar (n=87), anneler (n=87) ve çocuklar (n=169) için ortalama ADE aktivite değerleri sırasıyla 34,1 ± 10,7, 30,7 ± 10,4 ve 43,1 ± 17,2 bulunmuştur. Anne ve babalar için plazma ADE aktivitesi ile yaş, boy, kilo ve kan basıncı ile ilişki bulamamışlar ancak çocuklarda yaş ile enzim aktivitesi arasında ters bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Aile bireyleri arasında ADE aktivitesi ilişkileri kurulmaya çalışılmış ve ikili gruplar arasındaki ilişiki (p) değerleri sırasıyla, eşler için; 0,38, baba ve çoçuk için; 0,166, anne ve çocuk için; 0,323, kardeşler için; 0,303 olarak hesaplanmıştır. Yaptıkları genetik analiz sonunda baskın bir genin plazmadaki enzim aktivitesinin bireyler arası değişimini etkilediği yorumunu yapmışlardır.

Rigat ve ark. (1990), 80 sağlıklı insan üzerinde yaptıkları çalışmada bireylerin ADE gen bölgesi genotiplerini ve serum ADE aktivitelerini ölçmüşlerdir. Genotiplerle serum ADE aktivitelerini karşılaştırdıklarında I allel yoğunluğunun artışının serum ADE aktivite değerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır. Bu bulgulara dayanarak DD homozigotlardaki ADE seviyesinin ID heterozigotlara göre % 31, II homozigotlara göre ise % 65 daha fazla olduğunu saptamışlardır.

Zdrojewicz (1992), 240 kadın ve 34 erkek sağlıklı birey ile yaptığı çalışmada kadınlar yaş, vücut ağırlığı ve bulundukları menstruasyon aşamasına göre alt

gruplara ayrılmış, erkekler ise yaş ve vücut ağırlıklarına göre gruplandırılmışlardır. Tüm bireylerin serum ADE aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçta serum ADE aktivitesinin yaş, vücut ağırlığı ve menstruasyon döngüsüne bağlı olmadığı sonucu rapor edilmiştir ($p>0,05$).

Bloem ve ark. (1996), 141 beyaz ve 62 siyah sağlıklı insan üzerinde yaptıkları çalışmada, beyaz insanlarda ortalama serum ADE aktivitesi açısından DD homozigot'un ID heterozigottan ($p=0,002$) ve II homozigottan ($p=0,001$) istatiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğunu ancak, DD/ID/II genotipleri ile plazma ADE aktiviteleri ile anlamlı bir ilişki olmadığını saptamışlardır.

Tomita ve ark. (1998), 71 astım hastası ve 142 sağlıklı birey üzerine yaptıkları çalışmada ADE genotipi ve serumdaki ADE enzim seviyesi bakımından sağlıklı ve hasta bireylerde herhangi bir farklılık olmadığını saptamışlardır ($p>0,05$). Sonuç olarak astım ve ADE gen polimorfizmi arasında bir ilişki bulamadıklarını rapor etmişlerdir.

Alvarez ve ark. (1999), 60 seçkin atlet ve 400 sağlıklı insanla yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada plazma ADE seviyeleri ile I/D genotipleri arasında kuvvetli bir ilişki bulmuşlar ve I allellinin frekansının atletlerde kontrollere göre belirgin bir şekilde yüksek olduğunu görmüşlerdir ($p=0,0009$). Buna göre ADE polimorfizminin elit atlet gelişiminde önemli bir genetik faktör olduğunu bildirmişlerdir.

Qadar ve ark. (2002), Hindistanda yaşayan ve akrabalık ilişkisi olmayan 220 genç erkekle çalışmışlardır. Bireyleri, etnik kökenlerine bağlı olarak Sikh (n=45), Jat (n=30), Dogra (n=52), Assame (n=52) ve Kumaonese (n=33) adlı 5 gruba ayırmışlardır. Bireylerin ADE genotiplerini incelediklerinde Dogras, Assamese ve Kumanoese ve Jat gruplarında I allellinin dağılımının D allelli dağılımdan yüksek olduğunu ve Dogras, Assamese ve Kumanoese grupları için bu farkın istatiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir ($p<0,05$). Sikh grubunda ise D allelinin I allellinden göreceli daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir. Bunun yanında enzim aktviteleri ve genotipler karşılaştırıldığında enzimin aktivteleri ile ADE genotipi arasında bir ilişki olduğunu saptamışlar ve genotipteki tek bir D allelinin enzim aktivitesinin ortalama değerinde yaklaşık % 37,56 ± 3,13'lik artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Kantarcı ve ark. (2003), Çeşitli diabetik komplikasyonları olan insuline bağımlı olmayan diabetes mellituslu (NIDDM) 159 hasta ve 44 sağlıklı birey (G0) üzerine yaptıkları çalışmada anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) genindeki I/D polimorfizminin hastalıkla ilişkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada hastalar, diabetik nefropati açısından; non-proteinürik G1, n=37, mikroalbuminürik G2, n=41, aşikar proteinürik G3, n=46 ve renal replasman tedavisinde G4, n=35 olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Hasta ve sağlıklı tüm bireylerin ADE genotipleri belirlendiğinde; G0, G1, G2 ve G3 gruplarında genotiplerin görülme sıklığı ID>DD>II şeklinde bulunmuştur. Ancak G4 grubunda genotiplerin görülme sıklığı DD(n=19)>ID(16) bulunmuş ve bu grupta hiç II genotipli bireye rastlanmamıştır. Sonuç olarak çeşitli düzeylerde diabetik nefropatisi olan NIDDM'li hastalarda ACE geninin II/DD/ID genotiplerinin hastalıkla ilişkisi olmadığını rapor etmişlerdir. Hasta ve sağlıklı bireyleri kendi aralarında cinsiyetlerine göre gruplandırdıklarında ise II/ID/DD genotip ya da I/D allellerinin dağılımının cinsiyete bağlı olmadığı sonucuna varmışlardır.

Ocaranza ve ark. (2004), Farklı ADE polimorfizmindeki farelerde Ang 1-7 seviyesi üzerine hipertansiyonun etkisini araştırdıkları çalışmada normal tansiyon değerlerine sahip farelerde Ang II ve Ang 1-7'nin seviyelerinin zıt ($r=-0,64$) bir şekilde ilişkide olduğunu ($p<0,001$) ancak, hipertansif farelerde bu ilişkiye rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Buna bağlı olarak normotansif farelerde ADE gen polimorfizmiyle belirlenen Ang II ve Ang 1-7 'nin plazmadaki seviyeleri arasında ters bir orantı olduğu sonucuna varmışlardır.

Vickers C. ve ark. (2002), ADE2'nin in vitro koşullarda katalitik aktivitesini karakterize ettikleri çalışmada farklı pH'larda ve farklı iyon konsantrasyonlarında 126 farklı substrat için ADE2'nin aktivitesini ölçmüşlerdir. Çalışma sonunda ADE2 için optimum pH'nın 6,5 olduğunu, pH 5'te aktivite gösteremediğini ancak pH 6,5'tan pH 9'a kadar tüm pH'larda aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Cl^- ve Br^- iyonlarının ADE2'nin kofaktörleri olduğunu ve en iyi aktivitenin 0,1 M NaCl varlığında gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca ADE2'nin 126 biyolojik peptit substratın sadece 11'inde katalitik aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Hamdi ve Castellon (2004), İnsan endotelyal hücreleri üzerine yaptıkları çalışmada hücrelerin uzun süre açlık sonunda hayatta kalma oranlarını hücre sayma metoduyla ölçmüşler ve ADE genotipi II olan hücrelerin açlık karşısında hayatta kalma oranlarının DD olanların hayatta kalma oranından 20 kat fazla olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca DD genotipli hücrelere ADE inhibisyonu sağlayıcı kaptopril uygulandığında bu hücrelerin hayatta kalma oranlarının II genotipli hücrelere oldukça yaklaştığını saptamışlardır. Buna bağlı olarak ADE genotipinin insan biyolojisi, uzun ömürlülük ve hastalanma üzerinde fonksiyonel bir rolu olduğunu rapor etmişlerdir.

Wiwanitkit V. (2004), Avrupa **(**Fransa, Almanya, Danimarka, İngiltere), Asya (Japonya, Kore, Tayland, Çin) ve ABD'de olmak üzere toplam 9 ayrı ülkede yaşayan insanların ADE genotipleri belirlenmiş ve benzerlikleri karşılaştırmış. Bireylerde görülen I ve D allelleri sıklık açısından değerlendirildiğinde Fransa için D (0,54), I (0,46); Almanya için D (0,54), I (0,46); ABD için D(0,56), I(0,44); Danimarka için D (0,55), I (0,45); İngiltere D (0,55), I (0,45); Japonya için D (0,34), I (0,66); Tayland D (0,30), I (0,7); Çin D (0,4), I (0,6); D (0,39), I(0,61) bulunmuştur. Bu genotiplerin dağılımının aynı bölgede yaşayan bireyler arasındaki benzerliğinin farklı bölgelerde yaşayan insanlarla benzerliğinden anlamlı derecede farklı olduğunu rapor etmiştir.

Sözer (2004), Çukurova Bölgesinde yaşayan insanlar üzerinde yaptığı çalışmada 61 preeklampsili olgu ile 58 normotansif gebe grubunu karşılaştırmıştır. Hasta grubunu oluşturan preeklampsili olgularda I allel ve D allel taşıyıcılığı sırasıyla % 41 ve % 59 iken normotansif gebe grubunda bu değerler sırasıyla % 46,6 ve % 53,4 olarak bulunmuştur. ADE gen bölgeleri için bulgular karşılaştırıldığında iki grup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığını bildirmiştir.

Paizis ve ark. (2005), 9 fare üzerinde yaptıkları deneyde farelerin safra kanalı bağlaması (Bile Duct Ligation: BDL) uygulamasından önce ve sonra ADE2 mRNA seviyeleri, ADE2 protein seviyesi ve ADE2 aktivitesini ölçmüşlerdir. Ölçümler sonunda BDL uygulaması sonrasında ADE2 mRNA seviyesinin 363 kat ($p<0,01$), ADE2 protein seviyesinin 23,5 kat ($p<0,01$) ve ADE2 aktivitesinin 4 kat ($p<0,05$) arttığını bildirmişlerdir. Sağlıklı ve sirozu olan 9 insan üzerinde yaptıkları

çalışmada ise ADE2 mRNA seviyesinin hasta bireylerde sağlıklı bireylere göre 30 kat ($p<0,01$), ADE2 protein seviyesinin 97 kat ($p<0,01$) ve ADE2 aktivitesinin ise 2,4 ($p<0,01$) kat arttığını saptamışlardır.

Yoshiji ve ark. (2006), 2002-2005 yılları arasında 35 kronik hepatit C hastası birey üzerine yaptıkları çalışmada 10 kişilik bir kontrol grubu oluşturmuşlar ve bu gruba ne interferon (IFN) ne de ADE inhibitörü (ADE-I) uygulamışlardır. 7 kişilik bir gruba sadece IFN, 7 kişilik bir gruba sadece ADE-I, 11 kişilik bir gruba da hem IFN gem de ADE-I beraber uygualmışlardır. 3 yıllık tedavi sonunda IFN ve ADE-I 'nın beraber uygulandığı grupta HCV-RNA'sının miktarındaki azalmanın diğer gruplardaki azalmaya göre çok daha anlamlı olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak ADE-I inhibitörünün IFN'nin HCV'ye karşı etkisini güçlendirdiğini rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kimyasallar

N-[3-(2-Furil)akriloil]-Phe-Gly-Gly (FAPGG), Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA), Borik Asit, Tris Baz, Derişik Hidroklorik Asit (HCl) çözeltisi, Sodyum hidroksit (NaOH), Sodyum Klorür (NaCl), Agoroz, Deoksi nükleosit trifosfat (dNTP) Seti, Taq polimeraz Enzimi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tamponu, Saf Etil alkol, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Ficoll 400, Xylen Cyanol, Bromo Fenol Blue, Glasiyel Asetik Asit, İki kez destile edilmiş (double destilated : dd) H_2O.

3.1.2. Araç ve Gereçler

Elektroferez İçin Güç Kaynağı (Titan Plus Helena Laboratories), Elektroforez Sistemi (LKB 2013 Miniphor Electrophoresis, LKB 2012 Maxiphor Electrophoresis) Mikrodalga Fırın, Soğutmalı Ultrasantrifuj (Hettich Universal 30 RF), PCR Cihazı (MJ Research Techne), Polaroid Kamera (DS34 Direct Screen Instant Camera), UV/Vis Spektrofotometre (ATI lincam), Kandan Genomik DNA İzolasyon Kiti (AbsoGene), Heparinli Tüp (2 mL), Termostatlı Isıtıcı, pH metre, Vorteks.

3.1.3. ADE Gen Bölgesi İçin Kullanılan Primer Dizileri

Oligo 1 : 5’ CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3’
Oligo 2 : 5’ GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3’
Oligo 3 : 5’ TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAT TAC 3’
Oligo 4 : 5’ TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA 3’

3.2.ÇÖZELTİLER

3.2.1. 80 mmol/L pH=8,3 Borat Tamponu

4,95 g Borik asit ve17,5 g NaCl tartıldı ve üzerine 900 mL saf su eklendi ve 37 °C'de 1,0 M'lık NaOH çözeltisiyle pH 8,3 'e ayarlandı. Çözelti hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

3.2.2. 50xTris-Asetik Asit-EDTA (TAE) Tamponu

242 g Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 57,1 mL Glasiyal asetik asit ve 100 mL 0,5 M'lık EDTA ve 800 mL ddH_2O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözüldü. Balon jojeye aktarılarak hacmi ddH_2O ile 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.2.3. 5xTris-Borik Asit-EDTA (TBE) Tamponu

54 g tris baz ve 27,5 g borik asit tartılarak bir behere alındı. Üzerine 20 mL 0,5M EDTA çözeltisi ve 800 mL ddH_2O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözüldü. Balon jojeye aktarılarak hacmi 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.2.4. 10XTris-EDTA (1 mM Tris/0,1 mM EDTA) (TE) pH 7,5 Tamponu

1,213 g Tris baz ve 0,372 g EDTA tartılarak bir behere alındı. Üzerine 800 mL ddH_2O eklendi ve HCl çözeltisi ile pH'sı 7,5'a ayarlandı. Çözelti hacmi ddH_2O ile 1 L'ye tamamlandı. 120 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.2.5. 0,5 M EDTA Çözeltisi

18,6 g EDTA tartıldı ve dd H_2O ile 100 mL'ye tamamlandı. 120 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.2.6. 1 M Tris pH 8 Tamponu

12,13 g tris baz tartıldı ve 80 mL saf suda çözüldü. HCl ile pH 8'e ayarlandıktan sonra saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı. 120 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.2.7. 5XYükleme Çözeltisi

20 g Ficoll 400, 1 g SDS, 1,2 mL 0.5 M EDTA, 1 mL 1 M'lık Tris (pH 8,0), 200 mg Bromo fenol blue, 200 mg Xylen cyanol tartıldı ve steril ddH_2O ile 100 mL'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

3.2.8. Etidyum Bromür (10mg/dL)

10 g Etidyum bromür tartılarak steril ddH_2O ile hacmi 10mL'ye tamamlandı.

3.2.9. Deoksinükleosittrifosfat (dNTP) Karışımı (100 µM)

Her birinin derişimi 10 mM olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP çözeltilerinden 10'ar µL steril bir gode içerisine alındı ve üzerine 960 µL ddH_2O eklendi. Böylece her bir dNTP'nin derişimi 100 µM olan dNTP karışımı elde edilmiş oldu.

3.2.10. Primer Karışımı (10 pmol/L)

Liyofilize halde gelen primerler üzerine son derişimi 100 pmol/mL olacak şekilde ddH_2O eklendi. Hazırlanan çözeltilerden 10'ar µL steril bir gode içerisine alındı ve ddH_2O ile 100 µL'ye tamamlandı.

3.3. METOD

3.3.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Kronik Hepatitli bireylerin kan örnekleri Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Gastroenteroloji Servisi'nden sağlandı. Gastroenteroloji servisinde kronik hepatit hastalığı nedeniyle tedavi gören 20 bireyden alınan tam kan, 2 mL'lik heparinli tüplere alındı..

Sağlıklı bireylerin kan örnekleri ise Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Kan Merkezi'inden sağlandı. Bu örneklerin Elisa testleri sonrasında hepatit virüsü taşımadıkları tespit edildi. Çalışma için 29 sağlıklı bireyden alınan tam kan 2 mL'lik heparinli tüplere alındı.

3.3.2. FAPGG'nin Molar Absortivitesinin Bulunması

1. 1,1 mmol/L FAPGG çözeltisi hazırlandı. Bunun için 25 mg FAPGG substrat üzerine 56,179 mL 80 mM pH 8,3 tamponu konuldu ve +4 °C'de saklandı
2. Bu çözelti kullanılarak 0,2 ; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mmol /L 'lik çözeltiler hazırlandı ve 345 nm'de absorbans sonuçları alınarak grafiğe geçirildi.
3. Grafiğin eğimi yardmıyla FAPGG'nin molar absortivitesi hesaplandı (ΔA).

3.3.3. Periferik Kandan Plazma Ayrılması

1. Kan Heparinli tüplere alındı.
2. Yarım saat bekletildi.

3. 4000 rpm'de 4 dakika santrifuj edildi.
4. Tüpün üst kısmında kalan plazma mikropipetle 250 µL alınıp boş godelere konuldu ve –20 °C'de saklandı.

3.3.4. Elektroferez ve Jel Hazırlanması

1. %2'lik 200 mL agoroz çözeltisi hazırlandı. Bunun için 4 g agoroz tartıldı ve üzerine toplam hacim 200 mL olacak şekilde TBE çözeltisi eklendi..
2. Agorozun TBE içerisinde çözünmesini sağlamak için karışım mikrodalgada ısıtıldı.
3. Sıcak çözelti çeker ocağa getirildi ve üzerine 10 mg/mL'lik etidyum bromürden 2,5 µL konuldu.
4. Çözelti, etidyum bromürün kırmızı rengi tamamen yok oluncaya kadar karıştırıldı. Çözelti küvete boşaltıldı ve tarak yerleştirildi.
5. Jel soğuyunca/donunca elektroforez tankı 1XTAE çözeltisi ile doldurudu.
6. Alınan 15 µL PCR ürünleri son derişimi 1X olacak şekilde eklenen 5X'lık yükleme çözeltisi ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi.
7. Yükleme işlemi bittikten sonra elektrotlar yerleştirilerek örnekler 80-100 V'da yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında incelendi ve polaroid kamera ile fotoğrafı çekildi.

3.3.5. Kandan Genomik DNA İzolasyonu Kit Kullanım Protokolü

1. 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tübüne 20 µL Proteinaz K eklendi.
2. Bunun üzerine 200 µL örnek eklendi.
3. 250 µL lökosit parçalayıcı çözelti eklenip 20 kez dibine vurularak karıştırıldı.
4. 3000 rpm'de 1dakikalık santrifujden sonra her 3 dakikada bir karıştırılarak 65°C'de 15 dakika inkübe edildi.
5. 200 µL etanol (%96-100) eklenip, 20 kez dibine vurularak karıştırıldı.
6. 3000 rpm'de 1 dakikalık santrifüjden sonra karışım, toplama tüpünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarıldı.

7. 5500 rpm'de 1 dakika santrifuj yapıldı. Sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
8. 700 µL 1. yıkama çözeltisi eklendi. 5500 rpm'de 1 dakika santrifuj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
9. 700 µL 2. yıkama çözeltisi eklendi. 7000 rpm'de (10 000g) 30 saniye santrifuj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
10. 14 000 rpm'de 30 saniye santrifuj yapıldı.
11. Spin kolon, steril 1,5 mL'lik bir mikrosantrifuj tüpe aktarıldı.
12. 200 µL 70°C'ye ısıtılmış Tris-EDTA çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. 14 000 rpm'de 1 dakika santrifuj yapıldı.
13. Spin kolon atıldı ve genomik DNA'yı içeren elüsyon tampounun bulunduğu mikrosantrifuj tüpü – 20°C'de kullanılana kadar saklandı.

3.3.5.1. DNA Saflığının ve Derişiminin Hesaplanması

1. -20°C'de saklanan DNA çözeltisi dolaptan çıkarıldı ve çözünmesi sağlandı.
2. Çözündükten sonra başka bir mikrosantrifuj tüpünde belli oranda seyreltildi*.
3. UV/Vis spektrofotometre kullanılarak 260 nm'de ve 280 nm'de absorbansları ölçüldü.
4. $O.D._{260}/O.D._{280}$ değeri hesaplandı.
5. Çözeltideki DNA derişimi µg/mL cinsinden aşağıdaki formülle hesaplandı.
   DNA Derişimi = $O.D._{260}$ x 50 x Seyreltme Faktörü*

3.3.6. Plazma ADE Aktivitesinin Belirlenmesi

Deneyde enzim aktivitesi; 1 dakikada 1 µmol substratı (FAPGG) ürüne (FAP) dönüştüren enzimi içeren plazmanın hacmi (L) cinsinden verilmektedir (Buttery ve Stuart, 1993). Bunun için ;

1. Termostatlı ısıtıcı 37°C'ye getirildi.

2. İki boş ve temiz deney tüpü alındı.
3. Tüplerden birine 900 µL 80 mM pH=8,3 borat tamponu ve 100 µL plazma eklendi ve 37°C'de tutuldu. Bu tüp kör olarak kullanıldı.
4. Diğer tüpe önce 900 µL 80 mM pH=8,3 Borat tamponunda hazırlanmış 1,1 mM FAPGG çözeltisi eklendi ve 37°C'de tutuldu. Bu tüp reaksiyon tüpü olarak kullanıldı.
5. Bu sıcaklıkta, reaksiyon tüpüne 100 µL plazma ilave edilip kronometre başlatıldı.
6. Bu sırada UV cihazı dalga boyu 345 nm'ye ayarlanıp kör ile sıfırlandı.
7. Kronometrenin 3. dakikasında 37°C'deki reaksiyon tüpü içerisindeki çözelti ölçüm yapılacak kuvet içerisine aktarıldı ve 37°C'de 2 dakika daha bekletildi.
8. Süre bitiminde kuvet UV cihazına yerleştirldi.
9. 10 dakika boyunca birer dakikalık aralıklarla absorbans değerleri okundu ve 11 ölçüm sonunda kronometre durduruldu.
10. Her absorbans değerinin kendinden önceki absorbans değerinden çıkarılması ile absorbans değişimleri bulundu.
11. Absorbans değişim değerlerinin aritmetik ortalaması alındı.
12. Aşağıdaki formül yardımıyla enzim aktivitesi U/L cinsinden verildi.

$$\text{ADE Aktivitesi} = \frac{(\text{Ortalama absorbans değişimi}) \times (\text{Toplam reaksiyon hacmi}) \times 1000}{\text{Plazma Hacmi} \times \Delta A^{*}}$$

* ΔA: 345 nm'de 1 mM FAPGG'ye karşılık gelen absorbans değeri.

ΔA değeri Şekil 4.1'deki Standart FAGG Grafiği kullanılarak 1,1174 olarak hesaplandı.

3.3.6. PCR yöntemiyle ADE I/D Polimorfik Bölgesinin Çoğaltılması

Her bir DNA örneği için toplam 25 µL'lik karışımlar hazırlandı ve bu karışımlar örnek başına;

15,85 µL ddH_2O

2,5 µL 10XPCR tamponu (MgCl'süz)

1,5 µL 25 mM MgCl çözeltisi
2 µL 2 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) karışımı
2,5 µL 10 pmol/mL primer karışımı çözeltisi
0,5 µL Taq Polimeraz içermekteydi.

3.3.6.1. ADE I/D Polimorfik Bölgesini İçin Amplifikasyon Protokolu

ADE geninin I/D polimorfizmini belirlemek için Rigat ve ark (1992). tarafından önerilen PCR protokolu uygulandı. Bu protokol aşağıdaki gibidir.

94°C'de 2 dakika : Başlangıç Denatürasyonu
94°C'de 1 dakika : Denatürasyon
56°C'de 1 dakika : Bağlanma
72°C'de 2 dakika : Uzama
} 30 Döngü
72°C'de 5 dakika : Son Uzama

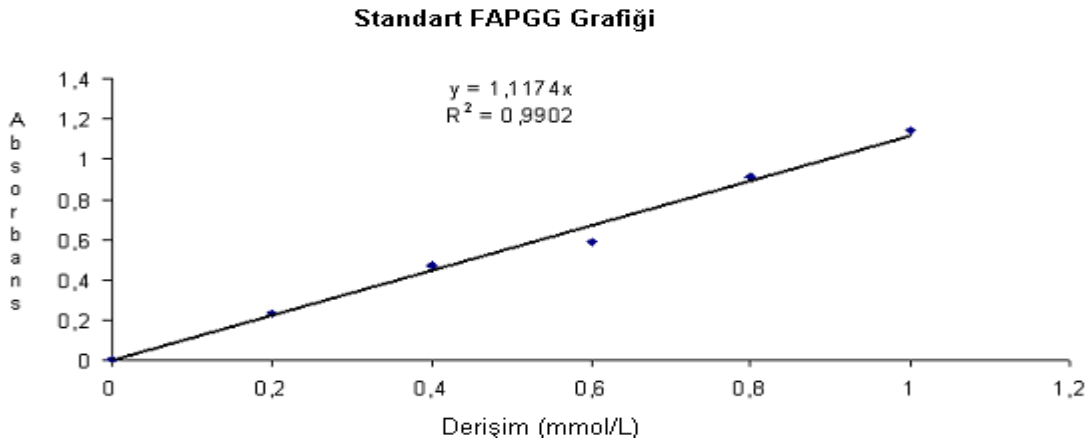
3.3.7. İstatiksel Analizler

Belirlenen genotiplerle aktivite arasında ilişki olup olmadığının anlaşılması için SPSS 14.0 programından Independent t testi, Hasta ve Kontrol gruplarının aktiviteleri arasındaki farkı değerlendirmek için Sigma Plot 10.0'dan Paired t testi ve I ve D allelleriyle kronik hepatit arasında ilişki olup olmadığını öğrenmek için SPSS 14.0'dan Chi-square testi yapıldı.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

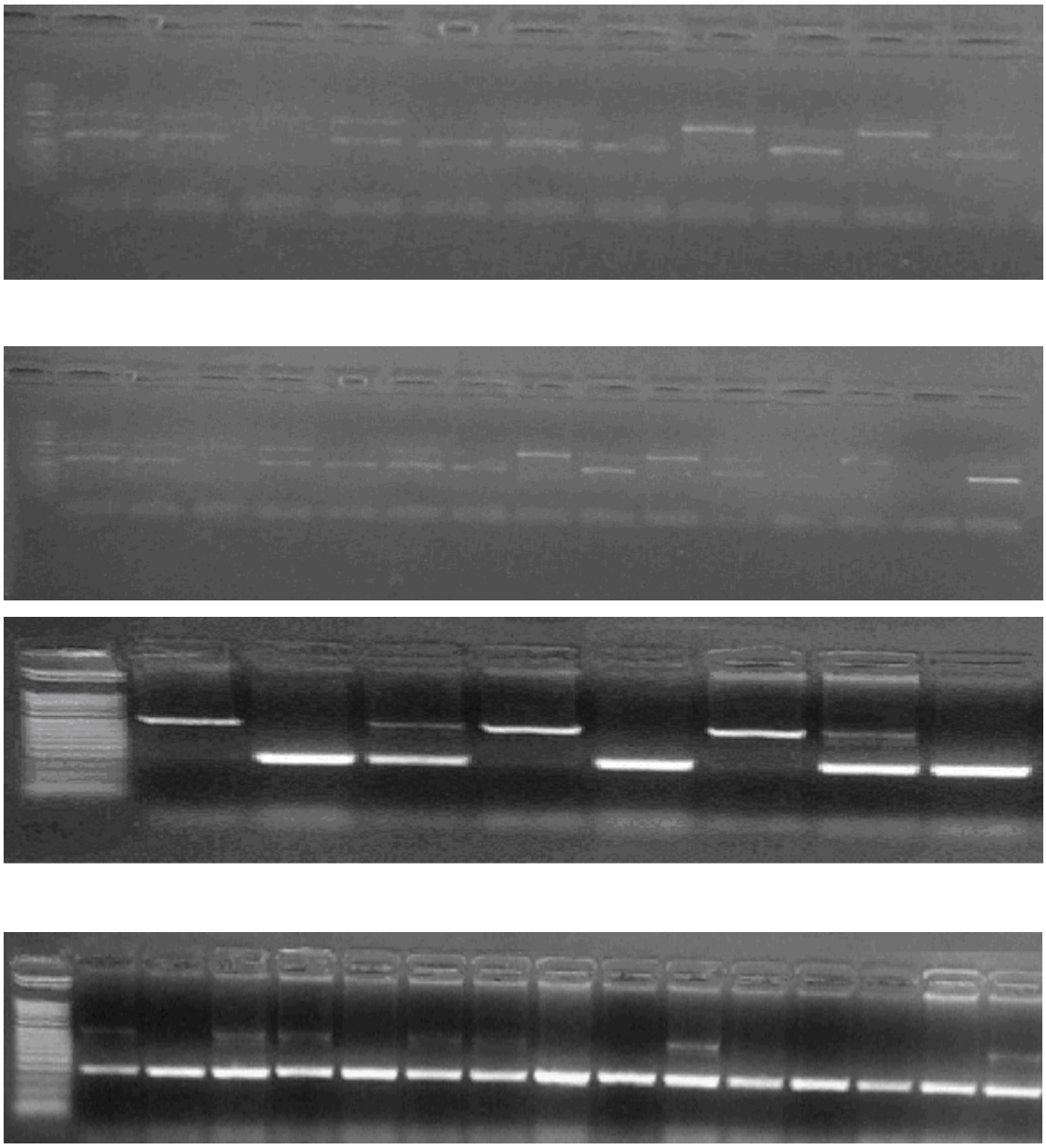
4.1. Bulgular

Alınan tam kan örneklerin plazmalarında ADE aktiviteleri ölçüldü. Enzimin aktivitesi in vitro koşullarda FAPGG substratını FAP'ye dönüştürmesine bağlı olarak FAPGG'nin 345 nm'de yaptığı absorbansın zamanla azalması incelenerek ölçüldü. Değişen absorbans değerinin FAPGG derişimi ile ilişkilendirilebilmesi için bilinen derişimlerde hazırlanan FAPGG çözeltileri için UV/Vis spektrofotometrede okunan absorbans değerleri derişimlere karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Standart FAPGG Grafiği

Hasta ve sağlıklı bireylerin tam kanlarından izole edilen DNA örnekleri istenen gen bölgesi için uygun primerler ve uygun amplifikasyon koşullarında PCR ile çoğaltıldıktan sonra elektroforezle yürütüldü. UV ışık altında etidyum bromür bağlama özelliği sayesinde görünür olan DNA parçalarının verdiği görüntüye bakılarak her bir örnek II, ID ya da DD olarak işaretlendi.

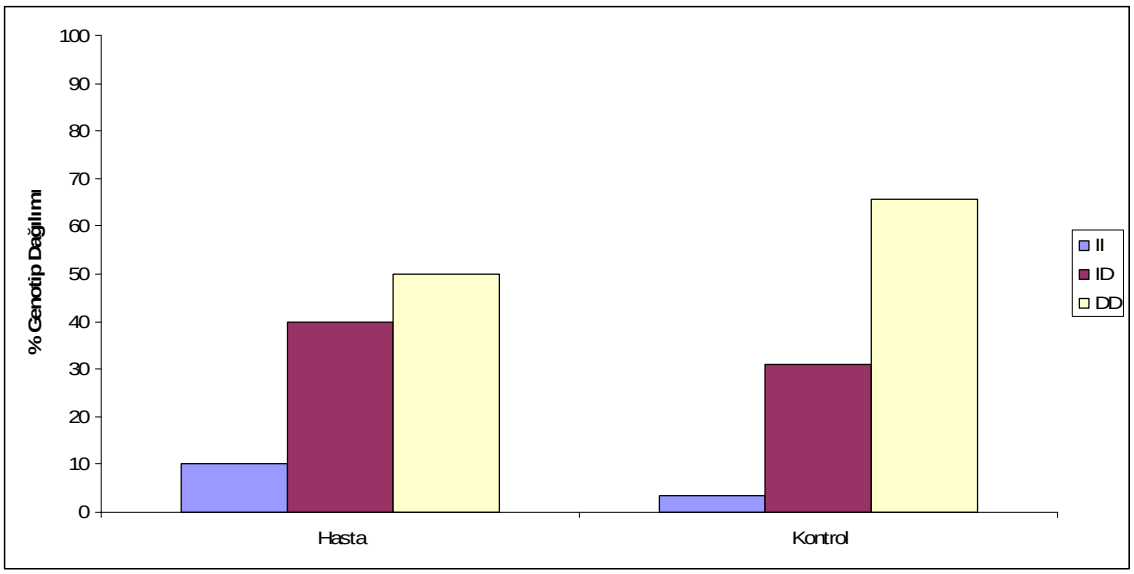


Şekil 4.2. PCR İle Çoğaltılan Gen Bölgelerinin İçerisinde Etidyum Bromür Çözünmüş Agoroz Jelle Yapılan Elektroferez Sonunda UV Işık Altındaki Görünümü.

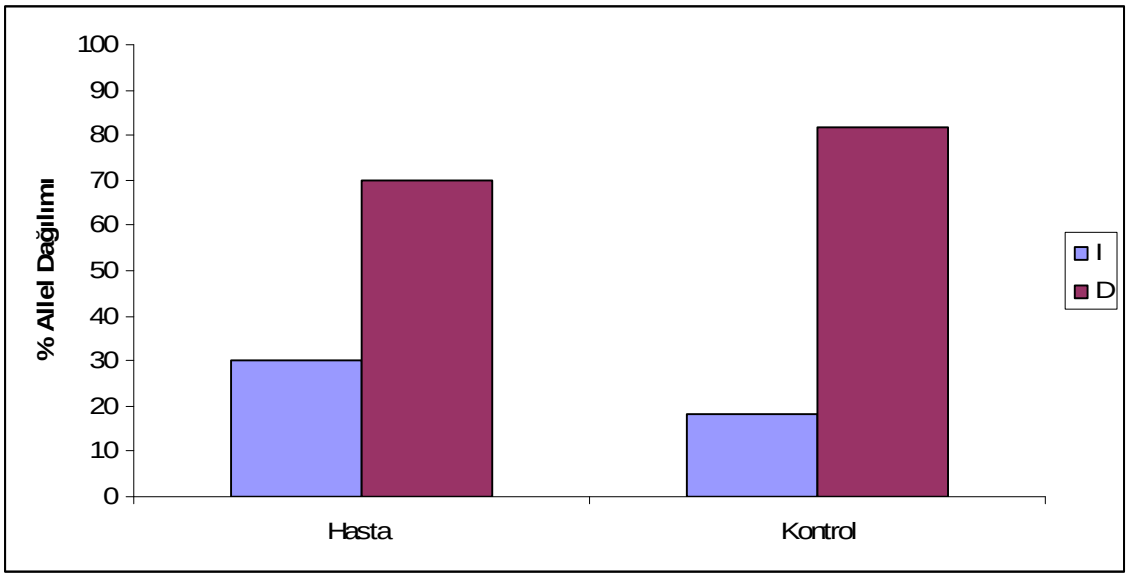
Hasta ve kontrol grubundaki tüm örneklerle yapılan bu görüntüleme sonunda hasta grubunda II, ID ve DD polimorfizmi gösteren bireylerin yüzdesi sırasıyla %10, %40 ve %50 olarak bulundu. Kontrol grubu için bu değerler sırasıyla %3,4, %31 ve %65,5 olarak hesaplandı. Gruplardaki genotip yüzdeleri Şekil 4.3.'de görülmektedir.

I allelinin hasta grubundaki yoğunluğu % 30 D allelinin yoğunluğu ise % 70 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda I alleli yoğunluğu % 18,6, D allelinin yoğunluğu da % 82,4 olarak hesaplanmıştır. Bu değerleri gösteren grafik Şekil 4.4.'de verilmiştir.

Hasta ve Kontrol grupları birleştirilerek yapılan I ve D alleli frekansı karşılaştırması sonunda I alleli yoğunluğunun (I/I+D) 0,31, D alleli yoğunluğunun ise (D/I+D) 0,69 olduğu hesaplanmıştır. Sonuçlar kullanılarak D alleli yoğunluğunun I alleli yoğunluğuna oranı 2,23 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. Hasta ve Kontrol Gruplarında Görülen Genotip Yüzdelerinin Grafiksel Gösterimi



Şekil 4.4. Hasta ve Kontrol Gruplarında I ve D Allelerinin Görülme Sıklığını Gösteren Grafik

Hem hasta hem de kontrol grubunda bireyler gösterdikleri genotiplere göre alt gruplara ayrıldı ve bireylerin gösterdiği plazma ADE aktivitesi kaydedildi. Bu değerleri gösteren tablo Çizelge 4.1. ‘de görülmektedir.

Çizelge 4.1. Hasta ve Kontrol Grubundaki bireylerin genotipleri ve gösterdikleri plazma ADE aktivitesi değerleri

KONTROL		***HASTA***	
GENOTiP	**AKTiViTE (U/L)**	**GENOTiP**	**AKTiViTE (U/L)**
DD	34,01	DD	29,53
DD	34,01	DD	35,80
DD	29,53	DD	23,27
DD	21,48	DD	33,11
DD	37,59	DD	44,75
DD	39,38	DD	23,27
DD	24,16	DD	25,95
DD	26,85	DD	25,95
DD	24,16	DD	16,19
DD	14,32	DD	25,06
DD	38,48	ID	33,11
DD	39,38	ID	20,58
DD	19,69	ID	28,64
DD	23,27	ID	24,16
DD	20,58	ID	22,37
DD	34,90	ID	20,58
DD	25,06	ID	21,48
DD	28,64	ID	24,16
DD	16,11	II	23,27
ID	38,48	II	14,32
ID	23,27		
ID	25,95		
ID	24,16		
ID	18,79		
ID	9,84		
ID	13,42		
ID	34,01		
ID	29,53		
II	38,48		
ORT ±SD	27,16 ± 8,55	**ORT ± SD**	25,77 ± 6,97

Belirlenen genotiplerle bu genotiplere sahip bireylerin gösterdiği plazma ADE aktivitelerinin karşılaştırılması için yapılan gruplandırmada hasta bireyler için II, ID ve DD genotipli bireylerin ortalama plazma ADE aktivitelerinin sırasıyla 18,79, 24,39 ve 28,28 U/L olduğu hesaplanırken benzer bir karşılaştırmada kontrol grubu bireylerinin aktivite değerlerinin sırasıyla 38,48, 24,16 ve 27,98 U/L olduğu görüldü. Çizelge 4.2.

Çizelge 4.2. Hasta ve Kontrol gruplarında genotipe bağlı olarak görülen ortalama plazma ADE aktivitesi değerleri.

GENOTİP	AKTİVİTE (±SD) (U/L)	
	Hasta	Kontrol
DD	28,28 ± 7,96	27,98 ± 7,64
ID	24,39 ± 4,40	24,16 ± 8,05
II	18,79*	38,48*

*: Hasta grubunda iki birey kontrol grubunda ise sadece bir birey II genotipi göstermiştir. Veri azlığı nedeniyle bu iki grup için II genotipi gösteren bireylerin ortalama aktivite değerlerinin standart sapması hesaplanamamıştır.

Hasta ve Kontrol gruplarında bireylerin gösterdiği genotiplerde bulunan I ve D alleli sayıları ve I/D oranları hesaplandı. Bu değerler Çizelge 4.3'te verilmektedir.

Çizelge 4.3. Hasta ve Kontrol Grubunda I ve D Alleli Sayıları ve I/D Oranları.

	I	D	I/D
Hasta	12	28	0,43
Kontrol	11	47	0,23

Hasta ve kontrol gruplarında DD/ID/II genotiplerini gösteren erkek ve kadın birey sayıları Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Hasta ve Sağlıklı Bireylerde Cinsiyete Bağlı Olarak ADE Genotipleri.

	Hasta		*Kontrol*	
	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
DD	9	1	19	X
ID	5	3	9	X
II	1	1	1	X

4.1.1. İstatiksel Bulgular

Elde edilen veriler uygun istatistik programlarıyla değerlendirildiğinde aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

Hasta ve Kontrol grupları içerisinde DD ve ID genotipleri ile ADE aktivite değerleri arasındaki ilişkiye bakıldığında her iki grubun DD genotipli bireylerin gösterdiği ortalama ADE aktivite değeri ile ID genotipli bireylerin gösterdiği ortalama aktivite değeri arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı ($p>0,05$). Hasta ve Kontrol grubunun II genotipli bireylerinin gösterdiği ortalama aktivite değerleri, veri sayısının az olması nedeniyle istatiksel yönden incelenmedi.

Hasta ve Kontrol grubundaki bireylerin genotiplerine bakılmaksızın ortalama aktivite değerleri karşılaştırıldığında hasta grubu bireylerin (n=20) gösterdiği ortalama aktivite değeri ($25,77 \pm 6,97$ U/L) ile kontrol grubundaki bireylerin (n=29) gösterdiği ortalama aktivite değeri ($27,16 \pm 8,55$ U/L) arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı ($p=0,23$).

Hasta ve Kontrol grubunda bulunan DD, ID ve II genotipli bireylerin ortalama aktivite değerleri birbirleriyle karşılaştırıldığında DD ve ID genotipli bireylerin ortalama aktivite değerlerinin hasta ve kontrol grubunda pek farklı olmadığı görüldü. II genotipli bireyler için istatiksel bir karşılaştırma yapılmamasına karşın kontrol grubundaki bireylerin (n=1) gösterdiği ortalama aktivite değerinin (38,48 U/L) hasta grubundaki bireylerin (n=2) gösterdiği ortalama aktivite değerinden (18,79 U/L) oldukça yüksek olduğu bulundu.

Hasta ve Kontrol grubu I ve D allelleri açısından incelendiğinde hasta bireylerin genotiplerindeki oranının (0,43), sağlıklı bireylerin genotiplerindeki I/D oranından (0,23) istatiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu bulundu ve kronik hepatit ile allel dağılımı arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptandı ($p<0,01$).

DD ve II genotipli hasta bireylerin sayısının az olması ve kontrol grubunda hiç kadın birey olmaması nedeniyle genotip ile cinsiyet arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelenemedi.

4.2. TARTIŞMA

Bu çalışmada 20 kronik hepatit hastası ve 29 sağlıklı bireyin kan örnekleri kullanılmıştır. Çalışılan bireyler 20-50 yaş aralığında yetişkinlerdir. Kronik hepatit hastası bireylerden 15'i erkek, 5'i kadındır. 29 sağlıklı bireyin tümü erkektir. Hasta ve Kontrol gruplarında görülen cinsiyete bağlı genotip dağılımları Çizelge 4.4'de gösterilmektedir. Bireylerin yaş aralığının geniş olması, kontrol grubunda hiç kadın birey bulunmaması nedeniyle çalışma sonuçları bireylerin cinsiyetlerine ve yaşlarına bağlı olarak değerlendirilememiştir. Zdrojewicz tarafından (1992) 240 kadın ve 34 erkek sağlıklı birey üzerinde yapılan çalışmada kadınlar yaş, vücut ağırlığı ve bulundukları menstruasyon aşamasına göre alt gruplara ayrılmış, erkekler ise yaş ve vücut ağırlıklarına göre gruplandırılmışlardır. Tüm bireylerin serum ADE aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçta serum ADE aktivitesinin yaş, vücut ağırlığı ve menstruasyon döngüsüne bağlı olmadığı sonucu rapor edilmiştir. Cambien ve ark. (1988) tarafından bireyleri sağlıklı 87 aile üzerinde yapılan çalışmada ise anne ve babalar için plazma ADE aktivitesi ile yaş, boy, kilo ve kan basıncı ile ilişki bulamamışlardır. Çocouklarda ise yaş ile ADE aktivitesi arasında ters bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Bu iki çalışma sonucuna göre, yetişkin bireyleri cinsiyet ve yaşlarına göre gruplandırmadan yapılan değerlendirmelerin sonuçların kabul edilebilirliği bakımından önemli bir sorun yaratmayacağı kabul edilebilir.

Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları için II, DD ve ID genotiplerinin görülme sıklığı çoktan aza sıralandığında hasta grubu için sıralama; DD(n=10)>ID(n=8)>II(n=2), kontrol grubu için sıralama DD(n=19)>ID(n=9)>II(n=1) şeklinde bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubuna ait bireyler, genotiplerin görülme sıklığı bakımından benzerlik göstermektedirler. Kantarcı ve ark. tarafından 2003 yılında Türkiye'de yaşayan 159 insuline bağımlı olmayan diabetes mellituslu hasta ve sağlıklı insan G0, n=44, üzerinde yaptıkları çalışmada hastalar, diabetik nefropati açısından; non-proteinürik G1, n=37, mikroalbuminürik G2, n=41, aşikar proteinürik G3, n=46 ve renal replasman tedavisinde G4, n=35 olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Hasta ve sağlıklı tüm bireylerin ADE genotipleri belirlendiğinde; G0, G1, G2 ve G3 gruplarında

genotiplerin görülme sıklığı ID>DD>II şeklinde bulunmuştur. Ancak G4 grubunda genotiplerin görülme sıklığı DD(n=19)>ID(16) bulunmuş ve bu grupta hiç II genotipli bireye rastlanmamıştır. Tuncer ve ark. tarafından 2006 yılında Türkiye'de yapılan bir çalışmada 108 iskemik inme hastası ve 79 sağlıklı bireyin ADE genotiplerini belirlenmiş ve iskemik inme riski ile ADE genotipi arasında bir ilişki kurmaya çalışılmıştır. Çalışma sonunda hasta bireylerde görülen genotip dağılımı DD>(n=48)>ID(n=43)>II(n=17) olarak bulunurken sağlıklı bireyler için bu dağılımın DD(n=37)>ID(n=30)>II(n=12) olduğu bildirilmiştir. Ergen ve ark. tarafından 2004 yılında yapılan bir çalışmada Türkiye'de yaşayan 75 Tip 2 Diabet hastası ve 37 sağlıklı bireyin ADE genotipi belirlenmiş ve ADE genotipi ile Tip2 Diabet arasında ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada tip2 diabet hastaları nefropatisi olanlar ve olmayanlar olarak 2 alt gruba ayrılmıştır. Sonuçta tüm gruplar için genotip görülme sıklığı incelendiğinde nefropatisi olan tip 2 diabet hastaları için ID(n=11)>DD(n=9)>II(n=5), nefropatisi olmayan tip 2 diabet hastaları için DD(n=24)>ID(n=21)>II(n=5) ve sağlıklı bireyler için ID(n=22)>DD(n=10)>II(n=5) bulunmuştur. Tomita ve ark. tarafından 1998 yılında yapılan bir araştırmada Japonya'da yaşayan 71 astım hastası ve 142 sağlıklı birey ADE genotipleri ve ADE aktiviteleri bakımından karşılaştırılmıştır. Tüm bireylerin genotipleri belirlendiğinde astım hastası olan kişilerde genotip görülme sıklığı ID(n=37)>II(n=25)>DD(n=9) şeklinde sıralanmaktadır. Sağlıklı bireylerde genotip dağılımı için de benzer bir sıralama ID(n=69)>II(n=57)>DD(n=16) bulunmuştur. Tüm bu çalışmalarda hasta ve kontrol grubu ayırt edilmeksizin ADE genotipi dağılımı sıralanması incelendiğinde; Kantarcı ve ark. tarafından 2003 yılında yapılan çalışmada replazman tedavisinde olan diabet hastaları, Tuncer ve ark. tarafından yapılan çalışmada hem iskemik inmesi olan hem de sağlıklı bireylerin oluşturduğu gruplar ve Ergen ve ark. tarafından 2004 yılında yapılan çalışmada nefropatisi olmayan tip2 diabet hastaları gösterdikleri genotip dağılımı bakımından bizim hasta ve kontrol gruplarımıza benzemektedirler. Öte yandan; Tomita ve ark. tarafından 1998 yılında yapılan çalışmada ne astım hastası olan bireyler ne de sağlıklı bireyler genotip dağılımı bakımından bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Çalışma sonuçlarımıza benzer sonuç veren çalışmaların (Kantarcı ve ark., 2003; Tuncer ve ark., 2006;

Ergen ve ark., 2004) Türkiye'de yaşayan bireyler üzerinde yapılmış olması, sonuçlarımıza hiç bir grupta benzerlik göstermeyen çalışmanın (Tomita ve ark., 1998) Japonya'da yaşayan bireyler üzerinde yapılmış olması genotip dağılımının belirli bir hastalık grubuna dahil olma ya da olmamaktan daha çok bireylerin yaşadığı bölge/ülke ile ilgi olduğunu düşündürmektedir.

Allel yoğunluğu bakımından hasta ve kontrol grubu beraber incelendiğinde D allelinin tüm bireyler arasındaki dağılım oranının (D/I+D=0,69), I allelinin dağılma oranından (I/I+D=0,31) 2,23 kat büyük olduğu hesaplanmıştır. Wivanitkit tarafından 2004 yılında yapılan bir araştırmada Fransa, Almanya, Danimarka, Japonya, Kore, Tayland, ABD, Çin ve İngilterede yaşayan insanların ADE genotipleri belirlenmiş ve benzerlikleri karşılaştırılmıştır. 9 ayrı ülkeden bireylerde görülen I ve D allelleri sıklık açısından değerlendirildiğinde Fransa için D (0,54), I (0,46); Almanya için D (0,54), I (0,46); ABD için D (0,56), I (0,44); Danimarka için D (0,55), I (0,45); İngiltere D (0,55), I (0,45); Japonya için D (0,34), I (0,66); Tayland D (0,30), I (0,7); Çin D (0,4), I (0,6); Kore D (0,39), I (0,61) bulunmuştur. Sonuçlarımız bu değerlerle karşılaştırıldığında I allellinin D allellinden daha az görülmesi bakımından Fransa, Almanya, ABD, Danimarka ve İngiltere'ye benzer bir dağılım sergilemektedir. Buna göre Çukurova Bölgesi insanları ADE genotipindeki allel dağılımı bakımından Avrupalı ve Amerikalılara Asyalılardan daha çok benzemektedir.

Sozer (2004) tarafından Çukurova Bölgesi'nde yaşayan 61 preeklampsili gebe ile 58 normotansif gebe üzerinde yapılan ve I ve D alleli taşıyıcılığının preeklampsili olgularda sırasıyla % 41 ve % 59, normotansif gebe grubunda ise sırasıyla % 46,6 ve % 53,4 olarak bulunduğu çalışma sonuçları, bizim çalışma sonucumuzla karşılaştırıldığında çalışılan hasta ve kontrol grupları benzemese de her iki grupta da D allelinin I allelinden baskın olması Çukurova Bölgesi'nde yaşayan insanlarda D allelinin baskın olduğu fikrini destekler görünmektedir.

Hasta ve Kontrol grubu için I/D oranları karşılaştırıldığında hasta grubu için 0,43, kontrol grubu için ise 0,23 olarak hesaplanmıştır ve I allellinin görülme sıklığının kronik hepatitli bireylerde sağlıklı bireylere göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,01$). Her iki grupta da D alleli baskındır, ancak I allellinin

hasta grubunda daha yoğun olması bu allellin kronik hepatit hastalığı için genetik bir risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir. Yine de I alleliyle kronik hepatit arasında bir ilişki olduğuna dair kesin kanıya varmak için daha çok kanıta ihtiyaç vardır. Hasta ve sağlıklı birey sayısı artırılarak yapılacak bir araştırma, sonucun güvenilirliğini artıracaktır.

Yaptığımız çalışmada ADE aktivitesi ve ADE genotipleri karşılaştırılmış, hasta ve kontrol grubu ortalama ADE aktivite değerleriyle her iki grupta görülen I ve D allelleri frekansları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$). Hasta grubunda DD genotipinde görülen ortalama ADE aktivitesi değeri ile aynı grup içerisindeki ID genotipli bireylerde görülen ortalama ADE aktivitesi değeri arasındaki fark istatiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$). Aynı grupta ID ve II genotipli bireylerde görülen ortalama ADE aktiviteleri II genotipli bireylerin sayısının azlığı nedeniyle istatiksel olarak karşılaştırlmamaktadır. Kontrol grubunda da DD ve ID genotipleri gösteren bireylerin ortalama ADE aktiviteleri arasındaki fark istatiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$) ve II genotipli birey sayısının yetersizliği nedeniyle bu genotip için belirlenen ortalama ADE aktivitesi istatiksel bir değerlendirmeye alınmamıştır. ADE'nin astım (Tomita ve ark., 1998), iskemik inme (Tuncer ve ark., 2006), atletik performans (Woods ve ark., 2000), diabet (Kantarcı ve ark., 2003), gebelik hipertansiyonu (Sözer, 2004), hücrelerin açlık karşısında hayatta kalabilirliği (Hamdi ve Castellon, 2004) ve koroner arter hastalığı (Akar ve ark., 1998) gibi birçok durum ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda Rigat B. ve ark. (1990) tarafından bildirilen I allelinin ortalama ADE aktivitesinde azalma yarattığı savı otomatik olarak kabul edilmektedir. Ancak Bloem J.L. ve arkadaşlarının (1996) siyah ve beyaz ırklar ile yaptıkları çalışmada beyaz ırk için genotip ve aktivite arasında doğrusal bir ilişki varken siyah ırk için böyle bir durumun söz konusu olmadığı bildirilmektedir. Bu nedenle genotiple ADE aktivitesi arasında doğrusal bir ilişki olduğunu önceden kabul etmek anlamlı olmayabilir. Bizim sonuçlarımız ADE genotipi ile plazma ADE aktivitesi arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir. Bu nedenle sonuçlarımız Rigat ve ark. (1990) tarafından yapılan çalışma ile paralellik göstermezken Bloem ve ark. (1996) tarafından yapılan çalışmanın siyah ırk ile ilgili sonuçlarına benzemektedir.

Bulgularımıza göre I allelinin baskınlığı ile kronik hepatit arasında bir ilişki kurulabilirken, I allelinin baskınlığı ile ADE aktivitesi arasında bir ilişki olmaması, hastalık ile genotip arasında bir ilişki varsa bile ADE'nin plazmadaki seviyesinin sadece genotipten değil başka bir takım faktörlerden de etkilendiğini göstermektedir. Literatürdeki bilgilere göre ADE'nin plazma aktivitesini etkileyen faktörlerden birisi ADE2 aktivitesi olabilir (Ocaranza ve ark., 2004). Çalışmamızda ADE aktivitesi pH 8,3 tamponunda ve FAPGG substratı kullanılarak ölçülmüştür. Literatürde FAPGG'nin ADE2 tarafından yıkımına değinilmezken Vickers ve ark. tarafından 2002 yılında yapılan araştırmada, ADE2'nin aktivitesi 126 biyolojik substrat ve farklı pH değerlerinde çalışılmış ve ADE2'nin pH 8 civarında çok düşük aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuca bakıldığında; ölçtüğümüz aktivitenin büyük oranda ADE aktivitesi olduğu ve bulduğumuz değerlere bağlı olarak ADE2 aktivitesi ile ilgili yorum yapmanın mümkün olmadığı görülmektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. SONUÇLAR

5.1.1. Çukurova Bölgesi'nde yaşayan bireyler arasında D allelinin dağılımı I allelinden fazladır.

5.1.2. ADE gen polimorfizmi ile ADE plazma seviyesi arasında istastiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$).

5.1.3. Kronik hepatitli bireyler ile hasta bireyler arasında plazma ADE aktivitesi bakımından anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$).

5.1.4. Kronik hepatitli bireylerde I allelinin dağılımı hasta grubundaki dağılımdan anlamlı derecede farklıdır ($p<0,01$).

5.1.5. I alleli hepatitin kronikleşmesinde genetik risk faktörü olabilir.

5.2.ÖNERİLER

5.2.1. Çalışma, hasta ve kontrol grubundaki birey sayısı arttırılarak tekrarlanabilir.

5.2.2. Aynı çalışma etnik köken, yaş ve cinsiyet gözönüne alınarak yapılabilir ve böylece bireyler arası farklar azaltılarak enzim aktivitesi değeri ile genotip arası ilişki daha iyi incelenebilir.

5.2.3. Hepatit hastalığı geçirmiş ancak kurtulmuş bireyler ile hepatiti kronikleşmiş bireyler genotip ve aktivite bakımından karşılaştırılabilir.

5.2.4. Kronik hepatitli hastalar ile sağlıklı insanlar Ang II ve Ang 1-7 seviyeleri bakımından karşılaştırılarak mekanizma anlaşılmaya çalışılabilir.

5.2.5. Aynı enzimi kodlayan genin farklı polimorfik bölgeleri ile benzer bir çalışma yapılabilir.

5.2.6. ADE ID polimorfizmi ile ilişki bulunmuş hastalıklar ADE ve ADE2 seviyeleri bakımından karşılaştırılarak ADE ve ADE2 enzimlerinin zıt etkisinin mekanizması daha iyi anlaşılabilir.

KAYNAKLAR

AKAR N., ARAS O., OMURLU K., CIN S., 1998. Deletion Polymorphism at the Angiotensin-Converting Enzyme Gene in Turkish Patients with Coronary Artery Disease. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.; 58: 491-496.

ALVAREZ R., TERRADOS N., ORTOLANO R., IGLESIAS C., REGUERO J.R., BATALLA A., CORTINA A.,FERNANDEZ-GARCIA B., RODRIGUEZ C., BRAGA S., ALVAREZ V. and COTO E., (1999). Genetic Variation in the Renin Angiotensin System and Athletic Performance. European. Journal of Applied Physiology; 82:117-120.

ANDRE F., 2000. Hepatitis B Epidemiology in Asia, The Middle East and Africa.Vaccine; 18 (1): 20-22.

BENFER I.F., DIZ D.I., FERRARIO C.M., 1993. Cardiovascular Actions of Angiotensin (1-7). Peptides; 14(4): 679-684.

BUTTERY J.E. and STUART S., (1993). Assessment and Optimization of Kinetic Methods for Angiotensin-Converting Enzyme in Plasma. Clinical Chemistry; 39(2): 312-316.

BLOEM L.J., MANATUNGA A.K. and PRATT H., (1996). Racial Difference in the Relationship of an Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Polymorphism to Serum Angiotensin I-Converting Enzyme Activity. Hypertension; 27:62-66.

CAMBIEN F., ALLHENC-GELAS F., HERBETH B., ANDRE J.L., RAKOTOVAOR., GONZALES M.F., ALLEGRINI J. and BLOCH C. (1988). Familial Resemblance of Plasma Angiotensin-Converting Enzyme Level: The Nancy Study. The American Journal of Human Genetics; 43: 774-780.

CHIU A.T., HERBLIN W.F., MCCALL D.E., ARDECK R.J., CARINI D.J., DUNCIA I.V., PEASE L.J., WONG P.C., WEXIER R.R., JOHNSON A.L., TIMMERMANS P.B.M.W.M., 1991. Identification of Angiotensin II Receptor Subtypes. Biochemical and Biophysical Research Communications; 165: 196-203.

CORNELL M.J., WILLIAMS T.A., LAMANGO N.S., COATES D., CORVOL P., SOUBRIER F., HOHEISEL J., LEHRACH H., ISAAC R.E., 1995. Cloning and Expression of an Evolutionary Conversed Single Domain Angiotensin Converting Enzyme From Drosophilla melanogaster. Journal of Biological Chemistry; 270: 13613-13619.

CORVOL P., WILLIAMS T.A., 1998. Peptidyl-Dipeptidase A/Angiotensin I-Converting Enzyme. A.J. Barrt, N.D. Rawlings, J.F. Woesner, In Hanbook of Proteolytic Enzymes, Academic Press, San Diego, s1066-1077.

CRISAN D., CARR J., 2000. Angiotensin I-Converting Enzyme. Journal of Molecular Diagnostics; 2: 1- 22.

DANILCZYK U., ERIKSSON U., CRACKOWER M.A., PENNIGER J.M., 2003. A Story of Two ACEs. Trends in Endocrinology and Metabolism.; 15: 166-169.

DONOGHUE M., HSIEH F., BARONAS E., GODBOUT K., GOSSELIN M., STAGLIANO N., DONOVAN M., WOOLF B., ROBINSON K., JEYASEELAN R., BREITBART R.E., ACTON S., 2000. A Novel Angiotensin-Converting-Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. Circulation Research; 87: e1-e9.

DZAU V.J., BRODY T., ELISON E., PRATT R.E., INGELFINGER J.R., 1987. Tissue Specific Regulation of Renin Expression in the Mouse. Hypertension; 9(Supl. III): 11138-11141.

DZAU V.J., BURT D.W., PRATT R.E., 1988. Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System. The American Journal of Physiology; 255: F563-F573.

EKMEKÇİ A., CANBERK A. VE BERKMAN K., 2000. Antiogensinler Antiogensin Reseptöreri ve Antiogensin Antagonistleri. Park Matbaacılık, İstanbul. 154s.

ERDÖS E.G., 1990. Angiotensin I Converting Enzyme and the Changes in Our Concepts Through the Years. Lewis K. Dahl Memorial Lecture. Hypertension; 16:363-370.

ERGEN H.A., HATEMI H., AGACHAN B., CAMLICA H., ISBIR T., 2004. Angiotensin-I-Converting Enzyme Gene Polymorphism in Turkish Type 2 Diabetic Patients. Exerimental. Molecular Medicine; 36(4): 345-350.

FERRARIO C.M., CHAPPELL M.C., TALLANT A., BROSNIHAN B. and DIZ D.I., (1997). Counter Regulatory Actions of Angiotensin (1-7). Hypertension; 30: 535.

HAMDI H.K. and CASTELLON R., (2004). A genetic Variant of ACE Increases Cell Survival: A New Paradigm For Biology and Disease. Biochemical and Biophysical Researc Communications; 318: 187-191.

HEBLIN W.F., CHIU A.T., MCCALL D.E., ARDECKY R.J., CARINI D.J., DUNCIA I.V., PEASE L.J., WONG P.C., WEXIER R.R., JOHNSON A.L., TIMMERMANS P.B.M.W.M., 1991. Angiotensin II Receptor Heterogeneity. American Journal of Hypertension; 4: 2995-3025.

HUBERT C., HOUOT A.M., CORVOL P., SOUBRIER F., 1991. Structure of The Angiotensin I-Converting Enzyme Gene. Two Alternate Promoters Correspond to Evolutionary Steps of A Duplicated Gene. Journal of Biological Chemistry; 266: 15377-15383.

INGELFINGER J.R., PRANT R.E., ELLISON K.E., DZAU V., 1986. Sodium Regulation Angiotensinogen mRNA Expression in Rat Kıdney Cortex and Medulla.The journal of Clinical Investigation; 78: 1311-1315.

KANTARCI G., EREN Z., YAMAN A., ISPIR T., OZENER Ç. ve AKOĞLU E., (2003). Türk Tip2 Diabetik Hasta Populasyonunda Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Polimorfizminin Diabetik Nefropati ve Diğer Vasküler Komplikasyonlar ile İlişkisi. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi; 12(1): 8-15.

KEAVNEY B., MCKENZIE C.A., CONNELL J.M., JULIER C., RATCLIFFE P.J., SOBEL E., LATHROP M., FARRAL M., 1998. Measured Haplotype Analysis of the Angiotensin-I Converting Enzyme Gene. Human Molecular Genetics; 7: 1745-1751.

KOHARA K., BROSNIHAN K.B., FERRARIO C.M., 1993. Angiotensin (1-7) in the Spontaneously Hypertensive Rat. Peptides; 14: 883-891.

McKENZIE C.A., ABECASIS GR., KEAVNEY B., FORRESTER T., RATCHLIFFE P.J., JULIER C., CONNELL J.M., BENNETT F., LATHROP M., 2001. Trans-Ethnic Fine Mapping of a Quantitative Trait Locus For Circulating Angiotensin Convertin Enzyme (ACE). Human Molecular Genetics; 1077-1084.

MISTIK R. ve BALIK I., 2001. Türkiyede Viral Hepatitlerin Epidemiyolojik Analizi. K. Kılıçturgay, S. Badur. Viral Hepatit'2001, Viral Hepatit Savaşım Derneği, İstanbul. s9-57.

NAKAMURA A., TWAO H., FUKUI K., KIMURA S., NAKANISHI S., ABE Y., 1990. Regulation of Liver Angitensinogen and Kidney Renin mRNA Levels by Angiotensin II. American Journal of Physiology 1990; 258 (1): 1-6.

OCARANZA M.P., PALOMERA C., ROMAN M., BARGETTO J., LAVANDER S. and JALIL J.E., (2006). Effetcts of Hypertension on Angiotensin-(1-7) Levels in Rats with Different Angiotensin-I Converting Enzyme Polymorphism. Life Sciences; 78: 1535-1542.

PAGE A.R., SHARP H.L., GREENBERG L.J., YUNIS E.J., 1975. Genetic Analysis of Patients with Chronic Active Hepatitis. The Journal of Clinical Investigation 56 : 530-535.

PAIZIS G., TIKELLIS C., COOPER M.E., SCHEMBRI J.M., LEW R.A., SMITH A.I., SHAW T., WARNER F.J., ZUILLI A., BURRELL and ANGUS P.W., (2005). Chronic Liver Injury in Rats and Humans Upregulates the Novel Enzyme Angiotensin Converting Enzyme 2. Gut; 54: 1790-1796.

PASHA Q.M.A., KHAN A.P., KUMAR R., RAM R.B., GROVER S.K., SRIVASTAVA K.K., SELVAMURTHY W. and BRAHMACHARI S.K., (2002). Variations in Angiotensin-Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism in Indian Populations of Different Ethnic Origins. Journal of Biosciences; 27(1): 67-70.

RIGART B., HUBERT C., ALHENC-GELAS F., CAMBIEN F., CORVOL P. and SOUBRIER F., (1990). An Insertion/Deletion Polymorphism in the Angiotensin-I-Converting Enzyme Gene Acoounting For Half the Variance

of Serum Enzyme Levels. The Journal of Clinical Investigation; 86: 1343-1346.

RIGAT B., HUBERT C., CORVOL P. and SOUBRIER F., (1992). PCR Detection of the Insertion/Deletion Polymorhism of the Human Angiotensin Converting Enzyme Gene (DCP1) (Dipeptidyl Carboxypeptidase 1). Nucleic Acids Research; 20(6): 1433.

RIORDAN J.F., (2003). Angiotensin-I-Converting Enzyme and Its Relatives. Genome Biology.; 4:225.

SANTOS R.A.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., ANDRADE S.P., 2000. Angiotensin (1-7) : An Update. Regulatory Peptides; 91: 45-62.

SCHUNKERT H., INGELFINGER J.R., HIRSCH A.T., PINTO Y., REMME W.J., JACOB H., DZAU V.J., 1993. Feedback Regulation of Angiotensin Converting Enzyme Activity and mRNA Levels by Angiotensin II. Circulation Research; 72: 312-318.

SCOTT A.L., CHANG R.S.L., LOTTI V.J., SIEGL P.K.S., 1992. Cardiac Angiotensin Receptors: Effects of Selective Angiotensin II Receptor Antagonists. DuP 753 and PD121981 in Rabbıt Heart. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics ; 251: 53-535.

SKEGGS L.T., KAHN J.R., SHUMWAY N.P., 1956. Preparation and Function of the Hypertensin Converting Enzyme. Journal of Experimental Medicine; 103: 295-299.

SOZER O., 2004. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İle Gebelik Hipertansiyonu Arasındaki İlişki. (ATTILA G. Danışman) Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana.

TASYARAN M.A., 2001. HBV İnfeksiyonu Epidemiyolojisi. K. Kılıçturgay, S. Badur, Viral Heptait'2001, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul. s121-128.

TIPNIS S.R., HOOPER N.M., HYDE R., KARRAN E., CHRISTIE G., TURNER A. J., 2000. A Human Homologue of Angiotensin I-Converting Enzyme. Journal of Biological Chemistry; 275: 33238.

TOMITA H., SATO S., MATSUDA R., OGISU N., MORI T., NIIMI T. and SHIMIZU S., 1998. Genetic Polynorphism of the Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) in Asthmatic Patients. Respiratory Medicine; 92: 1305-1310.

TUNCER N., TUGLULAR S., KILIC G., SAZCI A., US O., KARA I., 2006. Evaluation of the Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism and the Risk of Ischaemic Stroke. Journal of Clinical Neuroscience; 13: 224-227.

VALOTTON M.B., 1987. The Renin Angiotensin System. Trends in Pharmacological Sciences; 8: 69-74.

VICKERS C., HALES P., DICK L., GAVIN J., TANG J., GODBOUT K., PARSONS T., BARONAS E., HSIEH F., ACTON S., PATANE M., NICHOLS A., TUMMINO P.J., 2002. Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2). ACE2 Biological Peptide Substrates. Journal of Biological Chemistry; s27.

WEI L., ALHENC-GELAS F., CORVOL P., CLAUSER E., 1991. The Two Homologous Domains of the Human Angiotensin I-Converting Enzyme are Both Catalytically Active. Journal of Biological Chemistry 266:9002-9008.

WEI L., CLAUSER E., ALHENC-GELAS F., CORVOL P., 1992. The Two Homologous Domains of the Human Angiotensin I-Converting Enzyme Interact Differently with Competetive Inhibitors. Journal of Biological Chemistry 267: 13398-13405.

WELCHES W.R., BROSNIHAN K.B., FERRARIO C.M., 1993. A Comprasion of the Properties and Enzymatic Activity of Three Angiotensin Processing Enzymes: Angiotensin Converting Enzyme, Prolyl Endopeptidase and Neutral Endopeptidase. Life Sciences; 52(18): 1461-1480.

WIWANITKIT V., 2004. Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymrphism I and D Alleles From Some Different Countries. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostosis; 10(2): 179-182.

WOODS D.R., HUMPHRIES S.E., MONTGOMERY H.E., 2000. The ACE I/D Polymorphism and Human Physcial Performance. Trends in Endocrinology and Metabolism. 11(10): 416-421.

YOSHIJI H., NOGUCHI R., KOJIMA H., IKENAKA Y., KITADE M., KAJI K., UEMURA M., YAMAO J., FUJIMOTO M., YAMAZAKI M. TOYOHARA M., MITORO A. AND FUKUI H., (2006). Interferon Augments the Anti-Fibrotic Activity of an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor in Patients with Refractory Chronic Hepatitis C. World J. Gastroenterology; 12(42): 6786-6791.

ZDROJEWICZ Z., (1992). Does the Activity of Angiotensin Converting Enzyme Depend on Sex, Age, Body Weight and Phase of the Menstruation Cycle in Women? Pol. Tyg. Lek.; 47(44-45): 1016-1017.

ÖZGEÇMİŞ

1981 Yılında Adana ilinin Seyhan ilçesinde doğdum. İlköğrenimimi Anafartalar İlkokulu'nda tamamladım. Ortaöğrenimimi Seyhan Abdurrahim Gizer İlköğretim Okulu'nda ve Çukurova Elektrik Teknik Lise'sinde tamamladım

2004 yılında Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden bölüm birinciliği ile mezun oldum ve aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Tübitak Yurtiçi Yüksek Lisans Bursu desteği ile yüksek lisans eğitimime başladım.