

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**ESANSİYEL HİPERTANSİYONLU OLGULARDA
CHROMOGRANİN A GENİ POLİMORFİZMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. METİN ESER**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. C. NUR SEMERCİ**

DENİZLİ 2012

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**ESANSİYEL HİPERTANSİYONLU OLGULARDA
CHROMOGRANİN A GENİ POLİMORFİZMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. METİN ESER**


**DANIŞMAN
DOÇ. DR. C. NUR SEMERCİ**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 10.10.2011 tarih ve 2011TPF040 nolu kararı ile desteklenmiştir.

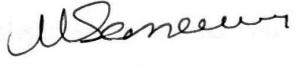
DENİZLİ 2012

Doç. Dr. C. Nur SEMERCİ danışmanlığında Dr. METİN ESER tarafından yapılan “Esansiyel hipertansiyonlu olgularda Chromogranin A geni polimorfizmlerinin araştırılması” başlıklı tez çalışması 27.12./2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Prof. Dr. Gülseren BAĞCI 

ÜYE

Doç. Dr. C. Nur Semerci 

ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Emre TEPELİ 

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.
25.1.2013


Prof. Dr. Mustafa Kılıç
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım Doç. Dr. C. Nur SEMERCİ'ye, katkılarından dolayı Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya, tez çalışmamın planlama ve laboratuvar aşamalarında katkılarından dolayı Prof. Dr. N. Lale ŐATIROĐLU TUFAN'a, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesinden çokça faydalandığım yardım ve desteğini benden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Emre TEPELİ'ye, çalışma grubumuzdaki hastaların seçiminde katkılarından dolayı Kardiyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. H. Asuman KAFTAN'a ve Arş. Gör. Dr. Musa ŐANLIALP'e, çalışma sonuçlarımızın istatistiksel değerlendirilmesinde katkılarından dolayı Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet ZENCİR'e, laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteğinden dolayı Arş. Gör. Dr. Akif AYAZ'a, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve çalışanlarıma ayrıca bu süreçte desteklerini sürekli hissettiğim eşim ve oğluma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
ÖZET..	XII
İNGİLİZCE ÖZET	XIV
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
HİPERTANSİYON.....	3
Tanım	3
Etiyolojik Sınıflandırma	3
Kan Basıncı Düzeylerine Göre Sınıflandırma	3
Fizyopatoloji	5
ESANSİYEL HİPERTANSİYON	5
Etiyopatogenezden Sorumlu Faktörler.....	5
Aşırı Tuz alımı ve Renal Sodyum Retansiyonu.....	6
Renin-Anjiotensin Sistemi.....	6
Sempatik Sinir Sistemi	8
Vasküler Hipertrofi	8
Endotel Kökenli Faktörler	8
Obezite ve İnsülin Direnci	9
Genetik Faktörler	10
GENETİK POLİMORFİZM VE HİPERTANSİYON	11
KROMOGRANİN A PROTEİNİ	13
CgA'nın Yapısı ve Fonksiyonları	14

CgA-Bağlı Peptidlerin Görevleri	16
Vasostatin-1.....	17
Catestatin.....	18
CHGA Geni.....	19
CHGA Geni Polimorfizmleri ve Esansiyel Hipertansiyon.....	23
GEREÇ VE YÖNTEM	25
ÇALIŞMA GRUPLARI.....	25
KAN ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU.....	26
İZOLE EDİLEN DNA'NIN SAFLIK DEĞERLENDİRMESİ.....	27
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU.....	27
AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ.....	29
PCR ÜRÜNLERİNİN PÜRİFİKASYONU.....	30
SEKANS REAKSİYONUNUN HAZIRLANMASI.....	31
SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	33
İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	33
BULGULAR.....	34
TARTIŞMA.....	56
SONUÇLAR.....	63
KAYNAKLAR	65

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A	: Adenin
aa	: Aminoasit
ACE	: Anjiyotensin “converting” enzim
Ach	: Asetil kolin
ADH	: Antidiüretik hormon
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
CgA	: Kromogranin A proteini
CHGA	: Kromogranin A
DKB	: Diyastolik Kan Basıncı
DM	: Diabetes mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DTCS	: Dye Terminator Cycle Sequencing
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EHT	: Esansiyel hipertansiyon
ESC	: Avrupa Kardiyoloji Derneği
ESH	: Avrupa Hipertansiyon Derneği
ETA	: Endotelin reseptörü A
ETB	: Endotelin reseptörü B
ET-1	: Endotelin-1 peptidi
F	: Forward
G	: Guanin
HT	: Hipertansiyon
JNC	: Amerika Birleşik Devletleri Birleşik Ulusal Komitesi
KB	: Kan basıncı
MgCL₂	: Magnezyum klorür

NO	: Nitrik Oksit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	: Reverse
RAAS	: Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SKB	: Sistolik Kan Basıncı
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSS	: Sempatik Sinir Sistemi
T	: Timin
TAE	: Tris-Asetikasit-EDTA
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör alfa
5'UTR	: 5'Untranslated Region
3'UTR	: 3'Untranslated Region
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: Esansiyel hipertansiyon oluşumunda etkili meknizmalar	5
Şekil 2 : Anjiyotensin-II'nin oluşumu	7
Şekil 3 : Anjiyotensin-II'nin etkileri	7
Şekil 4 : NO'nun damar üzerine olan etkileri	9
Şekil 5 : Leptinin kan basıncı üzerine etkileri	10
Şekil 6 : CHGA ve katekolaminlerin sentez ve salınımı	14
Şekil 7 : CgA'nın yapısı	15
Şekil 8 : Catestatinin 3D görüntüsü ve CgA'nın moleküler yapısı	16
Şekil 9 : CgA proteini ve derive peptitlerinin nöroendokrin granüllerde depolanması ve salınımı	17
Şekil 10 : CHGA'nın 14. Kromozom üzerindeki lokalizasyonu	20
Şekil 11 : CgA molekülünün 3 boyutlu görüntüsü.....	20
Şekil 12 : CHGA promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılan hedef dizisi ve kullanılan primerler.....	39
Şekil 13 : CHGA geni promotor bölgesindeki polimorfizmler (forward dizi).....	40
Şekil 14 : CHGA promotor bölge PCR ürünü (1F-2R, 851 bç) jel görüntüsü.....	41
Şekil 15 : CHGA promotor bölge PCR ürünü (1F-1R, 403 bç).....	41
Şekil 16 : CHGA promotor bölge PCR ürünü (2F-2R, 286 bç).....	41
Şekil 17 : CHGA promotor T-1014C bölgesi elektroferogram görüntüleri.....	42
Şekil 18 : CHGA promotor bölge T-988G bölgesi elektroferogram görüntüleri.....	43
Şekil 19: CHGA promotor bölge G-462A bölgesi elektroferogram görüntüleri.....	44
Şekil 20 : CHGA promotor bölge T-415C bölgesi elektroferogram görüntüleri.....	45

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1 : JNC VII'nin önerdiği hipertansiyon sınıflaması.....	4
Tablo 2 : ESH/ESC Guidelines'e göre kan basıncı sınıflaması	4
Tablo 3 : SNP kullanım alanları.....	12
Tablo 4 : Esansiyel hipertansiyon gelişiminde etkili olabilecek genler.....	13
Tablo 5 : CgA'dan proteolitik etki ile oluşan peptidler.....	16
Tablo 6 : Vazostatin-1'in fonksiyonları.....	18
Tablo 7 : Catestatinin fonksiyonları.....	19
Tablo 8 : CHGA geni transkriptleri.....	20
Tablo 9 : CHGA geni temel özellikleri.....	21
Tablo 10 : CHGA promotor bölgede sık görülen SNP'ler.....	22
Tablo 11 : Çalışmaya dahil olma ve dışlanma kriterleri.....	25
Tablo 12 : Primerlerin özellikleri.....	28
Tablo 13 : PCR karışım oranları.....	28
Tablo 14 : Hot start master miks içeriği.....	29
Tablo 15 : PCR reaksiyon basamakları.....	29
Tablo 16 : Sekans PCR master miks içeriği.....	31
Tablo 17 : Sekans PCR şartları.....	32
Tablo 18 : Stop solusyonu içeriği.....	32
Tablo 19 : Hasta grubu özellikleri.....	34
Tablo 20 : Kontrol grubu özellikleri.....	36
Tablo 21 : Hasta grubu spektrofotometri ölçümleri.....	37
Tablo 22 : Kontrol grubu spektrofotometri ölçümleri.....	38
Tablo 23 : Hasta grubunda tespit edilen genotipler.....	46
Tablo 24 : Kontrol grubunda tespit edilen genotipler.....	47
Tablo 25 : CHGA promotor -1014 polimorfik bölgesi genotiplerinin cinsiyete göre dağılımı.....	48
Tablo 26 : CHGA promotor -1014 polimorfik bölgesi genotip frekansları.....	48

Tablo 27: CHGA promotor -988 polimorfik bölgesi genotiplerinin cinsiyete göre dağılımı.....	49
Tablo 28: CHGA promotor -988 polimorfik bölgesi genotip frekansları.....	49
Tablo 29: CHGA promotor -462 polimorfik bölgesi genotiplerinin cinsiyete göre dağılımı.....	50
Tablo 30: CHGA promotor -462 polimorfik bölgesi genotip frekansları.....	50
Tablo 31: CHGA promotor -415 polimorfik bölgesi genotiplerinin cinsiyete göre dağılımı.....	51
Tablo 32: CHGA promotor -415 polimorfik bölgesi genotip frekansları.....	51
Tablo 33: Allel ve genotip sıklıklarının gruplar arasında karşılaştırılması.....	52
Tablo 34: Hasta ve kontrol grubu haplotipleri.....	55

ÖZET

Esansiyel hipertansiyonlu olgularda CHGA geni promotor bölge polimorfizmlerinin araştırılması.

Dr. Metin ESER

Hipertansiyon gelişmiş ülkelerde yetişkin popülasyonun %20-30'unu etkileyen önemli bir sağlık problemi olup miyokard infarktüsü, serebrovasküler atak, konjestif kalp yetmezliği ve son dönem böbrek yetmezliği gibi majör morbidite ve mortalite için risk oluşturur. Esansiyel hipertansiyon, nedeni saptanamayan ya da ikincil bir hastalığa bağlı gelişmeyen kan basıncı yüksekliği olarak tanımlanmakta olup genetik ve çevresel etkilerle meydana gelen ve genetik olarak heterojen özelliğe sahip kompleks hastalıklar grubundandır. Esansiyel hipertansiyonla ilişkili çok sayıda gen polimorfizmleri, metabolik yollar ve sistemler tanımlanmış olmakla birlikte esansiyel hipertansiyonun patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Halen esansiyel hipertansiyon patogenezinde kaç gen rol almaktadır ve bu genlerin birbiri ile etkileşimi nasıldır bilinmemektedir.

Son zamanlarda üzerinde çalışılan duyarlılık genlerinden biri de Chromogranin A (CHGA) genidir. CHGA geni başta adrenal medulla ve postganglionik sempatik aksonlardan eksprese olan, intrasellüler ve ekstrasellüler mekanizmalar ile katekolaminlerin depolanması ve salınımını düzenleyen bir genidir.

CHGA geninin promotor, 5'UTR, 3'UTR, kodlayan bölge ve kodlayan bölgelere bitişik intronik bölgelere ait çok sayıda polimorfizmler tanımlanmış ve bu polimorfizmlerden bazılarının kan basıncı ve otonom aktivitesinde değişikliklere neden olduğu klinik, fizyolojik, hücrel ve moleküler çalışmalar ile hem hayvan modelleri hem de insanlar üzerinde gösterilmiştir.

Bu çalışmada kardiyoloji kliniğine başvuran ve esansiyel hipertansiyon tanısı almış 50 hasta ve sağlıklı olarak kabul edilen 32 kişiden oluşan kontrol grubunda CHGA geni promotor T-1014C, T-988G, G-462A ve T-415C bölgelerindeki polimorfizmlerin dizi analizi ile saptanması amaçlanmıştır.

Bu polimorfizmler açısından esansiyel hipertansiyon hastaları ile kontrol grubunda fark olup olmadığı araştırılmıştır.

Bulgular incelendiğinde esansiyel hipertansiyon hastalarında CHGA geni promotor T-1014C polimorfik bölge için C alleli, CC ve TC genotipi, T-988G polimorfik bölgesi için G alleli, GG ve TG genotipi sıklığı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak yüksek saptanırken ($p<0.05$), CHGA promotor bölge G-462A ve T-415C Polimorfik bölgelerinde allel ve genotip sıklığı açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Sonuç olarak CHGA geninin kan basıncı değişikliklerinin genetik düzenleyicisi olması ve bu gen polimorfizmlerinin esansiyel hipertansiyon gelişiminde genetik risk oluşturabilmesi nedeniyle, çalışmamızda saptanan ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan T-1014C ve T-988G bölge polimorfizmlerinin ülkemizde daha geniş olgu gruplarında yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Esansiyel hipertansiyon, CHGA geni promotor bölge polimorfizmleri.

SUMMARY

Investigation of polymorphisms of CHGA gene's promoter region in cases with essential hypertension.

Dr. Metin ESER

Hypertension is an important health problem among 20-30 % of adults population in developed countries, and is a major risk factor for morbidity and mortality of myocardial infarction, cerebrovascular attack, congestive heart failure and end-stage renal disease. Essential hypertension is defined as high blood pressure with unknown cause or does not due to secondary disease, and it is occurred with genetic and environmental effects and is in genetically heterogeneous complex disease group.

There are described a lot of gene polymorphisms, metabolic pathways and systems associated with essential hypertension. However these genes, metabolic pathways and systems give partial information for understanding of essential hypertension's pathogenesis. Currently it is not known how many genes are involved in the pathogenesis of essential hypertension and how is the interaction of these genes with each other.

Chromogranin A (CHGA) gene, one of susceptibility genes, have been studied recently. CHGA gene that is mainly expressed in the adrenal medulla and postganglionic sympathetic axon, regulates storage and release of catecholamines by intracellular and extracellular mechanisms.

There are defined a large number of polymorphisms of CHGA gene's promoter, 5'UTR, 3'UTR, coding regions and intronic regions adjacent to coding regions. In the clinical, physiological, cellular and molecular studies in both animal models and humans it is shown that some of these polymorphisms cause changes in blood pressure and autonomic activity.

In this study, it is aimed to investigate polymorphisms in CHGA gene's promoter T-1014C, T-988G, G-462A and T-415C regions with sequence analysis in 50 patients admitted to cardiology clinics, diagnosed with essential hypertension and 32 healthy control cases.

According to polymorphisms the difference was investigated between patients with essential hypertension and control group.

According to the results in the CHGA gene; frequency of C allele, CC and TC genotypes for promoter T-1014C polymorphic region, G allele, GG and TG genotype for promoter T-988G polymorphic region is significantly higher ($p < 0.05$) in patients with essential hypertension to the control group; whereas in CHGA promoter region G-462A and the T-415C polymorphic regions there is no statistically significant difference according to frequencies of allele and genotype between patient and control groups ($p > 0.05$).

In conclusion, due to CHGA gene is a genetics regulatory of changing in blood pressure and the polymorphisms of this gene may be genetics risk for being essential hypertension, the polymorphisms of T-1014C and T-988G region which were statistically significant between patient and control groups in our study, must be analyzed to large group of patients for our country.

Key words: Essential hypertension, CHGA gene promoter region polymorphisms.

GİRİŞ

Arteriyel kan basıncının normal kabul edilen değerlerin üstüne çıkması olarak tanımlanan hipertansiyon (HT), gelişmiş ülkelerde yetişkin popülasyonun %20-30'unu etkileyen önemli bir sağlık problemi olup miyokard infarktüsü, serebrovasküler atak, konjestif kalp yetmezliği ve son dönem böbrek yetmezliği gibi majör morbidite ve mortalite için risk oluşturur (1-3). Kan basıncı, kalp debisi ve periferik vasküler direncin bir ürünüdür. Kalp debisinin veya arteryel direncin artması durumunda kan basıncı artmakta ve hipertansiyon ortaya çıkmaktadır (4). Hipertansiyonu olan erişkin hastaların %92-95'inde bir neden saptanmayıp primer ya da esansiyel hipertansiyon (EHT) olarak adlandırılır (5). Sekonder hipertansiyon ise kan basıncı yüksekliğinin bir hastalığın çeşitli bulgularından birini oluşturduğu durumlardır ve tüm hipertansiyon olgularının %5-6'sını oluşturur. Esansiyel hipertansiyon patogenezinde rol oynayan faktörler ve mekanizmalar henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Genetik faktörler başta olmak üzere muhtemelen birden fazla faktör kan basıncı yüksekliğinden sorumludur.

Esansiyel hipertansiyon genetik ve çevresel etkilerle meydana gelen ve genetik olarak heterojen özelliğe sahip kompleks hastalıklar grubundandır. Bu hastalık grubunda tek nükleotid polimorfizmlerinin (Single nucleotide polymorphism=SNP) hastalığa olan eğilimi göstermesi açısından önemi büyüktür. Esansiyel hipertansiyonda da ACE geni, anjiyotensin II tip 1 resöptör geni ve α -adducin geni gibi birçok gen polimorfizmlerinin rolü olduğu düşünülmektedir. Son zamanlarda üzerinde çalışılan genlerden biri de Chromogranin A (CHGA) genidir. CHGA adrenal medulla ve postgangliyonik sempatik aksonlardan katekolaminler ve nöropeptidler ile birlikte sekrete edilen 48 kDa asidik bir polipeptittir (6-12). CHGA polipeptidi uzun zamandan beri nöroendokrin tümörlerin tanısında marker (belirteç) olarak kullanılmaktadır. CHGA geni 14q32.12 bölgesinde lokalize, 12194 baz çifti (bç) uzunluğunda, 8 ekzon ve 7 intron bölgesinden oluşmuştur. 457 aminoasit (aa) uzunluğunda bir propeptidi (18 aminoasitlik kısmı artık sinyal peptidi, 439 aminoasitlik kısmı Chromogranin A proteini) kodlar ve bu propeptit spesifik bir endonükleaz enziminin proteolitik etkisi ile vasostatin-1, chromacin, pancreastin, parastatin ve catestatin'den oluşan biyolojik aktif peptitlere dönüşür. CHGA geninin

promotor, 5'UTR, 3'UTR, ekzon ve intronik bölgelerinde çeşitli varyasyonlar tespit edilmiştir. Promotor bölge, catestatin peptit bölgesi ve 3'UTR'deki DNA varyasyonları (değişiklikleri) kan basıncı ve otonomik aktivitesinde değişikliklere neden olmaktadır (13-15).

2008 yılında 920 kişi (204 esansiyel hipertansif hasta, 715 normotansif birey) ile yapılan bir araştırmada CHGA geni promotor bölgesindeki T-1014C, T-988G, G-462A, C-415T ve A-89C polimorfizmleri araştırılmış ve G-462A bölgesinde GA genotipine sahip bireylerde soğuk stres sonrası GG ve AA genotipine sahip bireylere göre beklenenden daha yüksek sistolik ve diyastolik kan basınçları ölçülmüş ve GA genotipine sahip bireylerin hipertansif ve normotansif bireyler arasında yer alan ara bir fenotipe sahip oldukları ve hipertansiyon gelişimi açısından genetik risk taşıdıkları belirtilmiştir (14,16). 2005 yılında yapılan bir araştırmada CHGA geni çıkarılmış farelerde kan basıncı kontrolünün bozulması sonucu kan basıncı değerlerinin yükseldiği gözlenmiştir (17). 2007'de yapılan bir çalışmada ise CHGA geni promotor T-988G, G-462A ve A-89C bölge polimorfizmlerinin endotel hücrelerinden endotelin-1 (ET-1) salınımını etkilediği ve sempatokromafin sistem ile endotel fonksiyonları arasında bir bağlantı olduğu görüşü ileri sürülmüştür (18).

Bu çalışmalar incelendiğinde CHGA geninin özellikle promotor ve 3'UTR'deki polimorfizmleri ile esansiyel hipertansiyon arasında kuvvetli ilişkiye dikkat çekilmiştir.

Bu proje kapsamında PAÜ Kardiyoloji bölümü tarafından tüm tetkikleri yapılarak esansiyel hipertansiyon tanısı almış hastalarda CHGA genindeki T-1014C, T-988G, G-462A ve C-415T polimorfizmlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu araştırma CHGA geni ile ilgili Türkiye'den yapılacak ilk çalışma olup esansiyel hipertansiyon için yapılan diğer çalışmalara katkı sağlayacaktır.

GENEL BİLGİLER

HİPERTANSİYON

Tanım

Hipertansiyon, arteriyel kan basıncının normal kabul edilen değerlerin üstüne çıkması olarak tanımlanır. Anormal kan basıncı düzeyi hakkında farklı görüşler ileri sürülmüştür. Pickering 1972 yılında normal ve anormal kan basıncı arasında kesin bir sınır olmadığını, arteriyel basınç düzeyleri ile mortalite arasındaki yakın bir ilişki olduğunu ve kan basıncı yükseldikçe prognozun kötüleşeceğini savunmuştur (19).

Hipertansiyon, inme, koroner kalp hastalığı gibi major komplikasyon risklerinde artışa neden olan kan basıncı yüksekliği olarak tanımlanabilir. Günümüzde sistolik kan basıncının 140 mmHg, diyastolik kan basıncının da 90 mmHg veya üzerinde olması veya kişinin kan basıncını kontrol etmek için antihipertansif ilaç kullanıyor olması hipertansiyon olarak tanımlanmaktadır (20).

Hipertansiyonun Etiyolojik Sınıflandırılması

Hipertansiyon etiyolojik olarak primer ve sekonder olmak üzere sınıflandırılır. Primer hipertansiyona idiyopatik veya esansiyel hipertansiyon da denir. Primer (esansiyel) hipertansiyon, nedeni saptanamayan ya da ikincil bir hastalığa bağlı gelişmeyen kan basıncı yüksekliği olarak tanımlanır. Sekonder hipertansiyon ise kan basıncı yüksekliğinin ikincil bir hastalığa bağlı gelişen yani ikincil bir hastalığın bulgularından biri olarak ortaya çıkan hipertansiyon tipidir. Tüm hipertansif olguların % 92-95'ini esansiyel hipertansiyon, % 5-6'sını sekonder hipertansiyon ve %1-3'ünü de diğer nedenler oluşturur.

Hipertansiyonun Kan Basıncı Düzeylerine Göre Sınıflandırılması

Amerika Birleşik Devletleri Birleşik Ulusal Komitesi'nin (JNC) raporunda 18 yaş ve üstündeki erişkinlerin kan basınçları normal, prehipertansiyon, evre I, evre II olarak dört dereceye ayrılmıştır (Tablo 1). Bu sınıflandırmaya göre normal kan basıncı, sistolik kan basıncının 120 mmHg'nın, diyastolik kan basıncı 80 mmHg'nin altında olması olarak tanımlanır. Sistolik kan basıncının 120-139 mmHg, diyastolik kan basıncının 80-89 mmHg olması prehipertansiyon olarak kabul edilir.

Hipertansiyon tanısı iki ya da daha fazla muayene sırasında iki ya da daha fazla kan basıncı ortalama değeri normal kabul edilen düzeyin üzerinde ise konmalıdır. Sınıflandırmada sistolik ve diastolik kan basınçları farklı sınıflara giriyorsa, daha yüksek olan kan basıncı sınıfı dikkate alınmalıdır. 2007 yılında Avrupa Hipertansiyon Derneği / Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESH/ESC) Guidelines'e göre tablo 2'de görülen farklı bir sınıflandırma daha yapılmıştır.

Tablo 1. JNC VII'nin önerdiği hipertansiyon sınıflaması (21).

Sınıflama	Kan basıncı (mmHg)	
	Sistolik	Diastolik
Normal	< 120	< 80
Prehipertansiyon	120-139	80-89
Evre-I hipertansiyon	140-159	90-99
Evre-II hipertansiyon	≥ 160	≥ 100

Tablo 2. ESH/ESC Guidelines'e göre kan basıncı sınıflaması (22).

Kategori	*SKB (mmHg)		*DKB (mmHg)
Optimal	< 120	ve	< 80
Normal	120-129	ve/veya	80-84
Yüksek normal	130-139	ve/veya	85-89
Grade-I hipertansiyon	140-159	ve/veya	90-99
Grade-II hipertansiyon	160-179	ve/veya	100-109
Grade-III hipertansiyon	≥ 180	ve/veya	≥ 110
İzole sistolik hipertansiyon	≥ 140	ve	< 90

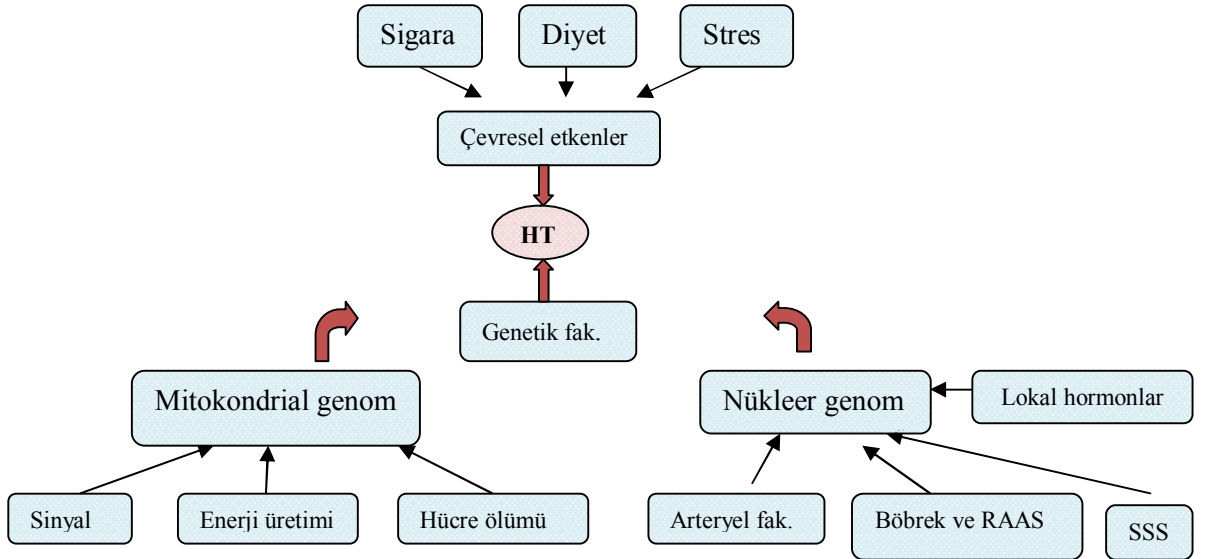
* SKB, sistolik kan basıncı; DKB, diastolik kan basıncı

Hipertansiyonun Fiziopatolojisi

Kan basıncı, kalp debisi ve periferik vasküler direnç ilişkisinin bir sonucudur ve sistemik kan basıncı: kalp debisi X periferik arteriyel direnç şeklinde formülize edilir. Bu denklem nöronal, hormonal ve metabolik etkenlerle dengede tutulur (23).

ESANSİYEL HİPERTANSİYON

Esansiyel hipertansiyon, nedeni saptanamayan ya da gösterilebilir hiçbir organ hastalığının başlatmadığı kan basıncı yüksekliği olarak tanımlanır. Kan basıncı yükselmesine yol açan pek çok mekanizmanın ayrı ayrı veya birlikte esansiyel hipertansiyona yol açtığı düşünülmektedir (Şekil 1).



SSS: Sempatik sinir sistemi, RAAS: Renin-Anjiyotensin-Aldosteron sistemi

Şekil 1. Esansiyel hipertansiyon oluşumunda etkili mekanizmalar (Kaynak 24'ten Türkçeleştirilerek alınmıştır (24)).

Esansiyel Hipertansiyon Etiyopatogenezinden Sorumlu Faktörler

- 1-Aşırı tuz alımı ve Renal sodyum retansiyonu
- 2-Renin-Anjiyotensin sistemi
- 3-Sempatik sinir sistemi
- 4-Kalp debisini artıran faktörler

5-Vasküler hipertrofi

6-Endotel kökenli faktörler

7-Obezite ve insülin direnci

8-Genetik faktörler

Aşırı Tuz Alımı ve Renal Sodyum Retansiyonu

DeneySEL, epidemiyolojik ve klinik çalışmalar diyetle alınan sodyum miktarı ile kan basıncı (KB) arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Diyetle alınan sodyum hipertansif hastaların bir kısmında KB artışına neden olmaktadır (tuza duyarlı hipertansifler). Tuza duyarlı hipertansiyonu olan kişilerde tuz kısıtlaması ile kan basıncı değerleri düşer. Yaş, ırk, obezite, sempatik aktivite, plazma renin düzeyi, diabetes mellitus (DM) ve kronik böbrek yetmezliği (KBY) gibi etkenler tuza olan duyarlılığı artırır. Alfa-adducin geni ve anjiyotensinojen geni sodyuma duyarlılıkla ilişkilidir (25). Renal sodyum retansiyonu da hipertansiyon etiopatogenezinden sorumlu faktörler arasında sayılır. Renal sodyum retansiyonunda ileri sürülen mekanizmalar;

1-Basınç natriürezinin yeniden düzenlenmesi

2-Renal sodyum ekskresyonunda herediter defekt

3-Natriüretik hormon indüklenmesi

4-Nefron heterojenitesi

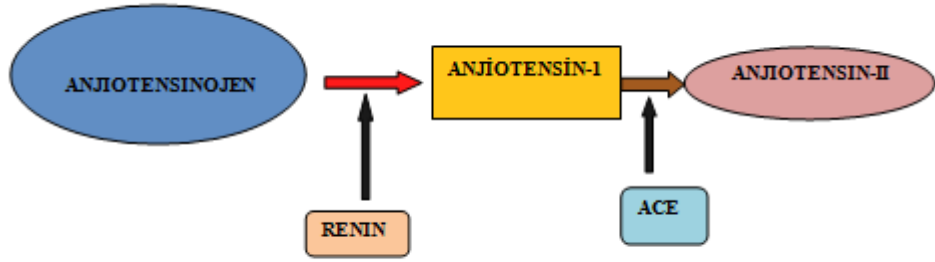
5-Azalmış nefron sayısı

Renin-Anjiyotensin Sistemi

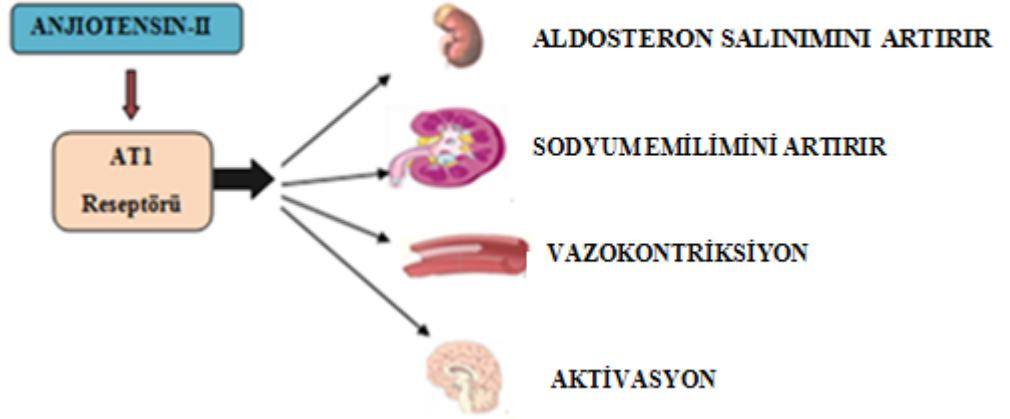
Renin bir proteolitik enzim olup jukstaglomerüler hücrelerde depolanır ve sekrete edilir. Renin karaciğerde sentezlenen anjiyotensinojeni etkileyerek anjiyotensin-I'i oluşturur. Anjiyotensin-I, ACE (Anjiyotensin converting enzim) tarafından anjiyotensin-II'ye dönüştürülür (Şekil 2). Anjiyotensin-II'nin damarlarda vazokonstriksiyon, aldosteron depolanması ve salınımının uyarılması, renin

salınımının baskılanması, ADH (Antidiüretik hormon) salınımı ve sempatik debi artışı gibi fonksiyonları vardır (Şekil 3).

Bu sistemin etkileri sonucu total periferik arteryel basınç ve ekstrasellüler volüm artar. Dolayısıyla bu sistemdeki bir bozukluk esansiyel hipertansiyon oluşumunda rol oynayabilir. Esansiyel hipertansiyonlu hastalarda renin plazma düzeyi düşük, normal veya yüksek olabilir (26-28).



Şekil 2. Anjiyotensin-II'nin oluşumu (27).



Şekil 3. Anjiyotensin-II'nin etkileri (27).

Sempatik Sinir Sistemi

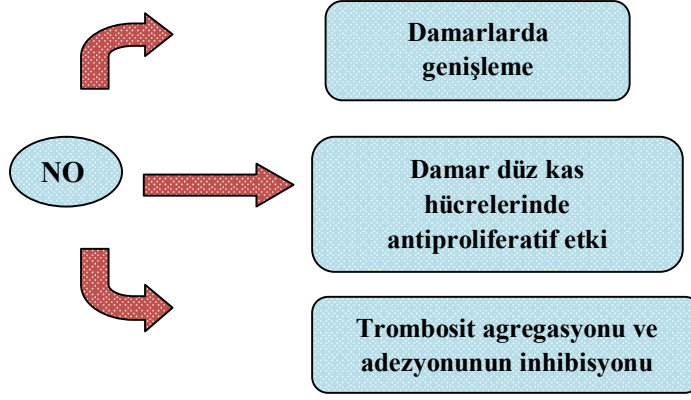
Klinik birçok gözlem SSS (sempatik sinir sistemi) aktivitesindeki artışın esansiyel hipertansiyon patogenezinde rolü olabileceğini göstermektedir. Yüksek normal kan basıncına sahip gençlerde SSS aktivite artışı gösterilmiştir. Genç hipertansif hastalarda plazma norepinefrin düzeylerinin normotansiflerinkinden daha yüksek olduğu saptanmıştır (29-30). Sempatik sinir sistemi ve renin-anjiyotensin sistemi değişik yollarla birbirlerini etkilemektedir. Sabahın erken saatlerinde SSS aktivitesinde ve KB'da artış olur. SSS aktivitesinin hipertansif hastalarda kardiyovasküler morbidite ve mortalite ile ilgili olduğu düşünülmektedir (31).

Vasküler Hipertrofi

Hipertansiyonda damar lümeninde daralma, yapısal veya damar tonusunun artışından dolayı fonksiyonel değişikliklerle oluşabilir. Vasküler tonus pressör ajanlara karşı artmış vazokonstriktör yanıt nedeniyle artar. Tekrarlayan stres vazokonstriksiyona bağlı vasküler hipertrofiye neden olur ve periferik damar direncinde artışla birlikte kan basıncını arttırır (32). Pozitif aile öyküsüne sahip kişilerin çevresel strese karşı artmış vazokonstriktör cevap verdikleri gösterilmiş ve bu kişilerin hipertansiyon gelişimi için risk grubunda oldukları belirtilmiştir (33).

Endotel Kökenli Faktörler

Nitrik oksit (NO) bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşmuş kısa ömürlü güçlü vazodilatör bir moleküldür. Gaz yapısından dolayı membranlardan kolayca geçer. Oksidan ve indirgeyici bir molekül olarak görev yapar (34-42). NO kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Kan basıncının farmakolojik olarak artırılması sonucu NO salınımı artarken, kan basıncındaki düşme NO salınımını inhibe eder. Kardiyovasküler sistem NO bağımlı vazodilatör tonus tarafından kontrol edilir. Fonksiyonel çalışmalar hipertansif hastalarda normotansif kişilere göre NO bağımlı vazodilatasyonun bozulduğunu göstermiştir (43).



Şekil 4. NO'nun damar üzerine olan etkileri (37).

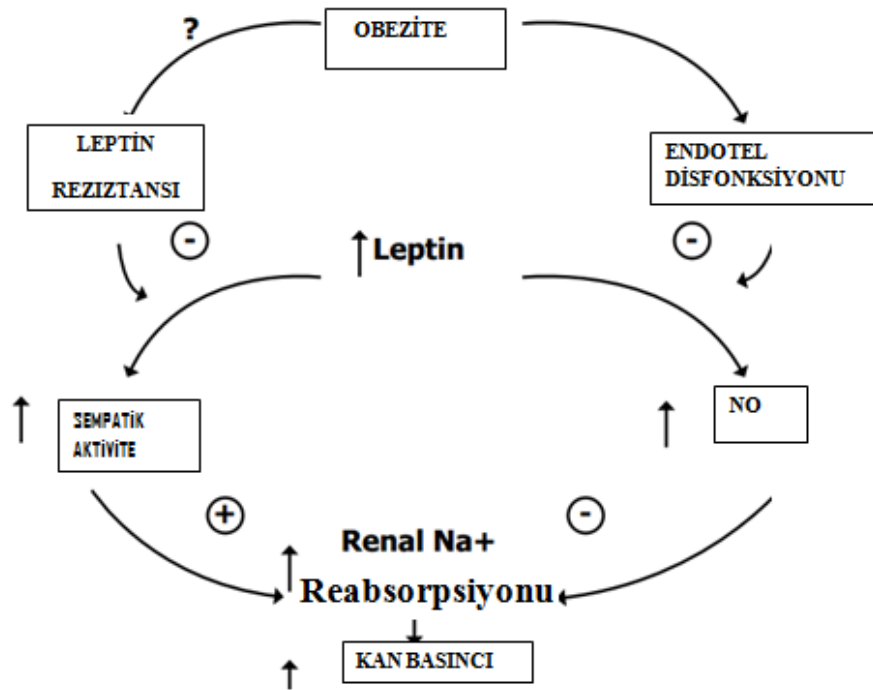
Endotelinler çeşitli izoformları (ET-1, ET-2 ve ET-3) olan peptit yapısında moleküllerdir. Endotelin-1 (ET-1) çoğunlukla vasküler endotel hücrelerinden sekrete edilen baskın izoformdur. ET-1'in kemotaktik, inotropik ve mitojenik özellikleri vardır ayrıca RAAS (Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi), vazopresin ve atrial natriüretik peptit üzerinden su ve tuz dengesini etkiler ve sempatik sinir sistemini uyarır. Farklı reseptörler üzerinden etki ederek hem vazokonstriktör hem de vazodilatör etki oluşturur. Düz kaslarda bulunan ETA reseptörü üzerinden vazokonstriktör etki oluşturur (44). Endotel hücrelerinde bulunan ETB reseptörlerini etkileyerek, prostasiklin ve NO salınımına neden olup vazodilatör etki gösterir. ET-1'in vazokonstriktör etkisinin daha baskın olduğu bilinmektedir. ETA/ETB reseptör antagonisti ile tedavi edilen hipertansif hastalarda kan basıncı değerlerinin düştüğü gösterilmiş olup bu sonuç ET-1'in esansiyel hipertansiyon gelişimindeki rolünü desteklemiştir (45).

Obezite ve İnsülin Direnci

Obezite hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilidir (46). Obezitenin hangi mekanizmaları kullanarak hipertansiyon oluşumuna katkıda bulunduğu net olarak bilinmemektedir. Ancak yağ dokusundan salınan leptin hormonunun kardiyovasküler, renal ve endokrin sistemi etkileyerek hipertansiyon gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (47).

İnsülin direnci, glikozun iskelet kasları başta olmak üzere periferik dokularda kullanımının yetersizliği olarak tanımlanan metabolik bir durumdur (48). Esansiyel

hipertansiyonlu bireylerde insülin direncine sık rastlanır ve bu durum hipertansiyonla ilgili toplam kardiyovasküler risk artışında rol oynar. Hipertansif ve normotansif bireylerle yapılan bir çalışmada zayıf prehipertansif bireylerde hiperinsülineminin daha belirgin olduğu gösterilmiş ve bunun patolojik önemi olabileceği belirtilmiştir (49). Hipertansif bireylerde insülinin vazodilatatör etkisi, artmış insülin direnci ve artmış SSS aktivitesine bağlı olarak azalmıştır (50). İnsülinin endotele bağımlı vazodilatatör etkisinin azalması, insülin direncine bağlı hipertansiyon gelişiminde en önemli rolü oynamaktadır (51).



Şekil 5. Leptinin kan basıncı üzerine etkileri (Kaynak 52'den Türkçeleştirilerek alınmıştır (52)).

Genetik Faktörler

Genetik faktörlerin esansiyel hipertansiyon patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Esansiyel hipertansiyonlu hastaların önemli bir kısmında aile öyküsü vardır. İnsan genom projesi tamamlanmadan çok önce esansiyel hipertansiyon genetiğini ortaya çıkarmak için yoğun araştırmalara girişilmiştir. Bu araştırmalar sonucunda hipertansiyona yol açan ve klinikte nadir olarak görülen bazı monogenetik sendromlar tanımlanmıştır (Liddle sendromu, Gordon sendromu, glukokortikoidlerle tedavi edilebilen aldosteronizm, mineralokortikoid fazlalığı, mineralokortikoid reseptör gen mutasyonu, Bilgin Turan sendromu).

Klinik ve genom haritalama çalışmaları sonucunda yüksek kan basıncı ile ilgili olabilecek çok sayıda gen tanımlanmıştır. Bu genlerden üzerinde en çok çalışılanlar ve hipertansiyon patogeneğinde rol alma ihtimali yüksek olan genler; anjiyotensinojen geni, ACE geni, anjiyotensin II tip 1 reseptör geni, α -adducin geni, β -2 adrenerjik reseptör geni ve G-protein B3 alt ünitesidir. Esansiyel hipertansiyon ile ilgili her geçen gün yeni aday genler ve polimorfizmler de tanımlanmaktadır. Son zamanlarda üzerinde çalışılan genlerden biri de Chromogranin A (CHGA) genidir.

GENETİK POLİMORFİZM VE HİPERTANSİYON

Dünyadaki her bireyin kromozomlarında aynı yerde bulunan DNA (Deoksiribonükleik asit) dizileri birbirine benzerlik gösterir. Popülasyonda iki farklı birey arasında DNA'nın yaklaşık 1000 bç uzunluğundaki herhangi bir kısmı ortalama sadece bir baz çifti (bç) değişikliği içerir. Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine allel adı verilir. Alleller, yaygın olduğu zaman genel popülasyonda kromozomlarda % 1'den fazla bulunur ve genetik polimorfizm olarak adlandırılırlar. Polimorfizmler, mutasyonlardan toplumda daha yüksek sıklıkta varyant allel olarak bulunmaları nedeniyle ayrılırlar ve hastalık nedeni değil hastalığa yatkınlık nedeni olabilirler (53).

En sık görülen polimorfizm tek nükleotid polimorfizmi (SNP)'dir. SNP genom dizisindeki tek nükleotid (Adenin: A, Timin: T, Guanin: G, Sitozin: C) değişimleridir. Bireyler arasında DNA özelliklerinin benzerliği % 99,9'dur. Dolayısıyla bireyleri farklı yapan DNA'nın % 0,1'lik küçük bir kısmıdır. Genomun çok küçük bir kısmı gen kodladığı için, SNP'lerin büyük bir kısmı gen kodlamayan bölgelerde bulunur. İnsan genomunda 15-30 milyon SNP olduğu tahmin edilmektedir ve şimdiye kadar 13 milyona yakını tanımlanmıştır. Genomdaki bir değişikliğin SNP olarak tanımlanması için, geniş bir toplumun en az %1'inin DNA dizisinde görülmelidir. SNP'ler transisyon (pürin-pürin, primidin-primidin) ve transversiyon (pürin-pirimidin) mekanizmaları ile oluşmaktadır. İki farklı birey arasında 1331 bç'de bir farklılık olduğu tahmin edilmektedir. Ancak bu oran toplumlar arasında değişiklik göstermektedir. SNP'ler kodlayan bölge, intergenik bölgeler ve kodlamayan bölgelerde görülebilir. SNP'lerin çoğunluğu kodlamayan bölgede yer alır ve bu tip SNP'lere sessiz SNP denir. Sessiz SNP'ler gen

fonksiyonlarını ve kalıtılan özellikleri etkilemezler. Kodlayan bölgelerde bulunan SNP'lere fonksiyonel SNP'ler denir. Fonksiyonel SNP'ler ya aminoasit dizisini değiştirerek (direk etki) ya da regülatör (düzenleyici) dizilerin fonksiyonlarını değiştirerek (dolaylı etki) gen fonksiyonlarını etkileyebilirler. Toplumdaki bireyler arasında görülen SNP'ler, hastalıklara karşı duyarlılık, ilaçlara direnç ve hastalık prognozunu etkilemektedir. Kanseri, bazı kardiyovasküler hastalıklar, DM, migren, şizofreni ve Alzheimer hastalığı SNP ile yakın ilişkilidir. Çeşitli hastalıklara özgü SNP profilleri belirlenmiştir. SNP taramaları yapılarak hastalığa neden olma ihtimali olan varyant alleller tespit edilip daha sonra bireylerin DNA örneklerinde spesifik alleller incelenerek hastalığa yatkınlıkları belirlenebilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar genomun çok büyük bir kısmının haplotip bloklar şeklinde olduğunu göstermiştir ve haplotip blokların birkaç SNP ile işaretlenmesi hastalıklarla olan ilişkisini belirlemede faydalı olabileceğini göstermiştir (54). SNP'lerin kullanım alanları tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 3. SNP kullanım alanları

SNP Kullanım alanları	
1.	Tanı ve risk profillenmesi
2.	Aday gen tespiti ve haritalanması
3.	Polimorfizm testleri
4.	Epidemiyolojik çalışma planlaması
5.	Farmakogenetik çalışmalar
6.	Çevresel uyaran ve diyetle yanıt
7.	Adli tıp

Yaygın kompleks hastalıklar genellikle mendelyan kalıtım modeline uymazlar. Birden fazla genin etkileşimi ve çeşitli çevresel faktörlerin kümülatif etkileri sonucu oluşurlar. Hipertansiyon, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, koroner kalp hastalığı, DM, obezite ve çeşitli türde kanserler kompleks hastalıklar grubundandır. Yaygın hastalık-yaygın DNA değişiklikleri hipotezi (Common

Disease-Common Variant Hypothesis) ileri sürülmüştür. DNA polimorfizmleri tek başlarına hastalık oluşturmak için yeterli değildir, ancak hastalık riskini artırarak, kümülatif etki ile hastalık oluştururlar (55).

Esansiyel hipertansiyon da yaygın (kompleks) hastalıklar grubundandır. Gen-gen ve gen-çevre etkileşimi hastalığın başlangıcını ve şiddetini belirler (3,24,56). Esansiyel hipertansiyonla ilişkili çok sayıda gen ve aday gen polimorfizmleri tanımlanmıştır ve bu genlerin sayısı artarak devam etmektedir (Tablo 4).

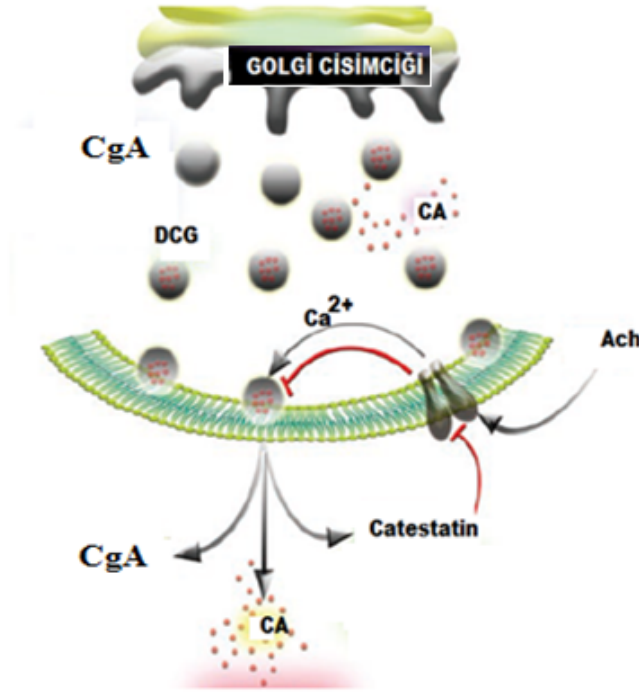
Tablo 4. Esansiyel hipertansiyon gelişiminde etkili olabilecek genler (57).

Lokalizasyonu	Gen	Gen /lokus MİM Numarası
1p36.12	ECE1	600423
1q23.3	RGS5	603276
1q24.2	ATP1B1	182330
1q24.2	SELE	131210
1q42.2	AGT	106150
2p25-p24	HYT3	607329
3q24	AGTR1	106165
4p16.3	ADD1	102680
5p13-q12	HYT6	610262
7q22.1	CYP3A5	605325
7q36.1	NOS3	163729
12p13.31	GNB3	139130
12p12.2-p12.1	HYT4	608742
15q	HYT2	604329
17q	HYT1	603918
17q11.2	NOS2A	163730
17q12	PNMT	171190
20q11-q13	HYT5	610261
20q13.13	PTGIS	601699

CHROMOGRANİN A PROTEİNİ (CgA)

Chromogranin A (CgA) ilk olarak 1965 yılında Banks ve Helle tarafından tanımlanmıştır. CgA, sekretuar protein-1 olarak da adlandırılır. CgA adrenal medulladaki kromaffin hücrelerinin salgı granüllerinde katekolaminlerle birlikte depolanan ve birlikte salınan çözünebilir bir protein olarak tanımlanmıştır (58). Takip eden çalışmalarda CgA'nın sadece adrenal medullada değil tüm endokrin,

nöroendokrin ve sinir sistemindeki sekretuar veziküllerde yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir (59-60). CgA ayrıca gastrointestinal sistem (mide, jejunoleum), hipofiz, diensefalon, immün sistem ve atrial miyokardiyumda bulunur.



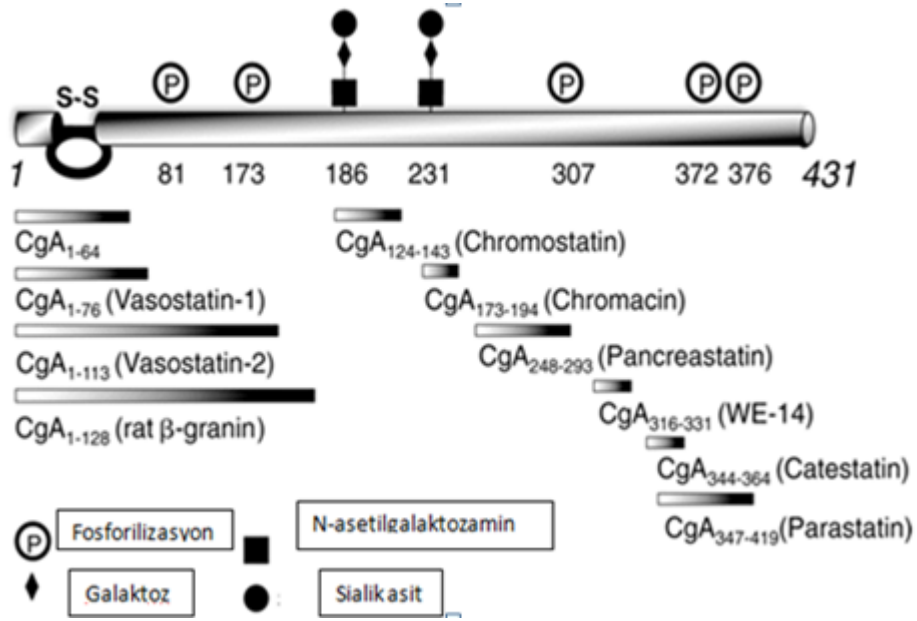
CA: Katekolamin, Ach: Asetil kolin, DCG: Dense kore sekretuar granül

Şekil 6. CgA ve katekolaminlerin sentez ve salınımı (Kaynak 61'den Türkçeleştirilerek alınmıştır (61)).

CgA'nın Yapısı ve Fonksiyonları

Peptit ve amin hormonlarla birlikte bulunan CgA, sekretuar proteinlerin düzenlenmesinde görev yapan asidik bir glikoproteindir. CgA, 439 aa'den oluşmuştur ve 49 kDa (kilodalton) ağırlığındadır. Granin protein ailesinden bir asidik glikoprotein olup başlıca adrenal medulla ve postganglionik sempatik aksonlardan katekolaminlerle birlikte salınır (6-12). CgA, endokrin ve nöronal hücre salgı granüllerinde amin, nükleotidler, kalsiyum ve diğer peptit hormonlarla birlikte depolanır ve ekzositozla ekstrasellüler alana salgılanır. Dokudan dokuya farklılık gösteren post-translasyonel modifikasyon (glikolizasyon, fosforilasyon ve

sülfatlanma) ve proteolitik ayrılmaya uğrar (62-66). Yapılan çalışmalarda intakt CgA molekülünün %60-65 rastgele kıvrılan bir yapıda, %25-40 ise α -heliks yapıda olduğu anlaşılmıştır (67). CgA kalsiyuma bağımlı olarak farklı pH'da dimer veya tetramer yapılar oluşturan konfigürasyon değişikliğine uğrar (68). CgA'nın C-terminal bölgesi dimer-tetramer dengesi açısından önemlidir. N-terminal bölge mikromolar konsantrasyonda dimer yapıdadır ve hızlı ayrılmadan sorumludur (Şekil 7).

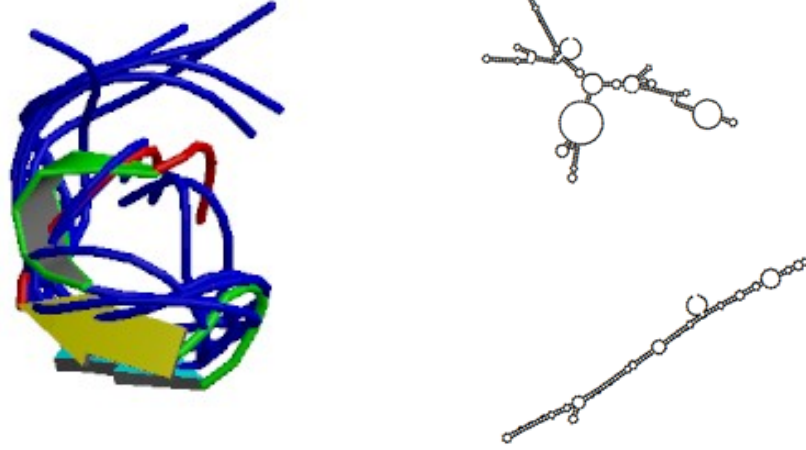


Şekil 7. CgA'nın yapısı (Kaynak 69'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (69)).

CgA proteininin ekstrasellüler işlevinin hala belirsizliğini koruması, CgA'nın biyolojik aktif peptitlerin bir öncüsü olduğu ve etkilerini asıl bu biyoaktif peptitlerle oluşturduğu hipotezini doğrumuştur. Bu biyolojik aktif peptitler otokrin, parakrin ve endokrin etkiler göstermektedir.

Tablo 5. CgA' dan proteolitik etki ile oluşan peptitler (69).

CgA'dan oluşan peptitler
1.Vasostatin
2.Pancreastatin
3.Catestatin
4.Parastatin
5.Chromacin



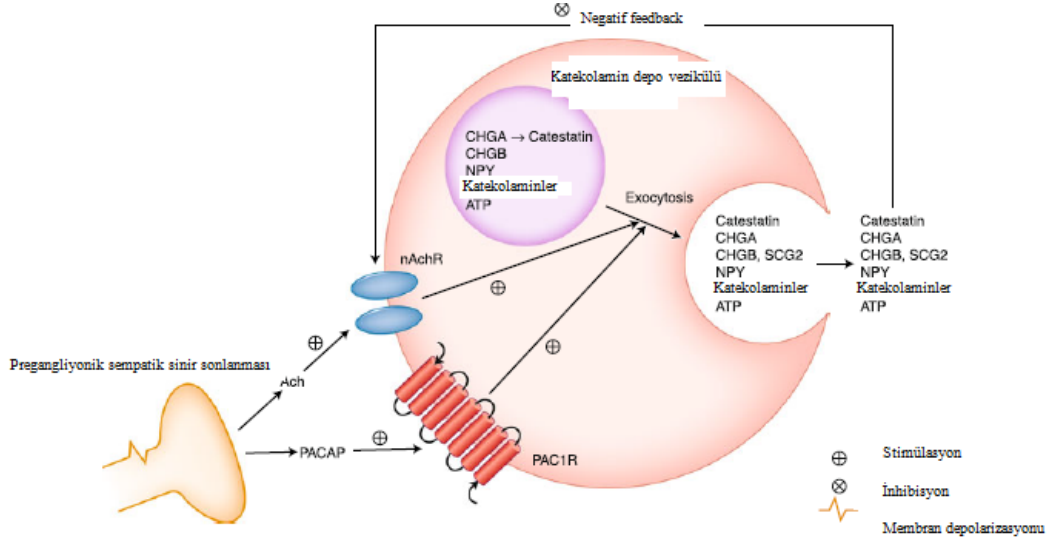
Şekil 8. Catestatinin 3D görüntüsü ve CgA'nın moleküler yapısı (70).

CgA- Bağlı Peptidlerin Görevleri

- 1- İnflamasyonda bakterisidal ve antifungal aktivite.
- 2-Kardiyovasküler reaksiyonlarda inhibitör düzenleyici etki (vazodilatasyon, negatif inotropik etki).
- 3-İmmunitenin başlangıcında ve enerji metabolizmasında görevleri vardır.
- 3-Kalsiyum dengelenmesi.
- 4-Hücre adezyonu ve yayılması.

5-Apoptozisin indüklenmesi.

CgA ve biyoaktif peptitlerinin nöroendokrin granüllerde depolanması ve salgı granüllerinden sekrete edilmesi şekil 9’da gösterilmiştir.



Ach: Asetil kolin, ATP: Adenozin trifosfat. NPY: Nöropeptit-Y, PACAP: Hipofiz adenil siklaz aktivatör protein, PAC1R: hipofiz adenil siklaz reseptörü-1

Şekil 9. CgA proteini ve derive peptitlerinin nöroendokrin granüllerde depolanması ve salınımı (kaynak 71’den Türkçeleştirilerek alınmıştır (71)).

Vasostatin-1

Vazodilatatör etkili bir peptittir. Vasostatinin kardiyovasküler sistemde birden çok modülör (düzenleyici) etkileri olduğunu gösteren çalışmalar rapor edilmiştir (72). İnsan kan damarlarından (İnternal torasik arter ve Vena safena) izole edilen segmentler üzerinde yapılan çalışmalarda Vasostatin-1’in ekstrasvasküler kalsiyum ve endotelden bağımsız olarak endotelin-1’i inhibe ettiği gösterilmiştir (73-75). Endotelin-1 vazokonstriktör bir madde olduğundan inhibisyonu vazodilatasyona yol açar. Vasostatin-1’in kardiyovasküler sistemdeki diğer önemli regülör fonksiyonu da pro-inflamatuar ajanların yıkıcı etkilerine karşı endotelial bariyer bütünlüğünü sağlamasıdır. Vasostatin-1’in fonksiyonları toplu olarak tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. Vasostatin-1'in fonksiyonları (76).

Etki	Fonksiyon	Doku
İnhibisyon	Vazokonstriksiyon	İnsan kan damarları
	Parathormon salınımı	Domuz paratroid bezi
	Büyüme-gelişme	Bakteri ve mantar
	Kalpde inotropik etki	Kurbağa kalbi
	Gastrointestinal kontraktilite	Rat proksimal kolon
	VEGF, hücre proliferasyonu ve migrasyonu	İnsan umbilikal ven endotelial hücreleri
	TNF- α 'yı da içeren gaplar	Fare umbilikal veni ve insan umbilikal veni
Aktivasyon	Nörotoksin üretimi	Rat mikroglia hücreleri
	Hücre adezyonu	İnsan fibroblastları, vasküler düz kas hücreleri
	Sekresyon	İnsan nötrofilleri

PTH: Parathormon, VEGF: vasküler endotelial growth faktör

Catestatin

Catestatin, CgA'dan proteolitik etki ile oluşan katyonik ve hidrofobik bir peptit olup kan basıncının düzenlenmesinde ve kardiyak fonksiyonlar üzerinde önemli etkileri vardır (77). Plazma konsantrasyonu hipertansiyon ile ters korelasyon gösterir. Catestatin plazma düzeyleri hem hipertansif bireylerde hem de onların normotansif çocuklarında düşük olarak ölçülmüştür. Dolaşımdaki catestatin düzeylerinin azalması, katekolamin salgılanmasının artması ile sonuçlanabilir. Düşük plazma catestatin düzeylerine sahip ve hipertansiyon açısından pozitif aile öyküsü olan bireylerin üriner epinefrin ekskresyonu (boşaltımı), hipertansiyon için negatif aile öyküsüne sahip bireylerden yaklaşık iki kat daha yüksek bulunmuştur (78). Catestatin nikotinik kolinerjik reseptörler üzerine güçlü antagonist etki gösterir (79). CHGA-/- knockout farelerde kan basıncının yükseldiği ve catestatin infüzyonu sonrası kan basıncı değerlerinin düştüğü gözlenmiştir (17). Catestatinin fonksiyonları toplu olarak tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Catestatinin fonksiyonları (76).

Etki	Fonksiyon	Doku
İnhibisyon	Katekolamin salınımı	Domuz adrenal medullası
	Kan basıncı	Rat
	Büyüme	Bakteri, mantar, maya
	Kalpde inotropik etki	Rat ve kurbağa kalbi
Aktivasyon	Histamin salınımı	Rat mast hücreleri
	Baroreseptör	İnsan
	Sekresyon	İnsan nötrofilleri

CHGA Geni

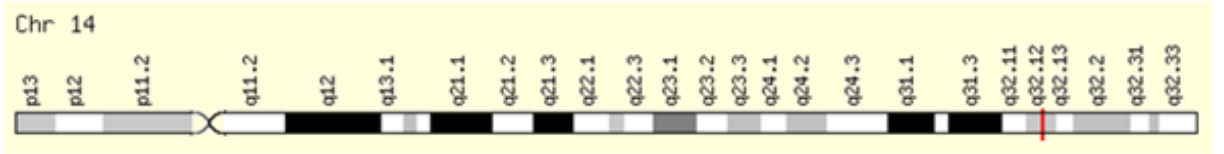
Chromogranin A (CHGA) geni, 14q32.12 bölgesine lokalize, 12194 bp uzunluğunda, 8 ekzon ve 7 intron bölgesinden oluşmuştur (şekil 10, şekil 11). CHGA geni 457 aa'lık bir ürünü kodlar (439 aa'den oluşan bir propeptit ve 18 aa'den oluşan sinyal peptidi). CHGA geninin kodladığı bu protein CgA olarak adlandırılır. CHGA geninin 7 tane transkripti vardır (tablo 8) ve başlıca nöronal, endokrin ve nöroendokrin dokuların sekretuar hücrelerinden sekrete edilir.

CHGA geni, nöroendokrin sistem dışında gastrointestinal sistem (özellikle jejunioileum), beyin (hipofiz ve diensefalon) ve atrial miyokardiyumdan eksprese olur (80). Pieroni ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada ventriküler miyokard hücrelerinden de CHGA geninin eksprese olduğu gösterilmiştir (81).

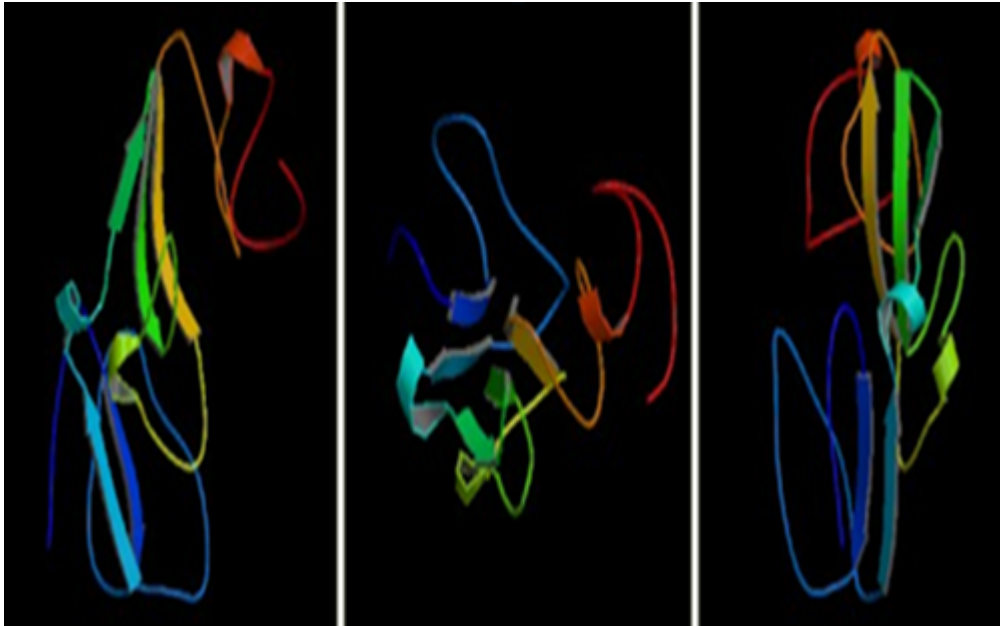
Tablo 8. CHGA geni transkriptleri (82).

Transkriptin adı	Uzunluğu	Protein ürün uzunluğu	Biyotip
CHGA-1	2063 bç	457 aa	Protein kodlama
CHGA-2	1474 bç	306 aa	Protein kodlama
CHGA-3	1922 bç	200 aa	Nmd
CHGA-4	896 bç	38 aa	Nmd
CHGA-5	889 bç	-	Pt
CHGA-6	638 bç	-	Ri
CHGA-7	912 bç	-	Ri

bç: Baz çifti, aa: Aminoasit, Nmd: Nonsense mediated decay: Nonsense aracılı yıkım, Pt: processed transcript:İşlenmiş transkript, Ri: Retained intron: İntron dizisi içeren kodsuz transkript.



Şekil 10. CHGA'nın 14. Kromozom üzerindeki lokalizasyonu (14q32.12) (82).



Şekil 11. CgA molekülünün 3 boyutlu görüntüsü (70).

Tablo 9. CHGA geni temel özellikleri (82).

GEN KİMLİĞİ	
Resmi ad	Chromogranin A (Paratroid sekretuar protein-1)
Resmi sembol	CHGA
Gen türü	Protein kodlama
HNGC Kimlik	1929
Kromozom	14
Lokalizasyon	14q32.12
Ekzon	8 (12.20 kb)
Aminoasit	457
GEN EKSPRESYONU	
Nöroendokrin Sistem	Adrenal medulla, paratroid, troid, pankreas
Santral sinir sistemi	Diensefalon, hipofiz
Kardiyovasküler sistem	Atrial myokardiyum, ventriküler myokardiyum
Gastrointestinal sistem	Mide, incebarsak (jejunoileum)
TEMEL FONKSİYONLAR	
1. Katekolaminlerin depolanması ve salınımının düzenlenmesi	
2. Vasostatin-1, catestatin, parastatin, chromastatin ve pancreastatin peptitlerinin prekürsörüdür.	
3. Paratiroid bezinden parathormonla birlikte salınır.	
4. Vazodilatatör etki (vasostatin-1)	
5. Antimikrobik etki (chromastatin)	
6. Disglisemik etki (pancreastatin)	

CHGA geni promotor bölgede sık görülen tek nükleotid değişiklikleri (polimorfizmleri) tablo 10'da gösterilmiştir.

CHGA geni intrasellüler ve ekstrasellüler mekanizmalar ile katekolaminlerin depolanmasını ve salınımını düzenler. Adrenal medullanın depo granüllerinden katekolaminlerle birlikte salınır. Paratiroid bezi depo granüllerinden parathormonla birlikte salınır. Bu genin ürünü olan CgA ve biyoaktif peptitlerinin önemli fizyolojik görevleri vardır. Bazı hormonların yanısıra birlikte salındığı birçok nörotransmitterin salınımının düzenlenmesinde rol alırlar. CgA'nın dokuya spesifik proteazlar tarafından ayrılması ile oluşan biyoaktif peptitler, otokrin, parakrin ve endokrin etkiler gösterir.

CHGA uzun süreden beri nöroendokrin tümörlerde marker (belirteç) olarak kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda, esansiyel hipertansiyonu da içeren kardiyovasküler hastalıklarda da rolleri olduğu gösterilmiştir. Özellikle promotor, catestatin peptit bölgesi ve 3'UTR'deki varyasyonlar kan basıncı otonomik aktivitesinde değişikliklere neden olarak hastalık oluşumuna katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır (13-15).

Tablo 10. CHGA geni promotor bölgede sık görülen SNP'ler (83).

No	Allel	Lokalizasyon	Pozisyon	Ref. SNP
1	GA	Promotor	-1106	rs9658628
2	AT	Promotor	-1018	rs9658629
3	TC	Promotor	-1014	rs9658630
4	GT	Promotor	-988	rs9658631
5	GA	Promotor	-462	rs9658634
6	TC	Promotor	-415	rs9658635
7	CA	Promotor	-89	rs7159323
8	CT	Promotor	-57	rs9658638

CHGA Geni Polimorfizmleri ve Esansiyel Hipertansiyon

CHGA geninin promotor, 5'UTR, 3'UTR, ekzon ve intronik bölgelerinde çeşitli varyasyonlar tespit edilmiştir. Promotor bölge, catestatin peptid bölgesi ve 3'UTR'deki DNA varyasyonlarının kan basıncı ve otonomik aktivitesinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (13-15). 2005 yılında yapılan bir araştırmada CHGA geni çıkarılmış farelerde kan basıncı kontrolünün bozulması sonucu kan basıncı değerlerinin yükseldiği gözlemlenmiş ve normal kan basıncı oluşumu için CHGA geninin iki kopyasının da bulunması gerektiği gösterilmiştir (17). Chen ve arkadaşlarının 175 hipertansif ve 189 normotansif kişi ile yaptıkları bir çalışmada 3'UTR'deki C+87T polimorfizminin özellikle erkek hipertansiyonu ile kuvvetli ilişkisi olduğu gösterilmiştir (15).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar hipertansif bireyler ve hala normotansif olan ancak hipertansiyon açısından aile öyküsü pozitif olan (genetik risk taşıyan) kişilerde promotor bölge polimorfizmlerinin, genin ekspresyonunu etkileyerek ve otonom fonksiyonlarda değişikliğe neden olarak hipertansiyona yol açabileceğini göstermektedir (84-85).

2008 yılında 920 kişi (204 esansiyel hipertansif hasta, 715 normotansif birey) ile yapılan vaka-kontrol çalışmasında CHGA geni promotor bölgesindeki T-1014C, T-988G, G-462A, C-415T ve A-89C polimorfizmleri araştırılmış G-462A bölgesinde GA genotipine sahip bireylerde AA ve GG genotipine sahip bireylere kıyasla soğuk stres testi sonrası beklenenden daha yüksek kan basıncı değerleri ölçülmüş ve bu sonuçlara dayanılarak polimorfik bölgelerin heterozigotluğunun her iki allel için homozigot olan bireylere göre daha fazla öneme sahip olması anlamına gelen moleküler heterozis kavramı ileri sürülmüştür (14,16). Aynı çalışmada promotor bölgenin haplotipi yapılmış ve en sık görülen haplotip-A (TTGTC)'da G allel frekansı (~%57), ikinci sıklıkta görülen haplotip B (CGATA)'de A allel frekansı (~%23) olarak bulunmuştur. Haplotip A'nın esansiyel hipertansiyon için risk taşıdığı öne sürülmüştür. CHGA geni katekolaminlerin depo veziküllerinin formasyonu (şekillenmesi) ve nörotransmitterlerin dolaşıma salınmasının düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir. Dolayısı ile CHGA geni promotor bölge değişikliklerinin transkripsiyonel kontrolü kardiyovasküler risk gelişiminin erken bir kontrol noktası

olabileceği ileri sürülmüştür (86-88). Fangwen ve arkadaşlarının 2012’de yaptıkları bir çalışmada, CHGA geni promotor bölgesi G-462A polimorfizminin esansiyel hipertansiyon yanı sıra metabolik sendrom içinde risk oluşturduğu gösterilmiştir (89).

Bu proje kapsamında PAÜ Kardiyoloji bölümü tarafından tüm tetkikleri yapılarak esansiyel hipertansiyon tanısı almış hastalarda CHGA geni promotor bölgesindeki T-1014C, T-988G, G-462A ve C-415T polimorfizmlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu araştırma CHGA geni ile ilgili Türkiye’den yapılacak ilk çalışma olup esansiyel hipertansiyon için yapılan diğer çalışmalara katkı sağlayacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

ÇALIŞMA GRUPLARI

Bu projede Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı tarafından tüm tetkikleri yapılarak esansiyel hipertansiyon tanısı almış, yaşları 30-82 arasında değişen 50 hasta ile kan basıncı değerleri normal sınırlarda olan, yaşları 26-45 arasında değişen 32 kontrol olgusu çalışmaya dahil edildi. Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Komisyonu tarafından 16.05.2011 tarih ve B.30.2.PAÜ.0.20.05.09/82 nolu kararı ile onaylanmıştır. Çalışmaya dahil olan tüm bireylere bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatıldı. Çalışmaya katılan tüm bireylerden 1 adet K3 EDTA'lı tüpe (VACUETTE®) toplam 2,5-3 ml periferik kan örneği alındı. Kan örnekleri hasta ve kontrol grupları için ayrı ayrı kodlanarak DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20°C' de saklandı. Çalışmaya dahil olma ve dışlama kriterleri tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Çalışmaya dahil olma ve dışlanma kriterleri

Dahil olma kriterleri	Dışlanma kriterleri
1. Esansiyel hipertansiyon tanısı almış olup takip altında olanlar ya da yeni tanı almış esansiyel hipertansiyonu olanlar.	1. Sekonder hipertansiyonu olanlar.
2. Ofis tansiyonu en az iki ölçümde 140/90 mmHg ve üzeri olanlar.	2. Kronik başka bir hastalığı nedeniyle izlenmekte olanlar.
3. Kronik başka hastalığı olmayanlar	3. Konjenital genetik temelli bir hastalığı olanlar
4. Konjenital genetik temelli bir hastalığı olmayanlar	
5. Yaşları 18 ve üzeri olanlar	4. 18 yaşın altında olanlar

KAN ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU

Kan örneklerinden DNA saflaştırılması, Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) kullanılarak yapıldı. Saflaştırma işleminde aşağıdaki sıra izlenmiştir.

1. -20°C'de buzdolabında saklanan ETDA'lı tüplerdeki kan örnekleri oda ısısında çözülünceye kadar bekletildi (25-30 dk). Daha sonra tüpler 1-2 kez alt üst edildi.
2. Her örnek için 1,5 ml'lik ependorf tüpleri hazırlandı ve tüpler içine 900 µl cell lysis solüsyonu eklendi.
3. 300 µl periferik kan örneği, önceden 900 µl cell lysis solüsyonu konmuş olan ependorf tüpleri içerisine eklendi ve iyice karışması için 5-6 kez alt üst edildi.
4. Karışım 10 dakika oda ısısında bekletildi ve bekleme esnasında 2-3 kez alt üst edildi.
5. Bekleme sonrası ependorf tüpleri 16.000 x g'de (14.000 rpm) 20 saniye santrifüj (Hettich Mikro 200R) edildi.
6. Santrifüj sonrası tüplerde 10-20 µl rezidü kalacak şekilde üzerindeki süpernatant pipetle alınarak atıldı.
7. Tüpler 10-15 saniye vortekslendi (Yellowline TTS2 Vortex Mixer).
8. Üzerine 300 µl nuclei lysis solüsyonu eklendi ve vizköz bir kıvam elde edilinceye kadar iyice pipetaj yapıldı.
9. 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi ve 10-20 saniye vortekslendi.
10. 16.000 x g'de (14.000 rpm) 3 dakika santrifüj edildi.
11. Örnek sayısı kadar ependorf tüpü hazırlandı ve üzerlerine oda ısısında bekleyen İsoopropanol solüsyonundan 300 µl eklendi. Daha sonra santrifüjden çıkan tüplerin süpernatantları bu tüplere aktarıldı.
12. Tüpler alt üst edilerek karıştırıldı ve beyaz renkte iplik benzeri DNA görüldü.
13. 16.000 x g'de (14.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.
14. Üzerindeki süpernatant, pellete dikkat edilerek atıldı ve tüplerin üzerine 300 µl %70 etanol eklenip hafifçe birkaç kez tüpler alt üst edildi.
15. 16.000 x g'de (14.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.
16. Santrifüj sonrası pellete dikkat edilerek pipetle etanol çekilerek atıldı.

17. Tüpler ağızları açık şekilde ters döndürölüp turnusol kâğıdı üzerine yerleştirildi ve 10-15 dakika kurumaya bırakıldı.
18. Kurumuř tüplere 100 µl DNA rehidratasyon solüsyonu eklendi ve +4°C'de bir gece bekletildi.

İZOLE EDİLEN DNA'NIN SAFLIK DEĞERLENDİRMESİ

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık tayini Thermo Scientific Nanodrop 2000c spektrofotometre cihazında yapıldı (Tablo 21, 22). Ölçümü yapılan DNA örnekleri çalışma yapılmıyaya kadar + 4°C'de buzdolabında saklandı.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

CHGA geni promotor T-1014C, T-988G, G-462A ve C-415T polimorfik bölgelerini içeren DNA dizisini amplifiye etmek (çoğaltmak) amacı ile uygun primerler tasarlandı.

Primer tasarımları internet üzerinden primer 3 Input (versiyon 0.4) programı kullanılarak yapıldı.

Çalışmamıza dahil olan 50 hasta ve 32 kontrol için 200 PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR'de kullanılan primerler ve özellikleri tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Primerlerin özellikleri

Hedef bölge	Primer dizisi	Baz uzunluğu	Tm	Ürün uzunluğu	Bağlanma derecesi
CHGA promotor bölge	1F CAGGTTCTCATTTAGGGACAGG	22	60.3	403	57
	1R CTTGCAACACCTACCCATTAGC	22	60.3		
	2F GTTACCTGTCAAGTGC GTTTCC	22	60.3	286	57
	2R CCCCGTGCTATTTTTCCTAAG	21	53.37		
	1F CAGGTTCTCATTTAGGGACAGG	22	60.3	851	57
	2R CCCCGTGCTATTTTTCCTAAG	21	53.37		

CHGA geninin çoğaltılacak bölümleri için toplam hacim 50 µl olacak şekilde PCR master miks (reaksiyon karışımı) hazırlandı. Tek bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği tablo 13’de, Hot start master miks içeriği ise tablo 14’de gösterilmiştir. Bu karışımdaki içerikler örnek sayısı ile çarpılarak PCR için gerekli miktar hazırlandı.

Tablo 13. PCR karışım oranları

Master miks karışımı	Miktarı
Hot start Taq polimeraz master miks	25µl
Forward primer	2µl
Reverse primer	2µl
dH2O (distile su)	11µl
DNA	10µl
Toplam	50µl

Tablo 14. Hot start master miks içeriği

Hot start Taq polimeraz master miks	
Hot start Taq DNA polimeraz	2.5 İU
MgCl₂	1.5mM
dNTP	200 µl

MgCl₂ (magnezyum klorür), dNTP (deoksiribonükleozid trifosfat)

Bazı örneklerde CHGA geni promotor hedef bölgesi tek primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (1F 2R, ürün 851 bp uzunluğunda), bazı örnekler ise 2 primer çifti kullanılarak her örnek için 2 ayrı PCR kuruldu. PCR master miks hazırlandıktan sonra örnekler Thermal Cycler cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki basamaklar izlendi.

Tablo 15. PCR reaksiyon basamakları

PCR basamakları	Isı	Süre	Döngü sayısı	
İlk denatürasyon	95 ⁰	15'	}	
Denatürasyon	95 ⁰	1'		}
Primerlerin bağlanması	57 ⁰	1'	}	
Uzama	72 ⁰	1'		
Sonuçlanma	72 ⁰	10'	1	

AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

10xTAE stok solüsyonundan 100 ml alıp üzerine 900 ml distile su eklenerek tampon çözeltisi hazırlandı. Toz halindeki agarozdan 2 gr tartıldı ve üzerine 10xTAE solüsyonundan 100 ml eklenip mikrodalga fırında maksimum sıcaklıkta agaroz eriyip saydam görünümlü jel kıvamı oluşuncaya kadar ısıtıldı. Daha sonra sıvı jel

kıvamdaki agaroz içerisine 2 µl etidyum bromür eklenip içerik elektroforez tankına boşaltılıp soğumaya bırakıldı. Agaroz jel katılınca elektroforez cihazına yerleştirildi ve üzerine işaretli bölgeye kadar 10xTAE solüsyonundan eklendi. İlk kuyucuğa 100 bç'lik DNA marker, diğer kuyucuklara PCR ürünleri yüklendi ve 100 volt'ta 25-30 dk elektroforetik olarak yürütüldü. Jel 'Vilbert Lourmat' UV görüntüleme cihazına yerleştirilip görüntüledi. PCR örneklerinin bant paternleri incelendi, uygun örnekler pürifikasyon için ayrıldı. Görüntüler, örnek numaraları, tarih ve PCR şartları belirtilerek kaydedildi.

PCR ÜRÜNLERİNİN PÜRİFİKASYONU (SAFLAŞTIRILMASI)

Görüntüleme sonrası uygun PCR ürünleri, Wizard SV Gel and PCR Clean-up System kiti (Promega) kullanılarak primer, nükleik asit, protein ve tuz kalıntılarından temizlendi. Pürifikasyon işlemi aşağıdaki sıraya göre yapıldı.

1. PCR ürünü üzerine ürün miktarı kadar (yaklaşık 40 µl) Membran binding solüsyonu eklendi.
2. Önceden hazırlanmış numaralı toplama tüplerine kolonlar yerleştirildi.
3. Karışım kolona aktarıldı ve 1 dakika oda ısısında bekletildi.
4. 16.000 xg (14.000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası toplama tüplerinde süzülen materyal atılıp kolonlar tekrar toplama tüplerine yerleştirildi.
6. Üzerine 700 µl Membrane Wash solüsyonu (önceden üzerine 375 µl %95'lik etanol eklenmiş) eklendi.
7. 16.000xg (14.000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi. Süzülen materyal atıldı
8. Tekrar üzerine 500 µl Membran Wash solüsyonu eklendi. 16.000xg (14.000 rpm)'de 5 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası toplama tüplerine süzülen materyal atıldı ve tüpler 16.000xg (14.000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası toplama tüpleri atılıp her örnek için önceden numaralandırılarak hazırlanmış 1,5 ml'lik ependorf tüplerine kolonlar yerleştirildi.

11. Üzerine 50 µl Nuclease Free Water solüsyonu eklenip 1 dakika oda ısısında bekletildi.

12. Örnekler 16.000xg (14.000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.

13. Santrifüj sonrası kolonlar atıldı ve ependorf tüplerinde kalan sıvı pürifiye PCR ürünü olarak ayrıldı ve +4°C'de saklandı.

Pürifiye PCR ürünleri etudyum bromür ile hazırlanmış %2'lik agaroz jelde elektroforetik olarak yürütüldü. Görüntüleme işlemi 'Vilbert Lourmat' UV görüntüleme cihazında yapıldı. Uygun örnekler sekans PCR için ayrıldı ve görüntüler kaydedildi.

SEKANS REAKSİYONUNUN HAZIRLANMASI

Sekans reaksiyonu için Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kiti (GenomeLab) kullanıldı. Sekans reaksiyonu için ürün başına hazırlanan karışım Tablo 16'da gösterilmiştir. Hedef dizi 851 bç uzunluğunda olan örneklerden hem reverse (geri) hem de forward (ileri) primerler ile iki ayrı sekans reaksiyonu kuruldu.

Tablo 16. Sekans PCR master miks içeriği

Sekans PCR master miks	
DTCS Quick start master miks	8 µl
Primer F/R	1 µl
PCR ürünü	5 µl
Enjeksiyonluk su	6 µl
Toplam	20 µl

Yukarıdaki tabloya göre örnek sayısı kadar master miks hazırlandı ve master miks 0,2 ml'lik PCR tüplerine 15 µl dağıtıldı. Hedef dizimiz GC'den zengin olduğu için ürünün kendi üzerine katlanmasını önlemek amacı ile Pürifiye PCR ürünleri Dry Block (Boeco Dry Block Thermostat TDB-100) cihazında 96°C'de 2 dakika denatüre edildi. Daha sonra master miks eklenmiş PCR tüpleri üzerine belirtilen miktarda pürifiye PCR ürünü eklenip karışım birkaç kez pipetaj yapıldı. PCR tüpleri Techne

TC-412 Thermal Cycler cihazına yerleştirildi ve tablo 17’de gösterilen basamaklar takip edildi.

Tablo 17. Sekans PCR şartları

Sekans PCR basamakları	Isı	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94 ⁰	2’	1
Denatürasyon	96 ⁰	20’’	} 30
Primerlerin bağlanması	50 ⁰	20’’	
Uzama	60 ⁰	4’	
Sonuçlanma	4 ⁰	4’	1

Sekans PCR tamamlanınca Tablo 18’de belirtilen miktarlarda taze stop solüsyonu hazırlandı ve aşağıda belirtilen aşamalar sırası ile yapıldı.

Tablo 18. Stop solüsyonu içeriği

Stop solüsyonu	
Na-Asetat	2 µl
Na-EDTA	2 µl
Glikojen	1 µl
Toplam	5 µl

1. Örnek sayısı kadar 1,5 ml’lik ependorf tüpleri hazırlandı.
2. Her tüpe taze hazırlanmış stop solüsyonundan 5 µl eklendi
3. Stop solüsyonu eklenmiş olan tüplere sekans PCR ürünleri ilave edildi ve yoğun pipetajla iyice karıştırıldı.
4. Tüplere -20°C’de muhafaza edilen %96’lık etil alkolden 70 µl eklendi ve iyice karışması için pipetaj yapıldı.
5. -20°C’de buzdolabında 35 dakika bekletildi.
6. 16.000xg (14.000 rpm)’de 20 dakika santrifüj edildi.

7. Santrifüj sonrası tüplerin dibindeki pellete dikkat edilerek pipetle süpernatant dikkatlice alınıp atıldı.
8. -20°C’de muhafaza edilen %70’lik etil alkolden 170 µl eklendi.
9. 16.000xg (14.000 rpm)’de 6 dakika santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası tüplerin dibindeki pellete dikkat edilerek pipetle süpernatant dikkatlice alınıp atıldı.
11. Tüpler kapakları açık şekilde 1 gece karanlıkta bekletildi.
12. Ertesi gün her tüpe 40 µl formamid solüsyonu (-20°C’de saklandı ve kullanılmadan önce ısısının oda ısısına gelmesi beklendi) eklendi.
13. Formamid eklenmiş örnekler vortekslenip yoğun pipetaj yapılarak sekans PCR ürününün formamid içerisinde çözünmesi sağlandı.
14. Dizi analizi cihazının programı (Beckman Coulter CEQ 8000 Genetics Analysis System) açıldı. Jel ve kapiller, protokole uygun şekilde cihaza yerleştirildi.
15. Örnekler tek tek sisteme kaydedildi ve LFRa programı seçildi.
16. Buffer plağına her kutucuğun 3/4’ü dolacak şekilde separate buffer solüsyonu eklendi. Bu işlemlerden sonra ependorf tüpünde bulunan ürünler dizi analizi için paletlere aktarıldı, paletler cihaza yerleştirildi ve analiz başladı.

SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sonuçlarımız Beckman Coulter CEQ 8000 Genetics Analiz sistemi kullanılarak analiz edildi. Hem reverse hem de forward primerleri ile iki ayrı sekans PCR kurulan örneklerin analizi için ‘‘Investigator programı’’ kullanıldı. Tek primerle kurulan sekans PCR örneklerin analizi ise ‘‘Sequence analysis’’ programı kullanılarak yapıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatiksel analiz SPSS 11,0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Çalışmadan elde edilen veriler tanımlayıcı istatiksel analiz ve *Ki-Kare testi* yöntemleri kullanılarak değerlendirildi ve kontrol grubu arasında yaygın olan homozigot genotip referans olarak seçildi. Her genotip ve allel için Odds oranları (OR) ve güvenlik aralığı (%95 CL) hesaplandı. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya 24'ü erkek, 26'sı kadın toplam 50 hasta ve 8'i erkek, 24'ü kadın toplam 32 kontrol grubu dahil edildi. Çalışma grubunun özellikleri tablo 19 ve 20'de görüldüğü gibidir.

Tablo 19. Hasta grubu özellikleri

Hasta no	Cinsiyet	Yaş	Tedavi öncesi KB (mm/Hg)	Tedavi Sonrası KB (mm/Hg)	Hipertansiyon süresi (yıl)
1	E	40	160/100	155/100	Yeni tanı
2	E	65	170/95	155/75	12
3	E	41	170/100	140/80	10
4	E	61	170/100	120/75	Yeni tanı
5	K	73	160/100	120/80	30
6	E	65	155/95	110/70	1
7	E	48	145/90	115/70	10
8	K	64	200/110	135/85	22
9	K	34	170/100	130/70	Yeni tanı
10	E	51	240/100	110/70	15
11	K	51	150/95	120/80	8
12	E	79	170/100	140/60	7
13	K	59	185/110	110/70	15
14	K	51	240/130	130/70	8
15	K	61	180/90	140/80	8
16	E	50	180/95	110/60	3
17	E	40	140/110	130/90	4
18	K	56	180/80	110/70	2
19	E	61	180/100	120/75	3
20	E	66	290/110	140/70	15
21	E	71	145/85	130/70	15
22	E	66	160/100	110/70	4
23	K	65	160/95	115/65	5
24	E	30	145/100	120/70	Yeni tanı
25	E	75	180/100	120/70	4

Tablo 19. “Devam”

Hasta no	Cinsiyet	Yaş	Tedavi öncesi KB mm/Hg	Tedavi sonrası KB mm/Hg	Hipertansiyon süresi (Yıl)
26	E	41	250/120	150/95	6
27	K	53	165/95	120/75	Yeni tanı
28	K	60	230/110	100/60	2
29	E	53	150/100	130/70	18
30	K	50	180/90	140/80	8
31	E	62	170/90	140/85	Yeni tanı
32	K	47	180/100	140/90	1.5
33	K	66	170/100	145/80	25
34	K	51	180/110	145/90	15
35	K	73	160/110	130/70	5
36	K	54	190/100	130/70	8
37	E	65	180/105	120/70	4
38	K	71	160/70	150/70	5
39	E	66	240/140	120/70	12
40	K	64	170/100	130/70	4
41	K	51	160/100	110/70	1.5
42	K	55	160/110	135/70	4
43	K	43	200/110	150/90	2
44	K	70	150/100	120/80	15
45	K	49	170/110	115/70	10
46	E	74	200/90	130/70	6
47	E	51	210/100	120/70	Yeni tanı
48	E	69	150/100	90/60	4
49	K	57	180/110	105/70	17
50	K	82	170/140	110/70	37

Tablo 20. Kontrol grubu özellikleri

Kontrol grubu	Cinsiyet	Yaş	Kan basıncı mm/Hg
1	E	42	120/80
2	K	26	110/65
3	E	27	120/75
4	K	41	100/80
5	K	40	115/70
6	K	27	110/75
7	K	30	100/80
8	K	26	115/80
9	K	36	100/80
10	K	22	100/80
11	K	31	115/75
12	K	37	100/65
13	K	34	110/75
14	E	29	100/75
15	K	44	100/80
16	E	38	115/75
17	K	45	120/70
18	K	43	120/80
19	E	31	100/75
20	E	30	120/65
21	K	46	100/65
22	K	35	120/80
23	K	26	120/70
24	K	32	120/80
25	K	26	110/70
26	K	26	100/70
27	K	29	110/70
28	K	33	100/80
29	K	29	100/70
30	E	28	100/70
31	E	26	110/70
32	K	28	100/70

Tablo 21. Hasta grubu spektrofotometri ölçümleri

Hasta no	Konsantrasyon ng/ μ l	A ⁰ 260/280	A ⁰ 260/230	Hasta no	Konsantrasyon ng/ μ l	A ⁰ 260/280	A ⁰ 260/230
H1	16.2	2.04	0.74	H26	17.8	1.89	1.28
H2	17.4	2.09	0.70	H27	15.6	1.93	1.49
H3	24.3	1.88	0.87	H28	22.0	2.11	1.16
H4	18.9	2.06	0.80	H29	21.1	1.82	1.22
H5	26.6	1.98	0.95	H30	21.0	1.85	1.19
H6	44.9	1.97	1.18	H31	23.9	1.82	1.22
H7	34.1	2.04	1.22	H32	26.4	2.00	2.20
H8	27.5	2.03	0.88	H33	30.1	1.97	1.85
H9	25.1	2.00	0.88	H34	27.4	1.87	1.99
H10	27.9	1.99	1.09	H35	75.0	2.00	0.55
H11	11.7	1.94	2.09	H36	30.2	1.98	1.30
H12	31.5	1.88	1.73	H37	13.3	2.01	1.43
H13	36.8	1.81	1.69	H38	14.3	1.99	1.23
H14	27.1	1.80	1.50	H39	16.4	2.02	1.46
H15	21.1	1.87	1.36	H40	22.4	2.00	1.91
H16	32.6	1.84	1.95	H41	32.6	1.84	1.95
H17	23.0	1.84	1.44	H42	23.0	1.84	1.44
H18	21.0	1.88	1.79	H43	20.1	1.83	2.08
H19	26.7	1.83	1.79	H44	30.2	1.98	1.96
H20	14.5	1.81	1.27	H45	16.8	2.08	2.44
H21	13.4	1.96	1.19	H46	16.1	1.95	2.08
H22	15.6	1.82	1.54	H47	29.4	1.86	2.16
H23	15.2	1.82	1.16	H48	53.5	1.85	2.24
H24	20.3	1.92	1.43	H49	28.4	1.82	1.76
H25	28.5	1.91	2.10	H50	60.9	1.85	1.95

Tablo 22. Kontrol grubu spektrofotometri ölçümleri

Kontrol no	Konsantrasyon ng/ μ l	A^{0}	A^{0}
		260/280	260/230
K1	17.3	1.87	1.72
K2	20.6	1.86	4.05
K3	19.9	2.00	1.29
K4	20.4	1.96	2.31
K5	18.9	1.95	1.80
K6	23.0	1.97	2.27
K7	13.5	1.85	2.27
K8	13.6	1.85	2.06
K9	10.8	1.81	1.77
K10	11.6	1.96	2.60
K11	18.0	1.86	1.62
K12	10.5	2.04	1.80
K13	16.7	1.82	1.80
K14	32.3	1.85	2.44
K15	34.9	1.83	3.95
K16	47.3	1.93	0.65
K17	25.8	1.99	0.59
K18	21.7	1.99	0.82
K19	20.4	1.84	3.95
K20	47.4	1.84	1.90
K21	25.9	1.98	1.16
K22	14.0	2.00	1.91
K23	21.0	1.94	1.74
K24	17.3	1.92	1.63
K25	17.4	1.98	1.34
K26	17.9	1.93	2.36
K27	34.8	1.91	2.19
K28	12.8	1.96	1.38
K29	15.2	1.83	1.70
K30	47.4	1.84	1.90
K31	35.6	1.85	1.75
K32	22.5	1.94	0.59

CHGA Geni Promotor Bölge Moleküler Analizi

PCR Sonuçları

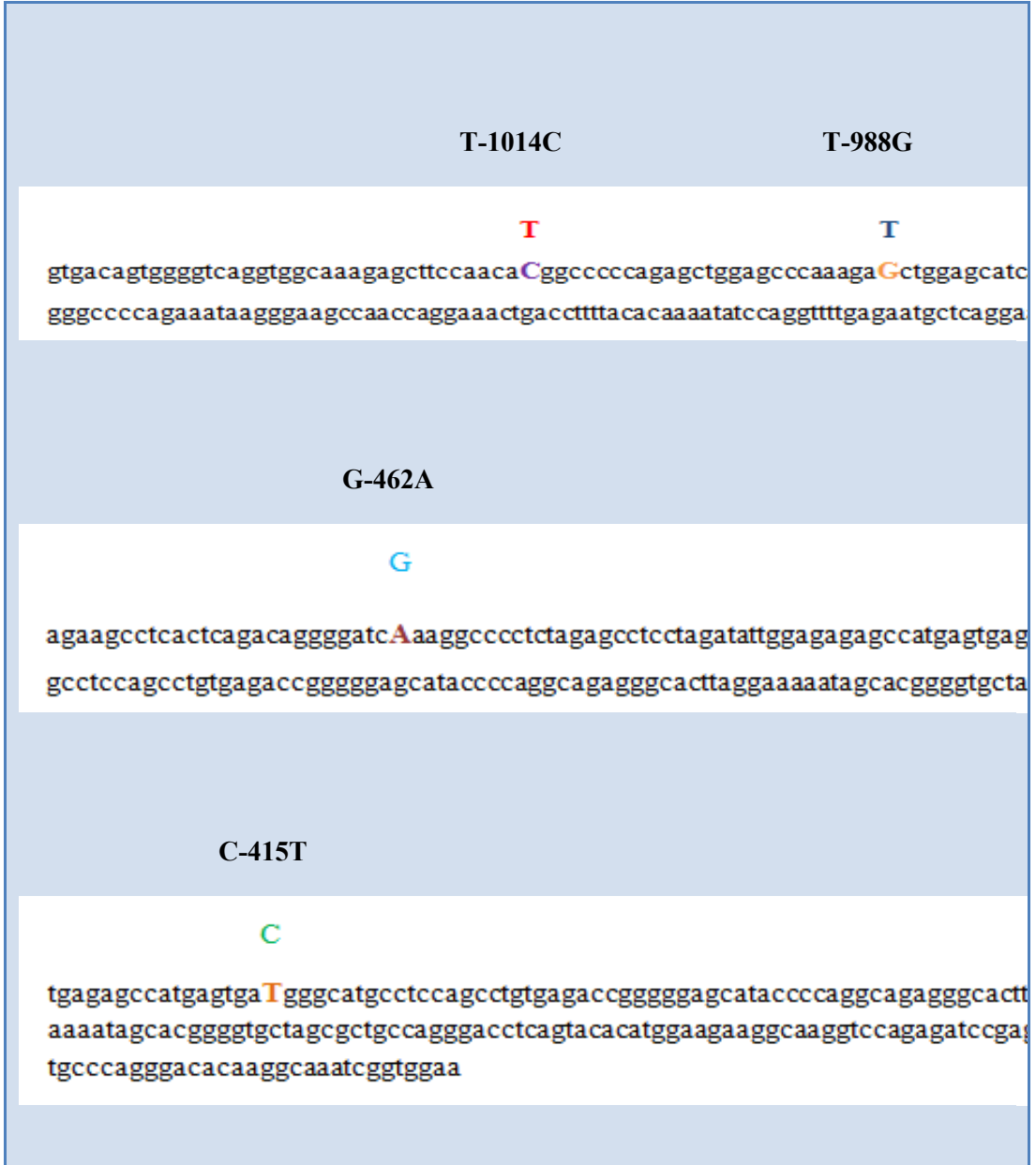
CHGA geni promotor T-1014C, T-988G, G-462A ve C-415T polimorfik bölgelerini içeren DNA dizisi tasarlanan primerler kullanılarak hem hasta hem de kontrol grubunda çoğaltıldı.

CHGA geni promotor bölgesine ait hedef dizi ve kullanılan primerler şekil 12’de gösterilmiştir.

```
acaaactgtgggtggttacttcttattcattgtctgtcttcaccatctaga
atgtagggcttctgtctgttctgtttaaagctgtaccctcaactgtgtac
tgttctaggatggttctaagcacatagtaggtgcttagcaaagcaaatatg
taaattcatgaatgtggccatttcagtctcctttgagctcccaccaggtt
ctcatttagggacaggcgtgagcacaggtgtgggaaaggaagtattagta
gaaaacagcagccgcagatggagaggggtgggcaggaaggaggggctctg
gacgatgccagccaatgacaaaccgtcaccagatcccaggttccctgtg
acagtggggtcaggtggcaaagagcttccaacacggccccagagctgga
gcccaaagagctggagcatcagggggccccagaaataaggggaagccaacca
ggaaactgaccttttacacaaaatatccaggttttgagaatgctcaggaa
gaggtgagagctgttctcaaattcagatgggctgccagtggaagaaggt
gatgctaaggggttgactagggctaatgggtagggtgttgcaaggactcc
tattttggcggatgtaataagaactggccccactcctccctctacctaa
caagaggtgtccaacagtggttaagcttctggtgaaagtgagccctg
gttcccgtgtgtatgcagagcccaggattcactcaccatggcttgaacc
ttaatggatacattcatcagttacctgtcaagtgcgtttcctctgtgcc
agattgtgtggcgctcagcactgtgaaagtaatgatgactaaacattatt
caaataaatacacattcaacaacaaagtgtgaaggcacaactagcttg
ccagagagagagaagcctcactcagacaggggatcaaaggcccctctaga
gcctcctagatattggagagagccatgagtgatgggcatgcctccagcct
gtgagaccgggggagcataccccaggcagagggcacttaggaaaaatagc
acggggtgctagcgctgccagggacctcagtacacatggaagaaggcaag
gtccagagatccgagtgacttgcccagggacacaaggcaaatcgggtggaa
tcgtcgaggggtggaggatcagccacagcccccgctcccacgccacct
```

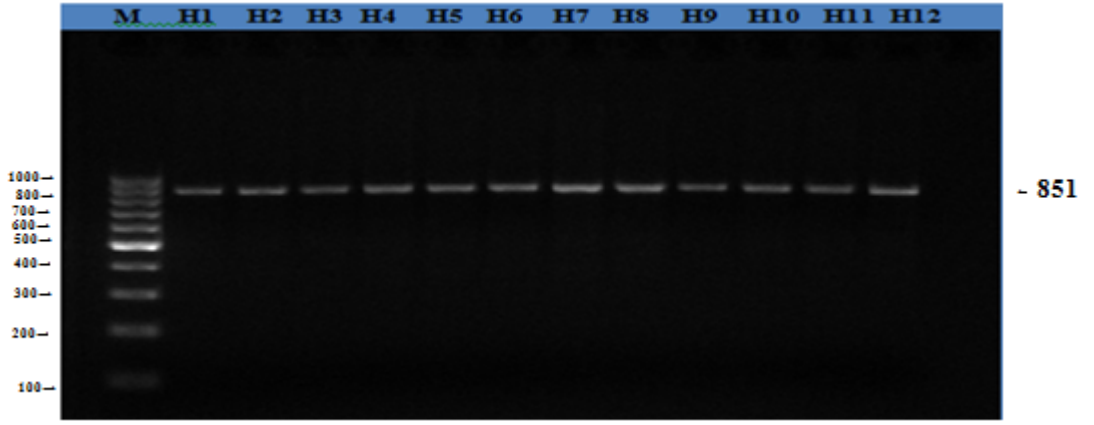
Şekil 12. CHGA promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılan hedef dizisi ve kullanılan primerler.

CHGA geni promotor bölgesindeki çalışmaya dahil edilen polimorfik bölgeler şekil 13’de gösterilmiştir.

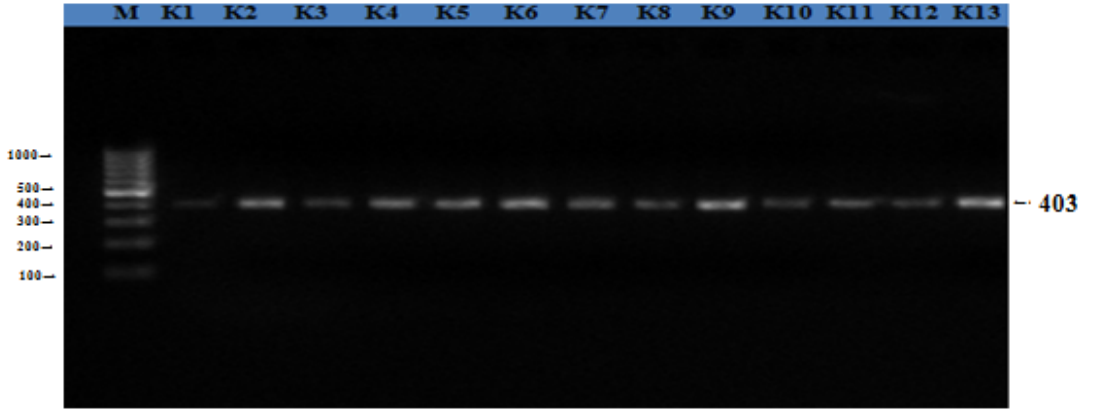


Şekil 13. CHGA geni promotor bölgesindeki polimorfizmler (forward dizi).

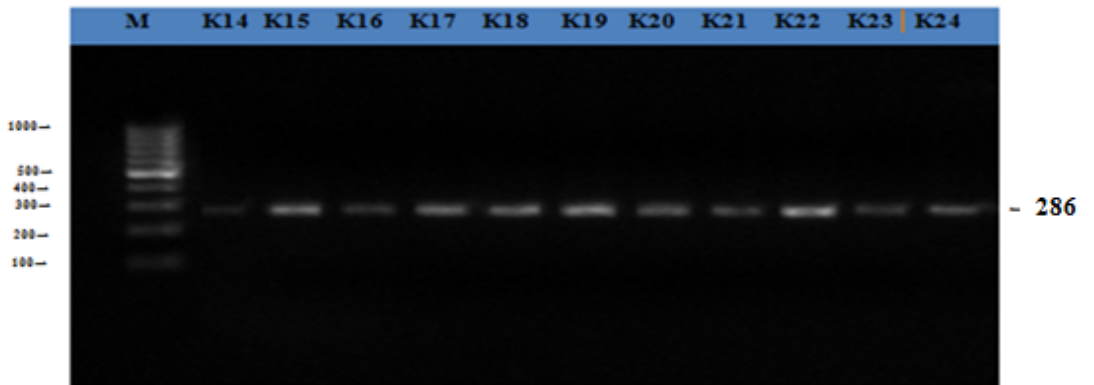
CHGA promotor bölgesi T-1014C, T-988G, G-462A ve T-415C polimorfik bölgelerinin hasta ve kontrol grubuna ait örnek PCR ve elektroferogram görüntüleri şekil 14-20’de gösterilmiştir.



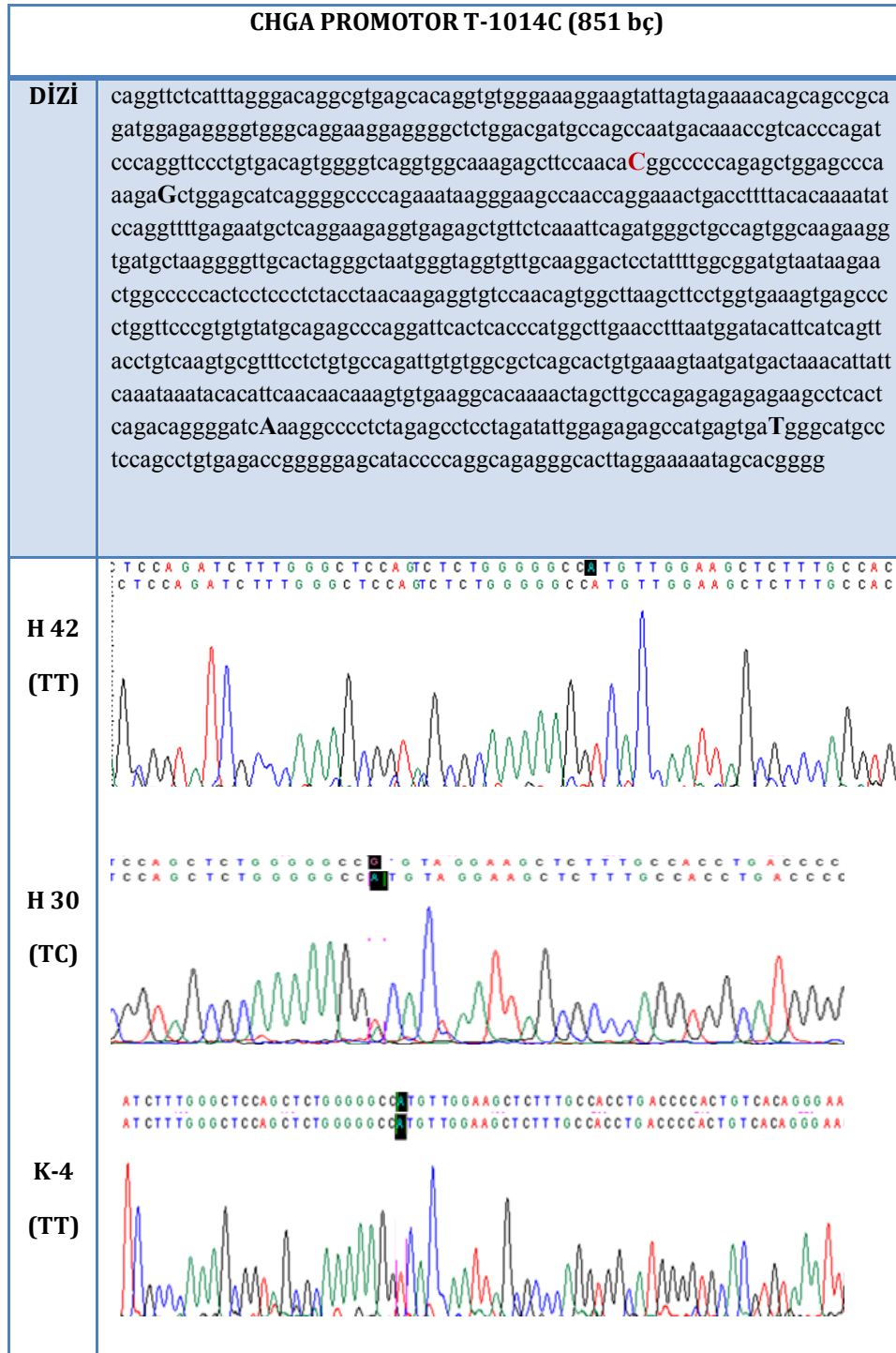
Şekil 14. Hasta grubuna ait CHGA promotor bölge PCR ürünü (1F-2R, 851 bç) jel görüntüsü.



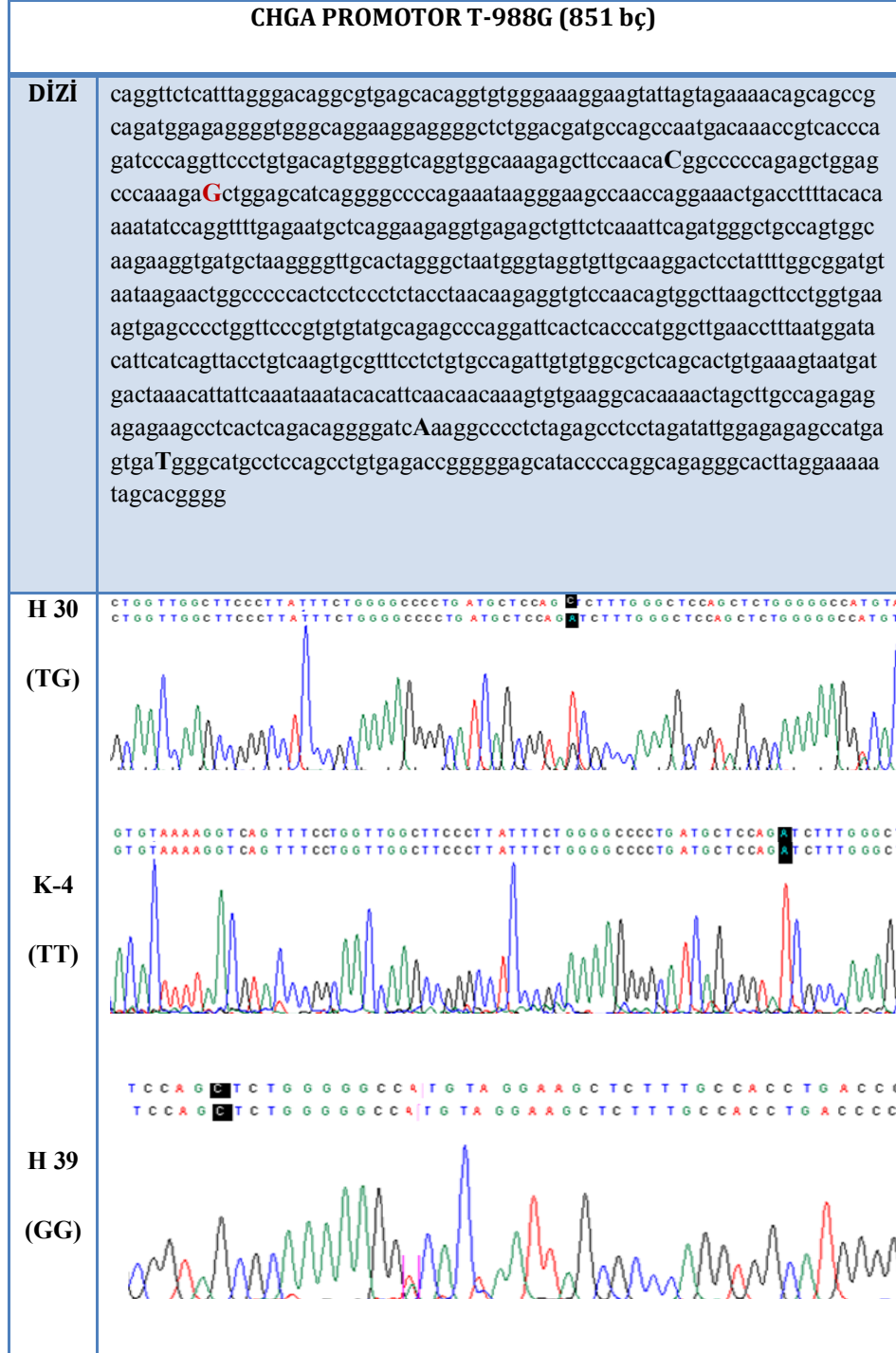
Şekil 15. Kontrol grubuna ait CHGA promotor bölge PCR ürünü (1F-1R, 403 bç) jel görüntüsü.



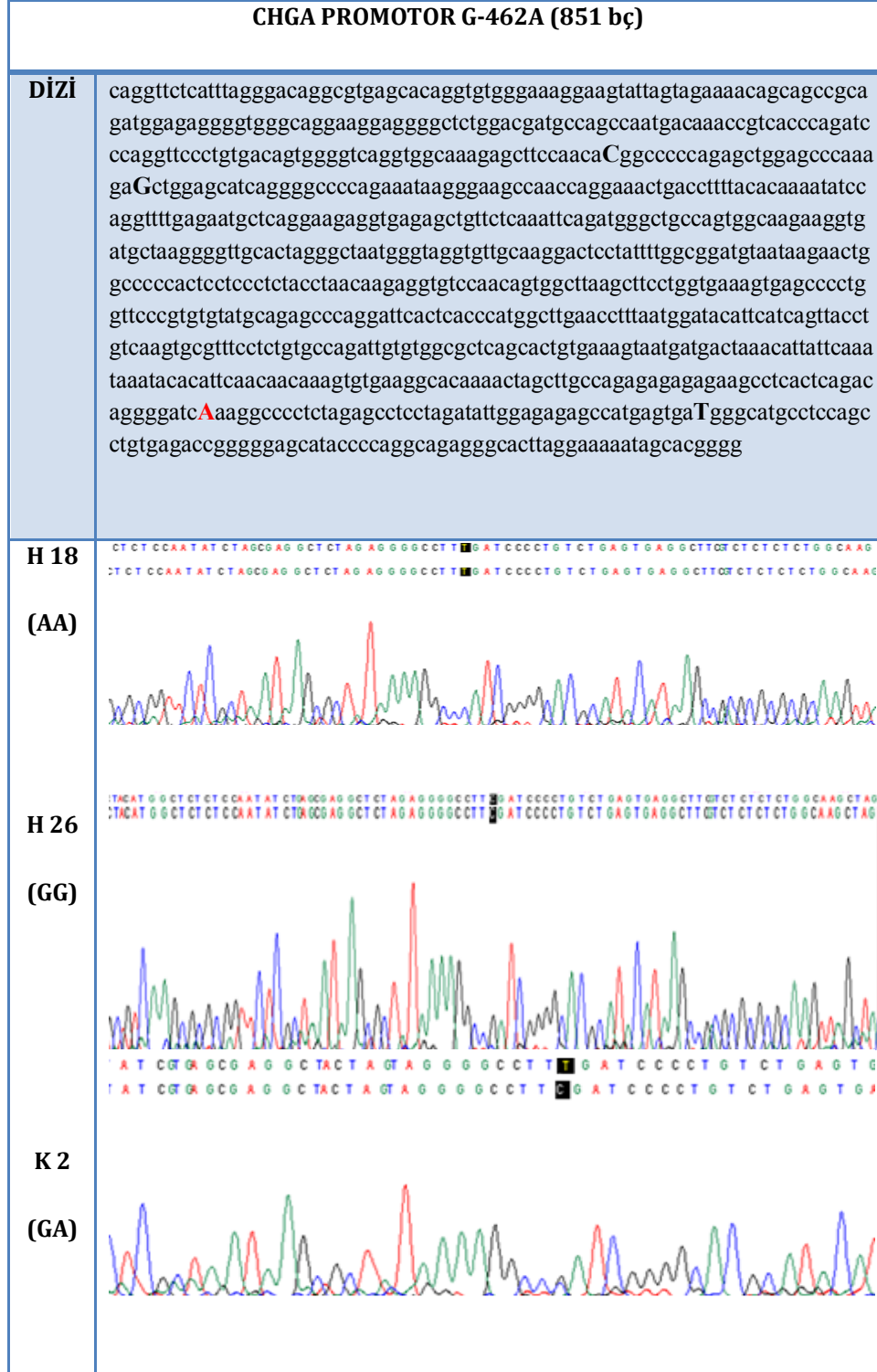
Şekil 16. Kontrol grubuna ait CHGA promotor bölge PCR ürünü (2F-2R, 286 bç).



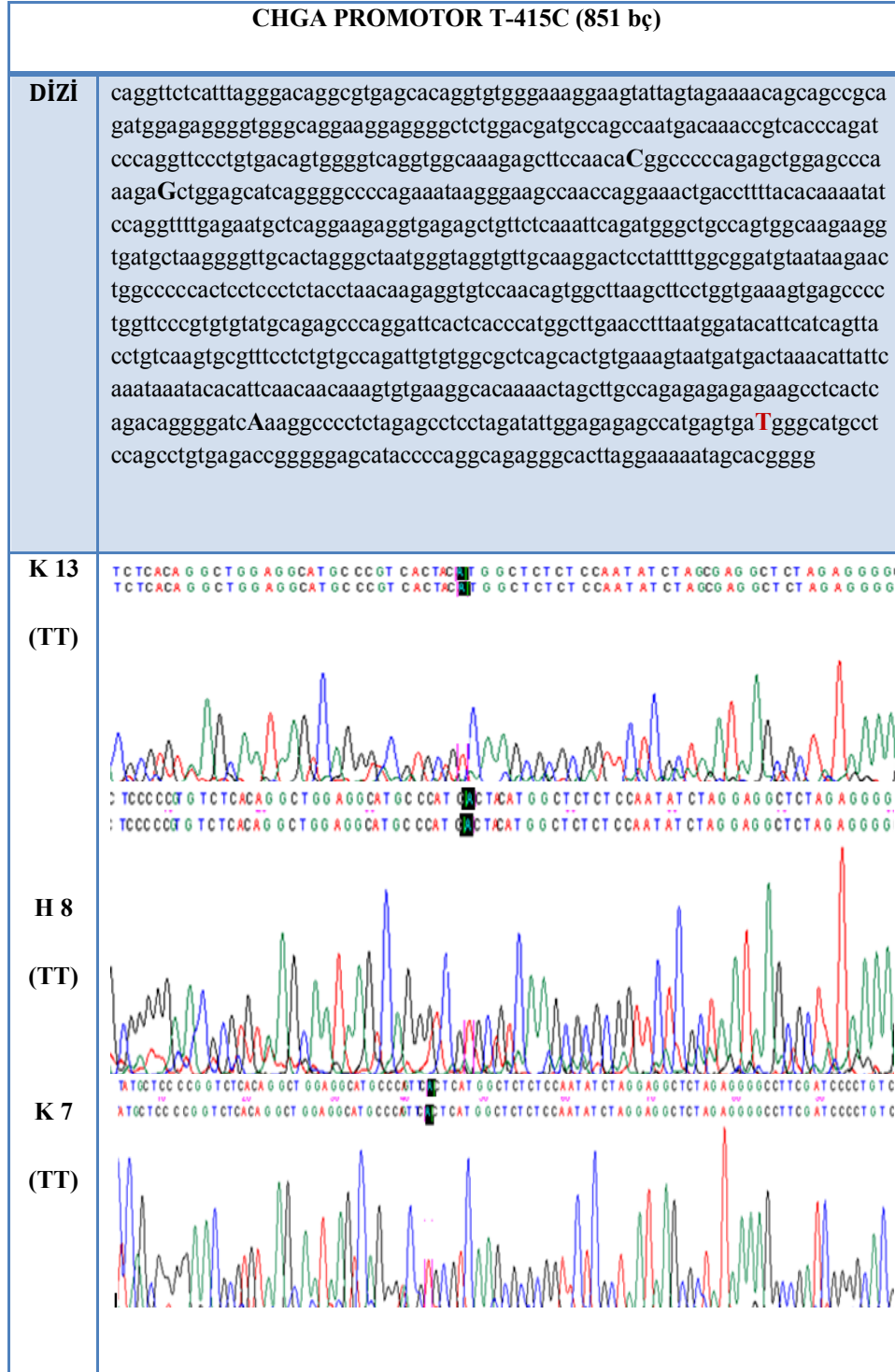
Şekil 17. CHGA promotor T-1014C bölgesi elektroferogram görüntüsü (Reverse dizi).



Şekil 18. CHGA promotor bölge T-988G bölgesi elektroferogram görüntüleri (Reverse dizi).



Şekil 19. CHGA promotor bölge G-462A bölgesi elektroferogram görüntüleri (reverse dizi).



Şekil 20. CHGA promotor bölge T-415C bölgesi elektroferogram görüntüleri (Reverse dizi).

Sekans PCR sonuçları Beckman Coulter CEQ 8000 Genetics Analiz sistemi kullanılarak analiz edildi. Hem reverse hem de forward primerleri ile iki ayrı sekans PCR kurulan örneklerin analizi için ‘‘Investigator programı’’, tek primerle kurulan sekans PCR örneklerin ise ‘‘Sequenece analysis programı’’ kullanılarak CHGA promotor T-1014, T-988G, G-462A ve T415C polimorfik bölgeleri hem kontrol hem de hasta grubunda analiz edildi. Sonuçlar tablo 23 ve 24’de gösterilmiştir.

Tablo 23. Hasta grubunda tespit edilen genotipler

Hasta no	DNA kod	-1014	-988	-462	-415	Hasta no	DNA kod	-1014	-988	-462	-415
1	EH1	TC	TG	GA	TT	26	EH26	TT	GG	GG	TT
2	EH2	TC	TG	GA	TT	27	EH27	TT	TT	GG	TT
3	EH3	TC	TG	GA	TT	28	EH28	CC	TT	GG	TT
4	EH4	TT	GG	GA	TT	29	EH29	CC	TT	GG	TT
5	EH5	TT	TT	GA	TT	30	EH30	TC	TG	GG	TT
6	EH-6	TT	TT	GA	TT	31	EH31	TT	TT	GG	TT
7	EH7	TT	TT	GG	TT	32	EH32	CC	TT	GG	TT
8	EH8	TC	TG	GA	TT	33	EH33	TC	TG	GG	TT
9	EH9	TT	TT	GG	TT	34	EH34	TT	TG	GG	TT
10	EH10	TT	TT	GG	TT	35	EH35	TC	TG	AA	TT
11	EH11	TT	TT	GG	TT	36	EH36	TT	TT	GG	TT
12	EH12	TC	TG	GA	TT	37	EH37	TC	TG	GA	TT
13	EH13	TT	TG	GA	TT	38	EH38	TT	TT	GG	TT
14	EH14	TT	GG	GG	TT	39	EH39	TC	TG	AA	TT
15	EH15	TT	GG	GG	TT	40	EH40	CC	GG	GG	TT
16	EH16	TT	TT	GG	TT	41	EH41	CC	TT	GG	TT
17	EH17	TC	TG	GA	TT	42	EH42	TT	TT	GG	TT
18	EH18	CC	GG	AA	TT	43	EH43	TT	TT	GG	TT
19	EH19	TT	TT	GG	TT	44	EH44	CC	TT	GA	TT
20	EH20	TT	TT	GG	TT	45	EH45	CC	TT	GG	TT
21	EH21	TT	TT	GG	TT	46	EH46	TC	TG	GG	TT
22	EH22	TT	TT	GG	TT	47	EH47	TT	TG	GG	TT
23	EH23	TT	TT	GG	TT	48	EH48	TT	TT	GG	TT
24	EH24	TT	TT	GG	TT	49	EH49	TT	TG	GG	TT
25	EH25	TT	TT	GA	TT	50	EH50	TT	TT	GG	TT

Tablo 24. Kontrol grubunda tespit edilen genotipler

Kontrol grubu	DNA kod	-1014	-988	-462	-415
1	EK1	TT	TG	GA	TT
2	EK2	TC	TG	GA	TT
3	EK3	TT	TT	GG	TT
4	EK4	TT	TT	GA	TT
5	EK5	TT	TT	GA	TT
6	EK6	TT	TT	GA	TT
7	EK7	TT	TT	GG	TT
8	EK8	TT	TT	GG	TT
9	EK9	TT	TT	GG	TT
10	EK10	TC	TG	GA	TT
11	EK11	TC	TG	AA	TT
12	EK12	TC	TT	GA	TT
13	EK13	TT	TT	GG	TT
14	EK14	TT	TT	GG	TT
15	EK15	TC	TT	AA	TT
16	EK16	TT	TT	GG	TT
17	EK17	TT	TT	GG	TT
18	EK18	TT	TT	GG	TT
19	EK19	TT	TT	GA	TT
20	EK20	TC	TT	GA	TT
21	EK21	TT	TT	GG	TT
22	EK22	TT	TT	GG	TT
23	EK23	TT	TT	GG	TT
24	EK24	TT	TT	AA	TT
25	EK25	TT	TT	GG	TT
26	EK26	TT	TT	GG	TT
27	EK27	TT	TT	GA	TT
28	EK28	TT	TT	GG	TT
29	EK29	TT	TT	GG	TT
30	EK30	TT	TT	GG	TT
31	EK31	TT	TT	AA	TT
32	EK32	TT	TT	GG	TT

Hasta ve kontrol grubunda cinsiyete göre CHGA promotor T-1014C bölgesinde belirlenen TT, TC ve CC genotiplerinin sıklığı karşılaştırıldığında, her iki cinste istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 25). Hasta grubunda kadınlarda CC genotip dağılımı (%14) erkeklere (%3,1) göre daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 25).

Tablo 25. CHGA promotor -1014 polimorfik bölgesi genotiplerinin cinsiyete göre dağılımı

CHGA promotor bölge (Hasta ve kontrol grubu)	T-1014C			Total	P
	CC	T/C	TT		
Erkek	1 %3,1	9 %28,1	22 %68,8	32 %100,0	0.194
Kadın	7 %14,0	9 %18,0	34 %68,0	50 %100,0	
Total	8 %9,7	18 %22,0	56 %68,3	82 %100,0	

T-1014C polimorfik bölgesinde hasta ve kontrol grubunda belirlenen genotiplerin frekansları tablo 26’da gösterilmiştir.

Tablo 26. CHGA promotor T-1014C polimorfik bölgesi genotip frekansları

CHGA promotor T-1014C	Hasta ve kontrol grubu genotip frekans	Hasta ve kontrol grubu genotip %
CC	8	9.7
TC	18	22
TT	56	68.3
Total	82	100.0

Hasta ve kontrol grubunda cinsiyete göre CHGA promotor T-988G bölgesinde belirlenen TT, TG ve GG genotiplerinin sıklığı karşılaştırıldığında, her iki cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 27).

Tablo 27. CHGA promotor -988 polimorfik bölgesi genotiplerinin cinsiyete göre dağılımı

CHGA promotor bölge (Hasta ve kontrol grubu)	T-988G			Total	P
	GG	T/G	TT		
Erkek	2 %6,3	10 %31,3	20 %62,5	32 %100,0	0.509
Kadın	4 %8,0	10 %20,0	36 %72,0	50 %100,0	
Total	6 %7,3	20 %24,4	56 %68,3	82 %100,0	

T-988G polimorfik bölgesinde hasta ve kontrol grubunda belirlenen genotiplerin frekansları tablo 28’de gösterilmiştir.

Tablo 28. CHGA promotor T-988G polimorfik bölgesi genotip frekansları

CHGA promotor T-988G	Hasta ve kontrol grubu genotip frekans	Hasta ve kontrol grubu genotip %
GG	6	7.3
TG	20	24.4
TT	56	68.3
Total	82	100.0

Hasta ve kontrol grubunda cinsiyete göre CHGA promotor G-462A bölgesinde belirlenen GG, GA ve AA genotiplerinin sıklığı karşılaştırıldığında, her iki cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 29).

Tablo 29. CHGA promotor G-462A polimorfik bölgesi genotiplerinin cinsiyete göre dağılımı

CHGA promotor bölge (Hasta ve kontrol grubu)	G-462A			Total	P
	AA	G/A	GG		
Erkek	1 %3,1	12 %37,5	19 %59,4	32 %100,0	0.165
Kadın	6 %12,0	11 %22,0	33 %66,0	50 %100,0	
Total	7 %8,5	23 %28,0	52 %63,4	82 %100,0	

G-462A polimorfik bölgesinde hasta ve kontrol grubunda belirlenen genotiplerin frekansları tablo 30’da gösterilmiştir.

Tablo 30. CHGA promotor G-462A polimorfik bölgesi genotip frekansları

CHGA promotor G-462A	Hasta ve kontrol grubu genotip frekansı	Hasta ve kontrol grubu genotip %
AA	7	8.5
GA	23	28.0
GG	52	63.4
Total	82	100.0

Hasta ve kontrol grubunda çalışmaya dahil edilen tüm bireylerde CHGA promotor T-415C polimorfik bölgesinde TT genotipi belirlendi. Genotiplerin cinsiyete göre dağılımları ve allel frekansları tablo 31 ve 32’de gösterilmiştir.

Tablo 31. CHGA promotor T-415C polimorfik bölgesi genotiplerinin cinsiyete göre dağılımı

CHGA promotor bölge (Hasta ve kontrol grubu)		T-415C			Total	P
		TT	TC	CC		
Cinsiyet	Erkek	32 %100,0	-	-	32 %100,0	a
	Kadın	50 %100,0	-	-	50 %100,0	
Total		82 %100,0	-	-	82 %100,0	

a: İstatiksel olarak hesaplanamadı.

Tablo 32. CHGA promotor T-415C polimorfik bölgesi genotip frekansları

CHGA promotor T-415C	Hasta ve kontrol grubu genotip frekansı	Hasta ve kontrol grubu genotip %
TT	82	% 100
TC	-	
CC	-	
Total	82	100.0

Hasta ve kontrol grubunda CHGA promotor T-1014C, T-988G, G-462A ve T-415C polimorfik bölgenin analizinde elde edilen genotip ve allel sıklıklarının karşılaştırılmasında *Ki-Kare* yöntemi kullanıldı. Kontrol grubunda sık görülen allel ve genotip referans olarak alındı (Tablo 33).

Tablo 33. Allel ve genotip sıklıklarının gruplar arasında karşılaştırılması

Lokus	Genotip	Hasta n: 50 (%)	Kontrol n: 32 (%)	P value	OR (%95 CL)	P value
-1014 T>C promotor	T>C (rs9658630)					
	TT	30 (%60.0)	26 (%81.3)	<u>0.038</u>	1	
	TC	12 (%24.0)	6 (%18.8)		1.74 (0.57- 5.27)	0.329
	CC	8 (%16.0)	0 (%0.0)		6.93 (0.81- 59.2)	0.069
	TC+TT	42 (%84.0)	32 (%97.0)	0.080	0.16 (0.02- 1.38)	0.080
	CC+TC	20 (%40.0)	6 (%18.8)	<u>0.044</u>	<u>2.89</u> (1.01- 8.28)	<u>0.044</u>
	Alleller					
	T	72 (%72.0)	58 (%90.6)	<u>0.008</u>	1	
	C	28 (%28)	6 (%9.4)		<u>3.76</u> (1.46- 9.69)	<u>0.008</u>
	-988 T>G promotor	T>G (rs9658632)				
TT		28 (%56.0)	28 (%87.5)	<u>0.008</u>	1	
TG		16 (32.0)	4 (%12.5)		4.0 (1.19- 13.47)	<u>0.039</u>
GG		6 (%12)	0 (%0.0)		6.0 (0.68- 57.1)	0.112
TG+TT		44 (%88.0)	32 (%97.0)	0.235	0.23 (0.03- 2.00)	0.235
GG+TG		22 (%44.0)	4 (%12.5)	<u>0.003</u>	5.50 (1.67- 18.02)	<u>0.003</u>
Alleller						
T		72 (%72.0)	60 (%93.8)	<u>0.001</u>	1	
G		28 (%28.0)	4 (%6.2)		<u>5.83</u> (1.94- 17.56)	<u>0.001</u>

Tablo 33. “Devam”

-462 G>A promotor	G>A (rs9658634)					
	GG	34 (%68.0)	18 (%56.3)	0.453	1	0.636
	GA	13 (%26.0)	10 (%31.3)			
	AA	3 (%6.0)	4 (%12.5)			
	GA+GG	47 (%94.0)	28 (%87.5)	0.422	2.24 (0.47- 10.7)	0.422
	AA+GA	16 (%32.0)	14 (%43.7)	0.399	0.61 (0.24- 1.51)	0.399
	Alleller					
	G	81 (%81)	46 (%71.9)	0.241	1	0.241
	A	19 (%19.0)	18 (%28.1)			
-415 T>C promotor	T>C (rs9658635)					
	TT	50 (%100)	32 (%100)			
	TC	-	-			
	CC	-	-			
	TC+TT	-	-			
	CC+TC	-	-			
	Alleller					
	T	100 (%100)	64 (%100)			
C	-	-				

CHGA geni promotor T-1014C polimorfik bölge allellerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklıkları karşılaştırıldığında, T alleli hasta grubunda 72 (%72), kontrol grubunda 58 (%90.6) olarak saptanırken, C alleli hasta grubunda 28 (%28), kontrol grubunda 6 (%9.4) olarak saptandı. Kontrol grubunda sık görülen allel olan T alleli referans alındığında her iki grup arasında C alleli taşıma yönünden farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0.008$). C alleli taşıyan bireylerin T alleli referans alındığında esansiyel hipertansiyona kalıtsal olarak yatkınlık riski taşıyabileceği belirlendi ($OR= 3.76$). TC ve TT genotipi sıklığı hasta grubunda toplam 42 (%84), kontrol grubunda toplam 32 (%97) olarak saptandı. Kontrol grubunda sık görülen genotip olan TT genotipi referans alındığında her iki grup arasında farklılık istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0.080$). TC ve CC genotipi

sıklığı hasta grubunda toplam 20 (%40), kontrol grubunda toplam 6 (%18.8) olarak saptandı. TT genotipi referans alındığında her iki grup arasında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0.044$). TT genotipi referans olarak alındığında, TC ve CC genotipine sahip olan bireylerin esansiyel hipertansiyona kalıtsal olarak yatkınlık riskine sahip olabileceği belirlendi ($OR=2.89$).

CHGA geni promotor T-988G polimorfik bölge allellerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklıkları karşılaştırıldığında, T alleli hasta grubunda toplam 72 (%72), kontrol grubunda toplam 60 (%93.8) saptanırken, G alleli hasta grubunda toplam 28 (%28), kontrol grubunda toplam 4 (%6.2) olarak saptandı. Kontrol grubunda sık görülen allel olan T alleli referans alındığında her iki grup arasında G alleli taşıma yönünden farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.001$). G alleli taşıyan bireyler, T alleli referans alındığında esansiyel hipertansiyona kalıtsal olarak yatkınlık riskine sahip olabilecekleri belirlendi ($OR=5.83$). TG ve TT genotipi sıklığı hasta grubunda toplam 44 (%88) kontrol grubunda toplam 32 (%97) olarak saptandı. Kontrol grubunda sık görülen genotip olan TT genotipi referans alındığında her iki grup arasında farklılık istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0.235$). TG ve GG genotipi sıklığı hasta grubunda toplam 22 (%44), kontrol grubunda toplam 4 (%12.5) olarak saptandı. TT genotipi referans alındığında her iki grup arasında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.003$). TT genotipi referans alındığında TG ve GG genotipine sahip olan bireylerin esansiyel hipertansiyona kalıtsal olarak yatkınlık riskine sahip olabilecekleri belirlendi ($OR=5.50$).

CHGA geni promotor G-462A polimorfik bölge allellerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklıkları karşılaştırıldığında, G alleli hasta grubunda toplam 81 (%81), kontrol grubunda toplam 46 (%71.9) olarak saptanırken, A alleli hasta grubunda toplam 19 (%19), kontrol grubunda toplam 18 (%28.1) olarak bulundu. Kontrol grubunda sık görülen allel olan G alleli referans alındığında her iki grup arasında A alleli taşıma yönünden farklılık istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0.241$). GA ve GG genotipi sıklığı hasta grubunda toplam 47 (%94), kontrol grubunda toplam 28 (%87.5) olarak saptandı. Kontrol grubunda sık görülen genotip olan GG genotipi referans alındığında her iki grup arasında farklılık istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0.422$). GA ve AA genotipi sıklığı hasta grubunda toplam 16 (%32), kontrol grubunda toplam 14 (%43.7) bulundu. GG genotipi referans olarak

alındığında her iki grup arasında farklılık istatistiksel olarak anlamsız bulundu (p=0.399).

CHGA geni promotor T-415C polimorfik bölge allellerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklıkları karşılaştırıldığında, T alleli hasta grubunda toplam 100 (%100), kontrol grubunda 64 (%100) olarak saptandı . C alleli hem hasta hem de kontrol grubunda saptanmadı. Her iki grupta allel olarak T alleli, genotip olarak TT genotipi saptandığından gruplar arası karşılaştırma istatistiksel olarak yapılamadı.

CHGA geni promotor T-1014C, T-988G, G-462A ve T-414C polimorfik bölgelerinin analizi sonrası hasta grubunda en sık TTGT 56 (%56), ikinci sıklıkta CGAT 12 (%12) haplotipleri saptanırken, kontrol grubunda en sık TTGT 46 (%71.87), ikinci sıklıkta TTAT 11 (%17.18) haplotipleri saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubunda saptanan haplotiplerin toplu listesi tablo 34’de gösterilmiştir.

Tablo 34. Hasta ve kontrol grubu haplotipleri

Haplotipler	Hasta grubu n (%)	Kontrol grubu n (%)
TGGT	10 (%10)	-
TTGT	56 (%56)	46 (% 71.87)
CTGT	11 (%11)	-
CGGT	4 (%4)	-
TTAT	4 (%4)	11 (% 17.18)
CGAT	12 (%12)	3 (% 4.68)
TGAT	2 (%2)	1 (% 1.56)
CTAT	1 (%1)	3 (% 4.68)

TARTIŞMA

Esansiyel hipertansiyon, nedeni saptanamayan ya da gösterilebilir hiçbir organ hastalığının başlatmadığı kan basıncı yüksekliği olarak tanımlanır ve tüm hipertansiyon olgularının % 92- 95'ini oluşturur (5). Kan basıncını belirleyen ve etkileyen başta genetik nedenler olmak üzere birden fazla etiyolojik ve patofizyolojik faktör vardır. Esansiyel hipertansiyon genetik ve çevresel etkilerle meydana gelen, genetik olarak heterojen özelliğe sahip yaygın kompleks hastalıklar grubundandır. Yaygın kompleks hastalıklar birden fazla genin etkileşimi ve çevresel faktörlerin kümülatif etkileri sonucu oluşurlar (55). Bu hastalık grubunda gen-gen ve gen-çevre etkileşimi hastalığın başlangıcını ve şiddetini belirler (3,24,56).

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) yaygın kompleks hastalıklarla ilişkilidir. SNP'ler tek başına hastalık oluşturmazlar ancak hastalığa yatkınlık oluşturarak hastalıklara yakalanma riskini arttırabilecekleri birçok çalışmada gösterilmiştir (55,90). Esansiyel hipertansiyonla ilişkili çok sayıda gen polimorfizmleri, metabolik yollar ve sistemler tanımlanmıştır. Ancak bu genler, metabolik yollar ve sistemler esansiyel hipertansiyon patogenezini anlamamızda bizlere kısmi bir bilgi vermiştir. Halen esansiyel hipertansiyon patogenezinde kaç gen rol almaktadır ve bu genlerin birbiri ile etkileşimi nasıldır tam olarak bilinmemektedir.

Son zamanlarda üzerinde çalışılan duyarlılık genlerinden biri de Chromogranin A (CHGA) genidir. CHGA geni başta adrenal medulla ve postganglionik sempatik aksonlardan eksprese olan, intrasellüler ve ekstrasellüler mekanizmalar ile katekolaminlerin depolanmasını ve salınımını düzenleyen bir genidir. Bu genin ürünü olan Chromogranin-A proteininin, sekretuar granüllerin biyosentezinde ve nöroendokrin hücrelerin hormon salgılamasında fizyolojik görevleri vardır (6,12).

CHGA geni ile esansiyel hipertansiyon arasındaki fenotipik ilişkiye vurgu yapan ve CHGA geninin promotor bölgesine, 5'UTR'ye, 3'UTR'ye, kodlayan bölgeye ve kodlayan bölgelere bitişik intronik bölgelere ait polimorfizmlerden bazılarının kan basıncı ve otonom aktivitesinde değişikliklere neden olduğunu gösteren farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalar vardır (13-15, 84-85).

Çalışmamızda kardiyoloji polikliniğine başvurmuş ve esansiyel hipertansiyon tanısı almış 50 hasta ve sağlıklı olarak kabul edilen 32 kişi kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Tüm katılımcıların CHGA geni promotor T-1014C, T-988G, G-462A ve T-415C bölgelerindeki polimorfizmleri dizi analizi ile incelenerek, bu polimorfizmler ile esansiyel hipertansiyon arasında ilişki olup olmadığı araştırıldı. Ancak literatürde esansiyel hipertansiyonlu olgularda CHGA geni promotor bölge ile ilgili çok az sayıda çalışma olduğundan ve çalışma grupları bizim çalışma grubumuzla uygunluk göstermediğinden, tartışma az sayıdaki çalışma ile kısmen yapılabilmektedir.

Çalışmamızda CHGA geni promotor T-1014C, T-988G, G-462A ve T-415C polimorfik bölgelerinin incelenmesinde çalışma grubunda en sık TTGT haplotipi (%62.1), ikinci sıklıkta CGAT (%9.1) ve TTAT (%9.1) haplotipleri saptanmıştır. Wen (13) ve arkadaşlarının Asyalı, hispanik, beyaz ve siyah ırkı kapsayan farklı etnik gruplardan oluşan 180 kişi ile yaptıkları bir çalışmada en yaygın haplotip olarak TTGT haplotipi saptanmıştır. Wen (13) ve arkadaşlarının sonuçları bu yönüyle bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Chen (14) ve arkadaşlarının çoğunluğunu normotansiflerin oluşturduğu Avrupalı ikiz çiftlerinde yaptıkları CHGA geni promotor T-1014C, T-988G, G-462A, T-415C ve A-89C polimorfik bölgelerini de içeren bir çalışmada en sık TTGTC haplotipi, ikinci sıklıkta CGATA haplotipi tespit edilmiştir. Bizim sonuçlarımız Chen (14) ve arkadaşlarının sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda haplotiplerin hasta ve kontrol grubuna göre dağılımlarını yaptığımızda, hasta grubunda en sık TTGT haplotipi (%56), ikinci sıklıkta CGAT haplotipi (%12), kontrol grubunda ise en sık TTGT haplotipi (%71.8) ve ikinci sıklıkta ise TTAT haplotipi (%17.1) tespit edildi. Chen (14) ve arkadaşlarının çalışmasında ise, hasta ve kontrol grubuna göre haplotip dağılımı yapılmamış olup, tüm çalışma grubundaki yaygın haplotipler belirlenmiştir.

Chen (14) ve arkadaşları, CHGA promotor T-1014C, T-988G, G-462A, T-415C ve A-89C polimorfik bölgeleri için CGATA haplotipine sahip bireylerde ayrıca soğuk stres testi ile sempatik stimülasyon oluşturup, kan basıncı cevabını değerlendirmişler ve normotansif bireylerin soğuk stres sonrası beklenenden daha düşük kan basıncı yanıtını, özellikle T-1014C (CC), T-988G (GG) ve G-462A (AA)

bölgeleri için homozigot minör allel varlığı ile ilişkilendirmişlerdir. T-1014C için C allele, T-988G için G allele, G-462A için A allele sahip bireylerin hipertansiyon gelişimi için düşük risk taşıdıklarını savunmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise, hasta ve kontrol grubundaki bireylere soğuk stres testi uygulanmamış olup, esansiyel hipertansiyon hastaları ile kontrol grubundaki CHGA promotor T-1014C, T-988G, G-462A ve T-415C bölgelerinin polimorfizmleri belirlenip, her iki grup arasında allel ve genotip sıklıklarının istatistiksel analizi yapıldı. İstatistiksel analiz sonrası CHGA geni promotor T-1014C polimorfik bölge allellerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklıkları karşılaştırıldığında, C alleli hasta grubunda %28, kontrol grubunda %9.4 olarak saptandı ve her iki grup arasında C alleli taşıma yönünden farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). TC ve CC genotipi sıklığı, hasta grubunda %40, kontrol grubunda %18.8 olarak saptandı ve her iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). T-988G polimorfik bölge allellerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklıkları karşılaştırıldığında G alleli hasta grubunda %28, kontrol grubunda %6.2 olarak saptandı. Her iki grup arasında G alleli taşıma yönünden farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). TG ve GG genotipi sıklığı hasta grubunda %44, kontrol grubunda %12.5 olarak saptandı ve her iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$). G-462A polimorfik bölge allelleri ve genotipleri hasta ve kontrol grubunda karşılaştırıldığında ise farklılık istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0.05$). Sonuçta T-1014C için C alleli, TC ve CC genotipi, T-988G için G alleli, TG ve GG genotipi sıklığı esansiyel hipertansiyonlu hasta grubunda kontrol grubuna göre daha sık tespit edilmiştir ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yine G-462A ve T-415C bölgeleri için allel ve genotip dağılımı açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Chen (14) ve arkadaşlarının çalışma sonuçları ile bizim sonuçlarımızın çelişkili olmasının nedenini, hem metod farklılığına (Soğuk stres testi) hem de olgu sayımızın az olmasına bağlayabileceğimiz gibi, SNP'lerin toplumlar arası farklılık göstermesine de bağlayabiliriz.

Chen (14) ve arkadaşları, % 90'ı Avrupalı, % 10'u Meksikalı hipertansif bireylerle normotansif bireyleri karşılaştırdıkları çalışmada, G-462A polimorfik bölge için GA genotipine sahip bireylerde soğuk stres testi sonrası GG ve AA

genotipine sahip bireylerden daha yüksek sistolik ve diyastolik kan basıncı değerleri elde edilmiş ve GA genotipine sahip bireylerin istirahat kan basıncı değerlerinin normal popülasyona kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu bireylerin hipertansif ve normotansif bireyler arasında yer alan ara bir fenotipe sahip oldukları ve ileride hipertansiyon gelişimi için genetik risk taşıdıkları ileri sürülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak, polimorfik bölgelerin heterozigotluğunun her iki allel için homozigot olan bireylere göre daha fazla öneme sahip olması anlamına gelen “moleküler heterosiz” kavramı ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamızda ise soğuk stres testi yapılmadan G-462A polimorfik bölgesi allel ve genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklığı ve gruplar arasında allel ve genotip dağılımı açısından, istatistiksel olarak fark olup olmadığı araştırıldı. G-462A polimorfik bölgesi için hasta grubunda GA genotipi sıklığı % 26, kontrol grubunda ise % 31.3 olarak saptandı ve her iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ancak bizim çalışmamızda soğuk stres testi yapılmadığından sonuçlarımız, Chen (14) ve arkadaşlarının çoğunluğu normotansif olgularla yapmış oldukları çalışma ile karşılaştırılamadı.

Lillie (18) ve arkadaşlarının CHGA geni polimorfizmlerinin ET-1 sekresyonunu etkileyip etkilemediğini araştırmak amacı ile çoğunluğu normotansif beyaz ırktan 238 ikiz çift ile yaptıkları bir çalışmada, CHGA geni promotor, 3'UTR, intronik ve ekzon 7 bölgelerinde toplam 13 polimorfik bölgeyi incelemişler ve CHGA geni promotor bölge T-988G bölgesi için G alleli, G-462A bölgesi için A alleli ve C-89A bölgesi için A alleli taşıyıcılarında plazma ET-1 düzeyleri, bu bölgeler için homozigot major allel taşıyıcılarına oranla yüksek bulunmuştur. Yine aynı çalışmada bu bölgeler için heterozigot allel taşıyıcılarının, plazma ET-1 düzeyleri ile homozigot major allel taşıyıcılarının plazma ET-1 düzeyleri karşılaştırılmış ve heterozigot allel taşıyıcılarında plazma ET-1 düzeyleri daha yüksek olarak ölçülmüş olup iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca CHGA geni varyasyonlarının ET-1 sekresyonunu etkilediğini *in vivo* ve *in vitro* ortamda göstermişler ve sonuç olarak sempatokromafin sistem ile endotel fonksiyonları arasında bir bağlantı olduğunu savunarak, endotel disfonksiyonlarının teşhis ve oluşum mekanizmalarında yeni bir genetik ve hücresel biyolojik yaklaşım ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda T-988G polimorfik

bölgesinde G alleli, TG genotipi hasta grubunda kontrol grubundan daha yüksek oranda tespit edilmiş olup her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. Bu sonuç çalışma grubumuzdaki olgularda plazma ET-1 düzeylerinin ölçülmesi ile ilgili planlanacak çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

CHGA geni promotor T-415C polimorfik bölge allel ve genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklıkları karşılaştırıldığında, hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda allel olarak T alleli, genotip olarak TT genotipi saptanmış olup C alleli ise hasta ve kontrol grubunda saptanmamıştır. Her iki grupta allel olarak T alleli, genotip olarak TT genotipi saptandığından gruplar arası karşılaştırma istatistiksel olarak yapılamamıştır. Lillie (18) ve arkadaşları, Salem (91) ve arkadaşları, Chen (14) ve arkadaşlarının çalışmalarında da bizim çalışmamızda olduğu gibi T-415C polimorfik bölgesinde en sık T alleli ve genotip olarak da TT genotipi saptanmıştır.

Çalışmamızda CHGA geni promotor T-1014C, T-988G, G-462A ve T-415C polimorfik bölge genotiplerinin cinsiyete göre dağılım yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış olup yaptığımız literatür taramasında bu polimorfik bölge genotiplerinin cinsiyete göre dağılımına ait yayınlara da rastlanmamıştır.

Literatürde CHGA geni promotor bölge polimorfizmleriyle ilgili farklı etiyolojik hipertansif olgularda yapılmış çalışmalar da vardır. Bu çalışmalardan biri Salem (91) ve arkadaşlarının 2008 yılında Amerikalı siyahi ırkta, hipertansif son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) olan 58 hasta ile böbrek fonksiyonları normal 76'sı hipertansif, 74'ü normotansif kontrol grubundan oluşan bir olgu-kontrol çalışmasıdır. Bu çalışmada CHGA geni promotor bölge, 3'UTR bölgesi, 3'sonlanma bölgesi, kodlayan bölge ve intronik bölgelerdeki 14 polimorfik bölge incelenmiş ve promotor G-462A, T-415C, C-89A bölgeleri için ATC haplotipi, 3'UTR C+87T ve 3'sonlanma bölgesi G1260C için TC haplotipi, SDBY olan hasta grubunda kontrol grubuna göre daha fazla tespit edilmiş ve bu haplotiplere sahip bireylerin hipertansiyon için 2.6 kat fazla risk taşıdıkları ileri sürülmüştür. Sonuç olarak bu CHGA geni polimorfizmlerinin özellikle siyahi hipertansif bireylerde nefroskleroza sekonder SDBY gelişme riskini tespit etmek için klinik marker (belirteç) olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

Yu (92) ve arkadaşlarının 23'ü primer malign hipertansiyon hastası, 39'u IgA nefropatisine sekonder malign hipertansiyon hastası ve 63'ü sağlıklı kontrol grubundan oluşan toplam 125 kişi ile yaptıkları bir çalışmada, CHGA promotor bölgede yaygın görülen polimorfizmler incelenmiş ve T-415C bölgesi için TT genotipi taşıyanların TC ve CC genotipine sahip bireylerden daha yüksek serum kreatinin değerlerine sahip oldukları gösterilmiştir. CHGA promotor bölgesinde yaygın görülen polimorfizmlerin ve haplotiplerin malign hipertansiyonun başlangıcında etkili olmayabilecekleri ancak IgA nefropatisine sekonder malign hipertansiyonda renal disfonksiyondan sorumlu olabilecekleri ileri sürülmüştür.

CHGA geninin promotor bölge dışındaki polimorfizmleri ile hipertansiyon arasındaki ilişkiye dikkat çeken çalışmalar da yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri de Chen (15) ve arkadaşlarının çoğunluğunu normotansiflerin oluşturduğu Avrupalı ikiz çiftlerinde, CHGA geni 3'UTR C+87T bölgesindeki polimorfizmleri araştırdıkları çalışmadır. Bu çalışmada özellikle erkek cinsiyette C alleleline sahip bireylerde soğuk stres testi sonucu yüksek sistolik kan basıncı değerleri ölçülmüş ayrıca 3'UTR C+87T bölgesi için CC genotipine sahip erkeklerde bazal sistolik ve diyastolik kan basıncı değerleri, TT genotipine sahip erkeklerden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgulara dayanarak 3'UTR C+87T polimorfik bölgesinin özellikle erkek cinsiyette hipertansiyon gelişiminde etkili bir polimorfizm olabileceği ileri sürülmüştür.

Rao (93) ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise 7.ekzon 11825 pozisyonundaki bazda G/A tek nükleotid değişimi sonucu oluşan Gly364Ser amino asit varyasyonunun (varyant catestatin) hipertansiyon üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Gly364Ser (varyant catestatin), Gly364Gly (wild- tip) ile karşılaştırıldığında varyant catestatinin katekolamin salgılanmasını wild-tip catestatinden daha fazla inhibe ettiği, parasempatik aktiviteyi artırıp sempatik aktiviteyi baskıladığı ve baroreseptör sensitivitesinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Gly364Ser heterozigot bireylerde soğuk stres sonrası Gly364Gly bireylere göre daha düşük kan basıncı değerleri ölçülmüş olup Gly364Ser heterozigotluğunun otonom aktivite değişikliklerine neden olduğu ve özellikle erkek cinsiyette hipertansiyon gelişme riskini azalttığı ileri sürülmüştür.

Çalışma grubumuz Denizli ili ve çevresinden gelen bireyleri kapsayan hasta ve kontrol grubundan oluşmaktadır. Çalışma sonuçlarımız, T-1014G polimorfik bölge için C alleli ve CC, TC genotipi, T-988G polimorfik bölgesi için G alleli ve GG, TG genotipinin esansiyel hipertansiyon için genetik risk oluşturabileceğini düşündürmektedir. Bu polimorfik bölgelerin daha fazla sayıdaki olgu serilerinde çalışılması gereklidir.

CHGA geni promotor bölge polimorfizmlerinin esansiyel hipertansiyon ilişkisine yönelik Türk toplumunda yapılmış başka çalışmalar olmadığı için, çalışmamızın sonuçları ile karşılaştırma yapılamamıştır. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen veriler, kısıtlı sayıdaki çalışma grubundan elde edildiğinden Türk toplumundaki CHGA promotor bölge polimorfizmlerini tam olarak yansıtmayabilir. Bu çalışmamız CHGA promotor bölge polimorfizmleri ile ilgili Türk toplumunda yapılmış ilk çalışma olması yönüyle önemlidir. Ayrıca ileride daha fazla sayıda olgu serisi ile yapılacak çalışmalara öncülük yaparak Türk toplumunun CHGA promotor bölge SNP profilinin çıkarılıp toplum taramaları ile riskli bireylerin tespit edilmesini, hipertansiyon ve komplikasyonlarını önlemeye yönelik tedbirler alınmasını sağlayabilecektir.

SONUÇLAR

1. CHGA geni promotor T-1014C, T-988G, G-462A ve T-414C polimorfik bölgelerinin analizi sonrası hasta grubunda en sık TTGT ikinci sıklıkta CGAT haplotipleri saptanırken, kontrol grubunda en sık TTGT ikinci sıklıkta TTAT haplotipleri saptanmıştır.
2. CHGA geni promotor T-1014C polimorfik bölge allellerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklıkları karşılaştırıldığında kontrol grubunda sık görülen allel olan T alleli referans alındığında her iki grup arasında C alleli taşıma yönünden farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubunda sık görülen TT genotipi referans alındığında TT ve TC genotipi taşıma yönünden hasta ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). TC ve CC genotipi taşıma yönünden ise hasta ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).
3. CHGA geni promotor T-988G polimorfik bölge allellerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklıkları karşılaştırıldığında, kontrol grubunda sık görülen allel olan T alleli referans alındığında her iki grup arasında G alleli taşıma yönünden farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubunda sık görülen TT genotipi referans alındığında TT ve TG genotipi taşıma yönünden hasta ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). TG ve GG genotipi taşıma yönünden ise hasta ve kontrol grubu arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).
4. CHGA geni promotor G-462A polimorfik bölge allellerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklıkları karşılaştırıldığında, kontrol grubunda sık görülen G alleli referans alındığında her iki grup arasında A alleli taşıma yönünden farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Kontrol grubunda sık görülen GG genotipi referans alındığında her iki grup arasında GG, GA ve AA genotipi taşıma açısından her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

5. CHGA geni promotor T-415C polimorfik bölge allellerinin hasta ve kontrol grubundaki sıklıkları karşılaştırıldığında hem hasta grubu hem de kontrol grubunun tamamında T alleli saptanırken, C alleli hasta ve kontrol grubunda saptanmadı. Hem hasta hemde kontrol grubunda allel olarak T alleli, genotip olarak TT genotipi saptanmıştır.
6. Bu çalışma esansiyel hipertansiyon olgularında CHGA geni promotor bölge polimorfizmlerini araştıran Türkiye’de yapılan ilk çalışma olup ileride yapılacak çalışmalara öncülük edeceğini düşünmekteyiz. Kan basıncı kontrolünde önemli rolü olduğu gösterilmiş CHGA geni ile ilgili Türkiye’nin farklı bölgelerinden daha çok sayıda olgu serisi ile yapılacak olan çalışmalar esansiyel hipertansiyon olgularının CHGA promotor bölge varyasyonlarının tespitinde ve SNP profillerinin çıkarılmasında faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. He J, Whelton PK. Epidemiology and prevention of hypertension. *Med.Clin. Nam* 1997;81:1077-97.
2. Pratt RE, Dzau VJ. Genetics and HT: Concepts, potential and opportunities. *Hipertension* 1999;33:238-47.
3. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular genetics of Hypertension. *Cell* 2001;104:545-56.
4. Kaplan NM. *Clinical Hypertension* 8th. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 2002:63.
5. Waeber B, Brunner HR, Burnier M. Hypertension. In: Willerson JT, Cohn JN, eds. *Cardiovascular Medicine*. 2th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone 2000:1496-511.
6. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 2003;348:1134-49.
7. Winkler H, Fischer-Colbrie R. The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992;49:497-528.
8. Helle KB. Some chemical and physical properties of the soluble protein fraction of bovine adrenal chromaffin granules. *Mol Pharmacol* 1966;2:298-310.
9. Blaschko H, Comline RS, Schneider FH, Silver M, Smith AD. Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature* 1967;215:58-59.
10. Iacangelo AL, Eiden LE. Chromogranin A: current status as a precursor for bioactive peptides and granulogenic/sorting factor in the regulated secretory pathway. *Regul pept* 1995;58:65-88.
11. Aunis D, Metz-Boutigue MH. Chromogranins: current concepts. Structural and functional aspect. *Adv Exp Med Biol* 2000;482:21-38.

12. Huttner WB, Gerdes HH, Rosa P. The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem Sci* 1991;16:27-30.
13. When G, Mahata SG, Cadman P, Mahata M, Ghosh S, Mahapatra NR, Rao F, et al. Both rare and common polymorphisms contribute functional variation at CHGA, a regulator of catecholamine physiology. *Am J Hum Genet* 2004;74:197-207.
14. Chen Y, Rao F, Rodriguez-Flores JL, Mahapatra NR, Mahata M, When G, et al. Common genetics variants in the chromogranin A promoter alter autonomic activity and blood pressure. *Kidney Int* 2008;74:115-25.
15. Chen Y, Rao F, Rodriguez-Flores JL, Mahata M, Fung MM, Stridsberg M, et al. Naturally occurring human genetic variation in the 3'untranslated region of the secretory protein chromogranin A is associated with autonomic blood pressure regulation and hypertension in a sex-dependent fashion. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1468-81.
16. Comings DE, Macmurray JP. Molecular heterosis: a review. *Mol Genet Metab* 2000;71:19-31.
17. Mahapatra NR, O'Connor DT, Vaingankar SM, Hikim AP, Mahata M, Ray S, et al. Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be recued by the human ortholog. *J Clin Invest* 2005;115:1942-52.
18. Elizabeth OL, Manjula M, Srikrishna K, Fangwen R, Richard AB, Gen W, et al. Herdity of endothelin secretion human twin studies reveal the influence of polymorphism at the chromogranin A locus, a novel determinant of endothelial function. *Circulation* 2007;115:2282-91.
19. Pickering G. Hypertension: Definitions, natural histories and consequences. *Am J Med* 1972;52(5):570-83.
20. Word Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines For the management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens* 1999;17(2):151-83.

21. <http://www.nhlbi.nih.gov/guedilines/hypertension/jnc7full.htm>. Erişim tarihi: 11 ocak 2012.
22. 2007 Guidelines for the Management of ArterialHypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007;25(6):1105-1187.
23. Ronald G. Victor. Systemic Hypertension: Mechanisms and Diagnosis. In: Robert O. Bonow, Douglas N. Mann, Douglas P. Zipes, eds. Braunwald' Heart Disease A Textbook of Cardiovascular Medicine. 9th Ed. Philadelphia: Elsevier 2012:935-55.
24. Gong M, Hubner N. Molecular genetics of human hypertension. *Clin Sci* 2006; 110:315-26.
25. Campese VM, Karubian F, Chervu I, Parise M, Sarkies N, Bigazzi R. Pressor reactivity to norepinephrine and angiotensin in salt sensitive hypertensive patients. *Hypertension* 1993;21:301-7.
26. Kopkan L, Cervenka L. Renal interactions of renin-angiotensin system, nitric oxide and superoxide anion: Implications in the pathophysiology of saltsensitivity and hypertension. *Physiol Res* 2009;58(2):55-67.
27. Harrison-Bernard LM. The renal renin-angiotensin system. *Adv Physiol Educ* 2009;33:270-4.
28. Gaboury CL, Simonson DC, Seely EW, Hollenberg NK, Williams GH. Relation of pressor responsiveness to angiotensin II and insulin resistance in hypertension. *J Clin Invest* 1994;94:2295-300.
29. Julius S, Schork MA. Predictors of hypertension. *Ann N Y Acad Sci* 1978;304: 38-58.
30. Julius S, Valentini M. Continuing on J.P. Henry's path; studies of physiology and pathophysiology of cardiopulmonary receptors in humans. *Acta Physiol Scand Suppl* 1997;640:122-4.

31. Marfella R, Gualdiero P, Siniscalchi M, et al. Morning blood pressure peak, QT interval and sympathetic activity in hypertensive patients. *Hypertension* 2003;41:237.
32. Obrist PA, Light KC, James SA, Strogatz DS. Cardiovascular responses to stress: I. Measures of myocardial response and relationship to high resting systolic pressure and parental hypertension. *Psychophysiology* 1987;2(1):65-78.
33. Calhoun DA, Mutinga ML. Race, family history of hypertension, and sympathetic response to cold pressor testing. *Blood Press* 1997;6(4):209-13.
34. Marin J, Rodriguez MA, Martinez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther* 1997;75(2):111-34.
35. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17(1):7-23.
36. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357(3):593-615.
37. Cannon RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998;44(8):1809-19.
38. Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, Authier S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 2005;208(2):177-92.
39. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, Gözükara EM. Nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS)'ın fizyolojik ve patolojik özellikleri. *T Klin Pediatri* 2001;10:226-36.
40. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri. *T Klin J* 2000;20:107-11.
41. Türköz Y, Özerol E. Nitrik oksitin etkileri ve patolojik rolleri. *JİUMF* 1997;4:453-61.
42. Malinski T. The vital role of nitric oxide. *Oakland J* 2000;1:47-57.
43. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 1993;21:(6)929-33.
44. Levin E.R. Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333(6):356-63.

45. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, et al. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med* 1998;338:784-90.
46. Sironi AM, Gastaldelli A, Mari A, Ciociaro D, Postano V, Buzzigoli E, Ghione S, Turchi S, Lombardi M, Ferrannini E. Visceral fat in hypertension: influence on insulin resistance and beta-cell function. *Hypertension*. 2004;44:127-33.
47. Canatan H, Bakan I, Akbulut M, et al. Comparative analysis of plasma leptin levels in both genders of patients with essential hypertension and healthy subjects. *Endocr Res* 2004;30:95-105.
48. Ferrannini E, Natali A, Capaldo B, et al. Insulin resistance, hyperinsulinemia and blood pressure. *Hypertension* 1997;30:1144-49.
49. Haffner SM, Ferrannini E, Hazuda HP, et al. Clustering of cardiovascular risk factors in confirmed prehypertensive individuals. *Hypertension* 1992;20:38-45.
50. Baron AD, Brechtel-Hook G, Johnson A, et al. Skeletal muscle blood flow. A possible link between insulin resistance and blood pressure. *Hypertension* 1993;21:129-35.
51. Hausberg M, Hoffman RP, Somers VK, et al. Contrasting autonomic and hemodynamic effects of insulin in healthy elderly versus young subjects. *Hypertension* 1997;29:700-5.
52. Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am J Hypertension* 2001;14:103-15.
53. Thompson & Thompson *Tıbbi Genetik*. Tunçbilek E, Çev.Ed, 6. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2005:87-9.
54. Zhang K, Calabrese P, Nordberg M, Güneş F. Haplotype block structure and its applications to association studies: power and study designs. *Am J Hum Genet* 2002;71(6):1386-94.

55. Smith G, Ebrahim S, Lewis S, Hansel L, Palmer J, Burton BR. Genetic epidemiology and public health : hope, hype, and future prospect. *Lancet* 2005;366: 1484-98.
56. O'Shaughnessy KM. The genetics of essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:5-11.
57. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). <http://www.ncbi.nlm.gov/omim>
Erişim tarihi: 11 ocak 2012.
58. Banks P, Hele K. The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem J.* 1965;97:40-1.
59. Winkler H, Fischer-Colbrie R. The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992;49:497-528.
60. Moulant AJ, Bevan S, White JH, Hendy GN. Human chromogranin-A gene. Molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell-specific expression. *Biol Chem* 1994;269:6918-26.
61. Taeynoon K, Y. Pengh L. Chromogranin A: a suprising link between granüle biogenesis and hypertension. *J. Clin. Invest* 2005;115:1711-13.
62. Helle, KB, Metz-Boutigue MH, Aunis D. Chromogranin A as a calcium binding precursor for a multitude of regulatory peptides for the immune, endocrine and metabolic systems. *Curr Med Chem Imm Endoc and Metab.* 2001;1:119-40.
63. Andrea L, Alfred D, Ulrike W. Proteolytic Processing of Chromogranins. *Adv Exp Med Bipl* 2000;482:155-66.
64. Metz-Boutigue MH, Garcia SP, Hoque A, Aunis D. Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur J Biochem* 1993;217:247-57.
65. Brandt DW, Burton DW, Hoque A, Deflo LJ. Chromogranin A peptide-specific antisera and high-performance size exclusion chromatography demanstrate amino-terminal and carboxy-terminal fragments of native molecule in human cell lines. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994;205:316-20.

66. Angelo C, Renato L, Anna G, Fuxiong C, Micaela P, Antonia GS. Antigenic Regions of Human Chromogranin A and their Topographic Relationship with Structural/Functional Domains. *Eur J Biochem* 1996;235:275-80.
67. Seung HY, Joseph PA. Ca^{+2} -Induced Conformational Change and Aggregation of Chromogranin A. *J Biol Chem* 1990;265:14414-21.
68. Seung HY, Marc SL. Effects of pH and Ca^{+2} on Monomer-Dimer and Monomer-Tetramer Equilibria of Chromogranin A. *J Biol Chem* 1992;267:11236-41.
69. Tota B, Quintieri AM, Di Felice V, Cerra MC. New biological aspects of Chromogranin A-derived peptides: Focus on vasostatins. *Comp Biochem Physiol* 2007;147(1):8-11.
70. Genome Browser. www.genome.ucsc.edu. Erişim tarihi:8 Mayıs 2012.
71. Mahapatra NR, Mahata M, Mahata SK, O'Connor DT. The chromogranin A fragment catestatin: specificity, potency and mechanism to inhibit exocytotic secretion of multiple catecholamine storage vesicle co-transmitters. *J Hypertens* 2006;24:895-904.
72. Helle KB. The chromogranin A-derived peptides vasostatin-I and catestatin as regulatory peptides for cardiovascular functions. *Cardiovasc Res* 2010;85(1):9-16.
73. Aardal S, Helle KB, Elsayed S, Reed RK, Serck-Hanssen G. Vasostatin, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppresses tension in isolated human blood vessel segments. *J. Neuroendocrinol* 1993;5:405-12.
74. Aardal S, Helle KB. The vasoinhibitory activity of bovine chromogranin A fragment (Vasostatin) and its independence of extracellular calcium in isolated segments of human blood vessels. *Regul pept* 1992;41:9-18.
75. Angeletti RH, Aardal S, Serck-Hanssen G, Gee P, Helle KB. Vasoinhibitory activity of the synthetic peptides from the amino terminus of the adrenomedullary chromogranin A. *Acta Physiol Scand* 1994;152:11-19.
76. Karan B, Helle. Regulatory peptides from Chromogranin A and Secretogranin II. *Cell Mol Neurobiol* 2010;30:1145-6.

77. Mahapatra NR. Catestatin in a novel endogenous peptide that regulates cardiac function and blood pressure. *Cardiovasc Res* 2008;80:330-8.
78. O'Connor DT, Kailasam MT, Kennedy BP, Ziegler MG, Yanaihara N, Parmer RJ. Early decline in the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in humans at genetic risk of hypertension. *J Hypertens*. 2002;20:1335-45.
79. Gaede AH, Lung MS, Pilowiski PM. Catestatin attenuates the effect of intrathecal nicotine and isoproterenol. *Brain Res* 2009;10:1016.
80. Steiner HJ, Wiler R, Ludescher C, Schmid KW, Winkler H. Chromogranins A and B are co-localized with natriuretic peptides in secretory granules of rat heart. *J.Histochem Cytochem* 1990;38:845-50.
81. Pieroni M, Corti A, Tota B, Curnis F, Angeleno T, Columba B, Cerra MC, et al. Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function. *Euro Heart J* 2007;28:1117-27.
82. Genatlas. <http://genatlas.org>. Erişim Tarihi: 8 Mayıs 2012.
83. Rany MS, Peter EC, Yuging C, Fangwen R, Gen W, Bruce AH, Brinda KR, et al. Chromogranin A Polymorphisms Are Associated With Hypertensive Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:600-14.
84. O'Connor DT. Plasma chromogranin A. Initial Studies in human hypertension. *Hipertension* 1985;7:176-9.
85. Takiyyuddin MA, Cervenka JH, Hsiao RJ, Barbosa JA, Parmer RJ, O'Connor DT. Chromogranin A. Storage and release in hypertension. *Hypertension* 1990;15:237-46.
86. Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP. Chromogranin A, a "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* 2001;106:499-509.
87. Kim T, Zhang CF, Sun Z, Wu H, Loh YP. Chromogranin A deficiency in transgenic mice leads to aberrant chromaffin granule biogenesis. *J Neurosci* 2005;25:6958-61.

88. Stephane C, Zhiyun W, Yuqing C, Kuixing Z, Gen W, Daniel T. Proteomic Analysis Yields an Unexpected Trans-Acting Point in Control of the Human Sympathochromaffin Phenotype *Circulation* 2011;4:437-45.
89. Fangwen R, Stephane C, Zhigun W, Maple M, Yuging C, Gen W, Srikrinha k, et al. Genetic Variation Cardiometabolic Risk Traits in Within a Metabolic Motif in the Chromogranin A Promoter: Pleiotropic Influence on Twins. *AJH*: 2012;25:29-40.
90. Manolia TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest* 2008;118:1590-1605.
91. Salem RM, Cadman PE, Chen Y, Rao F, Wen G, Hamilton BA, Rana BK, et al. Chromogranin A polymorphisms are associated with hypertensive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:600-14.
92. Yu L, Jiang L, Cu XL, Zhu L, Zhang H. Common genetic variants in the chromogranin a promoter are associated with renal injury in IgA nephropaty patients with malignant hypertension. *Ren Fail* 2010;32(1):41-6.
93. Rao F, Wen G, Gayen JR, Das M, Vaingankar SM, Rana BK, Mahata M, et al. Catecholamine release-inhibitory peptide catestatin: naturally occurring amino acid variant Gly364Ser causes profound changes in human autonomic activity and alters risk for hypertension. *Circulation* 2007;115:2271-81.