

T.C.

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Sinirbilim Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr.İhsan Kara

**AKUT İSKEMİK İNMEDE NİTRİK OKSİT SENTAZ
VE ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM GEN
POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

138401

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Yüksek Lisans Tezi

Dr. Neşe Tuncer Elmacı

İstanbul, 2002

138401

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Sinirbilim Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr.İhsan Kara

**AKUT İSKEMİK İNMEDE NİTRİK OKSİT SENTAZ
VE ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM GEN
POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

138401

Yüksek Lisans Tezi

Dr. Neşe Tuncer Elmacı

İstanbul, 2002

İÇİNDEKİLER:

Sayfa No

| | |
|----------------------|----|
| Teşekkür | |
| Giriş ve Amaç..... | 1 |
| Genel Bilgiler..... | 3 |
| Gereç ve Yöntem..... | 9 |
| Bulgular..... | 12 |
| Tartışma..... | 17 |
| Özet..... | 20 |
| İngilizce Özet..... | 21 |
| Kaynaklar..... | 22 |
| Özgeçmiş..... | 28 |

TEŞEKKÜR:

Günümüzde bilime ve insanlığa katkısı olan tüm özgün çalışmaların bir kişinin değil bir grubun emeği, inancı, özverisi ve kolektif çalışması sonucunda olduğuna inanıyorum. Gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışması grubumuzun üç yıllık çabasının ürünüdür. Gerek tez çalışmamda ve gerekse yüksek lisans eğitimim boyunca bana bilimselliği ve öğreticiliği ile örnek olan, her türlü yardım ve desteği sunan hocam Prof. Dr.İhsan Kara'ya, tez çalışmamın laboratuvar kısmını yürüten, genetik laboratuvar deneyimi ile sonuçlarımızın en güvenilir olmasını sağlayan Güner Kaya'ya ve Gamze Kılıç'a, genetik bilgi ve deneyimi ile bize katkıda bulunan Prof.Dr.Ali Sazcı'ya, yüksek lisans eğitimim süresince bana sıcak ve bilimsel bir ortam sağlayan Doç.Dr.Asiye Nurten'e, kader ve sınıf arkadaşım sevgili Bilge Özerman'a, tez çalışmamın istatistiksel dökümantasyonunda ve her türlü yazışmalarda emeği olan Soner Aydın'a çok teşekkür ediyorum.

Bedenlerini ve ruhlarını bize inançla teslim eden, güvenen, bu çalışmanın gerçek sahipleri olan ve hiç düşünmeden çalışmamıza katılan hasta ve hasta yakınlarımıza saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Yaptığım her iyi işte olduğu gibi bilimsel çalışmalarımda da bilimsel düşüncesi ile beni zenginleştiren, inancı, enerjisi ile yüreklendiren, umutsuz anlarda omuz veren sevgili eşim İlhan Elmacı'ya sevgi ve teşekkürlerimle...

Dr. Neşe Tuncer Elmacı

Temmuz 2002, İstanbul

GİRİŞ VE AMAÇ:

İnme, tüm dünyada kalp hastalıkları ve kanserden sonra ölüm nedenleri içinde üçüncü sırada yer almaktadır. Etiyolojik inme nedenleri arasında iskemik inme, %70-85 sıklıkta görülmekte ve bu olguların %15-%33'ünde ağır mortalite ve morbiditeyle sonuçlanmaktadır. Bu nedenlerle inme fizyopatolojisini aydınlatmak ve bu bilgilerle yeni tedavi yaklaşımları geliştirmek hedeflenmektedir.

Serebral iskemide, klinik bulguların ağırlığı beyinde hasarlı dokunun yerine ve büyüklüğüne bağlı olarak değişmektedir. Serebral dolaşımın bozulması, nöron kaybına ve kalıcı strüktürel hasara neden olmaktadır. İskemide membran reseptörlerinin aktivasyonu, enerji depolarının tüketilmesi, membran ve makromoleküllerde bozulma, proteolitik enzimlerin aktivasyonu sonucu serbest oksijen radikalleri oluşumuna ve DNA'da kırılmalara yol açmakta ve bunun sonucunda da hem nekrotik hem de apoptotik hücre ölümü gerçekleşmektedir.

İnme patogenezi, multifaktöryal olup genetik faktörlerin de rol aldığı düşünülmektedir. Klasik kahtımsal geçiş tam olarak gösterilmemekle birlikte çok sayıda tek gen patolojileri saptanmıştır. İskemik inme patogenezinin araştırıldığı klinik, epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan modellerinde genetik hastahklar halen araştırılmaktadır.

İskemik inme etyolojisi multifaktöryal nedenlere bağlıdır. Günümüzde tanımlanmış risk faktörleri henüz tanımlanmamış risk faktörleri yanında oldukça küçük bir grubu oluşturmaktadır. Moleküler genetik alanındaki gelişmeler, inme patogenezinde genlerin rollerinin aydınlatılmaya başlanmasına neden olmuştur.

L-arginin/nitrik oksid sentaz sistemi, endotel fonksiyonlarında önemli bir mediyatördür. Damar duvar tonusu, integrasyonu ve büyümesi ile ilgili fonksiyonları vardır. Klinik ve deneysel çalışmalarda bu sistemin genetik kontrolünün olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarda nitrik oksit sentaz enzimini kodlayan gen varyantları olduğu ve bu varyantların bir grubunun iskemik hastalıklara eğilimi arttırdığı öne sürülmüştür. Beyin dokusunda iskemi sırasında nitrik oksit (NO) artışı gösterilmiştir. Nöronal mesaj sisteminde düşük konsantrasyonlarda nitrik oksidin fizyolojik rol oynamasına rağmen, NO yüksek konsantrasyonlarda oldukça toksik bir madde haline gelmektedir. Nitrik oksid, süperoksid anyonu ile reaksiyona girerek oldukça toksik bir serbest radikal formu olan peroksinitrit oluşumuna neden olarak veya direkt protein,

metallerle reaksiyona girerek dokuya hasar vermektedir. Nitrik oksit sentaz (NOS) geni polimorfizmi gösterilmiştir. NOS3 geninde Glu298Asp polimorfizminin özellikle laküner enfarktlarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Anjiotensin Konverting Enzim (AKE), anjiotensin II üretimi ve bradikinin katabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu enzimler damar tonusunu, endotelial fonksiyonları, düz kas proliferasyonunu regüle eden başlıca enzimlerdir. Serebral küçük damar hastalıklarında AKE gen polimorfizminin (delesyon/insersiyon) ve AKE gen varyantlarının damar relaksasyonunun bozulmasına neden olarak özellikle bazı ırk ve etnik özelliklerde iskemik inme için bir risk faktörü olabildiği gösterilmiştir.

Çalışmanın amacı; akut inme ile başvuran Türk popülasyonundan oluşmuş bir hasta grubunda ve hastaların birinci derece akrabalarında AKE ve NOS gen polimorfizmlerinin saptanarak, inmeye yatkınlık ile korelasyonun ve aile bireylerinde genetik benzerliğin ve inme riskinin araştırılmasıdır.

GENEL BİLGİLER:

Serebrovasküler hastalıklar ve inme genetiği son yıllarda epidemiyolojik, deneysel ve klinik çalışmalarla araştırılmaktadır. Genetik çalışmalar içinde, iskemik inmeye neden olan koagülasyon bozuklukları, konnektif doku hastalıkları, vaskülopatiler, metabolik hastalıklar gibi sistemik hastalıkların ve hemorajik inmenin genetiği ile ilgili çalışmalar başta gelmektedirler. Son yıllarda subkortikal infarktlar ve lökoensefalopati ile seyreden serebral otozomal dominant arteriopati gibi Mendelian kalıtımla geçen monojenik hastalıkların genetiği ile ilgili bilgilerimizin artmasına rağmen kalıtımın kompleks, multijenik ve daha heterojen olduğu genetik hastalıkları anlamak daha zor olmaktadır.

İnme genetiği ile ilgili çalışmalar, geniş hasta gruplarının alındığı popülasyon çalışmaları, ailelerde yapılan çalışmalar ve ikiz kardeşler üzerinde yapılan çalışmalardan oluşmaktadır. Ailelerde yapılan çalışmalarda inmenin aynı aile breylerinde genetik yakınlığı gösterir olduğunu vurgulamaktadır (1,2,3). Monozigot ikizlerde yapılan çalışmalarda inme sıklığının dizigot ikizlere göre 5 kat fazla olduğu gösterilmiştir (4). Çalışmalarda intrakranial anevrizma ve subaraknoid kanamalar başta olmak üzere hemorajik inmelerde de genetik bir yakınlığın olduğu gösterilmiştir (5,6,7).

İnmeye Neden Olan Sistemik Hastalıkların Genetiği

İskemik inmeler, etyolojik olarak aterotrombotik veya tromboembolik kökenlidir. Tüm iskemik inmelerin %30'unu büyük damar hastalıkları, %20'sini küçük penetran arter dallarının tıkanması ile giden laküner enfarktlar oluşturmaktadır. Tromboembolik inmeler ise tüm olguların %30'unu teşkil etmekte olup başlıca emboli kaynağı birinci sırada kalp iken ikinci sırada büyük damarlar yer almaktadır. Genetik hastalıklar tüm iskemik inme tiplerine neden olabilmektedirler.

İskemik inmeye neden olan sistemik hastalıklar ;

1. Koagülasyon Bozuklukları
2. Konnektif doku hastalıkları
3. Vaskülopatiler
4. Metabolik Hastalıklar
5. Kalıtımsal küçük damar hastalıkları
6. Etiyolojisi saptanamayan hastalıklar

Hereditör koagülopatiler: Koagülasyon inhibitörleri eksikliği, fibrinolizis anomalileri, koagülasyon faktörlerinin yüksekliği, antifosfolipid antikor sendromu, eritrosit ve trombosit hastalıklarını içermektedir. Koagülasyon defektleri içinde koagülasyon inhibitörleri olarak bilinen protein C, protein S yetmezlikleri vardır. Defektif genin protein C için kromozom 2q13-q14 olduğu, ve protein S için ise kromozom 3p11.1q-11.2 olduğu gösterilmiştir (8). Aktive protein C rezistansı ise otozomal dominant geçişliliği olan venöz tromboembolizme yol açan bir koagülopatidir. Faktör V'i kodlayan genin (G1691A) 506.kodonunda(Arg506-Gln) bir nokta mutasyonla olmaktadır. Faktör V Leiden alleli heterozigot taşıyıcılarında venöz tromboz riski 7 kat artmışken, homozigot taşıyıcılarda bu riskin 100 katına çıktığı gösterilmiştir (9,10). Aktive protein C rezistansının ailesel özellik gösteren genç yaş grubu inmeli hastalarda etyolojik bir neden olabileceği ve serebral venöz tromboza yol açabileceği bilinmektedir.

Antifosfolipid antikor sendromu; otoantikorlara bağlı olarak arterial ve venöz trombozlara neden olan ve genetik özellikler gösteren bir sendromdur (11). Genetik geçişliliği kabul edilmekle birlikte sorumlu gen henüz tanımlanamamıştır.

Konnektif doku hastalıkları: Anevrizma, tıkaçıcı arteriyal hastalıklar, disseksiyon, arterio-venöz fistül gibi kardiyovasküler ve nörovasküler sistem hastalıklarına neden olarak iskemik ve hemorajik inmeye yol açabilirler. Bu grupta yer alan Ehler-Danlos Sendromu, Marfan Sendromu, Nörofibromatozis Tip I, Polikistik Böbrek Hastalığı yer almakta olup sendromlara yol açan genetik patolojiler ve kromozom ayrımları yapılabilmektedir (12,13,14,15).

Vaskülopatiler: Fibromusküler displazi, konjenital ,noninflamatuvar bir vaskülopati olup inmeye neden olmaktadır. Ailesel geçiş saptanmış olmasına rağmen hastalıktan sorumlu gen tanımlanamamıştır (16). Başka bir vaskülopati olan Moyamoya hastalığında ise Willis Poligonunun büyük damarları tıkanmakta, kollateral dolaşım bozulmakta ve hemorajik inmeye neden olmaktadır. Hastalığın ailesel özellikleri gösterilmiş olup sorumlu kromozomun 3p24.2-p26 olarak saptanmıştır (17).

Metabolik Hastalıklar: İnmeye neden olan metabolik hastalıklardan Fabry Hastalığı, MELAS Sendromu, hiperhomosisteinemia, homosistinüri ve genetik lokalizasyonları tanımlanmıştır (18,19).

Kalıtsal Küçük Damar Hastalıkları: ilk kez 1977 yılında tanımlanmış CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) laküner enfarktlar sonrası gelişen lökoensefalopati, multiinfarkt demansla seyreden kalıtsal bir hastalıktır. Ailelerde yapılan çalışmalar defektli genin 19q12 kromozomu ve NOTCH 3 gen mutasyonu olduğu gösterilmiştir(20).

Hemorajik İnme Neden Olan Sistemik Hastalıkların Genetiği:

Hemorajik inmeler, damar rüptürleri sonucunda meydana gelirler ve tüm inmelerin %10'unu intraserebral kanamalar oluşturmaktadır. Amiloidozisle seyreden intraserebral kanamaların amiloid prekürsör protein geni mutasyonu sonucu olduğu gösterilmiştir(21).

Serebral amiloid anjiyopati , ileri yaşta intraserebral kanamaya neden olan bir sendromdur. Serebral amiloid anjiyopatili hastalarda apolipoprotein epsilon 4 allelinin daha sık görüldüğü ve epsilon2 allelinin de bu hastalar içinde intraserebral kanama geçiren hastalarda sık görüldüğü bildirilmiştir(21). Apolipoprotein epsilon 4 allelinin amiloid anjiyopati dışında iskemik serebrovasküler hastalıklarda da sıklığının yüksek olduğu gösterilmiştir (22). Bunun dışında kavernoöz malformasyon ve arteriovenöz malformasyon gibi intraserebral kanamaya neden olan vasküler patolojilerin de ailesel özellik gösterebildiği ve genetik yatkınlığın söz konusu olabildiği gösterilmiştir (23, 24, 25).

İNME ETYOPATOGENEZİNDE ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM VE ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ GENLERİ

İnme multifaktöryal etyolojili bir hastalıktır. Epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan deneylerinde iskemik inme patogenezinde genetik etyolojinin önemli rol oynadığına dair güçlü kanıtlar olmakla birlikte bu genetik mutasyonların tanımlanması güçtür. İnme etyopatogenezinde angiotensin-konverting enzim geni ve endotelial nitrik oksit sentaz geni polimorfizmleri arasındaki ilişkileri araştıran ve farklı toplumların bireylerinde farklı sonuçlar gösteren çalışmalar vardır. Histokimyasal çalışmalarda serebral damarların AKE'ce zengin olduğu gösterilmiştir(26). Deneysel inme modelinde spontan hipertansif sıçanlarda AKE'in

özellikle arterler üzerindeki vasküler değişikliklerin olmasında ve insanlarda görülen beyaz cevher lezyonları ve laküner enfarktların patofizyolojisinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir(27,28).

Son yıllarda anjiotensin konverting enzimi kodlayan genin polimorfik varyantları ile iskemik inme arasındaki bağlantılar dikkat çekmektedir. AKE geninin delesyon/insersiyon (D/I) varyantları farklı plazma ve doku AKE aktivitelerine neden olmakta ve aktivite artışının arterial duvardaki patolojik süreci başlattığı öne sürülmektedir(29). Anjiotensin konverting enzim geni 17.kromozomda (17q23) yerleşmiştir ve 16.intronda 287 bp alu tekrar bölgesinde insersiyon/delesyon polimorfizmi göstermektedir. AKE geninin Mendel kalıtımı şeklinde geçiş gösterdiği, allellerin plazma AKE düzeyi üzerine etkilerinin farklı olduğu, homozigot D alleli (DD) taşıyan kişilerde yüksek AKE düzeyleri gözlenirken, homozigot insersiyon (II) alleli taşıyanların düşük AKE düzeylerine sahip olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda D alleli ile inme insidansının arttığı görüşü bazı otörlerce savunulurken bazıları ise bu görüşü desteklememektedir(30,31,32). Son yıllarda karotis aterosklozu ile AKE gen polimorfizmi arasındaki ilişkiler de araştırılmıştır. Karotis arter intima-media kalınlığı artışının inme ve koroner arter hastalıkları ile korelasyon gösterdiği bilinmektedir. AKE gen polimorfizmi ile karotid arter ateroskleroza arasındaki ilişki de farklı gruplarca farklı sonuçlanmıştır. Pozitif ilişki olduğu yönünde birkaç çalışma varken (33,34) geniş serilerde AKE I/D polimorfizminin karotis arter ateroskleroza ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir(35).

Takami ve ark. Anjiotensin-konverting enzim gen polimorfizminin laküner enfarkt için bir risk faktörü olmadığını göstermişlerdir(36). Zang ve ark. İskemik inme geçiren ve TipII diabetes mellitusu olan hastalarda AKE DD genotipinin ve D allel sıklığının varlığını göstermişler ve inme geçirmemiş diabetik hastalara göre anlamlı farklılık olduğunu vurgulamışlardır (37). Sierra ve ark. Esansiyel hipertansiyonu olan hasta popülasyonunda serebral beyaz cevher lezyonlarının anjiotensin-konverting enzim DD genotipi ve D allelinin sıklığı ile ilişkili olduğunu bulmuşlar ve anlamlı istatistiksel sonuçlar saptamışlardır (38). Hassan ve ark. ise küçük damar hastalığına bağlı laküner sendromlu hastalarda ve lökaryozisde, AKE DD genotipinin anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir(39). Araştırmacılar ırk ve etnik özelliklerin de AKE gen polimorfizmi ile inme

yatkınlığı arasındaki ilişkileri belirleyebileceğini göz önüne alarak farklı popülasyonlarda çalışmışlardır. Peterlin ve ark. Slovenya popülasyonunda inme hastalarında DD genotipinde sıklığa rastlamamışlar ve AKE gen polimorfizminin inme riski artışında önemli olmadığını vurgulamışlardır (40). Lin ve ark. Taiwan'lı hastalarda yaptıkları çalışmada AKE genetik polimorfizminin bu popülasyonda serebrovasküler hastalık patogenezi ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir (41). DeSer T ve ark. serum trigliserid konsantrasyonunun, AKE DD genotipli hastalarda yüksek olduğunu göstermiş ve inme sıklığındaki artışa bu mekanizma ile yol açtığını öne sürmüşlerdir (42).

İnmeden sorumlu genlerden birinin de nitrik oksid sentaz (NOS) geni olduğu düşünülmektedir. Nitrik oksid L-argininden nitrik oksit sentaz enzimi ile sentezlenir. NOS'un 3 formu tanımlanmıştır; nöronal (NOS1), endotelial (NOS3) ve immünolojik (NOS2). NO insan ve hayvanlarda serebral kan akımını düzenler. Endotelial nitrik oksid istirahatte serebral kan akımını düzenler, platelet adhezyon ve agregasyonunu azaltarak antitromboembolik etkide bulunur(43,44). Serebral iskemisi sırasında endotelial NO üretimi, serebral kan akımını arttırdığı ve antiplatelet aktivite gösterdiği için koruyucudur. Endotelial nitrik oksit (e NOS), kromozom 7q35-36'ya lokalize gen ile kodlanıp, vasküler endotelden, plateletlerden ve kalpten eksprese edilir(45). Endotelial nitrik oksit sentaz geninde en sık rastlanan polimorfizm exon 7'de (894GWT) olup GluWAsp dönüşümüne neden olur ve homozigot genotip (NN) koroner arter hastalığı ve iskemik inmede risk faktörü olabilmektedir (46).e NOS geni 4.intronunda 27-bp polimorfizmi ile iskemik inme riski arasındaki korelasyon konusunda da birbiri ile çelişkili sonuçlara sahip çalışmalar bulunmaktadır. Hugh ve ark. eNOS ekson 7 polimorfizmi ile iskemik serebrovasküler olay arasında bir korelasyon saptayamamışlardır(47). Elbaz ve ark. ise endotelial nitrik oksit sentaz geninin Glu298Asp polimorfizminin G alleli homozigotluğunun laküner beyin enfarktları ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (48). Hou ve ark. eNOS geni intron 4'te a alleli ile iskemik inme riski arasında Çinli hasta popülasyonunda pozitif bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir (49). McLeod ve ark, NOS3 geninde Glu/Asp polimorfizmi ile iskemik inme arasında bir ilişki saptamamışlardır (50).

eNOS enzim gen polimorfizmleri ile inme arasında Türk hasta popülasyonundaki ilişkiyi araştırır sonuçlanmış bir çalışma varken, anjitenin-konverting enzim gen polimorfizmi inme geçiren Türk hasta popülasyonunda çalışılmamıştır. Ayrıca bu genetik polimorfizmlerin inmeli hastaların birinci derecede sağlıklı yakınlarındaki profiline yönelik araştırmaya rastlanmamıştır.

Çalışmanın amacı; akut inme ile başvuran Türk popülasyonundan oluşmuş bir hasta grubunda ve hastaların birinci derece akrabalarında AKE ve eNOS gen polimorfizmlerinin saptanarak, inme tipi, inmeye yatkınlık ile korelasyonun ve aile bireylerinde genetik benzerliğin ve inme riskinin araştırılmasıdır.



GEREÇ VE YÖNTEM:

Çalışmaya Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalına Mart 2001 tarihinden itibaren akut inme ile başvuran 119 hasta, 88 hasta yakını (aileden biri) ve 200 adet kontrol grubu katıldı. Hastaların anamnezleri kendilerinden ve yakınlarından alınarak hipertansiyon, diabetes mellitus, hiperlipidemi, kardiyak hastalık, sigara kullanımı gibi aterosklerotik risk faktörleri tanımlandı.

Hastaların soygeçmişleri birinci derece akrabalarda aterosklerotik risk faktörleri ve geçirilmiş inme öyküleri açısından sorgulandı. Hastalar standart nörolojik muayeneleri yapıldıktan sonra kranyal bilgisayarlı tomografi (BBT), manyetik rezonans görüntüleme, elektrokardiografi, ekokardiografi, ekstrakranial karotis Duplex ultrasonografi, rutin biyokimyasal incelemeler yapıldı. İskemik inmeli olgularda öykü ve laboratuvar yöntemleriyle olası embolik (kardiyak /arterden artere) veya trombotik etyoloji belirlendi.

Laboratuvar çalışmaları İstanbul Üniversitesi Deneysel ve Tıbbi Araştırmalar Merkezi (DETAM) Sinir Bilim Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Hasta ve hasta yakınlarından periferik kanda DNA izolasyonu amacıyla 10cc kan falkon tüpüne alınıp 1:3 oranında Lysis buffer (30ml) eklenip +4°C'de 15 dakika rotorda çevrildi. Rotordan alınan örnekler, +4 °C 10 dakika da 1500rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pelet tamamen süspanse edildi. Bunun üzerine 15-20ml lysis buffer eklenerek +4°C'de 10 dakika 1500rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant tekrar atılıp pelet süspanse edildi. Örnekler 500µl %10'luk SDS 50µl proteinaz K(20mg/ml) ve 9.4ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56C su banyosunda bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her 1 ml örnek başına 0.37ml 9.5M amonyum asetat eklendikten sonra yavaşça karıştırılarak oda ısısında 25 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı yeni bir falkon tüpe aktarılıp üzerine 1:2 oranında %99'luk absolu alkol eklendi ve böylece DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklendi ve yüzeye ulaşan DNA steril bir mikropipet ucu ile alındı. DNA, %70'lik etil alkol çözeltisiyle yıkandı. Çıkarılan DNA'nın büyüklüğü oranında Eppendorf tüplere tris EDTA buffer eklenip bir gece bekletilerek DNA'nın tamamen bu solüsyona geçmesi sağlandı. DNA örnekleri +4°C 'de saklandı.

e NOS Gen Polimorfizminin Saptanması:

eNOS geninin 4.intronda 27 bp'lik tekrar bölgesindeki polimorfizmi belirlemek için kullanılacak primer dizileri: (5' AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT 3') (5' TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC-3'). Hasta ve hasta yakınlarının DNA'larında NOS lokusuna ait alleller polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldılar. Amplifikasyon reaksiyonları Thermal Cyclarda 94°C'de 1 dakika, 60°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika olarak 30 döngü şeklinde gerçekleştirildi. PSR ile çoğaltılan NO lokusuna ait fragman %3'lük agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. DNA fragmanları etidyum bromid ile boyandıktan sonra UV altında görüntülendi ve genotiplenmeleri yapıldı

Anjiotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizminin Saptanması:

AKE gen bölgesi için kullanılacak primer dizileri: (5' CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3'), (5' GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 32), (5' TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAT TAC 3'), (5' TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA 3') DNA örneklerinden AKE gen bölgesinin çoğaltılması için 50µl PCR karışımı hazırlandı. Karışım 31.9µl ddH₂O, 0.1 ünite Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10 x Reaksiyon çözeltisi, AKE gen bölgesine özgü 10pmol primer çifti, 200mM deoksitükleotid trifosfat karışımı (dNTP) içermektedir. DNA örnekleri yaklaşık 500ng olacak şekilde PCR karışımlarına eklenmiştir.

Buharlaşmanın engellenmesi için karışımın üzerine 50µl mineral yağ damlatılarak örneklerin Stratagene Mini Thermal Cyclers'da PCR'ları yapıldı.

AKE DD fenotipindeki örneklere ikinci kez PCR uygulandı. 20µL'lik PCR karışımında 9.05µl ddH₂O, 0.15 ünite Taq polimeraz enzimi, 2µl 10 x Reaksiyon çözeltisi, AKE gen bölgesine özgü 10pmol primer çifti, 200mM deoksitükleotid trifosfat karışımı (dNTP) kullanarak PCR reaksiyon ortamı hazırlandı ve DNA örnekleri yaklaşık 500ng olacak şekilde PCR karışımlarına eklenmiştir. Üzerlerine 50µl mineral yağ damlatılarak örneklerin Stratagene Mini Thermal Cyclers'da birinci PCR koşullarında PCR'ları gerçekleştirildi.

AKE gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon koşulu: 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 56°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 2 dakika uzama olmak üzere 30 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası oluşan amplifikasyon ürünlerinin

incelenmesi için %3'lük agaroz jel hazırlandı. Örnekler agaroz jel elektroforezinde hazırlanmış olan jele tatbik edilerek 100 voltluk elektrik akımında yürütüldü ve Poloroid kamera ile jelin fotoğrafı çekildi.

Hastalar, hasta yakınları ve kontrol gruplarında, angiotensin konverting enzyime (ACE), nitrik oksit sentaz (NOS) genlerinin genotiplenmeleri yapılarak allelik dağılımı, riks oranları ve %95 güven aralıklarına bakılarak değerlendirmeler yapıldı.. Hasta grubu ile hastaların birinci derece akrabalarının değerleri chi-square testi ile karşılaştırıldı.

$P < 0.05$ anlamlı kabul edildi.



BULGULAR:

Bu çalışmada 119 inmeli hasta grubu, 88 hasta yakını (aileden biri) ve 200 adet kontrol grubu kullanıldı. Hasta grubu aterosklerotik risk faktörleri açısından değerlendirildiğinde; %85'inde hipertansiyon, %55'inde hiperlipidemi, %23'ünde diabetes mellitus olduğu ve %47'sinin sigara içicisi olduğu görüldü. Hastalar, hasta yakınları ve kontrol gruplarında, angiotensin konverting enzyme (AKE), nitrik oksit sentaz (eNOS) genlerinin genotiplenmeleri yapılarak allelik dağılımı, riks oranları %95 güven aralıklarına bakılarak değerlendirildi.

Tablo 1'de görüldüğü üzere, hasta, hasta yakınları ve kontrol gruplarının genotiplenmeleri ve allelik dağılımları AKE için verildi. 119 hastanın 51 (%42.5)'i DD, 47 (%39.5)'si ID ve 21 (%17.6)'i II olarak tesbit edildi. 88 hasta yakınının genotiplenmesinde; 36 (%40.9)'sı DD, 37 (%42.0)'si ID ve 15 (%17.0)'i II olarak bulundu. Kontrol grubunda 200 kişi kullanıldı ve bunların allelik dağılımları; 88 (%44.0)'i DD, 81 (%40.5)'i ID ve 31 (%15.5)'i ise II olarak bulundu. Bu tablodaki allelik dağılımlar hastalar için %37.39; hasta yakınları için %37.64 ve kontrol grubu için ise %35.75 olarak bulundu.

Tablo 1. Anjiotensin konverting enzim geninin, inmeli hasta, hasta yakını ve kontrol gruplarındaki allelik dağılımı ve risk oranları ve % 95 güven aralığı

| Genotip | Hasta(%) | Hasta Yakını(%) | Kontrol(%) | Allelik Dağılım | | |
|---------|------------|-----------------|------------|-----------------|-----------------|------------|
| | | | | Hasta(%) | Hasta Yakını(%) | Kontrol(%) |
| AKE | 119(100.0) | 88(100.0) | 200(100.0) | 37.39 | 37.64 | 35.75 |
| DD | 51(42.9) | 36(40.9) | 88(44.0) | | | |
| ID | 47(39.5) | 37(42.0) | 81(40.5) | | | |
| II | 21(17.6) | 15(17.0) | 31(15.5) | | | |

Tablo 2'de eNOS geninin hasta, hasta yakını ve kontrol gruplarında allelik dağılımları tespit edildi. 119 hastada 86 (%72.3)'sı BB, 26 (%21.8)'sı BA, 7 (%5.9)'si ise AA olarak bulundu. 88 hasta yakınında 64 (%72.7)'ü BB, 22 (%25.0)'si BA ve 2 (%2.3)'si ise AA olarak tespit edildi. 200 kişilik kontrol grubunda, 133 (%66.5)'ü BB, 63 (%31.5)'ü BA ve 4 (%2.0)'ü AA olarak bulundu. Bu tablodaki allelik dağılımlar % 16.80'i hasta, %14.77'si hasta yakını ve % 17.75'i kontrol gruplarında bulundu.

Tablo2.Nitrik Oksit sentaz geninin, inmeli hasta,hasta yakını,ve kontrol gruplarındaki allelik dağılımı ve risk oranları ve % 95 güven aralığı

| Genotip | Hasta(%) | Hasta Yakını(%) | Kontrol(%) | Allelik Dağılım | | |
|---------|------------|-----------------|------------|-----------------|-----------------|------------|
| | | | | Hasta(%) | Hasta Yakını(%) | Kontrol(%) |
| NOS | 119(100.0) | 88(100.0) | 200(100.0) | 16.80 | 14.77 | 17.75 |
| BB | 86(72.3) | 64(72.7) | 133(66.5) | | | |
| BA | 26(21.8) | 22(25.0) | 63(31.5) | | | |
| AA | 7(5.9) | 2(2.3) | 4(2.0) | | | |

Tablo 3'te 119 hasta grubuyla 88 hasta yakınının alelleri karşılaştırıldı ve genotiplenmeleri, allelik dağılımlarını ayrıca risk oranları (OR) ve bununla ilgili güven aralıkları tespit edildi.

Tablo 3. Hasta ve hasta yakınlarında AKE'nin genotip,allelik dağılım,risk oranları ve %95 güven aralığı.

| Genotip | Hasta grubu | Hasta yakını | Allelik dağılım | | OR % 95 Güven Aralığı |
|---------|-------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------------------------------|
| | | | Hasta(%) | Hasta yakını(%) | |
| AKE | 119(100.0) | 88(100.0) | 37.39 | 38.76 | X ² =0.128; df:2;P=0.938 |
| DD | 51(42.9) | 35(40.4) | | | 1 |
| ID | 47(39.5) | 37(41.6) | | | 0.830 (0.474-1.453) |
| II | 21(17.6) | 16(18.0) | | | 0.885 (0.432-1.815) |

Sonuç olarak, 119 hastanın 51 (%42.9)'i DD, 47 (%39.5)'si ID ve 21 (%17.6)'i II olarak tespit edildi. 88 hasta yakınında, 35 (%40.4)'i DD, 37 (%41.6)'i ID ve 16 (%18.0)'sı II olarak bulundu.

Tablo 4'te 119 hasta ve 88 hasta yakını NOS geninin genotipleri allelik dağılımları, risk oranları ve buna takabül eden güven aralıkları verilmiştir. 119 hastanın 86(%72.3)'sı BB, 26 (%21.8)'sı BA ve 7 (%5.9)'si AA olarak bulunmuştur. 88 Hasta yakınlarının 64 (%73.0)'ü BB, 22 (%24.7)'si BA, ve 21 (%2.2)'i AA olarak bulunmuştur. Allelelik dağılımları; hastalarda %16.80 ve hasta yakınlarında %14.60 olarak tespit edilmiştir. Burada önem arzeden en önemli sonuç, AA genotipinin hastalarda 2.8 kat daha yüksek oluşudur. Bu durum tartışma kısmında ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

Tablo 4.Hasta ve hasta yakınlarında NOS'ın genotip,allelık dağılım,risk oranları ve % 95 güven aralığı

| Genoti p | Hasta Grubu | Hasta yakını | Allelik Sıklığı Hasta(%)Hasta yakını(%) | OR % 95 Güven Aralığı |
|----------|-------------|--------------|---|------------------------------------|
| NOS | 119(100.0) | 88(100.0) | 16.80 14.60 | X ² =1.741;df:2;P=0.419 |
| BB | 86(72.3) | 64(73.0) | | 1 |
| BA | 26(21.8) | 22(24.7) | | 0.884(0.462-1.693) |
| AA | 7(5.9) | 2(2.2) | | 2.826(0.572-13.944) |

Tablo 5'te hasta ve kontrol gruplarında AKE'nin genotip allelik dağılım ve risk oranlarıyla buna bağlı % lik güven aralığı verilmiştir. Buna göre 119 hasta grubunun 51 (%42.9)'i DD, 47 (%39.5)'si ID ve 21 (%17.6)'i ise II genotipine sahip oldukları tespit edilmiştir. 200 kişilik kontrol grubunda ise; 88 (%44)'i DD, 81 (%40.5)'i ID, ve 31 (%15.5) ise II genotipine sahip oldukları tespit edilmiştir. Allelik dağılımları; hasta gruplarında II genotipinin %37.39 kontrol gruplarında ise %35.78 oranında bulunduğu tespit edilmiştir.

Tablo5.İnmeli hastalar ve kontrollerde AKE'nin genotip,allelık dağılım,risk oranları ve % 95 güven aralığı.

| Genotip | Hasta Grubu | Kontrol Grubu | Allelik Sıklığı Hasta(%)Kontrol(%) | OR % 95 Güven Aralığı |
|---------|-------------|---------------|------------------------------------|------------------------------------|
| AKE | 119(100.0) | 200(100.0) | 37.39 35.75 | X ² =0.252;df:2;P=0.882 |
| DD | 51(42.9) | 88(44.0) | | 1 |
| ID | 47(39.5) | 81(40.5) | | 1.004 (0.631-1.595) |
| II | 21(17.6) | 31(15.5) | | 1.223 (0.665-2.245) |

Tablo 6'da hasta grubu ve kontrollerinde NOS geninin genotip allelik dağılımı ve risk oranlarıyla buna bağlı güven aralığlarına bakılmıştır. Sonuç olarak 119 kişilik hasta grubunun 86 (%72.3)'sı BB, 26 (%21.8)'sı BA ve 7 (5.9)'si ise AA genotipini taşıdığı tespit edilmiştir. 200 kişilik kontrol grubunda ise 133 (%66.5)'u BB, 63 (%31.5)'u BA ve 4 (%2.0)'u AA genotipini gösterdiği tespit edilmiştir. Allelik sıklıklarındaki dağılımlar; hasta grubunda AA geninin sıklık oranı %16.80, kontrol gruplarında ise %17.75 olarak tespit edilmiştir. Burada dikkate değer husus, AA genotipinin hasta gruplarında 2.33 katı daha yüksek oluşu ve bu oranla risk vermesidir.

Tablo 6: İnmeli hastalar ve kontrollerde NOS'un genotip, allelik dağılım, risk oranları ve % 95 güven aralığı.

| Genotip | Hasta Grubu | Kontrol Grubu | Allelik Sıklığı Hasta(%)Kontrol(%) | OR % 95 Güven Aralığı |
|---------|-------------|---------------|---------------------------------------|--------------------------|
| NOS | 119(100.0) | 200(100.0) | 16.80 17.75 | $X^2=6.114;df.2;P=0.047$ |
| BB | 86(72.3) | 133(66.5) | | 1 |
| BA | 26(21.8) | 63(31.5) | | 0.463 (0.273-0.784) |
| AA | 7(5.9) | 4(2.0) | | 2.331 (0.667-8.142) |

Tablo 7'de Bu tabloda hasta yakınları ve kontrol gruplarının AKE gen polimorfizmleri çalışılmıştır. 88 hasta yakınının 36 (%40.9)'sı DD, 37 (%42.0)'si ID ve 15 (%17.0) ise II genotipine sahip olduğu tespit edildi. 200 adet kontrol grubunda; 88 (%44)'i DD, 81 (%40.5)'i ID ve 31 (%15.5)'i ise II genotipini taşıdığı tespit edildi.

Allelik dağılımları ise, hasta yakınlarının AA allelini taşıma oranı %14.77, kontrol grubunu ise %17.75 olarak tespit edildi.

Tablo 7. Hasta yakını ve kontrollerde AKE'nin genotip, allelic dağılımı,risk oranları ve %95 güven aralığı.

| Genotip | Hasta Yakını(%) | Kontrol Grubu(%) | Allelik Dağılım Hasta Yakını(%) Kontrol Grubu | OR %95 Güven Aralığı |
|---------|-----------------|------------------|--|----------------------|
| AKE | 88(100.0) | 200(100.0) | 38.06 35.75 | |
| DD | 36(40.9) | 88(44.0) | | 0.881 (0.530-1.465) |
| ID | 37(42.0) | 81(40.5) | | 1.066(0.641-1.773) |
| II | 15(17.0) | 31(15.5) | | 1.120(0.570-2.200) |

Tablo 8'de burada 88 hasta yakını ve 200 adet kontrol grubunun NOS genotiplerini, allelik dağılımı risk oranlarıyla güven aralıklarına bakıldı. 88 hasta yakınının, 64 (%72.7)'ü BB, 22 (%25)'si BA ve 2 (%2.3) ise AA genotipini taşıdığı tespit edildi. 200 kontrol grubunun genotipi ise 133 (%66.5)'ü BB, 63 (%31.5) BA ve 4 (%2.0)'ü AA olarak bulundu. Allelik dağılımları ise, hasta yakınları %14.77, kontrol gruplarının ise %17.75 oranında AA allelinin taşıdığı setpit edildi.

Tablo 8. Hasta yakını ve kontrollerde NOS'un genotip,allelik dağılımı,risk oranları ve %95 güven aralığı.

| Genotip | Hasta Yakını(%) | Kontrol Grubu(%) | Allelik Dağılım Hasta Yakını(%)Kontrol Grubu | OR % 95Güven Aralığı |
|---------|-----------------|------------------|---|----------------------|
| NOS | 88(100.0) | 200(100.0) | 14.77 17.75 | |
| BB | 64(72.7) | 133(66.5) | | 1.343(0.772-2.336) |
| BA | 22(25.0) | 63(31.5) | | 0.725 (0.411-1.278) |
| AA | 2(2.3) | 4(2.0) | | 1.140 (0.205-6.340) |

Tablo 9' Seks dağılımı; Hasta grubunun 49 (%41.2)'u bayan, 70 (%58.8)'i ise erkek olarak tespit edildi. Kontrollerin 138 (%69.0) bayan 62 (%31.0) ise erkek olarak belirlendi. $X^2=23.811$, $Df=1$; $P=0.000$ olarak tespit edildi ve riks oranları 3.180 (1.983-5.099) olarak tespit edildi.

Tablo 9. Hastalar ve kontrollerde cinsiyet dağılımı.

| Hasta Grupları | Cinsiyet | | X2 | OR %95 Güven Aralığı |
|-----------------|-----------|----------|---------------------|----------------------|
| | Kadın(%) | Erkek(%) | | |
| Tıkanma(stroke) | 49(41.2) | 70(58.8) | 23.811;df=1;P=0.000 | 3.180 (1.983-5.099) |
| Kontrol | 138(69.0) | 62(31.0) | | |

TARTIŞMA:

Çalışmamızda iki genetik polimorfizmin serebrovasküler olaydaki sıklığı araştırılmış ve hastaların birinci derece yakınları ve bağımsız sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırılması yapılmıştır. Sonuçlar AKE D/I polimorfizminin inme ile ilişkili olmadığını gösterirken, eNOS geni polimorfizmi, inmeli hasta grubunda hasta yakınları ve kontrollere göre AA genotipinin anlamlı derecede yüksek oluşu ile, inme için risk faktörü olarak kabul edilebileceğini düşündürmektedir..

Anjiotensin konverting enzim D/I polimorfizminin mekanizması tam olarak aydınlatılamasa da plazma AKE aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir(29,30). AKE gen polimorfizmi dokudaki AKE aktivitesini değiştirerek arteriyel duvardaki patolojik süreci başlatıyor olabilir. Bununla birlikte sonuçlarımız inme ile AKE geni polimorfizmi arasında bir ilişkinin olmadığını göstermektedir. Literatürde AKE D/I polimorfizmi ile iskemik laküner enfarktılar arasında ilişkinin olduğunu gösteren birkaç çalışma vardır. Markus ve arkadaşları laküner enfarktlı hasta grubunda pozitif bir ilişki göstermişlerdir(29). Ancak çalışmada hasta sayısının sınırlı olması güvenilirliğini etkilenebileceğini düşündürmektedir. Catto ve arkadaşlarının yaptığı daha geniş bir laküner enfarkt grubunda ise aksine anlamlı bir ilişki olmadığı gösterilmiştir (51). Japon araştırmacılarından da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Watanabe ve arkadaşları sessiz beyin enfarktı oluşumunda AKE gen polimorfizminin anlamlı olmadığını gösterirken (52), Japon araştırmacıların yaptığı diğer bir çalışmada hipertansif hastalarda AKE D alleli ile bir korelasyonun olduğu gösterilmiştir (31). Çalışmamızda inmeli hastalarda DD genotipi allelik sıklığı %42.9 hasta yakınlarında ise %40.4 olarak saptanmış olup %95 güven aralığında $X^2=0.128$; $df:2$; $P=0.938$ olarak saptanmış ve anlamlılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlardaki farklılığı ırk ve değişik coğrafi bölgelerdeki genotipik özellik farkları ve hipertansiyon, diabet gibi risk faktörlerinin de varlığı etkiliyor olabilir. Çalışmamızda hasta yakınları ve kontrol grubu arasında da AKE gen polimorfizmlerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Genel olarak literatüre bakıldığında serebrovasküler olay riski, karotis aterosklerozu, sessiz beyin enfarktı ve lökaryozis riski ve sıklığı AKE D/I polimorfizminden etkilenmemekte buna karşıt görüş bildiren daha az sayıda çalışma olup, hipertansiyonları olan inme grubu gibi alt gruplarda anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamız literatürdeki çoğunluk görüşle

uyumlu olarak bulunmuştur. İnmeli Türk popülasyonunda yapılmış ve hasta yakınlarının da alındığı ilk çalışmadır.

Çalışmamızda 119 hasta ve 88 hasta yakını eNOS geninin genotipleri allelik dağılımları, risk oranları ve buna tekabül eden güven aralıklarına bakılmıştır. Buradaki en önemli sonuç, AA genotipinin hastalarda hasta yakınlarına göre 2.8 kat, kontrol grubundan ise 2.33 katı daha yüksek oluşu ve bu oranla risk vermesidir.

İnmeli hastalar ve kontrol grubunda eNOS geni genotipik dağılım ve allelik sıklık karşılaştırıldığında $X^2:6.114$, $P:0.047$, $OR:2.331$ % 95 $CI:0.667-8.142$ olarak, istatistiksel olarak belirgin bir anlamlılık saptanmamıştır. İnmeli hasta ve hasta yakınları ve hasta yakınları ile kontroller karşılaştırıldığında ise yine anlamlı farklılık olmadığı gözlenmiştir. Dikkati çeken özellik AA genotipine hasta grubunda büyük bir yüzde ile rastlanılmamasına karşın hastalarda, hasta yakınlarına ve kontrollere göre oldukça yüksek oranlarda gözlenmesidir.

Çalışmamız eNOS geni 4. intronundaki 27-bp polimorfizminin inme için risk faktörü olabileceğini gösterir istatistiksel anlamlılık taşımamasına rağmen, eNOS geni 4. intronundaki A allelinin iskemik inmede bağımsız bir risk faktörü olabileceğini vurgulamaktadır. Çalışmamızın sonuçları AA genotipik dağılımı ve sıklığı açısından Hou ve arkadaşlarının Çinli hasta popülasyonunda yaptıkları çalışma ile benzer özellikler göstermektedir.(49). Hou'nun çalışmasında risk faktörlerine göre genotipik dağılımın anlamlılığı da araştırılmıştır. Diabet, hipertansiyon, sigara kullanımı, hiperlipidemi gibi risk faktörleri ile anlamlı ilişki gösterilirken, inme tipi(olası etyolojik neden ile) belirgin bir anlamlı ilişki gösterilememiş, buna karşılık düşük risk grubunda genotipik dağılım ve allel sıklığının istatistiksel anlamlılığı vurgulanmıştır. Çalışmamız inmeli Türk hasta grubunda yapılan diğer çalışma sonuçları ile de benzerlik göstermektedir. Akar ve arkadaşlarının inmeli hastalarda yaptıkları çalışmada e NOS intron 4,27 polimorfizmini araştırmışlar ve AA homozigot hastaların serebrovasküler olay için kontrollere göre daha yüksek risk taşıdıklarını göstermişlerdir(53). Hasta ve hasta yakınları arasında genotipik dağılım ve allelik sıklığın karşılaştırılması sonucu anlamlı bir ilişkinin gözlenmeyişi hasta yakınlarında inme yatkınlığında artışın olmadığını vurgulamakta ve eNOS gen polimorfizminin birinci derece akrabalar arasında risk faktörü olarak kabul edilemeyeceğini göstermektedir. Literatürde hasta yakınlarının da dahil edildiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Hasta ve hasta

yakınları gruplarının sayıca arttırılması ve alt grup analizlerinin yapılması sonuçlarımızı daha güvenilir ve anlamlı kılacaktır.

e NOS gen polimorfizminin iskemik inme patogenezindeki etki mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak eNOS ile eksprese edilen NO'nun vasküler düz kas hücrelerinin relaksasyonuna, platelet ve lökositlerin vasküler endotele adhezyonunun inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte NO, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu indükleyen endotelin ve anjiotensin II gibi iki güçlü vazokonstriktörü süprese etmektedir. e NOS geni 4.intronundaki 27-bp tekrar polimorfizminin iskemik inmedeki etki mekanizması eNOS ürünleri ekspresyonunda dolayısıyla da NO sisteminin işleyişinde değişiklik yapması olarak hipotez edilmektedir(49). Farklı çalışmalarda farklı sonuçların olması etnik özellikler, hasta grubu ve kontrol olgularının farklılığı ve özellikleri, hasta sayısının değişkenliği ile ilişkili olabilir. Çalışmamızın hasta grubunun arttırılması sonuçların daha sağlıklı yorumlanabilirliği açısından anlamlı olabilir.

ÖZET:

İnme multifaktöryal etyolojili bir hastalıktır. Epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan deneylerinde iskemik inme patogeneğinde genetik etyolojinin önemli rol oynadığına dair güçlü kanıtlar olmakla birlikte bu genetik mutasyonların tanımlanması güçtür. İnme etyopatogeneğinde angiotensin-konverting enzim geni ve endotelial nitrik oksit sentaz geni polimorfizmleri arasındaki ilişkileri araştıran ve farklı toplumların breylerinde farklı sonuçlar gösteren çalışmalar vardır.

Çalışmanın amacı; akut inme ile başvuran Türk popülasyonundan oluşmuş bir hasta grubunda ve hastaların birinci derece akrabalarında ACE VE NOS gen polimorfizmlerinin saptanarak, inmeye yakınlık ile korelasyonun ve aile bireylerinde genetik benzerliğin ve inme riskinin araştırılmasıdır.

Çalışmaya Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalına Mart 2001 tarihinden itibaren akut inme ile başvuran 119 hasta, 88 hasta yakını (aileden biri) ve 200 adet kontrol grubu katıldı. Hastalar, hasta yakınları ve kontrol gruplarında, angiotensin konverting enzyme (ACE), nitrik oksit sentaz (NOS) genlerinin genotiplenmeleri yapılarak allelik dağılımı, riks oranları ve %95 güven aralıklarına bakılarak değerlendirmeler yapıldı.

Sonuçlar ACE D/I polimorfizminin inme ile ilişkili olmadığını gösterirken, eNOS geni polimorfizmi, inmeli hasta grubunda hasta yakınları ve kontrollere göre AA genotipinin oldukça yüksek oluşu ile, inme için risk faktörü olarak kabul edilebileceğini düşündürmektedir.

ABSTRACT:

The etiology of ischemic stroke is multifactorial. There are strong evidence that stroke is a genetic disorder. Both epidemiologic and animal studies show that identification of stroke risk genes in human is not easy. There are some researches about the polimorphism of angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase genes in the different racial groups of stroke patients.

The aim of this study is to investigate whether the polymorphism in ACE and e NOS genes is an independent risc factors for ischemic stroke, both for the patients and for their first degree relatives.

A total of 119 stroke patients, their 88 first degree relatives and 200 control enrolled in this study. The genotypes, the frequency of alleles of ACE and e Nos genes were investigated for patients, relatives and controls. Allele frequencies were compared using the X^2 analysis. OR and 95% CI were also calculated.

No significant association was observed between the polimorphism of both ACE and e NOS genes for the risk of ischemic stroke, but the e NOS A allele in intron 4 may be an independent risc factor for ischemic stroke in the Turkish population.

KAYNAKLAR:

1. Liado D, Meyers R, Hunt S et al. Familial history of stroke and stroke risk. The Family Heart Study. *Stroke* 1997; 28:1908-1912
2. Graffagnino C, Gasecki AP, Doig GS, Hachinski VC. The importance of family history in cerebrovascular disease. *Stroke* 1994;24:1599-1604
3. Rastenyte D, Tuomilehto J, Sarti C. Genetics of stroke. *J Neurol Sci* 1998;153:132-145
4. Brass LM, Isaacsohn JL, Merikangas KR, Robinette CD. A study of twins and stroke. *Stroke* 1992;23:221,223
5. Schievink WI, Parisi JE, Piepgras DG. Familial intracranial aneurysms: an autopsy study. *Neurosurgery* 1997;41:1247-1251
6. Schievink WI. Genetics of intracranial aneurysms. *Neurosurgery* 1997;40:651-662.
7. Ronkainen A, Hernesniemi J, Puranen M et al. Familial intracranial aneurysms. *Lancet* 1997;349:380-384
8. Watkins PC, Eddy R, Fukushima Y et al. The gene for protein S maps near the centromere of human chromosome 3. *Blood* 1988;71:238-241.
9. Bertina RM, Koegelman BP, Koster T et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67
10. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous factor V Leiden. *Blood* 1995;85:1504-1508
11. Levine SR, Welch KM. The spectrum of neurologic disease associated with antiphospholipid antibodies. Lupus anticoagulants and anticardiolipin antibodies. *Arc Neurol* 1987;44:876-883
12. Lee B, Vitale E, Superti-Furga A, Steinmann B, Ramirez F. G to T transversion at position +5 of a splice donor site causes skipping of the preceding exon in the type III procollagen transcripts of a patient with Ehler-Danlos Syndrome type IV. *J Biol Chem* 1991;266:5256-5259.
13. Kainulainen K, Pulkkinen L, Savolainen A, Kaitila I, Peltonen L. Location on chromosome 15 of defect causing Marfan Syndrome. *N Engl J Med* 1990;323:935-939
14. Gutman DH, Collins FS. The neurofibromatosis type I gene and its protein product, neurofibromin. *Neuron* 1993;10:335-343

15. Schienink WI, Torres VE, Piepgras DG, Wiebers DO. Saccular intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1992;3:88-95
16. Pannier-Moreau I, Grimbert P, Fiquet-Kempf B et al. Possible familial origin of multifocal renal artery fibromuscular dysplasia. *J.Hypertens* 1997;15(12 Pt 2):1797-1801
17. Yamauchi T, Tada M, Houkin K, et al. Linkage of familial moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis) to chromosome 17q25. *Stroke* 2000;31:930-935
18. Ooiwa Y, Uematsu Y, Terada T, et al. Cerebral blood flow in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. *Stroke* 1993;24:304-309
19. Kostulas K, Crisby M, Huang WX, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in ischemic stroke and in carotid artery stenosis. *Eur J Clin Invest* 1998;28:285-289
20. Tournier-Lasserre E, Iba-Zizen MT, Romero N, Bousser MG. Autosomal dominant syndrome with stroke like episodes and leukoencephalopathy. *Stroke* 1991; 22:1297-1302
21. Nicol JA, Burnett C, Love S, et al. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1997;41:716-721
22. McCarron MO, DeLong D, Alberts MJ. APOE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease. *Neurology* 1999; 53(6): 1308-11.
23. Polymeropoulos MH, Hurko O, Hsu F et al. Linkage of the locus for cerebral cavernous hemangiomas to human chromosome 7q in four families of Mexican-American descent. *Neurology* 1997;48:752-757
24. Amin-Hanjani S, Robertson R, Arginteanu MS, Scott RM. Familial intracranial arteriovenous malformations. *Pediatric Neurosurg* 1998;29:208-213
25. Kojima M, Nagasawa S, Lee YE et al. Asymptomatic familial cerebral aneurysms. *Neurosurgery* 1998; 43:776-781

26. Regerson F, Schlawe I, Paxinos G, Chai SY, McKinley MJ, Mendelson FAO. Localisation of angiotensin converting enzyme by invitro autoradiography in the rabbit brain. *J Chem Neuroanat.* 1995;8:227-243
27. Hadju MA, Heistad DD, Baumbach GL. Effects of antihypertensive therapy on mechanics of cerebral arterioles in rats. *Hypertension* 1991;17:308-316
28. Van Swieten JC, Van Den Hout JHW, Van Ketel BA, Hijdra A, Wokke JHJ, Van Gijn J. Periventricular lesions in the white matter on magnetic resonance imaging in the elderly: a morphometric correlation with arteriosclerosis and dilated perivascular spaces. *Brain* 1991;114:761-774
29. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Soubrier F. An insertion /deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86:1343-1346
30. Markus HS, Barley J, Lunt R, Bland JM, Jeffery S, Carter ND, Brown MM. Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism: a new risk factor for lacunar stroke but not carotid atheroma. *Stroke* 1995;26:1329-1333
31. Kario K, Kanai N, Saito K, Nago N, Matsuo T, Shimada K. Ischemic stroke and the gene for angiotensin converting enzyme in Japanese hypertensives. *Circulation.* 1996;93:1630-1633
32. Zee R, Ridker PM, Stampfer MJ, Hennekens CH, Lindpaintner K. Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. *Circulation* 1999;99:340-343
33. Dessi Fulgheri P, Catalini R, Sarzani R, Sturbini S, Siragusa N, Guazzarotti F, Offidani M, Tamburrini P, Zingarretti O, Rapelli A. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid atherosclerosis in a low-risk population. *J Hypertens* 1995;13:1593-1596
34. Castellano M, Muiesan ML, Rizzoni D, Beschi M, Pasini G, Cinelli A, Savletti M, Porteri E, Bettoni G, Kreutz R, Lindpaintner K, Rosei EA . Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a large population:the Vobarno Study. *Circulation* 1995;91:2721-2724
35. Mannami T, Katsuya T, Baba S, Inamoto N, Ishikawa K, Higaki J, Ogihara T, Ogata J. Low potentially of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion

- polymorphism as a useful predictive marker for carotid atherogenesis in a large general population of a Japanese City. *Stroke* 2001;32:1250-1256
36. Takami S, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, Satoh H, Hisamichi S, Higaki S, Ogihara T. Gene polymorphism of the renin-angiotensin system associates with risk for lacunar infarction. The Ohasama study. *Am J Hypertens* 2000;13(2):121-127
37. Zhang X, Wang D, Xu L, Ma Y, Zhang S. Association between renin-angiotensin system gene polymorphism and type 2 diabetics with stroke in China. *Zhonghua Yi xue Yi Chuan XueZaZhi* 2001;18(6):462-466 Medline (abstract) www. <http://home.mdconsult.com/das/journal/view/20684054/N/12195264?sid=118006542&source=MI>
38. Sierra C, Coca A, Gomez –Angelats E, Poch E, Sobrino J, de la Sierra A. Renin-angiotensin system genetic polymorphism and cerebral white matter lesions in essential hypertension. *Hypertension* 2002;39(2Pt 2):343-347
39. Hassan A, Lansbury A, Catto AJ, Guthrie A, Spencer J, Craven C, Grant PJ, Bamford JM. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion genotype is associated with leukoaraiosis in lacunar syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72(3):343-346
40. Peterlin B, Milanez T, Kobal J, Peterlin-Potisk K, Petrovic D, Grad A, Pogacnik T. Dd Genotype of the angiotensin-converting enzyme gene and stroke in slovenian population. *Pflugers Arch* 2000; 493(3 Suppl): R38-39 Medline(abstract) www. <http://home.mdconsult.com/das/journal/view/20684054/N/11207173?sid=118006775&source=MI>
41. Lin JJ, Yueh KC, Lin GY, Chang DC, Chang CY, Shieh HL, Harn HJ. Lack of association between angiotensin I-converting enzyme gene deletion polymorphism and cerebrovascular disease in Taiwanese. *J Formos Med Assoc* 2000;99(12):895-901 Medline(abstract)www. <http://home.mdconsult.com/das/journal/view/20684054/N/11657933?sid=118007085&source=MI>
42. del Ser T, Borstein B, Barba R, Cemillian C. Relationship of angiotensin-converting enzyme genotype with serum triglyceride concentration in stroke patients. *Neurosci Lett* 2001;316(1):21-24

43. Ayata C, Ma JK, Meng W, Huang PL, Moskowitz MA. L-NA sensitive rCBF augmentation during vibrissal stimulation in type III nitric-oxide synthase mutant mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:539-541
44. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;2:1057-1058
45. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localisation of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993;268:17478-17488
46. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Parsons A, Hooper RV, Trutwein D, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the nitric oxide synthase gene is a risk factor for coronary atherosclerosis in the East Anglian region of the U.K. *Circulation* 1997;96:SS-3050.(Abstract)
47. Markus HS, Ruigrok Y, Ali N, Powell JF. Endothelial nitric oxide synthase exon 7 polymorphism, ischemic cerebrovascular disease, and carotid atheroma. *Stroke* 1998;29:1908-1911
48. Elbaz A, Poirier O, Moulin T, Chedru F, Cambien F, Amerenco P. Association between the Glu298Asp polymorphism in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene and brain infarction. *Stroke*; 2000;31:1634-1639
49. Hou L, MmedSci OH, Yu H, Ren Z, Zhang Z, Wang B, Harada S. Association of a 27-bp repeat polymorphism in eNOS gene with ischemic stroke in Chinese patients. *Neurology* 2001;56:490-496
50. MacLeod MJ, Dahiyat MF, Cumming A, Meiklejohn D, Shaw D, Clair DS. No association between Glu/Asp polymorphism of NOS3 gene and ischemic stroke. *Neurology* 1999;53:418-420
51. Catto A, Carter AM, Barret JH, Stickland M, Bamford J, Davies JA, Grant PJ. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and cerebrovascular disease. *Stroke* 1996;27:435-440
52. Watanabe Y, Ishigami T, Kawano Y, Umahara T, Nakamori A, Mizushima S, Hibi K, Kobayashi I, Tamura K, Ochiai H, Umemura S, Ishii M. Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and carotid plaques in Japanese. *Hypertension* 1997;30(pt 2):569-573

53. Akar N, Akar E, Cin Ş, Deda G, Avcu F, Yalçın A. Endothelial nitric oxide synthase intron 4-27 polymorphism in Turkish patients with deep vein thrombosis and cerebrovascular accidents. *Thromb.Research* 1999;94:63-64



ÖZGEÇMİŞ

Yrd.Doç.Dr.Neşe Tuncer Elmacı

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı

Tophanehoğlu cad. 81190 Altunizade/ İstanbul
Tel: 2163271040 Faks: 2163259777
E-Mail: nesetuncer@yahoo.com

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara, 25.03.1966

Eğitim:

1983-1989: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

1978-1983: Antalya Koleji

1973-1978: Özel Ayşeabla İlkokulu, Ankara

Deneyim:

1989-1991: Mezuniyet sonrası zorunlu hizmet

1989-1990: Erzurum Sosyal Sigortalar Hastanesi, Pediatri ve Enfeksiyon Hastahları
Birimleri

1990-1991: Antalya Sosyal Sigortalar Hastanesi, Dahiliye ve Acil Servis Birimleri

1992-1994: Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma
Görevlisi

1994-1999: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Araştırma
Görevlisi

1999- : İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp ve Araştırma Anabilim Dalı
Sinirbilim Bilim Dalında yüksek lisans

1999- Halen M.Ü.T.F Nöroloji A.B.D'da öğretim üyesi olarak çalışmakta

Ödüller:

1. En iyi bildiri ödülü XXXVII. Ulusal Nöroloji Kongresi Antalya, 31Ekim-4 Kasım 2001 .Kaya D, *Tuncer N*, Gürsoy-Özdemir Y, Aktan S, Dalkara T. Fare fokal serebral iskemi reperfüzyon modelinde intraserebroventriküler verilen

vasküler endotelyal büyüme faktörünün iskemi ve apoptotik hücre ölümüne etkisi.

2. 34.Ulusal Nöroloji Kongresi Bursa, 1998 En iyi bildiri ödülü. Aykut-Bingöl C., Tuncer N., Dizdar H., Ekicioğlu G., Yeğen B., Aktan S. Kortikal displazi modelinde önbeyin ve hipokampal yapıların etkilenimi
3. XII. Uluslararası katılımlı Biyokimya Kongresi Çalışma Ödülü. Özben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Glomerüler bazal membran hasarının göstergesi olarak sialik asidüri.

Üyelikler:

Türk Tabipler Birliği
Türk Epilepsi Derneği
Türk Nöroloji Derneği
Beyin-Damar Hastalıkları Derneği
Mediterranean Stroke Society
American Academy of Neurology

Uzmanlık Tezi: Kainik Asitle Oluşturulan Epilepsi Modelinde Glial Reorganizasyonun İmmünohistokimyasal Olarak Gösterilmesi İstanbul, 1999