T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Prof.Dr.HÜSREV HATEMİ

107973

DİABETİK NEFROPATİDE ANGİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM (ACE)GEN POLİMORFİZMİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biolog H.Arzu Ergen

107973

İSTANBUL-2001

107973

Bu çalışma İ.Ü. Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje No: T-742/251099

Tez çalışmam süresince desteğini
esirgemeyen değerli Hocalarım Prof. Dr.
HÜSREV HATEMİ ve Prof. Dr. TURGAY ISBIR 'e
değerli çalışma arkadaşlarıma ve sevgili aileme
sonsuz ***teşekkürler...***

İÇİNDEKİLER

1. *GİRİŞ VE AMAÇ.....1-3*

2. *GENEL BİLGİLER.....4-20*

2.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı Ve Sınıflandırılması

2.2 Renin-Angiotensin Sistem(RAS)

2.3. Angiotensin Konverting Enzim Geni ve Diabetteki Yeri

2.4. Diabetik Nefropati

2.5. ACE gen polimorfizminin diğer hastalıklarla olan ilişkisi

2.6. Diabetik Komplikasyonlar

3. *MATERYAL METOD.....21-32*

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.3. Kullanılan Gereçler

3.4. Çözeltiler

3.4.1. DNA Izolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

3.4.3. Lipid Profili Tayininde Kullanılan Çözeltiler

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

3.5.2. DNA Saflık Tayini

3.5.3. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

3.5.4. PCR yöntemiyle ACE gen bölgesinin çoğaltılması

3.6. Lipid Profili Tayini

3.7. Serum kreatin tayini

3.8. Serum üre tayini

3.9. Serum glukoz tayini

3.10. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

4. *BULGULAR* 33-42

5. *TARTIŞMAVESONUÇ*..... *43-48*

6. *ÖZET* *49*

7. *SUMMARY*..... *50*

8. *ÖZGEÇMIŞ*..... *51*

9. *KAYNAKLAR*..... *52-62*

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
SYON MERKEZİ

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus(DM), insülin eksikligi, yetersizliği veya yokluğuna bağlı olarak ortaya çıkan bir metabolizma hastalığı olarak tanımlanmaktadır. DM genellikle birçok organ sistemini etkileyen mikrovaskular (retinopati, nefropati, nöropati) ve makrovaskular (kardiovaskular hastalıklar) komplikasyonlara neden olmaktadır. Diabetik nefropati (DN), DM'un neden olduğu en ciddi ve en sık olarak görülen mikravaskular komplikasyon olarak tanımlanmaktadır(17,68). İdrarda yüksek albumin çıkışı ile kendini göstermektedir. Diabetik Nefropati'nin genetik faktörlerden etkilendiğine dair önemli kanıtlar arasında ailesel hipertansiyon, diabet veya kardiovaskular hastalıklar bulunan kişilerde nefropati gelişimi gözlenmiş olup(17) Diabetik Nefropatinin, tip1 diabetlileri %30-40 oranında etkilediği rapor edilmiştir(17). ABD'de son dönem böbrek yetmezliği olan hastaların %35'ini diabetik nefropatili hastalar oluşturmaktadır. Ülkemizdede 1999 kayıtlarında %16.4'lük bir oranla son dönem böbrek yetmezliği arasında ikinci sırada yer almaktadır.

İnsan Angiotensin konverting enzim (ACE) geni 26 eksonludur ve 17. Kromozom üzerine yerleşmiştir. 1990 yılında Rigat tarafından Southern Blot ve ACE cdna kullanılarak tanımlanmış olup 16.intronda 278bp alu tekrar bölgesinin absence(delesyon-D) ve presence(insersiyon-I) polimorfizmi ile karakterize edilmiştir. ACE içerisinde akciğer, vaskular endotel, kalp ve testislerinde bulunduğu geniş bir doku bölgesinde sentezlenir(58). ACE'nin en önemli görevlerinden biri angiotensin1'in vasokonstriktör bir etkiye sahip olan angiotensin2'ye dönüşmesini sağlamaktadır. Renin-angiotensin sistem(RAS)

içinde yer alan angiotensinojen ACE ve renin gibi genlerde meydana gelen mutasyonlar Diabetik Nefropati'nin kalıtımsal başlangıcında rol oynayabilmektedirler(65).

İlk olarak Rigat 1990 yılında ACE I/D polimorfizmini Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemini kullanarak göstermiştir(75). ACE genine ait üç polimorfizm bulunmuştur: DD, ID ve II. Uluslararası alanda diabetli olgularda ACE gen polimorfiziyle ilgili bir çok araştırma yapılmaktadır (7,26,38,53,70,81,83,86,95). Ülkemizde genellikle ACE geni ile ilgili çalışmalar daha çok ACE serum düzeyleri ile ilgili olup daha çok kardiovaskular ve hipertansiyon hastaları üzerinde yoğunlaşmıştır(1,26,40,91). ACE genine ait bu polimorfizmler diabetik veya diabetik olmayan olgularda kardiovaskular hastalık oluşma riskinin artışıyla bağlantı olabileceği görüşü çeşitli araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür(15,28,29,40,84).

Estacio ve ark. 1999'da 289 tip2 diabetli hastada left ventricular mass(LVM) ve ACE genotipleri arasında ilişki araştırılmış ve erkeklerde ACE DD genotipinin LVM bireylerde arttığı gösterilmiştir(23).

Marre ve ark 1997'de IDDM hastalarında yaptıklarında bir başka çalışmada ACE I/D polimorfizmini incelemiş ve D allel frekansının nefropatik bireylerde arttığını belirtmişlerdir(58). Aynı araştırma grubunun yaptığı bir diğer çalışmada I allel frekansının albuminürisi yüksek bireylerde düşük çıkması I allelinin koruyucu bir rolünün olabileceği görüşünü ileri sürülmesine neden olmuştur(53). Kuramoto ve arkadaşları 1999'da insülin direnci 62 Japon tip2 diabetli (NIDDM) hastada Diabetik Nefropati gelişimi ve başlangıcında ACE gen polimorfizmlerini incelemiş ve D alleli taşıyan hastalarda DN'nin daha yaygın

olduğunu dolayısıyla NIDDM hastalarında ACE'nin Diabetik Nefropati başlangıcında etkili olduğunu göstermişlerdir(46).

Diabetik nefropatilerde etnik farklılıklara göre de ACE gen polimorfizminde farklılıklar göstermektedir(31,55,79) . Sagnella ve ark 1999'da yaptıkları bir çalışmada beyazlar, Afrika kökenliler ve Güney Asyalı bireylerde ACE'nin etnik varyasyonlarını araştırmışlar ve Afrikalı ve beyazlarda benzer frekanslar görülürken(II %18.4, ID%49.6, DD%32) Güney Asyalılarda II genotipinin arttığını bildirmişlerdir(II %39.8, ID%41.8, DD%18.3)(79).

Literatürlerde diabetik nefropati ile ACE gen polimorfizmi arasındaki ilişki ile ilgili çelişkili sonuçlar rapor edilmektedir. DD genotipi ve D allelinin diabetik nefropatilerde daha sık görüldüğü çalışmalar olduğu gibi (11,22,28,46) diabetik nefropati gelişimi ile ACE gen polimorfizmini arasında bir ilişki olmadığını savunan çalışmalarda mevcuttur(43,53). Ancak son yıllarda gelişimi ve ilerlemesindeki genetik yatkınlığı ortaya çıkarmak için yapılan gen analizleri Angiotensin Converting Enzim polimorfizminin değerlendirilmesine dayandırılmaktadır. Bu sistemin hücre proliferasyonu sitokin ve büyüme faktörü salınmasına olan etkileri göz önüne alındığında genetik yatkınlığı değerlendirmede bu sisteme etkili olan genlerdeki farklılıklar ve bunların klinik etkilerini incelemek en akıllı yaklaşım olmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalarda değişik etnik gruplarda farklı sonuçlar rapor edilmektedir. Bu nedenle Türk Toplumunda ACE gen polimorfizminin diabetik nefropatili hastalarda incelenerek hastalığın üzerindeki etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Diabetes Mellitus'un Tanımı Ve Sınıflandırılması

Dünya nüfusunun yaklaşık %3-5'I bu hastalığın etkisi altında olup, açlık kan şekerinin 140mg/dl'nin üzerinde çıkmasıyla tanımlanabilir(69) .

İnsülin yetersizliği, eksikliği veya yokluğuna, bağlı olarak gözlemlenen Diabetes Mellitus (DM) değişik tipleri olmakla birlikte esas olarak 2 ana grupta incelenmektedir. Bunlar:

1- Tip 1 Diabetes Mellitus (İnsülin'e Bağımlı Diabetes Mellitus; IDDM). Hastalık çocukluk döneminde başlamakla birlikte nadiren daha ileriki yaşlardada görülür. Hastalık otoimmün kökenlidir. IDDM için en büyük genetik faktör HLA kompleksi 6. Kromozomdur. Bu genetik temel çevre faktörleri ile etkileşerek pankreasta insülin üreten β hücrelerinin otoimmün bir atakla yok olmasına neden olur. Tedavi mutlaka insüline bağımlıdır. Hastalığın kış aylarında daha sık görüldüğü belirlenmiştir(90). Son yıllarda yapılan çalışmalarda viral etkenlerinde hastalığın oluşmasında etkili olduğunu göstermektedir. (18,35)

2- Tip 2 Diabetes Mellitus (İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus; NIDDM). Diabetin en sık görülen şeklidir. Hastalık genellikle erişkin dönemde başlar. İnsülin yetersizliği veya hücrelerin insüline duyarsızlaşması sonucu ortaya çıkmaktadır. Özellikle obezite ve hareket azlığı hastalık patogenezinde etkili olup Pima yerlilerinde en sık görülme yüzdesine sahiptir. Tedavide diyet ve oral antidiabetikler kullanılır.

Yukarıda özetlenen sınıflandırma dışında Diabetes Mellitus etiyolojik temele bağlı olarakta sınıflandırılabilmektedir.

A-Primer

1. İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus(IDDM, Tip1)
2. İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus(NIDDM, Tip2)
3. Non-obez NIDDM
4. Obez NIDDM
5. MODY (Maturty onset diabetes of the young)

B-Sekonder

1. Pankreas hastalıkları
2. Hormonal Anomaliler
3. İlaç ve kimtasal etkenlerle oluşan
4. İnsülin reseptör anomalileri

2.2.Renin-Angiotensin Sistem(RAS)

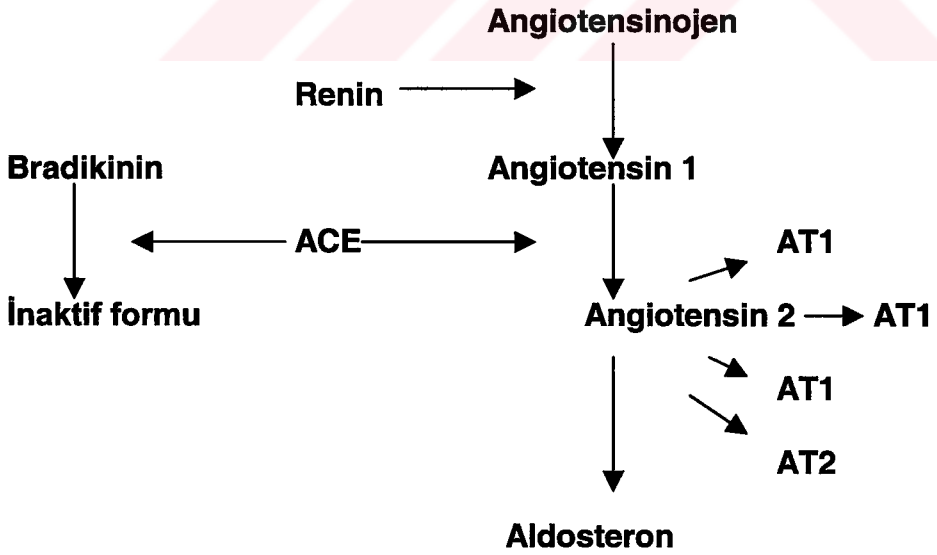
Renin-Angiotensin Sistem; kan basıncını,sıvı ve elektrolit dengesini ve bunları ilgilendiren doku ve organ sistemlerini kontrol eden bir sistemdir.

Bu sistem içerisine büyük globüler bir protein olan angiotensinojenden elde edilen angiotensin2'dir. Karaciğerde sentezlenen bir alfa-2 globulin angiotensinojen afferent arteriolun jugstaglomerular hücrelerinde sentezlenen reninin substratıdır. Bu hücreler konumlarından dolayı özellikle kan basıncı değişikliklerine karşı duyarlıdırlar. Ayrıca renin salınımı ile ilgili fizyolojijk reseptörlerin pek çoğu baroreseptör yolu ile etkilidirler.

Jugstaglomerular hücreler renal tubular sıvıdaki sodyum ve klor düzeyindeki değişikliklere karşı çok hassas bir tablo göstermektedir. İşte bu

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

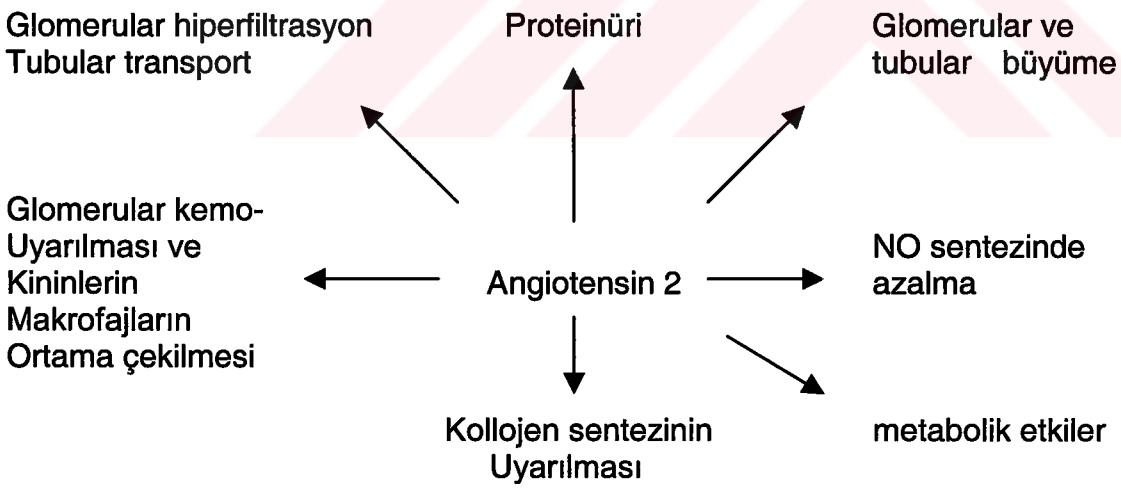
nedenden dolayı sıvı hacmini ve sodyum klorür derişimini azaltan faktörlerin herhangi biri renin salınımının uyarılmasına neden olmaktadır. Ayrıca jugstaglomerular hücrelerde sonlanan renal sempatik sinirler renin salınımı üzerine olan santral sinir sistemi etkilerini ve postoral etkileri beta adrenarjik reseptörleri kapsayan bir mekanizma ile baroreseptör ve bu etkilerden bağımsız olarak aracı olduğu ileri sürülmektedir(14,82). Renin anjiotensinijene proteolitik bir etki yaparak bir dekapeptid olan angiotensinojen1'I oluşturur. Akciğer, endotel hücreleri ve plazmada bulunan angiotensin konverting enzim(ACE) bir dipeptilkarboksipeptidaz olan ACE, angiotensin1'I angiotensin2'ye dönüştürmektedir. Bu basamak hız kısıtlayıcı basamaktır. Aynı zamanda ACE Bradikini inaktive ettiği gibi kallikrein sisteminide bloke eder(Şekil 1).



Şekil(1): Bradikinin inaktivasyonu ve Renin angiotensin sisteminde Angiotensin Converting Enzimin rolünün şematik gösterimi(63).

Angiotensin2 kan basıncını ve arteriolar vasokonstriksiyona bağlı olarak arttıran güçlü bir vasoaktıf madde olup jugstaglomerular hücrelerden renin çıkışını engellediği gibi aldosteron üretiminide uyarmaktadır. Angiotensin2 glomerular sirkülasyonu sınırlamadığı gibi proksimal tubulusta su ve sodyum emiliminde önemli derecede rol oynar (9). Mezengial hücrelerde bulunan angiotensin2 reseptörlerine bağlanarak bu hücrelerde ve afferent/efferent arteriollerde konstraksiyona neden olmaktadır(60).

Angiotensin2 MCT Hücrelerinde tip4 kollojenin transkripsiyonunu uyarmaktadır. Vasoaktif bir peptid olan anjiotensin2'nin böbreküstü görevleri dışında büyüme, fibrogenezin uyarılması gibi immünomobilasyon ile ilgili görevleride vardır(Şekil 2).



Şekil(2): Glomerulasclerosis ve tubulointersitisiyal fibrosisin nedenleri

Renal hasardan sonra böbreğin tekrar nodüllenmesinde de angiotensin 2 önemli derecede görev almaktadır. Angiotensin 2 renal hücrelerde henüz tanımlanamamış olan bir faktörü uyararak parankim ve otokrin bezlerin

yakınındaki hücreler,I aktive ederek lokal olarak sitokin ve büyüme faktörlerinin salınmasına neden olmaktadır.Tablo(1).

Tablo(1): Angiotensin 2 tarafından indüklenen sitokin ve büyüme faktörleri

Faktör	**Hücre Tipi**
Endothelin-1	Mezengial hücre
	Glomerular endotel
	Hücre
İnterlökin6	Mezengial hücre
MCP-1	"
PAF	"
PAI	"
PDGF	"
RANTES	Glomerular endotel
	hücre

Ayrıca angiotensin 2'nin uyarıcı etkisi sonucu böbrek intersitisiyel fibroplastları, mesengial ve düz kas hücrelerinde intersitisiyel tüpte kollojen ve fibronektin sentezlenmektedir.Ayrıca mezengial hücre proliferasyonu sonucu atrial natriüretik peptid ve NO sentezi öncüleri inhibe olmaktadır.

Son dönemlerde yapılan araştırmalar sonucu transforming büyüme faktörü, beta-1 trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve ana büyüme faktörü gibi Otokrin büyüme faktörleri fibroblast proliferasyonu parankim mekanizma ile de etkilenebileceği gösterilmiştir.

Angiotensin2'nin artmasıyla hipertansiyonun oluşmasınada neden olabilmektedir. ACE inhibitörleri hem proksimal tubul reabsorbsiyonunu azaltır hemde tubuloglomerular geri tepkiyi dindirir ve GFR'de azalmaya

sebep olur. ACE inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda bu maddenin hipertansif olgularda kas basıncını düşürdüğü, renal kan akımını ve sodyum atılımını normal insanlarda arttırdığı, böbrek hastalığı olan olgularda ise proteinüriyi azalttığı gösterilmiştir(12).

2.3.Angiotensin Converting Enzim Geni Ve Diabetteki Yeri

İnsan ACE geni 26 eksonludur ve 17. Kromozom üzerine yerleşmiştir. 1990 yılında Rigat tarafından Southern Blot ve ACE Cdna kullanılarak tanımlanmış olup 16.intronda 278bp alu tekrar bölgesinin absence(delesyon-D) ve presence(insersiyon-I) polimorfizmi ile karakterize edilmiştir. ACE içerisinde akciğer, vaskular endotel, kalp ve testislerinde bulunduğu geniş bir doku bölgesinde sentezlenir(58). Molekül ağırlığı karbonhidrat içeriğine bağlı olarak endotelyal şekli için 140-160kd iken testiküler şekli için bu değer 90-100kd olduğu gösterilmiştir(30).

ACE geninin Mendel kalıtımı şeklinde geçiş gösterdiği, allellerin plazma ACE seviyesi üzerindeki etkilerin değişik olduğu, D allelini homozigot(DD) olarak taşıyan kişilerde serum ACE düzeyi yüksek olarak bulunurken homozigot I(II) alleli taşıyanlarda düşük bulunmuştur(26,53).

Rigat ve ark. 1990'da 80 sağlıklı bireyde yaptıkları çalışmada ACE gen polmorfizmi ve serum konsantrasyonu düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmış ve DD genotipi taşıyan bireylerde serum konsantrasyonunun II ve ID genotipine göre yüksek olduğu gözlenmiştir. (II 299.3±49.0, ID 392.6±66.8, DD 494.1±88.3)(75).

Üstündağ B ve ark Türk tip1 ve diabetik nefropatili hastalarda ACE gen aktivite düzeylerini araştırmış kontrollere göre ACE aktivitesi diabetlilerde özelliklede DN'li hastalarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur(91).

Freire ve ark.1998'de DN'si olan ve olmayan IDDM hastalarında ACE serum düzeylerini araştırmış ve II genotipi taşıyanlarda ACE aktivitesinin az, DD genotipi taşıyanlarda ise artmış olduğunu bildirmişlerdir(26).

Yapılan ilk çalışmalar ACE I/D polimorfizmi ile miyokard infarktüsü (MI) ve kardiovaskular hastalıklar arasında odaklanmış olup daha sonra gelişen moleküler biyolojik teknikler ile renal hastalıklardada çalışılmaya başlanmıştır. (15,28,29, 40, 84).

Katsuya ve arkadaşları 1995 yılında 124 normal glikoz toleranslı ve 57 tip2 diabetli hastada ACE DD genotipi ile insülin rezistansı, glikoz intoleransı, hiperinsülinemi ve dislipidemi arasındaki ilişkiyi incelemi,ş iki grup arasındada istatistiksel olarak anlamlı değerler bulamamışlardır(44).

Yudkin ve ark 1997 yılında tip2 diabetli ve sağlıklı bireyler arasında ACE gen polimorfizmi ile mikroalbuminüri arasındaki ilişkiyi incelemiş ve ACE genotip dağılımı ve microalbuminüri arasında bir ilişki bulamamışlardır (96).

Hunley ve ark 1996 yılında ACE gen polimorfizmi ve IgA nefropatisi arasındaki ilişkiyi incelemiş ve ACE I/D polimorfizminin IgA nefropatisinde renal fonksiyonlardaki gerilemeyi arttırdığını belirtmişlerdir (39).

Ayrıca farklı etnik gruplar üzerinde yapılan çalışmalarda da ACE gen polimorfizmi farklı sonuçlar vermiştir(31,55,79).

Guiseppe A.Sagnella ve ark. 1999'da yaptıkları bir çalışmada beyazlar, Afrika kökenliler ve Güney Asyalı bireylerde ACE'nin etnik varyasyonlarını araştırmışlardır. Yapıllan çalışmada Afrikalı ve beyazlarda benzer frekanslar

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

görülürken (II %18.4, ID %49.6, DD %32) Güney Asyalıllarda II genotipinde artış görülmüştür (II %39.8, ID %41.8, DD %18.3)(79).

Yapılan bazı çalışmalarda Asya toplumunda D alleli Avrupa toplumuna göre daha düşük bulunmakla birlikte bazı çalışmalarda da tersi bir durum söz konusu olmuştur. Fujisama'nın 4773 diabetli Japon hastada yaptığı çalışmada D allelini anlamlı olarak Diabetik Nefropati ile ilşkili bulunmuştur(28).

Kuramoto ve ark. 1999'da insülin direnci görülen 62 tip 2 diabetli hasta da ACE gene polimorfizmi çalışmış ve ACE D alleli görülen hastalarda diabetik nefropati görülme sıklığının daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Buda ACE geninin Diabetik Nefropati oluşumu ve gelişiminde etkili olduğunu göstermiştir(46).

2.4.Diabetik Nefropati

Hem IDDM hemde NIDDM'nin sık olarakgözlenen mikrovaskular komplikasyonlarından biri olan diabaetik nefropatinin klinik gidişi aşağıda özetlenmiştir.Tablo(2)

Tablo(2): Diabetik nefropatinin klinik seyri

Diabet süresi(yıl)	Klinik gidiş
0	Büyümüş hiperfiltre eden böbrekler, mikroalbuminer düzenli insülin tedavisi ile kaybolur
2	Glomerular bazal zarın kalınlaşması ve mezengial matriksin artışı
10-15	Mikroalbuminüri gözlenmesi
10-20	Proteinürik dönem
15-20	Azotemik zaman

Diabetik hastalarda renal hasarın artmasında ve mikroalbuminüriye doğru ilerlemesinde pek çok faktörler etkili olmaktadır. Bu faktörler sırasıyla aşağıda özetlenmiştir.

1. Kötü glisemik kontrol
2. Sistemik hipertansiyon
3. Diabet süresi
4. Klipid profil bozuklukları
5. Hemostatik parametreler
6. Proteinüri
7. Sigara alışkanlığı

Renal hastalıklar diabetlilerde özürlere ve ölüme neden olan etkenlerdir. Diabetik Nefropati, her zaman hastalığın başlangıcıyla beraber ortaya çıkar veya bazı bireylerde uzun süre sessiz olarak fonksiyon gösterebilir. Diabetik nefropati 5 aşamada incelenir. Birinci aşamada glomerular filtrasyon hızı artmış kan basıncı ise normal düzeydedir. İkinci aşamada hem glomerular filtrasyon hızı hemde kan basıncı normal veya normalin biraz üzerindedir. Ancak glomerular kapillerde yapı anomalileri görülmeye başlanmıştır. Üçüncü aşamada Albumin atılım hızı 20-200ug/dk iken kan basıncında artış görülmektedir. Bu evre mikroalbuminürinin görülmeye başladığı devredir. Dördüncü aşamada albumin atılım hızı >200ug/dk' nın üzerindedir. Buna karşın glomerular filtrasyon hızı düşmüştür. Son aşama ise End Stage Renal Disease (ESRD) olarak adlandırılır(8). Diabetik nefropati 24 saatlik idrarda >300mg'ın üzerinde protein atılımı, artan kan basıncı ve gerileyen renal fonksiyonlarla karakterize edilir. Genellikle diabetin 7-13. Yılından sonra mikroalbuminüri görülmeye başlar ve 10-20 yıl sonra ise macroalbuminüri görülmesiyle beraber nefropati başlar(17). Bu periyot içinde hastaların bir çoğunda hipertansiyon gözlenmekte ve hastalık bir çok seferinde dializ veya transplantasyonla sonuçlanmaktadır(8). Renal hastalığı olan diabetlilerde özellikle hastalığın başlamasında yüksek kan şekeri, sistemik hipertansiyon, diabet süresi, genetik faktörler, lipid anomalileri, hemostatik parametreler ve sigara alışkanlığı gibi faktörler diabetlilerde renal hasarın başlamasında ve mikroalbuminüriden macroalbuminüriye geçişte önemli risk faktörleridir(19). NIDDM'li hastalarda hiperlipidemi ateroskleroz ve glomerulosklerozgelişmesinde önemli bir risk

faktörüdür. NIDDM'li hastalarda lipid profilinde artmış trigliserid ve VLDL düzeyleri ile artmış HDL düzeyi izlenir. LDL hafif artmış veya normaldir (37).

M.A. Gall ve arkadaşları 1997 yılında 66 yaş altı 191 normoalbuminürili ve 172 mikroalbuminürisi ve makroalbuminürisi olan tip 2 diabetli hastada yaptıkları çalışmada başlangıçta normoalbuminürik olup sonradan mikroalbuminüri gelişen 36 veya makroalbuminüri gelişen 5 hastada sistolik kan basıncının, HbA1c konsantrasyonunun, serum kolesterol konsantrasyonunun arttığı ve bu hastalarda uzun süreli yetersiz şeker kontrolünün bulunduğunu göstermişlerdir(49). IDDM ve NIDDM hastalarının %30-40'ında diabetik nefropati gelişir(87). Ailesinde kardiovaskular hastalıklar ve hipertansiyon görülen tip1'lerde nefropati gelişimi diabet olmayan hastalara göre 4 kat fazladır(7). Bir çok çalışmada sigara ile diabet arasındaki ilişki incelenmiştir. Sigara içen NIDDM ve IDDM hastalarında microalbuminüri ve proteinüri riskinin arttığı ve Diabetik Nefropati gelişim riskinin daha fazla olduğu belirtilmiştir(51). Yine kardiovaskular hastalığı olan diabetli erkek hastalarda ölüm riski diabatik olmayanlara göre üç kat daha fazladır. Bu oran sigara içen diabetli erkeklerde ise daha da artmıştır(45).

Diabetli hastalarda hipertansiyonla ilgili çalışmalarda yapılmıştır(10, 25, 29, 57, 77). Hipertansiyonu olan tip2 diabetli hastalarda diabete bağlı ölüm, komplikasyonların görülme sıklığı hipertansiyonun sıkı kontrolü ile azalmaktadır. Tansiyonu iyi kontrol edilen tip2 diabetli grupla edilmeyen grup karşılaştırıldığında %37 oranında iyi kontrol edilen grupta mikrovaskular komplikasyonların görülme oranı azalmıştır(89).

Tip 2 hastalarda diabetin teşhisinden hemen sonra nefropati görülmesi riski oldukça yüksektir. Buna başlıca neden diabetin aslında teşhisinden daha

öncede hastada mevcut olmasından kaynaklanmaktadır. Bu neden sonucu diabet süresi tam olarak bilinmemektedir(3). DN'den sorumlu olduğu düşünülen genlerin kan basıncını düzenleyen, kardiovaskular risk faktörü olan genler ve glomerular bazal membran, mezengial hücre proliferasyonunu düzenleyen faktörler ile ekstra sellular matriks ürünlerini kodlayan genler oldukları bilindiğinden beri bu genlerin polimorfizmleri çalışılmaya başlanmıştır. Diabetik Nefropatide genetik yatkınlık için 3 model ileri sürülmektedir.

1. Ana gen etkisi: Burada kötü glisemik kontrol ve bir genin polimorfizmi söz konusudur.
2. Orta derecede gen etkileri: Bu tabloda ise kötü glisemik kontrol ve birkaç genin polimorfizmi ve mutasyonu ile benzer aditif etkiler gözlenmektedir.
3. Poligenik genlerin etkisi: Kötü glisemik kontrolü yanında pek çok lokusu yanında DNA dizisindeki değişikliklerin yanında aditif etkiler ortaya çıkmaktadır.

Özellikle Renin-Angiotensin sistem(RAS)'e ait genetik anomaliler Diabetik Nefropati gelişiminde potansiyel risk faktörleridir. Diabetik Nefropati ve ESRD(End Stage Renal Disease)'nin ilerlemesi gliseminin kontrolü ve ACE inhibitörleri (ACEİ) kullanımı ile hastalığın ilk basamaklarında geri döndürülebilir(25). Özellikle ACEİ kullanımı ile Diabetik Nefropati hastalarında renal fonksiyonlardaki gerilemeler azaltılabilir. Bu konu ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır(32,34,41,48,54,65,88,92). Edmund J. Lewis ve ark. 1993'de yaptıkları bir çalışmada Captopril ve plasebo kullanan tip2 Diabetik Nefropati'li hastaları karşılaştırmış ve Captopril kullanan hastalarda %50 oranında

transplantasyon, dializ ve ölüm olaylarının azaldığı görülmüştür(48). Jacobsen ve ark 1998'de yaptıkları bir çalışmada Diabetik Nefropati'li 60 IDDM hastasında ACE inhibisyonunun etkisini incelemişlerdir. Bütün gruplarda albuminüri ve kan basıncında azalış olmasıyla beraber özellikle II genotipi taşıyan hastalarda diğer genotiplere göre bu azalmanın daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir (41).

Ha SK ve ark. 2000 yılında 83 overt proteinürili NIDDM hastasında yaptıkları çalışmada hastalara üç ay süre ile ACE inhibitörleri uygulamış ve bu süre sonunda ACE DD genotipi taşıyan hastalarda albumiüri ve protein atılımında ID ve II genotiplerine göre daha yüksek bir azalma gözlenmiştir(32).

ACE inhibisyonu renal fonksiyonlardaki azalmayı geciktirir ancak bu etki bireyler arasında farklılık gösterir. Özellikle DD genotipi taşıyan hastalarda bu etkinin zayıf olduğu bildirilmiştir(92).

2.5.ACE Gen polimorfizminin diğer hastalıklarla olan ilişkisi

IgA glomer5ulonefritli olgularda angiotensin(AGT)-M235T, ACE gen ve angiotensin2 tip1 reseptör polimorfizimlerini birlikte araştıran çalışmalarda ise söz konusu polimorfizmlerin progresyon ve proteinüri ile tek başına bir bağlantısının bulunmadığı ancak ACE DD ve AGT MM genotiplerini taşıyan olgularda prognozun daha kötü seyrettiği gözlenmiştir. Bu bulguya dayanarak angiotensin ve ACE gen lokuslarının IgA glomerulonefritli olgularda kronik renal yetmezliği doğru gidişin önemli belirleyicileri olabileceği görüşleri ileri sürülmüştür.(67)

Ancak IgA glomerulonefritli olgularda ACE inhibitörlerine karsı 4-12 haftalık tedavi sonucu verilen cevap DD,ID ve II genotiplerinde aynı olduğu gözlenmiştir.(34).

Ayrıca transplante olmuş IgA glomerulonefritli olgularda ACE I/D polimorfiziminin transplant yaşamıyla bir bağlantısı olmadığı gösterilmiştir(42).

Fokal segmantal glomerular skleroz 'lu Arap ve Yahudi çocuklarında yapılan çalışmaların sonucuna göre ACE II genotipi taşıyan olgularda hastalığın belirgin olarak yavaş ilerlediği ve II genotipinin koruyucu bir gösterge olabileceği DD genotipinin ise hastalığın kötü sonuçlanmasıyla bağlantılı olabileceği saptanmıştır(27).

Otozomal dominant geçişli polikistik böbrek hastalığı olan bireylerde DD genotipine sahip olanlarda hipertansiyon gelişimi ve son dönem renal yetmezliğe gidiş diğer genotiplere oranla daha genç yaşlarda ortaya çıktığı gözlenmiştir(6). Yapılan çalışmalar erkekler üzerinde ACE D allelinin hipertansiyon riski ile ilgili olduğu görüşünü savunmuşlardır(20).

ACE DD genotipi koroner arter hastalığının altında yatan etiyolojik neden mutasyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir(72).

Estacio ve ark 1999'da 289 tip 2 diabetlide left ventricular mass(LVM) ve ACE genotipleri arasında ilişki araştırmış ve erkeklerde ACE DD genotipinin LVM bireylerde arttığı gözlenmiştir (23).

Kafkas ve Japon ırklarında ACE DD genotipi taşıyan bireylerde koroner arter hastalığı riskinin arttığı rapor edilmiştir(42,47).

Özellikle DD genotipinin hücresel ACE aktivasyonu sonucu miyokardial fibrosis gelişmekte ve bu olayın atriumlarda gelişmesi sonucu hastalarda atrial

fibrilasyon gözlenmektedir. Ayrıca hipertrofik kardiomiyopatide DD genotipinin hipertrofinin artmasıyla bağlantılı olduğu ve bu hastalığa bağlı ani ölümlerin söz konusu genotipte daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Diabetli hastalarda lipoproptein düzeyleri ile ilgili olarakta çalışmalar yapılmıştır(68,94).

Ruiz ve arkadaşları 316 NIDDM hastasında kardiovascular hastalıklar ila ACE gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştitmış ve ACE D allelini hipertansiyon ve lipid düzeylerinden bağımsız olarak Kardiovaskular hastalıkların başlangıcıyla ilişkili olduğunu göstermiştir(78).

2.6.Diabetik Komplikasyonlar

Diabetes Mellitus'lu bireylerde ister tip1 ister tip2 olsun zamanla diabetin neden olduğu bir seri komplikasyonlar gözlenmektedir. Diabetik komplikasyonlar, bir çok organ sistemini etkiler ve makro ve mikro komplikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Mikrovaskular komplikasyonlar nefropati, nöropati, retinopati iken makrovaskular komplikasyonlar ise iskemik kalp hastalıkları, inme ve periferal dolaşım bozukluklarıdır. Diabetik komplikasyonların sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte multifaktoriyeldir. Bunların içinde yer alan glikozu sorbitole indirgeyen aldoz redüktaz enzimine bağlı olabileceği son günlerde geniş bir taraftar toplamaktadır. Sorbitol bir doku toksini gibi davranabilmektedir. Bu yüzden nöropati, retinopati, nefropati ve aortik hastalıkların patogenezinde rol oynayabilmektedir. Bu yol özellikle retinopati ve nöropati oluşumunda etkilidir. Diğer bir mekanizma ise proteinlerin nonenzimatik glikolizasyonudur. Bu proteinler içinde en önemlisi hemoglobindir. Ayrıca buna ek olarak lipoprotein

glikolizasyonuda diğer önemli mekanizmadır. Özellikle glikolize LDL, normal LDL reseptörleri tarafından tanınmaz ve oluşan hatalı ürünler plazmada kalarak damar duvarlarında birikirler ve vaskular komplikasyonlara neden olmaktadır. Yine bir başka protein olan kollogende glikozillenerek komplikasyonların oluşmasında rol oynar(13). Komplikasyonları başlamasındaki en önemli faktör diabet süresidir. Buna ek olarak hipertansiyon, hiperkolesterolemi,hiperglisemi ve sigara içimi diğer önemli faktörler arasında yer almaktadır(21). Tip 2 hastalara diabet tanısı konduktan sonra hastaların %20'sinde retinopati, %8'inde nefropati, %9'unda nöropati görülmesi rapor edilmiştir(69).

Frans J. van İttersum ve arkadaşları 2000 yılında 257 Hollandalı Tip 1 diabetli hastada yaptıkları bir çalışmada hastaların diabetik nefropati, retinopati ve kardiyovaskular hastalıklara karşı yüksek risk taşıdıklarını göstermişlerdir (93).

Kristian F. Hanssen 1997'de yaptığı bir çalışmada yüksek kan şekeri düzeyinin Tip 1 diabetlilerde mikrovaskular komplikasyonların oluşmasında önemli bir risk faktörü olduğunu belirtmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Tip 2'lerde de mikrovaskular komplikasyonlarla yüksek kan şekeri düzeyi arasında bir ilişki olduğuna dair kanıtlar vardır(33). Bununla ilgili bir diğer çalışmada da Stratton ve ark. 2000 yılında 4585 beyaz, asyalı ve afro-karabian tip 2 diabetli hastada çalışmış HbA1c düzeyinde meydana gelen her %1'lik azalmanın diabetten ölümleri %21, miyokard infarktüsü riskini %14, mikrovaskular komplikasyonları %37 oranında azalmasıyla ilgili olduğu anlaşılmıştır(85). Benzer bir çalışmada sıkı kan basıncı kontrolü ile diabetik komplikasyonlar arasındaki ilişki tip2 diabetlilerde araştırılmış ve sıkı kontrol

altında olan bireylerde, olmayanlara göre diabetten ölümlerin %31, inmenin %55, mikrovaskular komplikasyonların %37 oranında azaldığı gözlenmiştir(89).

Ailesel köken incelendiğinde ebeveynlerinde proteinüri olmayan Pima yerlilerinin(NIDDM) %14.3'ünde, ebeveynlerinin birinde proteinüri olanların %22.9'unda, ebeveynlerinin her ikisindede proteinüri olanların %45'inde proteinüri ve nefropati gelişimi görülmüştür(73).

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Seçilen örneklerin tanımı: Bu çalışmada dört örnek grubu kullanılacaktır. Birinci grupta diabetik nefropatisi olmayan 15-74 yaş arası 13 kadın 7 erkek toplam 20 tip1 diabetli olgu kullanılacaktır.

İkinci grupta ise diabetik nefropatisi olmayan 42-82 yaş arası 20 kadın 10 erkek toplam 30 tip2 diabetli olgu kullanılacaktır.

Üçüncü grupta klinik açıdan diabetik nefropati tanısı konulmuş 17-75 yaş arası 20 kadın ve 5erkek toplam 25 olgu kullanılacaktır.

Dördüncü grupta kontrol olarak kullanılmak üzere yüksek tansiyon, diabet, nefropati ve kalb rahatsızlığı olmayan 19-81 yaşları arasındaki 15 kadın ve 12 erkek toplam 37 birey normal populasyondan rastgele seçilerek örnek olarak kullanılacaktır.

Seçilen vakalardan 10ml.lik kan örnekleri EDTA'lı ve kuru tüplere toplanacaktır. EDTA'lı tüplerdeki periferik kan lökositlerinden elde edilen DNA örneklerinde ACE gen polimorfizmini saptamak için PCR (Polimeraz zincirleme reaksiyonu) ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanılacaktır. Kuru tüplere alınan kan örneklerinden santrifüjleme ile serum elde edilecek ve ayrılan serumlardan açlık kan şekeri, kreatinin, üre, kolesterol, trigliserid, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ve VLDL kolesterol tayini yapılacaktır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz (Promega MBG), Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorür (Sigma A-5666), Asetik asit (Merck K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768),

Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), Brom fenol mavisi (Sigma B-6896), dNTP seti (MBI Fermentas), Dietileter (Merck), EDTA (dihidrat)(Merck K-90602121), Elon (Sigma M-5251), Etanol (%99 Tekel), Etidyum bromür (Sigma E-8751), Hidrojen peroksit (%35 Merck K-22035097), Mineral yağ (Sigma M-5904), Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Sodyumbisülfit (Sigma S-9631), Sodyum doedosil (lauryl) sulfat (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Potasyumdihidrojenfosfat (Merck A-741071), Sodyum klorür (Carlo Erba 368257), Sodyum molibdat (Sigma S-6646), Sülfirik asit (Sigma S-1526), Trizma baz (Sigma T-1503), Taq polimeraz (Promega), Metaphor agaroz (FMC 50182), Xylene cyanol (Sigma X-4126), DNA marker(50-100 bp DNA size marker; MBI Fermentas), Proteinaz K (Stratagene300-141), Potasyum hidroksit (Sigma P 1767), Triton X-100 (Sigma T9284), Civa klorür(Sigma M 1136), Sodyum azid (Sigma S 2002), Titanyum oksid (Sigma T 8141), Amonyum sülfat (Sigma A 5132), Xylene orange (Sigma X 0127), İzopropanol (Sigma 405-7), Kolesterol standartı (Sigma C-0284), Kolesterol oksidaz (Sigma C 1638), primer dizileri (MBI Fermentas).

3.3. Kullanılan Gereçler

Elektroforez için güç kaynağı (Titan plus Helena Laboratories), Hassas terazi (Mettler), Polaroid kamera (DS34 Direct screen instant camera), Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj (TDX), PCR aleti (MJ Research Techne), pH metre (Hanna), Pipet takımı (Brand), Falkon santrifüj (Hereaus), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208), Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Vorteks (Nuve mix), Elektroforez Sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis).

3.4. ÇÖZELTİLER

3.4.1.DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

1-Eritrosit Parçalama Tamponu

8,74 gram amonyum klorür, 1 gram potasyum bikarbonat, 200ul 0,5 molarlık etilen diamin tetra asetat (EDTA)'nın tartımları yapılarak erlen içine alınır. 900ml ddH_2O eklenir ve çözeltinin pH'sı bir normal sodyum hidroksit çözeltisi ile 7.4'e ayarlanır. Daha sonra balon joje içine alınarak bir litreye tamamlanır. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişeye alınarak 120°C'ye alınarak 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de saklanır.

2- 0.5 M Disodyum etilen diamin tetra asetat (EDTA) (pH:8.0)

186.1 gram etilen diamin tetra asetat tartılarak beher içine alınır ve 800ml ddH_2O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürülür ve pH'sı sodyum hidroksit çözeltisi ile 8.0 'e ayarlanarak ddH_2O ile 1lt'ye tamamlanır. Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

3- 4 Molar Sodyum Klorür(NaCl)

233.6 gram sodyum klorür tartılarak erlene alınır. Üzerine 800ml ddH_2O ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürülür. Balon jojeye aktarılarak 1lt'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir

4- Lökosit Parçalama Tamponu

25ml 4M sodyum klorür ve 50ml 0.5M etilen diamin tetra asetat (EDTA) direkt balon jojeye aktarılarak 1lt'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklanır.

5- 1 Molar Tris Tamponu (stok)

121.1gram Tris baz tartılarak bir behere alınır. Üzerine 42ul hidroklorik asit ile yaklaşık 800ml ddH_2O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürülür. Daha sonra balon jojeye aktarılır ve 1lt'ye tamamlanır. . Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

6- 9.5 Molar Amonyum asetat

73.22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alınır. Üzerine 80ml ddH_2O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Balon jojeye aktarılır ve ddH_2O ile 100ml'ye tamamlanır. 0.22mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir ve +4°C'de saklanır.

7- %10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS)

10gr sodyum dodesil sülfat tartılır. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek beher içine alınır ve üzerine 80ml ddH_2O eklenir. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürülür ve pH'sı 7.2'ye ayarlanır. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir ve oda ısısında saklanır.

8- Proteinaz K (20mg/ml)

20mg proteinaz K tartılarak steril bir gode içinde steril ddH_2O ile 1ml'ye tamamlanır ve -20°C'de saklanır.

3.4.2.Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

1-Etidyum Bromür (10mg/dl)

10 gram etidyum bromür tartılarak steril ddH_2O ile 10ml'ye tamamlanır.

2-Agaroz jel yükleme tamponu (5x)

20gram Ficoll 400, 1gram SDS, 1.2ml 0.5 molarlık etilen diamin tetra asetat, 1ml 1molarlık Tris (pH 8.0), 200mg Bromo fenol blue, 200mg Xylen cyanol tartılarak steril ddH_2O ile 100ml'ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

3- 50xTris-Asetik asit-Etilen diamin tetra asetat (TAE) Tamponu

242 gram tris baz tartılarak bir behere alınır. Üzerine 57,1ml Glasiyal asetik asit ve 100ml 0.5 molarlık etilen diamin tetra asetat ve 800ml ddH_2O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve oda ısısında saklanır.

4- 5xTris-Borik asit-Etilen diamin tetra asetat (TBE) Tamponu

54 gram tris baz ve 27.5 gram borik asit tartılarak bir behere alınır. Üzerine 20ml 0.5 molarlık etilen diamin tetra asetat ve 800ml ddH_2O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Balon jojeye aktarılarak 1 l

itreye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve oda ısısında saklanır.

5-%3'lük Agaroz Jelin Hazırlanması

1.5 gram agaroz tartılarak behere alınır. Üzerine 50ml 1X TAE çözeltisi eklenerek mikrodalga fırında kaynatılır. Daha sonra üzerine 1ul 10mg/ml'lik etidyum bromür eklenerek karıştırılır. Yaklaşık 70°C'ye soğutularak küvete dökülür. Tarak yerleştirilir ve jel soğumaya bırakılır.

3.4.3.Lipid profilleri tayininde kullanılan çözeltiler

1-Etanolik potasyum hidroksit çözeltisi

50ml triton X-100, 600ml etanol ile birleştirildikten sonra litresinde 1nmol olacak şekilde potasyum hidroksit çözeltisi eklenerek balon jojede 1litreye tamamlanır.

2-10Mm Tris (hidroksimetil) aminomethyane fosfat tamponu (pH7.6)

Litrede 10 mmol olacak şekilde tris tartılarak pHsı 7.6 oluncaya kadar potasyum dihidrojen orto fosfat (29mmol/L) ile titre edildi. Daha sonra sonra balon jojede 1lt'ye tamamlandı.

3- Nötralize edici çözelti (A)

16.6ML hidroklorik asit (1mol/L), 100ml tris-hidroksimetil aminomethyane fosfat (pH7.6) çözeltisiile seyreltilerek nötralize edici çözelti hazırlandı. (Bu ayıraç her çalışmada taze olarak hazırlandı ve 37°C'de pH'ın 7.5 olup olmadığı kontrol edildi.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

4-Okside edici çözelti (B)

14mg merkürik klorür ve 1gr sodyum azid 100ml saf suda çözülerek okside edici çözelti hazırlanmıştır.

5-Kolesterol oksidaz çözeltisi

Mililitre başına 1-5 ünite kolesterol oksidaz içeren fosfat tamponu (0.1mol/L, pH7.6)'nun her 1 litresine 20ml triton X-100 eklenmiştir. Her bir deney için 0.25 ünite enzim kullanılmıştır.

6-Renk çözeltisi

2.5 ml stok titanyum çözeltisi, 3ml konsantre sülfirik asit ile karıştırıldıktan sonra üzerine 200ml ddH_2O ilave edildi. Karışım daha sonra balon jojede 250ml'ye tamamlandı. Elde edilen titanyum çözeltisine eşit miktarda Xylene orange çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı.

7-Kolesterol Standardının Hazırlanması

İzoprppanol içindeki stok kolesterol çözeltisi 200mg/dl'ye seyreltilerek standart olarak kullanılmıştır.

8-Trigliserid Tayininde Kullanılan Çözelti

Trigliserid ayıracı Tris-HCl (50mmol/L)içinde litre başına 0.1gr Triton X-100, 1mmol 4-aminoantipirin, 1.5 mmol sodyum 2-hidroksi-3,5-diklorobenzen sulfonat, 5mmol Magnezyum klorür, 0.5 mmol Adenozin trifosfat (ATP), 10 kU

α-glisero fosfat oksidaz, 0.25 kU gliserol kinaz ve 100kU lipaz içerecek şekilde hazırlandı. Ayıraç +4°C'de saklandı.

9-Fosfat Tuz Tamponu

1.36gram potasyum dihidrojen fosfat ve 9gram sodyum klorür tartılarak erlene alındı. Üzerine 800ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. PH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra distile su ile 1lt'ye tamamlandı. Tampon +4°C'de saklandı.

3.5.Kullanılan Yöntemler

3.5.1.Periferik Kandan DNA izolasyonu:

EDTA'lı tüplerle alınan 10ml.lik kan örnekleri çalışma için falcon tüpülerine aktarılır. Üzerilerine 1:3 oranında lysıs eklenerek +4C'de 15dk. bekletilir.Daha sonra 1500rpm'de 10dk. santrifüj edilir ve süpernatant kısımları atılarak pelletler tamamen süspansiyon durumuna getirilir ve üzerlerine tekrar 15-20ml. Lysıs eklenir. Örnekler +4C'de 15dk. Bekledikten sonra 10dk.1500rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant kısımları atılır ve süspanse olan pellet üzerine 500 μ %10'luk SDS, 75μ proteinazK ve lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C'de su banyosunda bir gece inkübe edilir. İnkübasyondan sonra 1ml. Örnek başına 0.37ml. 9.5M'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra karıştırılır ve 3000rpm'de 25dk santrifüj edilerek proteinler çöktürülür. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir falcona aktarılır ve üzerine 1:2 oranında %99'luk absolü alkol eklenir ve DNA'nın presipitasyonu sağlanır. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklenir

ve DNA mikropipet ucuyla alınır. DNA %70'lik alkolde yıkanır ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisinde çözündürülerek +4°C'de saklanır(59).

3.5.2.DNA saflık tayini: DNA örnekleri Tris-EDTA içerisinde 1/100 oranında sulandırılır. 260nm'de DNA'nın ve 280nm'de RNA ve proteinin vermiş olduğu absorbans Tris-EDTA ile spektrofotometre sıfırlanarak ölçülür. 260nm'de okunan absorbans/280nm'de okunan absorbans oranından DNA saflığı saptanır. O.D.260/O.D.280 oranı 1,7-1,8 olarak okunan DNA'lar saf olarak kabul edilir.

3.5.3.DNA konsantrasyonunun hesaplanması: Çift iplikli DNA2nın 260nm'de vermiş olduğu absorbans 50μ g/ml'dir. Buna göre(80):

DNA konsantrasyonu (ng/μl): sulandırma katsayısı(100)x A260x 50

3.5.4.PCR yöntemiyle DNA'da ACE gen bölgesinin çoğaltılması: ACE gene bölgesi için kullanılan primer dizileri(5' CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3'), (5' GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3'), (5' TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAT TAC 3'), (5' TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA 3'). DNA örneklerinden ACE gen bölgesinin çoğaltılması için 50ul hacminde PCR karışımı hazırlandı. Karışım 31.9 ul ddH2O, 0.1 ünite Taq polimeraz enzimi, 5ul Taq polimeraz enziminin çalışması için gerekli olan 10x reaksiyon çözeltisi, ACE gen bölgesine özgü 10pmol primer çifti, 200mMol deoksidinükleotid trifosfat karışımı (dNTP) içermektedir. DNA örnekleri yaklaşık 500ng olacak şekilde PCR karışımlarına eklenmiştir.

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

ACE DD fenotipinde örneklere ikinci kez PCR uygulandı. 2*ul'lik PCR karışımında 9.05ul ddH2O, 0.15 ünite Taq polimeraz enzimi, 2ul 1010x reaksiyon çözeltisi, ACE gen bölgesine özgü 10pmol primer çifti, 200mM deoksidinükleotid trifosfat karışımı (dNTP) kullanılarak PCR reaksiyon ortamı hazırlandı ve DNA örnekleri yaklaşık 500 ng olacak şekilde PCR karışımına eklenmiştir. Üzerlerine 50ul mineral yağ damlatılarak örneklerin Stratagene Mini Thermal Cycler'da birinci PCR koşullarında PCR'ları gerçekleştirildi(76).

ACE Gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon koşulu: 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 56°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 2 dakika uzama olmak üzere 30 döngü olarak gerçekleşmiştir. PCR sonrası oluşan amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi için %3'lük agaroz jel hazırlandı. Örnekler agaroz jel elektroforezinde hazırlanmış olan jele tatbik edilerek 100 voltluk elektrik akımında yürütüldü ve polaroid kamera ile jelin fotoğrafı çekildi.

3.6. Lipid Profilleri Tayini

Kolesterol W. Richmod'un önerdiği (1973) serumda enzimatik total kolesterol tayini yöntemine göre çalışıldı(74).Trigliserid Mc Gowan'ın önerdiği (1983) yönteme göre çalışıldı(56). Serum örneklerindeki düşük ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL, VLDL), fosfotungustik asit ve magnezyum iyonları ile çöktürüldü (64). Daha sonra santrifüj edilerek bu lipoproteinler çöktürüldü ve swntrifüj sonrası üsdt sıvı fazda kolesterol tayin metodu uygulanarak HDL-kolesterol tayin edildi. Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

kolesterol değerleri, serum tgigliserid düzeyi 400mg/dl'den az olmak koşuluyla, trigliserid değerlerinin 5'e bölümüyle hesaplandı(64).

Düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol değerleri aşağıda gösterilen Friedewald formülüne göre hesaplandı(64).

LDLkolesterol= Total kolesterol- (VLDL kolesterol+ HDL kolesterol)

3.7.Serum Kreatinin Tayini: Jaffe metodu kullanılarak Hitachi 717 analyzer'da otomasyonla ölçülmüştür.

3.8. Serum Üre Tayini: Talke and Schubert metodu kullanılarak Hitachi 717 analyzer'da otomasyonla ölçülmüştür.

3.9.Serum Glikoz Tayini: Serum glikoz düzeyleri enzimatik olarak saptanacaktır. Serumlardaki glikoz, glikoz oksidaz ile oksitlendikten sonra açığa çıkan hidrojen peroksit, ortamdaki o-dianizidin varlığında peroksidaz ile renkli bir birleşik olan oksitlenmiş o-dianizidine çevrilir. Oluşan renk şiddeti spektrofotometrede 540nm dalga boyunda ölçülecektir (24).

3.10.Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak alımıştır.

Sistolik ve diastolik kan basınçları, total kolesterol, trigliserid, HDL, LDL, VLDL, açlık glikozu, üre, kreatinin düzeyleri açsısından gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesinde student t testi kullanılmıştır.

ACE allellerinin görülme sıklığının gruplar arası değerlendrilmesinde Ki kare (X^2) testi kullanılmıştır.Ki kare testinde herhangi bir gözdeki beklenen değer 5'den küçük olduğunda Fisher tam Ki kare testi uygulanarak p değeri verilmiştir. Gruplar arası risk etkeninin belirlenmesi için Odds oranı (OR) ve %95 güven sınırları (%95 CI) verilmiştir. Allel hesaplamalarında gen sayma metodu kullanılmıştır.

ACE allellerinin ,sistolik ve diastolik kan basınçları, serum total kolesterol, trigliserid, HDL, LDL, VLDL, serum açlık glikoz, üre, kreatinin düzeylerine olan etkilerinin değerlendirilmesinde student t testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışma gruplarına ait demografik özellikler Tablo 3'de gösterilmiştir. Çalışmaya 75 hasta ve 37 sağlıklı gönüllü alınmıştır.

TABLO 3: Çalışma gruplarına ait demografik özellikler

GRUP	TİP1 DİABET (N=20)	TİP2 DİABET (N=30)	DİABETİK NEFROPATİ (N=25)	KONTROL (N=37)
Cinsiyet(Kadın/erkek)	13/7	20/10	20/5	15/22
Yaş (yıl)	49.35±17.87	62.36±8.72	59.68±13.58	47.80±16.77
Vücut Kitle İndeksi (kg/m^2)	23.24±3.34	28.02±3.74	26.34±3.99	24.79±3.70
Ailede diabet geçmişi (var/yok) %	60/40	43/57	24/76	0/100
Sigara içimi (evet/hayır) %	25/75	17/83	24/76	41/59
Hipertansiyon %	10	33	44	0

N: Örnek sayısı, gruplar arası değerler ortalama standart sapma olarak verilmiştir.Gruplar arası önemlilik Student T testi ile incelenmiştir.Diastolik kan basıncı>90 ve sistolik kan basıncı>140 alınmıştır.

Tip2 diabet, tip1 diabet ve diabetik nefropatili bireylerin yaş ortalamaları sırasıyla 62.36±8.72 yıl, 49.35±17.87 yıl, 59.68±13.58 yıl olarak saptanmıştır. Gruplar arasında tip1 diabet-kontrol, tip2 diabet-diabetik nefropati, diabetik nefropati(+)-diabetik nefropati(-) bireyler arasından yaş açısından anlamlı fark yokken ($p<0.05$); tip1-tip2, tip1-diabetik nefropati, tip2-kontrol, diabetik nefropati-kontrol grupları arasında yaş açısından anlamlı fark vardır ($p>0.05$).

Kontrol grubu, Tip2 diabet, tip1 diabet ve diabetik nefropatili bireylerin vücut litle indeksleri (BMI) sırasıyla 24.79±3.70(kg/m^2), 28.02±3.74(kg/m^2), 23.24±3.34(kg/m^2), 26.34±3.99(kg/m^2) olarak gözlenmiştir. Ancak tip2 diabetli hastalarda vücut kitle indeksi kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). Bunun yanısıra Tip2 diabetli ve diabetik nefropatili hastalarda Tip1 diabet tanısı konmuş hastalara göre vücut

kitle indeksleride aynı şekilde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (P<0.05). (tablo 3)

Diabetik nefropatili olguların %24'ünün sigara içtiği ve %44'ünde hipertansiyon bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca Diabetik nefropatili olguların %24'ünde ailede diabet bulunduğu gözlenmiştir. (Tablo 4)

TABLO 4: Diabetik nefropati tanısı konulan ve konulmayan olguların demografik özellikleri

GRUP	**Diabetik nefropati var**	**Diabetik nefropati yok**
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	20/5	33/17
Yaş (yıl)	59.68±13.58	57.16±14.50
BMI (kg/m^2)	26.34±3.99	26.11±4.27
Hipertansiyon(%)	44	24
Diabet süresi (yıl)	14.68±0.48	13.00±9.32
Aile hikayesi (var/yok) (%)	24/76	50/50
Sigara içimi (evet/hayır)(%)	24/76	20/80

Değerler X±SD olarak verilmiştir.

Çalışma gruplarına ait biyokimyasal değerler tablo5 ve Tablo 6'da verilmiştir.

Tip1,tip2 diabetli ve diabetik nefropatili hastalarda açlık kan şekeri açısından karşılaştırıldığında istatistiki açıdan bir anlamlılık saptanmamıştır. HDL kolesterol, trigliserid, LDL kolesterol, VLDL kolesterol düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur($p<0.05$). HDL kolesterol değeri yönünden hasta grupları ve kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Diabetik nefropatili hastalarda diabetik nefropatisi konulmayan olgulara göre üre düzeyleri tanıya uygun olarak istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur($p<0.05$) (Tablo 5).

TABLO 5: Diabetik nefropati tanısı konulanlar ve konulmayan (tip1 diabet, tip2 diabet) olgularda klinik bilgiler

GRUP	Diabetik Nefropati Var	Diabetik Nefropati Yok
Üre (mg/dl)	47.96±26.30	36.96±11.17
Kreatinin (mg/dl)	1.06±0.39	0.93±0.17
Trigliserid (mg/dl)	182.44±78.43	164.72±69.03
Kolesterol (mg/dl)	230.60±56.71	226.28±48.73
HDL (mg/dl)	37.64±7.04	37.38±7.55
LDL (mg/dl)	159.16±53.16	155.90±47.65
VLDL (mg/dl)	36.00±15.71	33.26±13.90
Açlık kan şekeri (mg/dl)	180.72±53.85	171.02±56.23

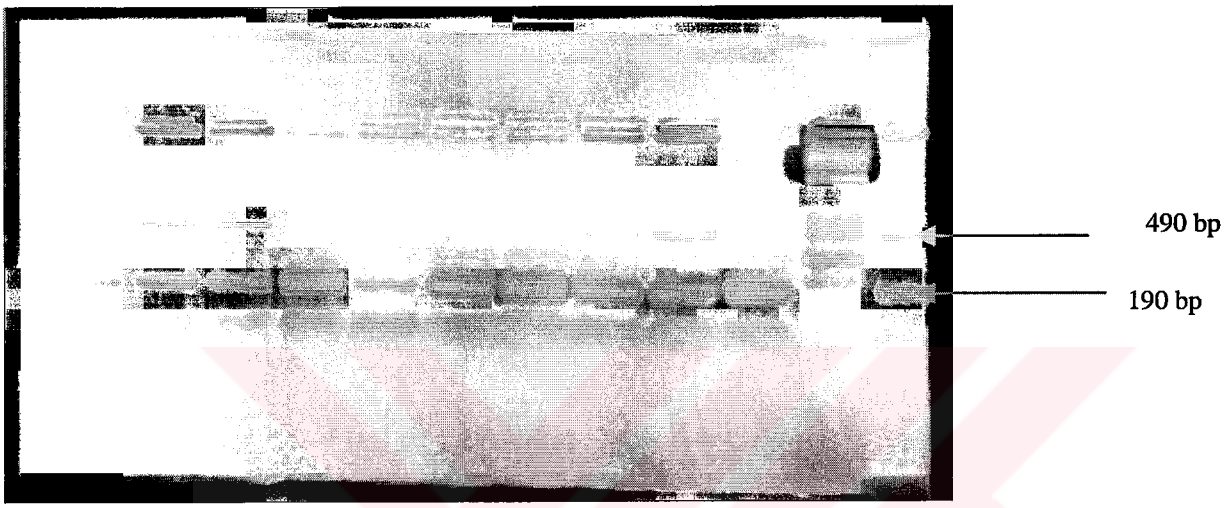
Değerler X±SD olarak verilmiştir.Gruplara arası önemlilik riski Student T testi ile yapılmıştır. HDL:Yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL:Düşük yığunluklu lipoprotein, VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein.

TABLO 6: Çalışma Gruplarına ait biyokimyasal değerler

GRUP	TİP1	TİP2	DN	KONTROL
Trigliserid (mg/dl)	178.4±62.5	171.96±73.6	182.44±78.43	113.62±40.34
Total kolesterol (mg/dl)	204.9±41.5	240.53±48.56	230.6±56.7	185.4±35.29
HDL(mg/dl)	39.85±8.38	35.73±6.59	37.64±7.04	39.37±9.47
LDL(mg/dl)	134.15±40.62	17.40±47.03	159.16±53.16	123.25±30.44
VLDL (mg/dl)	30.75±12.25	34.93±14.86	36.00±15.70	22.81±8.1
Açlık kan şekeri (mg/dl)	178.4±62.5	166.1±52.00	180.72±53.80	84.37±11.42
Üre (mg/dl)	35.60±7.94	37.86±12.93	47.96±26.30	-
Kreatinin (mg/dl)	0.88±0.14	0.97±0.17	1.06±0.39	-

Değerler X±SD olarak verilmiştir.Gruplara arası önemlilik riski Student T testi ile yapılmıştır. HDL:Yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL:Düşük yığunluklu lipoprotein, VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein.

Şekil (3)'de ACE gen polimorfizminin elektroforetik dağılımı görülmektedir. DD, ID,II genotiplerinin değerlendirilmesinde 100bp marker kullanılmıştır. Elektroforetik alanda ID genotipinin değerlendirilmesinde 490 ve 190bp lik iki bantın, DD genotipinde ise 190bplik bir bantın ve II genotipinin değerlendirilmesinde ise yalnız 490bplik bir bantın gözlenmesine göre değerlendirilmiştir.



Şekil(3): Angiotensin konverting enzim gen polimorfizmine ait bir örnek. 11.sütun 100bp DNA ladder size marker marker; 2.,3.,8.,9.,12.sütun:ID; 1.,4.,5.,6.,7.,10. Sütun: DD.

Tablo 7'de ise çalışma gruplarında ACE genotip ve allel dağılımları verilmiştir. Allel hesapları gen sayma metodu kullanılarak yapılmıştır. Kontrol grubu hastalarda I alleli taşıma oranı Tip 2 diabetli hastalara göre 3.53 kat fazladır. (X^2=6.05, p=0.014; Odds oranı (OR): 3.531; %95 güven aralığı (CI): 1.269-9.827). Tip1 diabet, Tip2 diabet ve Diabetik nefropatili hastalarda ise ACE genotip ve allel dağılımında istatistiksel açıdan anlamlılık gözlenmemiştir(p>0.05).

TABLO 7: Çalışma gruplarına ait ACE gen polimorfizmi dağılımları

	Toplam hasta (N=75)		Tip1 (N=20)		Tip2 (N=30)		Diabetik nefropati (N=25)		Kontrol (N=37)	
GENOTİP	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
DD	33	44	7	35	17	56.6	9	36	10	25.1
ID	32	42.6	10	50	11	36.6	11	44	22	59.4
II	10	13.3	3	15	2	6.6	5	20	5	13.5
ALLELLER										
D	98	65.3	24	60	45	75.1	29	58	42	56.7
I	52	34.7	16	40	15	24.9	21	42	32	43.3

Grup içi karşılaştırmalar X^2 testi ile yapılmıştır.

Tablo 8'de gruplar arasında cinsiyet ayırımı yaptığımızda ACE genotip dağılımı açısından bir fark gözlenmez iken allel dağılımına bakıldığında kontrol grubu kadın hastalarda I alleli taşıma oranı (%86.6) Tip 2 diabetli kadınlara (%45) göre istatistiksel olarak 7.9 kat daha fazla bulunmuştur. (Fisher testi, p: 0.016, CI: 1.409-44.804, OR: 7.944)

TABLO 8: Cinsiyet ayırımına göre ACE genotip ve allellerinin dağılımı

	Tip1				Tip2				Diabetik Nefropati				Kontrol			
	K		E		K		E		K		E		K		E	
GENOTİP	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
DD	5	38.5	2	28.6	11	55	6	60	7	35	2	40	2	13.3	8	13.6
ID	7	53.8	3	42.9	7	35	4	40	9	45	2	40	11	73.3	11	50
II	1	7.7	2	28.6	2	10	0	0	4	20	1	20	2	13.3	3	13.6
ALLELLER																
D	17	65.4	7	50	29	72.5	16	80	23	57.5	6	60	15	50	27	61.4
I	9	34.6	7	50	11	27.5	4	20	17	42.5	4	40	15	50	17	38.6

Grup içi karşılaştırmalar X^2 testi ile yapılmıştır.

Diabetik nefropati tanısı konulan ve konulmayan (tip1,tip2) diabetli olgulara ait ACE genotip ve allel dağılımı tablo 9'da verilmiştir.

TABLO 9: Diabetik nefropatisi olan ve olmayan olgularda ACE allel ve genotip dağılımı

	Diabetik Nefropati (+)		**DiabetikNefropati (-)**	
GENOTİP	N	%	N	%
DD	9	36	24	48
ID	11	44	21	42
II	5	20	5	10
ALLELLER				
D	29	58	69	65.5
I	21	42	31	34.5

Grup içi karşılaştırmalar X^2 testi ile yapılmıştır

Diabetik nefropati tanısı konulan olgularda ACE D ve I allel frekansları sırasıyla %58 ve%42 olarak bulunmuştur. Diabetik nefropati tanısı konulmayan olgularda ise ACE I ve D allel frekansları sırasıyla %65.5 ve %34.5 olarak bulunmuştur. Bu iki grup arasında yapılan ACE genotiplerinin karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir.($p>0.05$)

ACE genotiplerinin açlık kan şekeri, kan basıncı, vücut kitle indeksi ve lipid profilleri, üre ve kreatinin üzerindeki etkisi Student t testi ile incelenmiş ve Tablo 10 veTablo 11'de gösterilmiştir. Tip 2 diabetli hastalarda ACE II genotipi taşıyan bireylerin sistolik kan basınçları DD ve ID genotipi taşıyanlara göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Yine tip2 hastalarda ID genotipi taşıyanlarda kreatin değeri II genotipi taşıyanlara göre yüksektir($p>0.05$). Tip 1 diabetli hastalarda ACE II genotipi taşıyan bireylerde trigliserid ve VLDL-kolesterol düzeyleri ID ve DD genotipi taşıyanlara göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diabetik nefropatili hastalarda ise DD genotipi taşıyanlarda açlık kan şekeri düzeyi II genotipi taşıyanlara göre istatistikselolarakyüksekbulunmuştur($p<0.05$).

TABLO 10: ACE genotiplerinin Açlık kan şekeri, lipid profilleri, üre, kreatinin ve kan basınçları üzerine etkileri

GRUP	TİP1			TİP2			DİABETİK NEFROPATİ			KONTROL		
ACE GENOTİPİ	DD N=7	ID N=10	II N=3	DD N=17	ID N=11	II N=2	DD N=9	ID N=11	II N=5	DD N=10	ID N=22	II N=5
AÇLIK KAN ŞEKERİ (mg/dl)	213.00 ±72.74	153.60 ±37.89	180.33 ±86.95	152.70 ±37.62	189.00 ±67.82	152.70 ±37.62	210.77 ±12.44	168.18 ±47.99	154.20 ±28.22	83.70[b] ±9.71	84.00 ±12.34	87.40 ±12.21
TRİGLİSERİD (mg/dl)	155.00 ±58.26	131.40 ±58.82	226.00 ± 9.53	184.82 ±74.19	140.90 ±68.59	233.50 ±33.20	182.00 ±95.67	188.72 ± 73.32	169.40 ± 69.61	91.50[b] ± 24.74	115.[62a] ± 41.84	123.00 ± 49.38
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	207.14 ±24.16	190.20 ±27.96	248.66 ±84.38	243.82 ±47.00	239.54 ±52.52	243.82 ±42.00	228.66 ±58.41	231.00 ±64.54	233.20 ±45.19	203.50[b] ±24.74	193.62[a] ±26.84	174.20 ±47.79
HDL-KOLESTEROL (mg/dl)	41.28 ±7.27	40.20 ±10.04	35.33 ±4.16	36.76 ±6.82	34.00 ±5.91	36.50 ±10.60	36.44 ±7.40	39.81 ±6.50	35.00 ±7.58	38.00[b] ±5.65	39.50[a] ±10.56	40.00 ±11.46
VLDL-KOLESTEROL (mg/dl)	30.85 ± 0.61	26.40 ±11.63	45.00 ± 1.73	37.54 ±14.95	28.18 ±13.68	46.50 ± 6.36	36.33± 19.22	36.63 ± 14.67	34.00 ± 14.08	18.50[b] ± 4.94	23.12[a] ± 8.44	24.80 ± 9.88
LDL-KOLESTEROL (mg/dl)	133.57 ± 24.61	124.30 ±29.21	168.33 ±88.21	168.88 ±46.71	177.36 ±49.30	145.00 ±55.15	160.22±55. 96	156.90 ± 57.49	162.20 ± 48.99	147.00[b] ± 35.35	131.00[a] ± 23.07	109.40 ± 34.42
SİSTOLİK KAN BASINCI (mmHg)	124.00 ± 4.86	129.00 ±27.16	118.93 ± 2.88	140.29 ±21.39	142.72 ±19.54	115.00 ± 7.07	150.00 ±14.14	140.45 ± 17.38	140.00 ± 20.00	124.37[c] ± 9.03	118.92[d] ± 9.23	0.00
DİASTOLİK KAN BASINCI (mmHg)	80.71 ± 3.45	86.30 ±19.64	80.00 ± 0.00	87.35 ±12.51	83.63 ±12.06	75.00 ± 7.07	86.66 ±16.00	83.63 ± 11.20	89.00 ± 12.44	76.87[c] ± 9.61	74.28[d] ± 7.55	O.OO
ÜRE (mg/dl)	32.28 ±7.93	39.30 ±7.66	31.00 ±3.00	36.88 ±15.50	40.09 ±8.98	34.00 ±9.89	64.33 ±36.30	37.54 ±11.68	41.40 ±14.84	-	-	-
KREATİNİN (mg/dl)	0.85 ±0.15	0.91 ±0.12	0.85 ±0.03	0.97 ±0.18	0.99 ±0.18	0.81 ±0.04	1.36 ±0.51	0.91 ±0.14	0.80 ±0.19	-	-	-

Tablodaki değerler X±SD olarak verilmiştir.Gruplararası önemlilik derecesi student t testi ile incelenmiştir.
a kontrol olgu sayısı n=8; b kontrol olgu sayısı n=2; c kontrol olgu sayısı n=8; d kontrol olgu sayısı n=14. HDL:Yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL:Düşük yığunluklu lipoprotein, VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

Diabetik nefropatili hastalarda DD genotipi taşıyanlarda Nefropatisi olmayan diabetik gruba (tip1,tip2) göre üre değerleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0.014). Yine ID genotipi taşıyan diabetik nefropatili olgularda VLDL kolesterol ve trigliserid düzeyleri nefropatik olmayan olgulara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) Diabetik nefropatili hastalarda kendi içlerinde DD genotipi taşıyanlarda kreatin düzeyleri II genotipi taşıyanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).(Tablo 11).

Tablo 11: Diabetik nefropati tanısı konulan ve konulmayan olgularda ACE genotiplerinin açlık kan şekeri, üre, kreatinin, lipid profilleri üzerine etkisi.

GRUP	Diabetik Nefropati (+)			Diabetik Nefropati(-)		
ACE GENOTİPİ	DD	ID	II	DD	ID	II
Üre (mg/dl)	64.33± 36.3	37.54± 11.68	41.4± 14.84	35.54± 13.7	39.7± 8.10	32.2± 5.63
Kreatinin (mg/dl)	1.36± 0.51	0.91± 0.14	0.80± 0.19	0.93± 0.18	0.95± 0.16	0.84± 0.13
Açlık kan şekeri (mg/dl)	210.77± 12.44	168.18± 47.99	169.40± 69.61	176.12± 70.04	136.38± 62.71	169.80± 65.21
Trigliserid (mg/dl)	182.00± 95.67	188.72± 73.3	169.40± 69.61	176.12± 70.04	136.38± 62.71	229.00± 18.39
Total kolesterol (mg/dl)	228.66± 58.41	231.00± 64.54	233.20± 49.19	233.12± 44.49	216.04± 48.67	236.40± 70.00
HDL (mg/dl)	36.44± 7.40	39.81± 6.50	35.00± 7.58	38.08± 7.11	36.95± 8.54	35.80± 6.09
LDL (mg/dl)	160.22± 55.5	156.50± 57.49	162.20± 48.99	158.80± 44.10	152.00± 48.34	159.00± 69.39
VLDL (mg/dl)	34.33± 19.22	36.63± 14.67	34.00± 14.08	35.87± 14.23	27.33± 12.46	45.60± 3.50

Değerler X±SD olarak verilmiştir.Gruplara arası önemlilik riski Student T testi ile yapılmıştır. HDL:Yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL:Düşük yığunluklu lipoprotein, VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein.

5-TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde Diabetes Mellitus yaşam şartlarındaki değişime paralel olarak tüm dünyada olduğu gibi ülkemizdede hızla yayılmaktadır. Son yıllarda hastalık üzerinde etkili olduğu düşünülen genetik ve çevresel faktörlerle ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Hastalığın genetik kökeninin bilinmesi tedavisi açısından önemlidir.

ACE polimorfizmiyle ilgili olarak Diabetes Mellitus'lu hasta gruplarında dünyada pek çok çalışma yapılmaktadır. Ülkemizde bu polimorfizmleri ile ilgili çalışmalar daha çok ACE serum düzeyleri ile ilgili çalışmalar olup sıklıkla kalp ve hipertansiyon hastalar üzerinde yapılmıştır(1,10,40, 91).

Bir çok çalışmada Tip1 ve Tip2 diabetlerde hipertansiyon ve renin-angiotensin sisteminin renal hasarın oluşması ve ilerlemesindeki görevi kanıtlanmıştır. Renin angiotensin sistemin genleri tarafından kodlanan proteinler sistemik kan basıncı ve intrarenal hemodinamiğin düzenlenmesinden sorumludur. Angiotensin vasoaktif bir peptid olan angiotensin 2 oluşumunda anahtar rol oynamaktadır. Renin ve angiotensin 2'nin renal hastalığın ilerlemesindeki yeri bir çok çalışmada gösterilmiştir(2,4,82).

Angiotensin 2 renal proksimal tubul hücrelerine etkisi sonucu direkt olarak sıvı retensiyonuna neden olurken indirekt etkisiyle de zona glomeruloza da aldosteronsentezini uyarmaktadır. Bunun sonucu olarakta kardiak ve renal hastalıkların patogenezinde hücresel hipertrofi ve proliferasyonun uyarılmasından sorumlu tutulabilmektedir. Renin angiotensin sistemin hücre proliferasyonu , sitokin ve büyüme faktörü salınımına olan etkileri gözönüne alınarak ACE gen polimorfizminin diabetiklerde komplikasyonların gelişmesinden sorumlu gen olabileceği farklı hasta ve etnik gruplarda araştırılmıştır.(61,84)

Diabetik hastaların seyrindeki heterojeniteyi açıklayabilmek farklı genetik varyantlarda değişik komplikasyaonların farklı prognoz ile seyredebileceği hipotezi ile mümkün olmaktadır. Hastalar yaş, cinsiyet, diabet yaşı, vücut kitle indeksi ve sigara içiciliği gibi faktörler açısından eşit

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

özelliklere sahip gruplarda değerlendirildiğinde yalnız hastaların hastaları genetik özelliklerinin etkilerinin prognozu belrleyebileceği sonucuna varabiliriz.

Bu tez çalışmasında Diabetes Mellitus'lu hasta gruplarındaki (Tip1, Tip2, DN) bireylerle, sağlıklı bireyler arasında bir risk faktörü olarak ACE gen polimorfizminin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada hastaların yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, sigara içiciliği ve tanıda esas alınan biyokimyasal parametreleri ve ACE gen polimorfizminin diabetik nefropati ve diabetik komplikasyonların üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Kontrol grubundaki sağlıklı gönüllülerde ACE DD genotipi sıklığı %25.1, ID sıklığı %59.4 ve II sıklığı %13.5 olarak bulunmuştur.

Kebabcıoğlu tarafından İstanbul'da ki diyaliz merkezleri ve diğer merkezlerde diabetik hastalarda ve anabilim dalımızda yapılan çalışmalarda farklı oranlarda olsa da II genotipinin düşük oluşu renin angiotensin sistemi aktivasyonunun Türk toplumunda artmış olması ve bunun klinik etkilerinin daha sık görülmesi anlamına gelebilir.

Avrupa kökenli beyaz ırkta yapılan pek çok çalışmada DD/ID/II genotip oranları 1/2/1 olarak verilmekte Türk toplumunda bu oranın II genotipinde belirgin bir azalma ve DD genotipinde belirgin bir artma ile seyrettiği söylenebilir. Bu bulgu diabetik nefropati ile ilişkili görülmese de Türk toplumunda aterosklerotik hastalık sıklığının Avrupalılar ve Japonlarla karşılaştırıldığında yüksek olmasının nedeni olabilir izlenimi edinilmiştir.

Marre M. ve arkadaşlarının 1994'de yaptıkları bir çalışmada DN'si olan ve olmayan tip 1'ler de çalışılmış ve II genotipini DN 'si olmayan hastalarda daha yüksek bulunmuş ve I allelinin DN riskini azaltıcı bir faktör olduğu belirtilmiştir(53). Marre'nin 1997'de yaptığı başka bir çalışmada da tip2 diabetli hastaları nefropatinin farklı basamaklarına göre sınıflamış ve ACE gen polimorfizmi araştırmıştır. Bu çalışmada ID Ve DD genotipleri açısından bir fark görünmezken, II genotipinin hastalığın aşaması ilerledikçe görülme oranının azaldığı gösterilmiştir(58).

Schmıdt ve ark. 1995'de yaptıkları bir çalışmada 247tip1 ve 455 tip2 hastada ACE gene polimorfizmi çalışmışlar ve her iki grup arasında ACE genotip dağılımı açısından anlamlı bir fark bulamamışlardır. Aynı hasta gruplarını DN'si olan ve olmayanlar olarak ayırdıklarındada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır(81). Yine Schmidt 1997'de 658 DN'si olan ve

olmayan tip2 diabetli hastalarda ACE gen polimorfizmi çalışmış ve ACE genotip dağılımı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulamamıştır. Ancak dializli hastalarda DD genotipi daha yüksek oranda bulunmuştur(83).

Tarnow ve ark.1995'de DN'si olan ve olmayan tip1 diabetli hastalarda ACE polimorfizmi çalışmış ve ACE genotip dağılımı açısından bir fark bulamamıştır(86).

Freire ve arkadaşları da 1998'de DN'si olan ve olmayan tip1 hastalarda ACE gene polimorfizmi çalışmış ve ACE genotip dağılımı açısından bir fark bulamamıştır(26).

Yashıda H ve ark 1996'da 168 tip2 diabetli hastada yaptıkları çalışmada hastaları normal renal fonksiyonları olanlar (1.grup) ve renal fonksiyonları gerileyenler (2.grup) olarak ikiye ayırmışlar sonuçta 2.grupta yer alan hastalarda ACE DD genotipini 1. Gruba göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. DD genotipi çıkan hastaların diabet tanısından sonra on yıl içinde renal fonksiyonlarında gerileme görüldüğü saptanmıştır (95).

Aucella ve ark 2000 yılında diabet olmayan fakat renal hastalıkları olan bireylerle sağlıklı bireyler arasında ACE gen polimorfizmi çalışmış sağlıklı grup ve hasta grubu arasında ACE genotip dağılımı açısından bir fark bulamamıştır. Ancak üremi görülen erkek bireylerde ACE DD genotipi oranının kadınlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur(5).

Pfohl ve ark 1998 yılnda 210 diabetik nefropatisi olan IDDM hastasında ACE gen polimorfizmi çalışmışlar ve uzun süreli IDDM hastası olan ACE DD genotipi taşıyan bireylerde nefropati görülme yüzdesinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ancak elde ettikleri sonuçları retinopati, cinsiyet ve diabet süresi ile karşılaştırdıklarında ise ACE gen polimorfizmi ile diabetik nefropati arasında bir ilişki bulamamışlardır(70).

Hsieh ve ark 2000 yılında Diabetik nefropatisi olan ve olmayan tip2 diabetli hastalarla sağlıklı kontroller arasında ACE genotipi dağılımını incelemiş, sağlıklı bireylerde D allelinin yüzdesini %29.3 olarak bulurken bu oran DD genotipi taşıyan hastalarda kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Nefropatili olan tip2 hastalarda ise bu oran nefropatisi olmayanlara göre daha fazladır(38).

Çalışmamızda cinsiyet ayırımı yapılmaksızın ACE genotip ve allel frekansları (DD, ID, II; D, I) incelenmiş olup kontrol grubu hastalarda I alleli

taşıma sıklığının Tip2 diabetli hastalara göre 3.53 kat artmış olduğu gözlenmiştir(O.R.=3.531, %95 Cl: 1.296-9.827).Bulgularımız Schmıdt (81),(83), Tarnow(86), Freire (26) ile uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda diabetlilerde nefropati açısından D allelindeki artışın istatistiki açıdan önemli olmadığı saptanmıştır. Ancak örnek sayısı arttırıldığı taktirde ACE gen polimorfizminde D allel taşıyıcılığının diabetlilerde periferik arter hastalığı, iskemik kalp hastalığı için iyi bir genetik yatkınlık belirteci olabileceği izlenimi edinilmiştir. Nitekim bu düşüncemizi destekleyen bir çok çalışma mevcuttur. Şöyle ki diabetlilerde yapılan çalışmalarda DD, ID,II genotipi ve D alleli ile iskemik ve idiopatik dilate kardiopati, sol ventrikül hipertrofisi ve ani ölümler arasında bağlantı olduğu bir çok araştırıcı tarafınadan rapor edilmiştir.(52,62,71)

Görüşümüzü destekleyen önemli bir çalışma ise Hosoi ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada 288 tip2 diabetlide ultrasonografik olarak ölçülen karotis duvar kalınlığı ile DD allel sıklığı arasında bağımsız bir ilişki olduğu rapor edilmiştir.(36)

ACE genotiplerinin kan basıncı, açlık kan şekeri ve lipid profili üzerindeki etkisi incelendiğinde Tip2 diabetli hastalarda ACE II genotipi taşıyan hastalarda sistolik kan basıncı ID ve II genotipi taşıyan hastalara göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Tip1 diabetli hastalarda ise ACE II genotipi taşıyan bireylerde trigliserid ve VLDL düzeyleri ID ve DD taşıyan hastalara göre istatistiksel olarak yüksek olarak bulunmuştur ($p<0.05$). Diabetik nefropatili hastalarda DD genotipi taşıyanların açlık kan şekeri düzeyleri II genotipi taşıyanlara göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

DD ve II genotipi taşıyan diabetik nefropati olgularında serum glikoz düzeylerinin yüksek olması ilgi çekici bir bulgudur. Tip2 diabetiklerde kan şekeri regülasyonu etkinliğinde en önemli etken periferik insülin rezistansıdır. Kan şekeri regülasyonu etkinliği pek çok etkende (enfeksiyon, kanser) periferik insüline direnç gelişmesine neden olan kontrol edilemeyen hiperglisemilerin gözlenmesinden sorumludur.

Panahloo ve arkadaşları 103 tip 2 diabetik ve 530 non-diabetikte yaptıkları cohort çalışmasında DD genotipi taşıyan hastaların II genotipine sahip olan hastalara oranla insüline daha hassas oldukları gösterilmiştir(66).

Chiu ve arkadaşları I alleline sahip olanlarda kan şekerinin regülasyonunun daha zor olduğunu saptadıktan sonra öglisemik klemp yöntemi ile 24 hastada I allelinin insüline rezistans ile bağlantlı olduğunu göstermişlerdir(16).

Ancak bu konuda yapılan çalışmalar dikkat alınırsa D allel varlığının ve DD genotipinin kardiovaskular morbidite ve ani ölüm ile ilişkisinin genetik yakınlık açısından insülin rezistansı ile ilişkisinin olmayacağı ve bundan sorumlu başka mekanizmaların olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak diyebiliriz ki;

- Kontrol grubu sağlıklı bireylerde ACE I alleli taşıma oranı Tip2 diabetli hastalara göre 3.53 kat fazla bulunmuştur.
- Kontrol grubu sağlıklı kadınlarda ACE I alleli taşıma oranı tip2 diabetli kadın hastalardan 7.4 kat daha yüksek bulumuştur.
- Kontrol grubu sağlıklı bireylerle, Tip1 diabetli ve Diabetik nefropatili hasta grupları arasında ACE genotip dağılımı açısından bir fark gözlenmemiştir.
- Diabetik nefropatisi olan ve olmayan Tip2 diabetli hastalar arasında ACE genotip ve allel dağılımı açısından bir fark gözlenmemiştir.
- Diabetik nefropatisi olan ve olmayan Tip1 diabetli hastalar arasında ACE genotip ve allel dağılımı açısından bir fark gözlenmemiştir.
- Diabetik nefropatisi olan ve olmayan (tip1,tip2) hastalar arasında ACE genotip ve allel dağılımı açısından bir fark gözlenmemiştir.

Sonuç olarak söylemek gerekirse Diabetik nefropatinin genetiğinin bilinmesi gelecekte bu hastalığın tedavisini iki yönden ilgilendirilmektedir. Bunlarda biri böyle bir bilginin elimizde olmasının her bir bireyde hastalığa yol açan nedenlerin özellikle arka plandaki kusurlarını hedef alan daha iyi tedavilerin uygulanabilmesine olanak verecek olmasıdır. İkincisi ise hastalık gelişimine riski olan bireylerin ortaya çıkarılması ve düzeltilmesi olanaksız terminal organ hasarının oluşmasının tedavi edilmesini sağlayacak tarama testleri geliştirilebilecektir.

Bu özet bilgiler ışığı altında Türk toplumunda diabetik nefropatili hastalarda risk faktörlerinin detaylı olarak incelenerek hastalık oluşumunda bu faktörlerin tek tek veya birleşik etkilerinin saptanması ile bu konuda genetik danışmanlığa zemin hazırlayacak daha kapsamlı ve çok örnek sayılı çalışmalara gerek duyulduğunu göstermektedir.

6. ÖZET

Bu çalışmada Türk populasyonunda Angiotensin konverting enzim gen polimorfizminin diabetik nefropatili hastalarda incelenerek hastalık üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Diabetik nefropati ile Angiotensin konverting enzim polimorfizmi arasındaki ilişki çeşitli toplumlarda araştırılmış ve araştırmalar sonucunda birbirinden farklı sonuçlar bildirilmiştir.

Çalışmamızda 25 diabetik nefropatili, 20 tip1 diabetli, 30 tip2 diabetli ve 37 sağlıklı bireyde ACE gen polimorfizmini saptamak için PCR (polimeraz chain reaction) ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanıldı. Serum lipid ,üre,kreatin ve glukoz düzeyleri enzimatik metod kullanılarak ölçüldü.

Çalışmamız sonucunda kontrol grubunu oluşturan bireylerde I alleli taşıma oranı Tip 2 diabetli hastalara göre 3.53 kat yüksek bulunmuştur. (X^2=6.05, p=0.014; Odds oranı (OR): 3.531; %95 güven aralığı (CI): 1.269-9.827). Cinsiyete göre değerlendirdiğimizde ACE genotip dağılımı açısından bir fark gözlenmezken allel dağılımına bakıldığında kontrol grubu kadınlarda I alleli taşıma oranı (%86.6) Tip 2 diabetli kadınlara (%45) göre istatistiksel olarak 7.9 kat daha fazla bulunmuştur. (Fisher testi, p: 0.016, CI: 1.409-44.804, OR: 7.944). Diabetik nefropati tanısı konulan olgularda ACE D ve I allel frekansları sırasıyla %58 ve %42, diabetik nefropati tanısı konulmayan olgularda (tip1 diabet, tip2 diabet) ACE D ve I allel frekansları sırasıyla %65.5 ve %34.5 olarak saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre diabetik nefropati tanısı konulan olgularda ACE gen polimorfizminin bir risk faktörü olarak kabul edilemeyeceği ve ACE I allelinin sağlıklı bireylerde Tip2 diabetli bireylere göre koruyucu bir rol oynayabileceği izlenimi elde edilmiştir.

7- SUMMARY

İn this study, the relationship between an insertion(I)/deletion(D) polymorphism in angiotensin converting enzyme were studied in the healthy persons and patients with diabetic nephropathy.

We examined 75 patients (25 diabetic nephropathy, 20 type1 diabetes, 30 type 2 diabetes). As control we took 37 healthy volunteers. Polymerase chain reaction (PCR)and agarose gel electrophoresis tecniques were used tto determine the ACE genotype. Serum lipid, glucose, urea, kreatinin levels were measured by enzymatically.

The frequencies of ACE D and ACE I allels among the patients with diabetic nephropathy were %58,%42 and in control subjects were %65.5, %34.5 respectively. The greater frequency of deletion (D) allel was found in the diabetic nephropathy than in the control subjects.

In conclusion, there is no significant correlation between diabetic nephropathy and ACE gene polymorphism. ACE DD and ID genotypes can be a noteable genetic marker for cardiovascular and peripheral arterial disease. Fallow up studies are needed to achieve a better understanding of the role of candidate gene polymorphism on the development of complications of diabetic nephropathy.

8.ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Küçükyalı Merkez İlkokulunda, ortaöğrenimimi Küçükyalı Rezan Has Ortaokulunda, Lise öğrenimimi Küçükyalı Kadir Has Lisesinde tamamladım. 1994 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 1998 yılında buradan mezun oldum ve aynı yıl İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.

Biolog H.Arzu Ergen

9-KAYNAKLAR

1. Akar N, Aras O, Omurlu K, Cin S. Deletion polymorphism at the angiotensin-converting enzyme gene in Turkish patients with coronary artery disease. Scand J Clin Lab Invest. 1998 Oct;58(6):491-5.
2. Allen TJ, Cooper ME, Gilbert RE, Winikoff J, Skinni SL, Jerums G. Serum total renin is increased before microalbuminuria in diabetes. Kidney Int. 1996 Sep;50(3):902-7.
3. American diabetes association: Clinical practice recommendations 1998. Diabetic nephropathy. Diabetes Care 1998.21(1):s50
4. Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. J Clin Invest. 1986 Jun;77(6):1993-2000.
5. Aucella F, Vigilante M, Margaglione M, Grandone E, del Popolo A, Forcella M, Procaccini D, Salatino G, Passione A, Ktena M, De Min A, Stallone C. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in end-stage renal failure patients. Nephron. 2000 May;85(1):54-9.
6. Baboolal K, Ravine D, Daniels J, Williams N, Holmans P, Coles GA, Williams JD. Association of the angiotensin I converting enzyme gene deletion polymorphism with early onset of ESRF in PKD1 adult polycystic kidney disease. Kidney Int. 1997 Sep;52(3):607-13.
7. Bakris GL. Diabetic nephropathy. What you need to know to preserve kidney function. Postgrad Med. 1993 Apr;93(5):89-90, 93-5, 99-100.
8. Barnett A.H., Dodson P.M. Hypertension and diabetes1990. 3;2.
9. Barocci S, Ginevri F, Valente U, Torre F, Gusmano R, Nocera A. Correlation between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and kidney graft long-term outcome in pediatric recipients: a single-center analysis. Transplantation. 1999 Feb 27;67(4):534-8.

10. Bedir A, Arik N, Adam B, Kilinc K, Gumus T, Guner E. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and activity in Turkish patients with essential hypertension. Am J Hypertens. 1999 Oct;12(1O Pt 1):1038-43.
11. Beohar N, Damaraju S, Prather A, et al. Angiotensin-1 converting enzyme genotype DD is a risk factor for coronary artery disease. J Clin İnvest 1995; 43(3): 275-280
12. Braam B, Koomans HA. Renal responses to antagonism of the renin-angiotensin system. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1996 Jan;5(1):89-96.
13. Braunwald E., Isselbacher K.J., Petyersdorf R.G., Wilson J.D., Martin J.B. Fauci A.S. Endocrinology and metabolism. Harrison's principles of internal medicine 11th edition 1792-1793.
14. Brock JW 3rd, Adams M, Hunley T, Wada A, Trusler L, Kon V. Potential risk factors associated with progressive renal damage in childhood urological diseases: the role of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. J Urol. 1997 Sep;158(3 Pt 2):1308-11.
15. Cambien F., Costerrousse O., Tıret L., Poireier O., Lecerf L., Gonzalez M.F., Evans A., Arvelier D., Cambou J.P., Luc G., et al. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin converting enzyme in relation to myocardiol infarction. Circulation 1994;90(2):669-76
16. Chiu KC, McCarthy JE. The insertion allele at the angiotensin I-converting enzyme gene locus is associated with insulin resistance. Metabolism. 1997 Apr;46(4):395-9.
17. Chowdhury T.A., Dyer P.H., Kumar S., Barnett A.H., Bain S.C. Genetic determinants of diabetic nephropathy. Clinical Science 1999.96;221-230
18. Clements G.B., Galbraith D.N., Taylor K.W. Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. The Lancet 1995;346: 221-222
19. Deferrari G, Repetto M, Calvi C, Ciabattoni M, Rossi C, Robaudo C. Diabetic nephropathy: from micro- to macroalbuminuria. Nephrol Dial Transplant. 1998;13 Suppl 8:11-5.
20. Di Paolo S, Schena A, Stallone G, Cerullo G, D'Altri C, Gesualdo L, Schena FP. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in renal transplant patients with IgA nephropathy: relationship with graft function

and prevalence of hypertension. Transplant Proc. 1999 Feb-Mar;31(1-2):1357-8.

21. Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner ID, Morris AD. ABC of arterial and venous disease: vascular complications of diabetes. BMJ. 2000 Apr 15;320(7241):1062-6.
22. Doria A, Waram JH, Krolewski AS. Genetic predisposition to diabetic nephropathy. Evidence for a role of the angiotensin-1 converting enzyme gene. Diabetes 1994; 43:690-695
23. Estacio RO, Jeffers BW, Havranek EP, Krick D, Raynolds M, Schrier RW. Deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene is associated with an increase in left ventricular mass in men with type 2 diabetes mellitus. Am J Hypertens. 1999 Jun;12(6):637-42.
24. Fales F.W. In standart methods of clinical chemistry. 1963;4:P.101
25. Freedman B. I., Bowden D.W., Rıch S.S., Appel R.G. Genetic initiation of hypertensive and diabetic nephropathy. AJH 1998;11; 251-257
26. Freire MB, van Dijk DJ, Erman A, Boner G, Warram JH, Krolewski AS. DNA polymorphisms in the ACE gene, serum ACE activity and the risk of nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. Nephrol Dial Transplant. 1998 Oct;13(10):2553-8.
27. Frishberg Y, Becker-Cohen R, Halle D, Feigin E, Eisenstein B, Halevy R, Lotan D, Juabeh I, Ish-Shalom N, Magen D, Shvil Y, Sinai-Treiman L, Drukker A. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and the outcome of focal segmental glomerulosclerosis in children. Kidney Int. 1998 Dec;54(6):1843-9.
28. Fujisawa T, Ikegami H, Shen GQ, Yamato E, Takekawa K, Nakagawa Y, Hamada Y,Ueda H, Rakugi H, Higaki J.angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardialinfarction, but not with retinopathy or nephropathy, in NIDDM.Diabetes Care. 1995 Jul;18(7):983-5.
29. Gomez-Angelats E, de la Sierra A, Enjuto M, Sierra C, Oriola J, Francino A, Pare JC, Poch E, Coca A. Lack of association between ACE gene polymorphism and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. J Hum Hypertens. 2000 Jan;14(1):47-9.

30. Griendling K.K., Murphy T.J.,Alexander R.W. Molecular Biology of the renin angiotensin system. Circulation 1993;87(6):1816-1828
31. Gutierrez C, Vendrell J, Pastor R, Llor C, Aguilar C, Broch M, Richart C.Angiotensin I-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms innon-insulin-dependent diabetes mellitus. Lack of relationship with diabeticand retinopathy in a Caucasian Mediterranean population.Metabolism. 1997 Aug;46(8):976-80.
32. Ha SK, Yong Lee S, Su Park H, Ho Shin J, Jung Kim S, Hun Kim D, Rae Kim K, Yung Lee H, Suk Han D. ACE DD genotype is more susceptible than ACE II and ID genotypes to the antiproteinuric effect of ACE inhibitors in patients with proteinuric non-insulin-dependent diabetes mellitus. Nephrol Dial Transplant. 2000 Oct;15(10):1617-1623.
33. Hanssen K.F. Blood glucose control and microvascular and macrovascular complications in diabetes. Diabetes 1997.46; s101
34. Hans-Henrik Parving, Peter Jacobsen, Lise Tarnow, Peter Rossing, Laure Lecerf,Odette Poirier and Francois Cambien. Effect of deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene on progression of diabetic nephropathy during inhibition of angiotensin converting enzyme: observational follow up study. BMJ 1996; 313: 591-594
35. Honeyman M.C., Coulson B.S., Stone N.L., Gellert S.A., Goldwater P.N., Steele C.E., Couper J.J., T.B.D., Colman P.G., Harrison L.C. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. Diabetes 2000:49(8):1319-24
36. Hosoi M, Nishizawa Y, Kogawa K, Kawagishi T, Konishi T, Maekawa K, Emoto M, Fukumoto S, Shioi A, Shoji T, Inaba M, Okuno Y, Morii H. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with carotid arterial wall thickness in non-insulin-dependent diabetic patients. Circulation. 1996 Aug 15;94(4):704-7.
37. Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. J Lipid Res. 1987 Jun;28(6):613-28.
38. Hsieh MC, Lin SR, Hsieh TJ, Hsu CH, Chen HC, Shin SJ, Tsai JH .Increased frequency of angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with type 2 diabetes in Taiwan. Nephrol Dial Transplant. 2000 Jul;15(7):1008-13.

39. Hunley T.E., Julien B.A., Phillips J.A. 3rd.,Summer M.L., Yoshida H., Horn R.G., Brown N.J.,Fogo A., Ichikawa I., Kon V. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: potential sılencer motif and impact on progression IgA nephropathy. Kidney İnt.1996;49(2): 571-577
40. Isbir T, Yilmaz H, Agachan B, Aydin M, Isbir CS. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and coronary artery disease. IUBMB Life. 1999 Aug;48(2):205-7.
41. Jacobsen P, Rossing K, Rossing P, Tarnow L, Mallet C, Poirier O, Cambien F, Parving HH. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and ACE inhibition in diabetic nephropathy. Kidney Int. 1998 Apr;53(4):1002-6.
42. Jardine AG, Padmanabhan N, Connell JM. Angiotensin converting enzyme gene polymorphisms and renal disease. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1998 May;7(3):259-64.
43. Jeffers BW, Estacio RO, Raynolds MV, Schrier RW. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus and its relationship with diabetic nephropathy. Kidney İnt. 1997: 52(2):473-477
44. Katsuya T, Horiuchi M, Chen YD, Koike G, Pratt RE, Dzau VJ, Reaven GM. Relations between deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and insulin resistance, glucose intolerance, hyperinsulinemia, and dyslipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995 Jun;15(6):779-82.
45. Krimholtz M, Thomas S, Viberti G. Cigarette smoking and diabetic nephropathy. Contrib Nephrol. 2000;130:85-93.
46. Kuramoto N., Lizuka T. İto H., Yagui K., Omura M., Nozaki O., Nishikawa T., Tsuchida H., Makino H.,Saito Y. Effect of ACE gene on diabetic nephropathy in NIDDM patients with insulin resistance. Am J Of Kıdney Dis 1999,33(2):276.
47. Lee DY, Kim W, Kang SK, Koh GY, Park SK. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in patients with minimal-change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. Nephron. 1997;77(4):471-3.

48. Lewis E.J., Hunsıcker L.G., Baın R.P., Rohde R.D. The effect of angiotensin converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. N Engl J Med 1993 .329:1456-1462
49. M.A. Gall, P.Haugard, K. Borch-Johnsen, H.H. Parving. Risk factors for development of incipğient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin diabetes mellitus. Prospective observational study. BMJ 1997;314:783,
50. Malik F.S., Lovie C.J., Mehra M.R., Milani R.V., Re R.N. Renin angiotensin system: genes to bedside. Am Heart J 1997;134(3):514-526
51. Marcantoni C., Ortalda V., Lupo A., Mascio G. Progression of renal failure in diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 1998;13(8):16-19
52. Marian AJ, Yu QT, Workman R, Greve G, Roberts R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. Lancet. 1993 Oct 30;342(8879):1085-6.
53. Marre M, Bernadet P, Gallois Y, Savagner F, Guyene TT, Hallab M, Cambien F, Passa P, Alhenc-Gelas F. Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complications. Diabetes. 1994 Mar;43(3):384-8.
54. Marre M, Lievre M, Chatellier G, Plouin PF. ACE inhibitors and diabetics with albuminuria. Lancet. 1995 Dec 16;346(8990):1638.
55. Martinez E, Puras A, Escribano J, Sanchis C, Carrion L, Artigao M, Divison JA, Masso J, Vidal A, Fernandez JA. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. J Hum Hypertens. 2000 Feb;14(2):131-5.
56. Mc Gowan M.W., Artiss J.D., Stranbergh D.R., Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerids. Clin Chem 1983;29/3:538-542
57. Mehler P.S., Jeffers B.W., Estacio R., Schrier R.W. Associations of hypertension and complications in non-insulin diabetes mellitus. AJH 1997. 10; 152-161

58. Michel **Marre**, Xavier Jeunemaitre, Yves Gallois, Michel Rodier, Gilles Chatellier, Caroline Sert, Laurent Dusselier, Zoubida Kahal, Lucy Chaillous, Serge Halimi, Anne Muller, Henry Sackmann, Bernard Bauduceau, Françoise Bled, Philippe Passa, and François Alhenc-Gelas

Contribution of Genetic Polymorphism in the Renin-Angiotensin System to the Development of Renal Complications in Insulin-dependent Diabetes . J. Clin. Invest. 1997 99: 1585-1595.

59. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.S. Simples salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res 1988;16/3:1215

60. Mizuiri S, Hemmi H, Inoue A, Takano M, Kadomatsu S, Tanimoto H, Tanegashima M, Hayashi I, Fushimi T, Hasegawa A. Renal hemodynamic changes induced by captopril and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. Nephron. 1997;75(3):310-4.

61. Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, Miyakawa T, Iwasaki R, Hiramori K. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. Circulation. 1994 Nov;90(5):2199-202.

62. Naohauri I, Nobuyuki O, et al. DD genotype of the ACE gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. Circulation 1994; 90: 20622-20628.

63. Navis G., Van der Kleij F.G.H.,de Zeeuw D., DE Jang P.E. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism and renal disease. J Mol Med 1999;77:781-791

64. Onaka L.I.:Lipids. In:Clinical chemistry concepts and applications. Anderson S.C., Cockayne S. Saunders London, 1993

65. Orisio S. Gene polymorphism of the renin-angiotensin system and progression of diabeticnephropathy. J Nephrol. 1999 Jan-Feb;12(1):9-17. Review.

66. Panahloo A, Andres C, Mohamed-Ali V, Gould MM, Talmud P, Humphries SE, Yudkin JS. The insertion allele of the ACE gene I/D polymorphism. A candidate gene for insulin resistance? Circulation. 1995 Dec 15;92(12):3390-3.

67. Pei Y, Scholey J, Thai K, Suzuki M, Cattran D. Association of angiotensinogen gene T235 variant with progression of immunoglobin A nephropathy in Caucasian patients. J Clin Invest. 1997 Aug 15;100(4):814-20.
68. Per- Ola Attman, Carolyn Knıgt-Gibson, Marcelo Tavella, Ola Samuelsson, Petar Alaupovic. The compositional abnormalities of lipoproteins in diabetic renal failure. Neph.Dial Transplant 1998,13:2833-2841.
69. Peters AL, Schriger DL. The new diagnostic criteria for diabetes: the impact on management of diabetes and macrovascular risk factors. Am J Med. 1998 Jul 6;105(1A):15S-19S.
70. Pfohl M, Frost D, Koch M, Clemens P, Patzies A, Schmulling RM, Beischer W,Haring HU.of association between the insertion/deletion polymorphism of theangiotensin-converting-enzyme gene and diabetic nephropathy in IDDM patients. Horm Metab Res. 1998 May;30(5):276-80.
71. Raynolds MV, Bristow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, Taft CS, Perryman MB. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. Lancet. 1993 Oct 30;342(8879):1073-5.
72. R.K.Mattu, E.W.A. Needham, D.J.Galton, E.Frangos, A.J.L.Clark, M.Caulfield. A DNA variant at the angiotensin converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly heart study. Circulation. 1995, 91: 270-274.
73. Rich S.S., Freedman B.I., Bowden D.W. Genetic epidemiology of diabetic complications. Diabetes review 1998;13(8): 11-15
74. Richmond W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from nocardia sp. And its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. Clin Chem 1973; 19/2:1350-6
75. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F.An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest. 1990 Oct;86(4):1343-6.
76. Rigat B., Hubert C., Corvol P., Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphısm of the human angiotensin converting enzyme gene. Nucl Acids Res 1992;20:1433

77. Ringel J, Beige J, Kunz R, Distler A, Sharma AM. Genetic variants of the renin-angiotensin system, diabetic nephropathy and hypertension. Diabetologia. 1997 Feb;40(2):193-9.
78. Ruiz J, Blanche H, Cohen N, Velho G, Cambien F, Cohen D, Passa P, Froguel P.Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene isstrongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependentdiabetes mellitus.Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 26;91(9):3662-5.
79. Sagnella GA, Rothwell MJ, Onipinla AK, Wicks PD, Cook DG, Cappuccio FP. A population study of ethnic variations in the angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism: relationships with gender, hypertension and impaired glucose metabolism. J Hypertens. 1999 May;17(5):657-64.
80. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual,2nd edition, New York Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989;9:19
81. Schmidt S., Schöne R., Ritz E. and the diabetic nephropathy study group. Association of ACE gene polymorphism and diabetic nephropathy? Kidney İnt 1995;47:1176-1181
82. Schmidt S., Ritz E.Genetics of the renin-angiotensin system and renal disease: A progress report. (review) Curr Opin Nephrol Hyper.1997; 6:146-151.
83. Schmidt S., Ritz E. Angiotensin-1 converting enzyme gene polymorphism and diabetic nephropathy in type 2 diabetes. Nephrol Dial Transplant 1997,12(2):37-41.
84. Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GA. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. N Engl J Med. 1994 Jun 9;330(23):1634-8.
85. Stratton M.I., Adler A.I., Nell H.A.W., Mathews D.R., Manley S.E., Cull C.A. Hadden D., Turner R.C.,Holman R.R. Prospective observational study. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type2 diabetes (UKPDS 35).. . BMJ 2000;321:405-412
86. Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen FS, Hansen BV, Lecerf L, Poirier O, Danilov S, Parving HH. Lack of relationship between an

insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene and diabetic nephropathy and proliferative retinopathy in IDDM patients. Diabetes. 1995 May;44(5):489-94.

87. Tarnow L. Genetic pattern in diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 1996 Mar;11(3):410-2.

88. Tarnow L, Parving HH, Jacobsen P, Rossing P, Lecerf L, Poirier O, Cambien F.[The significance of deletion polymorphism in the ACE gene for progression ofdiabetic nephropathies treated with ACE inhibitors].Ugeskr Laeger. 1998 Aug 17;160(34):4886-9.

89. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type2 diabetes: UKPDS38 UK Prospective Diabetes Study Group. BMJ 1998; 317: 703-713.

90. Trevistan r., Vedovato M., Tiengo A. The epidemiology of diabetes mellitus. Nephrol Dial Transplant 1998;13(8):2-5

91. Ustundag B, Canatan H, Cinkilinc N, Halifeoglu I, Bahcecioglu IH.Angiotensin converting enzyme (ACE) activity levels in insulin-independentdiabetes mellitus and effect of ACE levels on diabetic patients withnephropathy.Cell Biochem Funct. 2000 Mar;18(1):23-8.

92. van der Kleij FG, Schmidt A, Navis GJ, Haas M, Yilmaz N, de Jong PE, Mayer G, de Zeeuw D. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and short-term renal response to ACE inhibition: role of sodium status. Kidney Int Suppl. 1997 Dec;63:S23-6.

93. van Ittersum FJ, de Man AM, Thijssen S, de Knijff P, Slagboom E, SmuldersY, Tarnow L, Donker AJ, Bilo HJ, Stehouwer CD.Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus.Nephrol Dial Transplant. 2000 Jul;15(7):1000-7.

94. Winocour PH, Durrington PN, Ishola M, Anderson DC. Lipoprotein abnormalities in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet. 1986 May 24;1(8491):1176-8.

95. Yoshida H, Kuriyama S, Atsumi Y, Tomonari H, Mitarai T, Hamaguchi A, Kubo H, Kawaguchi Y, Kon V, Matsuoka K, Ichikawa I, Sakai O. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. Kidney Int. 1996 Aug;50(2):657-64.

96. Yudkin JS, Andres C, Mohamed-Ali V, Gould M, Panahloo A, Haines AP, Humphries S, Talmud P. The angiotensin-converting enzyme gene and the angiotensin II type I receptor gene as candidate genes for microalbuminuria. A study in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetic subjects. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Oct;17(10):2188-91.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ