

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**PREEKLAMPSİ HASTALARINDA İNTERLÖKİN 10 GENİ PROMOTOR
(2849 A-G) VE ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM GENİ İNTRON 16
İNSERSİYON/DELESYON POLİMORFİZMLERİNİN VE GENOTİP
DAĞILIMLARININ ARAŞTIRILMASI**

Ceyhun BEREKETOĐLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Mülkiye KASAP

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
TF2009YL24 no'lu proje olarak desteklenmiştir.**

Tez No:

ADANA-2010

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Preeklampsi Hastalarında İnterlökin 10 Geni Promotor (2849 A-G) ve Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Geni İntron 16 İnsersiyon/Delesyon Polimorfizmlerinin ve Genotip Dağılımlarının Araştırılması” adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mülkiye KASAP
Çukurova Üniversitesi
Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD
Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Fatma Tuncay ÖZGÜKEN
Çukurova Üniversitesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD
Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Ayfer PAZARBAŞI
Çukurova Üniversitesi
Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD
Öğretim Üyesi

Yukarıdaki tez, yönetim kurulununtarih vesayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil KASAP

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve çalışmamın her aşamasında beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Mülkiye KASAP'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazımında her türlü desteklerinden dolayı Doç. Dr. Ayfer PAZARBAŞI'na, Dr. M. Bertan YILMAZ'a, Bio. Mehmet Ali ERKOÇ'a özellikle teşekkürlerimi sunuyorum.

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Fatma Tuncay ÖZGÜNEN'e ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı asistanlarına ve çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca Başkent Üniversitesi Adana Araştırma ve Uygulama Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinden Doç Dr. Tayfun BAĞIŞ'a ve klinik çalışanlarına göstermiş oldukları yardımlardan dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

İstatistik uygulamalarımda yardımcı olan Ç.Ü. Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Z. Nazan ALPARSLAN'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TF2009YL24 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Son olarak manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili anneme, babama, abilerim, ablalarım ve arkadaşım Müge Turunç'a sonsuz sevgilerimi iletiyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Preeklampsisi	3
2.1.1. Preeklampsinin Tarihçesi	3
2.1.2. Preeklampsinin Tanımı ve Sınıflandırılması	3
2.1.3. İnsidans, Prevalans, Mortalite ve Morbidite	5
2.1.4. Risk Faktörleri	6
2.1.5. Preeklampsinin Tedavisi	7
2.1.6. Preeklampsinin Etiyolojisi ve Patofizyolojisi	8
2.2. Sitokinler	11
2.2.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri	11
2.2.2. Sitokinlerin Etki Mekanizmaları	12
2.2.3. Sitokinlerin Sınıflandırılması ve İşlevleri	12
2.2.4. İnterlökin 10 (IL-10)	13
2.3. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) ve Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS)	14
2.3.1. ADE'nin Biyokimyası	15
2.3.2. ADE'nin Homologları ve Genetiği	16
2.4. Preeklampsisi Genetiği	16
2.4.1. Aile Çalışmaları	16
2.4.2. İkiz Çalışmaları	18
2.4.3. Fetüsteki Genetik Aberasyon	19

2.4.4. Paternal Genotipin Katkısı	19
2.4.5. Paterniti ve Gebelik Aralığındaki Değişiklik	20
2.4.6. Aday Gen Çalışmaları	20
2.4.7. Kapsamlı Genom Taramaları	22
2.4.8. Genetik Polimorfizmler	25
2.4.8.1. IL-10 Geni Polimorfizmleri	25
2.4.8.2. ADE Geni İntron 16 İnsersiyon/Delesyon Polimorfizmleri	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Araç ve Gereçler	28
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	28
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler	29
3.2. Kan Örneklerinin Sağlanması	29
3.2.1. Hasta Rızası	30
3.3. Yöntem	30
3.3.1. Periferik Kandan DNA Eldesi	30
3.3.2. Agaroze Jelin Hazırlanması	31
3.3.3. Örneklerin Agaroze Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi	32
3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) Yönteminin Uygulanması	32
3.3.4.1. IL-10 Geni 2849 Promotor Bölgesi için PZR Yönteminin Uygulanması	33
3.3.4.2. ADE Geni İntron 16/Ekzon 17 İnsersiyon/Delesyon Polimorfizmi için PZR Yönteminin Uygulanması	34
3.3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) Yönteminin Uygulanması	37
3.3.5.1. IL-10 Geni 2849 Promotor Polimorfizminin Belirlenmesi için PZR Ürünlerinin AlwI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	38
3.3.6. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi	38
3.4. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1. Preeklampsi ile İlgili Genel Kriterler	40
4.2. Moleküler Genetik Analizleri	41
4.2.1. IL-10 Geni 2849 Promotor Polimorfizmi için Genetik Analizler	41

4.2.2. ADE Geni İtron 16 I/D Polimorfizmi için Genetik Analizler	48
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	61
7. KAYNAKLAR	63
EKLER	70
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Preeklampsi patofizyolojisi için öne sürülen mekanizmalar	9
Şekil 2.2.	Renin anjiyotensin sistemi ve anjiyotensin dönüştürücü enzimin rolü	15
Şekil 4.1.	Bazı hastaların PZR yöntemi ile çoğaltılan IL-10 2849 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri. M: marker DNA'lar, B: blank, Bantlar 590 bp büyüklüğündedir	41
Şekil 4.2.	Bazı hasta ve kontrollerin PZR yöntemi ile çoğaltılan IL-10 2849 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri. M: marker DNA, B: blank (K ile belirtilenler kontrolleri göstermektedir)	42
Şekil 4.3.	Bazı hasta ve kontrollerin RFLP yöntemi ile AlwI restriksiyon enzimi kesim bantlarının poliakrilamid jel görüntüsü. M: marker DNA, PZR: polimeraz zincir reaksiyon ürünü (K ile belirtilenler kontrolleri göstermektedir)	43
Şekil 4.4.	Şekil 4.3'teki bazı hasta ve kontrollere ait agaroz jel görüntüsü ve genotip dağılımı. M: marker DNA (K ile belirtilenler kontrolleri göstermektedir)	43
Şekil 4.5.	Bazı hasta ve kontrollerin RFLP yöntemi ile AlwI restriksiyon enzimi kesim bantlarının poliakrilamid jel görüntüsü. M: marker DNA, PZR: polimeraz zincir reaksiyon ürünü	44
Şekil 4.6.	Şekil 4.5'teki bazı hasta ve kontrollere ait agaroz jel görüntüsü ve genotip dağılımı. M: marker DNA (K ile belirtilenler kontrolleri göstermektedir).	44
Şekil 4.7.	Bazı hasta ve kontrollerin RFLP yöntemi ile AlwI restriksiyon enzimi kesim bantlarının poliakrilamid jel görüntüsü. M: marker DNA, PZR: polimeraz zincir reaksiyon ürünü (K ile belirtilenler kontrolleri göstermektedir)	45
Şekil 4.8.	Bazı hasta ve kontrollerin RFLP yöntemi ile AlwI restriksiyon enzimi kesim bantlarının agaroz jel görüntüsü ve genotip dağılımı. M: marker DNA (K ile belirtilenler kontrolleri göstermektedir)	45
Şekil 4.9.	Bazı hastaların ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon	49

polimorfizmi PZR 1 agaroz jel görüntüsü. M: marker DNA,
B: blank.

- Şekil 4.10.** Bazı hasta ve kontrollerin ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon 49
polimorfizmi PR 1 agaroz jel görüntüsü. M; marker DNA, B;
blank (K ile belirtilenler kontrolleri göstermektedir)
- Şekil 4.11.** Bazı hasta ve kontrollerin ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon 50
polimorfizmi PZR 1 agaroz jel görüntüsü. M; marker DNA,
B; blank
- Şekil 4.12.** Bazı hasta ve kontrollerin ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon 51
polimorfizmi PZR 1 agaroz jel görüntüsü. M: marker DNA (K ile
belirtilenler kontrolleri göstermektedir)
- Şekil 4.13.** Bazı hasta ve kontrollerin ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon 51
polimorfizmi PZR 2 agaroz jel görüntüsü. M: marker DNA, B:
blank (K ile belirtilenler kontrolleri göstermektedir)

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Gebeliklerde ortaya çıkan hipertansif bozuklukların tanı kriterleri ve sınıflandırılması	4
Çizelge 2.2.	Preeklampsi için risk faktörleri	7
Çizelge 2.3.	Sitokinlerin işlevlerine göre sınıflandırılması	13
Çizelge 2.4.	Aile çalışmaları	17
Çizelge 2.5.	Preeklampside belirlenmiş olan aday genler (en az bir çalışmada onaylanmış)	22
Çizelge 2.6.	Preeklampsi için kapsamlı genom çalışmaları	24
Çizelge 2.7.	ADE geni üzerindeki polimorfik bölgeler	26
Çizelge 3.1.	IL-10 geninin 2849 promotor bölgesi amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri	33
Çizelge 3.2.	IL-10 geni 2849 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları	34
Çizelge 3.3.	IL-10 geni 2849 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri	34
Çizelge 3.4.	ADE geni intron 16 bölgesi amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri	35
Çizelge 3.5.	ADE geni intron 16 bölgesi PZR 1 ve PZR 2 için optimal amplifikasyonların gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları	35
Çizelge 3.6.	ADE geni intron 16 bölgesi PZR 1 ve PZR 2 için optimal amplifikasyonların gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri	36
Çizelge 3.7.	IL-10 geni 2849 promotor polimorfizmleri RFLP reaksiyon koşulları	37
Çizelge 3.8.	IL-10 geni 2849 promotor polimorfizmleri için optimal RFLP reaksiyonun gerçekleştiği RFLP programı ısı döngüleri	37
Çizelge 4.1.	Hasta ve kontrol grubunun klinik özellikleri ve ortalamaları	40
Çizelge 4.2.	Hastaların IL-10 geni 2849 promotor bölgesi için AlwI enzimi kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri	46
Çizelge 4.3.	Kontrollerin IL-10 geni 2849 promotor bölgesi için AlwI enzimi	47

	kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri	
Çizelge 4.4.	Hasta ve kontrol gruplarının IL-10 geni 2849 promotor bölgesi için genotip dağılımları ve allel frekansları	48
Çizelge 4.5.	Hastaların ADE geni intron 16 bölgesi insersiyon/delesyon polimorfizmlerine göre genotipleri	52
Çizelge 4.6.	Kontrollerin ADE geni intron 16 bölgesi insersiyon/delesyon polimorfizmlerine göre genotipleri	53
Çizelge 4.7.	Hasta ve kontrol gruplarının ADE geni intron 16 bölgesi için genotip dağılımları ve allel frekansları	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AGT	Anjiyotensinojen
AGTR2	Anjiyotensinojen 2 Reseptörü
APS	Amonyum Persülfat
ASSHP	Australasian Society for the Study Hypertension in Pregnancy
bç	Baz Çifti
BMI	Vücut Kitle İndeksi
°C	Santigrat Derece
D	Delesyon
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotit Tri Fosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
eNOS3	Endoteliyal Nitrik Oksit Sentetaz 3
EtBr	Etidyum Bromür
F5	Faktör 5 Leiden
g	Gram
G-CSF	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
Gm-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GOPEC	Preeklampsi Genetiği Birliği
I	İnsersiyon
IFN	Interferon
IFN-γ	İnterferon Gama
Ig E	İmmünoglobulin E
IL-1	İnterlökin 1
IL-1β	İnterlökin 1 Beta
IL-2	İnterlökin 2
IL-3	İnterlökin 3
IL-4	İnterlökin 4
IL-5	İnterlökin 5

IL-6	İnterlökin 6
IL-7	İnterlökin 7
IL-8	İnterlökin 8
IL-9	İnterlökin 9
IL-10	İnterlökin 10
IL-11	İnterlökin 11
IL-12	İnterlökin 12
kb	Kilobaz
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmHg	Milimetre Civa
MTHFR	Metilentetrahidrofolat Redüktaz
M-CSF	Monosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
NaCl	Sodyum Klorür
ng	Nanogram
NHBPEP	National High Blood Pressure Education Program
OD	Otozomal Dominant
OR	Otozomal Resesif
PEE1	Preeklampsi, Eklampsi Geni 1
PEE2	Preeklampsi, Eklampsi Geni 2
PEE3	Preeklampsi, Eklampsi Geni 3
PLGF	Plasental Büyüme Faktörü
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAS	Renin Anjiyotensin Sistemi
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
sADE	Somatik Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Tek Nükleotit Değişikliği
sn	Saniye
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
TEMED	Tetrametilendiamin
TGF- β	Transforming Büyüme Faktörü Beta
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
μl	Mikrolitre

ÖZET

Preeklampsi Hastalarında İnterlökin 10 Geni Promotor (2849 A-G) ve Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Geni İntron 16 İnsersiyon/Delesyon Polimorfizmlerinin ve Genotip Dağılımlarının Araştırılması

Preeklampsi, patofizyolojisinde plasental, maternal, immün ve genetik faktörlerin önemli rol oynadığı düşünülen, hipertansiyon ve proteinüri ile karakterize multifaktöriyel bir hastalıktır. Preeklampsi oluşumunu birçok çevresel faktör yanında genetik yapının da etkilediği ve birçok aday genin varlığı rapor edilmiştir. Ancak bu genlerin birbirleri ve çevresel etkenlerle olan etkileşimleri ile preeklampsi üzerine olan etkileri halen anlaşılmış değildir.

Bu çalışmada, 126 preeklampitik ve 116 normal gebe kadın, preeklampsi ile interlökin-10 (IL-10) 2849 promotor ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) geni intron 16 insersiyon/delesyon (I/D) polimorfizmleri arasındaki ilişki bakımından araştırılmıştır. Ayrıca çalışmamızda bu polimorfizmlere ait genotip ve allel frekanslarının normal ve preeklampitik olgulardaki dağılımı incelenmiştir.

Çalışma sonuçlarımıza göre preeklampitik ve normal gebe kadınlar genotip frekansları bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark belirlenmiştir. IL-10 geni 2849 promotor polimorfizmi bakımından preeklampitik kadınlarda; AA genotipine sahip olguların normal gebe kadınlardan daha yüksek olduğu saptanmış ($p=0,030$), GG genotipi ile preeklampsi arasında ise bir ilişki saptanamamıştır. ADE geni I/D polimorfizminde kodominant, dominant ve resesif modeller uygulanmış ve kodominant modeli bakımından preeklampitik kadınlarda; DD genotipine sahip olguların normal gebe kadınlardan daha yüksek olduğu saptanmış ($p=0,016$), ancak II genotipi ile preeklampsi arasında bir ilişki saptanamamıştır. Dominant modelde de (DD, II+DI) DD genotipi ile preeklampsi arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0,006$). Resesif modelde ise II genotipi ile preeklampsi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p=0,977$). IL-10 geni 2849 promotor polimorfizmi için, G allel frekansı hasta grubunda %85.7 bulunurken kontrol grubunda %87.5 olarak ($p=0,564$), ADE geni I/D polimorfizmi için D alleli hasta grubunda %64.6 bulunurken kontrol grubunda %56.1 olarak bulunmuştur ($p=0,062$). Preeklampitik ve normal gebe kadınlar allel frekansları bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark belirlenememiştir.

Anahtar Sözcükler: Preeklampsi, İnterlökin 10 Geni, Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Geni, Polimorfizm, Promotor

ABSTRACT

Studies on Interleukin 10 Gene Promoter (2849 A-G) and Angiotensin Converting Enzyme Intron 16 Insertion/Deletion Polymorphisms and Genotype Distributions in Preeclampsia Patients

Preeclampsia is a multifactorial disease characterized by hypertension and proteinuria. Placental, maternal, immune and genetic factors are thought to play an important role in its pathophysiology. Besides, the relation between preeclampsia and many environmental factors also genetic structures which affect the onset of preeclampsia was analyzed and the existence of many candidate genes was reported. However, the effect of these genes on preeclampsia, the interaction with each other and environmental factors remains to be unclear.

In this study, 126 preeclamptic and 116 normotensive pregnant women was researched in terms of the relationship between preeclampsia and interleukin-10 (IL-10) gene 2849 promotor and angiotensin converting enzyme (ACE) gene intron 16 insertion/deletion (I/D) polymorphisms. Moreover, the distribution of genotype and allele frequencies belonging to these polymorphisms in normal and preeclamptic women was also evaluated.

According to our results, there was significant difference in terms of genotype and allele frequencies between preeclamptic and normotensive pregnant women. For IL-10 gene 2849 promotor polymorphism, AA genotype was found significantly higher in preeclamptic women than normotensive pregnant women ($p=0,030$), but there was no relation between GG genotype and preeclampsia. Codominant, dominant and recessive models were applied in ACE gene I/D polymorphism and for codominant model, DD genotype was found significantly higher in preeclamptic women than normotensive pregnant women ($p=0,016$), but there was no relation between II genotype and preeclampsia. In dominant model (DD, II+DI) again there is a significant relation between DD genotype and preeclampsia ($p=0,006$) but no relation in recessives ($p=0,977$). For IL-10 gene 2849 promotor polymorphism, G allele frequency was 85.7% in preeclamptic group while it was 87.5% in controls ($p=0,564$). For ACE gene intron 16 I/D polymorphism, D allele frequency was 64.6% in patients while it was 56.1% in controls ($p=0,062$). There is no significant difference between preeclamptic and normotensive pregnant women considering the allele frequency.

Key Words: Preeclampsia, Interleukin 10 Gene, Angiotensin Converting Enzyme Gene, Polymorphism, Promotor

1. GİRİŞ

Preeklampsia, gebelikte ortaya çıkan hipertansiyona eşlik eden proteinüri ve ödem ile seyreden bir hastalıktır. Perinatal mortalite ve morbiditenin aynı zamanda da maternal mortalitenin en önemli sebeplerinden birini oluşturur¹⁻⁸. Gebeliğin 20. haftasından sonra ortaya çıkıp doğumla birlikte ortadan kalkar. En uygun tedavi gebeliğin sona ermesiyle olur^{4,9}. Tüm gebelikleri %3-5'inde görülür⁵.

Preeklampsia tanısının konulmasında ASSHP (Australasian Society for the Study of Hypertension in Pregnancy) ve NHBPEP (National High Blood Pressure Education Program) kriterleri kullanılmaktadır. Preeklampsia için yüksek risk grubunu; primigravida, çok genç veya ileri yaş, diyabet veya hipertansiyon gibi sistemik hastalıklara sahip olma ve önceki gebelikteki preeklampsia öyküsü oluşturmaktadır¹⁰.

Preeklampsinin etiyolojisi ve patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Teoriler hastalığı olarak adlandırılmaktadır. Son yıllarda, yüksek kan basıncı yerine sendromun tümüne dikkat çekilmesiyle hastalığın patofizyolojisinin anlaşılmasında önemli gelişmeler elde edilmektedir. Preeklampsia patofizyolojisinin temelinde plasental ve maternal faktörlerin yer aldığı bilinmektedir. Damar endotel hasarı, kronik hipertansiyon gibi plasental ve maternal faktörlerin preeklampside önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Preeklampsie sebep olan plasental ve maternal faktörler arasındaki dengenin farklı gebeliklerde farklı olduğu ihtimali göz önünde bulundurulmaktadır. Oksidatif stres, hem plasental ve hem de maternal faktörlerin her ikisinde yer alan preeklampsia patofizyolojisinin bir bileşenidir. Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda immün ve genetik faktörler üzerinde de yoğun bir şekilde durulmakta ve bu faktörlerin preeklampsinin ardında yatan faktörlerin başında yer alabileceği düşünülmektedir. Genetik faktörler, insan hastalıklarının neredeyse tümünde etkilidir ve hastalıkta genetik faktörlerin oynadığı rolün anlaşılması genetik olmayan, çevresel faktörlerin de anlaşılmasını sağlamaktadır. Bu durumun doğası gereği preeklampsinin genetik araştırmasında ortaya çıkan engellere rağmen, bu alanda kayda değer gelişmeler sağlanmaktadır. Preeklampsinin genetik temelini anlaşılmasında aile çalışmaları, ikiz çalışmaları, fetüsteki genetik aberasyonun etkisi, paternal genotipin katkısı, paterniti ve gebelik aralığındaki değişiklik ve preeklampsideki moleküler genetik çalışmalar üzerine yoğunlaşmıştır^{5,8}.

Preeklampsinin oluşumunun ardında yatan genetik faktörlerin araştırılmasında şu ana kadar 50'den fazla gen araştırılmış ve bunlardan 8'inin aday gen olabileceği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda preeklampi ile bu genlerdeki değişiklikler arasında %70 gibi bir bağlantı elde edilmiştir. Ancak sonuçların birbirleriyle çelişkili olmasından dolayı şu ana kadar bu hastalıkla tam olarak ilişkilendirilmiş bir gen mevcut değildir. Ayrıca bu aday genler içerisinde çeşitli bölgelerde farklı polimorfizm tiplerinde yapılan araştırmalarda da evrensel bir sonuca varılamamıştır¹⁰⁻¹⁴.

Başarılı bir gebelik annenin genetik olarak kararlı bir savunma mekanizmasına bağlıdır. Savunma sisteminde rol alan sitokinlerden birisi de interlökin-10 (IL-10)'dur. IL-10 geninin promotor bölgesindeki genetik çeşitliliğin (polimorfizmlerin) preeklampsi ile sonuçlanan anormal plasantasyon ile ilişkilendirilen maternal savunma mekanizmasındaki belirleyici faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir. Bu kapsamda IL-10 geninin farklı promotor bölgelerinde çeşitli polimorfizmler araştırılarak IL-10 geni preeklampsi ile ilişkilendirilmeye çalışılmış, promotor bölgelerinin çeşitli noktalarında farklı toplumlarda farklı sonuçlar elde edilmiştir^{15, 16}.

Gebelik süresince spiral arterlerin fizyolojik olarak yeniden oluşumu renin anjiyotensin sistemi (RAS) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Gebelikteki fizyolojik adaptif mekanizmada, vasküler direnç ve kan basıncı azalır, plazma volümü yükselir ve RAS stimüle edilir. Preeklampitik kadınlarda farklı olarak vasküler direnç artar ve renin ve anjiyotensin II'nin plazma seviyesi düşer. Bundan dolayı plasental RAS'taki bozukluk preeklampsi ile sonuçlanabilir. Peptidil karboksipeptidaz olan anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE), kan basıncını düzenleyen RAS sisteminin önemli bir enzimi olup anjiyotensin I'in potansiyel vazokonstriktör olan anjiyotensin II'ye dönüşümünü katalizler. Vazokonstriksiyon etkisi olan ADE'nin yüksek aktivitesi hipertansiyona sebep olur. Bu kapsamda, ADE geni intron 16'daki insersiyon/delesyon polimorfizmi çeşitli çalışmalarda preeklampsi ve hipertansiyon ile ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Delesyon (D alleli) polimorfizminin yüksek ADE aktivitesi ile ilişkili olduğu ve D allelinin preeklampsi için yüksek risk oluşturduğu düşünülmektedir¹⁷⁻²⁰.

Bu çalışmada preeklampsi tanısı konmuş Türk kadınları IL-10 geninin promotor bölgesindeki 2849 A/G ve ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon polimorfizmleri ve genetik dağılımlarının Çukurova bölgesindeki durumu incelenerek ulusal literatürdeki boşluğun doldurulması ve uluslar arası literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. PREEKLAMPSİ

2.1.1. Preeklampsinin Tarihçesi

Scott ve Jenkins'in preeklampsinin etiyolojisi adlı derlemesine göre Hipokrat uyku, nöbet ve komanın gebe kadınlarda ciddi prognostik öneme sahip olduğunu belirtmiş ve 1619'da Varandaeus gebe kadınların nöbet öncesi şikayetleri için Yunan terimi olan "eklampsi" yi kullanmıştır²¹. Ancak, 1739'a kadar eklampsi epilepsiden tam olarak ayırt edilememiştir. Sauvages yıllar boyunca tekrarlayan nöbetler sonucu oluşan epilepsinin kronik bir hastalık olduğunu belirtmiş, fakat akut kökenli nöbetlere eklampsi adını vermiştir⁶. 1843'te Lever eklamptiklerde albuminüri görüldüğünü ve nöbet öncesinde hipertansiyon ve bazen de ödem olduğunu rapor etmiştir. Böylece preeklampsi sendromu tanımlanmıştır²¹. Preeklampsi alanında yapılan çalışmalar, ilk kez 1968'de Chesley tarafından özetlenmiştir¹⁰.

2.1.2. Preeklampsinin Tanımı ve Sınıflandırılması

Preeklampsiye ait evrensel bir tanım ve gebeliğe bağlı hipertansif bozukluklara ait evrensel bir sınıflandırma yoktur. Yıllar boyunca yayınlanmış çalışmalarda çeşitli terminoloji ve tanı kriterleri kullanılmıştır²². Son zamanlarda, uluslar arası birçok tanım yapıldığı görülmüştür²³. Gebeliğe bağlı hipertansiyon çalışmalarında, sınıflandırma ve tanımlar için yaygın olarak kullanılan raporlar ASSHP (Australasian Society for the Study of Hypertension in Pregnancy) ve NHBPEP (National High Blood Pressure Education Program)' den alınmıştır. Gebelikteki hipertansiyon tanımları her iki raporda da aynıdır; gebeliğin 20. haftasından itibaren sistolik kan basıncı ≥ 140 mmHg ve diastolik kan basıncı ≥ 90 mmHg'dir^{24, 25}.

Gebelik süresince ortaya çıkan hipertansif bozukluklar 5 kategori altında toplanmıştır; preeklampsi, eklampsi, gestasyonel hipertansiyon, kronik hipertansiyon ve süperempoze preeklampsi (Çizelge 2.1)²⁵.

Çizelge 2.1. Gebeliklerde ortaya çıkan hipertansif bozuklukların tanı kriterleri ve sınıflandırılması

Sınıflandırma	Tanı Kriteri
Gestasyonel Hipertansiyon	Normotensif bir kadında gebeliğin 20. haftasından sonra: - Sistolik kan basıncı ≥ 140 mmHg - Diastolik kan basıncı ≥ 90 mmHg
Preeklampsi	Normal kan basıncına sahip kadında gebeliğin 20. haftasından sonra: - Sistolik kan basıncı ≥ 140 mmHg - Diastolik kan basıncı ≥ 90 mmHg Proteinüri: 24 saatlik idrar örneğinde protein $\geq 0,3$ g/L olması
Kronik Hipertansiyon	Gebeliğin 20. haftasından önce ortaya çıkan ve/veya doğumdan 6 hafta sonrasına kadar devam eden hipertansiyon
Süperempoze Preeklampsi	Kronik hipertansiyona gebelik döneminde proteinürinin eklenmesi
Eklampsi	Preeklampsi olan kadında epilepsi v.b. sebeplere dayanmayan nöbet ve koma gelişimi

Preeklampsi, hipertansiyon ve proteinürinin kombinasyonu olarak tanımlanmıştır. Hipertansiyon ve proteinüriye bazen de ödem eşlik edebilir. Gebeliğin 20. haftasından sonra, daha önce normal kan basıncı ölçüleri olan kadında en az 6 saat ara ile yapılan iki ölçümde sistolik kan basıncının 140 mmHg ve üzeri ve diastolik kan basıncının 90 mmHg ve üzerinde ölçülmesi ve bunun yanı sıra 24 saatlik idrar ölçümünde 300mg/L ve üzeri protein saptanması veya 6 saatlik arayla rasgele alınan en az 2 idrar örneğinde +1 veya daha yüksek proteinüri olması preeklampsinin varlığına kanıttır. Ayrıca sınıflandırmada preeklampsi hafif ve şiddetli preeklampsi olarak altgruplara ayrılmıştır. Şiddetli preeklampsi, sistolik kan basıncının 160 mmHg ve üzeri ve diastolik kan basıncının 110 mmHg ve üzeri ölçülmesi ve 24 saatlik idrarda protein miktarının 3g/L ve üzeri bulunması olarak tanımlanmıştır²⁵.

2.1.3. İnsidans, Prevelans, Mortalite ve Morbidite

Gebe kadınların yaklaşık %10'u doğum yapmadan önce, gebeliğin belli bir noktasında yüksek kan basıncına sahip olur. Bununla birlikte dünya genelinde gebelerin yaklaşık %3-5'inde preeklampsisi olgusu gelişir. Preeklampsisi sıklığı, gelişmekte olan ülkelerde ve toplumlar arasında farklılık göstermektedir²⁶. Örneğin; nulliplarlarda preeklampsisi insidansı beyaz kadınlarda %18 iken İspanyol asıllı kadınlarda %20 ve siyah kadınlarda % 22 olarak bulunmuştur. Yine eklampsisi sıklığının yaklaşık olarak her 2000 doğumda 1 olduğu gösterilmiştir²⁷⁻²⁹.

Preeklampsinin en şiddetli hali olan eklampsisi mortalite ile ilişkilidir ve bundan dolayı her yıl 50 000 den fazla maternal ölüm gerçekleşmektedir. Avrupa'da mortalite nadir görülür. Her 10 000 doğumda 2-3 vakada gerçekleşir. Fakat gelişmekte olan ülkelerde bu oran artar ve her 10 000 doğumda 16-69 arasındadır^{30, 31}. Gelişmekte olan ülkelerde sağlık hizmetlerinin sınırlı olması bunun muhtemel açıklamasıdır²⁶. Maternal mortalitenin düşük olduğu ülkelere ölümün çok azı eklampsisiyle ilişkiliyken, maternal mortalitenin yüksek olduğu ülkelere ise ölümün neredeyse hepsi eklampsisiyle ilişkilidir^{32,33}.

Preeklampsisi insidansı son 15 yılda %40 oranında artmıştır. Bunun sebepleri arasında dünya genelinde artan obezite hastalığı, ileri anne yaşı sayısındaki ve çoğul gebelik sıklığındaki artış gösterilebilir. Böbrek yetmezliği, kalp krizi, felç, karaciğer yetmezliği gibi şiddetli morbiditelerin hepsi preeklampsisi ve eklampsisiyle ilişkili olup etkilenmiş kadınlar mutlaka yoğun bakıma gereksinim duyarlar³². Diğer taraftan, preeklampsinin kadınlar üzerindeki psikolojik etkisi ile ilgili bazı çalışmalar da yapılmıştır. Preeklampsisi zor ve beklenmeyen bir hastalık olduğundan erken doğum ve daha da kötüsü fetal ölümlerle sonuçlanabilir. Ayrıca post-travmatik stres bozukluğu riskini de arttırabilir³³.

Düşük gebelik yaşıyla doğmuş bebeklerin %10'undan fazlası preeklampitik gebeliklerden dünyaya gelmiştir. Perinatal mortalite preeklampsisi ve eklampsiden sonra artar ve bütün neonatal ölümler ve ölü doğumların %25'i hastalıkla ilişkilidir. Bebeklerin mortalite oranları, gelişmekte olan ülkelere gelişmiş olan ülkelere karşılaştırıldığında preeklampside 3 kat eklampside 4,5 kat daha yüksektir^{32, 34}.

2.1.4. Risk Faktörleri

Preeklampsi için risk faktörleri Çizelge 2.2’de özetlenmiştir. Genç ve nullipar kadınların preeklampsi olma riski yüksektir. İlk gebeliklerini yaşayan kadınların 2. ya da daha sonraki gebeliklerini yaşayan kadınlara göre preeklampsi olma riski 3 kat daha yüksektir³⁵. Birden çok doğum yapmış kadınlar eş değiştirdiğinde preeklampsiye yakalanma riski artar. Bunun olası açıklaması preeklampside paternal antijenlere karşı immünolojik reaksiyon oluşmasıdır. Eş değişiminden kaynaklı iki gebelik arasındaki sürenin uzamasıyla da preeklampsiye eğilimin arttığı gözlenmiştir^{36, 37}.

Ayrıca, anne yaşı risk faktörü olarak dikkate alınabilir. 40 yaş üstü kadınların preeklampsiye yakalanma riski 40 yaş altı kadınlardan daha yüksektir. Bu da obezite, kronik hipertansiyon gibi yaşa bağlı risk faktörleri ile açıklanabilir. Gerçek obezite yokluğunda bile vücut kitle endeksi (BMI)’nin artışı, yüksek preeklampsi riskiyle bağlantılıdır. Diastolik kan basıncının 110 mmHg üstünde olması süperempoze preeklampsi riskini 5 kat arttırır³⁵. Preeklampsi ile ilişkilendirilmiş diğer faktörler, insülin bağımlı diyabet, renal hastalıklar, antifosfolipid sendromu ve otoimmün gibi hastalıklardır^{35, 38, 39}.

Preeklampsi prevalansı Amerika’da Afrikalı-Amerikan ırkında diğer etnik gruplara göre daha yüksektir ve preeklampsi oluşumunda etnik köken eğilimli bir faktör olabilir. Bununla birlikte kronik hipertansiyon prevalansı bu popülasyonda daha yüksektir^{9, 40}.

Preeklampsinin bireysel ve ailesel geçmişleri diğer iki risk faktörüdür. İlk gebeliğinde preeklampsi öyküsü olan kadınların, ilk gebeliğini sağlıklı atlatan kadınlarla karşılaştırıldığında ikinci gebeliğinde preeklampsiye yakalanma riskinin daha yüksek olduğu verilerle gösterilmiştir. Ayrıca, preeklampsinin ailesel geçmişinin riski 3 kat arttırdığı belirtilmiştir. İkiz gebeliklerin normal gebeliklere göre preeklampsi riskini 3’e katladığı ve üçüz gebeliklerin de ikiz gebeliklere göre preeklampsi riskini 3’e katladığı rapor edilmiştir³⁵.

Çizelge 2.2. Preeklampsi için risk faktörleri

Risk Faktörleri
Maternal yaş
Çoğul gebelik
Primigravida
Önceki gebelikte görülen preeklampsi
Preeklampside ailesel geçmiş
Vücut kitle endeksi (BMI)
İki gebelik arasındaki süre
Partner değişimi
Afrikalı-Amerikan ırkı
Önceden var olan tıbbi hastalıklar:
İnsülin bağımlı diyabet
İnsülin rezistansı
Kronik hipertansiyon
Böbrek hastalıkları
Antifosfolipid sendromu
Otoimmün hastalıklar

2.1.5. Preeklampsinin Tedavisi

Preeklampsinin etiyolojisi ve patogenezi tam olarak belli olmadığı için önlem ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi zordur. Antiplatelet ilaçların kullanımı ile ilgili olumlu sonuçlar yayınlanmış ve tedavi sonrası preeklampsi riskinin azaldığı rapor edilmiştir. Kalsiyum ilavesi de düşük preeklampsi riski ile bağlantılıdır, fakat bebek üzerine net bir etkisi yoktur. Tedavi büyük ölçüde semptomlara yöneltilmiştir. Hafif preeklampsi çoğunlukla anne bakım üniteleri, hastane ya da evde dikkatli bir gözlem ve aktivite sınırlaması ile tedavi edilebilir. Yüksek kan basıncı direkt vasküler zarara sebep olup böbrek yetmezliği, fetal distress ve felç gibi diğer komplikasyonlara yol açtığı için, çok yüksek kan basıncına sahip kadınlarda antihipertansif ilaçlar zorunludur. Magnezyum sülfatın preeklampsi kadınlarda eklampsi riskini azalttığı bilinmektedir ve

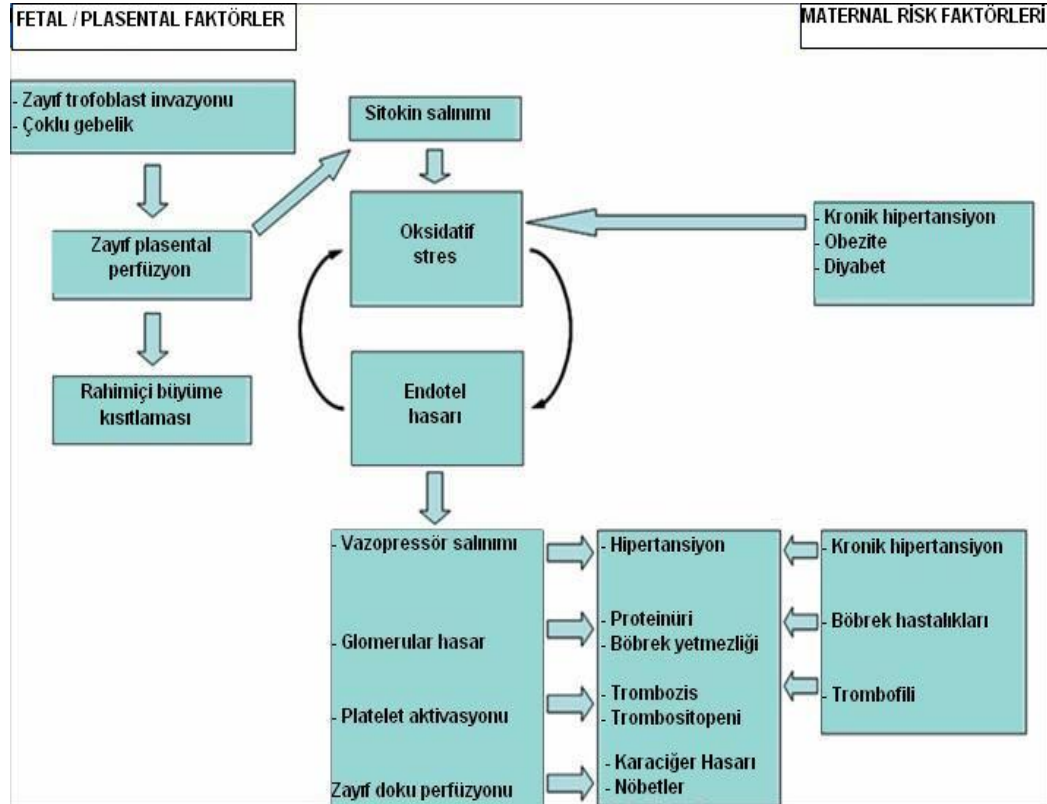
eklampsisi ilişkili nöbetleri önlemek için kullanılabilir. Şu ana kadar en etkili tedavi yöntemi plasentanın alınması ve doğumdur. Gebeliği sonlandırarak anneyi korumak ile şiddetli preeklampsiye sahip kadının zamanını ayarlayarak fetüsü en olgun seviyeye ulaştırmak arasındaki dengeyi kurmak zordur. Çünkü şiddetli preeklampside gebelik çoğunlukla 32. haftadan önce sonlandırılmalıdır^{28, 41, 42}.

2.1.6. Preeklampsinin Etiyolojisi ve Patofizyolojisi

Preeklampsisi teoriler hastalığı olarak adlandırılmaktadır. Bu alanda yapılan birçok çalışmaya rağmen sendromun etiyolojisi ve patofizyolojisi bütünüyle anlaşılamamıştır. Bununla birlikte maternal ve fetal / plasental kökenli, multisistem bir hastalık olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1). Ayrıca hem plasenta hem de maternal sistemik sirkülasyon içinde oksidatif stres önemli bir bileşen olarak belirtilmektedir (Şekil 2.1)¹⁴. Preeklampsideki çalışmaları zorlaştıran sebeplerden bazıları da preeklampsisi için belirli bir test olmaması, ortaya çıkış noktası ve gelişmesinin tahmin edilememesi ve gebeliğin sonlanmasıyla hastalığın ortadan kalkmasıdır. Bunu yanı sıra, spiral arterlerdeki yüzeysel(yetersiz) endovasküler sitotrofoblast invazyonu ve endotelyal hücre disfonksiyonu preeklampsinin patogenezinin merkezinde yer alan temel mekanizmalardan ikisi olarak görülmektedir (Şekil 2.1)⁴³.

Preeklampsinin başlangıcı, plasental ve spiral arterlerin bozulmuş ekstrasvillöz invazyonu ile gerçekleşir. Fetal trofoblastik hücreler bazal arterlerden yükselen myometriumu uterusun desidual bölgesine kadar saran spiral arter endotelini, internal elastik laminasını işgal eder. Intervillöz aralıktan myometriyumun iç kısmına kadar vasküler değişiklikler olur ve genellikle bu olay gebeliğin 20. haftasında tamamlanır. Elastik müsküler arterler, büyümekte olan fetüsün gereksinimlerini karşılamak amacıyla çaplarını arttırarak yüksek akımlı düşük rezistans sistemine geçerler. Ancak preeklampside bu olaylar gerçekleşmediği için “akut arteroz” adı verilen durum ortaya çıkar. Bununla birlikte, aktif duruma gelmiş trombositler artmış miktarlardaki plasental büyüme faktörünü (PLGF) üretirler. Bu faktörler de endotel proliferasyonuna sebep olur. Bunun sonucu vazoaaktif peptitlerin anormal yıkımından kaynaklanan prostasiklinin azalması ve tromboksan, endotelin-1, fibronektin seviyesinin artması gibi diğer anormallikler görülür⁴⁴.

Öne sürülen diğer bir teori immünolojik uyumsuzluk durumudur. Burada lokal antijen bloke edici faktörlerin yetersizliğinden dolayı fetüse karşı maternal bir immün yanıt oluşur. Bu durum, plasentanın hasar görmesine sebep olur. Sonuç olarak, farklı dokular arasında uyumsuzluk ortaya çıkar ⁴⁴.



Şekil 2.1. Preeklampsi patofizyolojisi için öne sürülen mekanizmalar

Gebeliğin erken haftalarında, sitotrofoblast hücreleri dallanan villuslara doğru göç etmeye başlar. Sinsityotrofoblastlara doğru trofoblast kabuğunu sararak sitotrofoblast kolonlarını oluştururlar. Trofoblast hücreleri göçlerine devam ederek plasental yatak altında, myometriumda kolonize olurlar. Sitotrofoblast hücre kolonları spiral arterlere ulaştınca trofoblast hücreleri lümen içine yerleşirler ve intralüminal tıkaç oluştururlar. Endovasküler trofoblast hücreleri spiral arterlerin endotel hücrelerinin yerini alır ve medya tabakasını işgal ederler. Bundan dolayı nöral müsküler ve elastik yapılar zarar görür ^{44, 45}.

Gebelikte sistemik vasküler direncin azalması, kan basıncının düşmesi, kardiyak atım hızı ve hacminin yükselmesi, kan hacminin artması gibi maternal kardiyovasküler

fizyolojik değişiklikler olur. Bu değişiklikler plasental yatakta hemodinamik değişiklikler oluşmadan önce, gebeliğin ilk trimesterinde başlar. Myometriuma ve plasental yatağa olan kan akımı uterus dolaşımındaki iki bileşendir ve ayrı kontroller altında yönetilir. Myometriuma olan kan akımı genellikle otoregölasyon ile kontrol edilir. Ancak, plasental yatağa olan akım normal gebeliklerde pasif durumdadır. Normal gebeliklerde vasküler rezistanstaki azalma sonucu uteroplasental yatağa olan kan akımı artar ⁴⁶. Damar sayısının artmasıyla birlikte spiral arterler uteroplasental arterlere dönüşürler. Bu olay yaklaşık olarak 12. haftada başlar ve gebeliğin 18 ila 20. haftalarında en üst seviyeye ulaşır. Trofoblast tabakaları ilerlemeye başlar. Oluşan damarlar görüntü ve işlev olarak arterlerden farklıdır. Sitotrofoblastlar damar lümeni ve duvarına invaze olurlar. Böylece damar kas tabakası dejenere olur, arterler düzleşirler ve büyük bir dilatasyon gerçekleşir. Plasental yatak damarlanması kıvrımlı venlere benzer. Bu damarlar desidua tabakası içinde yayılırlar. Aynı zamanda muskuloelastik özelliklerini kaybederler. Bu sebeple vazoregölator bileşenlere ve basınç değişikliklerine cevap veremezler ^{44, 46, 47}.

Preeklampsi ve plasenta patofizyolojisinde yetersiz trofoblast invazyonu ve damar transformasyonu belirtilmiştir. Başarılı bir trofoblast göçü olmayabilir. Ayrıca fizyolojik vasküler transformasyon eksikliğinden kaynaklanan plasentanın her iki tarafında kardiyovasküler fonksiyon bozukluğu ortaya çıkabilir ⁴⁷. Plasenta fetal ve maternal dolaşım sistemleri arasında gazlar, besinler ve artık maddelerin değişimi için gerekli bir vasküler organdır. Embolizasyon ile maternal uteroplasental akımın azalması durumunda fetal umblikal akımda bir azalma gerçekleşir. Bu sebeple hayati önem taşıyan organlar dikkate alınarak kardiyak output fetus tarafından yeniden düzenlenir. Bunun yanı sıra, uterus kan akımının artmasıyla fetal dolaşım hızı da artar ^{46, 48}.

Preeklampsinin ortaya çıkmasındaki en önemli faktörlerden biri de hipertansiyondur. Periferik damar direnci ve kardiyak output kan basıncını etkileyen iki etmendir. Sağlıklı gebelerde 1. trimesterde kardiyak output gebe olmayan kadınlara göre %30-50 oranında artar ve artışın durmasıyla gebeliğin sonlanmasına kadar aynı seviyede kalır. Ancak, preeklampitik kadınlarda artış durmayarak gebeliğin sonuna kadar yükselmeye devam eder. Bunun yanı sıra, periferik damar direnci normal gebelerde azalırken, preeklampitik gebelerde artar. Bu da preeklampitik kadınlarda ortaya çıkan hipertansiyonun temel sebebi olarak belirtilir ⁴⁹.

Sağlıklı gebelerde anjiyotensin II'ye karşı direnç oluşurken preeklampitik kadınlarda hassasiyet artar. Preeklampitik kadınlardaki bu durum, 17. haftadan itibaren başlamaktadır. Bundan dolayı, preeklampsi riski taşıyan hastaların daha önceden hastalığının bilinebileceği belirtilmektedir¹⁰.

Sağlıklı gebelerde tromboksan A2 ve prostasiklinin her ikisinde de artış gözlenmesine rağmen denge prostasiklin tarafındadır. Prostrasiklin damar endoteli tarafından üretilir ve vazodilatör bir maddedir. Tromboksan A2 trofoblastlar tarafından üretilir ve vazokonstriktör bir maddedir. Preeklampitik kadınlarda tromboksan A2 / prostasiklin oranı artar. Hasar görmüş endotel hücrelerinden prostasiklin üretiminin azalması sebebiyle tromboksan A2 salınımının ortaya çıkması bu olaydaki temel neden olarak gösterilmektedir⁴⁹⁻⁵¹.

2.2. Sitokinler

Sitokinler farklı hücre tipleri tarafından üretilip salgılanan polipeptid yapıda moleküllerdir. Hücre büyümesi, iyileşmesi, inflamasyon, yaralanmaya yanıt gibi bağışıklık ve inflamatör reaksiyonlarda görev alır. Hormonlara benzemekle birlikte tam olarak hormon değildir ve salınımları geçicidir. Hücre yüzeyi sitokin reseptörleri aracılığıyla görevlerini yerine getirirler^{52, 53}.

Sitokinler biyolojinin neredeyse her alanında etkisini gösterir, bu da kısmen sitokinlerin sayısını yansıtır. İyi bilinen 100'den fazla sitokin mevcuttur. Başlangıçta sadece lenfositlerin sitokinlerin kaynağı olduğu düşünüldüğünden, sitokinlere lenfokin adı verilmiştir. Ancak sonra monositlerin de anlaşılmasıyla monokin adı da kullanılmaya başlanılmıştır. Günümüzde farklı hücrelerden salgılandığı görülünce sitokin ismi yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır^{53,54}.

2.2.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri

Uzak mesafelerde etkisini gösteren ve dokuların normal günlük fonksiyonları için önemli fizyolojik tepkileri düzenleyen endokrin hormonların aksine sitokinler sadece dokularda temel fizyolojik değişiklik ya da bozukluk olduğu zaman rol üstlenirler. Bu tür değişiklik ve bozukluklar enfeksiyon ve doku travması süresince gerçekleşir ve sitokinler bu olaylar boyunca dokuların savunma ve tamirinde temel bir rol oynarlar. Sitokinler immünite ile bağlantılıdır. Doğal ve sonradan elde edilen

immün sistem hücrelerini düzenlemenin yanı sıra, hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenler. Ayrıca fetal gelişim ve embriyo implantasyonunu da etkiler⁵⁴.

Sitokinler suda çözünebilen, her dokuda ve çoğu hücrede üretilen proteinlerin ya da glikoproteinlerin 8 ile 30 kDa'lık birimlerini içerirler⁵⁴.

Sitokinler birçok farklı hücre tarafından üretilir ve hücre etrafında ya da canlının farklı yerlerinde olabilirler. Ayrıca bu durum ortamda başka sitokinlerin olmasına bağlı bir şekilde gerçekleşebilir. Çünkü sitokinler başka sitokinlerin sentezini etkileyebilir ve biyolojik etkisine ortam hazırlayabilirler. Bu durum bir sitokin diğer bir sitokin etkisini azaltmak ya da arttırmak şeklinde meydana gelebilir^{53,54}.

2.2.2. Sitokinlerin Etki Mekanizmaları

Sitokinler özel hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatırlar. Bu reseptörler transmembran proteinleridir. Ekstrasellüler domainleri ile sitokine bağlanırlar. Daha sonra hücre içi sinyalleşme kaskatları hücre fonksiyonlarını değiştirir. Bir sitokin etki seviyesi hücre dışı yoğunluğuna, reseptörün çokluğuna ve reseptör afinitesine bağlıdır. Ancak biyolojik olarak etki gösterebilmek için az bir miktarda sitokin yeterlidir. Bununla birlikte, sitokinler fazla olmalarıyla tanımlanırlar. Bazı sitokinler benzer fonksiyonları paylaşabilirler. Etkileri aşağıdaki gibi gruplandırılabilir^{53,55}.

- § Otokrin; sitokin kendisini salgılayan hücreyi etkiler.
- § Parakrin; sitokin çevresinde bulunan komşu hücreleri etkiler.
- § Endokrin; sitokin gerçek hormonlarda olduğu gibi dolaşım ile uzak mesafelerdeki hücreleri etkiler.

2.2.3. Sitokinlerin Sınıflandırılması ve İşlevleri

Sitokinler temel olarak 4 ana grupta toplanırlar. İşlevlerine göre sınıflandırılmaları Çizelge 2.3'te özetlenmiştir⁵⁵.

Çizelge 2.3. Sitokinlerin işlevlerine göre sınıflandırılması

İşlev	Sitokin
Doğal immüniteye aracılık eden sitokinler	- Tip I interferonlar (IFN) - İnterlökin - 1 (IL-1) - İnterlökin - 6 (IL-6) - Kemokinler
Lenfosit aktivasyonu, büyüme, farklılaşma düzenleyicileri olarak T lenfositlerinin özel antijenleri tanımlarına yanıt oluşturan sitokinler	- İnterlökin - 2 (IL-2) (T hücresi büyüme faktörü) - İnterlökin - 4 (IL-4) (IgE sentez düzenleyicisi) - Transforming büyüme faktörü beta (TGF-β)
Bağışıklık aracılığıyla inflamasyonu düzenleyen sitokinler. Bu grup sitokinler antijenle uyarılmış CD_4^+ ve CD_8^+ T lenfositler tarafından uyarılırlar ve inflamatör lökositleri aktive ederler.	- İnterferon - γ (IFN-γ) (Mononükleer fagositlerin birincil aktivatörü) - Lenfotoksin (LT) (Nötrofil aktivatörü) - İnterlökin -10 (IL-10) (Mononükleer fagositlerin negatif düzenleyicisi) - İnterlökin - 5 (IL-5) (Eosonofil aktivatörü) - İnterlökin - 12 (IL-12) (Natural Killer (NK) ve T hücre stimülatörü)
Olgunlaşmamış lökosit büyüme ve farklılaşmasına aracılık eden medyatörler	- c-kit ligand - İnterlökin - 3 (IL-3) (Koloni stimüle eden faktör) - Granulosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (Gm-CSF) - Monosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) - Granulosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) - İnterlökin - 7 (IL-7) - İnterlökin - 9 (IL-9) - İnterlökin - 11 (IL-11)

2.2.4. İnterlökin-10 (IL-10)

İnterlökin-10 (IL-10) immünosüpresör bir sitokin olup aktive olmuş T ve B lenfositler, monositler ve keratinositler ile plasentanın temel hücreleri olan trofoblast hücreleri tarafından üretilir. IL-10 çeşitli proinflamator sitokinlerin[IL-1 β , IL-8, IL-6, Tümör nekroz faktör – alfa (TNF α)] monosit ve makrofajlardaki üretimini inhibe

etmesi ile bilinir. Böylece antiinflamator aktivite göstererek gelişen bağışıklık yanıtını inhibe eder. Bununla birlikte belirli T hücreleri ve mast hücreleri üzerine stimulator etkisi vardır. Ayrıca B hücre olgunlaşması antikor üretimini de stimüle eder. IL-10 otoimmün hastalıklarda aday mediyatördür ve hem hücresel hem de humoral immün tepkileri düzenleyici rol üstlenmiştir⁵⁶⁻⁶¹.

İnsanlarda IL-10 kromozom 1 üzerinde lokalize olmuş bir gen tarafından kodlanır ve bu gen 5 ekzon içerir. IL-10 proteini homodimerdir, moleküler ağırlığı 18 kDa'dur. Her alt ünitesi 178 amino asit uzunluğundadır. 178 amino asidin; 18 amino asit uzunluğundaki parçası sinyal sekansıdır, 160 amino asit uzunluğundaki kısmı ise olgun segmenttir. Farelerdeki IL-10'un aksine insan IL-10'un potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgesi yoktur ve glikozile edilmez. IL-10 alfa heliks yapıdadır ve 6 alfa heliksten oluşur. İnsan IL-10'u ve homologlarının hepsi benzer ekzon intron yapılarına sahiptir. Ekzon-ekzon sınırları kodlanan proteinlerin benzer bölümlerinde olur. IL-10 gen lokusu insan genomunda yaklaşık 2 kb büyüklüğündedir. İlk ekzon sinyal peptidi ve A heliksini kodlar. İkinci ekzon AB ilmiğini (loop) ve B heliksini kodlar. Üçüncü ekzon C ve D heliksini kodlar. Dördüncü ekzon DE ilmiğini ve E heliksini kodlar. Son olarakta beşinci ekzon E heliksi, IL-10'un -COOH kuyruğunu ve AUUUA respons elementlerini içeren translasyona katılmayan segmenti kodlar^{57, 58, 62, 63}.

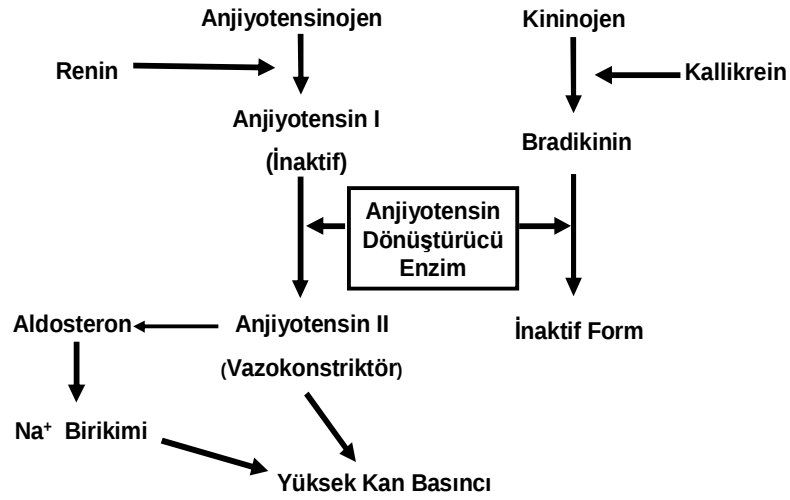
IL-10 ailesinin reseptörlerinin hepsi klas II sitokin reseptör protein ailesindendir. Bütün fonksiyonel reseptörler alfa ünitelerinden oluşmaktadır^{62,63}

2.3. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) ve Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS)

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE, peptidil-karboksipeptidaz, EC 3.4.15.1) renin anjiyotensin sisteminin (RAS) bir parçası olup, anjiyotensin I'i anjiyotensin II'ye dönüştürerek kan basıncının düzenlenmesinde rol alır. Ayrıca potansiyel bir vazodilatör olan bradikininin karbonil ucundan bir dipeptit kopararak onu inaktif forma dönüştürür^{18, 64}.

RAS, kan basıncı, kan hacmi ve su-elektrolit dengesinin düzenlenmesinde ve fizyolojik düzeylerde devamının sağlanmasında görev alan bir endokrin sistemdir. Temel elemanları anjiyotensinogen, renin, anjiyotensin dönüştürücü enzim, anjiyotensin II ve anjiyotensin II reseptörüdür¹⁷. RAS'ta anjiyotensinogen, renin için substrat olarak

görev alan büyük globüler bir proteindir. Renin anjiyotensinogenin dekaeptit anjiyotensin I'e proteolitik dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Anjiyotensin dönüştürücü enzim, anjiyotensin I'i oktapeptit olan anjiyotensin II'ye dönüştürür. Anjiyotensin II reseptörü ise anjiyotensin II'nin hücresel etkilerinin iletiminden sorumludur. Anjiyotensin II'nin reseptörüne bağlanmasıyla vazokonstriksiyon gerçekleşir ve aldosteron salınımı ortaya çıkar (Şekil 2.2) ^{17, 65}.



Şekil 2.2. Renin anjiyotensin sistemi ve anjiyotensin dönüştürücü enzimin rolü

2.3.1. ADE'nin Biyokimyası

ADE, ekto-enzim olarak çalışan, hücre zarına bağlı bir enzimdir. Aktif merkezi hücrenin dış yüzeyine doğru yönelmiştir. Enzim çinko metalopeptidaz sınıfından olup üç boyutlu yapısında merkeze bir çinko atomu yerleşmiştir. Substrat spesifikliğin geniş olmasının yanı sıra, katalitik aktivitesi anjiyotensin I ve bradikinin peptitleri üzerinde ölçülmüştür. Enzim bu iki peptit için dipeptidil karboksipeptidaz aktivitesi gösterir. Böylece anjiyotensin I'i oktapeptid olan anjiyotensin II'ye ve bradikininini inaktif forma dönüştürür ⁶⁵.

2.3.2. ADE'nin Homologları ve Genetiği

ADE geninin ortaya çıkışı yaklaşık olarak 300-350 milyon yıl öncesine dayanır. ADE geni o tarihten itibaren inek, şempanze, tavşan, tavuk, at sineği, *Drosophila melanogaster* gibi farklı türlerde bulunmuştur⁶⁶.

ADE, farklı türlerde bulunmasının yanı sıra, aynı tür içerisinde farklı tür organlardan elde edilebilmektedir. Örneğin; serum, akciğer, seminal sıvı ve plazmadan elde edilebilmektedir¹⁷. Ayrıca insan vücudundaki dağılımı da çeşitlilik göstermektedir. Çoğunlukla endotel ve epitelyum hücrelerinde ve erkek spermatitlerinde bulunmaktadır. Endotel ve epitelyum hücrelerdeki formu somatik form (sADE) ve spermatitlerdeki formu germinal form (gADE) olarak adlandırılır. Bu formların primer yapıları farklı olup aynı gen tarafından kodlanırlar. sADE iki aktif bölgeye sahip olup, bu bölgeler farklı katalitik aktivite taşımaktadır. gADE ise bir aktif bölgeye sahiptir ve fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir^{67, 68}. sADE'nin moleküler ağırlığı 140-160 kDa iken gADE'nin moleküler ağırlığı ise 90-100 kDa'dır¹⁷.

ADE2 olarak isimlendirilen ve ADE'nin memeli homologu olan bir enzim 2000 yılında keşfedilmiştir. Enzimin gen bölgesi X kromozomu üzerindedir ve 85 amino asitlik bir yapıyı kodlar. Moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 120 kDa'dır. N terminal ucundan başlayarak %42'lik kısmı sADE ile aynıdır, ayrıca aktif merkezi ADE ile %61 oranında benzerlik göstermektedir.^{69, 70}

Haploid genom üzerinde 21 kilobaz (kb) uzunluğunda tek bir ADE var olup, bu gen 25 intron ve 26 ekzon bölgesi içermektedir ve 17. kromozom üzerine lokalize olmuştur. sADE 1-12 ve 14-26 ekzon bölgelerinden kodlanırken gADE 13-26 ekzon bölgesinden kodlanır. sADE'nin promotorü genin 5' ucunun 1. ekzonuna, gADE'nin promotorü ise genin 12. intronuna yerleşmiştir^{18, 71}.

2.4. Preeklampsi Genetiği

2.4.1. Aile Çalışmaları

Preeklampsinin ailesel bir bileşeni vardır. Preeklampsili gebeliklerden doğan kadınların normal gebeliklerden doğan kadınlara göre preeklampsi olma riski 3 kat daha fazladır^{35, 72}. Dr. Leon Chesley 1935'te eklampitik kadınlara yönelik bir çalışma başlatmış ve 1974'e kadar sürdürmüştür. Chesley 1931 ile 1951 yılları arasında dünyaya gelen eklampitik 147 kız kardeş, 248 kız çocuğu, 74 kız torun ve 131 gelin gebelerle

ilgili bilgi toplamıştır^{11, 12, 73}. Chesley'in verileri 0.25 olarak varsayılan gen sıklığına sahip tek gen modeli ile neredeyse uyumaktadır^{11, 12, 73}. Yapılan aile çalışmaları Çizelge 2.4'te özetlenmiştir¹¹.

Çizelge 2.4. Aile Çalışmaları

Sonuç	Yorum	Çalışmanın Yapıldığı Ülke
Preeklampitik kadınların annelerinin %28'inde preeklampsi Normal gebe kadınların annelerinin %13'nde preeklampsi	Bütün gebelerin anneleri incelenmiştir	Amerika
Preeklampitik kadınların kızkardeşlerinin %13.8'inde preeklampsi Normal kadınların kızkardeşlerinin %4.5'inde preeklampsi	Kızkardeşlerin ilk gebelikleri incelenmiştir	İskoçya
Eklampitik kadınların kız kardeşlerinin %36.7, kızlarının %26.2, gelinlerinin % 6.1 ve kız torunlarının %16.2'si preeklampsi veya eklampsi	Akrabaların ilk geçerli gebelikleri incelenmiştir Populasyon:Kafkaslar	Amerika (İki ayrı çalışma)
Preeklampitik kadınların annelerinin %22.9'unda preeklampsi Normal kadınların annelerinin %6.4'ünde preeklampsi Preeklampitik kadınların kızkardeşlerinin %18.2'inde preeklampsi Normal kadınların kızkardeşlerinin %8.6'ında preeklampsi	İncelenen kadınlar ilk defa doğum yapmıştır Akrabaların ilk gebelikleri incelenmiştir	İskoçya
Preeklampitik kadınların annelerinin %15.9'unda preeklampsi Normal kadınların annelerinin %3.1'inde preeklampsi Preeklampitik kadınların gelinlerinin %4.4'ünde preeklampsi Normal kadınların gelinlerinin %5.3'inde preeklampsi	İncelenen kadınlar ilk defa doğum yapmış ve ayrı ayrı incelenmiştir Akrabaların ilk gebelikleri incelenmiştir	İskoçya
Eklampitik kadınların kızlarının %38.1'inde preeklampsi veya eklampsi	İlk kez doğum yapanlar İlk gebelikler incelenmiştir Populasyon; Zenci Amerikalı, Kafkaslar	Amerika
Preeklampitik kadınların kızkardeşlerinin %11.3'ünde preeklampsi	Birden çok doğum yapanlar dahildir İlk gebelikler incelenmiştir.	İskoçya
Preeklampitik veya eklampitik kadınların kızlarının %25.8'inde preeklampsi veya eklampsi Preeklampitik veya eklampitik kadınların gelinlerinin %10.6'ında preeklampsi veya eklampsi	Birden çok doğum yapanlar dahildir	İzlanda

Arngrimsson ve arkadaşları birleştirilmiş aile verileri için dört kalıtım modelini test etmişler ve bu verilere azaltılmış penetransa sahip temel maternal dominant gen modeli ya da multifaktöriyel modelin uyduğunu belirtmişlerdir^{11, 12, 74}. Aile çalışmaları maternal genlerin preeklampsi etiyolojisinde rolleri olduğunu desteklemektedir.

2.4.2. İkiz Çalışmaları

İkiz çalışmaları hastalığın kalıtılabilirliğini hesaplamak için kullanılmıştır. Tek yumurta ikizleri somatik hücre mutasyonları, mitokondriyal DNA moleküllerinin sayısı ve kadınlardaki X inaktivasyonu modeli hariç genetik olarak aynıdır. Çift yumurta ikizlerinde ise yaklaşık olarak genlerin yarısı aynıdır¹².

Preeklampsi ile uyumlu iki tane tek yumurta ikizi çalışması yayınlanmıştır, fakat geniş çaplı üç ikiz çalışması preeklampsi ile uyumluluk bulamamıştır¹². 917 tek yumurta ikizi ve 1199 çift yumurta ikizini içeren bir çalışma, ikiz kardeşi preeklampsi olan kadınların %25'inin aynı hastalığa yakalandığını tespit etmiştir. Çift yumurta ikizlerinde bu oran %6 bulunmuştur. Bu çalışmanın kalıtılabilirlik hesaplamalarına göre, preeklampsinin etiyolojisinde çevresel etkiler yaklaşık olarak genetik etkilere eşit bir öneme sahiptir⁷⁵. Preeklampsinin etiyolojisinde, ikiz çalışmaları maternal genlerin tek başına rolünden çok maternal ve fetal genlerin etkileşimini destekler. Böyle bir kombinasyon aynı veya farklı genlerin allellerini içerebilir. Preeklampsideki transgenik fare modeli buna iyi bir örnektir ki bu modelde insan anjiyotensin genini taşıyan dişi fare insan renin genini taşıyan erkek fare ile çiftleştirilmiştir. Plasentadaki renin geni ekspresyonu anjiyotensin genini taşıyan dişi farelerde hipertansiyon ve proteinüri ile kendini gösteren preeklampsi benzeri sendromla sonuçlanmıştır. Fakat normal farelerde buna rastlanmamıştır¹².

İkiz çalışmaları, maternal ve fetal genetik faktörlerin etkilerini çevresel faktörlerden ayıramaz. Bu amaçla, Cnattingius ve çalışma arkadaşları, tüm kardeşlerin yer aldığı geniş çaplı bir çalışmadaki gebelik sonuçlarını analiz etmişlerdir. Analiz sonuçlarına göre, genetik faktörlerin preeklampsideki etkilerinin %50'den çok ve maternal genlerin katkılarının fetal genlerden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, preeklampsi üzerinde güçlü çift etki (çevresel katkı ve maternal ve paternal genler arasında etkileşim) olduğu da belirlenmiştir¹².

2.4.3. Fetüsteki Genetik Aberasyon

Preeklampsi ve fetal trizomi 13 ya da 13q için kısmi trizomi arasındaki bağlantı, kromozom 13 üzerinde kodlanmış olan bazı fetal genlerin dozaj etkisi olduğunu ileri sürmektedir⁷⁶. Geni kromozom 13q12 üzerinde bulunan ve plasental orijinin doğal olarak meydana gelen anti-anjiyogenik bir molekül olan sFlt-1'in aşırı salınması preeklampsideki maternal sendromun patogenezeine katkıda bulunur. Preeklampsi de, genelde erken başlayanlar, molar plasental değişiklikler sebebiyle anormal hale gelen gebeliklerle ilişkilidir. Tam(komplet) molar gebelik 46 kromozoma sahiptir ve genom sadece paternal katkı içermektedir. Kısmi(parsiyel) molar gebelik 23 maternal ve 46 paternal olmak üzere 69 kromozomludur, halbuki 23 paternal ve 46 maternal kromozom içeren triploidi molar plasental değişikliklerle ilişkili değildir. Triploidi 2. trimester gebelik dönemine ait 70 olguya dair raporda, bu gebeliklerin %28,3'ünde plasental molar değişiklikler tespit edilmiştir. Tüm bu gebeliklerin %4,3'ünde preeklampsi tanımlanmıştır, fakat plasental molar değişiklik tespit edilmiş gebeliklerde bu oran %15 olarak bulunmuştur^{12, 77, 78}.

Trofoblastik genoma hem paternal hem de maternal katkı, hem embriyonik hem de ekstraembriyonik dokuların dengeli gelişiminin korunması için gereklidir. Molar değişikliklerde, preeklampsiye yatkınlığın ileri sürülmesinde birçok olası açıklama mevcuttur. (i) Yüksek gen yüklemesi ve damgalama değişiklikleri fetüsün normal gelişimini bozar. (ii) Anneye yabancı olan fetüsteki genom miktarı artar ve tam molar değişikliklerdeki gebeliklerde anneye tümüyle yabancı olur. Yumurtanın bağışlanmış olduğu gebeliklerde preeklampsi insidansıda artar ki bu gebeliklerde de fetüsün tüm genomu anneye yabancıdır. (iii) Genişlemiş kistik plasentadaki azaltılmış perfüzyon preeklampsiye yatkındır¹². Fetüsteki genetik aberasyon için yapılan çalışmalar fetal genlerin preeklampsi etiyolojisindeki temel rolünü desteklemektedir.

2.4.4. Paternal Genotipin Katkısı

Preeklampside plasentanın merkezi rolü fetüsteki paternal genlerin de hastalığın gelişiminde etkisi olabileceğini göstermektedir. Norveç toplumunda yapılmış bir çalışmaya göre daha önce başka bir kadından preeklamptik gebelik sahibi olmuş bir erkekten gebe olan bir kadının preeklampsi geçirme riski iki kat daha yüksektir. Bu

sonuç Utah toplumundaki verilerle de desteklenmiştir. Preeklampitik bir gebelikten doğmuş bir babanın çocuğunun normal gebelikten doğmuş bir babanın çocuğuna göre preeklampitik bir gebelikten doğma riski iki kat daha yüksektir^{72, 79}. Norveçli araştırmacılar Norveç'teki doğum kayıtlarından alınmış olan 438 597 anne ve bebek çifti ile 286 945 baba ve bebek çiftinin bilgilerini inceleyerek preeklampside ikinci nesli çalışmışlardır. Preeklampitik gebelikten doğmuş bir erkeğin preeklampitik bir babalık geçirme riski 1,5 kat artmıştır⁸⁰. Paternal genotipin preeklampsie katkısı geniş verilere sahip çalışmalarla desteklenmiştir.

2.4.5. Paterniti ve Gebelik Aralığındaki Değişiklik

Preeklampsinin immün temelli veya immünogenetik etiyolojiye sahip olabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Preeklampsie çoğunlukla ilk gebelikte ortaya çıkan bir hastalıktır. Preeklampsinin normal bir gebelikten sonra görülme sıklığı ilk gebelikte görülme sıklığının yarısıdır^{35, 36, 37, 44, 79}. Ayrıca ilk gebeliği düşükle sonuçlanmış bir kadının aynı erkekten ikinci gebeliğinde preeklampsie yakalanma riski yaklaşık olarak yarıya iner. Partner değişiminin daha önce preeklampsie olmamış kadınlarda riski arttırdığı daha önce preeklampsie olmuş kadınlarda ise riski düşürdüğü gösterilmiştir⁸¹.

2.4.6. Aday Gen Çalışmaları

Genetik bağlantı çalışmaları preeklampsinin patofizyolojisi ile ilişkili aday genlerle yapılır. Kan örnekleri hem hasta ve hem de kontrol gruplarından toplanır. DNA izolasyonundan sonra aday gendeki genetik polimorfizmlerin prevalansı her iki grupta karşılaştırılır. Genetik polimorfizm her 100 kopyanın en az birinde oluşan DNA sekansındaki varyasyondur ve insan genomu boyunca ortalama her 500–1000 baz çiftinde bir meydana gelebilir. Böylece ilgilenilen genin çalışılması için fonksiyonel olarak anlamlı bir polimorfizmin seçilmesi mümkündür⁸².

Preeklampsideki genetik bağlantı çalışmaları ile ilgili yayınların sayısı son on yılda sürekli artmıştır, fakat bu çalışmalar herkesçe kabul edilen yatkın genler tanımlayamamıştır. Aday genler Çizelge 2.5'te özetlenmiştir. Trombofili, sitokinler, ve anjiyotensinogeni de içeren 8 aday gen kapsamlı bir şekilde çalışılmış, fakat çelişkili sonuçlar elde edilmiştir^{10, 11, 12, 14, 83}. Aday gen çalışmalarındaki çelişkili sonuçlar için birçok açıklama öne sürülebilir. (i) Çalışılan popülasyon seçimi. Eğer bir allel bir

populasyonda diğerk bir populasyondan daha sık bulunuyorsa ve hastalık sıklığı bu iki populasyon arasında değışiyorsa, bu iki populasyon arasında yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilir. (ii) Preeklampitik fenotipin tanımı doğru değildir. Birçok sınıflandırma kullanılmıştır. Geçerli tanımlamaların hiçbirisi hastalığın ardında yatan farklı patojenik mekanizmaları uygun şekilde yansıtmaz. (iii) Farklı çevresel faktörler genetik faktörlerle etkileşime girebilir ve preeklampsiye eğilimi değıştirebilir. (iv) Aday gen çalışmalarının çoğunda tek nükleotit değışiklikleri (SNP) analiz edilmiştir. Preeklampsi gibi multifaktöriyel hastalıklarda, haplotip analizi genelde bağlantının tespitinde ya da dışlanmasında ek bir güç sağlar. (v) Bağlantı çalışmalarında çoklu testlerin istatistik korelasyonu gereklidir^{12, 22}.

Aday gen çalışmalarının çoğunluğunda maternal genotipin rolü üzerinde durulmuştur. Son zamanlarda, Preeklampsi Genetiğı Birliğı (GOPEC) çok merkezli bir çalışmayla maternal ve fetal genlerin katkısı üzerine yoğunlaşmıştır. Preeklampsiyle ilişkilendirilmiş yedi aday geni çalışmışlardır: AGT, AGTR2, TNF, NOS3, MTHFR ve F5. Preeklampside etkilenmiş 657 kadın ve ailesi genotiplendirilmiş maternal ve fetal genler arasındaki etkiler araştırılmıştır. Maternal ya da fetal genotip ile bağlantılı istatistiksel olarak anlamlı hiçbir genotip risk oranı bulunamamıştır¹².

Genetik bağlantı çalışmalarındaki yönergeler(kılavuzlar) son zamanlarda şunları önermiştir: yüksek sayıda hasta, etnik kökenle eşleştirilmiş kontrol grupları, yaş ve cinsiyet, çoklu karşılaştırmaların ayarlamaları, fizyolojideki fonksiyonel değışiklikteki polimorfizm, bağımsız örnek grubundaki sonuçların tekrarı ve negatif sonuçlanmış yüksek kalitedeki bağlantı çalışmalarının yayınlanması⁸⁴. Bağlantı çalışmaları fonksiyonel çalışmalar değildir, fakat gelecekte yapılacak klinik çalışmalar için yeni yaklaşımlar sağlamaktadır. Geniş bilgiler içeren populasyon çalışmalarındaki çeşitli aday genlerle ilgili sistematik derlemeler, hastaların tanımlanması, örnekleme, hasta ve kontrollerin sayısı ve sonuçlar okuyucular için yardımcı olabilir. Preeklampside aday gen çalışmaları muhtemelen maternal fetal etkileşimleri içeren genlere yönelik en iyi çalışmalardır^{5, 11, 12, 85}. Fetal genotip ve maternal fetal genotip etkileşimini araştıran çalışmaların sayısı azdır ve geçerli yatkın herhangi bir gen tespit edilememiştir. Muhtemelen, preeklampsi ile bağlantılı tek bir temel gen bulunamayacaktır fakat çoklu bağlantılar ortaya çıkarılacaktır. Uygun şekilde yürütülecek bağlantı çalışmaları

araştırmayı teşvik edebilecek ve belki de preeklampsiyle ilgili beklenmeyen biyokimyasal yollara dikkat çekecektir¹².

Çizelge 2.5 Preeklampside belirlenmiş olan aday genler (en az bir çalışmada onaylanmış)

Gen	Sembol
Trombofili	
Faktör V Leiden	F5
Metilentetrahidrofolat redüktaz	MTHFR
Protrombin	F2
Plasminojen aktivatör faktör-1	PAI-1
İntegrin glikoprotein IIIa	GPIIIa
Oksidatif stres ve Lipid metabolizması	
Apolipoprotein E	ApoE
Lipoprotein lipaz	LPL
Mikrozomal epoksit hidrolaz	EPHX
Glutation S-transferaz	GST
Endotelial fonksiyon ve Angiogenezis	
Endotelial nitrik oksit sentetaz 3	eNOS3
Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 1	VEGFR-1
Vasküler endotelial büyüme faktörü	VEGF
İmmünoregülasyon	
Tümör nekroz faktör alfa	TNF- α
İnterlökin 1 reseptör antagonisti	IL1Ra
İnterlökin 1 alfa	IL-1 α
İnterlökin 10	IL-10
T-lenfosit bağlı protein 4	CTLA4
Hemodinamik	
Anjiyotensinojen	AGT
Anjiyotensin dönüştürücü enzim	ACE
Anjiyotensin II tip 1 reseptörü	AGTR1
Anjiyotensin II tip 2 reseptörü	AGTR2

2.4.7. Kapsamlı Genom Taramaları

Hastalık geninin pozisyonel klonlaması ilgilenilen hastalıkta aileler boyunca aktarılan kromozom bölgelerinin tanımlanması ile başlar (genetik bağlantı). Kapsamlı genom taramasında düzenli bir şekilde yerleştirilmiş mikrosatellitler (Çok basit DNA

dizilerinin kısa tekrar dizileri) kromozomal bölgeleri tanımlamak için genom boyunca kullanılır. Kapsamlı genom taraması hastalığa yatkın genleri çalışmak için zorlu yöntemler içermektedir¹².

Preeklampsi için kapsamlı genom taramaları Çizelge 2.6'da özetlenmiştir. Kesin tanı kriteri sadece yeni ortaya çıkmış hipertansiyon ve proteinüri veya eklampitik kadınları işaret eder. Halbuki genel tanı kriteri ayrıca yeni ortaya çıkmış hipertansiyonu olan, proteinürisi olmayan kadınları da işaret eder. Muhtemelen, preeklampitik bir ailede genel tanı kriterine sahip bir kadın kesin tanı kriterine sahip etkilenmiş akrabalarıyla aynı genetik risk faktörlerini paylaşır. Sadece kesin tanı kriteri kullanılıyor olsa bile, her zaman bir fenokopi (farklı genetik altyapı ile benzer bir fenotip) ihtimali vardır¹².

Preeklampsi için ilk kapsamlı genom taraması 1992 de yayınlanmıştır ve analiz için tam olarak etkili resesif kalıtım modeli ve kesin tanı kriteri kullanılmıştır. O dönemlerde bazı bağlantı çalışmalarının yoğunlaştığı aday bölgelerden HLA bölgesinde bağlantıya dair herhangi bir kanıt bulunamamıştır⁸⁶. İkinci kapsamlı genom taraması sonucu kromozom 4q üzerinde bir aday bölge bulunmuştur. Araştırmacılar 2 kalıtım modeli kullanmıştır: yüksek penetranslı resesif gen ya da düşük penetranslı dominant gen ve hem kesin tanı kriteri hem de genel tanı kriteri⁸⁷.

Daha sonraki iki kapsamlı genom taraması ile preeklampsi için kromozom 2 üzerinde maternal yatkınlığı olan bir lokus bulunmuştur. Genel tanı kriteri kullanılarak, İzlanda toplumunda yapılan bir çalışmada 2p13 üzerinde anlamlı bir lokus tespit edilmiş ve bu sonuç iki geniş aile ile desteklenmiştir. Aynı çalışmada iki aile dışındaki diğer ailelerde, genel tanı kriteri ile 2q23 üzerinde diğer bir lokus bulunmuştur⁸⁸. Benzer kriterler ile, Avustralya ve Yeni Zelanda'daki ailelerde yapılan ikinci genom taraması 2q23 için olası bir bağlantı göstermiştir. Bu genişletilmiş aile paneliyle, araştırmacılar daha önceden rapor edilmiş 4q üzerindeki aday bölgeleri doğrulayamamışlardır. İzlanda'daki tarama ile bulunan 2p13 üzerindeki lokus ve Avustralya'daki ikinci taramada bulunan 2q32 üzerindeki lokus arasındaki mesafe yaklaşık olarak 50cM olmasına rağmen araştırmacılar iki çalışmanın da aynı lokusu tespit ettiği çıkarımını yapmışlar ve lokus preeklampsi, eklampsi geni 1(PEE1) olarak belirlenmiştir. Öte yandan, Hollanda toplumunda kan bağı olan ailelerde yapılan sonraki kapsamlı genom taraması kromozom 2 üzerindeki bağlantıyı tespit edememiştir. Bu çalışma HELLP

sendromu kriterini kullanan tek kapsamlı genom taramasıdır. 12q için olası bağlantının HELLP sendromu ile ilişkili olduğu görülmüştür, halbuki 10q ve 22q için olası bağlantı HELLP olmayan ailelerde de bulunmuştur^{89, 90}.

Çizelge 2.6. Preeklampsi için kapsamlı genom çalışmaları

Ülke	Model	Kriter K: Kısıtlı G: Genel	Markır Sayısı	Aile Sayısı	Nominal veya olası bağlantısı olan kromozom	Anlamli bağlantısı olan kromozom
İskoçya	Otozomal Resesif (OR)	K	43	35	3, 9	
Avustralya	OR, Otozomal Dominant (OD)	K,G	90	15	4q34(G)	
İzlanda	Non- parametrik	K,G	440	124	2q23(G)	2p13(G)
Avustralya, Y. Zelanda	Non- parametrik	K,G	400	34	2q23(K), 11q23(G)	
Hollanda	Non- parametrik	K, HELLP	293	67	10q,22q(K), 12q(HELLP)	
Finlandiya	Non- parametrik	K,G	435	15	4q32(G)	2p25(G), 9p13(G)

Son zamanlardaki kapsamlı genom taraması Finlandiya’da yayınlanmıştır. Genel tanı kriteri kullanılarak kromozom 2p25(PEE2) ve 9p13(PEE3) için anlamlı bağlantı ve kromozom 4q32 için olası bağlantı bulunmuştur. Bu çalışmada kromozom 2p25 üzerindeki yatkın lokus, İzlanda’da yapılmış çalışmadaki 2p13 ve Avustralya/Yeni Zelanda’da yapılmış çalışmadaki 2q23 ile karşılaştırıldığında açık bir biçimde farklılık göstermiştir. 9p13 üzerindeki lokusun Çin ve Finlandiya’da son zamanlarda yapılmış iki kapsamlı genom taramasında tip 2 diyabet için aday bir bölge olabileceği gösterilmiştir^{11, 12}. 4q32 üzerindeki lokus Avustralya’da yapılmış ilk kapsamlı genom taramasındaki aday bölgeye yakındır⁸⁷. Kapsamlı genom taramalarının hiçbiri

7q36(nitrik oksit sentetaz gen bölgesinin endotel izoformu) için daha olası bağlantıyı doğrulayamamıştır.

2.4.8. Genetik Polimorfizmler

Polimorfizm, bir toplumda farklı allellere bağlı olarak genetik açıdan belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir⁹¹. Eğer toplumda herhangi bir lokusta en az iki tane yaygın bulunan allel varsa bu lokusun polimorfizm gösterdiği söylenir ve bir allelin toplumdaki sıklığı %1'den fazla olursa bu allel polimorfik olarak adlandırılır^{92, 93}.

Çizelge 2.5'te trombofili, hemodinamik, oksidatif stres ve immünite gibi faktörlere göre gruplara ayrılmış ve preeklampsile ilişkilendirilmeye çalışılmış aday genler özetlenmiştir. Bu aday genlerin farklı bölgelerindeki polimorfizm tiplerinin çeşitli toplumlarda preeklampsisi ile bağlantıları birçok çalışmada araştırılmıştır. Bazı bölgelerdeki polimorfizmler preeklampsisi ile anlamlı derecede bağlantılı bulunurken bazı bölgelerdeki polimorfizmler preeklampsisi ile ilişkilendirilememiştir. Ayrıca farklı toplumlarda aynı bölgelerdeki polimorfizmlerle yapılan çalışmalarda da çelişkili sonuçlar elde edilmiştir^{10, 49}.

2.4.8.1. IL-10 Geni Polimorfizmleri

Preeklampsinin patofizyolojisi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte immün sistem preeklampside önemli rol üstlenir. Fetal-plasental ünitelere karşı maternal immünolojik tepkilerin preeklampside anormal seviyede olabileceği düşünülmektedir. İyi bir savunma sistemi sağlıklı bir gebelik için gereklidir⁹⁴. Gebelikte, IL-10 başarılı bir doğum için gerekli temel immünoregülatör sitokinlerden birisidir. IL-10'nun düşük seviyede üretilmesi düşükle ve preeklampsile bağlantılıdır⁵⁹. Hayvanlarla yapılan çalışmalarla bu desteklenmiştir. Farelerle yapılan çalışmalarda IL-10 üretiminin inhibe edilmesiyle fetal büyümenin durduğu ve IL-10'nun azlığıyla düşüklerin gerçekleştiği gösterilmiştir⁹⁵. IL-10 bu öneminden dolayı aday genler içerisindeki yerini almış ve preeklampsile ilişkisi birçok çalışmada araştırılmıştır. -592 C→A, -819 C→T, -1082 G→A ve -2849 G→A polimorfizmlerinin preeklampsisi riskleri farklı çalışmalarla incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda -592, -819 promotor bölgelerindeki polimorfizmlerin preeklampsisi ile ilişkisi tespit edilememiş ve -1082 promotor

bölgesinde yapılan çalışmaların sonuçları halen tartışmalıdır^{16, 57, 58, 59, 96, 97}. Ancak, de Groot ve arkadaşları Hollanda toplumunda -2849 promotor bölgesinde yaptıkları çalışmada, preeklampitik kadınlarda -2849A genotipinin kontrol grubuna göre daha düşük frekansta olduğunu göstermişlerdir. -2849AA homozigot genotipine sahip kadınların preeklampsiye yakalanma riskinin üç kat daha düşük olduğu belirtilmiştir. Çalışmada, ailesel hipertansiyon, diyabet ve obezite gibi preeklampsi için ortaya çıkan risk faktörlerinden bağımsız olarak A allellinin varlığının koruyucu faktör olduğu ifade edilmiştir¹⁶.

2.4.8.2. ADE Geni İntron 16 İnsersiyon/Delesyon Polimorfizmleri

ADE geni üzerinde 10 ayrı polimorfik bölge bilinmektedir (Çizelge 2.7)⁹⁸. Bu bölgelerden en çok çalışılan insersiyon/delesyon (I/D) polimorfizmidir. ADE geni peptidil karboksipeptidaz olup RAS'ın önemli bir parçasıdır. 17. kromozoma yerleşmiş olup 16. intronunda 278-300 baz çiftlik Alu elementinin varlığı [insersiyon(I)] veya yokluğuna [delesyon(D)] bağlı olarak insersiyon/delesyon polimorfizmi ortaya çıkmaktadır. Bu polimorfizmde DD ve II homozigot iken DI heterozigottur^{19, 99}.

Çizelge 2.7. ADE geni üzerindeki polimorfik bölgeler

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

ADE I/D polimorfizminin preeklampsi ve hipertansiyon ile ilişkisi farklı toplumlarda bazı çalışmalarla araştırılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında ilişki tespit edilirken, bazılarında herhangi bir bağlantı bulunamamıştır. Gürdöl²⁰ ve arkadaşlarının Türk toplumunda, Mello¹⁰⁰ ve arkadaşlarının İtalya toplumunda ve Choi¹⁰¹ ve arkadaşlarının G. Kore toplumunda yaptıkları çalışmalarda D allelinin preeklampsiyle

ilişkisi tespit edilmiştir. Ayrıca, Choi¹⁰¹ ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada DD genotipi ile preeklampsi arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, Kaur¹⁰² ve arkadaşlarının Hindistan toplumunda yaptıkları çalışmada D allelinin gebeliğe bağlı hipertansiyon ile olan ilişkisi tespit edilirken, Seremak-Mrozikiewicz¹⁰³ ve arkadaşlarının Polonya toplumunda yaptıkları çalışmada ise I allelinin gebeliğe bağlı hipertansiyonla ilişkisi tespit edilmiştir. Diğer yandan Morgan¹⁰⁴ ve arkadaşlarının İngiltere toplumunda, Galao¹⁰⁵ ve arkadaşlarının Brezilya toplumunda ve Kobashi¹⁰⁶ ve arkadaşlarının Japonya toplumunda yaptıkları çalışmalarda I/D polimorfizmi ve preeklampsi arasında herhangi bir bağlantı bulunamamıştır. Ayrıca, Tamura¹⁰⁷ ve arkadaşlarının Amerika’da yaptıkları çalışmada I/D polimorfizmi ile gebeliğe bağlı hipertansiyon arasında ilişki tespit edilememiştir.

Bununla birlikte, Mando ve arkadaşlarının İtalya’da yaptıkları çalışmada kodominant, dominant ve resesif modeller kullanılmış, kodominant ve resesif modellerde II genotipinin hafif preeklampsi ile ilişkisi olduğu ortaya çıkarılmıştır¹⁹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, cihazlar ve teknik malzemeler temin edildikleri firmalarla birlikte aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

- Taq DNA polimeraz enzimi (Vivantis)
- PZR tamponu (Vivantis)
- Primerler (ITD Integrated DNA Technologies, Biomers.net)
- dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Dr. Zeydanlı)
- Restriksiyon enzimi AlwI (Biolabs)
- Etidiyum bromid (Sigma)
- Agaroz (Sigma)
- Akrilamid (Sigma)
- N,N'-Metilen-bis-Akrilamid (Sigma)
- Amonyüm Persülfat (Sigma)
- Tris-baz (Sigma)
- Borik asit (Sigma)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Magnezyum klorür
- Tris-HCl
- TritonX100 (Sigma)
- Sükroz (Merck)
- Proteinaz-K (Sigma)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
- Bromfenol mavisi (Merck)
- Etil alkol (Merck)
- Distile ve bidistile su

3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

- Soğutmalı santrifüj (Universal 16R)
- Mikrosantrifüj (Techne force 16)
- Su banyoları (Grant)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Terazi (Shimadzu 321-33557)
- pH metre (İnolab)
- UV jel görüntüleme sistemi (UVItec)
- Otomatik pipetler (Gilbson, Biohit, Socorex)
- Vorteks (Nüve NM 110)
- Etüv (Dedeoğlu)
- Elektroforez güç kaynağı (EC3000-90)
- Yatay ve dikey elektroforez tankları (Biogen ve Biolab)
- PZR cihazı (Thermal cycler Ependorf Mastercycler)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Deepfreez (Siemens, Bosch)
- Otoklav (Trans)

Araştırmanın yapıldığı Moleküler Genetik laboratuvarı, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında bulunmaktadır.

3.2 Kan Örneklerinin Sağlanması

Çalışma grupları Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı Doğum Ünitesi, Doğum Servisi ve Obstetrik Polikliniği ile Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Kadın Doğum Anabilim Dalı Doğum Servisi ve Polikliniğinde takip edilen preeklampsi tanısı konulmuş hastalardan ve herhangi bir hastalık tanısı almamış normal gebelerden oluşturuldu. Gestasyonel hipertansiyon ve süperempoze preeklampsi olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Hasta grubu 1, 2, 3 olarak, kontrol grubu K1 (Kontrol 1), K2, K3 olarak kodlandırıldı. Bu çalışmada, 116 normal, 126 preeklampsi olmak üzere toplam 242 birbiri ile akraba olmayan kadın moleküler biyolojik açıdan değerlendirildi.

Bu kişilerden EDTA'lı tüplere kan alındı. Tüpler alt üst edilerek kanların pıhtılaşması önlendi. Kan örnekleri DNA elde etmek üzere kullanıldı.

3.2.1. Hasta Rızası

Çalışmada yer alan tüm hasta ve kontrol grubunun çalışmaya katılımları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formunda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmış DNA Çalışması Onam Formları doldurularak sağlandı.

3.3. Yöntem

3.3.1. Periferik Kandan DNA Elde Edilmesi

Çalışmamızda periferik kandan DNA eldesi için Miller ve arkadaşlarının geliştirdiği salting out (tuzla çöktürme) yöntemi modifiye edilerek uygulandı¹¹⁴.

1. 1,5 ml lik ependorf tüpü içerisine iyice alt üst edilmiş kan örneğinden 700 µl, eritrosit lizis (Ek-1.1) solüsyonundan da 700 µl konulup dikkatlice alt üst edilerek 3-5 dk. oda ısısında bekletildi. 4500 rpm’de 5 dk Santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.

2. Elde edilen pellet üzerine 700 µl eritrosit lizis solüsyonu eklendi. Tüp kuvvetlice çalkalanarak pellet çözündürüldü. 4500rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.

3. Pellet üzerine 1000 µl (1 ml) fizyolojik tampon (Ek-1.2) eklenerek çözündürüldü. 4500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.

4. Pellet üzerine 300 µl TE-9 (Ek-1.3) tamponu ilave edilerek çözündürüldü. Bunun üzerine 100 µl SDS (Ek-1.4) ile 20 µl Proteinaz-K (Ek-1.5) ilave edildi. Vorteks üzerinde tüp içeriği iyice karıştırıldı. 65 °C de 1-2 saat benmaride tutuldu. 20 dk aralıklarla tüp alt üst edildi.

5. İnkübasyon sonunda tüp içerisine 200 µl 6M NaCl (Ek-1.6) ilave edildi. Oluşan beyaz görünümlü yapıyı dağıtmak için tüp kuvvetlice çalkalandı ve 13500 rpm’de 7 dk santrifüj edildi.

6. Santrifüj sonunda süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Süpernatant tekrar 13500 rpm’de 7 dk santrifüj edildi.

7. Yine süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Tuzdan arınmış olan süpernatantın üzerine 900 µl %100’lük etil alkol eklendi. Tüp iyice karıştırıldı. Bu aşamada DNA ipliksi formunda görülebilmektedir.

8. Tüp içeriği 13500 rpm’de 7 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

9. Tüpün dibine yapışan DNA'yı kaldırmak için 1000 µl %70'lik etil alkol (Ek-1.7) eklendi. 13500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.

10. Süpernatant döküldükten sonra tüp ters çevrilip DNA'nın tüpe yapışması için 15 dk beklendi.

11. DNA'nın büyüklüğüne göre 50-100 µl TE (Tris-EDTA) (Ek-1.8) konuldu.

12. DNaz aktivitesini ortadan kaldırmak için 70-80 °C benmaride, 10-15 dk inkübasyona bırakıldı.

13. DNA örnekleri kullanılıncaya kadar +4 °C de muhafaza edildi. Uzun süreli saklamalar için ise -20 °C ye alındı.

3.3.2. Agaroz Jelin Hazırlanması

PZR sonrasında elde edilen ürünlerin varlığını kontrol etmek için kolay ve hızlı hazırlanması sebebi ile agaroz jellerden yararlanıldı. Genellikle %2 oranında agaroz jel hazırlandı.

1. Çalışmaya başlamadan önce jel kabı iyice temizlenip kurutulduktan sonra jel dökme kabına yerleştirildi. Bu kalıp, düzgün bir yüzeye kondu. Kuyucuk oluşturmak için kullanılan taraklar düzgünce yerlerine yerleştirildi.

2. Jel dökme kabının boyutları ile jelin kalınlığı dikkate alınarak hesaplama yapıldı. 8 X 9cm boyutundaki jel kabına % 2 konsantrasyonunda jel dökmek için erlenmayerde 1 g agaroz tartılıp, 50 ml 1 X TBE solüsyonu (Ek-2.1) eklendi. Mikrodalga fırında agaroz iyice eriyene kadar ısıtıldı.

3. Jelin içine 3 µl stok EtBr (Etidiyum bromür) (Ek-2.2) solüsyonundan ilave edildi. Etidiyum bromür kuvvetli mutajen ve toksik olduğundan bu boyayı içeren çözeltilerle çalışırken her zaman eldiven kullanıldı.

4. Agaroz çözeltisi, sıcaklığı 45-50 °C'ye (el yakmayacak sıcaklığa) gelinceye kadar soğutuldu.

5. Ilık agaroz çözeltisi hava kabarcığı oluşturulmadan dikkatlice jel dökme kabına döküldü.

6. Jel, oda sıcaklığında yaklaşık 30-45 dakikada polimerize oldu.

7. Jel elektroforez tankına alındı, üzerini örtecek kadar 1 X TBE tamponu ilave edildi. Taraklar dikkatlice çekilerek yükleme yapmak için kuyucuklar oluşturuldu.

3.3.3. Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Kontrol edilmek istenen DNA örnekleri jel yükleme tamponu (Loading dye) (Ek-2.3) ile birlikte yüklendi.

Jel yükleme (veya DNA yükleme) tamponu;

- Örneğin yoğunluğunu arttırarak DNA'nın kuyucuğa düzgün olarak damlamasını sağlar.
- Örneği renklendirerek kuyulara yüklenme işlemini basitleştirir.
- Elektriksel alanda göç hareketinin takip edilmesini kolaylaştırır.
- Jelin sağındaki veya solundaki ilk kuyuya moleküler ağırlığı bilinen marker DNA'dan 5 µl yüklendi. Mikropipet ile 5 µl PZR ürünü ile 1 µl Bromfenol mavisi içeren 6X yükleme tamponu karıştırıldı. Toplamı 6 µl olan karışım kuyucuklara yüklendi. 100 voltta 60 dakika elektrik akımına maruz bırakılarak yürütüldü.
- Jel UVİdoc cihazında ultraviyole ışık altında görüntülendi ve jel görüntüleri diskete kaydedildi.

3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yönteminin Uygulanması

PZR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı in-vitro DNA sentez yöntemidir.

PZR reaksiyonunun hazırlanmasında temel olarak sırasıyla şu basamaklar izlendi:

- Reaksiyonda kullanılacak DNA'lar ve çözeltiler -20°C'tan alınıp çözündürüldü.
- 200 µl'lik PZR tüpleri üzerlerine örnek kodu yazılarak hazırlandı.
- Tüm DNA örnekleri ve çözeltiler önce vortekslendi, daha sonra tüpün duvarındaki tüm damlaları toplamak amacıyla kısa bir süre santrifüj edildi.
- Reaksiyon hacmini tamamlamak için steril bidistile su içeren bir ampül kullanıldı.
- PZR miks hazırlamak için 200 µl'lik PZR tüpüne daha önce hesap edilen miktarlarda PZR tamponu, primerler, dNTP miks ve Taq polimeraz eklendi.
- Tüp önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.

- Kodlanmış her bir PZR tüpüne önceden hesap edilen miktarlarda su ve kodunu taşıdıkları DNA eklendi.
- Daha sonra PZR miks tüplere eşit olarak dağıtıldı.
- Böylece tüplerin her birine tüm PZR bileşenleri eklenmiş oldu.
- Tüpler önce vorteklendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- Tüpler önceden programlanmış thermal cyclers'a yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

3.3.4.1 IL-10 Geni 2849 Promotor Bölgesi için PZR Yönteminin Uygulanması

Çalışmamızda IL-10 geninin 2849 promotor bölgesini çoğaltmak için de Groot¹⁶ ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları primerler seçilmiştir. Kullanılan primer çiftlerinin dizileri aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. IL-10 geninin 2849 promotor bölgesi amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri¹⁶

Primer F	5'-CTGTAATCTCAGCACTCTGG -3'
Primer R	5'-ATAGGTACCAAGTCTGGCCCTTGAA -3'

Örneklerimizin uygun amplifikasyon koşullarını saptamak için çeşitli denemeler yapıldı. Primerlerin, Taq polimerazın ve dNTP'nin farklı konsantrasyonları ile PZR programında farklı ısı döngüleri ve annealing (yapışma) ısıları denendi; her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutuldu. Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği koşullar, bütün PZR reaksiyonları için kullanıldı.

PZR reaksiyonunu gerçekleştirmek için kullanılan malzemelerin tümü ticari olarak satın alınmıştır. Amplifiye olan ürünler ileri ki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C de saklandı.

Çizelge 3.2. IL-10 geni 2849 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
10X PZR Tamponu	2,5 µl	1 X PZR Tamponu
dNTP	0,25 µl	25 mM
Taq Polimeraz enzimi	0,5 µl	0,05 U/ µl
Primer F	1 µl	10 pmol
Primer R	1 µl	10 pmol
Genomik DNA (1/10 sulandırılmış)	4 µl	100-200 ng
Bidistile Su	15,75 µl	
Toplam Hacim	25 µl	

Çizelge 3.3. IL-10 geni 2849 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1. Ön Denatürasyon	94.0 °C	10 dk
2. Denatürasyon	94.0 °C	30 sn
3. Yapışma (Annealing)	60.0 °C	30 dk
4. Sentez (Extention)	72.0 °C	30 sn
5. Her seferinde 2. döngüye giderek toplam 35 döngü		
6. Final uzama (Final Extention)	72.0 °C	10 dk
7. Saklama	4.0 °C	Uzun süre

3.3.4.2. ADE Geni İntron 16/Ekzon 17 İnsersiyon/Delesyon Polimorfizmi için PZR Yönteminin Uygulanması

Çalışmamızda ADE geni insersiyon/delesyon polimorfizmini tespit edebilmek için iki ayrı PZR'den (PZR 1, PZR 2) oluşan yöntem kullanılmıştır. Yöntemde PZR amplifikasyonu için Mando ve arkadaşlarının kullandıkları primerler seçilmiştir. Kullanılan primer çiftlerinin dizileri aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. ADE geni intron 16 bölgesi amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri¹⁶

PZR 1	Primer F	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT -3'
	Primer R	5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'
PZR 2	Primer F	5'-TTTGAGACGGAGTCTCGCTC-3'
	Primer R	5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'

Örneklerimizin uygun amplifikasyon koşullarını saptamak için çeşitli deneyler yapıldı. Primerlerin, Taq polimerazın ve dNTP'nin farklı konsantrasyonları ile PZR 1 ve PZR 2 programları için ayrı ayrı farklı ısı döngüleri ve annealing (yapışma) ısıları denendi; her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutuldu. PZR 1 ve PZR 2 için optimal amplifikasyonların gerçekleştiği koşullar PZR reaksiyonları için kullanıldı

Çizelge 3.5. ADE geni intron 16 bölgesi PZR 1 ve PZR 2 için optimal amplifikasyonların gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (µl)		Final Konsantrasyon
	PZR 1	PZR 2	
10X PZR Tamponu	2,5 µl	2,5 µl	1 X PZR Tamponu
dNTP	0,6 µl	0,6 µl	10 mM
Taq Polimeraz enzimi	0,5 µl	0,5 µl	0,05 U/ µl
Primer F	1 µl	1 µl	10 pmol
Primer R	1 µl	1 µl	10 pmol
Genomik DNA (1/10 sulandırılmış)	4 µl	4 µl	100-200 ng
Bidistile Su	15,4 µl	15,4 µl	
Toplam Hacim	25 µl	25 µl	

Çizelge 3.6. ADE geni intron 16 bölgesi PZR 1 ve PZR 2 için optimal amplifikasyonların gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri

Döngüler	Sıcaklık		Süre	
	PZR 1	PZR 2	PZR 1	PZR 2
1. Ön Denatürasyon	94.0 °C	94.0 °C	5 dk	5 dk
2. Denatürasyon	94.0 °C	94.0 °C	1 dk	1 dk
3. Yapışma (Annealing)	58.0 °C	60.0 °C	1 dk	75 sn
4. Sentez (Extention)	72.0 °C	72.0 °C	2 dk	1 dk
5. Toplam döngü sayısı (2. döngüden itibaren)	30	40		
6. Final uzama (Final Extention)	72.0 °C	72.0 °C	4 dk	10 dk
7. Saklama	4.0 °C	4.0 °C	Uzun süre	Uzun süre

PZR sonucunda insersiyona sahip allel I, delesyona sahip allel D olarak adlandırıldı. PZR 1 sonucunda homozigot II (insersiyon-insersiyon) genotipi olan bireylerde 490 bç'lik bir bant, heterozigot DI (delesyon-insersiyon) genotipi olan bireylerde 190 bç ve 490 bç'lik iki bant ve homozigot DD (delesyon-delesyon) genotipi olan bireylerde 190 bç'lik tek bant görülecektir.

Ancak küçük olan D allel amplifikasyonunun tercih edilmesi ihtimalinden dolayı heterozigot DI genotiplerinin homozigot DD genotipi olarak yanlış kodlanması durumu ortaya çıkabilmektedir. Bu sebeple homozigot DD genotipinin doğrulanması için DD olarak bulunan her örnek ikinci PZR'ye (PZR 2) tabi tutuldu. PZR 2'de reverse primer sabit tutulurken forward primer sadece I allelinin varlığında amplifiye olan ancak D allelinin varlığında amplifiye olmayan bir primerle değiştirildi. Böylece I allelinin varlığında 408 bç'lik bir bant elde edilecektir.

Örneklerin amplifikasyonu ve elde edilen bantların kontrolü önce anlatıldığı gibi (3.3.3), örnekler agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) Yönteminin Uygulanması

Agaroz jel elektroforeziyle IL-10 geni 2849 promotor bölgesi için amplifikasyon kontrolü yapılacak örnekler, de Groot¹⁶ ve arkadaşlarının yöntemine göre AlwI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim reaksiyonuna alındı. Kesim reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için aşağıda belirlenen oranlarda reaksiyon bileşenleri hazırlandı.

Çizelge 3.7. IL-10 geni 2849 promotor polimorfizmleri RFLP reaksiyon koşulları

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (µl)
Tampon	2,5 µl
Restriksiyon Enzimi	0,5 µl
Amplifiye Ürün (PZR ürünü)	10 µl
Steril Bidistile Su	7 µl
Toplam Hacim	20 µl
Reaksiyon Isısı	55 °C
Reaksiyon Süresi	17 saat

Amplifiye olmuş örneklerin kesim reaksiyonu AlwI restriksiyon endonükleaz ile aşağıda belirlenen ısı döngülerine göre gerçekleştirildi.

Çizelge 3.8. IL-10 geni 2849 promotor polimorfizmleri için optimal RFLP reaksiyonun gerçekleştiği RFLP programı ısı döngüleri

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1. Kesim Reaksiyonu	55.0 °C	17 saat
2. Enzim İnaktivasyonu	80.0 °C	1 saat (60 dk)

Enzim inaktivasyonundan sonra kesimler, jele uygulanan PZR ürününün izlenmesini sağlayan Bromfenol mavisi içeren 6X yükleme tamponu (Ek 2.3) ile karıştırılarak agaroz ve poliakrilamid jellere uygulamaya hazır hale getirildi. Bunun için 6X yükleme tamponundan 1 µl alınıp 5 µl kesim solüsyonu ile karıştırıldı.

3.3.5.1. IL-10 Geni 2849 Promotor Polimorfizminin Belirlenmesi için PZR Ürünlerinin AlwI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

AlwI, *Acinetobacter lwoffii* 'den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA' yı;

5'-GGATC(N)₄↓...-3'

3'-CCTAG(N)₅↑... -5'

dizisinden tanıyarak yapışkan uçlu kesim yapmaktadır. PZR ile elde edilen 590 bç'lik hedef gen bölgesi AlwI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede guanin içeren allel (G) AlwI kesim noktası taşımaktadır. Guaninden adenine (G→A) bir nükleotit değişimi varsa AlwI enziminin tanıma bölgesi bulunmaz (A alleli). Guanin nükleotitinden adenin nükleotitine değişimi olmayan (GG genotipli) bireylerde 305, 241 ve 44 bç'lik üç bant, heterozigot bireylerde (GA genotipli) 305, 285, 241 ve 44 bç'lik dört bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (AA genotipli) 305 ve 285 bç'lik iki bant görülecektir.

Örneklerde elde edilen kesim ürünleri 3.3.3'te anlatıldığı gibi, agaroz jelde ve aşağıdaki gibi poliakrilamid jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.3.6. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi

%12'lik Poliakrilamid jeli hazırlamak için şu ön hazırlıklar yapıldı:

- %30'luk stok Poliakrilamid çözeltisi (Ek-2.4) hazırlandı.
- %25'lik Amonyüm Persülfat (APS) çözeltisi (Ek-2.5) taze olarak hazırlandı.
- 5X TBE stok tamponu (Ek-2.1) hazırlanıp otoklavda steril edildi.
- Dikey elektroforez cihazı temizlenip saf sudan geçirildikten sonra, elektroforez camları %70'lik alkolle silinip kurutuldu.
- Camların arasına sızdırmayı önlemek üzere vazelinlenmiş spADER'lar yerleştirildi
- Arasına spADER'lar konmuş camlar aparata yerleştirildi ve vidaları sıkıştırıldı.
- 12 kuyuluk tarak, %70'lik alkolle silinerek camlar arasına yerleştirildi.

%12'lik jeli oluşturmak üzere

3.75 ml distile su

2.25 ml %40'luk akrilamid

1.5 ml 5X TBE tamponu

50 µl APS ve

5 µl TEMED eklenerek karıştırıldı.

- TEMED eklendikten sonra Poliakrilamit karışımı mümkün olduğunca çabuk enjektöre çekilip, enjektörle camların arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde enjekte edildi. Çünkü TEMED polimerizasyonu başlatıcı katalizör bileşendir.
- Polimerizasyon gerçekleşmesi için 15-20 dk beklendi.
- Polimerizasyon gerçekleştikten sonra aparat tankın içine yerleştirildi.
- Jelin alt ve üst sınırlarına temas edecek şekilde tanka 1X TBE tamponu eklendi.
- Tampon eklendikten sonra tarak düzgün şekilde çekildi.
- Her bir kuyuya, 1 µl yükleme tamponu ve 5 µl kesim ürünü karıştırılarak uygulandı.
- Kuyulardan birine kesim ürünü ile karşılaştırmak için markır (4 µl), birine de, kesim sonucu oluşan bantların kesilip kesilmediğini kontrol etmek amacıyla PZR ürünü uygulandı.
- Tankın kapağı kapatıldı, güç kaynağı çalıştırıldı ve 2 saat süre ile akım uygulandı.
- Süre sonunda jel, camların arasından alınarak 1X TBE de 0.5 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış EtBr çözeltisinde 3-5 dk boyandı.
- Boya artıklarının uzaklaştırılması amacıyla jel boya çözeltisinden çıkarılıp saf su içine alındı.
- Bir süre bekletildikten sonra saf sudan alınan jel, Uvitec görüntüleme cihazının içine yerleştirildi, ekrandan izlenerek fokus ayarı yapıldı ve görüntü diskete kaydedildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 15.0 paket programı kullanıldı. Hasta ve kontrol grubunun klinik özellikleri, ortalama ve standart sapmaları bulunarak değerlendirmeye alındı. Hasta ve kontrol grubu genotip dağılımlarında kodominant, dominant ve resesif modeller kullanıldı. Genotip ve allel frekansları Pearson's Ki kare testi kullanılarak tespit edildi. Tüm testlerde istatistiksel önem değeri $p \leq 0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniklerinde takip edilen 116 normal, 126 preeklampşik olmak üzere toplam 242 gebe kadın araştırmaya dahil edildi. Çalışmaya katılan tüm kadınların sistolik ve diastolik kan basıncı ve idrardaki protein miktarları ölçüldü. Tüm gebelerin yaşı, kilosu, gebelik sayısı, gebelik haftası, kronik hipertansif hasta olup olmadıkları yapılan anketlerle sorgulandı. Toplanan kanlardan tuzla çöktürme yöntemiyle elde edilen DNA'lar ile PZR yöntemi kullanılarak IL-10 geni 2849 promotor bölgesi ve ADE geni intron 16 bölgesi insersiyon/delesyon polimorfizmi araştırıldı.

4.1. Preeklampsi ile İlgili Genel Kriterler

Hasta ve kontrol grubu; yaş, kilo, gebelik sayısı, gebelik haftası, sistolik ve diastolik basınç ortalamaları bakımından değerlendirildi. Hasta grubunda kontrol grubuna göre yaştan ve vücut ağırlığının daha yüksek olduğu, ancak gebelik haftasının daha düşük olduğu görülmektedir. Gebelik sayısı iki grupta benzer çıkmıştır. Hasta gebelerde sistolik ve diastolik basınç ortalamalarının preeklampsi tanı kriterlerine uygun olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol grubunun klinik özellikleri ve ortalamaları

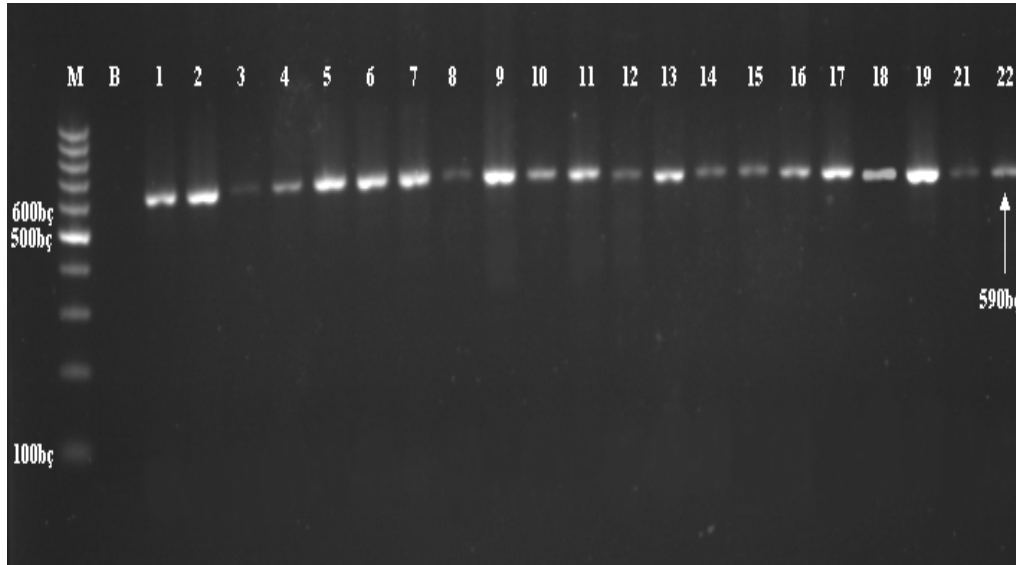
Hasta ve Kontrol	Yaş Ortalaması (Yıl)	Ağırlık Ortalaması (kg)	Gebelik Sayısı	Gebelik Haftası	Sistolik Basınç	Diastolik Basınç
Hasta	29,00±7,044	78,89±10,201	2,29±1,597	34,615±4,6985	151,56±16,116	98,85±12,934
Kontrol	27,41±5,317	77,01±9,985	2,27±1,639	37,060±4,0954	110,54±10,000	71,63±8,044

Hasta ve kontrol grubunda bireyler tespit edilirken, gebeliğe bağlı hipertansiyon çalışmalarında, sınıflandırma ve tanımlar için yaygın olarak kullanılan raporlar ASSHP (Australasian Society for the Study of Hypertension in Pregnancy) ve NHBPEP (National High Blood Pressure Education Program) dikkate alınmıştır. Hasta grubu seçilirken gebeliğin 20. haftasından sonra, daha önce normal kan basıncı ölçülerine sahip (normotensif) kadınlarda en az 6 saat ara ile yapılan iki ölçümde sistolik kan basıncının 140 mmHg ve üzeri ve diastolik kan basıncının 90 mmHg ve üzerinde olmasına ve bunun yanı sıra 24 saatlik idrar ölçümünde 300mg/L ve üzeri protein saptanması veya 6 saatlik arayla rasgele alınan en az 2 idrar örneğinde +1 veya daha yüksek proteinüri olmasına dikkat edilmiştir.

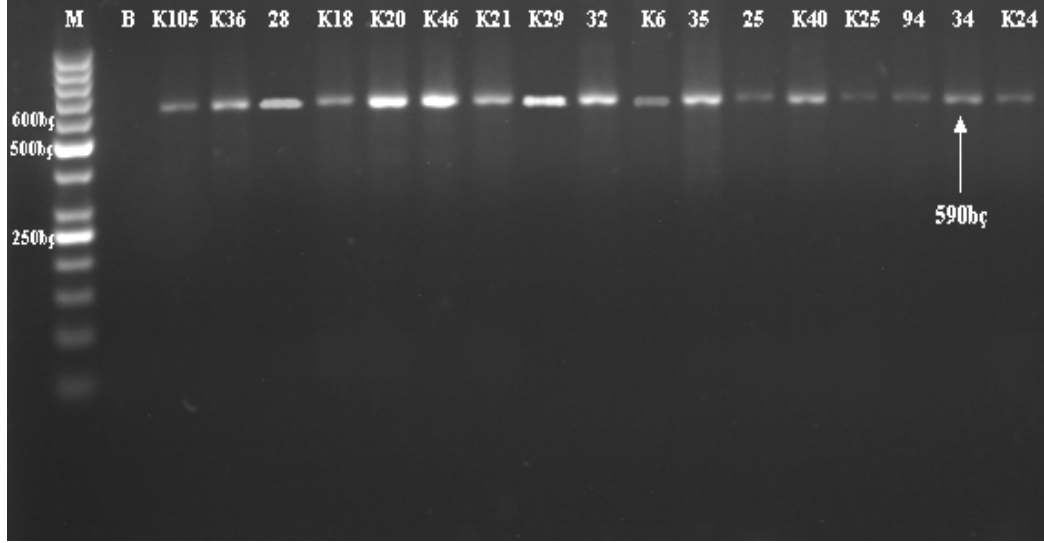
4.2. Moleküler Genetik Analizler

4.2.1. IL-10 Geni 2849 Promotor Polimorfizmi için Genetik Analizler

IL-10 geni 2849 promotor bölgesinin 590 bç'lik bölümü PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Bazı hasta ve kontrollerin PZR yöntemi ile çoğaltılmış IL-10 2849 promotor bölgesinin görüntüleri Şekil 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.



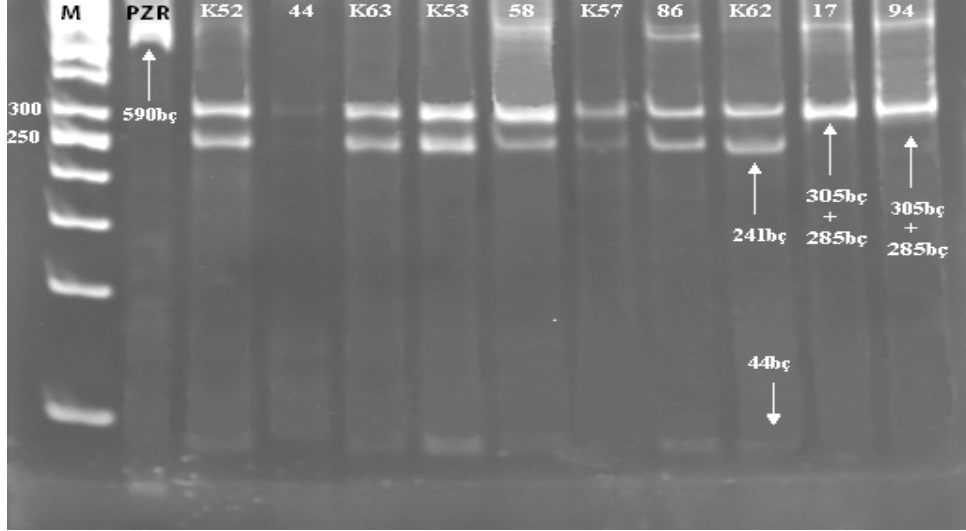
Şekil 4.1. Bazı hastaların PZR yöntemi ile çoğaltılan IL-10 2849 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri. M: marker DNA'lar, B: blank, Bantlar 590 bç büyüklüğündedir.



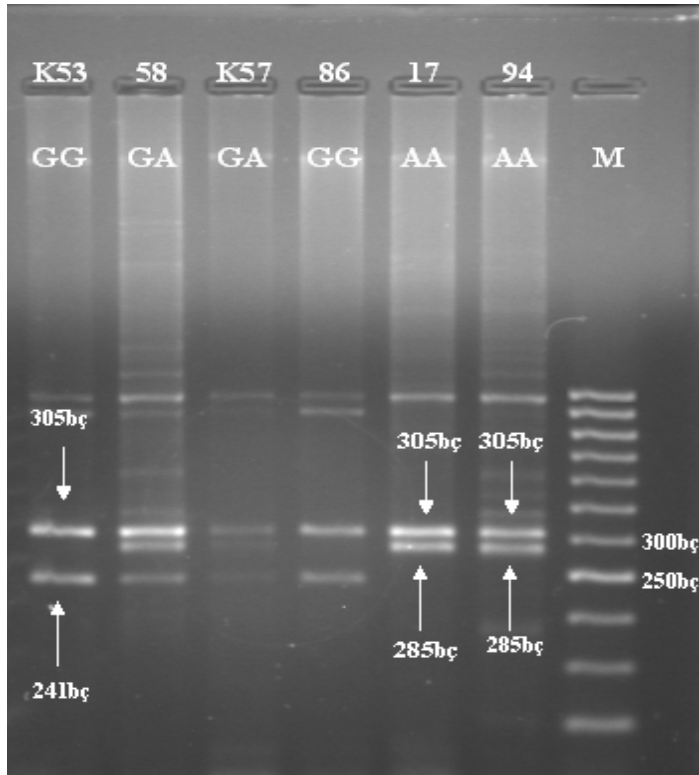
Şekil 4.2. Bazı hasta ve kontrollerin PZR yöntemi ile çoğaltılan IL-10 2849 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri. M: marker DNA, B: blank, K: kontrolleri göstermektedir.

PZR yöntemi ile çoğaltılan IL-10 geni 2849 promotor bölgesinin 590 bp'lik bölgesi RFLP yöntemi kullanılarak AlwI restriksiyon enzimiyle kesildi. AlwI enzim kesimi sonucu guaninden → adenine (G>A) nükleotit değişimi olmayan homozigot bireylerde (GG genotipli) 305, 241 ve 44 bp'lik üç bant, heterozigot bireylerde (GA genotipli) 305, 285, 241 ve 44 bp'lik dört bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (AA genotipli) 305 ve 285 bp'lik iki bant oluştu (Şekil 4.3, 4.4). GG ve GA genotipli bireylerde görülmesi beklenen kesim ürünlerinden 44 bp'lik bandın agaroz jelde görülememesinden dolayı poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülerek bantın görüntüsü elde edildi (Şekil 4.3, 4.5, 4.7). Bu nedenle GG genotipli K53 ve 86 ile GA genotipli 58 ve K57 numaralı bireylerde 44 bp'lik bantlar sadece Şekil 4.3'teki poliakrilamid jel görüntüsünde görülmüş, Şekil 4.4'tek agaroz jel görüntüsünde görülememiştir. Aynı şekilde GG genotipli 43, 118, K39, 97, 27 numaralı bireylerde 44 bp'lik bant Şekil 4.5'teki poliakrilamid jel görüntüsünde görülmüş, Şekil 4.6'daki agaroz jel görüntüsünde görülememiştir. Bunun yanı sıra GA ve AA genotipli bireylerde beklenen ve poliakrilamid jel elektroforezinde ayrılamayan 305 ve 285 bp'lik bantlar da agaroz jel elektroforezinde yürütülerek belirlendi (Şekil 4.4, 4.6, 4.8). GA genotipli 58 ve K57 ile AA genotipli 17 ve 94 numaralı hasta bireylerde 305 ve 285 bp'lik bantlar Şekil 4.3'teki poliakrilamid jel de birbirlerinden ayrılamamışken, Şekil 4.4'teki agaroz jel de ayrılmışlardır. Aynı şekilde AA genotipli 123 numaralı bireyde

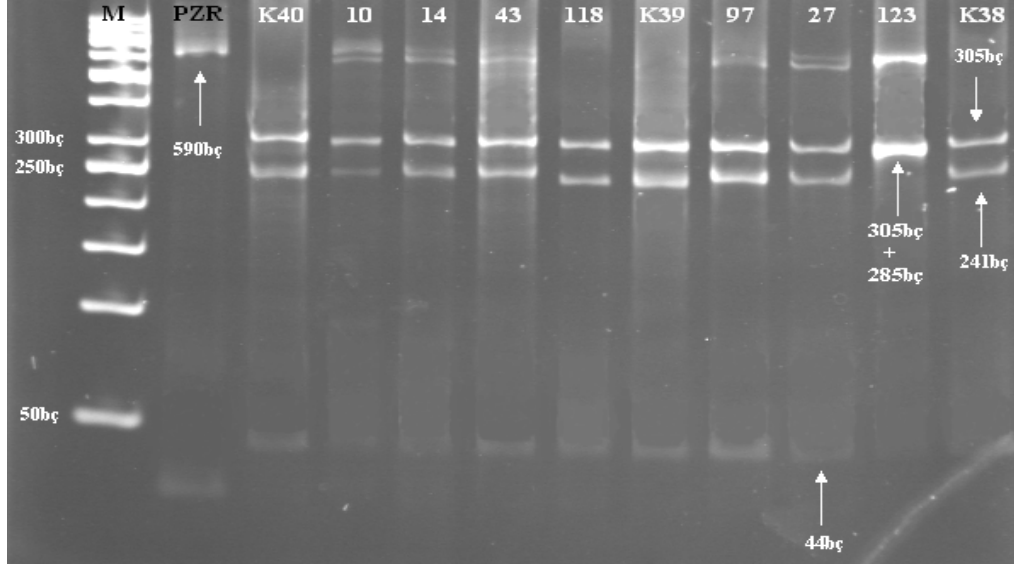
305 ve 285 bç'lik bantlar Şekil 4.5'teki poliakrilamid jel görüntüsünde birbirlerinden ayrılmamışken, Şekil 4.6'daki agaroz jel görüntüsünde ayrılmışlardır.



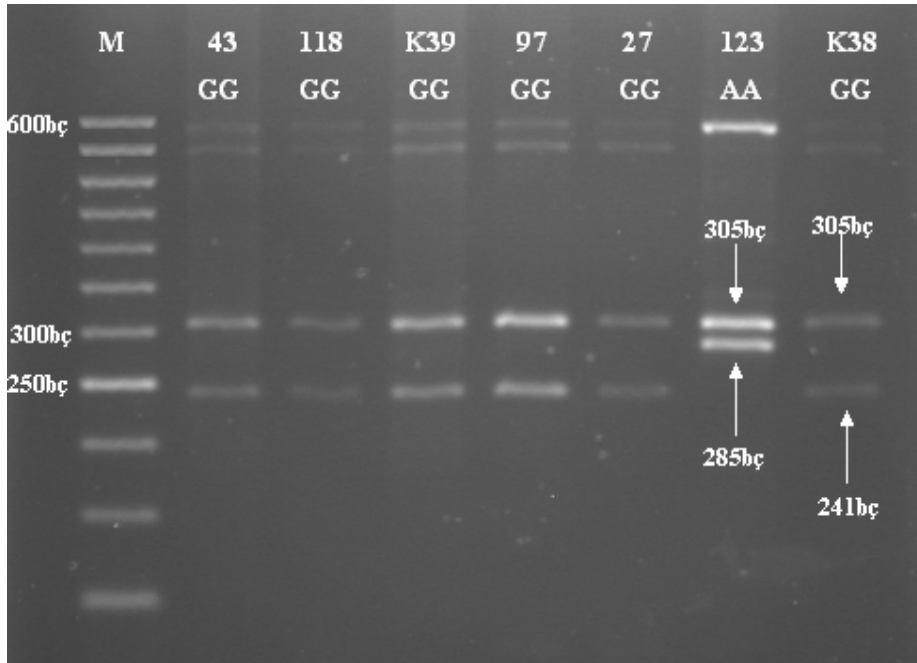
Şekil 4.3. Bazı hasta ve kontrollerin RFLP yöntemi ile AlwI restriksiyon enzimi kesim bantlarının poliakrilamid jel görüntüsü. M: marker DNA, PZR: polimeraz zincir reaksiyonu ürünü, K: kontrolleri göstermektedir.



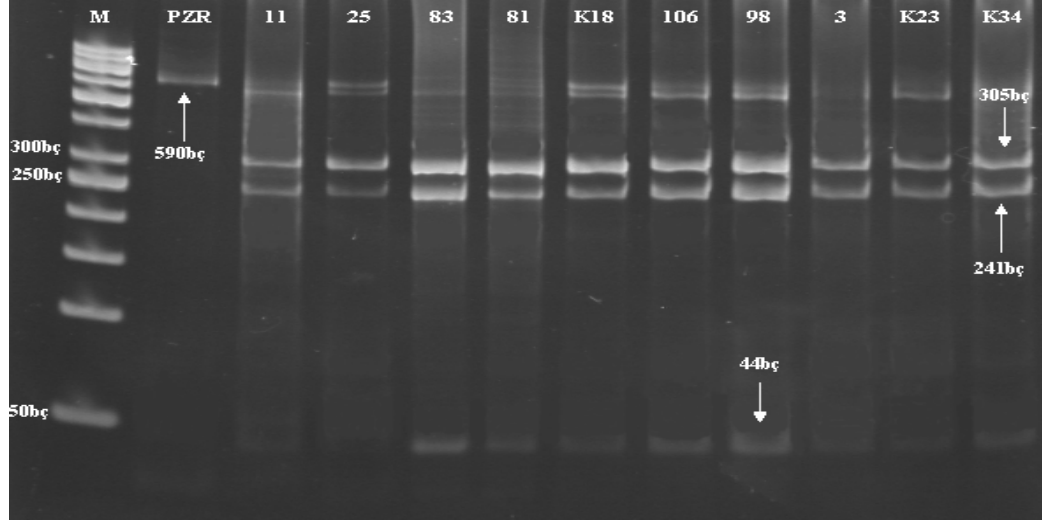
Şekil 4.4. Şekil 4.3'teki bazı hasta ve kontrollere ait agaroz jel görüntüsü ve genotip dağılımı. M: marker DNA, K: kontrolleri göstermektedir.



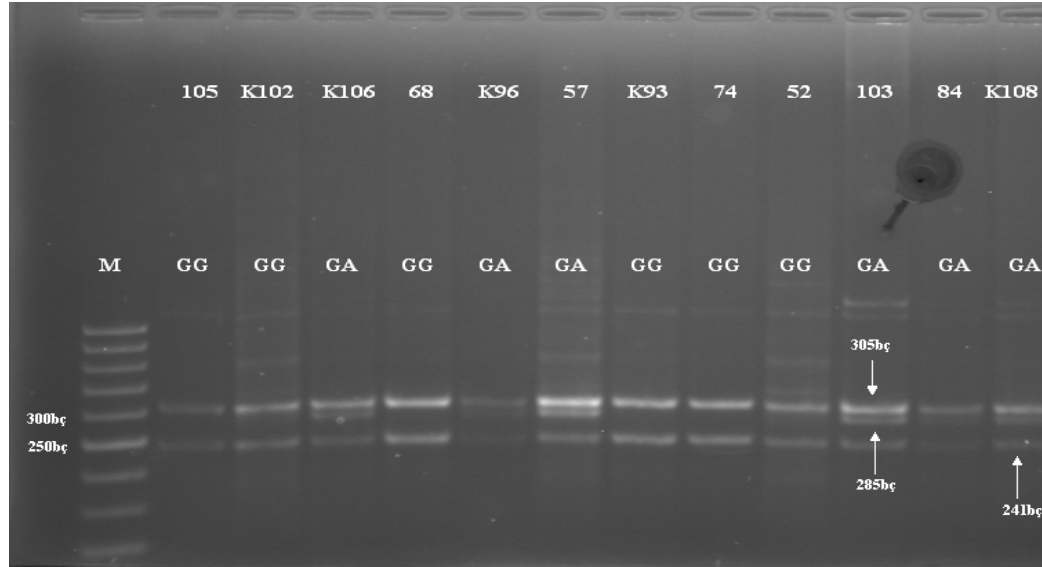
Şekil 4.5. Bazı hasta ve kontrollerin RFLP yöntemi ile AluI restriksiyon enzimi kesim bantlarının poliakrilamid jel görüntüsü. M: marker DNA, PZR: polimeraz zincir reaksiyonu ürünü, K: kontrolleri göstermektedir.



Şekil 4.6. Şekil 4.5'teki bazı hasta ve kontrollere ait agaroz jel görüntüsü ve genotip dağılımı. M: marker DNA, K: kontrolleri göstermektedir.



Şekil 4.7. Bazı hasta ve kontrollerin RFLP yöntemi ile AlwI restriksiyon enzimi kesim bantlarının poliakrilamid jel görüntüsü. M: marker DNA, PZR: polimeraz zincir reaksiyonu ürünü, K: kontrolleri göstermektedir.



Şekil 4.8. Bazı hasta ve kontrollerin RFLP yöntemi ile AlwI restriksiyon enzimi kesim bantlarının agaroz jel görüntüsü ve genotip dağılımı. M: marker DNA, K: kontrolleri göstermektedir.

Çalışmamıza dahil olan 116 normal gebe kadının IL-10 geni 2849 promotor bölgesi polimorfizmleri açısından; 87'sinin GG ve 29'unun GA genotipli olduğu yapılan RFLP analiziyle belirlenmiştir. Çalışmamıza dahil edilen 126 preeklampatik kadının ise; 95'nin GG, 26'nın GA ve 5'nin AA genotipli olduğu RFLP analiziyle tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin kodlarına göre sahip oldukları genotipler Çizelge 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Hastaların IL-10 geni 2849 promotor bölgesi için AlwI enzimi kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri.

Hasta Numarası	IL-10 2849	Hasta Numarası	IL-10 2849	Hasta Numarası	IL-10 2849	Hasta Numarası	IL-10 2849
1	GG	33	GG	65	GG	97	GG
2	GG	34	GA	66	GA	98	GG
3	GG	35	GG	67	GG	99	GG
4	GG	36	GG	68	GG	100	GA
5	GA	37	GG	69	GA	101	GG
6	GG	38	GG	70	GG	102	GA
7	GG	39	GG	71	GG	103	GA
8	GG	40	GG	72	GG	104	GG
9	GG	41	GG	73	GG	105	GG
10	GA	42	GG	74	GG	106	GG
11	GG	43	GG	75	GG	107	GG
12	GA	44	GG	76	GG	108	GG
13	GG	45	GG	77	AA	109	GA
14	GA	46	GG	78	GG	110	GA
15	GG	47	AA	79	GG	111	GG
16	GG	48	GG	80	GG	112	GG
17	AA	49	GA	81	GA	113	GG
18	GG	50	GG	82	GG	114	GG
19	GG	51	GG	83	GG	115	GG
20	GA	52	GG	84	GA	116	GG
21	GG	53	GG	85	GA	117	GA
22	GG	54	GG	86	GG	118	GG
23	GG	55	GA	87	GG	119	GA
24	GG	56	GG	88	GG	120	GA
25	GA	57	GA	89	GG	121	GG
26	GG	58	GA	90	GG	122	GG
27	GG	59	GA	91	GG	123	AA
28	GG	60	GG	92	GG	124	GG
29	GG	61	GG	93	GG	125	GG
30	GG	62	GG	94	AA	126	GG
31	GG	63	GG	95	GG		
32	GG	64	GG	96	GA		

Çizelge 4.3. Kontrollerin IL-10 geni 2849 promotor bölgesi için AlwI enzimi kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri.

Kontrol Numarası	IL-10 2849	Kontrol Numarası	IL-10 2849	Kontrol Numarası	IL-10 2849	Kontrol Numarası	IL-10 2849
K1	GG	K30	GG	K59	GA	K88	GG
K2	GG	K31	GG	K60	GG	K89	GG
K3	GA	K32	GA	K61	GG	K90	GA
K4	GG	K33	GG	K62	GG	K91	GG
K5	GG	K34	GG	K63	GA	K92	GA
K6	GG	K35	GG	K64	GG	K93	GG
K7	GG	K36	GG	K65	GG	K94	GG
K8	GG	K37	GA	K66	GG	K95	GA
K9	GG	K38	GG	K67	GA	K96	GA
K10	GG	K39	GG	K68	GG	K97	GG
K11	GG	K40	GG	K69	GG	K98	GG
K12	GG	K41	GA	K70	GG	K99	GG
K13	GG	K42	GG	K71	GG	K100	GG
K14	GG	K43	GG	K72	GG	K101	GG
K15	GG	K44	GG	K73	GG	K102	GG
K16	GG	K45	GG	K74	GG	K103	GG
K17	GA	K46	GG	K75	GG	K104	GG
K18	GA	K47	GG	K76	GG	K105	GG
K19	GA	K48	GG	K77	GG	K106	GA
K20	GG	K49	GG	K78	GG	K107	GG
K21	GG	K50	GG	K79	GG	K108	GA
K22	GG	K51	GG	K80	GA	K109	GG
K23	GG	K52	GG	K81	GA	K110	GA
K24	GA	K53	GG	K82	GG	K111	GA
K25	GG	K54	GG	K83	GG	K112	GG
K26	GG	K55	GA	K84	GG	K113	GG
K27	GG	K56	GA	K85	GA	K114	GG
K28	GA	K57	GA	K86	GA	K115	GA
K29	GG	K58	GG	K87	GG	K116	GA

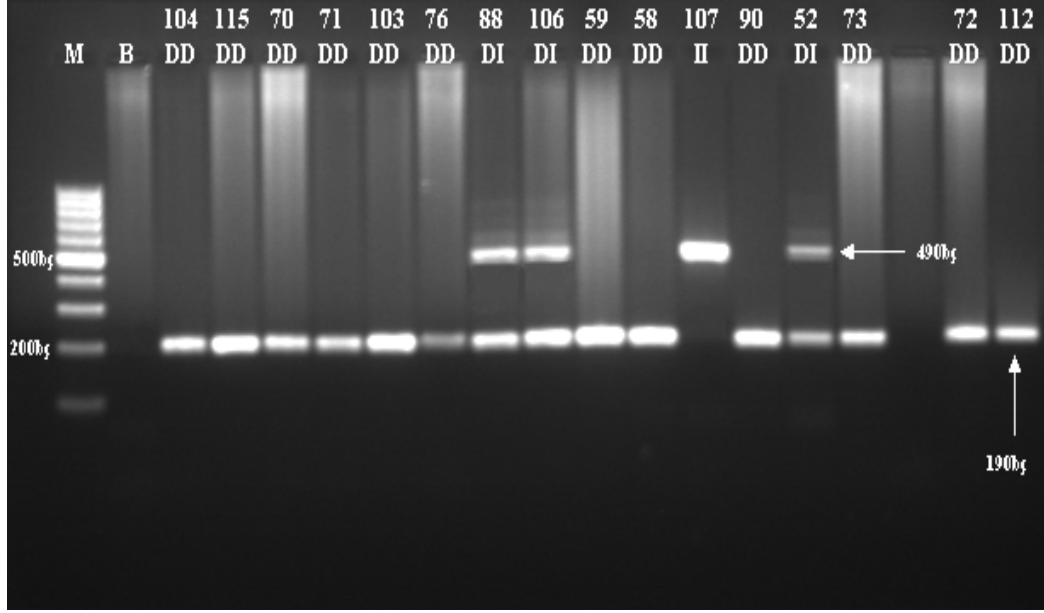
IL-10 geni 2849 promotor polimorfizmlerinin genotip dağılımları ve allel frekansları SPSS 15.0 Ki kare testi kullanılarak analiz edilmiştir (Çizelge 4.4). Hasta ve kontrol grupları birlikte değerlendirildiğinde GG ve GA genotipleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ancak AA genotipine bakıldığında hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,030$). AA genotipinin kontrol grubunda hiç rastlanmayıp sadece hasta grubunda görülmesi, preeklampsi öyküsünün bu genotiple ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Allel frekansları karşılaştırıldığında ise hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır ($p=0,564$).

Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol gruplarının IL-10 geni 2849 promotor bölgesi için genotip dağılımları ve allel frekansları

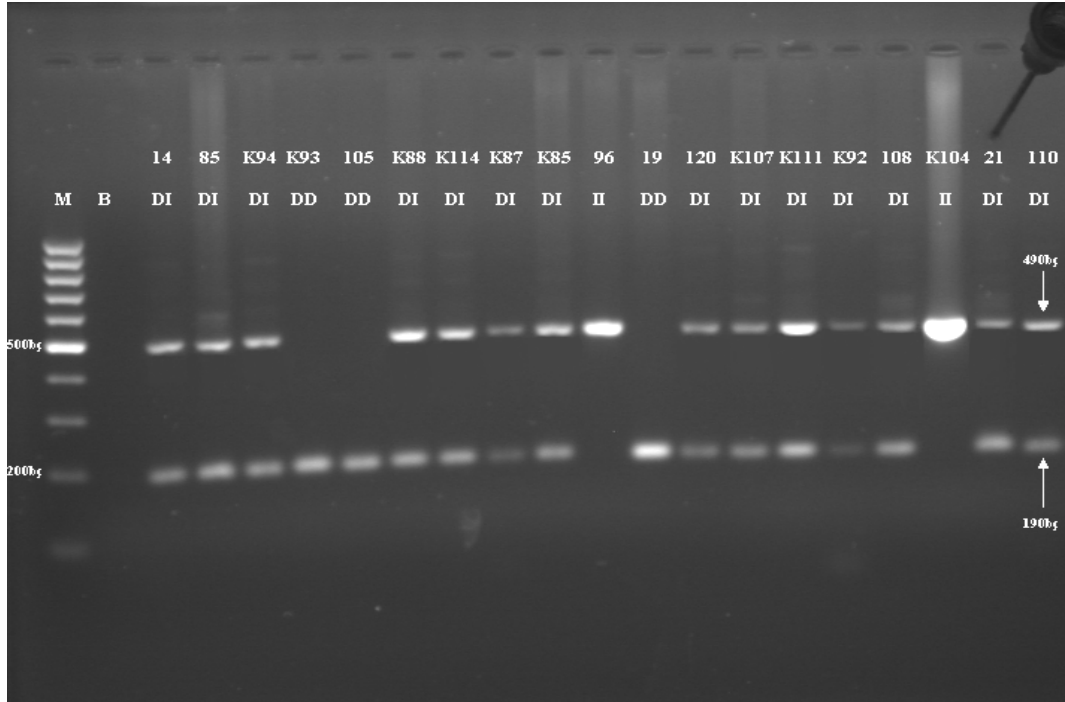
	<u>Kontrol</u> n=116 Dağılım	<u>Preeklampsi</u> n=126 Dağılım	P Değeri
GG GA AA	87 (%75,0) 29 (%25,0) 0 (%0,0)	95 (%75,4) 26 (%20,6) 5 (%4,0)	.030
GG+GA AA	116 (%100,0) 0 (%0,0)	121 (%96,0) 5 (%4,0)	.010
GG GA+AA	87 (%75,5) 29 (%25,5)	95 (%75,4) 31 (%24,6)	.943
G A	203 (%87,5) 29 (%12,5)	216 (%85,7) 36 (%14,3)	.564

4.2.2. ADE Geni İtron 16 I/D Polimorfizmi için Genetik Analizler

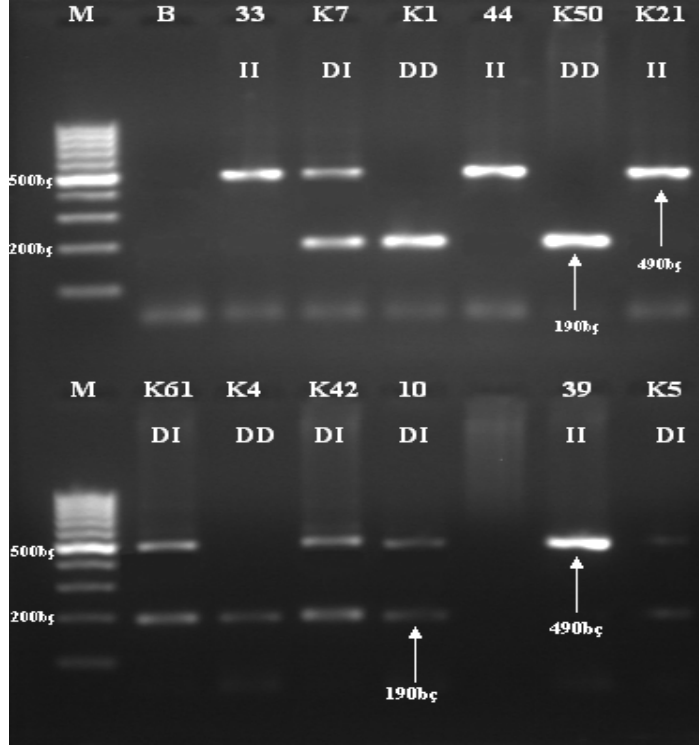
ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon polimorfizminin tespiti için iki ayrı PZR yapılmıştır. İlk PZR (PZR 1)'de homozigot DD genotipine sahip bireylerde 190 bp'lik tek bant, heterozigot DI genotipine sahip bireylerde 190 bp ve 490 bp'lik iki bant ve homozigot II genotipine sahip bireylerde 490 bp'lik tek bant elde edilmiştir. Bazı hasta ve kontroller için PZR 1'de elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 4.9, 4.10, 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.9. Bazı hastaların ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon polimorfizmi PZR 1 agaroz jel görüntüsü. M: marker DNA, B: blank.



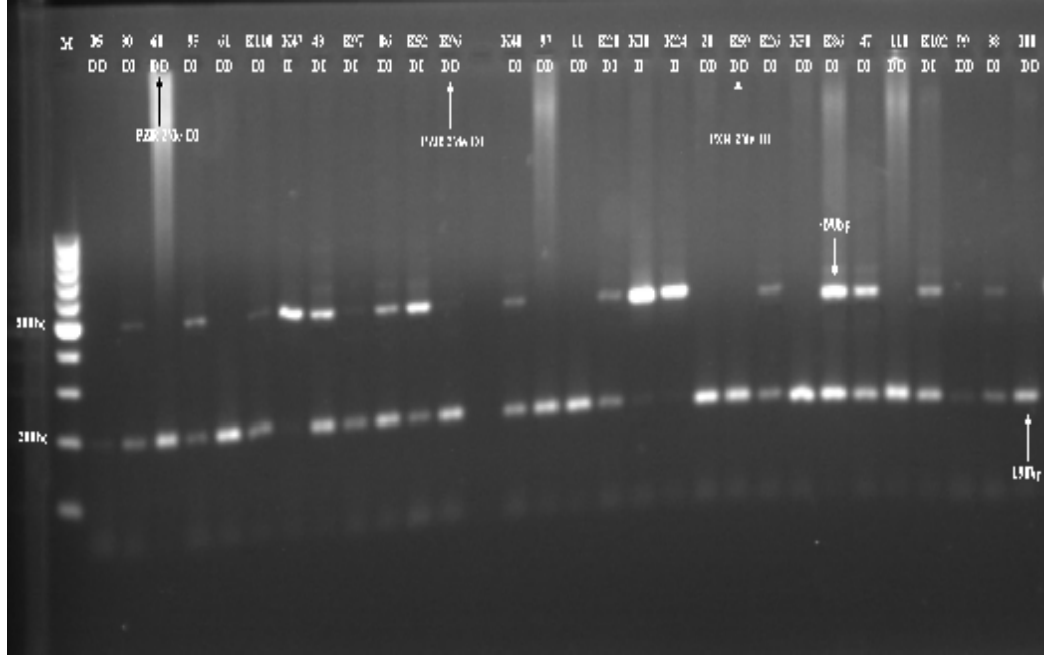
Şekil 4.10. Bazı hasta ve kontrollerin ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon polimorfizmi PR 1 agaroz jel görüntüsü. M; marker DNA, B; blank, K: kontrolleri göstermektedir.



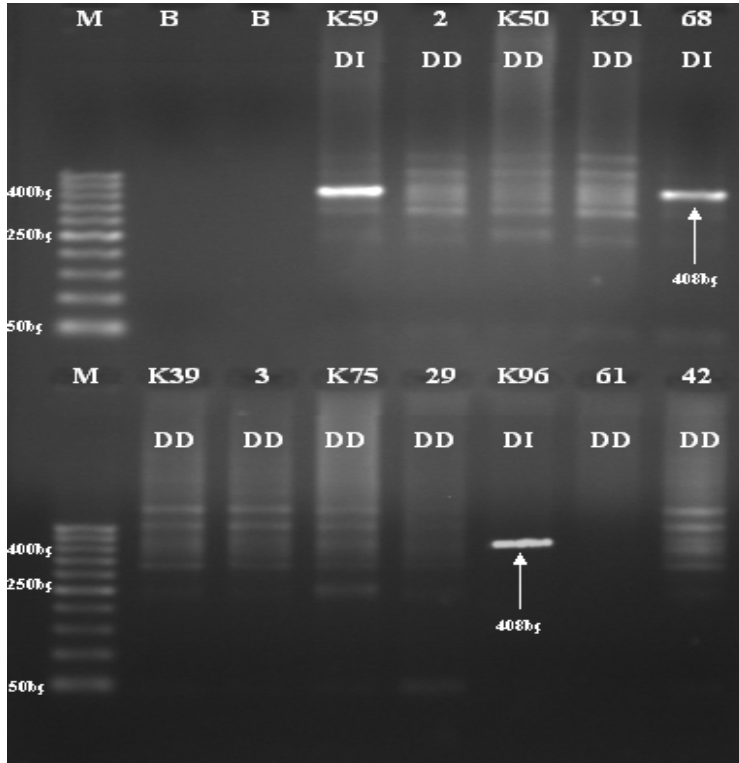
Şekil 4.11. Bazı hasta ve kontrollerin ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon polimorfizmi PZR 1 agaroz jel görüntüsü. M; marker DNA, B; blank.

PZR 1’de küçük olan D allel amplifikasyonunun tercih edilmesi ihtimalinden dolayı heterozigot DI genotiplerinin homozigot DD genotipi olarak yanlış kodlanması durumu ortaya çıkabilmektedir. Bu sebeple homozigot DD genotipinin doğrulanması için PZR 1’de DD olarak belirlenen her örnek ikinci PZR (PZR 2)’ye tabi tutuldu. PZR 2’de heterozigot DI olan bireylerde 408 bp’lık bant elde edilirken homozigot DD olan bireylerde herhangi bir amplifikasyon olmamıştır (Şekil 4.12, 4.13). Örneğin PZR 1’de homozigot DD olarak belirtilen 68, K59, K96 örneklerinin ikinci PZR’sinde (PZR 2’de) 408 bp’lık bandın ortaya çıkması bu bireylerin DI olduklarını göstermiştir (Şekil 4.12, 4.13).

Çalışmamıza dahil olan 114 normal gebe kadının ADE geni intron 16 bölgesi insersiyon/delesyon polimorfizmleri açısından; 30’nun DD, 68’nin DI ve 16’sının II genotipli olduğu yapılan PZR analizleriyle belirlenmiştir. Çalışmamıza dahil olan 120 preeklamptik kadının ise; 52’sinin DD, 51’nin DI ve 17’sinin II genotipli olduğu yapılan PZR analizleriyle tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin kodlarına göre sahip oldukları genotipler Çizelge 4.5 ve 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.12. Bazı hasta ve kontrollerin ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon polimorfizmi PZR 1 agaroz jel görüntüsü. M: marker DNA, K: kontrolleri göstermektedir.



Şekil 4.13. Bazı hasta ve kontrollerin ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon polimorfizmi PZR 2 agaroz jel görüntüsü. M: marker DNA, B: blank, K: kontrolleri göstermektedir.

Çizelge 4.5. Hastaların ADE geni intron 16 bölgesi insersiyon/delesyon polimorfizmlerine göre genotipleri.

Hasta Numarası	IL-10 2849	Hasta Numarası	IL-10 2849	Hasta Numarası	IL-10 2849	Hasta Numarası	IL-10 2849
1	DD	31	DI	61	DD	91	DD
2	DD	32	DD	62	DD	92	DI
3	DD	33	II	63	DD	93	DD
4	II	34	DD	64	DI	94	II
5	DI	35	DD	65	DD	95	DI
6	DI	36	DI	66	DI	96	II
7	DD	37	DI	67	DI	97	DD
8	II	38	DI	68	DI	98	DD
9	II	39	II	69	DD	99	DD
10	DI	40	II	70	DD	100	DD
11	DD	41	DI	71	DD	101	II
12	DD	42	DD	72	DD	102	DI
13	DD	43	DI	73	DD	103	DD
14	DI	44	II	74	DI	104	DD
15	DD	45	II	75	DI	105	DD
16	DI	46	DI	76	DD	106	DI
17	DI	47	DI	77	II	107	II
18	DI	48	DD	78	DI	108	DI
19	DD	49	DI	79	DD	109	DD
20	II	50	DD	80	II	110	DI
21	DI	51	DI	81	DI	111	DI
22	DI	52	DI	82	DI	112	DD
23	DI	53	DD	83	DI	113	DI
24	DI	54	DI	84	DD	114	DD
25	DD	55	DI	85	II	115	DD
26	II	56	II	86	DI	116	DD
27	DD	57	DI	87	DI	117	DI
28	DD	58	DD	88	DI	118	DD
29	DD	59	DD	89	DI	119	DD
30	DI	60	DD	90	DD	120	DI

Çizelge 4.6. Kontrollerin ADE geni intron 16 bölgesi insersiyon/delesyon polimorfizmlerine göre genotipleri.

Hasta Numarası	IL-10 2849	Hasta Numarası	IL-10 2849	Hasta Numarası	IL-10 2849	Hasta Numarası	IL-10 2849
K1	DD	K30	DI	K59	DI	K88	DI
K2	DI	K31	DI	K60	DI	K89	DD
K3	II	K32	DI	K61	DI	K90	DD
K4	DD	K33	DI	K62	DI	K91	DD
K5	DI	K34	II	K63	DD	K92	DI
K6	DD	K35	II	K64	DD	K93	DD
K7	DI	K36	DI	K65	DD	K94	DI
K8	DI	K37	DI	K66	DI	K95	DI
K9	DD	K38	II	K67	DI	K96	DI
K10	II	K39	DD	K68	II	K97	DI
K11	DI	K40	DI	K69	DD	K98	DD
K12	DD	K41	DI	K70	DI	K99	II
K13	II	K42	DI	K71	II	K100	DD
K14	DI	K43	DI	K72	II	K101	DI
K15	DI	K44	DI	K73	DD	K102	DI
K16	II	K45	DD	K74	DD	K103	DD
K17	DI	K46	DI	K75	DD	K104	II
K18	DI	K47	II	K76	DI	K105	DI
K19	DI	K48	DI	K77	DD	K106	DD
K20	DI	K49	DI	K78	DI	K107	DI
K21	II	K50	DD	K79	DD	K108	DD
K22	DI	K51	DD	K80	II	K109	DI
K23	DI	K52	DI	K81	DI	K110	DI
K24	II	K53	DI	K82	DI	K111	DI
K25	DI	K54	DI	K83	DD	K112	DI
K26	DI	K55	DI	K84	DI	K113	DI
K27	DI	K56	DI	K85	DI	K114	DI
K28	DI	K57	DD	K86	DI		
K29	DI	K58	DD	K87	DI		

ADE geni intron 16 insersiyon/delesyon polimorfizmlerinin genotip dağılımları ve allel frekansları SPSS 15.0 Ki kare testi kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler yapılırken hasta ve kontrol gruplarına kodominant, dominant ve resesif modeller uygulanmıştır (Çizelge 4.7). Kodominant modelde hasta ve kontrol grupları birlikte değerlendirildiğinde aralarında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p=0,016$). DD genotipi hasta grubunda yüksek frekansta bulunurken, DI genotipi kontrol grubunda yüksek bulunmuştur. II genotipi her iki grupta da yakın frekansta bulunmuştur. Bunun yanı sıra, dominant modele de bakıldığında hasta ve kontrol grubu arasında DD genotipi açısından anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p=0,006$). Ancak, resesif modelde ise hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p=0,977$). Kodominant ve dominant modelde hasta grubunda DD genotip frekansının anlamlı derecede yüksek olması bu genotipin preeklampsi öyküsü ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte allel frekanslarına bakıldığında iki grup arasında D ve I allelleri bakımından anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır ($p=0,062$). Ancak p değerinin 0,05 yakın olması ve DD genotipinin hasta grubunda yüksek olması D allelinde preeklampsiye eğilimli olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.7. Hasta ve kontrol gruplarının ADE geni intron 16 bölgesi için genotip dağılımları ve allel frekansları

Model	<u>Kontrol</u> n=114 Dağılım	<u>Preeklampsi</u> n=120 Dağılım	P Değeri
<u>Kodominant</u>			
DD	30 (%26,3)	52 (%43,3)	.016
DI	68 (%59,6)	51 (%42,5)	
II	16 (%14,0)	17 (%14,2)	
<u>Resesif</u>			
II	16 (%14,0)	17 (%14,2)	.977
DD+DI	98 (%86,0)	103 (%85,8)	
<u>Dominant</u>			
DI+II	84 (%73,7)	68 (%56,7)	.006
DD	30 (%26,3)	52 (%43,3)	
<u>Allel</u>			
DI	128 (%56,1)	155 (%64,6)	.062
	100 (%43,9)	85 (%35,4)	

5. TARTIŞMA

Preeklampsinin etiyolojisi ve patofizyolojisi henüz tümüyle bilinmemektedir. Hastalığa dair farklı teoriler ortaya atılmaktadır. Bununla birlikte, son zamanlarda hastalığın tümüne dikkat çekilerek önemli gelişmeler elde edilmiştir. Damar endotel hasarı ve plasental perfüzyon gibi plasental ve maternal etkenlerin preeklampsinin patofizyolojisinin temelinde önemli rol oynadığı bilinmekle birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalarla immün ve genetik faktörlerin de üzerinde durulmakta ve bunların preeklampsinin ardında yatan nedenlerin başında yer alabileceği öne sürülmektedir ^{5, 8}. Yapılan çalışmalar, preeklampsinin tek bir etkene bağlı olmayan, çevresel, immün, ve genetik gibi çeşitli faktörlerden etkilenen multifaktöriyel bir hastalık olduğunu desteklemektedir.

Preeklampsinin ardında yatan genetik faktörlerin araştırılmasında 50'den fazla gen kullanılmış ve bunların 8'inin aday gen olabileceği belirtilmiştir. Aday genler ile yapılan çalışmalarda preeklampsi ile bu genler arasında yüksek oranda bağlantı tespit edilmesine rağmen sonuçların çelişkili olmasından dolayı henüz preeklampsi ile kesin olarak ilişkilendirilmiş bir gen yoktur ¹⁰⁻¹⁴. Aday genler arasından immünregülatör genlerden IL-10 ve hemodinamik genlerden ADE bu çalışmaya dahil edilmiştir.

IL-10 savunma sisteminde rol alan sitokinlerden bir tanesidir. IL-10 geninin gebelikteki savunma sistemiyle ilişkili olduğu ve düşük seviyede üretilmesinin düşükle ve preeklampsiyile bağlantılı olabileceği belirtilmektedir ⁵⁹. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda bu desteklenmiş, farelerle yapılan deneylerde IL-10 üretiminin inhibe edilmesi sonucu fetal büyümenin durduğu ve IL-10 azlığıyla ise gebeliğin sonlandığı gösterilmiştir ⁹⁷. Bu öneminden dolayı IL-10 ile preeklampsi arasındaki ilişki IL-10 üzerindeki polimorfik değişikliklerin çalışılmasıyla araştırılmaktadır. 592, 819, 1082 gibi bazı promotor bölgeler farklı çalışmalarla preeklampsi ile ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Ancak, şu ana kadar yapılan çalışmalarda 592 ve 819 promotor bölgeleri ile preeklampsi arasında herhangi bir bağlantı tespit edilememiştir. Ayrıca, 1082 promotor bölgesi ve preeklampsi arasındaki bağlantı çalışmalarının sonuçları çelişkilidir ^{16, 57, 58, 59}. Çalışmamızda yer alan 2849 promotor bölgesi ile ilgili ulusal düzeyde mevcut bir çalışma bulunmamakla birlikte uluslararası literatürde yer almış bir çalışma mevcuttur. ¹⁶.

de Groot ve arkadaşları¹⁶ Hollanda toplumunda 157 preeklampitik kadın ve 157 kontrol gebe ile IL-10 2849 bölgesi ve preeklampsi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmaya göre hasta ve kontrol grubunda GG ve GA genotipleri ile preeklampsi arasında anlamlı bir ilişki belirlenememiştir. Çalışma sonuçlarına göre kontrol ve hasta grubu arasında GG ve GA genotipleri yüzdeleri birbirine yakın bulunmuştur. Hasta grubunda 85 kadın (%54.1) GG bulunurken kontrol grubunda 73 kadın (%46.5) GG bulunmuştur. Aynı şekilde hasta grubunda 67 kadın (%42.7) GA bulunurken kontrol grubunda 69 kadın (%43.9) GA bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da GG ve GA genotipleri bakımından benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hasta grubunda 95 kadın (%75.4) GG bulunurken kontrol grubunda 87 kadın (%75.0) GG bulunmuştur (Çizelge 4.3). GA genotipi bakımından hasta grubunda 26 (%20.6) kadın ve kontrol grubunda 29 (%25.0) kadın GA bulunmuştur. Çalışmamızda de Groot ve ark.'nın çalışmasına benzer şekilde GG genotipi ve preeklampsi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ancak, de Groot arkadaşları¹⁶ hasta grubunda 5 (%3.2) kadını AA genotipli bulurken kontrol grubunda 15 (%9.6) kadını AA bulmuşlardır. Çalışmada AA genotipine sahip kadınların preeklampsiye yakalanma riskinin üç kat daha düşük olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise kontrol grubunda AA genotipine hiç rastlanmazken, hasta grubunda AA genotipli 5 (%4.0) kadın tespit edilmiştir. de Groot ve arkadaşlarının¹⁶ yaptığı çalışmanın aksine çalışmamızda AA genotipinin koruyucu olmadığı preeklampitik kadınlarda mevcut bir genotip olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Çalışma sonuçlarımıza göre, IL-10 2849 AA genotipine sahip kadınlarda preeklampsiye bir yatkınlık vardır. Ayrıca, sonuçların AA genotipi bakımından de Groot ve arkadaşlarının¹⁶ yaptığı çalışmayla farklı oluşu, preeklampside toplumsal farklılıkların etkili olduğunu da düşündürmektedir. Ayrıca çalışılan birey sayısının artırılması konuya daha da açıklık getirecektir.

Gebelikte fizyolojik olarak vasküler direnç ile kan basıncı azalır ve gebelik süresince spiral arterlerin yeniden oluşumunu sağlayan RAS stimüle edilir. Ancak bunun aksine preeklampitik kadınlarda vasküler direnç ile kan basıncı artar ve renin ile anjiyotensin II'nin plazma seviyesi düşer. RAS sisteminin önemli bir parçası olan ve vazokonstriktör görevi üstlenen ADE'nin yüksek aktivitesinin hipertansiyona sebep olmasından dolayı preeklampsi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle ADE geni üzerinde bulunan çeşitli polimorfik bölgelerin preeklampsi ile bağlantıları tespit

edilmeye çalışılmıştır. Bu bölgelerden en çok çalışılan ADE geni intron 16 üzerindeki 278-300 bç'lik Alu elementinin insersiyonu (I) veya delesyonu (D) ile ortaya çıkan polimorfizmdir ¹⁷⁻²⁰. ADE geni intron 16 I/D polimorfizmi ile preeklampsi arasındaki ilişkiye dair ulusal düzeyde bir çalışma mevcuttur. Uluslar arası literatüre baktığımızda ise bu bölge ile preeklampsi ve gebeliğe bağlı hipertansiyon ilişkisini belirlemeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ancak elde edilen sonuçların bazılarında bağlantı tespit edilirken bazılarında tespit edilememiştir.

ADE geni intron 16 I/D polimorfizminde yaptığımız çalışmada I ve D allelleri arasında şu ana kadar herhangi bir baskınlık tespit edilemediği için kodominant, dominant ve resesif modeller kullanılmıştır. Daha önce ulusal ve uluslar arası literatürde yapılmış çalışmalara bakıldığında Mando ve arkadaşlarının¹⁹ İtalyan toplumunda yaptıkları çalışmada bu model kullanılmıştır. Diğer çalışmalarda ise genotip dağılımları çalışmamızdaki kodominant model ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar yapılan çalışmaların bazılarıyla benzerlik gösterirken bazılarıyla ise çelişmektedir.

Çalışmamızla aynı modelin kullanıldığı, Mando ve arkadaşlarının¹⁹ İtalya toplumunda yaptıkları çalışmada 197 preeklampsi (78/197 hafif preeklampsi) ve 410 normal gebe kadın incelenmiştir. Çalışmada hafif ve şiddetli preeklampsi hastalarının tümü birlikte değerlendirildiğinde kodominant modelde DD, DI ve II genotip dağılımları hasta ve kontrol grubunda karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır (p=0,083). Bizim çalışmamızda ise yukarıdaki çalışmanın aksine hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark elde edilmiştir (p=0,016, Çizelge 4.7).

Mando ve arkadaşlarının¹⁹ çalışmasında dominant model kullanıldığında II+DI ve DD genotip dağılımları hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında aynı şekilde bu modelde de anlamlı bir fark elde edilememiştir (p=0,374). Bizim çalışmamızda ise genotip dağılımları hasta ve kontrol grubunda karşılaştırıldığında yukarıdaki çalışmanın aksine anlamlı bir fark elde edilmiştir (p= 0,006, Çizelge 4.7).

Mando ve arkadaşlarının¹⁹ çalışmasında resesif modele baktığımızda II ve DI+DD genotip dağılımları hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bulunmuştur (p=0,030). Bizim çalışmamızda ise genotip dağılımları hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edilememiştir (p=0,977). Bizim sonuçlarımız, DD genotipinin preeklampsi ile ilişkilendirildiğini, yani hastalığa yatkınlık sağladığını

düşündürmektedir. Çalışmamız ile aynı modeli kullanan Mando ve arkadaşları İtalya toplumunda DD genotipi ile preeklampsi arasında bir ilişki bulamamışlardır.

Aynı çalışmada hafif ve şiddetli preeklampsi birbirlerinden bağımsız incelendiğinde hafif preeklampsi grubunda, kodominant modelde DD, DI ve II genotip dağılımlarında II genotipi bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p=0,033$). Çalışmamızda ise kodominant modelde DD genotipi bakımından hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p=0,016$, Çizelge 4.7). Bizim çalışma grubumuza şiddetli preeklampsi olguları dahil edilmemiştir. Mando ve arkadaşlarının çalışmasında II+DI ve DD genotip dağılımlarında anlamlı bir fark yok iken bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,006$, Çizelge 4.7).

Gürdöl ve arkadaşlarının²⁰ Türk toplumunda yaptıkları çalışmada 95 preeklampitik hasta ve 89 sağlıklı gebe kullanılmıştır. DD, DI, II genotip dağılımları kontrol grubunda %34.8, %41.6 ve %23.6 bulunurken hasta grubunda ise %49.5, %32.6 ve %17.9 olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmada genotip dağılımları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Gürdöl ve arkadaşlarının²⁰ yaptıkları çalışmaya uyan kodominant modelimize baktığımızda, çalışmamızda DD, DI ve II genotip dağılımları 114 kadından oluşan kontrol grubunda %26.3, %59.6 ve %14.0 bulunurken 120 kadından oluşan hasta grubunda %43.3, %42.5 ve %14.2 bulunmuştur (Çizelge 4.7). Çalışmamızda genotip dağılımları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p=0,016$). DD genotipi preeklampitik hastalarda daha yüksek bulunmuştur. Allel frekanslarına baktığımızda ise Gürdöl ve arkadaşlarının çalışmasında D allel frekansının preeklampitik hastalarda anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0,05$). Çalışmamızda ise D allel frekansında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p=0,062$). Ancak DD genotipinin hasta grubunda yüksek frekansta bulunması ve allel frekansları bakımından p değerinin 0,05'e yakın olması, D allel frekansı bakımından preklampsiye eğilimin olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla bir çelişki yoktur. Preeklampsi ile ADE geni arasında aynı toplumda bölgesel ve etnik farklılıkların olabileceğini de akıldan çıkarmamak gerekir. Ayrıca hasta ve normotensif grupta test edilen birey sayısının arttırılması da belki duruma dahada açıklık getirebilecektir.

Çalışmamızla benzer sonuçlar, Choi ve arkadaşlarının¹⁰¹ Güney Kore toplumunda yaptıkları 90 preeklampitik ve 98 normotensif gebe kadın ile yapılan çalışmadan gelmiştir. DD, DI ve II genotip dağılımları hasta ve kontrol grubunda incelenmiş ve DD genotip frekansı hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Çalışmamızda Choi ve arkadaşlarının elde ettikleri sonuca benzer şekilde DD genotip dağılımı bakımından anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p=0,016$ Çizelge 4.7). Ayrıca yapılan çalışmada D allel frekansı da hasta grubunda yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Çalışmamızda da D allel frekansı hasta grubunda yüksek olmakla birlikte anlamlı bulunmamıştır ($p=0,062$). Ancak çalışmamızda DD genotipi bakımından Choi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla benzer sonuçların elde edilmesi ve allel frekansları için p değerinin 0,05 yakın olması, birey sayısının arttırılmasıyla D alleli bakımından bu çalışma ile benzer sonuçların elde edilebileceğini düşündürmektedir.

Mello ve arkadaşlarının¹⁰⁰ İtalya toplumunda 48 preeklampitik kadın ve 58 sağlıklı gebe kadın ile yaptıkları çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmada DD genotipi hasta grubunda yüksek bulunmuş ve genotip dağılımları bakımından anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p=0,0002$). Bizim çalışmamızda da DD, DI ve II genotip dağılımları kontrol ve hasta grubunda belirlenerek DD genotipinin hasta grubunda yüksek olduğu bulunmuş ve preeklampsi ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir ($p=0,016$, Çizelge 4.7). Mello ve arkadaşlarının çalışmasında D alleli ve preeklampsi arasında bir ilişki saptanırken ($p<0,0001$), bizim çalışmamızda da eğilim olduğu belirlenmiştir ($p=0,062$). Ayrıca Mello ve arkadaşlarının çalışmasında II genotip frekansı kontrol grubunda yüksek bulunmuştur (hastalarda %6 ve kontrollerde %34).

Morgan ve arkadaşlarının¹⁰⁴ İngiltere toplumunda 72 preeklampitik ve 83 normotensif gebe kadın, Galao ve arkadaşlarının Brezilya¹⁰⁵ toplumunda 51 preeklampitik ve 71 normotensif gebe kadın ve Kobashi ve arkadaşlarının¹⁰⁶ Japonya toplumunda 122 preeklampitik ve 291 normotensif gebe kadın ile yaptıkları çalışmada DD, DI ve II genotip dağılımları ve allel frekansları bakımından kontrol ve hasta grubu arasında çalışmamızın aksine anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

ADE geni intron 16 I/D polimorfizmi dikkate alındığında hem çalışmamızda hem de farklı ülkelerden gelen çalışmaların çoğunda benzer sonuçlar elde edilmiş DD

genotipinin preeklampsi ile ilişkilendirildiği ve D allel frekansının preeklampsi lehine yüksek olduğu belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniklerinde takip edilen 116 normal, 126 preeklampşik olmak üzere toplam 242 gebe kadın preeklampsi ile ilgili kriterler dikkate alınarak incelenip moleküler biyolojik yönden değerlendirilmiş ve aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir.

1. Hasta ve kontrol grubunda yaş, gebelik sayısı ve gebelik haftası gibi klinik özellikler bakımından benzer ortalamalar elde edilmiştir.

2. IL-10 2849 promotor polimorfizminde GG genotip frekansı hasta grubunda %75.4 ve kontrol grubunda %75.0 olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubunda GG genotipi bakımından anlamlı bir fark saptanamamıştır.

3. AA genotipine kontrol grubunda hiç rastlanmamış iken hasta grubunda 5 (%4.0) hastanın AA genotipine sahip olduğu tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu AA genotipi bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,030$). AA genotipinin preeklampsi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ancak çalışılan sayının artırılması gerekmektedir.

4. G allel frekansı hasta grubunda %85.7 ve kontrol grubunda %87.5 olarak bulunmuştur. Allel frekansları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p=0,564$). G alleli ile preeklampsi arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir.

5. ADE intron 16 I/D polimorfizminde kodominant modelde DD genotip frekansı hasta grubunda %43.3, kontrol grubunda %26.3 olarak bulunmuştur. DD genotipi bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,016$). DD genotipi ve preeklampsi arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. II genotip frekansları ise hasta grubunda %14.2, kontrol grubunda %14.0 olarak bulunmuştur. II genotipi ile preeklampsi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

6. Dominant modelde (II+DI, DD), DD genotip frekansı hasta grubunda %43.3, kontrol grubunda %26.3 olarak bulunmuştur. Bu modelde hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,006$).

7. Resesif modelde(II, DD+DI), DD+II genotip frekansı hasta grubunda %85.8, kontrol grubunda %86.0 olarak bulunmuştur. Bu modelde hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p=0,977$).

8. D allel frekansı hasta grubunda %64.6 ve kontrol grubunda %56.1 olarak bulunmuştur. Allel frekansları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p= 0,062$). D alleli ile preeklampsi arasında bir ilişki tespit edilememiş olsa da eğilim vardır.

Yapılan çalışmalarda IL-10 geni 2849 ve ADE geni intron 16 I/D polimorfizmleri ile, genotip ve allel frekansları arasında popülasyonlara bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte, çalışmamızla diğer araştırmacıların çalışmalarını destekleyen bulguların yanında farklı popülasyonlarla ve aynı popülasyonun farklı bölgelerinde çalışıldığından farklı sonuçlar da elde edilmiştir. Sonuç olarak çalışılan hasta ve kontrol sayımızın toplumumuza ait genotip yapısı hakkında kesin bir sonuç bildirmek için yetersiz olduğunu ve ileride hasta sayısının artırılmasıyla bulguların güçleneceğini düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. **James MR, Hilary SG.** Preeclampsia: recent insights. *Hypertension*, **2005**; 46:1243-1249.
2. **James JW.** Pre-eclampsia. *Lancet*, **2000**;356:1260-1265.
3. **Peters RM, Flack JM.** Hypertensive disorders of pregnancy. *Journal of Obstetrics, Gynecologic and Neonatal Nursing*, **2006**; 33(2):209-220.
4. **Roberts JM, Lain KY.** Recent insight into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*, **2002**;23:359-372.
5. **Roberts JM, Cooper DW.** Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet*, **2001**; 357: 53–56.
6. **Chesley LC.** History and epidemiology of preeclampsia-eclampsia. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, **1984**; 27(4):801-820.
7. **Roberts JM, Redman CWG.** Preeclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet*, **1993**;341:1447-1451.
8. **Benirschke K, Kaufmann H.** Pathology of the human placenta. 4th. Ed., New York: Springer, **2000**.
9. **Witlin AG, Sibai BM.** Hypertension in pregnancy: current concepts of preeclampsia. *Annu Rev Med*, **1997**; 48:115-127.
10. **Mütze S, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Rath W.** Genes and preeclampsia syndrome. *J Perinat Med*, **2008**; 36: 38-58.
11. **Lachmeijer AMA, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrimsson R.** Searching for preeclampsia genes: the current position. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, **2002**;105:94–113.
12. **Laivuori H.** Genetic aspects of preeclampsia. *Frontiers in Bioscience*, **2007**; 12: 2372-2382.
13. **Cross JC.** The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin Genet*, **2003**; 64:96–103.
14. **Chappell S, Morgan L.** Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia. *Clinical Science*, **2006**;110; 443-458.
15. **Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C, Jonsson Y, Sharma S.** Immunology of preeclampsia. *Immunology of Pregnancy*, **2005**; 89:49–61.
16. **de Groot CJM, Jansen MWJC, Bertina RM, Schonkeren JJM, Helmerhorst FM, Huizinga TWJ.** Interleukin 10-2849AA genotype protects against pre-eclampsia. *Genes and Immunity*, **2004**; 5:313–314.
17. **Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW.** Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*, **1993**; 87:1816-1828.
18. **Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F.** Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. *Journal of Biological Chemistry*, **1991**; 266 (23):15377-15383.
19. **Mando C, Antonazzo P, Tabano S, Zanutto S, Pileri P, Somigliana E, Colleoni F, Martinelli A, Zolin A, Benedetto C, Marozio L, Neri I, Facchinetti F, Miozzo M, Cetin I.** Angiotensin-converting enzyme and adducin-1 polymorphisms in women with preeclampsia and gestational hypertension. *Reproductive Sciences*, **2009**; 1-8.

20. **Gürdöl F, İsbilen E, Yılmaz H, İşbir T, Dirican A.** The association between preeclampsia and angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Clin Chim Acta*, **2004**; 341(1-2):127-131.
21. **Scott JS, Jenkins DM.** Immunogenetic factors in aetiology of preeclampsia/eclampsia (gestosis). *J Med Genet*, **1976**; 13:200-207.
22. **Harlow FH, Brown MA.** The diversity of diagnosis of preeclampsia. *Hypertans Pregnancy*, **2001**; 20:57-67.
23. **Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, et al.** The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertans Pregnancy*, **2001**; 9-19.
24. **Australasian Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ASSHP).** Management of hypertension in pregnancy: executive summary. *Med J Aust*, **1993**;158:700-702.
25. **National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP).** Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, **2000**; **183**:1-22.
26. **Hogberg U.** The World Health Report 2005: "make every mother and child count". -including Africans. *Scand J Public Health*, **2005**; 33:409-411.
27. **Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Gilstrap III LC, Wenstrom KD.** Chapter 34: Hypertensive disorders in pregnancy. *Williams Obstetrics*. 22nd. Ed., USA: McGraw-Hill Companies , **2005**:761-809.
28. **Duley L.** Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy. *Br Med Bull*, **2003**; 67:161-176.
29. **Zhang J, Klebanoff MA, Roberts JM.** Prediction of adverse outcomes by common definition of hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol*, **2001**; 97:261-267.
30. **Frias AE, Belfort MA.** Post Magpie: how should we be managing severe preeclampsia? *Curr Opin Obstet Gynecol*, **2003**; 15; 489-3495.
31. **Kullberg G, Lindeberg S, Hanson U.** Eclampsia in Sweden. *Hypertens Pregnancy*, **2002**; 21:12-21.
32. **Duley L.** The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatal*, **2009**; 33:130-137.
33. **van Pampus MG, Wolf H, Weijmar Schultz WC, Neeleman J, et al.** Posttraumatic stress disorder following preeclampsia and HELLP syndrome. *J Psychosom Obstet Gynecol*, **2004**; 25:183-187.
34. **Roberts CL, Algert CS, Morris JM, Ford JB, et al.** Hypertensive disorders in pregnancy: a population based-study. *Med J Aust*, **2005**; 182:332–335.
35. **Duckitt K, Harrington D.** Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *Bmj*, **2005**; 330:565.
36. **Robillard PY, Hulsey TC, Perianin J, Janky E, et al.** Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet*, **1994**; 344:973-975.
37. **Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT.** The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, **2002**; 346:33-38.
38. **Pattison NS, Chamley LW, McKay EJ, Liggins GC, et al.** Antiphospholipid antibodies in pregnancy: prevalence and clinical association. *Br J Obstet Gynecol*, **1993**; 100:909–913.

39. **Yasuda M, Takakuwa K, Tokunaga A, Tanaka K.** Prospective studies of the association between anticardiolipin antibody and outcome of pregnancy. *Obstet Gynecol*, **1995**; 86:555-559.
40. **Kurian AK, Cardarelli KM.** Racial and ethnic differences in cardiovascular disease risk factors: a systematic review. *Ethn Dis*, **2007**; 17:143-152.
41. **Duley L, Henderson-Smart DJ.** Drugs for rapid treatment of very high blood pressure during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*, **2000**; (2):CD001449.
42. **Villar J, Say L, Shennan A, Lindheimer M, Duley L, Conde-Agudelo A, Merialdi M.** Methodological and technical issues related to the diagnosis, screening, prevention, and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, **2004**; 85(Suppl. 1):28-41.
43. **Roberts JM, Hubel CA.** The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta*, **2009**; 30 (Suppl A) :32-37
44. **Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ.** Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in the syndrome? *Clin Invest*, **1997**; 99:2152-2164.
45. **Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, et al.** Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol*, **2000**; 96:271-276.
46. **Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M.** The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*, **2006**; 27:939-958.
47. **Cheng MH, Wang PH.** Placentation abnormalities and pathophysiology of preeclampsia. *Expert Rev Mol Diagn*, **2009**; 9:37-49.
48. **Clapp JF, McLaughlin MK, Larrow R, Farnham J, Mann L.** The uterine hemodynamic response to repetitive unilateral vascular embolization in the pregnant ewe. *Am J Obstet Gynecol*, **1982**; 144(3):309-318.
49. **Peterson H.** Genetic studies of pre-eclampsia. Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, **2010**.
50. **Slowinski T, Neumayer HH, Stolze T, Gossing G, et al.** Endothelin system in normal and hypertensive pregnancy. *Clin Sci(Lond)*, **2002**; 103 (Suppl 48):446-449.
51. **Redman CW, Sargent IL.** Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response-a review. *Placenta*, **2003**; 24 (Suppl A):21-27.
52. **Nororiha IL, Niemir Z, Stein H, Waldher R.** Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, **1995**; 10:775-786.
53. **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.** Cellular and Molecular Immunology. 6th. Ed., Philadelphia: WB Saunders Company, **1994**.
54. **Hopkins SJ.** The patophysiological roles of cytokines. *Legal Medicine*, **2003**; 5:45-57.
55. **Rabson A, Roitt IM, Delves PJ.** Really Essential Medical Immunology. 2nd. Ed., Massachusetts:Blackwell Publishing, **2005**.
56. **Orange S, Horvath J, Hennessy A.** Preeclampsia is associated with a reduced interleukin-10 production from peripheral blood mononuclear cells. *Hypertension in Pregnancy*, **2003**; 22(1):1-8.

57. **de Jong BA, Westendorp RGJ, Eskdale J, Uitdehaag BMJ, Huizinga TWJ.** Frequency of functional interleukin-10 promoter polymorphism is different between relapse-onset and primary progressive multiple sclerosis. *Human Immunology*, **2002**; 63:281–285.
58. **Rees LEN, Wood NAP, Gillespie KM, Lai KN, Gaston K, Mathieson PW.** The interleukin-10-1082G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2002**; 59:560–569.
59. **Makris A, Xu B, Yu B, Thornton C, Hennessy A.** Placental deficiency of interleukin-10 (IL-10) in preeclampsia and its relationship to an IL10 promoter polymorphism. *Placenta*, **2006**; 27:445–451.
60. **van Dunne FM, de Craen AJM, Helmerhorst FM, Huizinga TWJ, Westendorp RGJ.** Interleukin-10 promoter polymorphisms in male and female fertility and fecundity. *Genes and Immunity*, **2006**; 7:688–692.
61. **Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM.** A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *The Journal of Immunology*, **1999**; 349:3491–3495.
62. **Moore KW, O’Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR.** Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*, **1993**; 11:165–190.
63. **Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB.** Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*, **2004**; 22:929–979.
64. **Skeegs LT, Kohn JR, Shumway NP.** Preparation and function of the hypertension converting enzyme. *Journal of Experimental Medicine*, **1956**; 103:295–299.
65. **Erdős EG.** Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension*, **1990**; 16:363–370.
66. **Cornell MJ, Williams TA, Lamango NS, Coates D, Corvol P, Soubrier F, Hoheisel J, Lehrach H, Isaac RE.** Cloning and expression of an evolutionary conserved single domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, **1995**; 270:13613–13619.
67. **Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Clauser E.** The two homologous domains of the human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *Journal of Biological Chemistry*, **1991**; 266:9002–9008.
68. **Wei L, Clauser E, Alhenc-Gelas F, Corvol P.** The two homologous domains of the human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, **1992**; 267:13398–13405.
69. **Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karan E, Christie G, Turner AJ.** A human homologue of angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **2000**; 275:33238.
70. **Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robinson K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S.** A novel angiotensin-converting-enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation*, **2000**; 87:1–9.
71. **Öztürk Ö, Öztürk Ü.** Relation between angiotensin-converting enzyme i/d gene polymorphism and pulse pressure in patients with a first anterior acute myocardial infarction. *Anadolu Kardiyol Derg*, **2009**; 9:9–14.
72. **Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J, Varner MW.** Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med*, **2001**; 344:867–872.

73. **Chesley LC, Cooper DW.** Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. *Br J Obstet Gynaecol*, **1986**; 93:898-908.
74. **Arngrimsson R, Björnsson H, Geirsson R.** Analysis of different inheritance patterns in preeclampsia/eclampsia syndrome. *Hypertens Pregnancy*, **1995**; 14:27-38.
75. **Ros HS, Lichtenstein P, Lipworth L, Cnattingius S.** Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. *Am J Med Genet*, **2000**; 91:256-260.
76. **Boyd PA, Maher EJ, Lindenbaum RH, Hoogwerf AM, Redman J, Crocker M.** Maternal 3;13 chromosome insertion, with severe pre-eclampsia. *Clin Genet*, **1995**; 47:17-21.
77. **Rijhsinghani A, Yankowitz J, Strauss RA, Kuller JA, Patil S, Williamson RA.** Risk of preeclampsia in second-trimester triploid pregnancies. *Obstet Gynecol*, **1997**; 90:884-888.
78. **Li HW, Tsao SW, Cheung ANY.** Current understandings of the molecular genetics of gestational trophoblastic diseases. *Placenta*, **2002**; 23:20-31.
79. **Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, Irgens LM.** Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study. *BMJ*, **1998**; 316:1343-1347.
80. **Skjaerven R, Irgens LM, Wilcox AJ, Rønning T, Lie RT.** Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *Br Med J*, **2005**; 331:877.
81. **Tubbergen P, Lachmeijer AM, Althuisius SM, Vlak ME, van Geijn HP, Dekker GA.** Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparous women? *J Reprod Immunol*, **1999**; 45:81-88.
82. **Daly AK, Day CP.** Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. *Br J Clin Pharmacol*, **2001**; 52:489-499.
83. **Wilson ML, Goodwin TM, Pan VL, Ingles SA.** Molecular epidemiology of preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*, **2003**; 58:39-66.
84. **Bird TD, Jarvik GP, Wood NW.** Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology*, **2001**; 57:1153-1154.
85. **Bernstein JA.** Genetic association studies: what are they teaching clinicians? *J Allergy Clin Immunol*, **2003**; 111:465-466.
86. **Cooper DW, Brennecke SP, Wilton AN.** Genetics of pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy*, **1993**; 12:1-23.
87. **Harrison GA, Humphrey KE, Jones N, Badenhop R, Guo G, Elakis G, Kaye JA, Turner RJ, Grehan M, Wilton AN, Brennecke SP, Cooper DW.** A genomewide linkage study of preeclampsia/eclampsia reveals evidence for a candidate region on 4q. *Am J Hum Genet*, **1997**; 60:1158-1167.
88. **Arngrimsson R, Sigurardottir S, Frigge ML, Bjarnadottir RI, Jonsson T, Stefansson H, Baldursdottir A, Einarsdottir AS, Palsson B, Snorraddottir S, Lachmeijer AM, Nicolae D, Kong A, Bragason BT, Gulcher JR, Geirsson RT, Stefansson K.** A genom-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for preeclampsia on chromosome 2p13. *Hum Mol Genet*, **1999**; 8:1799-1805.
89. **Moses EK, Lade JA, Guo G, Wilton AN, Grehan M, Freed K, Borg A, Terwilliger JD, North R, Cooper DW, Brennecke SP.** A genom scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia on chromosome 2. *Am J Hum Genet*, **2000**; 67:1581-1585.

90. **Lachmeijer AM, Arngrimsson R, Bastiaans EJ, Frigge ML, Pals G, Sigurdardottir S, Stefansson H, Palsson B, Nicolae D, Kong A, Aarnoudse JG, Gulcher JR, Dekker GA, ten Kate LP, Stefansson K.** A genom-wide scan for preeclampsia in the Netherlands. *Eur J Hum Genet*, **2001**; 9:758-764.
91. **Passarge E.** Renkli Genetik Atlası, Formal Genetik: Polimorfizm. Luleci G, Sakizli M. 2.baskı, İstanbul: Nobel Tıp - Yüce Yayınları; **2000**. s.156.
92. **Carey J, White B.** Medical Genetics. 3rd. Ed., Missouri: Mosby, **2006**.p.29.
93. **Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF.** Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 6th. Ed., Philadelphia: Saunders Elsevier, **2004**.p.87.
94. **Redman CW, Sacks GP, Sargent IL.** Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, **1999**; 180(2):499-506.
95. **Rijhsinghani AG, Thompson K, Tygrette L, Bhatia SK.** Inhibition of interleukin-10 during pregnancy results in neonatal growth retardation. *Am J Reprod Immunol*, **1997**; 37:232-235.
96. **Haggerty CL, Ferrell RE, Hubel CA, Markovic N, Harger G, Ness RB.** Association between allelic variants in cytokine genes and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, **2005**; 193:209-215.
97. **Daher S, Sass N, Oliveria LG, Mattar R.** Cytokine genotyping in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*, **2006**; 55:130-135
98. **Keavney B, McKenzie CA, Connell JM, Julier C, Ratcliffe PJ, Sobel E, Lathrop M, Farral M.** Measure haplotype analysis of the angiotensin I-converting enzyme gene. *Human Molecular Genetics*, **1998**; 7:1745-1751.
99. **Turgut S.** Anjiotensin dönüştürücü enzim ve I/D polimorfizmi. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, **2005**; 12(4):53-57.
100. **Mello G, Parretti E, Gensini F, Sticchi E, Mecacci F, Scarselli G, Genuardi M, Abbate R, Fatini C.** Maternal-fetal flow, negative events, and preeclampsia: role of ace I/D polymorphism. *Hypertension*, **2003**; 41:932-937.
101. **Choi H, Kang JY, Yoon HS, Han SS, Whang CS, Moon IG, Shin HH, Park JB.** Association of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms with preeclampsia. *J Korean Med Sci*, **2004**; 19:253-257.
102. **Kaur R, Jain V, Khuller M, Gupta I, Sherawat BS.** Association of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with pregnancy-induced hypertension. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **2005**; 84:929-933.
103. **Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Chmara E, Mrozikiewicz A.** Polymorphism of gene angiotensin converting enzyme in pregnancy induced hypertension. *Ginekol Pol*, **2001**; 72:605-610.
104. **Morgan L, Foster F, Hayman R, Crawshaw S, Baker PN, Pipkin FB, Kalsheker N.** Angiotensin-converting enzyme insertion-deletion polymorphism in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Journal of Hypertension*, **1999**; 17:765-768.
105. **Galao AO, de Souza LH, da Costa BEP, Scheibe RM, de Figueiredo CEP.** Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in preeclampsia and normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **2004**; 191:821-824.

106. **Kobashi G, Hata A, Shido K, Ohta K, Yamada H, Kato EH, Minakami H, Tamashiro H, Fujimoto S, Kondo K.** Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and preeclampsia in japanase patients. *Hemostatis and Thrombosis in Obstetrics and Gynecology*, **2005**; 31(3):346-350.

107. **Tamura T, Johanning GL, Goldenberg RL, Johnston KE, DuBard MB.** Effect of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on pregnancy outcome, enzyme activity and zinc concentrion. *Obstet Gynecol*, **1996**; 88:497-502.

EKLER

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASAL VE SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI

Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning” esas alınmıştır.

Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarını elde etmek için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüştürmelerinde basitçe şu formülden yararlanılabilir.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

M1 = Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

V1 = Stoktan alınması gereken miktar (v)

M2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (v)

EK-1. DNA Elde Edilmesinde Kullanılan Solüsyonları

1.1 Eritrosit Lizis Tamponu (pH=7,5)

1 Litre Solüsyon İçin;	
0,32 M Sükroz	109,563 gr
10 mM Tris-HCl (pH=7,5)	1,211 gr
5mM MgCl ₂	1,015 gr
%1 Triton X 100	10 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlanır. pH = 7,5 olacak şekilde ayarlanır. Triton X, solüsyona otoklavlandıktan sonra ilave edilir.

1.2. Fizyolojik Tampon (pH=7,5)

1 Litre Solüsyon İçin;	
0,075 M NaCl	4,383 gr
0,025 M EDTA	9,305 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözündürülüp otoklavlandı. pH = 7,5 olarak ayarlanır

1.3. TE-9 (pH=9)

1 Litre Solüsyon İçin;	
500 mM Tris baz	60,5 gr
20 mM EDTA	7,44 gr
10 mM NaCl	0,58 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözündürülüp otoklavlandı. pH = 9 olarak ayarlanır.

1.4. %10'luk SDS

20 ml için;

2 gr SDS tartılıp, üzerine bir miktar (20 ml'den az) saf su ilave edilip iyice çözündürülür.

Son hacim 20 ml olacak şekilde ayarlanır.

1.5. Proteinaz-K (10mg/ml)

100 ml için;

10 gr PK tartılır, üzerine bir miktar (100 ml'den az) saf su ilave edilip iyice çözündürülür.

Son hacim 100 ml olacak şekilde ayarlanır.

1.6. 6 M NaCl

1 litre için;

321.4 gr NaCl tartılıp, üzerine bir miktar (1000 ml'den az) bidistile su ilave edilip iyice çözdürölüp son hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlanır.

1.7. % 70 Etil Alkol

100 ml için;

70 ml etil alkol (absolut) ve 30 ml bidistile su ilave edilir.

1.8. TE tamponu (Tris/EDTA) (pH= 8)

10 mM Tris-Cl (pH=8)

0,1 mM EDTA (pH=8)

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürölüp otoklavlanır. pH = 8 olarak ayarlanır.

EK-2. AgaroZ Jel ve Poliakrilamit Jel Elektroforezi Analiz Solüsyonları

2.1. 10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok solüsyonu

108 gr Tris baz (890 mM)

55 gr borik asit (890 mM)

40 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0 (20 mM)

Az miktardaki bidistile su içinde çözüldükten sonra pH 8.0 olarak ayarlanıp solüsyon 1 litreye tamamlanır.

1 Litre 5X TBE stok solüsyonu için;

500 ml 10X TBE stok solüsyonu ve

500 ml bidistile su karıştırılır.

1 Litre 1X TBE solüsyonu için;

100 ml 10 X TBE stok solüsyonu ve

900 ml bidistile su karıştırılır.

2.2. Etidyum bromid solüsyonu (10 mg/ml)

0,1 gr etidyum bromid

10 ml bidistile su içinde çözölüp ışık almayan bir cam şişe içinde buzdolabında muhafaza edilir.

2.3. DNA Yükleme Tamponu (Loading dye) (6X)

40 gr süktroz

0,25 gr bromfenol mavisi

100 ml olacak şekilde bidistile su içinde çözülür. Ependorf tüplere paylaştırılarak buzdolabında muhafaza edilir.

2.4. % 30 Poliakrilamit

29 gr akrilamit

1 gr N, N' – metilenbisakrilamit

Su ile 100 ml'ye tamamlanır.

100 ml %30'luk poliakrilamit solüsyonu hazırlamak için yukarıda verilen miktarlarda kimyasallar tartılır ve toplam hacimden biraz az saf su ile çözülür. Kimyasallar çözününce saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlanır. Kimyasalların iyice çözünmesi için solüsyon 37°C'ta su banyosunda bir süre bekletilir. 0.22 µm por çapına sahip steril filtreden süzülüp steril edilir ve oda ısısında saklanır.

Uyarı: Akrilamit, potansiyel bir nörotoksindir ve deri yoluyla absorbe edilir. Toz halindeki akrilamit ve metilenbisakrilamit tartılırken maske takılıp, eldiven giyilmelidir. Bu kimyasalları içeren çözeltiler ile çalışılırken eldiven kullanılmalıdır. Poliakrilamit çözeltisi nontoksik olsa da çok az miktarlarda polimerize olmamış akrilamit içerebileceği ihtimaline karşılık dikkatli çalışılmalıdır.

2.5. %25 Amonyum Persülfat (APS)

0.125 gr APS

Saf su ile 0.5 ml'ye tamamlanır.

1,5 ml'lik temiz bir ependorf tüpüne yukarıda belirtilen miktarda APS tartılır ve üzerine saf su eklenir. Karışım vortekslenir ve iyice çözülmesi için 37°C'ta su banyosunda bir süre bekletilir. 4 °C'ta 1-2 hafta saklanabilir.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Hatay’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini burada tamamladı. 2000 yılında Antakya Kurtuluş Lisesi’nden mezun oldu. 2001 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nü kazandı. 2006 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2007 yılında Gülhane Askeri Tıp Akademisi (Ankara)’nde kısa dönem olarak başladığı askerlik görevini 2008 yılında bitirdi ve aynı yıl Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programına başladı.