

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**HİPERTANSİF TİP 2 DİABETES MELLİTUS'LU
BİREYLERDE HGF GEN POLİMORFİZMİ VE SERUM HGF
DÜZEYİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. FUNDA ERCAN**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. DİLER ASLAN**

DENİZLİ-2009

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**HİPERTANSİF TİP 2 DİABETES MELLİTUS'LU
BİREYLERDE HGF GEN POLİMORFİZMİ VE SERUM HGF
DÜZEYİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. FUNDA ERCAN**

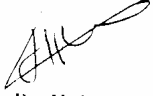
**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. DİLER ASLAN**

DENİZLİ-2009

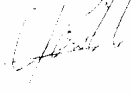
Prof. Dr. Diler ASLAN danışmanlığında Dr. Funda ERCAN tarafından yapılan "Hipertansif Tip 2 Diabetes Mellitus'lu Bireylerde HGF Gen Polimorfizmi ve Serum HGF düzeyi" başlıklı çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.



BASKAN: Prof. Dr. Diler ASLAN

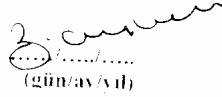


ÜYE: Doç. Dr. Hülya AYBEK



ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Yaşar ENLİ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.



(gün/ay/yıl)

Prof. Dr. Zafer AYBEK
Dekan

F.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANI

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, her zaman yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Diler ASLAN'a, uzmanlık eğitimime değerli katkılarından dolayı öğrencileri olmaktan onur duyduğum Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU'na, hocalarım Prof. Dr. Simin ROTA'ya , Prof. Dr. Süleyman DEMİR'e , Doç. Dr. Hülya AYBEK'e, Yrd. Doç. Dr. Yaşar ENLİ'ye, eğitimim süresince sevgi ve dostluklarını benden esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Dr. Şahika ÖZEN'e, Dr. Mehmet TÜRK'e, Dr. Gamze Can YILMAZTÜRK'e, Dr. Selahattin SERT'e, Dr. Ramazan AKBAY'a, Dr. Feride SERT'e, Dr. Murat ÇELİKER'e, Dr. Didem PINARBAŞILI'ya, Dr. Koray KORKMAZCAN'a, Dr. Emine KAVALCI'ya, Dr. Cafer GÖNEN'e, Dr. Fatih YAMAN'a, Dr. Mahmut ŞENYURT'a, Dr. Dilek İREN'e, Dr. Esin AVCI'ya, tezime katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Vildan CANER'e, her zaman ilgi, sevgi, anlayış ve destekleri ile yanımda olan çok sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ.....	3
Tarihçe.....	3
Tanımı,Yapısı, Sentezi.....	3
Etki Mekanizması.....	6
Biyolojik Fonksiyonları.....	9
HGF Geni ve HGF Gen Polimorfizmleri.....	10
VASKÜLER BOZUKLUKLARDA RİSK FAKTÖRLERİ OLARAK DİABETES MELLİTUS ve HİPERTANSİYON.....	13
DİABETES MELLİTUS.....	13
Epidemiyoloji,Tam ve Sınıflaması.....	13
Komplikasyonları.....	14
Diabetes mellitus ve HGF.....	15
HİPERTANSİYON.....	16
Epidemiyoloji,Tam ve Sınıflaması.....	16
Hipertansiyon ve Kardiyovasküler Hastalıklarla İlişkisi.....	18
Hipertansiyon ve HGF.....	19
DİABETES MELLİTUS VE HİPERTANSİYON	19
HGF, DİABETES MELLİTUS VE HİPERTANSİYON.....	21
GENETİK POLİMORFİZM ANALİZİ.....	21
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
BULGULAR.....	47
TARTIŞMA.....	63
SONUÇLAR.....	77
ÖZET.....	79
İNGİLİZCE ÖZET.....	81
KAYNAKLAR.....	83

TABLolar ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Tablo-1 Diabetes Mellitus Tanı Kriterleri.....	13
Tablo-2 Diabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflandırılması.....	14
Tablo-3 Diabetes Mellitus'un Uzun Dönem Komplikasyonları.....	15
Tablo-4 Hipertansiyon kategorileri ve tanı kriterleri.....	17
Tablo-5 Hipertansiyonun etiopatolojik sınıflaması.....	18
Tablo-6 Moleküler tekniklerde kullanılan nükleik asit enzimleri.....	22
Tablo-7 Nükleik asit çoğaltma teknikleri.....	23
Tablo-8 Elektroforez temeline dayalı yaygın teknikler.....	24
Tablo-9 Hibridizasyon yöntemleri.....	24
Tablo-10 RT- PCR yönteminde yaygın olarak kullanılan boya ve proplar.....	25
Tablo-11 Ölçülen analitlerin ölçüm yöntemleri ve ölçümde kullanılan cihazlar.....	31
Tablo-12 HGF <i>A43839T</i> (intron 8) SNP analizinde kullanılan Primerler ve hibridizasyon probları.....	33
Tablo-13 hsCRP kontrol serumu ölçüm değerleri.....	40
Tablo-14 Biyokimyasal testlerin analitik performansı.....	47
Tablo-15 Biyokimyasal testlerin Haziran 2008 dış kalite kontrol sonuçları.....	48
Tablo-16 Biyokimyasal testlerin Temmuz 2008 dış kalite kontrol sonuçları.....	48
Tablo-17 Kontrol ve hasta gruplarının antropometrik özellikleri.....	49
Tablo-18 Kontrol ve hasta gruplarının ölçüm sonuçları.....	50
Tablo-19 Hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar.....	51
Tablo-20 Hasta alt gruplarında HbA1c yüzdesine göre serum HGF ve hsCRP düzeyleri.....	54
Tablo-21 Tüm hasta gruplarında HbA1c yüzdesine göre serum HGF ve hsCRP düzeyleri.....	54

Tablo-22	HGF A43839T polimorfizminin genotipik dağılımı.....	55
Tablo-23	HGF A43839T polimorfizminde allel sıklığı.....	56
Tablo-24	Genotipik ve Allelik farklılıklara göre serum HGF düzeyi.....	57
Tablo-25	Genotiplere göre gözlenen anlamlı farklılık.....	58
Tablo-26	DM grubunda genotiplere göre farklılıklar.....	59
Tablo-27	AA genotipli grupta hasta gruplarına göre ölçüm sonuçları.....	60
Tablo-28	AT genotipli grupta hasta gruplarına göre ölçüm sonuçları.....	61
Tablo-29	A allellilerde hasta gruplarına göre ölçüm sonuçları arasındaki farklılıklar.....	62
Tablo-30	T allellilerde hasta gruplarına göre ölçüm sonuçları arasındaki farklılıklar.....	62

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Şekil-1 HGF protein yapısının şematik gösterimi.....	4
Şekil-2 HGF ve onun varyant formlarının şematik yapıları.....	5
Şekil-3 Öncül HGF molekülünden olgun HGF heterodimer sentezinin şematik gösterimi.....	5
Şekil-4 HGF hücresel ileti yolu.....	6
Şekil-5 HGF'nin hücre yüzey reseptörüyle etkileşimi sonucu hücre içi sinyal yollarının fosforilasyonu.....	7
Şekil-6 HGF ve onun reseptörü MET'in şematik yapısı.....	8
Şekil-7 HGF'nin heparin ve heparan sülfatlarla düzenlenmesi.....	9
Şekil-8 HGF ve reseptörü MET'in biyolojik etkileri.....	9
Şekil-9 HGF geni kromozomal lokalizasyonu.....	10
Şekil-10 HGF protein aminoasit dizilimi.....	11
Şekil-11 HGF intron 8'de A43839T SNP analizi için RT-PCR ile elde edilen wild-type (normal) bireye ve negatif kontrole ait erime eğrisi analizi.....	37
Şekil-12 HGF intron 8'de A43839T SNP analizi için RT-PCR ile elde edilen wild-type (normal) bireye, heterozigot bireye ve negatif kontrole ait erime eğrisi analizi.....	37
Şekil-13 HGF intron 8'de A43839T SNP analizi için RT-PCR ile elde edilen wild-type (normal) bireye, heterozigot bireye ve mutant bireye ait erime eğrisi analizi.....	38
Şekil-14 HGF Kalibrasyon Eğrisi.....	40
Şekil-15 Hasta ve kontrol gruplarında serum HGF düzeyleri.....	52
Şekil-16 Hasta ve kontrol gruplarında serum hsCRP	53
Şekil-17 Hasta ve kontrol gruplarında serum HbA1c düzeyleri.....	53
Şekil-18 Hasta gruplarına göre genotip dağılımı.....	56
Şekil-19 Hasta grupları arasında allel sıklığı.....	56
Şekil-20 Allelik farklılığa göre sistolik kan basıncı.....	58

KISALTMALAR

ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
ADP	: Adenozin Difosfat
Akt	: Protein kinaz B
AT-II	: Anjiotensin II
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bag-1	: Bcl-2 bağlayıcı protein-1
Crk	: CT10 kinaz düzenleyici
DAG	: Diaçil Gliserol
DCCT	: The Diabetes Control and Complications Trial (Diyabet Kontrol ve Komplikasyonları Çalışması)
DKB	: Diyastolik kan basıncı
DM	: Diabetes Mellitus
DM+HT	: Diabetes Mellitus ve Hipertansiyon
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
ERK	: Hücreğışı Sinyal Düzenleyici Kinaz
ESC	: European Society of Cardiology (Avrupa Kardiyoloji Cemiyeti)
ESH	: Avrupa Hipertansiyon Cemiyeti
FAK	: Fokal Adezyon Kinaz
FRET	: Floresan enerji transferi
g	: Gravite
Gab1	: Büyüme faktörü reseptörü bağlayan protein2 ilişkili bağlayıcı
Grb2	: Büyüme faktörü reseptörü bağlayan protein2
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
HGFA	: HGF Aktivatör
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
hsCRP	: Yüksek Duyarlıklđ C-Reaktif Protein
HT	: Hipertansiyon
ID	: Referans Kimlik Numarası

IGT	: Bozulmuş Glukoz Toleransı
IP3	: Fosfatidil İnozitol 1,4,5 Trifosfat
JNC VII	: Joint National Committee seven report (Birleşik Ulusal Komite 7. rapor)
KG	: Kontrol Grubu
KVH	: Kardiyovasküler Hastalık
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MAPK	: Mitojen Aktive Eden Protein Kinaz
MRS	: MET ilişkili dizi alanı
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	: İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NCBİ	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	: Fosfatidil İnozitol 3 Kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
PLC-g	: Fosfolipaz C-gamma
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı PCR
SH2	: Src homoloji 2
Shp2	: SH2 alanı içeren protein tirozin fosfataz 2
SKB	: Sistolik Kan Basıncı
STAT3	: Transkripsiyonun Sinyal İletici Ve Aktivatörleri
Tag	: Thermus aquaticus
TEKHARF	: <i>“Türkiye’de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı”</i>
TGF-β	: Transforming growth factor-β
Tm	: Melting Sıcaklığı, Erime Derecesi
TURDEP	: Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışması
UKPDS	: United Kingdom Prospective Diabetes Study (İngiltere Prospektif Diyabet Çalışması)
VKİ	: Vücut Kütle İndeksi
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

GİRİŞ

Endotele özgü büyüme faktörleri ailesinin yeni bir üyesi olan Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) endotelyal hücreler ve vasküler düz kas hücrelerinde *in vitro* ve *in vivo* gösterilmiştir. Anjiyogenik büyüme faktörlerinden biri olan HGF, vasküler endotelyal hücrelerin hasar ve onarım süreçlerinde ve proliferasyonunda etkin rol alan bir büyüme faktörüdür (1-3). HGF'nin hasarlanmış endotelyal hücreleri onararak vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve aterosklerotik vasküler lezyonların ilerlemesini durdurduğu düşünülmektedir (3).

Diabetes Mellitus ve hipertansiyonun her ikisi de kardiyovasküler risk faktörüdür. Etkilerini mikro ve makrovasküler hasarlanma ile göstermektedirler (4-7).

Hipertansiyon ve diyabete bağlı kardiyovasküler hastalıklar tüm dünyada ve ülkemizde en sık görülen hastalıklar arasında yer almaktadır (8-11).

HGF'nin yukarıda sayılan özellikleri nedeniyle hipertansif ve diyabetli hastalarda vasküler endotelyal hasarlanmada koruyucu olarak işlev görmesi olasıdır. Bu olasılık nedeniyle HGF ile hipertansiyon (12) ve diyabet (13) arasındaki ilişki araştırılmaktadır. Araştırmalardan elde edilen sonuçlar endotelyal hasarlanmayla ve dolayısıyla da mikro ve makrovasküler bozukluklarla ilişkili olarak dolaşımdaki HGF düzeyinin değiştiğini göstermektedir.

HGF düzeyleri karaciğer (14), böbrek (15) akciğer hastalıklarında (16), androlojik hastalıklarda (17), çok çeşitli kanserlerde (18-22) değerlendirilmiştir.

Eksprese edilen proteinlerin polimorfizmlere göre işlevlerinin farklılık göstereceği gerçeği temel alınarak HGF polimorfizmi çalışmaları da yaygınlaşmaktadır (23, 24, 25). HGF geninde yapılan çalışmalarda 21 tek nükleotit polimorfizmi (SNP) saptanmıştır (23). Özellikle Japonya'da yapılan bir çalışmada HGF intron 8 A43839T polimorfizmine sahip kadın hastaların karotid ateroskleroz ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (23).

Türkiye’de kan HGF değerlerinin diyabetli ve hipertansif hastalardaki düzeylerini inceleyen araştırma bulunmamaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda toplumumuzda hipertansif, diyabetli ve diyabeti olmayan bireylerde kan HGF düzeylerini ve HGF intron 8 A43839T polimorfizmini değerlendirmeyi amaçladık.

Ayrıca Diabetes Mellitus ve hipertansiyon ile ateroskleroz arasındaki yakın ilişki dikkate alınarak bir akut faz reaktantı olan hsCRP ile ve kardiyovasküler risk faktörü olarak değerlendirilen parametreler (LDL-kolesterol, total kolesterol, hiperglisemi, sigara içimi, obezite, yaş) ile HGF arasındaki ilişkiyi inceledik.

Bu çalışmamızda aynı zamanda polimorfizm araştırmalarında Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) kullanımını daha önceki çalışmamızda kullandığımız geleneksel PCR yöntemine göre değerlendirmeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ

Tarihçe

HGF ilk olarak 1984 yılında parsiyel hepatektomi sonrası fare serumunda saptanmıştır (2). Yetişkin farelerin primer hepatosit kültüründen ve fare trombositlerinden de elde edilmiştir (26, 27). İnsanda HGF fulminan hepatik yetmezlikli hastaların plazmalarından saflaştırılmıştır (28).

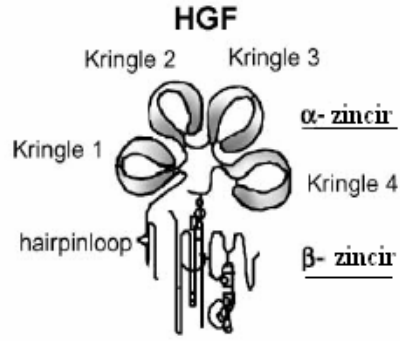
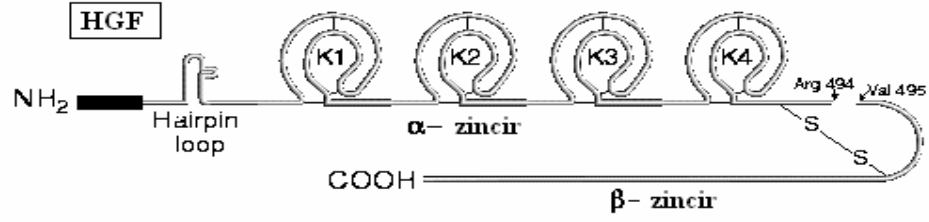
Tanımı

Aynı zamanda scatter faktör ve hepapoietin A olarak da bilinen HGF (29, 30) yapısal olarak diğer büyüme faktörlerinden farklıdır ve çok sayıda farklı epitelyal ve endotelyal hücrelerde motojen, morfojen, mitojen etki gösteren pleiotropik bir büyüme faktörüdür. Bu yüzden tümör invazyonunda, embriyonik gelişimde, anjiogeneizde çok önemli rol oynamaktadır (31- 33).

Yapısı

Hasta plazmalarından saflaştırılan HGF'nin moleküler ağırlığı 76,000 ve 92,000 dalton olan birden çok formda olduğu gösterilmiştir. Aktif HGF yaklaşık molekül ağırlıkları 54,000 – 65,000 ve 31,500 – 34,500 dalton olan birbirlerine disülfid bağı ile bağlı alfa (ağır) ve beta (hafif) iki zincirden oluşmaktadır (28, 30) (Şekil-1).

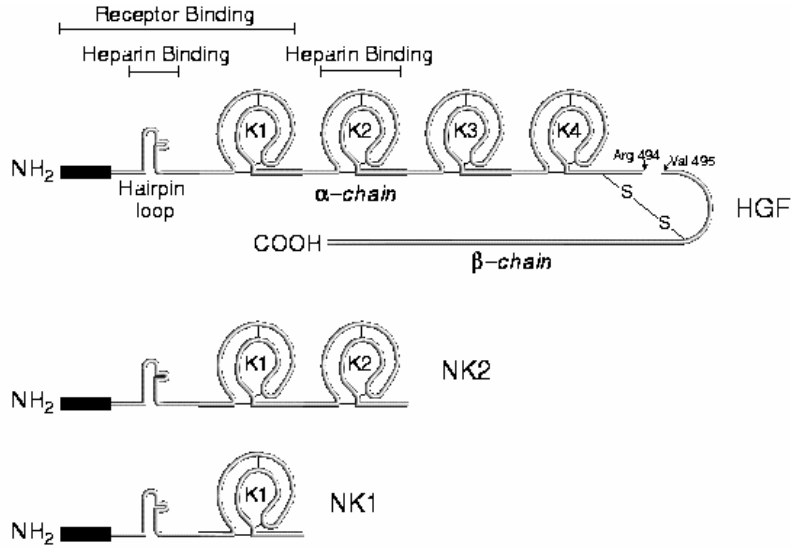
Alfa zincirin N terminal bölgesinin öncesinde metiyonin ile başlayan 54 aminoasitlik dizi bulunur. Bu 54 aminoasitlik bölgenin ilk 29 aminoasitlik kısmı sinyal dizisi için tipik olan hidrofobik özellik gösterir. Alfa zinciri 55- 494. aminoasitler arasında beta zinciri ise 495-728. aminoasitler arasında uzanır (34) (Şekil-1).



Şekil-1: HGF protein yapısının şematik gösterimi (33).

Alfa zinciri N-terminal firkete halkası ve 4 kringle alanı içerir. Bu kringle bölgeleri molekül içi üç disülfid köprüleri ile stabilize edilmiş 80 amino asitlik iç içe geçmiş halka şeklindeki yapılardır ve protein-protein karşılıklı etkileşimini sağlar (35). Beta zinciri serin proteazların katalitik bölgesi ile benzerdir ama proteazların aktif bölgesinde kritik rol oynayan histidin ve serin kalıntılarının yerini glutamin ve tirozin almıştır. Bu nedenle HGF proteaz aktivitesi göstermez. (36).

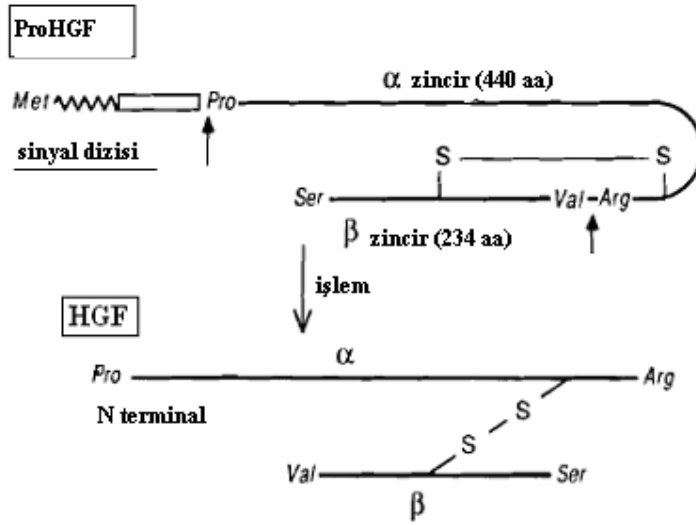
HGF'nin belirlenmiş farklı varyant formları mevcuttur (Şekil-2) (37, 38).



Şekil-2: HGF ve onun varyant formlarının şematik yapıları (33).

Sentezi

HGF molekülü esas olarak mezodermal kökenli hücrelerden salınır. Serum ve ekstrasellüler matrikte bulunur. HGF'nin mRNA'dan kopyalanan formu 83 121 dalton molekül ağırlığında olan öncül Pro HGF'dir (34, 39). ProHGF'nin proteolitik olarak Arg494-Val495 arasındaki bağın yıkılması ile HGF'nin aktif heterodimer formu oluşur (34, 38, 40) (Şekil-3).

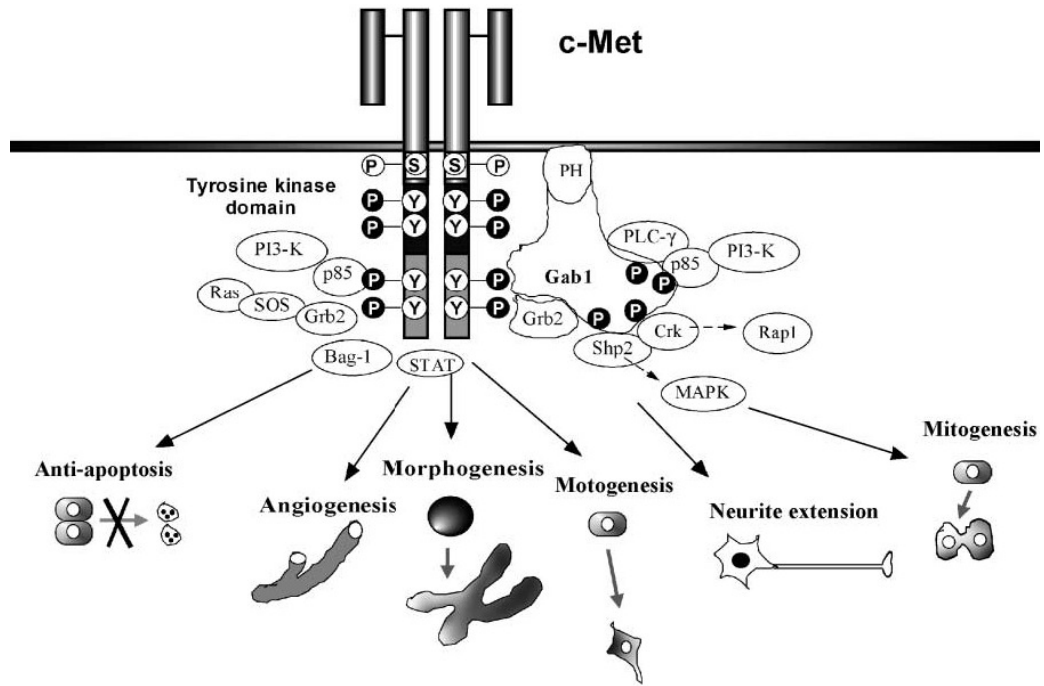


Şekil-3: Öncül HGF molekülünden olgun HGF heterodimer sentezinin şematik gösterimi (34).

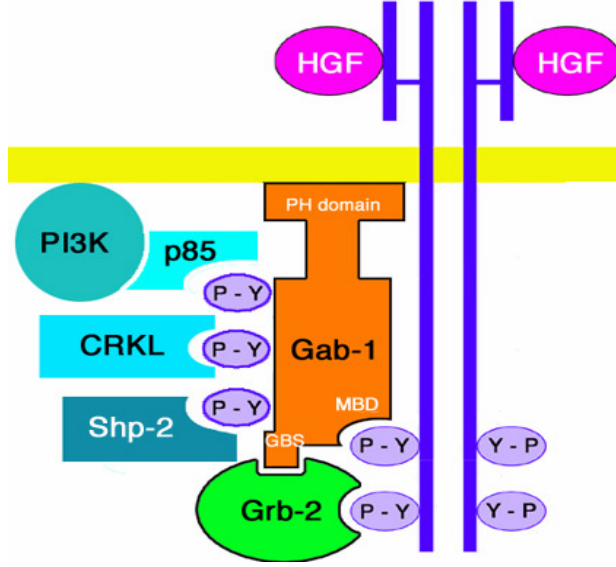
ProHGF'nin aktivasyonunu katalizleyen ana proteaz HGF aktivatör (HGFA) dür. HGFA 34 kD molekül ağırlığında ekstrasellüler bir serin proteazdır (32, 41). HGFA karaciğerin parankimal hücreleri tarafından inaktif zimojen formunda sentezlenir ve plazmaya salgılanır. Doku hasarlanması durumunda hasarlanmış doku içinde trombin tarafından aktiflenir. Bu aktif HGFA, inaktif HGF'yi aktif formuna dönüştürür (42). ProHGF ve çift zincirli olgun HGF'nin her ikisi de hücre reseptörüne sıkıca bağlanır ancak yalnızca çift zincirli olgun formu reseptör sinyalizasyonunu uyarır (43).

Etki Mekanizması

HGF, c-MET transmembran tirozin kinaz reseptörüne bağlanarak etki gösterir (Şekil-4, Şekil-5) (32, 44, 45).



Şekil-4: HGF hücresel ileti yolu (46).

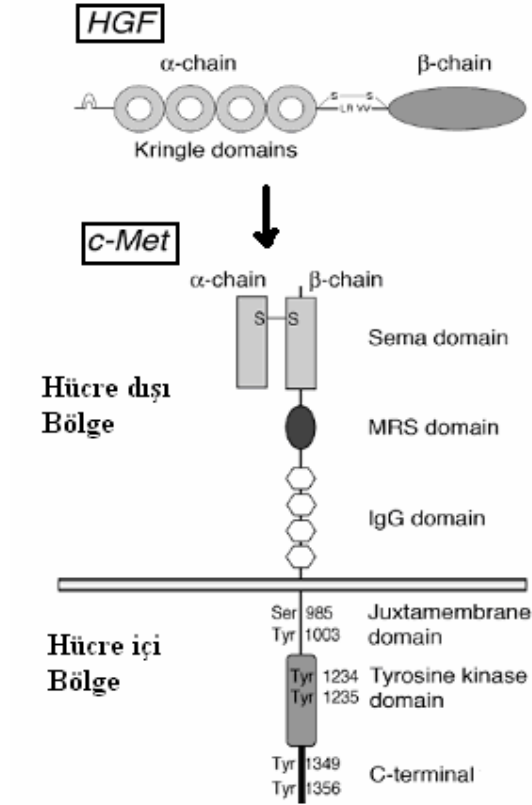


Şekil-5: HGF'nin hücre yüzey reseptörüyle etkileşimi sonucu hücre içi sinyal yollarının fosforilasyonu (IP3K: fosfatidil inozitol trifosfat kinaz, CRKL: CT10 kinaz düzenleyici, MAPK: mitojen aktive eden protein kinaz, Shp2: Src homoloji 2 (SH2) alanı içeren protein tirozin fosfataz 2, Gab1: Büyüme faktörü reseptörü bağlayan protein2 (Grb2) ilişkili bağlayıcı, ERK: hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz, STAT3: transkripsiyonun sinyal iletici ve aktivatörleri) (47).

c-Met tirozin kinaz reseptör ailesi MET, SEA, RON olmak üzere üç üyeliştir. (49, 50). Bu reseptör alt aileleri özgün yapısal benzerlikler ve biyokimyasal özellikler gösterirler (33, 50).

Şekil-6'da gözlendiği gibi Met reseptörü birbirlerine disülfid bağı ile bağlanan 145 kD β ve 50 kD α alt biriminden oluşur ve sinyal iletiminin düzenlenmesinde fosforilasyon bölgeleri ve tirozin kinaz alanlarını içerir (51, 52) (Şekil-6).

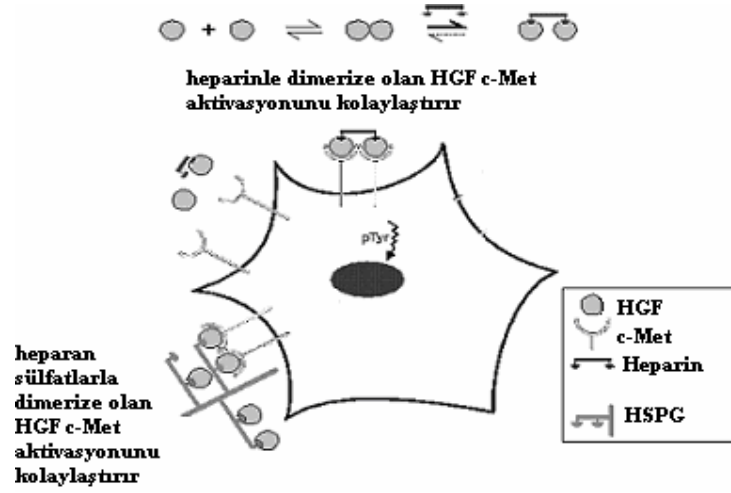
HGF Met reseptörüne bağlanarak (33) ve hücre içi sinyal kaskadının ilk basamağı olarak reseptör dimerizasyonu ve otofosforilasyonunu uyarmaktadır (52).



Şekil-6: HGF ve onun reseptörü MET'in şematik yapısı (53).

Met reseptörü başlıca vasküler endotelial hücreler, lenfatik endotelial hücreler, nöral hücreler, hepatositler, hematopoetik hücreler ve perisitleri içine alan çeşitli epitelyal hücrelerde bulunur (53).

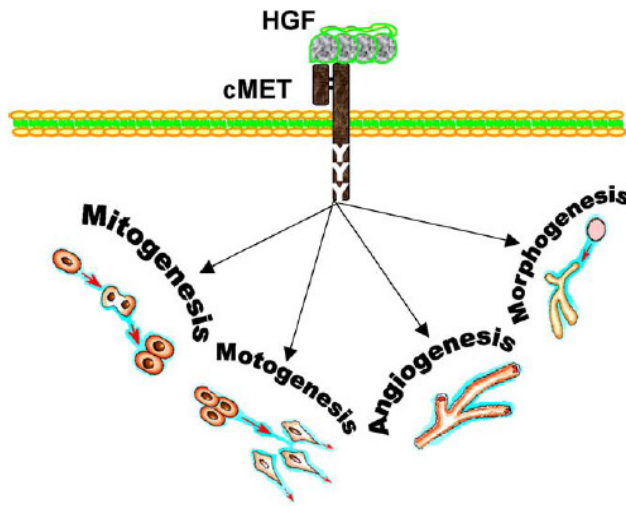
HGF düşük bir ilgi ile heparan sülfat ve dermatan sülfat gibi proteoglikanlarla bağlanabilir (54, 55). Proteoglikanlar MET reseptör aktivasyonu için gerekli olan ko-reseptörlerdir (56). Proteoglikanlara bağlanmaları konformasyonel değişikliklere neden olarak büyüme faktörleriyle MET reseptör aktivasyonunu kolaylaştırır (Şekil-7) (55, 57).



Şekil-7: HGF'nin heparin ve heparan sülfatlarla düzenlenmesi (HSPG:heparan sülfat) (46).

Biyolojik Fonksiyonları

Met reseptörünün doğal ligandı olan HGF tarafından uyarılması kompleks sinyalizasyon yollarını tetikleyerek anjiyogenez (58, 59), hücre hareketlilik (60), büyüme (61), invazyon (62), yapısal farklılaşma (63), embriyolojik gelişim (64, 65), doku yenilenmesi (66) ve yara iyileşmesi (32) gibi çok geniş çeşitli hücresel yanıtları uyarmaktadır (Şekil-8).



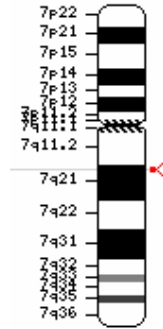
Şekil-8: HGF ve reseptörü MET'in biyolojik etkileri (53).

İnsan aortik endotelial hücrelerinde yapılan çalışmalarda HGF'nin DNA sentezini arttırdığı bulunmuştur (67). HGF'nin hücre çoğalmasını uyardığı ve endotelial hücrelerde antiapoptotik etkiye sahip olduğu (67, 68), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesini uyararak vazodilatasyona yol açtığı öne sürülmüştür (69).

HGF'nin antiapoptotik etki ile karaciğer, böbrek yenilenmesinde ve organogenezde rol oynadığı belirlenmiştir (70).

HGF Geni

HGF'nin gen lokalizasyonu ve aminoasit dizilimi 1989 yılında tanımlanmıştır (34). HGF geninin ilk olarak tanımlandığı kromozomal lokalizasyonu 7q11.1–21 bölgesidir (Şekil-9). Saccone ve arkadaşları 1992'de izotopik olmayan insitu hibridizasyon yöntemi ile HGF geninin 7. kromozomun 7q21.1 bölgesinde yerleşmiş olduğunu belirlemişlerdir (30).



Şekil-9: HGF geni kromozomal lokalizasyonu (30).

HGF geni 18 ekzon, 17 introndan oluşur ve 70 kb uzunluğundadır. 6 kb uzunluğundaki mRNA'dan primer kopyalanan HGF, 728 aminoasitlik tek zincirli inaktif öncül molekülü olan pro HGF'dir (34, 71). 728 amino asitlik HGF proteinin aminoasit dizilimi Şekil 10'da gösterilmektedir (72).

1 MWVTKLLPAL LLQHVLLHLL LLPAIPIYAE GQRKRRNTIH EFKKSAKTTL IKIDPALKIK
61 TKKVNTADQC ANRCTRNKGL PFTCKAFVFD KARKQCLWFP FNSMSSGVKK EFGHEFDLYE
121 NKDYIRNCII GKGRSYKGTV SITKSGIKCQ PWSSMIPHEH SFLPSSYRGK DLQENYCRNP
181 RGEEGPPWCF TSNPEVRYEV CDIPQCSEVE CMTCNESYR GLMDHTESGK ICQRWDHQTP
241 HRHKFLPERY PDKGFDDNYC RNPDGQPRPW CYTLDPHTRW EYCAIKTCAD NTMNDTDVPL
301 ETTECIQGGG EGYRGTVNTI WNGIPCQRWD SQYPHEHDMT PENFKCKDLR ENYCRNPDGS
361 ESPWCFTTDP NIRVGYSQI PNCDMSHGQD CYRGNNGKNYM GNLSQTRSGL TCSMWDKNME
421 DLHRHIFWEP DASKLNENYC RNPDDDAHGP WCYTGNPLIP WDYCPISRCE GDTTPTIVNL
481 DHPVISAKT KQLRVVNGIP TRTNIGWMVS LRYRNKHICG GSLIKESWVL TARQCFPSRD
541 LKDYEAWLGI HDVHGRGDEK CKQVLNVSQV VYGPEGSQDLV LMKLARPAVL DDFVSTIDLP
601 NYGCTIPEKT SCSVYGGWYT GLINYDGLLR VAHLYIMGNE KCSQHHRGKV TLNESEICAG
661 AEKIGSGPCE GDYGGPLVCE QHKMRMVLGV IVPGRGCAIP NRP GIFV RVA YYAKWIHKII
721 LTYKVPQS

Şekil-10: HGF proteini aminoasit dizilimi (72).

HGF Gen Polimorfizmi

HGF geni araştırılmakta olan bir gendir. Şimdiye kadar National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, NCBI) veri tabanında referans kimlik numaraları (ID) ile yayınlanan insan HGF genine ait 1493 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bulunmaktadır (73).

HGF Gen Polimorfizmleri ve İlişkili Olduğu Bozukluklar/Hastalıklar

HGF anjiogenezde (58, 74), vasküler endotelial hücrelerin hasar ve onarımında ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunun önlenmesinde etkin rol alır (3, 75). HGF'nin kardiyovasküler koruyucu etki gösterebilmesi özellikle ilgi çekmiştir. Bu nedenle mikro ve makrovasküler hastalıkların önemli risk faktörleri olan Diabetes Mellitus ve hipertansiyonla ilişkisi araştırılmaktadır (12, 13, 76-81). Yapılan araştırmalarda Diabetes Mellituslu ve hipertansif hastalarda serum HGF düzeylerinin hastalığın şiddetine ve komplikasyonların varlığına bağlı olarak etkilendiği gösterilmiştir (12, 13, 79- 84).

Kardiyovasküler hastalıklarda HGF gen polimorfizmleri serum HGF yoluyla etkili olabilir (23, 24). Ancak kardiyovasküler hastalıklarla HGF gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi inceleyen az sayıda rapor vardır (23).

Japon toplumunda HGF geninde belirlenen 21 SNP'den intron 8 A43839T polimorfizminin ateroskleroz ve hipertansiyonla ilişkisi incelenmiş ve A alleli kadın bireyler ile karotid aterosklerozun ilişkili olduğu saptanmıştır (23). HGF genindeki SNP'ler ile hipertansiyon ilişkisini araştıran bir başka çalışmada HGF genindeki intron 13 C/A polimorfizminin kadın ve ince bireylerde esansiyel hipertansiyonla anlamlı olarak ilişkili olduğu bulunmuştur (24). Ayrıca bu çalışmada intron 13 C/A polimorfizmi ile intron 8 A43839T polimorfizminin bağlantı eşitsizliğinde olduğu belirlenmiştir (24). Çin toplumunda yüksek myopi ile HGF gen polimorfizmi ilişkisini inceleyen bir çalışmada HGF İtron 8 A43839T SNP'nin minör allel sıklığı yüksek bulunmuştur (25). Japon Hipertansiyon Genetik Konsorsiyum'unun sürdürdüğü hipertansif genlerin belirlenmesine yönelik geniş genom taramalarında HGF gen lokusuna özgü ilişkilendirmeler dikkatle izlenmektedir (24).

HGF geni promotor bölgesindeki tekrarlayan deoksiadenozin nükleotit elementinin delesyon mutasyonuna bağlı kısa varyantlarının varlığı ile anormal HGF ekspresyonunun ve artmış meme kanseri insidansının ilişkili olduğunu belirlenmiştir (85).

Tansjenik farelerde aşırı eksprese edilen HGF geninin histolojik olarak farklı tümörlerde tümör hücrelerinin büyüme ve yayılımı ile ilgili olduğu gösterilmiştir (86, 87).

HGF'nin endotelin onarımı, korunması ve anjiyogenezdeki etkileri göz önüne alınarak periferik vasküler hastalıklar, myokard infarktüsü, anjioplasti sonrası yeniden tıkanmanın tedavisinde kullanılabilmesine ilişkin uygulamalar denetlenmektedir (88, 89). Son çalışmalar esansiyel hipertansiyonda endotelial hücre apoptozunun önlenmesi, hipertansiyona bağlı böbrek tübül ve glomerüllerinde hasarlanmanın tedavi edilmesinde HGF gen terapisi çalışmalarının başlatılmasına neden olmuştur (89, 90).

VASKÜLER BOZUKLUKLARDA RİSK FAKTÖRLERİ OLARAK DİABETES MELLİTUS ve HİPERTANSİYON

DİABETES MELLİTUS

Diabetes Mellitus insülin salınımı, insülin aktivitesi veya her ikisinde birden defekt sonucu ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterli çeşitli etiyolojilere sahip metabolik bir hastalıktır (91). Diyabet mikrovasküler ve makrovasküler çok sayıda komplikasyona neden olmaktadır (92, 93).

Epidemiyoloji, Tanı ve Sınıflama

Dünya üzerinde, tüm yaş gruplarında diyabet prevalansı 2000 yılı itibariyle %2,8'dir. 2030 yılında %4,4 olacağı öngörülmektedir (8).

Ülkemizde yapılan TURDEP (Türk Diyabet Epidemiyoloji) çalışmasında Tip 2 DM prevalansının %7,2 (daha önceden tanı konulmamış %2,3) olduğu, 2000 yılı nüfus sayısına göre 4,9 milyon diyabetli hasta olduğu tespit edilmiştir. (11).

Diyabet tanısı için takip eden farklı günlerde doğrulama gerekmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar için insidans ve prevalansın hesaplanması açlık plazma glukozunun ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/L) olmasına dayanır (4, 94). Diabetes Mellitus tanı kriterleri Tablo-1'de özetlenmektedir.

Tablo-1: Diabetes Mellitus Tanı Kriterleri

1. poliüri, polidipsi ve beklenmeyen kilo kaybı gibi diyabetin klasik semptomlarının varlığı yanında rastgele günün herhangi bir saatinde aç veya tok olunmasına bakılmaksızın ölçülen plazma glukoz düzeyinin ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L) olması.

veya

2. en az 8 saatlik tam açlık sonrası farklı iki zamanda ölçülen plazma glukoz düzeyinin ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L) olması

veya

3. WHO tarafından tanımlandığı şekilde 75g anhidroz glukozun su içinde çözdürülerek yüklenmesini içeren Oral Glukoz Tolerans Testi sırasında 2. saat plazma glukoz düzeyinin ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) olması .

Diabetes Mellitusun sınıflandırılması Tablo-2’de gözlenmektedir (94).

Tablo-2: Diabetes Mellitus’un Etiyolojik Sınıflaması

Diabetes Mellitus (DM) Tipleri	Alt tipler ve Özellikler
Tip1 DM	<ul style="list-style-type: none">• İmmunolojik veya idiyopatik (Beta hücre harabiyeti, genelde mutlak insülin eksikliği mevcuttur)
Tip 2 DM	<ul style="list-style-type: none">• İnsülin direnci veya insülin sekresyon defekti ön plandadır
Diğer Spesifik Tipler	<ul style="list-style-type: none">• Beta hücre fonksiyonunda genetik bozukluklar [MODY 1 (Kromozom 20, HNF-alfa), MODY 2 (Kromozom 7, glukokinaz), MODY 3 (Kromozom 12, HNF-1alfa), MODY 4 (Kromozom 13, IPF-1), MODY 5 (Kromozom17, HNF 1Beta), MODY 6(Kromozom 2, Neuro D), Mitokondrial DNA 3243 mutasyonu]• İnsülin etkisinde genetik defektler (Tip A insülin direnci, Leprechaunism, Rabson-Mandenhall Sendromu, Lipoatrofik diyabet)• Ekzokrin pankreas hastalıkları (Pankreatit, Travma/Pankreatektomi, Kistik Fibrozis,Hemokromatozis,Fibrokalküloz Pankreatopati, diğerleri)• Endokrinopatiler (Akromegali, Cushing Sendromu, Glukagonoma, Feokromasitoma, Hipertiroidi, Somatostatinoma, Aldosteronoma, diğerleri)• İlaç ve kimyasal maddeler (Pentamidin, Nikotinic asit, Glukokortikoidler Beta -adrenerjik agonistler, Tiroid hormonu ve diğerleri)• İnfeksiyonlar (Konjenital Rubella, CMV, diğerleri)• İmmün kaynaklı nadir diyabet formları (Anti insülin reseptör antikorları, "Stiffman" sendromu, diğerleri)• Diyabetle beraber görülen diğer genetik sendromlar (Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu)
Gestasyonel DM	

Diabetes Mellitus’un Komplikasyonları

Diyabet 5-10 yıl kadar yaşam uzunluğunu azaltmaktadır. Hastalardaki morbidite ve mortalitenin çoğundan hastalığın uzun dönemdeki mikro ve makrovasküler komplikasyonları sorumludur (95-97) Diabetes Mellitusun uzun dönemdeki komplikasyonları Tablo-3’de gözlenmektedir (95).

Tablo-3: Diabetes Mellitus'un Uzun Dönem Komplikasyonları

Damarsal Komplikasyonlar	Uzun Dönemdeki Etkiler
Mikrovasküler Komplikasyonlar	<ul style="list-style-type: none">• Retinopati• Nefropati• Nöropati
Makrovasküler Komplikasyonlar	<ul style="list-style-type: none">• Serebrovasküler hastalıklar• İskemik Kalp Hastalıkları• Periferik Arteriyal Hastalıklar

Diyabet Kontrol ve Komplikasyonları Çalışması (DCCT) ve İngiltere Prospektif Diyabet Çalışması (UKPDS)'nda HbA1c düzeylerinin diyabetin komplikasyonlarının öngörülmesinde yararlı olduğu saptanmıştır (97-100).

Hiperglisemi vasküler dokularda aterosklerozun artmasını kolaylaştıran çok sayıda değişikliği uyarmaktadır (92, 101). Diyabetik komplikasyonların görünmesini önlemede ve onların ilerlemesini baskılamada kan basıncı ve normale yakın glisemik kontrol ön gerekliliktir (93).

Hipergliseminin endotel hücrelerinde protein sentezini bozduğu ve DNA'ya hasar verdiği gösterilmiştir (102).

Diabetes Mellitus ve HGF

Erken dönemde mikro ve makrovasküler hastalıkların gelişimi ile karakterli olan Diabetes Mellitus (DM), kardiyovasküler hastalıkların gelişimi için bağımsız bir risk faktörüdür (103). Kardiyovasküler hastalıklar DM'un en yaygın ve zarar verici komplikasyonudur (6). Diabetes mellituslu hastalarda hem hiperglisemi hem de insülin direncinin endotelial fonksiyon bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir (103, 104). Bu yüzden endotelial fonksiyon bozukluğu DM'lu hastalarda

ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde çok önemli ilk hedefdir (104).

HGF ve onun reseptörü MET'in oluşturduğu lokal HGF sistem endotel hücrelerde ve vasküler düz kas hücrelerinde *in vitro* ve *in vivo* gösterilmiştir (3). Lokal HGF sistemi "transforming growth factor- β (TGF- β)", anjiotensin II ve HGF'nin kendisi arasındaki denge ile kontrol edilmektedir. TGF- β ve Anjiotensin II, lokal HGF sistemini güçlü bir biçimde baskımlarken HGF'nin kendisi pozitif yönde düzenler (89, 105). HGF hem vasküler endotel hem de düz kas hücrelerinde ekspres olmasına rağmen, yalnızca vasküler endotel hücrelerin hasar ve onarım süreçlerinde ve proliferasyonunda etkin rol alan bir büyüme faktörüdür (3, 12).

Hücre kültürlerinde yüksek glukoz değerlerinin endotel hücrelerde ölüme yol açtığı ve endotel ve vasküler düz kas hücrelerinde lokal HGF üretimini baskıladığı belirlenmiştir (81, 89, 103). Rekombinan HGF uygulamasının yüksek glukozla bağlı endotel hücre ölümünden koruyucu bir etkisinin olduğu gösterilmiştir (81).

Tip 2 diyabetli hastalarda karotid arter intima-medyal kalınlığı ile serum HGF düzeyi arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır (80). Tip 2 Diabetes Mellituslu hastalarda yüksek mortalite ile bağımlı olan kardiyovasküler otonomik fonksiyon bozukluğunun yüksek serum HGF düzeyi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (106). Bu bulgular serum HGF düzeyinin makroanjiopatinin bir belirteci olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

HİPERTANSİYON

Epidemiyoloji, Tanı ve Sınıflama

Toplam hipertansiyonlu birey sayısı tüm dünyada 2000 yılında ortalama 972 milyon (%26,4) iken 2025'te bu sayının 1.56 milyar (%29,2) olması beklenmektedir. Hipertansiyonun dünyadaki tüm bölgelerde yaşla arttığı öne sürülmektedir (9). "*Türkiye'de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı*" (TEKHARF) çalışmasında ülkemizde hipertansiyon prevalansının % 31.8 olduğu ve kadınlarda (%36.1) erkeklerden (%27.5) daha yüksek olduğu saptanmıştır (10).

Hipertansiyon başlangıç taramasından sonra iki ya da daha fazla sayıdaki ziyaretlerin her birinde iki veya daha fazla sayıda yapılan ölçümlerin ortalamasında sistolik kan basıncı (SKB)nın 140 mmHg veya diyastolik kan basıncı (DKB)nın 90 mmHg'nın üzerinde belirlenmesidir (107).

Hipertansiyon tanı kriterleri Tablo-4'te özetlenmektedir (108, 109).

Tablo-4: Hipertansiyon kategorileri ve tanı kriterleri

JNC VII		WHO/ESC	
KATEGORİ	SKB/DKB	KATEGORİ	SKB/DKB
Normal	<120/80	Optimal	<120/80
Prehipertansiyon	120-139/80-89	Normal	120-129/80-84
Hipertansiyon	≥140/90	Yüksek Normal	130-139/85-89
Evre 1	140-159/90-99	Derece 1 Hipertansiyon	140-159/90-99
		Derece 2 Hipertansiyon	160-179/100-109
Evre 2	≥160/100	Derece 3 Hipertansiyon	≥180/110
		İzole Sistolik Hipertansiyon	≥140/ <90

Hipertansiyon bilinen bir nedeni olmayan primer (idiyopatik, esansiyel) ve bilinen bir nedene bağlanan sekonder hipertansiyon olarak iki ana etiyopatolojik sınıfa ayrılmaktadır. Hipertansiyonlu hastaların yaklaşık %90'ı esansiyel hipertansiyona, %10'u ise sekonder hipertansiyona sahiptir (107).

Kan basıncı, kardiyak atım hacmi ve sistemik vasküler direncin ürünüdür (110) ve sinirsel, hormonal, endotelial bir çok kompleks yolla kontrol edilir (110 - 112).

Vasküler endotelial hücreler vazodilatatör, anti proliferatif ve vazokonstriktör bazı vazoaktif maddeler salgılamaktadır. Endotel, kan hücrelerinin adezyonunu inhibe ederek, damarları dilate ederek ve vasküler düz kas proliferasyonunu inhibe ederek vasküler koruyucu etki gösterir (113-115).

Endotel fonksiyon bozukluğu vazokonstriksiyona, trombosit ve monosit adezyonuna, inflamasyona ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonuna yol açarak aterosklerotik vasküler hastalığa ve hipertansiyona neden olmaktadır (116,

117). Hipertansiyonda endotele bağlı vasküler gevşeme inhibe olmuştur (110). Esansiyel hipertansiyonlu hastalarda varlığı gösterilen endotelyal bozukluklar kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde başlangıç evresi olarak kabul edilir (118, 119).

Sistolik ve diastolik hipertansiyonun etiyolojik sınıflaması Tablo-5'te gösterilmektedir (120).

Tablo-5: Hipertansiyonun etiyopatolojik sınıflaması

Hipertansiyon (HT) Tipleri	Etiyolojik Nedenler
Primer (Esansiyel HT)	<ul style="list-style-type: none">• Bilinen bir nedene bağlanamayan (İdiyopatik)
Sekonder HT	<ul style="list-style-type: none">• Renal Hipertansiyon (renal parankimal HT, renovasküler HT, renin salgılayan tümörler, Renoprival HT, primer sodyum retansiyonu)• Endokrin Hipertansiyonlar [Akromegali, Hipotiroidi, Hipertiroidi, Hiperparatiroidi, Sürrenal dışı kromaffin tümörler, Karsinoid, sürrenal korteks kökenli tümörler (Cushing sendromu, Primer hiperaldosteronizm), Sürrenal medulla tümörleri (feokromasitoma)]• Aort koarktasyonu• Gebeliğe Bağlı Hipertansiyon• Nörolojik Bozukluklara bağlı Hipertansiyon (kafaıçi basınç artışı, uyku apnesi, Kuadrupleji, ailevi disotonomi, kurşun zehirlenmesi, Gullian Barre sendromu)• Fiziksel ve Mental Strese Bağlı Hipertansiyon• İnvasküler Hacim Artışına bağlı Hipertansiyon

Hipertansiyon ve Kardiyovasküler Hastalıklarla İlişkisi

Kardiyovasküler morbidite ve mortalite hem sistolik hem diastolik kan basıncı ile yakın ilişkili kabul edilir (107, 121) Hem sistolik hem diastolik kan basıncı temelinde aterosklerotik vasküler değişikliklerin bulunduğu kardiyovasküler hastalıklarla bağımsız olarak ilişkilidir (122). Özellikle 50 yaşın üzerindeki bireylerde sistolik hipertansiyon diastolik KB'ına göre çok daha önemli bir kardiyovasküler hastalık (KVH) risk faktörüdür (121).

Bu yüzden hipertansiyonun kardiyovasküler hastalıklar ve kardiyovasküler riskte belirgin artışa yol açan ilişkili hastalıklarda esas risk faktörü olduğu düşünölmektedir (108, 109).

Avrupa Hipertansiyon Cemiyeti (ESH) ve Avrupa Kardiyoloji Cemiyeti (ESC) 2003 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Hipertansiyon Cemiyetinin Hipertansiyon ile ilgili kılavuzunu (123) destekleyen bir kılavuz yayınlamıştır ve 2007’de bunu güncellemiştir (109). Kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olan hipertansiyona çoğunlukla bozulmuş glukoz ve lipit metabolizması gibi diğer bağımsız risk faktörleri de eşlik etmektedir. Hipertansiyonun tanı ve yönetiminin, hem kan basıncı yükseklik derecesi hem de kardiyovasküler risk faktörlerinin varlığıyla ilişkili olan başlangıçtaki risk düzeyine bağlı olması gerektiği belirtilmektedir (109).

Hipertansiyon ve HGF

Endotelyal hücrelerde güçlü mitojenik etkiye sahip olduğu iyi bilinen ve vasküler sistemde endotelin yenilenme ve onarımında önemli rol oynayan HGF (1, 124) lokal organlarda doza bağlı olarak esasen otokrin ve parakrin etki ve kısmen de endokrin etki göstermektedir (3, 89) .

Vasküler sistemde HGF aktivitesinin yoksunluğu hemostaz, tromboz, inflamasyon ve endotelyal hücrelerin bunlara yardım eden fonksiyonları ile ilişkilidir (1).

Endotelyal hasarlanmanın olduğu hastalıklarda TGF- β ve AT-II üretimi artarak lokal HGF üretimini baskılamaktadır (105). Ancak hipertansiyon, periferik arter hastalıkları, iskemik kalp hastalıkları gibi endotelyal hasarlanmanın iyi bilindiği kardiyovasküler hastalıklarda serum HGF düzeyi yüksek bulunmaktadır (13, 74, 84, 125-127). Bunun endotelyal hasara yanıt olarak karaciğer, akciğer gibi HGF’den zengin sağlam organlardan sistemik dolaşıma HGF salınımının artması ve HGF’nin endokrin bir davranışla hasarlanmış bölgeye ulaşarak vasküler endotelin onarım ve korunmasına katkıda bulunmasına bağlı olduğu öne sürülmüştür (46, 128).

DİABETES MELLİTUS VE HİPERTANSİYON

Kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar tüm dünyada mortalite ve morbiditenin bir numaralı nedeni olarak ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden risk faktörlerinin tanınması ve değerlendirilmesinde yeni yaklaşımlar gereklidir (129).

Diabetes Mellitus ve hipertansiyon kardiyovasküler kalp hastalıkları için bağımsız risk faktörleridir (104, 108, 130).

Endotelial hücre hasarlanmasının hipertansiyonun önemli bir özelliği olduğu kanıtlanmıştır (118). Hipertansiyonda hasarlanan endotelial hücrelerden nitrik oksit gibi vazodilatatör maddelerin kaybı vasküler damar direncinde artmayla sonuçlanır (131, 132). Ayrıca normal endotel ile önemli derecede kontrol edilen vasküler düz kas hücre büyümesi hipertansiyonda bozularak aterosleroza eğilimi artırır (133). Endotelial fonksiyonların düzenlenmesi hipertansiyonun önemli komplikasyonlarını en aza indirmede önemli bir tedavi seçeneğidir (116).

Diyabetli hastalarda da endotelial fonksiyonlar erken dönemde bozulur (134). Hipergliseminin neden olduğu bozulmuş endotel fonksiyonlarının mekanizması açık değildir (135). Glukozun doğrudan veya dolaylı olarak ileri glikasyon son ürünleri veya reaktif oksijen radikallerinin üretimi yoluyla arter damar duvarını etkilediği (136) ve diyabette endotele bağlı gevşemenin bozulduğu öne sürülmektedir (137).

Diabetes Mellitus ve hipertansiyonun birlikte görülme oranı yüksektir (138, 139). Hipertansiyon ve diyabetin birlikte görülmesinde genetik ve çevresel faktörlerin etkisi üzerinde durulmaktadır (140). Endotelial bozukluğa yol açan insülin direnci, artmış doku inflamasyonu ve reaktif oksijen radikallerinin üretimi , artmış doku renin anjiotensin aldosteron sistemi ve sempatik sisir sistemi aktivitesi (141), total vücut sodyumunda artış ve vazokonstriktörlere karşı artmış vasküler yanıt diyabetik olgularda hipertansiyon gelişiminde rol alan fizyopatolojik mekanizmalardır (141).

Epidemiyolojik çalışmalarla diyabetik popülasyonda hipertansiyon sıklığının, diyabetik olmayanlara kıyasla 1.5-3 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (142). Makrovasküler komplikasyonlar diyabetli hastalarda mortalitenin %70'inden sorumludur ve bu komplikasyonların en önemlisi koroner kalp hastalıklarıdır (143). Hipertansiyon diyabetli hastaların %20-60'ını etkileyen retinopati, nefropati gibi mikrovasküler komplikasyonlarda olduğu gibi myokard infarktüsü, koroner kalp

hastalıkları, inme gibi kardiyovasküler hastalıklarda da en önemli risk faktörlerinden biridir (139).

HGF, DİABETES MELLİTUS ve HİPERTANSİYON

Diabetes mellitus ve hipertansiyonun her ikisinin de bağımsız olarak endotelial hasarlanmaya yol açarak ateroskleroz gelişimine neden olduğu bilinmektedir (118, 134). Diyabetli hastalar ile sık olarak birlikte görülen hipertansiyon, mikro ve makrovasküler komplikasyon riskini arttırmaktadır (143, 139).

DM hastalarında HGF üretiminin azalmasının aksine HT'nun ağırlığına bağlı olarak hipertansif DM'lu hastalarda serum HGF düzeyinin normotansif DM'lu bireylere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar HGF'nin DM'ta HT gibi komplikasyonların yeni bir göstergesi olabileceğini öne sürmektedir (13).

GENETİK POLİMORFİZM ANALİZİ

Moleküler Teknikler

Nükleik asit temeline dayalı moleküler teknikler genomdaki diziliş değişikliklerinin saptanmasında geniş olanaklar sunmaktadır (144-146).

Moleküler teknikler temel olarak şu basamakları kapsamaktadır: 1) Canlı örneğinden nükleik asidin özütlenmesi; 2) Özütteki nükleik asit miktarının değerlendirilmesi (özütlenme veriminin değerlendirilmesi), 3) Çoğaltma, 4) Saptama (Ölçme, dizi sırası saptama vb.)

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase chain reaction; PCR) özütlenmiş olan hedef nükleik asidin çoğaltılması yöntemidir (147). PCR ile çoğaltılan nükleik asit çeşitli yöntemlerle analiz edilir. Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time PCR; RT-PCR) yönteminde nükleik asit çoğaltılırken veriler toplanır.

Moleküler tekniklerde kullanılan nükleik asit enzimleri Tablo-6'da sunulmaktadır.

Tablo-6: Moleküler tekniklerde kullanılan nükleik asit enzimleri

Enzim
Nükleazlar
Ekzonükleazlar
Endonükleazlar
Restriksiyon endonükleazlar
Ligazlar
DNA ligazlar
RNA ligazlar
Polimerazlar
Termostabil DNA polimeraz; örn, <i>Thermus aquaticus</i> (Tag) polimeraz
Reverse transkriptaz

1) Canlı örnekten nükleik asitin özütlenmesi

Laboratuvarda hazırlanan reaktiflerle ya da hazır özütleme kitleri kullanılarak nükleik asitler özütlenmektedir (144, 148, 149).

2) Özütleme verimliliğinin değerlendirilmesi

DNA miktarı, spektrofotometrik, elektroforetik, florometrik yöntemler ve real time PCR ile belirlenebilir (150). Spektrofotometrik olarak nükleotitlerin heterosiklik halkalarının maksimum absorpsiyon verdikleri 260 nm dalga boyunda 1 birim optik yoğunluk, 50 mikrogram çift sarmal DNA'ya karşılık gelir.

En iyi ışık emiliminin gerçekleştiği DNA için 260 nm deki ölçülen absorpsiyon değerinin ve RNA ve proteinler için 280 nm'deki ölçülen absorpsiyon değerine oranlanması ile de DNA saflık değerlendirmesi yapılır. Saf DNA molekülü için bu değer 1.8-2.0 olmalıdır (151).

3) Çoğaltma

Bu basamakta kullanılan teknikler hedef nükleik asit, saptama sinyali ve probun miktarının artırılması ilkelerine dayanmaktadır (144). Çoğaltma teknikleri Tablo-7'de özetlenmektedir.

Tablo-7: Nükleik asit çoğaltma teknikler

Amplifikasyon Tipi	Amplifikasyon Teknikleri
Hedef	<ul style="list-style-type: none">♦ Polimeraz zincir Reaksiyonu (PCR)♦ Ligaz Zincir reaksiyonu (LCR)♦ Transkripsiyona Dayanan Amplifikasyon Sistemi (TAS)♦ Transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA); kendine yeterli sekans replikasyonu (3SR); nükleik asit sekansına dayanan amplifikasyon (NASBA)♦ Zincir yerdeğiştirme amplifikasyonu (SDA)♦ Döngü aracılı amplifikasyon (LAMP)♦ Bağlanmış lineer amplifikasyon (LLA)♦ Tüm Genom amplifikasyonu(WGA) veya çoklu yer değiştirme Amplifikasyonu (MDA)♦ Antisense RNA amplifikasyonu (aRNA)
Sinyal	<ul style="list-style-type: none">♦ Dallı zincirli DNA (bDNA)♦ Seri invaziv sinyal Amplifikasyonu
Prob	<ul style="list-style-type: none">♦ Q beta replikaz (QBR)♦ Dönen Halka Amplifikasyon (RCA)♦ İzotermal Oligo Amplifikasyon

4) Saptama

Moleküler genetik testlerde saptama teknikleri temel olarak iki amaçla kullanılır: 4-1) Nükleik asitlerin ölçümü ya da varlıklarının saptanması ve 4-2) Spesifik nükleik asit dizilerinin ayrılması ve ölçümü (144).

4-1) Nükleik asitlerin ölçümü ya da varlıklarının saptanması

- UV absorbans
- Nükleik asitlerin Floresans boyalarla boyanması
- Haberci moleküller ve İşaretlenmiş Problar
 - Radyoaktivite
 - Probla indirekt saptama
 - Floresans işaretleyiciler

4-2) Spesifik nükleik asit dizilerinin ayrılması ve ölçümü

4.2.1 Elektroforetik Ayrım: Nükleik asit parçalarının moleküler ağırlık ve şekillerine göre fiziksel ayrımı. Yaygın kullanılan elektroforeze dayalı teknikler Tablo 8’de sıralanmaktadır (Tablo-8)

4.2.2 Elektroforeze Alternatif Ayrım: Elektroforez kullanılmadanın nükleik asitlerin dizilim ve büyüklüğünün belirlenmesi. (Kısa dizinin saptanması, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), kütle spektrometresi)

4.2.3 Hibridizasyon Yöntemleri: Genellikle arka-alan üzerinde nükleik asitlerin gözlenmesi ilkesine dayanır. Örn, proplar. Katı faz ve sıvı faz hibridizasyon yöntemleri Tablo-9’da gözlenmektedir.

Tablo-8: Elektroforez temeline dayalı yaygın teknikler

Polimorfizmlerin saptanması amaçlı
<ul style="list-style-type: none">• PCR/Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi (RFLP)• PCR (RT-PCR) parça analizi• Southern Blotting• Northern Blotting• DNA dizi analizi• Tek-nükleotid uzatma yöntemi (Single-nucleotid extension assay-SEN)• Oligo-bağlama yöntemi (Oligo-ligation assay-OLA)
Polimorfizmlerin taranması amaçlı
<ul style="list-style-type: none">• Heterodupleks göç yöntemi (Heterodublex migration assay-CSGE)• Tek-zincirli yapı polimorfizm analizi (SSCP, SSCA)• Denatürasyon farkı jel elektroforezi (DGGE)• Sıcaklık farkı elektroforezi (TGGE, TGCE)

Tablo-9: Hibridizasyon Yöntemleri

Katı faz Hibridizasyon yöntemleri
<ul style="list-style-type: none">• Nokta lekeleme ve çizgi prob analizi• Dizilimler (mikro-dizilim veya orta-yoğunluklu dizilimler)• İn situ hibridizasyon• Southern ve Northern lekeleme
Sıvı faz hibridizasyon Yöntemleri
<ul style="list-style-type: none">• Gerçek Zamanlı (veya homojen) PCR• PCR• PCR erime analizi• Diğer klasik teknikler

Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tablo-9’da belirtildiği gibi spesifik genetik polimorfizmlerin saptanmasında kullanılan RT-PCR nükleik asitlerin çoğaltılması ve saptanmasının aynı süreçte yapıldığı sıvı faz hibridizasyon yöntemidir (144). Bu teknikte floresan haberci moleküller ve termal döngü sırasında salınan floresansı kaydeden cihazlar kullanılır. Elde edilen veriler nükleik asit örneğindeki nükleik asitin belirlenmesinde, ölçümünde ve baz dizisi hakkında bilgi sağlarlar. Çoğaltılma ve floresansın izlenmesi için aynı örnek tüpü kullanılır. Örnek transferi, reaktif eklenmesi ve jel ayrımı gerekmez. Bu bağlamda kontaminasyon riski azaltılmış olmaktadır (152).

RT-PCR’da çeşitli çift zincirli DNA bağlayan boyalar, floresans işaretli primerler, proba özgün saptama gibi çeşitli floresans haberci sistemleri kullanılır (Tablo-10). Yöntemlerin çoğu hedef nükleik asit dizisini tamamlayıcı dizilimli proplar kullanmaktadır (144).

Tablo-10: RT- PCR yönteminde yaygın olarak kullanılan boya ve proplar:

Boyalar:

1. Çift zincirli DNA bağlayıcı boyalar (Örn;Etidiyum bromür, SYBR Green I
2. Floresans işaretli primerler

Proplar

1. **Hibridizasyon probları** [Birbirine yakın iki proba florofor yerleştirilir. Çoğunlukla hibridizasyona bağlı olarak bu proplar floresansı değiştirirler. Bu değişim floresans rezonans enerji transferi (FRET) şeklindedir.]
 2. **Hidroliz probları** [Florofor işaretli prob sentezlenirken proba, florofordan floresansı açığa çıkaracak yapı yerleştirilir. PCR sırasında prob florofor ve floresansı açığa çıkaracak yapı arasında hidroliz olursa floresans açığa çıkar.]
-

Homojen hibridizasyon (RT-PCR) yöntemi ile nükleik asitler çoğaltılmakta, ölçülmekte, baz dizisi belirlenmekte ve aynı zamanda ayrıntılı genotipleme yapılmaktadır.

RT-PCR yönteminde çift-zincirli DNA ürünü her döngüde açığa çıkan floresans ile izlenir. Hedef DNA varsa floresans artar. Sinyalin erken görülme derecesi başlangıçtaki hedef DNA miktarına bağlıdır. Bu da nicel ölçüme olanak sağlamaktadır. Sıcaklık artırıldıkça floresans izlenirse erime eğrisi elde edilir. Erime

eğrisi gözlenerek erime sıcaklığının pozisyonu saptanır. Erime analizi ile tek baza kadar dizi varyantları da dahil çoğaltılan ürün belirlenebilmektedir (149).

Erime analizinde, genotipleme yapılırken kontrollü ısıtma sırasında hibridize olan çiftlerin erimesi aynı tüpte izlenir ve sonuçta erime eğrileri elde edilir. SNP saptanması için haberci prob hazırlanır. Haberci prob normal alleli veya mutant alleli tamamlayıcı olarak hazırlanır. Sıcaklık artırılması sırasında hedef DNA ürünündeki haberci proba tamamlayıcı olmayan allelin çift sarmalı daha önce erime eğrisi verirken, haberci proba tamamlayıcı olan allelin çift sarmalı daha yüksek sıcaklıkta erime eğrisi verir. Bu eğrilerin analizi ile genotipleme yapılır (144, 152, 153).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

ÇALIŞMA GRUBU

Hasta Grubu

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı'nda izlenmekte olan ve Haziran -Temmuz 2008 tarihleri arasında polikliniğe başvuran diyabet hastaları arasından, hazırlanmış olan bilgi toplama formları (Ek. 1) her birey için doldurularak seçildi. Toplam 120 hasta çalışmaya alındı. Hasta grubu Diabetes Mellituslu ve Hipertansif, Diabetes Mellituslu ve normotansif olmak üzere iki alt gruba ayrıldı.

Hasta Grubu:

n:120, yaş: 53,1±10,0

Erkek: n= 60; yaş: 54,0±10,2 (35-77)

Kadın: n= 60; yaş: 52,2±9,9 (33-76)

Hasta Alt grupları:

Diabetes Mellituslu ve normotansif hasta grubu:

n:60, yaş: 49,85±8,3

Erkek: n= 30; yaş: 50,1±10,2 (35-77)

Kadın: n= 30; yaş: 49,6±8,6(35-65)

Diabetes mellituslu ve hipertansif hasta grubu:

n: 60, yaş: 56,35±9,7

Erkek: n= 30; yaş: 58,0±8,7 (36-75)

Kadın: n= 30; yaş: 54,7±10,5 (33-76)

Diabetes mellitus tanısı Amerikan Diyabet Birliği (ADA) kriterlerine göre yapıldı (5). Hipertansiyon tanısı için Birleşik Ulusal Komite-7. rapor (Joint National Committee-seven report, JNC VII) kriterleri temel alındı (121). Ayrıca antihipertansif ilaç kullanan hastalar hipertansif olarak kabul edildi.

Diabetes mellitus dışında kronik veya şiddetli akciğer, karaciğer ve böbrek hastalığı olanlar, herhangi bir nedenle kanser tedavisi görenler ile iki hafta öncesine kadar enfeksiyon ve travma öyküsü olanlar çalışma dışı bırakıldı.

Kontrol Grubu

Kontrol grubu klinik şikayet ve bulgusu olmayan, sağlıklı 63 bireyden oluşturuldu.

n: 63, yaş: 44,2±8,3

Erkek: n= 30; yaş: 43,7±9,2 (24-63)

Kadın: n= 33; yaş: 44,7±7,5 (27-58)

Etik Kurul Onayı

Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu onayı alındı. Tüm çalışma grubundan bilgi toplama formları ile yaş, cinsiyet, boy, kilo, vücut kütle indeksi, diyabet süresi, kullanılan ilaçlar, sigara kullanımı, takip edilen diğer sistemik hastalıkları gibi konularda bilgi toplandı ve her katılımcıdan "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" ile gönüllü olduklarına ilişkin imzaları ile izinleri alındı.

Hasta Örneklerinin Toplanması ve Analiz Örneklerinin Hazırlanması

Kan örnekleri, 8-12 saatlik açlık sonrası, sabah saat 08.00-10.30 arasında, biri jelli vakumlu (Vacutest, İtalya) ve diğer ikisi EDTA'lı tüpe (Vacutest, İtalya) olmak üzere 3 tüpe alındı.

Total kolesterol, trigliserid, HDL-kolesterol, glukoz (Architect 8200i, Abbott, ABD) ve HbA1c (iyon değiştirici kolon, Agilent1100 Chromsystems) aynı gün içinde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya Biriminde ölçüldü. LDL-kolesterol ve VLDL-kolesterol, TG<400 mg/dL koşulu sağlayanlarda, Friedwald formülüne göre hesaplandı [VLDL= Trigliserit/5; LDL=Total kolesterol – (HDL + trigliserit/5)]. Serum örnekleri

ayrılarak analiz zamanına kadar HGF ölçümü için –80 °C, hsCRP ölçümü için –20 °C’de saklandı.

Aynı gün içinde yapılan DNA izolasyonundan elde edilen DNA özütleri SNP (intron 8, A43839T) analizine kadar –20°C’de saklandı. SNP için genotipleme RT-PCR yöntemiyle yapıldı.

Ayrıca her hastanın sfigmomanometre ile sistolik ve diyastolik kan basınçları ölçüldü.

KULLANILAN CİHAZLAR

1. DNA özütlenmesi

Soğutmalı masaüstü santrifüj	(Hettich, MİKRO 22 R, Almanya)
Vorteks/spin santrifüj	(FVL-2400N, Biosan, Letonya)
Derin dondurucu (-20 °C)	(Beko, Türkiye)
Otomatik pipet seti (0-10µL, 10-100µL 100-1000µL)	(Eppendorf, ABD)
UV Spektrofotometre (U.V 1601)	(Shimadzu, Japonya)

2. Gerçek zamanlı PCR

Gerçek-zamanlı PCR sistemi	(LightCycler® 2.0, Roche, Almanya)
LightCycler® Santrifüj Adaptörü	(Roche, Almanya)
LightCycler® 2.0 Karusel	(Roche, Almanya)
Vorteks/spin santrifüj	(FVL-2400N, Biosan, Letonya)

3. Serum HGF Ölçümü

ELISA Okuyucu	(Digital And Analog System(das), İtalya)
Otomatik pipet seti (0-10µL , 10-100µL , 100-1000µL)	(Eppendorf, ABD)
Çok kanallı otomatik pipet (30-300µL hacimli)	(CAPP, Danimarka)
Derin dondurucu (-80 °C)	(NUAIRE, Ultralow freezer, ABD)

4. Biyokimyasal Ölçümler

Masaüstü satrifüj	(NF 1215, Nüve, Türkiye)
Otoanalizör	(Architect 8200i, Abbott, ABD)
HPLC (iyon değiştirici kolon kromatografi, Agilent1100 Chromsystems, Almanya)	

KULLANILAN SARF MALZEMELER

1. Hasta örneklerinin toplanması ve analiz için hazırlanması
 - 1.1. Jelli vakumlu düz biyokimya tüpü (Vacutest, İtalya)
 - 1.2. EDTA'lı tüp (Vacutest, İtalya)
 - 1.3. 1.5 mL'lik Eppendorf mikro tüpler (Isolab, Almanya)
2. DNA Özütleme
 - 2.1. 1.5 mL nükleaz free kapaklı mikrosantrifüj tüpü (CLP, ABD)
 - 2.2. Nükleaz free-0-10 μ L , 10-100 μ L , 100-1000 μ L hacimli filtreli Pipet uçları (CLP,ABD)
3. Gerçek-zamanlı PCR
 - 3.1. LightCycler® kapillerler (20 μ l) (Roche,Almanya)
 - 3.2. Nükleazlardan arındırılmış steril -0-10 μ L , 10-100 μ L , 100-1000 μ L hacimli filtreli mikropipet uçları (CLP,ABD)

KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

1. DNA Özütleme
 - 1.1. DNA İzolasyon Kiti (High pure PCR Template Kit) (Roche, Almanya)
 - 1.2. İzopropanol
2. HGF intron 8 A43839T SNP Analizi
 - 2.1. "LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes" Kiti (Roche, Almanya)
 - 2.2. HGF intron 8 A43839T SNP'ye özgün primer seti ve hibridizasyon problemleri (TIB Molbiol, Almanya)
3. Serum HGF Düzeyi Ölçümü
 - 3.1. HGF Human Elisa Kit (Quantikine, R&D system, ABD)
4. Serum yüksek duyarlılıklı C reaktif protein ölçümü
 - 4.1. Ultrasensitif CRP kiti (Abbott, ABD)

HGF POLİMORFİZMİ VE BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

HGF Polimorfizmi ve Ölçülen Analitler

Ölçüm yöntemleri ve HGF polimorfizmi yöntem ilkeleri Tablo-11’de gözlenmektedir.

Tablo-11: Ölçülen analitlerin ölçüm yöntemleri ve ölçümde kullanılan cihazlar

Analit Adı	Ölçüm/Saptama Yöntemi	Kullanılan Cihaz
Glukoz	Enzimatik spektrofotometrik	Abbott/Architect 8200i
HbA _{1c}	İyon değişimi	Agilent1100Chromsystems
HDL kolesterol	hızlandırıcı seçici deterjan	Abbott/ Architect 8200i
HGF	ELISA (Quantikine, R&D system)	Digital and Analog System
hsCRP	lateks immunölçüm	Abbott/ Architect 8200i
Kreatinin	Kinetik kolorimetrik	Abbott/Architect 8200i
Total kolesterol	Enzimatik kolorimetrik	Abbott/ Architect 8200i
Trigliserit	Enzimatik kolorimetrik	Abbott/ Architect 8200i
Üre	Kinetik enzimatik yöntemle ölçülen üre nitrojeninden hesaplanır	Abbott/ Architect 8200i
Polimorfizm Analizi		
DNA özütleme	Yüksek saflıkta PCR kalıbı hazırlama Kiti ile özütleme	Roche, Almanya
HGF, intron 8 A43839T SNP Analizi	Sıvı faz hibridizasyon (Real Time PCR)	Light Cycler System (Roche, Almanya)

HGF Polimorfizmi

Tablo-11’de gözlenen ölçüm yöntem ilkeleri aşağıda özetlenmektedir.

Tam Kan Örneğinden DNA’nın Özütlenmesi

Kan örneklerinden ”Yüksek Saflıkta PCR Kalıbı Hazırlama Kiti” (Roche, Almanya) kullanılarak DNA özütlendi.

Kitle Sağlanan Reaktifler ve Gereçler:

1. Bağlayıcı tampon
2. İnhibitörleri uzaklaştırıcı tampon
3. Yıkama tamponu

4. Elüsyon tamponu
5. Proteinaz K
6. Yüksek saflıkta filtre içeren tüp
7. Toplayıcı tüp

Kit kılavuzundaki DNA özütleme basamakları aşağıdaki gibidir:

1. 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine 200 µL kan örneği alındı.
2. Üzerlerine 200 µL Bağlayıcı Tampon ve 40 µL Proteinaz K eklenerek iyice karıştırıldı ve bu şekilde proteinler DNA ipliğinden uzaklaştırıldı.
3. 72 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
4. Daha sonra her tüpe 100 µL isopropanol eklendi, pipetle karıştırıldı ve DNA'nın çökmesi sağlandı.
5. Hasta sayısı kadar toplayıcı tüp çıkartıldı ve her birine filtre içeren tüp yerleştirildi.
6. Madde 4'te hazırlanan karışım filtre içeren tüplere aktarıldı ve 8.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
7. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
8. Her tüpe 500 µl inhibitörleri uzaklaştırıcı tampon (inhibitör removal buffer) eklendi ve 8.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Böylece DNA izolasyonunda inhibisyona neden olabilecek tüm maddeler toplama tüpleri içine süzülen sıvı içinde uzaklaştırılmış oldu.
9. Toplama tüpleri atıldı ve filtre içeren tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
10. Her tüpe 500 µL yıkama tamponu eklendi ve 8.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
11. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
12. Her tüpe 500 µL yıkama tamponu eklendi ve 8.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
13. Toplama tüplerindeki sıvı döküldü ve tekrar 13.000 x g'de 10 saniye kısa santrifüj yapıldı.
14. Toplama tüpleri atıldı ve filtre içeren tüpler, 1,5ml'lik steril yeni mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi.
15. Her tüpe 72 °C'de bekleyen elusyon tamponundan 200 µL eklendi.

16. 8.000 x g'de 1 dk santrifüj yapıldı.

17. Filtreli tüpler atıldı ve filtreli tüplerin filtresinde emilmiş halde bulunan saf DNA, mikrosantrifüj tüplerin içindeki elüsyon tamponu içine süzölmüş oldu.

HGF İtron 8 A43839T SNP'nin Saptanması

Human HGF geni 8. intronunda gözlenen rs2286194 SNP (A43839T) için, National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, NCBI) veri tabanında tanımlanan bölge kullanıldı (153).

SNP analizi için, LightCycler® 2.0 gerçek-zamanlı PCR sistemi (Roche, Almanya) kullanıldı. Reaksiyon koşulları, "LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes" kiti kullanılarak optimize edildi. Öncelikle hedef bölge çoğaltıldı ve sonrasında ampikonun identifikasyonu erime eğrisi analizi ile yapıldı (LightCycler yazılım programı, versiyon 4.05).

Hedef SNP'nin belirlenmesi amacıyla, HGF intron 8'de hedef SNP bölgesini de içeren 392 baz çift (bç)'lik parçanın çoğaltılmasında kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin dizaynı Tıbbi Molbiol (Berlin, Almanya) tarafından yapıldı. Kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizilimleri Tablo-12'de gözlenmektedir.

Tablo-12: HGF A43839T (intron 8) SNP analizinde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemleri

HGF A43839T (intron 8) SNP belirlenmesinde kullanılan Primer ve İşaretli Problemlerin baz dizilimi	
Primer Sense	5'-CAGTAATTTTCTCGTAGGTCCCT-3'
Primer Antisense	5'TTCTACACAATATGTGGGCCAT-3'
Prob 43839 T için (donör-verici)	5'-GAGTTCTAACATTTTGGACTCA-3'--Flu
Prob Anchor (Acceptor-alıcı)	5'-LC-640-G+CTATAA+CAATTTAATATT+CAGTATA+CAT-3'--PH

Primerler ve hibridizasyon problemleri tasarlandıktan sonra, bu primer-prob setinin melting sıcaklığı (Erime derecesi, T_m) dereceleri ve bu setle çoğaltılacak hedef

bölgenin büyüklüğü baz alınarak, gerçek-zamanlı PCR protokolünün optimizasyon çalışmaları yapıldı. Aşağıda optimize edilen gerçek-zamanlı PCR reaksiyon karışımı ve protokolü yer almaktadır:

Gerçek Zamanlı PCR Protokolü:

Reaksiyon karışımı

Komponent	Hacim	Son konsantrasyon
Su	10,4µL	-
MgCl ₂ (25mM)	1,6 µL	3 µM
Primerler	1 µL	0.5 µM (herbiri)
Hibridizasyon Probları	1 µL	0.15µM (herbiri)
“HybProbe” reaksiyon karışımı	2 µL	
DNA örneği	2 µL	
Toplam hacim	20 µL	

Su, MgCl₂, primerler, proplar ve HybProbe reaksiyon karışımı (FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, nükleotid karışımı ve 10 mM MgCl₂) belirtilen sıra ile ve belirtilen miktarlarda karıştırıldıktan sonra, 18 µL hacimde olacak şekilde kapillere aktarıldı. Kapillere aktarılan her reaksiyon karışımı üzerine 2 µL DNA örneği eklendi. Negatif kontrol örneğinde DNA örneği yerine 2 µL “PCR-grade” su kullanıldı. Toplam 20 µL reaksiyon karışımı içeren kapillerler, karusel yardımı ile gerçek-zamanlı PCR ile hedef bölgenin çoğaltılması ve SNP analizi için LightCycler® 2.0 gerçek-zamanlı PCR sistemine yerleştirildi.

Gerçek-zamanlı PCR Protokolu

Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
“None”	1		95 °C	10 dk	“None”
Amplifikasyon					
“Quantification”	45	Denaturasyon	95 °C	10 sn	“None”
		Annealing	55 °C	15 sn	“Single”
		Ekstensiyon	72 °C	20 sn	“None”
Erime eğrisi					
“Melting curves”	1	Denaturasyon	95 °C	0 sn	“None”
		Annealing	37 °C	30 sn	“None”
		Melting	95 °C	0 sn	“Continuous”
slope=0.1°C/sn					
Soğutma					
“None”	1		40 °C	30 sn	“None”

***Pre-inkübasyon:** Enzim aktivasyonu ve kalıp DNA'nın denatürasyonu, **Amplifikasyon:** Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması, **Erime eğrisi:** Amplikona ait genotipin belirlenmesi (SNP analizi), **Soğutma:** Sistemde yer alan rotorun ve termal haznenin soğutulması basamaklarını içermektedir.

Optimize edilen protokolde belirtilen reaksiyon koşullarına göre, primerler kullanılarak HGF intron 8'de bulunan ve hedef SNP'yi içeren 392 bç'lik bölüm çoğaltıldı. Amplikonun varlığı, özgün hibridizasyon prob çifti kullanılarak floresans artışı ile belirlendi. Sistemdeki floresans değerinin ölçüm şekli izleyen paragrafta özetlenmektedir:

Özgün hibridizasyon prob çifti, çoğalan hedef bölgede yer alan dizilerle hibridize olabilen iki farklı oligonükleotitten oluşmaktadır. Bir prob, 5'-ucunda “LightCycler®Red 640-N-hydroxy-succinimide ester (Red 640-NHS ester)” ile

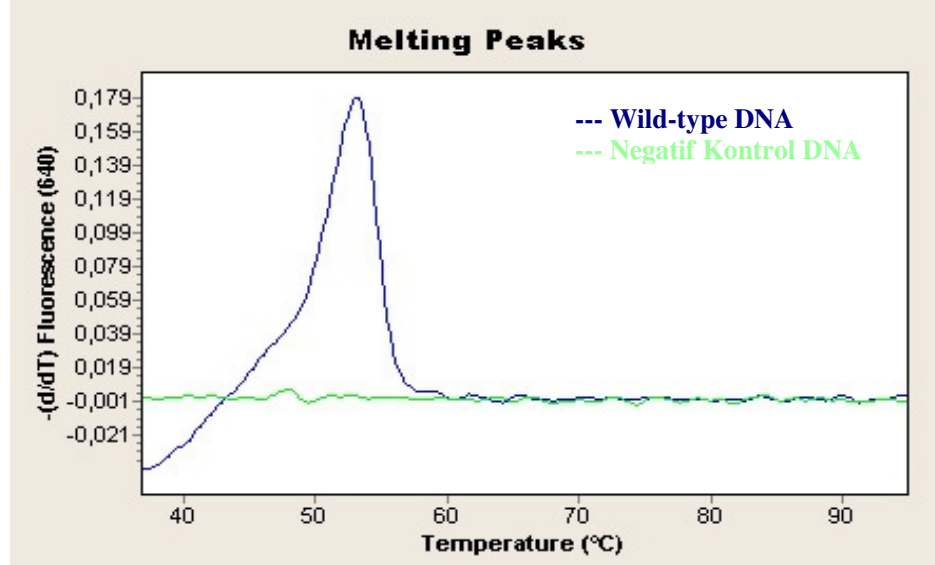
işaretlidir ve 3'-ucu fosforilasyonla modifiyedir. Diğer probun ise 3'-ucu floresans (Flu) ile işaretlidir. Hedef DNA'ya hibridize olduklarında, her iki prob birbirine oldukça yakındır ve bu iki floresan boya arasındaki yakınlaşma “floresans rezonan enerji transferi” (FRET)'ne neden olur . FRET sırasında, LightCycler 2.0 sisteminin ışık kaynağı tarafından floresans (donör florofor), ışığa yapmaktadır ve bu ışığa enerjisinin bir kısmı diğer florofora (akseptör florofor; Red 640-NHS estere) transfer edilir. Sistem, akseptör florofor tarafından salınan floresansı ölçmektedir.

Amplikonun varlığının belirlenmesinden sonra, amplikonun identifikasyonu için, yani SNP analizi için erime eğrisi analizi yapıldı. Bu aşamada, öncelikle sistemin ısısının 95°C'ye çıkmasına olanak sağlandı. Daha sonra ısı 37°C'den 95°C'ye çıkartıldı ve her 0.1°C'de sistemde varolan floresans için okuma yaptırıldı. LightCycler yazılım programı yardımıyla, her bir örneğe ait 640 dalga boyunda ölçülen floresansın negatif türevini ısıya göre değerlendiren ve amplikona ait erime derecesini (T_m) gösteren grafik elde edildi.

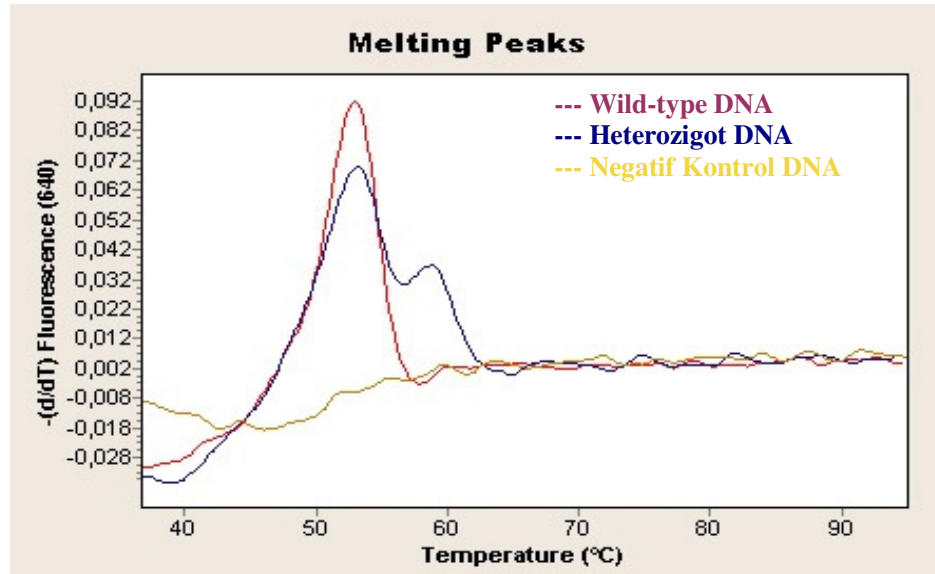
Erime eğrisi analizi sırasında, artan ısı floresansda azalmaya neden olacaktır ve iki probdan daha kısa olanı daha önce ayrılacaktır. Sonuçta iki prob arasındaki yakınlaşma uzun süre devam etmeyecektir. Eğer hedef bölgede nükleotid değişimi varsa, hedef bölge ile bu probunun bozuk eşleşmesi hibridi stabilize edecek ve böylece floresansdaki azalma daha düşük derecelerde gerçekleşecek ve daha düşük T_m derecesine sahip olacaktır. Nükleotid değişimi yoksa, hedef bölge ile diğer probun normal biçimde eşleşmesi gerçekleşecek ve böylece prob ile eşleşen DNA, daha yüksek T_m'e sahip olacaktır. Heterozigot durumunda, her iki T_m'de de eğri gözlenecektir.

Gerçek-zamanlı PCR optimizasyon çalışması tamamlandıktan sonra, yukarıda belirtildiği şekilde, kontrol ve hasta grubu DNA örneklerinde HGF intron 8 A43839T tek nükleotid polimorfizm analizleri yapıldı. Çalışmamızda TT allele özgün prob (mutasyon probu) kullanıldı. Beklenildiği şekilde, mutasyon probuna eşlenik olan dizinin erime derecesi (T_m) daha yüksek oldu ve 58 ± 1 °C olarak saptandı. Mutasyon probuna komplementer olmayan alleli taşıyan, dolayısıyla bu prob ile eşleşmeyen veya bozuk eşleşme gösteren dizinin erime ısısı daha düşüktü ve

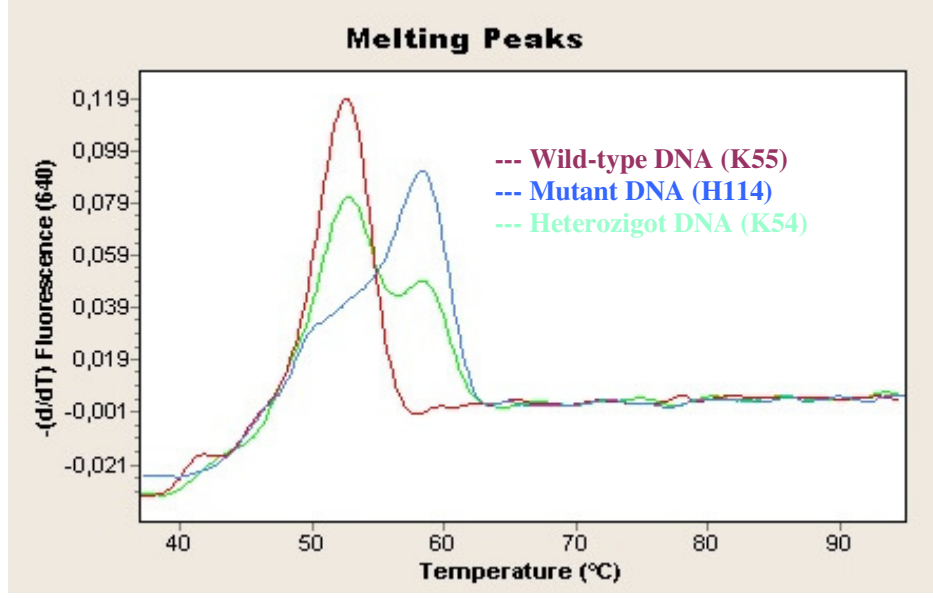
52 ± 1°C olarak belirlendi. Buna göre, yalnız 52°C’de erime eğrisi gözlenen örnekler AA (Wild type-normal), 52 °C ve 58 °C’de erime eğrisi gözlenen örnekler AT (heterozigot), 58 °C’de erime eğrisi gözlenen örnekler TT (mutant) olarak kabul edildi (Şekil-11, Şekil-12 ve Şekil-13).



Şekil-11: HGF intron 8’de A43839T SNP analizi için RT-PCR ile elde edilen wild-type (normal) bireye ve negatif kontrole ait erime eğrisi analizi.



Şekil-12: HGF intron 8’de A43839T SNP analizi için RT- PCR ile elde edilen wild-type (normal) bireye, heterozigot bireye ve negatif kontrole ait erime eğrisi analizi.



Şekil-13: HGF intron 8’de A43839T SNP analizi için RT- CR ile elde edilen wild-type (normal) bireye, heterozigot bireye ve mutant bireye ait erime eğrisi analizi.

Serum HGF düzeyleri Quantikine (R&D System, ABD) ELISA kiti kullanılarak manuel olarak ölçüldü. Kullanılan yöntem kantitatif sandviç enzim immün ölçüm yöntemidir. Örnekteki HGF özgün bir katı faz monoklonal antikor ve poliklonal bir enzim-antikor konjugatına bağlanır. Böylece HGF molekülü katı faz ve enzim işaretli antikor arasında sandviç oluşturur. Bağlı olmayan enzim işaretli antikor ve örnek uzaklaştırıldıktan sonra plaka enzim substratı ile inkübe edilerek renk oluşumu sağlanır. Oluşan renk örnekteki HGF konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kitle Sağlanan Reaktifler

- Hu HGF (insan hepatosit büyüme faktörü) Standard
- HGF Konjugat (horseradish peroxidase ile işaretlemiş poliklonal antikor)
- Ölçüm Dilüenti (tamponlanmış protein baz)
- Kalibratör Dilüent
- Yıkama Tamponu
- Renk reaktifi A(Stabilize Hidrojen peroksit)
- Renk reaktifi B (stabilize kromojen)

- Stop Çözeltisi (2 N sülfirik asit.)
- Adheziv stripler, plaka örtüsü

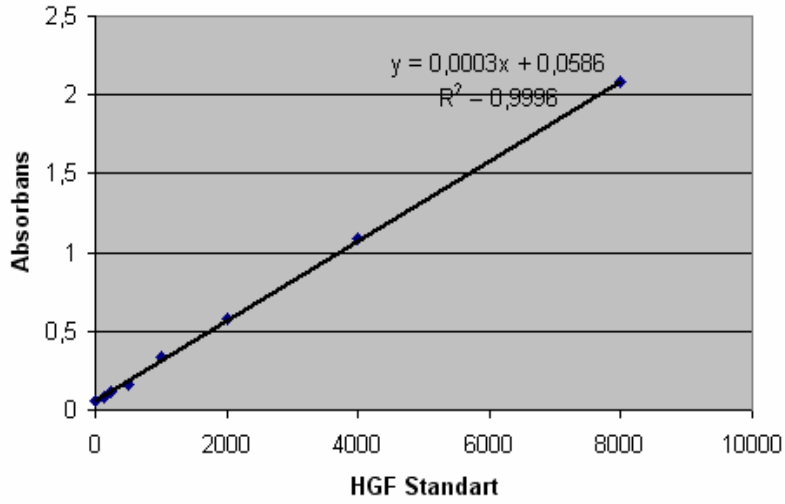
Kullanılmadan önce tüm reaktifler oda ısısına getirildi.

Kit kılavuzunda verilen analiz basamakları aşağıdaki gibidir:

- HGF için spesifik monoklonal antikorlar ile kaplanmış kuyucuklara 150 µL ölçüm diüenti pipetlendi.
- Ardından her kuyucuğa 50 µL standart ve serum örneklerinden eklendi.
- Plakaların kapağı kapatılarak 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası kuyucuklar 400 µL yıkama tamponu ile toplam 4 kez yıkandı.
- Ardından her kuyucuğa 200 µL HGF konjugatı eklendi ve yeni bir plaka kapağı kapatılarak oda ısısında 2 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası kuyucuklar 400 µL yıkama tamponu ile toplam 4 kez yıkandı.
- Kuyucukların her birine 200 µL substrat çözeltisi eklendi ve plakaların üstü kapatılıp ışıktan korunarak 30 dk. oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µL stop çözeltisi ilave edildi ve kuyucuklardaki renk değişikliği gözlemlendi.
- 30 dk. içinde her kuyucuğun optik dansitesi ELISA mikroplak okuyucu ile 450 nm dalga boyunda okundu.

Referans aralığı : 671 – 1992 pg/mL

HGF standartları kullanılarak hazırlanmış kalibrasyon eğrisine göre serum HGF düzeyleri hesaplandı (Şekil-14).



Şekil-14: HGF Kalibrasyon eğrisi

Yüksek Duyarlı C-Reaktif Protein (hsCRP)

Yüksek duyarlılıkta C-reaktif protein lateks immunölçüm yöntemiyle ölçüldü. Lateks partiküllere emdirilmiş olan poliklonal anti-C reaktif protein antikorları ile örnekteki CRP arasında antijen-antikor reaksiyonu meydana gelir. Oluşan antijen-antikor kompleksi çöker. Bu çökme absorbans değişimi olarak belirlenir. 580 nm dalga boyunda absorbansdaki değişikliğin büyüklüğü ile örnekteki hsCRP düzeyi orantılıdır.

Yüksek duyarlılıkta C-reaktif protein ölçümü için öncelikle hsCRP kiti, Abbott-8200i analizörüne uyarlandı. Öncelikle iki düzeyli kontrol serumu ölçümü ile testin analitik performansı değerlendirildi. Ardından hasta örnekleri çalışıldı. hsCRP kontrol serumu ölçüm sonuçları Tablo-13'te görüldüğü gibidir.

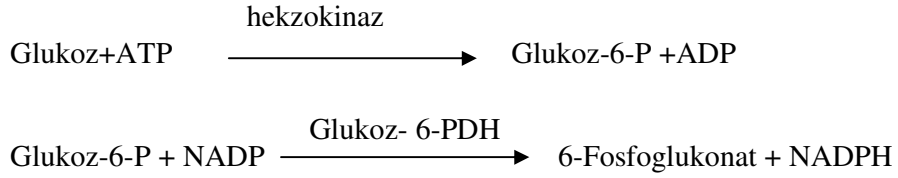
Tablo-13: hsCRP kontrol serumu ölçüm değerleri

Analit	Kontrol Serumu Ölçüm Değerleri			
	Kontrol düzeyi	Hedef Değer	n	Ölçülen Değer
hsCRP (mg/dL)	Düzye 1	0,045 – 0,055	1	0,05
	Düzye 2	1,27– 1,31	1	1,3

Referans değerler: ≤ 0.5 mg/L

Glukoz

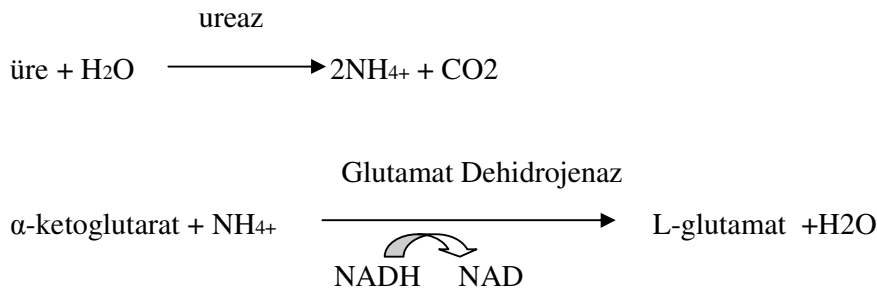
Glukoz Hezkokinaz/G-6-PDH (glukoz 6 fosfat dehidrojenaz) enzimatik spektrofotometrik yöntemi ile ölçüldü. Glukoz hezkokinaz ile ATP ve Mg^{2+} iyonu varlığında fosforillenir ve glukoz-6-fosfat ve ADP oluşur. Glukoz 6 fosfattan, G6PDH ile spesifik olarak 6-fosfoglukonat oluşurken nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) de indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'e indirgenir. Tüketilen her mikromol glukoz için bir mikromol NADH üretilir. Bu sırada oluşan absorbans farkı 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.



Referans Aralığı:70-105 mg/dL (3.89 - 5.83 mmol/L)

Üre

Üre azotu analizi kinetik enzim yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntemde örnekteki Üre üreaz ile amonyak ve karbondioksit (CO_2) hidrolize edilir. İkinci reaksiyonda glutamat dehidrojenazın katalizlediği bir reaksiyonla amonyak ve α -ketoglutarat, glutamat ve suya dönüştürülürken eş zamanlı olarak indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) nikotinamid adenin dinükleotite (NAD) okside olur. Mevcut her bir mol üre için iki mol NADH okside olur. 340 nm de absorbanstaki azalmanın başlangıç derecesi örnek üre konsantrasyonu ile orantılıdır.



Ölçülen üre nitrojeni cihaza girilen formül ile üreye çevrilir.

mg/dL üre nitrojen \times 2.14 = mg/dL üre

Referans aralığı: Kadınlarda 20,9-43 mg/dL

Erkeklerde 17,9- 54,9 mg/dL

Kreatinin

Kreatinin kinetik kolorimetrik yöntem ile ölçüldü. Bu ölçüm yöntemi Alkali pH'da örnek içindeki kreatininin pikrat ile reaksiyona girerek kreatinin-pikrat kompleksini oluşturmasına dayanmaktadır. Bu kompleksin oluşumundan dolayı 500 nm'de absorbansın artma derecesi örnek kreatinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

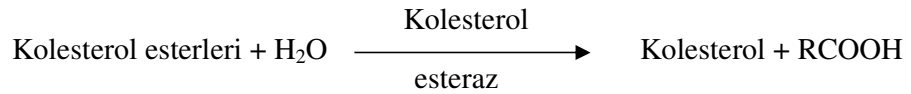
Kreatinin+ Pikrik asit $\xrightarrow{\text{Alkalın çözelti}}$ kreatinin pikrat (kırmızı renkli)

Referans aralığı : Kadınlarda 0.6 -1.1mg/dL (53 – 97 umol/L)

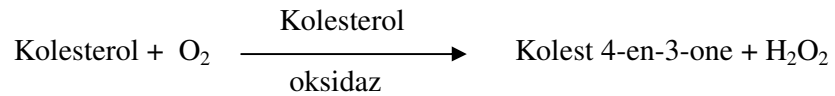
Erkeklerde 0.7 -1.3 mg/dL (62- 115 μ mol/L)'dir.

Total Kolesterol

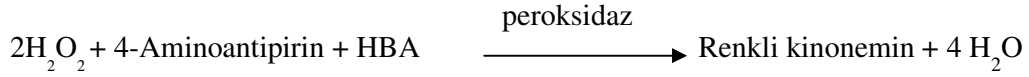
Total kolesterol enzimatik kolorimetrik yöntemle ölçüldü. Kolesterol, kolesterol esteraz ile serbest kolesterol ve yağ asidi oluşturacak şekilde parçalanır.



Kolesterol, kolesterol oksidazın yardımı ile oksijen tarafından kolest-4-en-3-one ve hidrojen peroksite dönüştürülür.



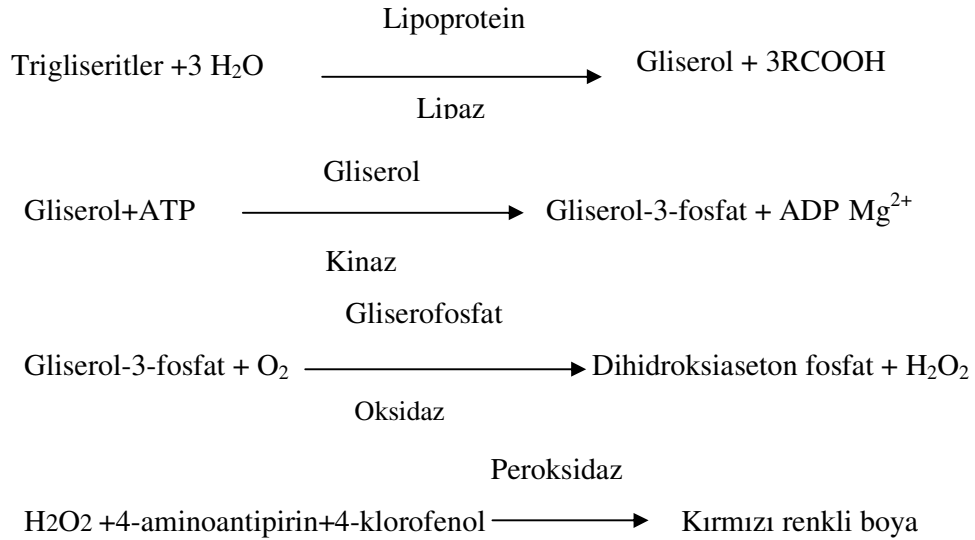
Açığa çıkan hidrojen peroksidin 4-aminoantipirin ve hidroksibenzoik asitle (HBA) birleşmesiyle renkli bir bileşik olan kinonemin meydana gelir. Renkli bileşiğin absorbanası 500 nm de spektrofotometrik olarak okunur.



Referans Aralığı: < 200 mg/dl (5.18 mmol/L)'dir.

Trigliserid

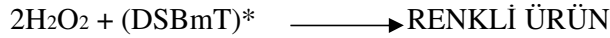
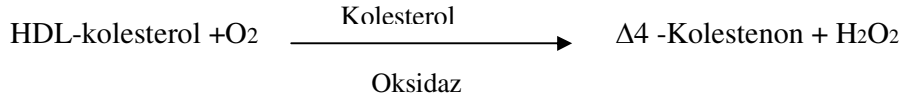
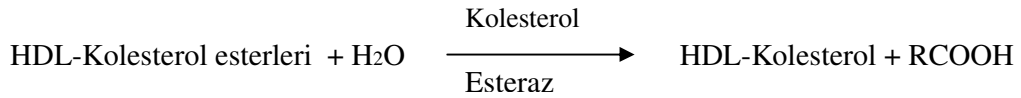
Ölçüm enzimatik kolorimetrik yöntemle yapıldı. Bu yöntemde trigliseritler enzimatik olarak lipaz ile serbest yağ asitleri ve gliserole hidroliz olur. Gliserol'ün gliserol kinaz ile Adenozin trifosfat (ATP) tarafından fosforillenmesiyle gliserol-3-fosfat ve adenozin difosfat (ADP) üretilir. Gliserol fosfat gliserol fosfat oksidaz ile dihidroksiaseton fosfata oksidize olur ve aynı zamanda hidrojenperoksit oluşur. Peroksidaz ike katalizlenen renk reaksiyonunda H₂O₂, 4-aminoantipirin (4-AAP) ve 4-klorofenol (4-CP) ile renkli bir bileşik oluşturur. Bu rengin absorbanası örnekte bulunan trigliserid konsantrasyonu ile orantılıdır.



Referans değerleri: <150 mg/dL (1.70 mmol/L)

HDL Kolesterol

HDL-K hızlandırıcı seçici deterjan yöntemi ile ölçüldü. Bu yöntem özgün bir deterjan kullanımı seçilerek çözünen HDL kolesterol ve HDL içermeyen esterleşmemiş kolesterol ile kolesterol oksidazın hızlandırılmış reaksiyonuna dayanır. İlk reaktif içinde HDL içermeyen esterleşmemiş kolesterol enzim reaksiyonuna tabi olur ve üretilen peroksit, N, N-bis (4-sulphobutyl)-m-toluidine-disodium (DSBmT) renksiz ürünü ile peroksidaz reaksiyonu tarafından tüketilir. İkinci reaktif HDL kolesterolü çözebilen bir deterjan, kolesterol esteraz ve HDL Kolesterolün miktarının belirlenmesi için renk geliştiren bir kromojenik bağlayıcıdan oluşur. Oluşan renkli bileşiğin verdiği absorbans spektrofotometrik olarak ölçülür.



*DSBmT: N, N-bis (4-sulphobutyl)-m-toluidine-disodium

Referans aralığı : 40-60 mg/dL

VLDL Kolesterol ve LDL Kolesterol

VLDL- Kolesterol ve LDL Kolesterol düzeyi "Friedwald" formülüne göre hesaplandı. Serum trigliserid düzeyi 400 mg/dL'nin üzerinde olduğu zaman bu formül kullanılmamaktadır.

$$\text{VLDL-kolesterol} = \text{Trigliserid}/5$$

$$\text{LDL-kolesterol} = \text{Total kolesterol} - [(\text{HDL-kolesterol}) + (\text{Trigliserid}/5)]$$

VLDL-kolesterolün referans aralığı erkeklerde 8-32 mg/dL(0,20-0,82 mmol/L), kadınlarda 7-47 mg/dL (0,18-1,20 mmol/L)'dir.

LDL-kolesterolün referans aralığı 65-175 mg/dL (1,68-4,50 mmol/L)'dir.

Hemoglobin A1c (HbA1c)

HbA1c iyon değişimi yöntemi ile HPLC cihazında çalışıldı.

Referans aralığı: %4,4-6,1

KALİTE KONTROL SONUÇLARI

Çalışmanın yürütüldüğü süre içinde glukoz, üre, kreatinin, total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserid ve HbA_{1c} analitlerinin ölçümünde iç kalite kontrol ve dış kalite değerlendirme programları sonuçları değerlendirildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS 15.0 (Chicago,ABD) paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Düzeyler aritmetik ortalama \pm standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) ve ortanca (minimum-maksimum) olarak belirtildi.

Normal dağılıma uyan ölçümsel analitlerin gruplar arasındaki farkı tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile değerlendirildi ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) olarak belirtildi. Normal dağılıma uymayan ölçümsel analitlerin gruplar arasındaki farkı Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirildi ve sonuçlar ortanca olarak belirtildi. Tüm istatistiksel analizler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Belirlenen farkın hangi gruplar arasında olduğunu saptamak için parametrik koşulları sağlayan verilere post-hoc testlerden (çoklu karşılaştırma testleri) Tukey testi, karşılamayan verilere de Bonferonni düzeltmeli Mann Whitney U testi uygulandı. Ölçümsel olmayan değişkenler için Kikare testi kullanıldı.

Değişkenler arasındaki ilişkinin gücünü belirlemek amacıyla korelasyon analizi yapıldı. Korelasyon analizinde r (Pearson korelasyon katsayısı) değeri 0,000-0,49 aralığı zayıf ilişki, 0,50-0,69 aralığı orta ilişki, $\geq 0,70$ olanlar güçlü ilişki olarak kabul edildi.

BULGULAR

Kalite Kontrol Sonuçları

Çalışmanın yürütüldüğü sürede (Haziran – Temmuz 2008) glukoz, üre, kreatinin, total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit, ve HbA_{1c} iç kalite kontrol sonuçları Tablo-14’te gözlenmektedir.

Tablo-14: Biyokimyasal testlerin analitik performansı

Analit	Kontrol düzeyi	Hedef Değer	n	X _{ort}	±SD	% CV
Glukoz (mg/dL)	Düzye 1	82,7 – 96,9	50	89,9	4,6	5,0
	Düzye 2	274,3 - 321,7	49	299,8	8,2	2,7
HbA _{1c} (%)	Düzye 1	5,2 – 6,4	20	5,7	0,20	3,5
	Düzye 2	8,3 – 10,7	18	9,8	0,21	2,1
HDL-kol. (mg/dL)	Düzye 1	62,5 –76,5	48	69,1	5,6	8,2
	Düzye 2	30,9 – 37,8	46	33,1	1,12	3,4
hsCRP (mg/dL)	Düzye 1	0,045 – 0,055	1	0,05	-	-
	Düzye 2	1,27– 1,31	1	1,3	-	-
Kreatinin (mg/dL)	Düzye 1	1,8 – 2,3	51	1,96	0,061	3,1
	Düzye 2	5,44 – 6,78	50	5,9	0,2	3,3
T.kolesterol (mg/dL)	Düzye 1	246 – 282	51	265,4	4,6	1,7
	Düzye 2	93 – 107	50	101,3	1,8	1,7
Trigliserit (mg/dL)	Düzye 1	166,5 – 199,5	54	191,5	3,7	1,9
	Düzye 2	76,4 – 91,6	53	88,7	1,3	1,5
Üre (mg/dL)	Düzye 1	27 – 37	50	33,3	0,72	2,17
	Düzye 2	88- 114	46	103,5	2,2	2,1

Çalışmanın yürütüldüğü sürede (Haziran – Temmuz 2008) glukoz, üre, kreatinin, total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit analitlerinin dış kalite kontrol sonuçları Tablo-15 ve Tablo-16’da gözlenmektedir.

Tablo-15: Biyokimyasal testlerin Haziran 2008 dış kalite kontrol sonuçları

Tarih	24.06.2008		
Analit	Bizim Sonucumuz (mg/dL)	Grup Ortalama Değeri (mg/dL)	SDI
Glukoz	125,0	129,0	-0,81
HDL-kol.	43	35,3	+ 1,77
Kreatinin	2,65	3,67	- 0,17
T.kolesterol	160,0	160,0	+0,07
Trigliserid	88,0	88,4	-0,11
Üre	65,0	64,9	+ 0,05

Tablo-16: Biyokimyasal testlerin Temmuz 2008 dış kalite kontrol sonuçları

Tarih	29.07.2008		
Analit	Bizim Sonucumuz (mg/dL)	Grup Ortalama Değeri (mg/dL)	SDI
Glukoz	145,0	137,0	+ 1,75
HDL-kol.	63	60,3	+ 0,57
Kreatinin	7,4	7,23	+ 0,40
T.kolesterol	152	154	- 0,33
Trigliserid	88	84,1	+1,08
Üre	67	60,5	+0,17

Çalışma Gruplarının Özellikleri

Çalışma kapsamına alınan sağlıklı kontrollerin ve Diabetes Mellituslu normotansif (DM), Diabetes Mellituslu Hipertansif (DM+HT) hasta grubunun antropometrik özellikleri Tablo-17’de, ölçüm sonuçları Tablo-18’de, ölçüm sonuçlarının hasta grupları arasındaki farklılıkları Tablo-19’da gözlenmektedir.

Tablo-17: Kontrol ve hasta gruplarının antropometrik özellikleri.

Demografik Özellik	Kontrol (n = 63) ortalama ± SD ortanca (min- maks)	DM Hasta Grubu (n = 60) ortalama ± SD ortanca (min- maks)	DM+HT Hasta Grubu (n = 60) ortalama ± SD ortanca (min- maks)
Yaş (yıl)	44,2 ± 8,3 45 (24-63)	49,85 ± 9,3 50 (35-77)	56,35 ± 9,7 58 (33-76)
Cinsiyet [n(%)]			
Erkek	30 (%47,6)	30 (%50)	30 (%50)
Kadın	33 (%52,4)	30 (%50)	30 (%50)
VKİ* (kg/m ²)	26,2 ± 3,8 25,9 (18,6-37,1)	28,0 ± 4,3 27,4 (19,6-40,0)	29,7 ± 4,9 29,3 (22,2-49,1)
Sigara [n(%)]			
İçiyor	23 (36,5)	12 (%20)	10 (%16,7)
İçmiyor	40 (63,5)	48 (%80)	50 (%83,3)
İlaç	**OAD	46 (%76,7)	***
Kullanımı	İnsülin	14 (%23,3)	***
[n(%)]			
OAD+Anti hipertansif			44 (%73,3)
İnsülin+ Anti hipertansif			16 (26,7)
Diyabet Süresi (yıl)	–	5,1 ± 5,5 3 (1-23)	8,4 ± 7,6 6 (1-40)

*: Vücut kütle indeksi, **: oral antidiyabetik, ***: DM+HT grubu hastaların tümü bir alt satırda belirtildiği gibi oral antidiyabetik veya insülin tedavisine ek olarak antihipertansif ilaç kullanmaktadır.

Tablo-18: Kontrol ve hasta gruplarının ölçüm sonuçları

Ölçümler	Kontrol (KG) (n = 63) ortalama ± SD ortanca (min-maks)	DM Hasta Grubu (n = 60) ortalama ± SD ortanca (min-maks)	DM+HT Hasta Grubu (n = 60) ortalama ± SD ortanca (min-maks)
Diastolik Kan Basıncı (mmHg)	73,8 ± 6,5 75 (60-80)	74,7 ± 6,4 75 (60-90)	85,3 ± 10,8 85 (70-120)
Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	114,1 ± 11,5 115 (90-130)	117,5 ± 11,0 120 (90-130)	140,7 ± 22,2 140 (100-180)
Glukoz (mg/dL)	88,9 ± 9,4 88 (61-112)	133,5 ± 57,8 116 (51- 396)	146,2 ± 67,4 122 (74 - 488)
HbA _{1c} (%)	5,3 ± 0,4 5,4 (4,1-6,1)	6,5 ± 1,3 6,2 (4,9-10,6)	6,6 ± 1,6 6,3 (5,0-14,0)
HDL-Kolesterol (mg/dL)	43,9 ± 10,1 44,0(25-69)	45,2 ± 13,7 45,5(21-89)	42,7 ± 11,2 41,0(23-68)
HGF (pg/mL)	1131,9 ± 361,1 1138 (318-2091,3)	1285,0 ± 427,6 1195(631,3-2841,3)	1510,0 ± 510,9 1421,3 (664,7-2888,0)
hsCRP (mg/dL)	0,13 ± 0,2 0,07 (0,001-1,4)	0,15 ± 0,2 0,08 (0,001-0,7)	0,42 ± 1,7 0,11 (0,010- 13,0)
Kreatinin (mg/dL)	0,86 ± 0,2 0,85 (0,54-1,26)	0,80 ± 0,2 0,79 (0,49-1,19)	0,89 ± 0,3 0,88(0,50-1,86)
LDL-Kolesterol (mg/dL)	120,7 ± 30,6 119(68-192)	102,2 ± 26,8 102(51-180)	98,8 ± 29,5 92,5(41-159)
Total kolesterol (mg/dL)	189,0 ± 36,4 192 (120-270)	180,0 ± 32,6 176(128-259)	176,5 ± 37,9 174,5(102-245)
Trigliserit (mg/dL)	120,7 ± 66,3 109 (30-357)	162,2 ± 103,2 137 (17 - 543)	175,4 ± 99,9 155 (37 - 565)
ÜRE (mg/dL)	26,8 ± 8,7 26,0 (12-54)	28,2 ± 8,3 26,5 (14-52)	34,8 ± 13,3 31,8 (14-79)
VLDL-Kolesterol	24,4 ± 12,9 22,0(6-71)	33,0 ± 20,3 28,5(6-108)	34,8 ± 19,0 31,0(7-97)

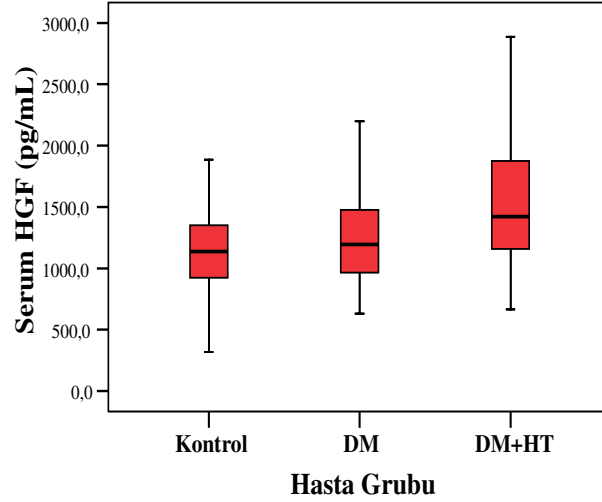
DM: Diabetes Mellitus, DM+HT: Diabetes Mellitus ve Hipertansiyon, KG: Kontrol, n:olgu sayısı, HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein, VLDL: çok düşük yoğunluklu lipoprotein, hsCRP: yüksek duyarlılık C-reaktif protein, HGF: Hepatosit büyüme faktörü

Tablo-19: Hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar

KONTROL		DM		DM+HT	
KONTROL	VKİ	p= 0.000	VKİ	p= 0.000	
	Glukoz	p= 0.000	Sistolik KB	p= 0.000	
	HbA1c	p= 0.000	DiastolikKB	p= 0,000	
	LDL-Kol	p= 0.000	Glukoz	p= 0.000	
			HbA1c	p= 0.000	
			HGF	p= 0.000	
			hsCRP	p= 0.045	
			LDL	p= 0.000	
			TG	p= 0,001	
			Üre	p= 0,000	
DM	VKİ	p= 0.000	Sistolik KB	p= 0.000	
	Glukoz	p= 0.000	Diastolik KB	p= 0,000	
	HbA1c	p= 0.000	HGF	p= 0.013	
	LDL-Kol	p= 0.000	Kreatinin	p= 0,014	
	Sigara içimi	p=0,043	Üre	p= 0,000	
DM+HT	VKİ	p= 0.000	Sistolik KB	p= 0.000	
	Sistolik KB	p= 0.000	DiastolikKB	p= 0,000	
	DiastolikKB	p= 0,000	HGF	p= 0.013	
	Glukoz	p= 0.000	Kreatinin	p= 0,014	
	HbA1c	p= 0.000	Üre	p= 0,000	
	HGF	p= 0.000			
	hsCRP	p= 0.017			
	LDL	p= 0.000			
	Sigara içimi	p=0,013			
	TG	p= 0,001			
	Üre	p= 0,000			

Çalışma grubu bireyleri belirli kriterlere göre yaş gruplarına ayrıldı (20-25, 26-30 ve 31-40 yaş aralıkları ile 18-40, 41-60 ve >60 grupları). Bu yaş gruplarının HGF değerleri kontrol, DM ve DM+HT gruplarında ayrı ayrı karşılaştırıldı. Tüm gruplar arasında HGF düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,190).

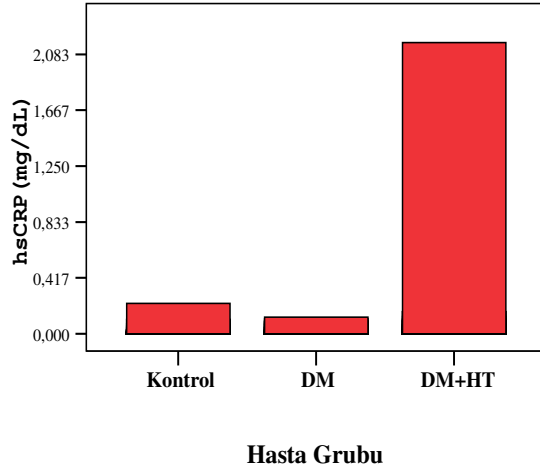
Dağılımları Şekil-15’de gözlenmekte olan gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildiğinde serum HGF düzeyi DM+HT grubunda (Ort \pm SD, 1510 \pm 510,9 pg/mL) hem DM (Ort \pm SD;1285 \pm 427,6 pg/mL) hem de KG’den (Ort \pm SD; 1131,9 \pm 361,1 pg/mL) anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p = 0,0001) .



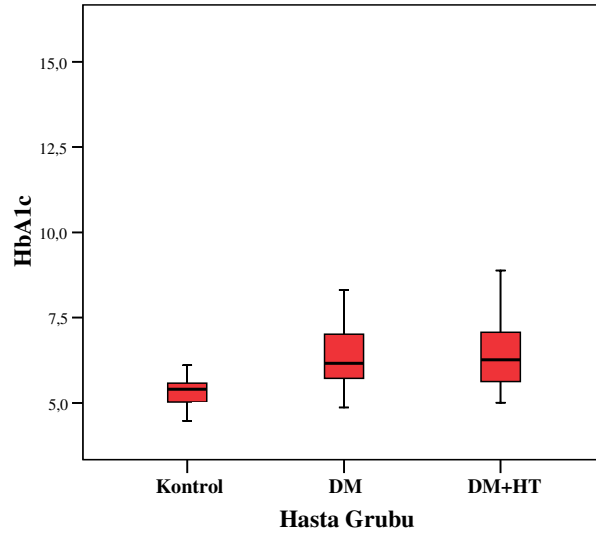
Şekil-15: Hasta ve kontrol gruplarında serum HGF düzeyi

Dağılımları Şekil-16’da gözlenmekte olan gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildiğinde Serum hsCRP düzeyi (Ort \pm SD) DM+HT grubunda (0,41 \pm 1,7), kontrol grubundan (0,13 \pm 0,2) anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p= 0,017).

Dağılımları Şekil-17’de gözlenmekte olan gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildiğinde, HbA1c düzeyleri (Ort \pm SD) DM (6,5 \pm 1,3) ve DM+HT (6,6 \pm 1,6) gruplarında kontrol grubundan (5,3 \pm 0,4) anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p = 0,0001) .



Şekil-16: Hasta ve kontrol gruplarında serum hsCRP düzeyi



Şekil-17: Hasta ve kontrol gruplarında serum HbA1c düzeyleri

HbA1c düzeyi iyi kontrollü ($HbA1c < 7\%$) ve kötü kontrollü ($HbA1c > 7\%$) bireylerin serum HGF ve hsCRP düzeylerinin hasta alt grupları ve tüm hasta grupları arasındaki dağılımı Tablo-20 ve Tablo-21’de gösterilmektedir.

Tablo-20: Hasta alt gruplarında HbA1c yüzdesine göre serum HGF ve hsCRP düzeyleri

Analit	DM		DM+HT	
	Serum HGF (pg/mL) Ort±SD Min-Maks (n)	hsCRP (mg/dl) Ort±SD Min-Maks (n)	Serum HGF (pg/mL) Ort±SD Min-Maks (n)	hsCRP (mg/dl) Ort±SD Min-Maks (n)
HbA1c<%7	1257,1±447,1 631,3-2841,3 (45)	0,15±0,17 0,001-0,67 (45)	1477±516,0 708-2888 (43)	0,48±1,97 0,020-13,02 (43)
HbA1c>%7	1368 ± 363,8 891,3-2178,0 (15)	0,18±0,21 0,001-0,74 (15)	1593,5±503,6 664,7-2408 (17)	0,27±0,3 0,10-0,98 (17)
p	0,386	0,694	0,431	0,588

Tablo-21: Tüm hasta gruplarında HbA1c yüzdesine göre serum HGF ve hsCRPdüzeyleri

Analit	[DM+(DM+HT)]	
	Serum HGF (pg/mL) Ort±SD Min-Maks (n)	hsCRP (mg/dl) Ort±SD Min-Maks (n)
HbA1c<%7	1364,6±491,8 631,3-2888 (88)	0,3±1,4 0,001-0,98 (88)
HbA1c>%7	1488,1±451,3 664,7-2408 (32)	0,23±0,26 0,001-13,02 (32)
p	0,216	0,483

Tüm çalışma grubu verileri HbA1c grupları arasında değerlendirildiğinde, serum HGF (p=0,014), trigliserid (p=0,002) ve VLDL-kol (p=0,002) düzeyleri

HbA1c>7 grubunda (n=32), HbA1c<7 grubundan (n=151) anlamlı derecede yüksek bulundu.

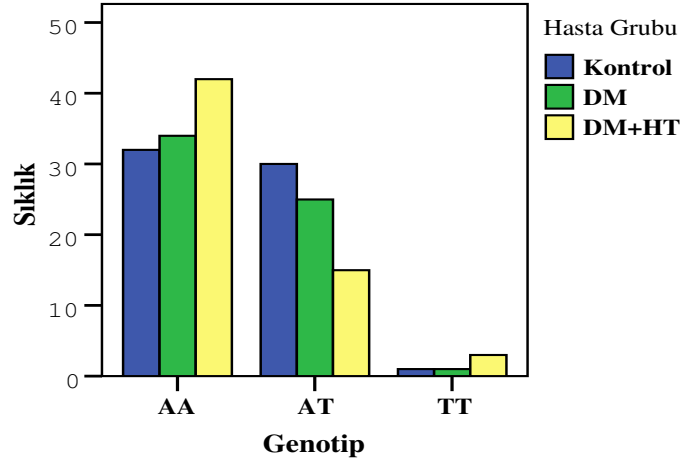
Çalışma grubundaki HGF intron 8 A43849T polimorfizminin genotip dağılımı Tablo-22 ve Şekil-18’de, allel sıklıkları da Tablo-23 ve Şekil-19’da gözlenmektedir.

Çalışma grubundaki allel sıklığı Hardy-Weindberg eşitliğine göre beklenen sıklıktan anlamlı farklılık göstermedi ($\chi^2=1,29$, $p = 0,797$; A/T allel sıklığı= 0,781/0,219).

Çalışma gruplarındaki genotip dağılımları ve allel sıklığı Kikare varyans analizi ile test edildi. Hasta grupları ve kontrol grubunda AA genotipi sayı olarak daha fazla görülmesine karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,089$) (Tablo-22, Şekil-18). Tüm çalışma grupları içinde A allel sıklığı sayı olarak daha fazla gözlenmesine karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,319$) (Tablo-23, Şekil-19).

Tablo-22: HGF A43839T polimorfizminin genotipik dağılımı

Hasta Grubu	HGF A43839T			χ^2	p
	AA n(Sıklık)	AT n(Sıklık)	TT n(Sıklık)		
Kontrol (n:63)	32 (0,508)	30 (0,476)	1 (0,016)	8,068	0,089
DM (n:60)	34 (0,567)	25 (0,417)	1 (0,017)		
DM+HT (n:60)	42 (0,700)	15 (0,250)	3 (0,050)		
Toplam (n:183)	108 (0,590)	70 (0,383)	5 (0,027)		

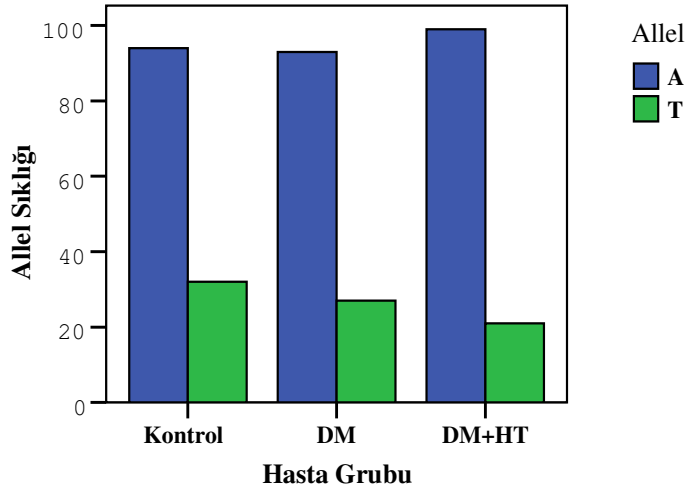


Şekil-18: Hasta gruplarına göre genotip dağılımı

Tablo-23: HGF A43839T polimorfizminde allel sıklığı

Hasta Grubu	A n(sıklık)	T n(sıklık)	χ^2	p
Kontrol	94(0,746)	32 (0,254)	2,287	0,319
DM	93 (0,775)	27(0,225)		
DM+HT	99 (0,825)	21 (0,175)		
Toplam	286 (0,781)	80 (0,219)		

Genotip dağılımları ve allel sıklığı cinsiyete göre de anlamlı bir farklılık göstermedi ($p=0,051$)



Şekil-19: Hasta Grupları Arasında Allel Sıklığı

Genotipik ve allelik farklılıklara göre hasta ve kontrol grupları arasında serum HGF düzeyleri Tablo-24'te belirtilmektedir.

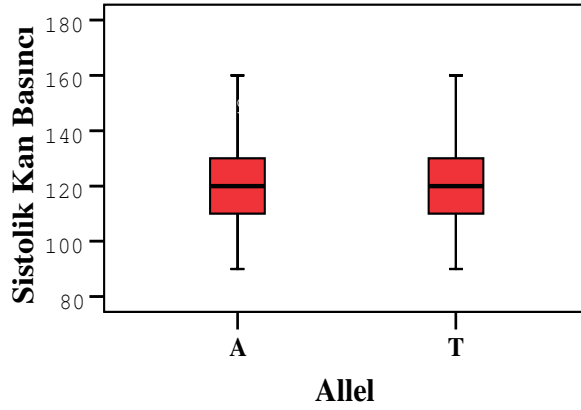
Tablo-24: Genotipik ve Allelik farklılıklara göre serum HGF düzeyi.

	Kontrol		DM		DM+HT		P (gruplar arası)
	n	HGF (pg/mL) Ort±SD Min-maks	n	HGF (pg/mL) Ort±SD Min-Maks	n	HGF (pg/mL) Ort±SD Min-Maks	
A	94	1130±361,1 318,0-2091,3	93	1282,5±415,0 631,3-2841,3	99	1490,5±470,7 664,7-2654,7	0,000
T	32	1137,3±361,0 331-2091,3	27	1293,7±469,1 764,7-2841,3	21	1602,1±666,3 664,7-2888	0,005
P (grup içi)		0,922		0,885		0,363	
AA	32	1127,8±361,2 318-2084,7	34	1265,6±398,2 631,3-2198,0	42	1522,4±470,5 708-2654,7	0,000
AT	30	1134,8±373,1 331,3-2091,3	25	1328±470,4 764,7-2214,7	15	1311±462,1 664,7-2214,7	0,202
TT	1	1174,6	1	858,0	3	2329,1±602,2 1691,3-2888	0,255
P (grup içi)		0,990		0,523		0,05	

AA genotipli bireylerde DM+HT grubunda serum HGF düzeyi hem DM (p=0,024) hem de kontrol grubundan (p=0,0001) anlamlı olarak yüksek bulundu. AT genotipli bireylerde ise serum HGF düzeyi açısından çalışma grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo-24).

A allel grubunda DM+HT grubunda serum HGF düzeyi hem kontrol grubundan (p= 0,0001) hem de DM grubundan (p=0,002) anlamlı olarak yüksek bulundu. Ayrıca A allel grubunda DM grubunun serum HGF düzeyi kontrollerden anlamlı olarak daha yüksekti (p=0,036).

A allelli bireylerde sistolik kan basıncı (Ort±SD) (125,2±20,2) T allelli bireylerden (119 ±16,4) anlamlı olarak daha yüksekti (p= 0,027) (Şekil-20).



Şekil-20: Allellik farklılığa göre sistolik kan basıncı

A allelli bireylerde sistolik kan basıncı ≥ 140 mmHg olan bireylerde serum HGF düzeyi sistolik kan basıncı <140 mmHg olanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,011$).

Tüm genotiplere göre 3 grup arasında (AA, AT, TT) sadece sistolik tansiyonda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,025$). Her grup arasındaki, farklar tüm ölçümler için değerlendirildiğinde AA ile AT grupları arasında diyastolik tansiyon ($p=0,038$) ve sistolik tansiyonda ($p=0,007$) ve AT ile TT grupları arasında hsCRP ($p=0,038$) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (Tablo-25). Buna göre AA genotipine sahip olanlarda hem sistolik hem diyastolik tansiyon AT grubuna göre yüksekti. Şekil-20'de görüldüğü gibi T alleleline sahip olanların tansiyon değerleri daha düşüktür.

Tablo-25: Genotiplere göre gözlenen anlamlı farklılık

Ölçüm	p	HGF A43839T Genotip		
		AA (n) Ort±SD min-maks.	AT (n) Ort±SD min-maks	TT (n) Ort±SD min-maks
Diastolik TA	(AAxAT) 0,038	(108) 79,12±10,2 60-120	(70) 75,79±6,94 60-90	(5) 79,0±5,47 70-85
Sistolik TA	(AAxAT) 0,007	(108) 127,1±20,77 90-180	(70) 119,1±17,38 90-170	(5) 122 ±5,7 115-130
hsCRP	(ATxTT) 0,038	(104) 0,163±0,198 0,001-0,980	(69) 0,140±0,209 0,001-1,36	(5) 2,92±5,65 0,05-13,02

Ölçülen tüm değerler çalışma gruplarında genotip ve allel gruplarına (Tablo-26) ve genotip (Tablo-27, Tablo-28) ve allel gruplarında (Tablo-29 ve Tablo-30) çalışma gruplarına göre incelendi.

Hasta grupları içinde genotiplere göre farklılıklar değerlendirildi. Ölçüm sonuçları kontrol grubu ve DM+HT grubu içinde genotiplere göre anlamlı bir farklılık göstermedi.

Tüm çalışma grubunda AA genotiplilerde sistolik (127±20,7) ve diyastolik kan basıncı (79±11,0) AT genotiplilerin sistolik (119±17,4) ve diyastolik kan basıncından (75±7,0) anlamlı olarak daha yüksekti (SKB için p=0,007, DKB için p=0,038). Ayrıca A allellilerin sistolik (125±20,2) ve diyastolik kan basıncı (78,3±10,3) da T allellilerin sistolik (119,5± 16,8) ve diyastolik kan basıncından (76,2±6,8) anlamlı olarak daha yüksekti (SKB için p=0,010, DKB için p=0,031).

DM hasta grubunda ise AA genotiplilerde sistolik kan basıncı AT genotiplilere göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksekti (p=0,012) (Tablo-25). DM hasta grubunda TT genotipe sahip birey sayısı n = 1 olduğu için değerlendirmeye alınmadı.

Tablo-26: DM grubunda genotiplere göre farklılıklar

DM Hasta Grubu	p	HGF A43839T Genotip	
		AA (n) Ort±SD min-maks	AT (n) Ort±SD min-maks
Diastolik TA	0,051	(34) 75,74±6,57 60-90	(25) 73±5,77 60-80
Sistolik TA	0,012	(34) 120±11 90-130	(25) 113,60±10,05 90-130

Her bir genotip grubu içinde hasta gruplarına göre farklılıklar değerlendirildi. AA ve AT genotipli bireylerde hasta gruplarına göre ölçülen değerlerin farklılıkları Tablo-27 ve Tablo-28’de gözlenmektedir.

Tablo-27: AA genotipli grupta hasta gruplarına göre ölçüm sonuçları

AA Genotipli Grup							
Ölçümler	p	p			Hasta Grupları		
		(Gruplar arası)			K(n=32)	DM(n=34)	DM+HT(n=42)
(Tüm gruplar için)	KxDM	Kx	DMx	Ort±SD min-maks	Ort±SD min-maks	Ort±SD min-maks	
		(DM+HT)	(DM+HT)				
VKİ	0,001	0,008	0,001	-	25,9±3,15 19,7-33,5	28,43±4,23 21-40	29,89±5,48 22-49
Diastolik TA	0,0001	-	0,0001	0,0001	73,3±57,4 60-80	75,8±6,8 60-90	86,3±12,1 70-120
Sistolik TA	0,0001	-	0,0001	0,0001	115,8±11,0 95-130	120,2±11,1 90-130	141,4±24,2 100-180
HbA1c	0,0001	0,0001	0,0001	-	5,22±0,388 4,14-5,78	6,54±1,10 5,3-9,5	6,61±1,66 5,12-14,8
HGF	0,001	0,03	0,0001	-	1127±361 308-2085	1266±398 631-2198	1522±471 708-2655
hsCRP	0,037	-	0,030	-	0,093±0,081 0,001-0,340	0,17±0,198 0,001-0,740	0,214±0,248 0,02-0,98
LDL	0,008	-	0,002	-	120±29,4 72-190	105,9±26,7 53-154	96,6±29,6 41-159
TG	0,001	0,001	0,001	-	108±59 52-357	166±80 39-355	169±101 37-565
Üre	0,002	-	0,002	0,004	26±8 14-53	27±7,5 16-52	36±14,3 16-79
VLDL	0,001	0,001	0,001	-	22±11 10-71	33±16 8-71	32±16 7-73

Tablo-28: AT genotipli grupta hasta gruplarına göre ölçüm sonuçları

Ölçümler	AT Genotipli Grup						
	p	p			Hasta Grupları		
		(Gruplar arası)			K(n=32)	DM(n=34)	DM+HT(n=42)
(Tüm gruplar için)	KxDM	Kx (DM+HT)	DMx(DM+HT)	Ort±SD min-maks	Ort±SD min-maks	Ort±SD min-maks	
Diastolik TA	0,0001	-	0,0001	0,0001	74,5±5,3 60-80	73,0±5,8 60-80	83,0±7,0 70-90
Sistolik TA	0,0001	-	0,0001	0,0001	112±12,2 90-130	113,6±10,1 90-130	142,0±17,1 115-70
Crea	-	-	-	0,043	0,86±0,15 0,62-1,18	0,80±0,17 0,53-1,18	0,93±0,23 0,51-1,30
HbA1c	0,0001	0,0001	0,0001	-	5,4±0,45 4,5-6,19	6,6±1,66 4,9-10,6	6,4±0,90 5,01-1,30
LDL	0,33	0,09	-	-	121±33 68-192	98±27 51-180	104±32 47-155

Allere göre çalışma grupları arasındaki farklılıklar değerlendirildi. A alleli ve T alleli bireylerde çalışma gruplarına göre değişken farklılıkları Tablo-29 ve Tablo-30'da gösterilmiştir.

Tablo-29: A allellilerde hasta gruplarına göre ölçüm sonuçları arasındaki farklılıklar

A Allel Grubu				
Ölçümler	p	P		
		(Gruplar arası)		
	(Tüm gruplar için)	KxDM	Kx (DM+HT)	DMx(DM+HT)
VKİ	0,000	0,001	0,000	-
Diastolik TA	0,000	-	0,000	0,000
Sistolik TA	0,000	0,019	0,000	0,000
Crea	0,007	0,002	-	0,016
HbA1c	0,000	0,000	0,000	-
HGF	0,000	0,022	0,000	0,001
hsCRP	0,014	-	0,014	-
LDL	0,000	0,000	0,000	-
TG	0,000	0,000	0,000	-
TKolesterol	-	-	0,034	-
Üre	0,000	-	0,000	0,000
VLDL	0,000	0,000	0,000	-

Tablo-30: T allellilerde hasta gruplarına göre ölçüm sonuçları arasındaki farklılıklar

T Allel Grubu			
Ölçümler	p	P	
		(Gruplar arası)	
	(Tüm gruplar için)	KxDM	Kx (DM+HT)
Diastolik TA	0,000	-	-
Sistolik TA	0,000	-	-
HbA1c	0,000	0,001	0,000
HGF	-	-	0,007
hsCRP	-	-	0,054
LDL	0,007	0,003	-
TG	-	-	0,043
Üre	-	-	0,028

TARTIŞMA

Hipertansif diyabetli, normotansif diyabetli bireylerde serum HGF düzeylerini ve HGF intron 8 A43839T polimorfizmini incelemeyi amaçladığımız çalışmamızda gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildiğinde serum HGF düzeyi Diabetes Mellituslu hipertansif hasta grubunda ($1510 \pm 510,9$ pg/mL) hem Diabetes Mellituslu normotansif ($1285 \pm 427,6$ pg/mL) hem de kontrol grubundan ($1131,9 \pm 361,1$ pg/mL) anlamlı olarak daha yüksek bulundu.

Diabetes Mellitus ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler risk faktörleri arasındaki bozukluklarda serum HGF düzeyleri etkilenmektedir (13, 79-81, 83, 84, 106, 125-127). Normotansif bireylerde HGF, otokrin-parakrin etkilerle vasküler yapının sürekliliğini sağlar. Hipertansif veya DM'li olgularda HGF sisteminin bu düzenleyici özelliği bozulmaktadır. Transforme-edici büyüme faktörü beta veya anjiyotensin II, HGF sistemini bozan etkenlerdendir (23) ve anormal düz kas büyümesine ve çoğalmasına neden olurlar. Bu şekilde ateroskleroza katkıda bulunurlar. Bunun yanında, HGF'nin endotel ve inflamasyona karşı koruyucu faktör olduğu da ileri sürülmektedir (155, 156). Bu bağlamda, HGF sentezinin bozukluğun ya da hastalığın evrelerine göre değişiklik gösterebildiği ve çok sayıda dokuda sentezlenebildiği gerçeği dikkate alınarak serum HGF düzeyleri dikkatle değerlendirilmelidir.

Serum HGF düzeyleri hipertansif hastalarda yüksek bulunurken (79, 84, 125-127), sistolik ve diyastolik kan basıncı ile serum HGF düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalarda (79, 126, 127) serum HGF düzeyi ile kan basıncı arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Özellikle sistolik kan basıncı ile serum HGF düzeyi arasındaki ilişkinin daha kuvvetli olduğu gözlenmiştir (126).

Çalışma grubumuzda, diyastolik ve sistolik kan basınçlarına göre serum HGF düzeyleri değerlendirildiğinde diyastolik kan basıncı ile anlamlı bir ilişki gözlenmezken (Spearman's $r = 0,128$, $p = 0,085$) sistolik kan basıncı ile serum HGF düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki (Spearman's $r = 0,158$, $p = 0,032$) gözlenmiştir. Bu sonuç Nakamura Y. ve arkadaşlarının (126) çalışması ile uyumluluk göstermektedir.

Bu bulgu hipertansiyon grubunda değerlendirmeler yapan çalışmalarla desteklenmektedir (79, 126, 127). Bu çalışmalarda serum HGF düzeyi özellikle sistolik kan basıncı ile anlamlı olarak pozitif ve güçlü bir ilişki göstermiştir.

Özellikle yaşlılarda diyastolik kan basıncına göre sistolik kan basıncının vasküler sistemde arteriosklerotik değişiklikler ve mortalite riskinin çok daha güçlü bir belirteci olduğu belirlenmiştir (157). Bu özelliklere dayanarak çalışmamızda sistolik kan basıncı ve serum HGF düzeyi arasında gözlemlenen anlamlı ilişki HGF'nin diyabetli hastalarda yüksek kan basıncı ile hasarlanan vasküler endotelial hücrelerin onarımı ve korunmasına katkıda bulunabildiğini göstermiştir. Bu açıdan HGF, kardiyovasküler komplikasyonların erken dönemde tespit edilmesi ve tedavisi ile mortalite ve morbiditenin azaltılması açısından klinik yararlı bir öngördürücü olabilir.

Serum HGF düzeylerinin diabetes mellituslu hastalarda vasküler komplikasyonlarla ilişkisini değerlendirmek için yapılmış olan çalışmalarda retinopati, karotid ateroskleroz, kardiyomyopati gibi vasküler komplikasyonlara sahip DM'li hasta grubunda serum HGF düzeyi komplikasyonsuz DM'lilerden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (80, 83, 106, 124). Bu sonuçlar diabetes mellituslu olgularda HGF düzeyinin vasküler hasarlanmaya yanıt olarak yükseldiği düşüncesini destekler niteliktedir.

Yapılan çalışmalarda da DM'li olgularda farklı sonuçlar bulunması hastanın iyi kontrollü, kötü kontrollü ve komplikasyonlu veya komplikasyonsuz olma durumlarıyla ilişki göstermektedir. Normotansif DM'li grubumuzda HGF düzeyleri kontrolden farklılık göstermedi ($p=0,129$). Normotansif DM'li grubumuzun glukoz ve HbA1c düzeyleri kontrolden yüksek bulunmuş olmasına karşın HGF düzeyinde istatistiksel olarak farklılık gözlenmemesi ancak kontrol grubuna göre daha yüksek bulunması ve hipertansif DM grubunun normotansif DM grubundan istatistiksel farklılık göstermesi yüksek kan basıncının DM komplikasyonlarının gelişmesine ek bir katkısı olduğunu göstermektedir. DM'li olgularda yapılan çalışmaların sonuçlarında izleyen bölümde özetlenmekte olduğu gibi farklılıklar vardır.

Tip 1 DM'li hastalarda serum HGF düzeyleri yüksek bulunmuştur (82). Tip 2 DM'li olgularda yapılan bazı çalışmalarda ise serum HGF düzeyleri diyabetli olmayan bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı düşük bulunmuştur (13, 83). Komplikasyonsuz Diabetes Mellituslularda düşük (13, 81); retinopati, nefropati, kardiyomyopati, hipertansiyon gibi komplikasyonlu DM'lilerde serum HGF düzeyi yüksek olarak belirlenmiştir (79, 80, 83, 106).

DM'nin mikro ve makrovasküler komplikasyonlara yola açan damarsal etkilerini araştıran bazı çalışmalarda diyabetik hastalarda damarların vazodilatatör özelliklerinin kaybolduğu rapor edilmiştir. Vasküler tonustaki bu değişikliklerin nitrik oksit (NO) gibi endoteli koruyucu özellikteki içeriğin azalması ve DM tarafından indüklenen vasküler büyüme ve/veya hipertrofiye artma yoluyla olabileceği öne sürülmüştür (81). HGF'nin endotel hücrelerde NO sentezini arttırdığı gösterilmiştir (69). Bu sonuçlar HGF'nin bu yolla DM'li hastalarda damarsal koruyucu rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Makondo ve Ark. (69) çalışmasında HGF'nin aortik endotel hücrelerde dakikalar içinde endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Nitrik oksit (NO)'in vasküler tonus ve endotel hücre bütünlüğünün korunmasında anahtar rol oynayan bir molekül olduğu ortaya çıkarılmıştır. NO'in ayrıca direkt olarak vasküler hücrelerde anjiyogenezi düzenlediği de kanıtlanmıştır. Bu nedenle eNOS aktivitesinin HGF aracılığı ile akut düzenlenmesinin miyokardiyal iskemi sonrası doku yenilenmesi, neointimal proliferasyonun sınırlanması, anjiyogenez ve vazodilatasyonda çok önemli olabileceği ileri sürülmüştür. Bu direkt etkilere ilaveten HGF vasküler düz kas hücrelerinden vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi güçlü mitojenik moleküllerin salınımını da tetikleyebilmektedir. Bu gözlemler kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi endotel hücre hasarı ve aterosklerozla ilişkilendirilen kompleks hastalıklarda HGF'nin damarsal sistemlerdeki etkisini anlamak açısından çok önemlidir.

Bununla birlikte Morishita R.ve ark. ile Nakano N. ve arkadaşlarının endotel hücre ortamında yaptıkları invitro çalışmalarda yüksek glukoz konsantrasyonunun endotel hücre ölümüne neden olduğu ve lokal HGF düzeyini

azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, bu çalışmalarda rekombinan HGF uygulaması ile endotel hücrelerin apoptozisten kurtarıldığı gösterilmiştir (81, 105, 158). Yüksek glukoz tedavisine bağlı olarak endotel ve vasküler düz kas hücrelerinden lokal HGF sekresyonunun kaybı endotel disfonksiyona yol açmaktadır (81). Diabetes Mellituslu hastalarda serum HGF düzeyinin uyarıcı faktörlerle (hipertansiyon, vasküler değişiklikler gibi) baskılayıcı faktörlerin (yüksek kan şekeri, TGF- β , AT-II gibi) dengesiyle belirlendiği öne sürülmüştür (89, 105).

Nakamura S ve arkadaşlarının (13) çalışmasında komplikasyonsuz DM'li hastaların serum HGF düzeylerinde olan düşüklüğün önceki bu invitro çalışmalara dayanarak yüksek glukozla bağlı vasküler damar sisteminde lokal HGF üretiminin baskılanması nedeni ile meydana geldiği öne sürülmüştür. Bu bilgiler bizim sonuçlarımızın açıklanmasına da yardımcı olabilir. DM'li grubumuzda kan glukoz düzeyinin kontrolden yüksek olması HGF'yi baskılayıcı olabileceğini düşündürürken, Hipertansif DM'li grupta kan glukoz düzeyi yüksek olmasına karşın HGF düzeyinin yüksek bulunması HT'nin varlığında gelişmekte olan endotel disfonksiyonuna yanıt olduğunu açıklamaktadır.

Serum HGF düzeylerinin Diabetes Mellitus'lu hastalarda vasküler komplikasyonlarla ilişkisini değerlendirmek için yapılmış olan çalışmalarda retinopati, karotid ateroskleroz, kardiyomyopati gibi vasküler komplikasyonlu DM'li hasta grubunda serum HGF düzeyi komplikasyonsuz DM'lilerden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (80, 81, 106, 124). Bu sonuçlar Diabetes Mellitus'lu olgularda HGF düzeyinin vasküler hasarlanmaya yanıt olarak yükseldiği düşüncesini destekler niteliktedir.

Ancak, normotansif DM'li grubumuzda glukoz ve HbA1c'ye göre serum HGF düzeylerinin kontrolden farklı bulunmaması HT'si bulunmayan DM'li olgularda serum HGF'nin komplikasyon göstergesi olma açısından ne derece yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

DM ve tansiyon durumu (normotansif ve hipertansif olgular) birlikte değerlendirildiğinde de çalışmalar arasında farklılıklar gözlenmektedir. Hipertansif DM grubundaki bulgularımız Nakamura ve Ark.'nın (13) Tip 2 Hipertansif DM'li

olgulara buldukları sonuçlarla uyumludur. Bu sonuçlar HT'nin DM üzerine ek risk faktörü oluşturduğu görüşlerini de desteklemektedir ve serum HGF konsantrasyonunun diyabetli hastalarda hipertansiyon tarafından indüklenen endotelial hasara yanıt olarak yükselmiş olması olasıdır.

Hipertansif DM'li hastalarda bizim çalışma bulgularımızla da uyumlu biçimde sistemik dolaşımda gözlenen HGF yüksekliğinin otokrin ve parakrin lokal HGF üretimine ek olarak humoral bir aracı gibi doku yenilenmesi için çalışabildiği öne sürülmüştür (126). Hasarlanmış kan damarlarında azalan HGF'nin kan damarlarındaki lezyonların ilerlemesine yol açan bir faktör olabileceği ve dolaşımsal HGF'nin bu etkiyi kompanze etmek için yükselmiş olabileceği öne sürülmüştür (81, 127, 159). Endotelial hasara yanıt olarak karaciğer, akciğer gibi HGF'den zengin sağlam organlarda HGF üretimi ve sistemik dolaşıma salınımı artmış olabilir. Bu sayede sistemik dolaşımda artan HGF endokrin bir davranışla hasarlanmış bölgeye ulaşarak vasküler endotelin onarım ve korunmasına katkıda bulunabilir (46, 128).

DM'nin komplikasyonları açısından önemli izlem analiti olan HbA1c düzeylerinde göre yapılan değerlendirmeler, HbA1c'ye göre iyi kontrollü (HbA1c<%7) ve kötü kontrollü (HbA1c>%7) gruplar arasında serum HGF düzeylerinde istatistiksel olarak farklılık göstermedi (p=0,216). Ancak kötü kontrollü grubun serum HGF düzeyleri daha yüksek bulundu.

Satani ve Ark. (80) Tip 2 diyabetli hastalarda karotid ateroskleroz ile serum HGF düzeyi arasında anlamlı ve pozitif yönde bir ilişki saptadığı çalışmalarında HbA1c ile serum HGF düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır, ancak Tip 2 DM grubunda HbA1c düzeylerini oldukça yüksek (%9,3±2,2) bulmuşlardır. Bu bağlamda, serum HGF düzeylerinin HbA1c düzeyleri ile ilişkisinin gözlenmemesi, her ikisinin de bağımsız risk faktörleri olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer taraftan, Satani ve Ark.'nın (80) sistolik ve diyastolik kan basınçları ile HGF arasında ilişki bulunamamış olmaları da bu bölümün başında belirttiğimiz gibi HGF düzeylerini etkileyen faktörlerin oldukça fazla olmasıdır. Ancak karotid

aterosklerozla ilişkisinin bulunması serum HGF'nin bağımsız bir risk faktörü olabileceği görüşlerini kuvvetlendirmektedir.

Bu bulgulara göre normotansif Diabetes Mellituslu hasta grubunda serum HGF ile HbA1c arasında anlamlı bir ilişkinin olmaması ve serum HGF düzeyinin normotansif DM'li hasta grubunda kontrollerden daha yüksek bulunması çalışmamızda yer alan Diabetes Mellituslu hastaların ilaç tedavisi altında olmalarından kaynaklanabilir. Diğer yandan bu bulgunun diyabetik kontrolün serum HGF konsantrasyonunda zorunlu veya gerekli bir etkiye sahip olmamasına da bağlı olabileceği düşünülmüştür. Ancak tüm bu bilgiler ve veriler ışığında açık ve doğru bir değerlendirmenin yapılabilmesi için ileri çalışmalar gereklidir.

Vasküler bozukluklar için diğer risk faktörleri (121) olan kan glukoz, total kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri ile obezite ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$), sigara içimi ve yaş da gruplar arasında değerlendirildi. Tablo-19'da gözlendiği gibi tüm ölçümler hipertansif DM hasta grubunda kontrol grubundan anlamlı farklılık gösterirken normotansif DM hasta grubunda yalnızca VKİ, sigara içimi, glukoz, HbA1c, LDL-kolesterol açısından farklılık bulundu. LDL-kolesterol ve sigara içme yüzdesi dışındaki farklılık gösteren tüm ölçümler hasta grubunda kontrollerden yüksekti. Oysa LDL-kolesterol ve sigara içme oranı hem normotansif DM hem de hipertansif DM grubunda kontrollerden anlamlı düşük bulundu. Bu bulgu temel kardiyovasküler risk faktörü olarak belirlenen LDL-kolesterolün ve sigara tüketiminin (121, 160, 161) hasta grubunda lipit düşürücü ilaç ve sigara alışkanlığının tedavisine bağlı olarak kontrollü olduğunu göstermektedir. Hasta grubumuzdaki bireylerde LDL-kolesterol düzeyleri kontrollü olmasına karşın serum HGF düzeyinin özellikle hipertansif DM grubundaki hastalarda yüksek bulunması HGF düzeylerinin klinik yararlı bir gösterge olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda temel kardiyovasküler risk faktörlerinden biri olan yaşın etkisini değerlendirmek için çalışma grubu bireyleri belirli kriterlere göre yaş gruplarına ayrıldı. Bu yaş gruplarının HGF değerleri kontrol, normotansif DM ve hipertansif DM gruplarında ayrı ayrı karşılaştırıldı. Tüm yaş grupları arasında HGF düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Vasküler risk faktörlerinden olan obezitenin etkisini değerlendirmek için çalışma grubu bireylerinin VKİ'leri hesaplandı. Kontrol grubundaki bireylerin vücut kütle indeksi hem normotansif Diabetes Mellituslu hem de hipertansif Diabetes Mellituslu grupta olanlardan anlamlı olarak daha düşüktü (Tablo17, Tablo19). Obezite için sınır VKİ değeri, JNC VII (121) raporuna dayanarak 30 kg/m² olarak kabul edildi. Tüm çalışma bireylerinde 30 kg/m² VKİ'ye göre yapılan ayarlamalar sonrasında da serum HGF düzeyi hipertansif Diabetes Mellituslu hasta grubunda hem normotansif diyabetlilerden (p=0,0001) hem de kontrollerden (p=0,0001) anlamlı olarak yüksek bulundu.

Bu sonuçlara göre serum HGF düzeyi, kardiyovasküler risk faktörü olarak belirlenen yaş, sigara içimi, artmış total kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyi, hiperglisemi, obezite gibi ana etkenlerden bağımsız olarak hipertansif Diabetes Mellituslu hastalarda yüksekti. Ancak serum HGF düzeyinin endotelial hasarlanmanın ve diyabetli hastalarda hipertansiyon gibi vasküler komplikasyonların gelişiminin bağımsız bir öngördürücüsü olarak kullanılabilmesi için daha ileri çalışmaların gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Diabetes mellitus ve hipertansiyon ile ateroskleroz arasındaki yakın ilişki gösterilmiştir (133, 136). Özellikle ateroskleroz gibi patogenezinde inflamasyonun rol oynadığı endotelial bozukluklarda devam eden süreçlerin izlenmesi için akut faz reaktanlarının kullanılması önerilmiştir (162-166).

Tip2 DM'li hastalarda metabolik olarak aktif hücelere glukoz alımının arttığı ve insülin reseptörlerinin aktivasyonunun arterlerde endotelial seviyede antiinflamatuvar ve damarsal koruyucu etki gösteren nitrik oksit ve çeşitli aracı maddelerin üretilmesini uyardığı gösterilmiştir (164). Bu yüzden insülin direnci yalnızca hiperglisemiye yol açmakla kalmaz aynı zamanda vasküler korunmanın bozulmasına ve bunu izleyerek vasküler duvarda adezyon moleküllerinin sekresyonunda artma, monosit aktivasyonu ve migrasyonunda artma ile belirgin inflamasyona ve endotelial fonksiyonların bozulmasına yol açmaktadır (164).

Aterosklerozun endotelial hasar ve fonksiyon bozukluğu ile ortaya çıkan dinamik ve ilerleyici bir süreç olduğu öne sürülmüştür. Sağlıklı görünen bireylerde bile bir akut faz reaktantı olan hsCRP düzeyleri ile ileride gelişebilecek kardiyovasküler olaylar (inme, periferik arter hastalıkları, ani kardiyak ölüm, myokard enfarktüsü gibi) arasında iyi, sürekli ve anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (163). Tip2 DM'li hastalarda endotelial inflamasyon ve ateroskleroz gelişiminin, dolayısıyla da makrovasküler bozuklukların önemli bir klinik belirtici olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (164).

Bu bilgiler ışında hsCRP açısından gruplar değerlendirildiğinde hsCRP düzeylerinin yalnızca hipertansif Diabetes Mellituslu hasta grubunda anlamlı yüksek bulunması hsCRP'nin de HGF gibi yararlı bir kardiyovasküler risk belirtici olduğu görüşlerini destekleyen bir bulgudur. Ancak HbA1c'ye göre iyi ve kötü kontrollü gruplara bakıldığında (Tablo 20) hipertansif Diabetes Mellituslu hasta grubunda hsCRP, kötü kontrollü olanlarda daha düşük bulunmuştur.

Hasta sayıları az olmasına ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen hsCRP'nin kardiyovasküler bozukluklarda enflamasyon ve doku hasarının göstergesi olan bir akut faz reaktantı olması dikkate alındığında HGF'nin kardiyovasküler hastalıklar ve endotelial hasarlanma ile daha yakın ilişkili olduğu söylenebilir.

Damar duvarında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) aracılı lökosit adezyonunun HGF tarafından baskılandığının belirlendiği bazı çalışmalarda HGF'nin antiinflamatuvar etkinliği gösterilmiştir (155). Ayrıca HGF'nin böbrek gibi çeşitli organlarda da yaygın endotelial inflamasyonu baskıladığı, güçlü ve direkt antiinflamatuvar bir etki gösterdiği ne sürülmüştür (156).

Bu bilgilere dayanarak çalışma bulgularımızla da desteklendiği gibi HGF düzeyinin diyabetik ve özellikle hipertansiyon gibi komplikasyonlara sahip hastalarda damar duvarında enflamasyonla seyreden endotelial bozuklukların izlenmesinde de yararlı bir gösterge olabileceği dşnlmştir. Ancak bu konuda daha geniş kapsamlı ve ileri çalışmalar gereklidir.

Gen yapısı ve fonksiyonunun bilinmemesi genotip/fenotip ilişkilerini gizleyebilmektedir. Bu bağlamda, gen polimorfizmleriyle ve bu polimorfizmlerin hastalıklarla ilişkileri araştırılmaktadır.

SNP'ler tıbbi olarak hastalığa yatkınlık ve ilaçlara yanıtta önemli farklılıklarla bağlantılı olduğu görülen genetik değişikliklerin belirlenmesi için geniş bir alanda incelenmektedir. Bu sayede yakın gelecekte kanser, mental bozukluklar, otoimmün durumlar, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi kompleks hastalıkların genetik temelini belirlemenin mümkün olabileceği düşünülmektedir. Hastalıklara eğilim yaratan polimorfizmlerin sayısının katlanarak arttığına inanılmaktadır (153).

Ateromatöz lezyonların olgunlaşmasında anahtar rol oynama potansiyeline sahip olduğu düşünülen bazı büyüme faktörü genlerinin polimorfizmleri araştırılmıştır. Bu büyüme faktörleri arasında HGF özellikle ilgi çekmiştir çünkü hipertansiyon, Diabetes Mellitus ve kardiyovasküler hastalıkları içeren bazı bozukluklarda kardiyovasküler koruyucu etkiye sahip olabileceği ileri sürülmektedir (23). HGF kardiyovasküler bozukluklardan sorumlu 36 aday genden biridir (167).

HGF geninde yaklaşık 1493 polimorfizm saptanmıştır (73). Takuchi ve Ark. (23) sekans taramasıyla 21 SNP saptamışlardır. Bunlardan 8'i promoter bölgede, 1'i ekzonda diğer 12'si intron alanlarındadır. İleri analiz için allel sıklığı %10'un üzerinde olanlar arasından bağlantı eşitsizliği güçlü olan SNP'lerden seçim yapmışlardır. İtron 8 A43839T polimorfizmi de çalıştıkları polimorfizmler arasındadır.

Motone ve Ark. (24) da Japon halkında serum HGF ile HGF gen polimorfizmi arasındaki ilişkileri incelemiş olup, HGF intron 13 C57488A ve HGF intron8 A43839T polimorfizmlerinden intron 13 C57488A'yı seçmiş ve ilişkiyi araştırmışlardır. Motone ve ark. larının HT'li hastalarda yaptığı bu çalışmada intron 13 C57488A SNP için CC genotiplilerde serum HGF yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda bu çalışmada hipertansiyon ile ilişkili buldukları HGF intron 13 C57488A polimorfizmi ile HGF intron8 A43839T polimorfizmi arasında bağlantı eşitsizliği

olduğu belirlenmiştir. Takuichi ve arkadaşları (23) ise HGF intron 8 A43839T polimorfizmini hem HT’li hem de karotid aterosklerozlu hastalarda incelemişler, karotid ateroskleroz ile HGF intron 8 A43839T polimorfizmini ilişkili bulmuşlardır. Ayrıca Çin toplumunda ailesel myopi ile HGF SNP ilişkisini araştıran bir çalışmada HGF intron 8 A43839T polimorfizminin minör allel sıklığı yüksek bulunmuştur (25).

Bu bilgiler işığında biz de çok az çalışma bulunan (13) normotansif DM’li ve hipertansif DM’li olgularda serum HGF düzeyleri yanında HGF intron 8 A43839T gen polimorfizmini değerlendirmeyi seçtik. Bu kararı almamızın diğer nedeni de incelenen tüm HGF polimorfizmlerinin ekzon ve promotör bölgede değil de intron bölgelerinde değerlendiriliyor olmasıdır (24).

Türkiye’de HGF gen polimorfizmi çalışmasına rastlanmamıştır. Türkiye’de Hipertansiyonlu ve Diabetes Mellituslu olgu sayısının olduğua yüksek olduğunu gösteren çalışma sonuçlarının (10, 11) varlığı ve HGF’nin vasküler bozuklukların erken belirlenmesindeki yararları ve bu bozukluklarda HGF serum düzeylerindeki değişiklikler göz önüne alındığında HGF gen polimorfizmlerinden hangisinin etkili olabileceğinin araştırılması hedeflenerek, Türkiye’de bir çalışma başlatılması amaçlandı.

Daha nce ApoE polimorfizmi çalışmalarımızda laboratuvar-yapımı zeltilelerle geleneksel PCR uygulanmıştı (168). Bu alışmada, DNA özütlenmesi için hazır kit kullanarak ve gerçek-zamanlı PCR tekniğiyle çalışma yaptık. Bu şekilde iki yöntemi değerlendirme olanağı yaratıldı.

DNA ztlenmesinin hazır kitlelerle yapılması zaman açısından kazanç sağlamakta ve hata riskini azaltmaktadır. Real-time PCR’da istenen gen bölgesinin çoğaltımı ve ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi işık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Gerçek-zamanlı PCR yöntemi geleneksel PCR’a göre el ile yapılan işlemlerin kapalı tüpte yapılmasını sağladığından bulaşma riskini en aza indirmektedir. Gerçek zamanlı PCR’daki gibi otomatize sistemlerde PCR için gerekli olan sıcaklık döngüsü değişiklikleri, bu ısı

değişimlerini sağlamak için kullanılan geleneksel cihazlarla (thermocycler) yapılanlara göre çok daha hızlı olmaktadır (152). Ayrıca maliyet açısından farklı olsalar da, ticari kit ile DNA özütleme ve çoğaltma, ayırma ve saptamanın gerçek-zamanlı PCR ile yapılması güvenilirlik ve zaman açısından avantaj sağlamaktadır.

HGF gen numarası 3082 ve referans SNP numarası rs2286194 ve başvuru numarası ss7990335 ile HGF intron 8 A43849T polimorfizmi çalışmalarında (169) başvuru kimlik kodlarına göre allel sıklıkları, PDR90 (genel popülasyon, n=112, A=0,795, T=0,205); HapMap-CEU (Avrupalı, n=108, A=0,824, T=0,176); HapMap-HCB-EAST ASIA (n=88, A=0,830, T=0,170) ve HapMap-JPT (Asyalı, n=78, A=0,885, T=0,115) olarak bulunmuştur. Takuchi ve Ark'nın (n=2412) A=0,750, T=0,250 iken bizim grubumuzdaki allel sıklıkları ise (n=286) A=0,781, T=0,219'dur. Hardy Weindberg eşitliğine göre değerlendirmede de (Ki kare=1,29, df=1 ve p=0,797) diğer çalışmalar (p değerleri yukarıdaki çalışmaların sırasıyla, 0,655, 0,251, 0,479 ve 0,439) gibi uyum gözlenmiştir.

Çalışma grubumuzda HGF intron 8 A43839T'de AA yaygın olmak üzere sırasıyla AT ve TT genotipleri saptandı. Kontrol ve hasta gruplarına bakıldığında (Tablo 22) her gruptaki sıklık benzerdi ve gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu (p=0.089). Birey sayısı çok düşük olduğu için TT genotipli çalışma grubunda değerlendirme yapılmadı. Ancak hipertansif DM grubunun TT genotipi kontrol ve normotansif DM grubuna göre fazla idi. Özellikle TT genotipli bireylerin serum HGF düzeylerinin referans aralığın üzerinde bulunması (2329,1±602,2 pg/mL) bu polimorfizmde T alleli açısından ileri araştırma gerektirebileceğini göstermektedir.

HGF gen polimorfizmleri ve HGF geninin aşırı ekspresyonunun hipertansiyon (24), ateroskleroz (23), miyopi derecesi (25), meme kanseri (85) ile ilişkisini gösteren çalışmalar vardır.

Özellikle serum HGF düzeylerinin vasküler bozukluklarla, önemli ilişkisi gösterilmektedir (12, 13, 79, 80, 83, 170). HGF gen polimorfizminin serum HGF düzeylerini etkileyerek kan basıncının düzenlenmesinde etkili olabileceği öne sürülmüştür (23, 24).

Takuichi ve Ark (23) diyastolik ve sistolik kan basınçlarıyla alleller arasında bir ilişki bulamamış olsalar da, çalışma grubumuzda sistolik ve diyastolik kan basınçları A allelli bireylerde T allelli olanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (SKB için $p=0,010$, DKB için $p=0,031$). Ayrıca AA genotipli bireylerde de kan basınçları AT ve TT genotiplilerden anlamlı olarak daha yüksekti (SKB için $p=0,007$, DKB için $p=0,038$). Bu bulgu, Takuichi ve Ark (23)'ün AA genotipli kadınlarda karotid aterosklerozun daha şiddetli olduğuna ilişkin bulgularıyla uyumludur.

Motone ve Ark.'nın da intron 13 C57488A polimorfizmiyle hipertansiyon arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada hipertansif grupta CC genotipini daha yaygın ve serum HGF düzeyini anlamlı olmasa da daha yüksek bulmuşlardır (24). Bu bulgular, hem Takuchi hem de bizim bulgularımızla benzerdir. Ancak bu çalışmalarda yaygın allel sıklığı yüksek olan kişilerin çoğunlukla hipertansif olmaları, minor allellilerin kan basınçlarının kontrollü olması, Motone ve Ark.'nın vurguladıkları gibi ve Japon Hipertansiyon Genetiği Konsorsiyumunun da amaçları arasında bulunan HGF gen polimorfizmi çalışmalarının sürdürülmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Ancak bu çalışma ile ilgili bazı sınırlamalar bulunmaktadır. Bu sınırlamalardan biri haplotip blok analizinin kullanıldığı son araştırmalarda HGF gen bölgesinde bağlantı eşitsizliğinin beklenenden çok daha geniş (yaygın) olarak korunmuş olduğunun açığa çıkarılmış olmasıdır (24). 7q21 lokusunda TGF- β , voltaja bağlı, L tipi kalsiyum kanal α altünite (CACN) ve β guanin nükleotit bağlayan protein (GNB) gibi hipertansiyona genetik yakınlıkla ilişkili (23, 171, 172) bazı genler ile HGF geni arasında bazı karşılıklı etkileşimlerin veya bağlantıların var olabileceği düşünülmüştür (23, 24). Buna bağlı olarak HGF gen polimorfizmi ile hipertansiyon arasında açıkça bir ilişkinin kurulması güçtür.

Diğer bir sınırlama hipertansiyon ve ateroskleroz için artmış yakınlık yaratan HGF gen polimorfizmlerinin intron bölgesinde lokalize olmuş olmasıdır. HGF gen polimorfizmlerinin intronda yerleşmiş olması işlevsel olarak HGF proteini üzerine etkisinin daha az olacağını düşündürmüştür. Bu durum HGF geninin intron 8'deki

A43839T polimorfizminin hipertansiyon ve ateroskleroz gelişimi için fiilen sorumlu olan diğer bazı polimorfizmlerle bağlantı eşitsizliğinde olması olasılığını destekler niteliktedir.

Bu nedenlerle HGF gen polimorfizmi ile serum HGF düzeyi arasındaki ilişkinin kesin mekanizmalarını ve klinik yansımalarını açık ve doğru olarak açıklamak için daha ileri fonksiyonel ve bağlantı eşitsizliği analizleri gereklidir.

HGF'nin çeşitli dokulardaki epitelyal ve endotelyal hücreler üzerindeki biyolojik etkileri tanı ve izlemdeki kullanılabilirliği yanında terapötik etkinliği ve kullanımı ile ilgili çalışmaların da önem kazanmasına neden olmuştur. Son yıllarda esansiyel hipertansiyonda endotelyal hücre apoptozunun önlenmesi, hipertansiyona bağlı böbrek tübül ve glomerüllerinde hasarlanmanın tedavi edilmesinde, iskemik hastalıkların tedavisinde HGF gen terapisi çalışmaları başlatılmıştır (77, 90, 173). HGF geninin diyabetik nefropatinin ilerlemesini yavaşlattığı (77), hipertansiyon gibi nedenlere bağlı kronik böbrek hastalıklarında böbrek endotel ve epitelinin onararak böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiği (90) belirlenmiştir. Ayrıca endotel onarımı ve anjiyogenez etkisi ile periferik arter hastalıkları, myokard infarktüsü, kronik kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarda tedavi edici etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (173).

Bulgularımız sistolik ve diyastolik kan basınçlarının serum HGF düzeyleriyle ilişkili bulunması serum HGF düzeyinin mikro ve makro vasküler bozuklukların oluşumu ve ilerlemesiyle ilişkili olduğunu destekler niteliktedir.

Önemli ve yaygın diğer risk faktörü olan Diabetes Mellitus'ta, komplikasyonların değerlendirilmesi açısından HGF'nin yararının değerlendirilmesi gerekli görünmektedir. Çünkü normotansif DM'li olgularda yüksek glukoz, HbA1c düzeylerinde karşın serum HGF düzeylerinin yüksek bulunsa da istatistiksel anlamlılık göstermemiştir.

Hipertansiyon, diabetes mellituslu olgularda kardiyovasküler risk açısından daha fazla tehdit oluşturmaktadır. HbA1c düzeyleri yüksek olsa da bu olgularda serum

HGF ($p=0,013$), serum kreatinin ($p=0,0001$) ve serum üre ($p=0,0001$) anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu bulguya göre serum HGF düzeyi bağımsız bir gösterge olabilir.

Genotip/fenotip ilişkileri açısından HGF gen polimorfizmleri ile ilgili çalışmaların geliştirilmesi gerekmektedir.

SONUÇLAR

- Hipertansif Diabetes Mellituslu Grubun serum HGF düzeyleri hem normotansif Diyabetes Mellitus'lulardan ($p=0,015$) hem de kontrollerden ($p=0,0001$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir.
- Serum HGF düzeyi ile diyastolik kan basıncı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (Spearman's $r = 0,128$, $p= 0,085$). Buna karşın sistolik kan basıncı ile serum HGF düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki (Spearman's $r = 0,158$, $p= 0,032$) saptanmıştır.
- Tüm çalışma grubu bireyleri dikkate alındığında serum HGF düzeyleri HbA1c'ye göre kötü kontrollü ($HbA1c > 7\%$) grupta iyi kontrollü ($HbA1c < 7\%$) gruba göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksektir ($p=0,014$).
- Hasta grubu bireyleri dikkate alındığında ise HbA1c'ye göre iyi kontrollü ($HbA1c < 7\%$) ve kötü kontrollü ($HbA1c > 7\%$) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemesine karşın ($p=0,216$) kötü kontrollü grubun serum HGF düzeyleri daha yüksek bulundu.
- Çalışma grubu bireyleri belirli kriterlere göre yaş gruplarına ayrılarak değerlendirildiğinde (20-25, 26-30 ve 20-30, 31-40 yaş aralıkları ile 18-40, 41-60 ve >60 grupları) yaş grupları arasında serum HGF düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,190$).
- HbA1c düzeyleri hem normotansif DM ve hem de hipertansif DM gruplarında kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksekti ($p = 0,0001$).
- LDL-kolesterol ve sigara içme oranı hem normotansif DM (sırasıyla, $p=0,0001$, $p=0,043$) hem de hipertansif DM grubunda (sırasıyla, $p= 0,0001$, $p= 0,013$) kontrollerden anlamlı düşük bulunmuştur. Total kolesterol

(p=0,132) ve HDL kolesterol (p=0,511) düzeyleri ise gruplar arasında anlamlı bir fark göstermemiştir. Serum hsCRP düzeyi Hipertansif DM grubunda kontrollerden istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksektir (p=0,017).

- Çalışma grubundaki allel sıklığı Hardy-Weindberg eşitliğine göre beklenen sıklıktan anlamlı farklılık göstermemiştir ($\chi^2=1,29$, p = 0,797; A/T allel sıklığı= 0,781/0,219).
- HGF intron 8 A43869 T polimorfizmi açısından değerlendirmede tüm çalışma grubunda A alleli yaygın allel (A=0,781, T=0,219) olarak, AA genotipi yaygın genotipti (AA=0,590, AT= 0,383, TT=0,027). Gruplar arasında allel (p=0,051) ve genotip sıklığı açısından anlamlı farklılık gözlenmedi (p=0,089).
- TT genotipli birey sayısı çok az olmasına karşın hipertansif DM grubunun TT genotipi (n=3) kontrol (n=1) ve normotansif DM (n=1) grubuna göre fazlaydı ve bu bireylerin serum HGF düzeyleri referans aralığın üzerinde bulunmuştur (2329,1±602,2 pg/mL).
- Sistolik ve diyastolik kan basınçları A allelli bireylerde T allelli olanlara göre anlamlı olarak daha yüksektir (SKB için p=0,010, DKB için p= 0,031). Ayrıca AA genotipli bireylerde de kan basınçları AT ve TT genotiplilerden anlamlı olarak daha yüksektir (SKB için p=0,007, DKB için p=0,038).
- Serum HGF düzeyi DM'lu hastalarda Hipertansiyon gibi vasküler komplikasyonlara bağlı endotelial hasarın değerlendirilmesinde yararlı bir belirteç olabilir.
- HGF intron 8 A43839T polimorfizmi için serum HGF düzeylerine etkisi ve kan basıncı ile ilişkisi yönünden daha geniş kapsamlı ve ileri analiz gereklidir.

ÖZET

HİPERTANSİF TİP 2 DİABETES MELLİTUS'LU BİREYLERDE HGF GEN POLİMORFİZMİ VE SERUM HGF DÜZEYİ.

Dr. FUNDA ERCAN

Hepatosit büyüme faktörü (HGF) vasküler endotelyal hücrelerin hasar ve onarım süreçlerinde ve proliferasyonunda etkin rol almaktadır ve hipertansif ve diyabetli hastalarda vasküler endotelyal hasarlanmada koruyucu olarak işlev görmesi olasıdır. Araştırmalar, mikro ve makrovasküler bozukluklarla ilişkili olarak dolaşımdaki HGF düzeyinin değiştiğini göstermektedir.

Genotip/Fenotip ilişkileri ile ilgili çalışmaların yoğunlaştığı günümüzde, bu alanda da HGF gen polimorfizmi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. HGF geninde 1493 polimorfizm saptanmıştır. Hipertansiyon ve kardiyovasküler bozukluklarla ilişkileri araştırılan 21 SNP'de HGF intron 8 A43839T polimorfizimli olgularda karotid ateroskleroz ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Türkiye'de HGF gen polimorfizmi ve diyabetli olgularda serum HGF düzeyleriyle ilişkili çalışmalara rastlanmamıştır. Çalışmamızda normotansif diyabetli ve hipertansif diyabetli olguların serum HGF düzeyleri ve HGF intron 8 A43839T polimorfizmi açısından değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışma grubumuz; 63 (Erkek: n=30; yaş: 43,7± 9,2) (Kadın: n=30; yaş: 44,7 ± 7,5) kontrol; 60 (Erkek:n=30; yaş: 50,1± 10,2; Kadın: n=30; yaş: 49,6 ± 8,6) normotansif diabetes mellituslu (DM) ve 60 (Erkek: n= 30; yaş: 58,0± 8,7) (Kadın: n= 30; yaş: 54,7 ± 10,5) hipertansif DM'li olmak üzere üç gruptan oluşturuldu. Serum HGF ölçümü ve HGF gen polimorfizmi saptanması yanında, bireylerin kan glukoz, HbA1c, HDL-kolesterol, hsCRP, kreatinin, total kolesterol, trigliserid, üre düzeyleri ölçüldü. Diyabetli bireyler HbA1c düzeylerine göre değerlendirildi. HGF gen polimorfizmi gerçek-zamanlı PCR ile saptandı.

HGF düzeyleri; hipertansif DM grubunda hem normotansif DM ($p=0,015$) hem de kontrollerden ($p=0,0001$); HbA1c'ye göre kötü kontrollü ($HbA1c>7\%$) olanlarda iyi kontrollü ($HbA1c<7\%$) olanlara göre ($p=0,014$) ve AA genotipli bireylerde hipertansif DM grubunda hem DM ($p=0,024$) hem de kontrol grubundan ($p=0,0001$) anlamlı olarak yüksek bulundu. AT ve TT genotipli bireylerde ise serum HGF düzeyi açısından çalışma grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (AT: $p=0,202$, TT: $p=0,255$).

Serum HGF düzeyi ile sistolik kan basıncı (SKB) arasında anlamlı bir ilişki (Spearman's $r = 0,158$, $p= 0,032$) saptandı. Sistolik ve diyastolik kan basınçları (DKB) A allelli bireylerde T allelli olanlara göre (SKB için $p=0,010$, DKB için $p= 0,031$) ve AA genotiplilerde AT ve TT genotiplilere göre (SKB için $p=0,007$, DKB için $p=0,038$) anlamlı olarak yüksekti.

Hipertansiyonun DM'li olgularda da HGF düzeyleriyle ilişkili olduğunu saptadığımız çalışmamızın HGF intron 8 A43839T polimorfizmi ile ilişkili bulguları, yaygın olan AA genotipli bireylerde hipertansiyonun daha yaygın olması ve bu olgularda HGF'nin yüksek bulunması ileri çalışmalara katkı sağlayacak bulgular olarak değerlendirildi. TT genotipli bireylerdeki bulgular da olgu sayısı arttırdıkça yararlı bilgiler sağlayabilecektir.

Polimorfizm çalışmasında kullanılan RT-PCR yöntemi maliyet açısından farklılık gösterse de geleneksel PCR yöntemine göre, kontaminasyon riskini azaltmaktadır ve güvenilirlik, uygulama kolaylığı ve zaman açısından avantajlıdır.

SUMMARY

HGF GENE POLYMORPHISM AND SERUM HGF LEVELS IN PATIENTS WITH HYPERTENSION AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Dr. FUNDA ERCAN

Hepatocyte growth factor (HGF) is one of a growth factor which plays an effective role in protection and repairment of vascular endothelial cells. Because of this characteristics it may have protective function against to vascular endothelial damage in hypertensive and diabetic patients. Most of studies have reported that serum HGF concentration was elevated in response to micro- and macro vascular disorders.

Currently, studies investigating genotype/fenotype relationships have been increasing. It was determined that the HGF gene had 1493 polymorphisms. According to a study which has investigated the 21 SNPs of HGF gene, a relationship of carotid atherosclerosis with the HGF intron 8 A43839T polimorphism was determined.

There are no studies related to HGF gene polymorphism and serum HGF levels in diabetic patients, and hipertansive diabetics in Turkey. In our study, the aim is evaluation of serum HGF levels and HGF intron 8 A43839T polymorphism in normotensive and hypertensive diabetic subjects.

Our study group was composed of 3 groups, control (male: n=30, age: 43,7±9,2; female: n=30, age: 44,7±7,5), normotensive diabetes mellitus (male: n=30, age: 50,1±10,2; female: n=30, age: 49,6±8,6) and hypertensive diabetics (male: n=30, age: 58±8,7; female: n=30, age: 54,7±10,5. Serum HGF levels measured, and HGF intron 8 A43839T polimorphism was examined. The levels of blood glucose, HbA1c, HDL-C, hsCRP, creatinin, total cholesterol, trigliceride, urea were also measured in all participitants. The HGF levels of diabetic subjects were evaluated according to their HbA1c levels. HGF gene polymorphism was detected by real-time PCR.

HGF levels were significantly higher in the hypertensive diabetic subjects, in bad-controlled diabetic subjects, and the hypertensive diabetic patients with the AA genotypes.

There were a significant relation between serum HGF level and systolic blood pressure (SBP) (Spearman's $r = 0,158$, $p = 0,032$). Both systolic and diastolic blood pressures were significantly higher in subjects with A allele than the subjects with T allele ($p = 0,010$ for SBP, $p = 0,031$ for DBP) and in the subjects with AA genotype than the subjects with AT and TT genotypes ($p = 0,07$ for SBP, $p = 0,038$ for DBP).

We detected that hypertension was associated with HGF levels in diabetic subjects. Also results of our study indicated that hypertension is widespread in common AA genotyped subjects. The findings of the subjects with TT genotype will possibly provide useful information so long as the number of subjects are increased.

Even if the RT-PCR is more expensive than the traditional PCR but it has some advantages especially in terms of reliability, practicability, time and the contamination risk.

KAYNAKLAR

1. Bussolino E, Di Renzo ME, Ziche M, Olivero M, Naldini L and et.al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell Biol.* 1992;119: 629-641.
2. Nakamura T, Nawa K and Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Bioph Res Co.* 1984;122: 1450-1459.
3. Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, Kida I, Aoki M, Moriguchi A et al. Expression of local hepatocyte growth factor system in vascular tissue. *Biochem Bioph Res Co.* 1995;215: 483-488.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2008;31: 55-60.
5. Grundy SM., Benjamin İJ., Burke GL, Chait A, Eckel R, Howard BV et al. Diabetes and cardiovascular disease a statement for healthcare professionals from the american heart association . *Circulation* 1999;100: 1134-1146.
6. Mooradian AD. Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus current management guidelines. *Arch Intern Med* 2003;163: 33-40.
7. Sowers JR, Epstein M and Frohlich ED. Diabetes, hypertension and cardiovascular disease : An update. *Hypertension* 2001;37: 1053-1059.
8. Wild S, Roglic G, Green A. Global prevalence of diabetes. estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27: 1047-1053.
9. Kearney PM., Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005;365: 217–23.
10. Altun B, Arıcı M, Erdem Y, Dericı Ü, Nergizoğlu G, Turgan Ç et al. and Turkish Society of Hypertension and Renal Diseases. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in Turkey (the PatenT study) in 2003. *J Hypertens* 2005;23(10):1817-1823.
11. Satman İ, Sargin M, Yılmaz T, Dinççağ N, Şengül A, Karşıdağ K et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in turkey results of the Turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care* 2002;25: 1551–1556.

12. Nishimura M, Ushiyama M, Ohtsuka K, Nishida M, Inoue N, Matsumuro A et.al. Serum Hepatocyte Growth Factor as a Possible Indicator of Vascular Lesions. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84: 2475–2480.
13. Nakamura S, Morishita R, Moriguchi A, Yo Y, Nakamura Y, Hayashi S-i et.al. Hepatocyte growth factor as a potential index of complication in diabetes mellitus. *Hypertens* 1998;16: 2019-2026.
14. Yamagami H, Moriyama M, Tanaka N, Arakawa Y. Detection of serum and intrahepatic human hepatocyte growth factor in patients with type c liver diseases. *Intervirolology* 2001;44: 36-42.
15. Matsumoto K and Nakamura T. Renotropic role and therapeutic potential of HGF in the kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17: 59-61.
16. Quesnel C, Marchand-Adam S, Fabre A, Marshall-Somme J, Philip I, Lasocki S et.al. Regulation of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in patients with acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294: 334-343.
17. Depuydt CE, De Potfer CR, Zalata A, Baekelandt E, Bosmans E and Comhaire FH. Levels of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in seminal plasma of patients with andrological diseases. *J Androl* 1998;19: 175-182.
18. Tanimoto S, Fukumori T, El-Moula G, Shiirevnyamba A, Kinouchi S, Koizumi T et.al. Prognostic significance of serum hepatocyte growth factor in clear cell renal carcinoma: comparison with serum vascular endothelial growth factor. *J.Med.Invest* 2008; 55: 106-111.
19. Tomida M and Saito T. The human hepatocyte growth factor (HGF) gene is transcriptionally activated by leukemia inhibitory factor through the Stat binding element. *Oncogene* 2004;23: 679-686.
20. Taniguchi T, Toi M, Inada K, Imazawa T, Yamamoto Y and Tominaga T. Serum concentration of hepatocyte growth factor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1:1031-1034.
21. Yamagamim H, Moriyama M, Matsumura, Aoki H, Shimizu T, Saito T et.al. Serum concentrations of human hepatocyte growth factor is a useful indicator for predicting the occurrence of hepatocellular carcinomas in C-viral chronic liver diseases. *Cancer* 2002;95: 824-34.

22. Yamashita J-I, Ogawa M, Yamashita S, Nomura K, Kuramoto M, Tetsushi S et al. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res* 1994;54: 1630-1633.
23. Takiuchi S, Mannami T, Miyata T, Kamide K, Tanaka C, Kokubo Y et al. Identification of 21 single nucleotide polymorphisms in human hepatocyte growth factor gene and association with blood pressure and carotid atherosclerosis in the Japanese population. *Atherosclerosis* 2004;173: 301-307.
24. Motone M, Katsuya T, Ishikawa K, Iwashima Y, Sugimoto K, Yamamoto K et al. Association between hepatocyte growth factor gene polymorphism and essential hypertension. *Hypertens Res* 2004;27: 247-251.
25. Han W., Yap MKH, Wang J and Yip SP. Family-based association analysis of hepatocyte growth factor (HGF) gene polymorphisms in high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47: 2291-2299.
26. Nakamura T, Teramoto H and Ichihara A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures (hepatocyte growth factor/hepatotropic factor/liver regeneration) *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1986;83: 6489-6493.
27. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N and Nishino T. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *Febs Letters* 1987;224(2): 311-316.
28. Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K et al. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J. Clin. Invest* 1988;81: 414-419.
29. Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H et al. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor (motility factor/tumor cell invasion/chromosomal localization/c-met tyrosine kinase receptor/lung fibroblast-derived mitogen). *Proc. Nati. Acad. Sci. USA Cell Biology* 1991;88: 7001-7005.

30. Hepatocyte Growth Factor. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=142409>. 18 Mayıs 2009 tarihinde ulaşılmıştır.
31. Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;53: 35-69.
32. Conway K, Price P, Harding KG, Jiang WG. The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing. *Wound Rep Reg* 2006;14: 2-10.
33. Richardson L, Schwall RH and Zioncheck TF. Hepatocyte growth factor/scatter factor: structure, function and regulation by glycosaminoglycans. *Trends Glycosci. Glycotechnol* 1996;8:167-182.
34. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989;342: 440-443.
35. Cioce V, Csaky KG, Chan AML, Bottaro DP, Taylor WG, Jensen R et al. Hepatocyte growth factor (HGF)/NK1 is a naturally occurring hgf/scatter factor variant with partial agonist/antagonist activity. *J Biol Chem* 1996;271: 13110–13115.
36. Mizuno K, Inoue H, Hagiya M, Shimizu S, Nose T, Shimohigashi Y et al. Hairpin loop and second kringle domain are essential site for heparin binding and biological activity of hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 1994;269: 1131-1136.
37. Stella MC, Comoglio PM. HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31: 1357-1362.
38. Wang X., Choi AMK., and Ryter SW. Function of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in endothelial cells. In: AIRD WC, editor. *Endothelial Biomedicine*. Cambridge: Cambridge University Press, 2007: 285-290.
39. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y and Kitamura N. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 1993;268(14): 10024-10028.

40. Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F and Comoglio PM. Biological activation of proHGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by stichiometric reaction. *J Biol Chem* 1995;270: 603-611.
41. Somerset DA, Strain AJ, Afford S, Whittle MJ and Kilby MD. Hepatocyte growth factor activator (HGF-A) and its zymogen in human placenta. *Placenta* 2000; 21: 615-620.
42. Miyazawa K, Wang Y, Minoshima S, Shimizu N and Kitamura N. Structural organization and chromosomal localization of the human hepatocyte growth factor activator gene. phylogenetic and functional relationship with blood coagulation factor XII, urokinase, and tissue-type plasminogen activator. *J. Biochem.* 1998;258: 355-361.
43. Kirchhofer D, Lipari MT, Santell L, Billeci KL, Maun HR, Sandoval W et al. Utilizing the activation mechanism of serine proteases to engineer hepatocyte growth factor into a Met antagonist. *PNAS* 2007;104: 5306–5311.
44. Bolanos-Garcia VM. MET meet adaptors: functional and structural implications in downstream signalling mediated by the Met receptor. *Mol Cell Biochem* 2005;276: 149–157.
45. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM.-L, Kmiecik TE, Vande Woude GF et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991;251: 802-804.
46. Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clinica Chimica Acta* 2003;327: 1 –23.
47. c-Met Signalling. Available from: URL: <http://www.icampus.ucl.ac.be/courses/SBIM2520/document/genemol/pictures/c-met/c-met.html>. 22.06.2009 tarihinde ulaşılmıştır.
48. Sheth PR and Watowich SJ. Biochemical ground-rules regulating c-MET receptor tyrosine kinase activation and signaling. *Cancer Ther* 2005;3: 1-12.
49. Comoglio P. and Boccaccio C. The HGF receptor family: unconventional signal transducers for invasive cell growth. *Genes to Cells* 1996;1: 347-354.
50. Weidner KM., Sachs M and Birchmeier W. The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/ hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol* 1993;121: 145-154.

51. Hartmann G, Naldini L, Weidner KM, Sachs M, Vigna E, Comoglio PM et al. A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation but not mitogenesis (motility factor/receptor-type tyrosine kinase/MET oncogene/protein processing/splice variants) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Cell Biology* 1992;89: 11574-11578.
52. Heldin C-H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995;80: 213-223.
53. You W-K and McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB reports* 2008; 41(12): 833-839.
54. Deakin JA and Lyon M. Differential regulation of hepatocyte growth factor/scatter factor by cell surface proteoglycans and free glycosaminoglycan chains. *J Cell Sci* 1999;112: 1999-2009.
55. Lyon M, Deakin JA and Gallagher JT. The mode of action of heparan and dermatan sulfates in the regulation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *J Biol Chem* 2002;277: 1040–1046.
56. Kemp LE, Mulloy B and Gherardi E. Signalling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors. *Biochem Soc Trans* 2006;34: 414-417.
57. Sakata H, Stahl SJ, Taylor WG, Rosenberg JM, Sakaguchi K, Wingfield PT et al. Heparin binding and oligomerization of hepatocyte growth factor/scatter factor isoforms. *The J Biol Chem* 1997;272: 9457–9463.
58. Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL et al. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Cell Biology* 1993;90: 1937-1941.
59. Xin X, Yang S, Ingle G, Zlot C, Rangell L, Kowalski J et al. Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 2001;158: 111-1120.
60. Gherardi E, Gray J, Stoker M., Perryman M and Furlong R. Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Cell Biology* 1989;86: 5844-5848.

61. Rubin JS, Chan AM.-L, Bottaro DP, Burges WH, Taylor WG, Cech AC et al. A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry* 1991;88: 415-419.
62. Jeffers M, Rong S and Vande Woude GF. Enhanced tumorigenicity and invasion-metastasis by hepatocyte growth factor/scatter factor-met signalling in human cells concomitant with induction of the urokinase proteolysis network. *Mol Cell Biol* 1996;16: 1115–1125.
63. Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM and Klein R. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev* 1997;11: 3341-3350.
64. Defrances MC, Wolf H, Michalopoulos GK and Zarnegar R. The presence of hepatocyte growth factor in the developing rat. *Development* 1992;116: 387-395.
65. Ma PC, Maulik G, Christensen J and Salgia R. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer and Metastasis* 2003;22: 309-325.
66. Matsumoto K and Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239: 639–644.
67. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Matsumoto K et al. Mitogenic and antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor through ERK, STAT3, and Akt in endothelial cells. *Hypertension* 2001;37: 581-586.
68. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Kim S et al. Anti-apoptotic action of hepatocyte growth factor through mitogen-activated protein kinase on human aortic endothelial cells. *J Hypertens* 2000;18:1411-1420.
69. Makondo K, Kimura K, Kitamura N. Hepatocyte growth factor activates endothelial nitric oxide synthase by Ca^{2+} and phosphoinositide 3 kinase/Akt-dependent phosphorylation in aortic endothelial cells. *Biochem. J.* 2003;374: 63-69.

70. Matsumoto K and Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J. Biochem* 1996;119: 591-600.
71. Seki T, Hagiya M, Shimonishi M, Nakamura T. and Shimizu S. Organization of the human hepatocyte growth factor-encoding gene (Recombinant DNA; liver regeneration; domain; genomic structure; introns; exons; serine protease; plasminogen; kringle). *Gene* 1991;102: 213-219.
72. Hepatocyte growth factor [Homo sapiens] Available from: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/219700?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum. 18 Mayıs 2009 tarihinde ulaşılmıştır.
73. Human HGF SNP. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. 15 Nisan 2009 tarihinde ulaşılmıştır.
74. Hayashi S-I, Morishita R, Nakamura S, Yamamoto K, Moriguchi A, Nagano T et al. Potential role of hepatocyte growth factor, a novel angiogenic growth factor, in peripheral arterial disease downregulation of hgf in response to hypoxia in vascular cells. *Circulation* 1999;100: II-301-II-308.
75. Ono M, Sawa Y, Mizuno S, Fukushima N, Hajime I, Bessho K et al. Hepatocyte growth factor suppresses vascular medial hyperplasia and matrix accumulation in advanced pulmonary hypertension of rats. *Circulation* 2004;110: 2896- 2902.
76. Cantón A, Burgos R, Hernández C, Mateo C, Segura RM, Mesa J et al. Hepatocyte growth factor in vitreous and serum from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2000;84: 732-735.
77. Dai C, Yang J, Bastacky S, Xia J., LI Y and Liu Y. Intravenous administration of hepatocyte growth factor gene ameliorates diabetic nephropathy in mice. *J Am Soc Nephrol* 2004;15: 2637-2647.
78. Hiratsuka A, Adachi H, Fujiura Y, Yamagishi S-I, Hirai Y, Enomoto M et al. Strong association between serum hepatocyte growth factor and metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90: 2927-2931.
79. Nakamura S, Moriguchi A, Morishita R, Aoki M, Yo y, Hayashi S-i. et al. A novel vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), as a potential

- index of the severity of hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242: 238–243.
80. Satani K, Konya H, Hamaguchi T, Umehara A, Katsuno T, Kohri K et al. Clinical significance of circulating hepatocyte growth factor, a new risk marker of carotid atherosclerosis in patients with Type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 2006; 23: 617–622.
 81. Morishita R, Nakamura S, Nakamura Y, Aoki M, Atsushi M, Kida I et al. Potential role of an endothelium-specific growth factor, hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes. *Diabetes.* 1997;46: 138-142.
 82. Kulseng B, Borset M, Espevik T, Sundan A. Elevated hepatocyte growth factor in sera from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 1998;35: 77–80.
 83. Nishimura M, Nakano K, Ushiyama M, Nanb A, Ohtsuka K, Takahashi H et al. Increased serum concentrations of human hepatocyte growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83: 195-198.
 84. Morishita R, Moriguchi A, Higaki J, and Ogihara T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a potential of severity of hypertension index. *Hypertens Res* 1999;22: 161-167.
 85. Ma J, DeFrances MC, Zou C, Johnson C, Ferrell R and Zarnegar R. Somatic mutation and functional polymorphism of a novel regulatory element in the HGF gene promoter causes its aberrant expression in human breast cancer. *J Clin Invest* 2009;119: 478-491.
 86. Takayama H, Larochelle Wj, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M et al. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor (autocrine loop) breast cancer/malignant melanoma/Metytransgenic mice). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Medical Sciences* 1997;94: 701-706.
 87. Harrison P, Bradley L and Bomford A. Mechanism of Regulation of HGF/SF Gene Expression in Fibroblasts by TGF- β 1. *Biochem Biophys. Res.Com.*2000; 271: 203-211
 88. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Ssayama S. Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model. *Circulation* 1997;95:2552-2558.

89. Morishita R, Aoki M, Yo Y and Ogihara T. Hepatocyte growth factor as a cardiovascular hormone: role of HGF in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Endocr J* 2002;49: 273-284.
90. Komamura K, Miyazaki J-Ī., Imai E, Matsumoto K, Nakamura T and Hori M. Hepatocyte Growth Factor Gene Therapy for Hypertension. In: Li S., editor. *Electroporation Protocols: Preclinical and Clinical Gene Medicine. From Methods in Molecular Biology*, New Jersey:Humana Pres, 2008;423: 393-404.
91. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006;29: 43-48.
92. Yuan S, Liu Y and Zhu L. Vascular complications of diabetes mellitus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1999;26: 977-978.
93. Kikkawa R. Chronic complications in diabetes mellitus. *Br J Nutr* 2000;84: 183-185.
94. The Expert Committee. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26: 5-20.
95. Marshall S, Flyvbjerg A. Prevention and early detection of vascular complications of diabetes. *BMJ* 2006;333: 475-480.
96. Fisher M. Macrovascular disease in diabetes. *Medicine* 2006;34:101-103.
97. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-53
98. Kilpatrick ES. Haemoglobin A1c in the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. *J Clin Pathol* 2008;61: 977-982.
99. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group The Effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329: 977-986.
100. Edelman D, Olsen MK, Dudley TK, Harris AC, Oddone EZ. Utility of Hemoglobin A1c in predicting diabetes risk. *J Gen Intern Med* 2004;19: 1175-1180.

101. Rahman S, Rahman T, Ismail AA-S and Rashid ARA. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes Obes Metab* 2007;9: 767–780.
102. Yenigün M. Diyabetik mikroanjiopati ve diyabetik makroanjiopati. Editörler: Yenigün M, Altuntaş Y. Her yönüyle diabetes mellitus. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 2001: 315-399.
103. Nakagami H, Kaneda Y, Ogihara T and Morishita R. Endothelial dysfunction in hyperglycemia as a trigger of atherosclerosis. *Current Diabetes Reviews* 2005;1: 59-63.
104. Hadi AH, suwadi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* 2007;3: 853-876.
105. Nakano N, Morishita R, Moriguchi A, Nakamura Y, Hayashi S-i, Aoki M et al. Negative regulation of local hepatocyte growth factor expression by angiotensin II and transforming growth factor- β in blood vessels potential role of HGF in cardiovascular disease. *Hypertension*. 1998;32: 444-451.
106. Anan F, Masaki T, Yonemochi H and et al. Hepatocyte growth factor levels are associated with the results of ^{123}I -metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metab. Clin. Exp.* 2009;58: 167-173.
107. Holm SW., Cunningham LL Jr, Bensadoun E and Madsen MJ. Hypertension: classification, pathophysiology, and management during outpatient sedation and local anesthesia. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64: 111-121.
108. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman C, Gren LA, Izzo JL. et al. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension* 2003;42: 1206–1252.
109. European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension the task force for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 2007;25: 1105–1187.
110. Fox PD, Sear JW. Hypertension: pathophysiology and treatment. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 2004;4: 71-74.

111. Vikrant S, Tiwari SC. Essential Hypertension-pathogenesis and pathophysiology. Journal, Indian Academy of Clinical Medicine 2001;2: 140-161.
112. Carretero O, Oparil S. Essential hypertension part I: definition and etiology. Circulation. 2000;101: 329-335.
113. Shimokawa H and Takeshita A. Endothelium-dependent regulation of the cardiovascular system. Internal Medicine 1995;34: 939-946.
114. Furchgott RF and Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB J 1989;3: 2007-2018.
115. Sainani GS , Maru VG. Role of endothelial cell dysfunction in essential hypertension. JAPI 2004;52: 966-969.
116. Beevers G, Lip GYH, O'Brien E. ABC of hypertension The pathophysiology of hypertension. BMJ 2001;322: 912-916.
117. Torun E, Bayram F. Endokrin bir organ olarak endotel ve endotelin hipertansiyondaki rolü. Erciyes Tıp Dergisi 2004;26: 126-131.
118. Taddei S and Salvetti A. Endothelial dysfunction in essential hypertension: clinical implications. J Hypertens 2002;20:1671–1674.
119. Petrák O, Widimský J Jr., Zelinka T, Kvasnička J, Strauch B, Holaj R. et al Biochemical markers of endothelial dysfunction in patients with endocrine and essential hypertension. Physiol. Res. 2006;55: 597-602.
120. Türk kardioloji derneği ulusal hipertansiyon tedavi ve takip kılavuzu. Available from: URL: http://www.tkd.org.tr/kilavuz/k03/3_3575c.htm?wbnum=1105. 20Nisan 2009 tarihinde ulaşılmıştır.
121. The seventh report of the Joint National committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure Available from:URL: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/jnc7full.pdf>. 12 Şubat 2009 tarihinde ulaşılmıştır.
122. Bennett PC, Silverman S and Gill P. Hypertension and peripheral arterial disease. Journal of Human Hypertension 2009;23: 213–215.
123. World Health Organisation. Definition, diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and its complications. Available from: URL:

http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf. 18 Mayıs 2009 tarihinde ulaşılmıştır.

124. Shinoda K, Ishida S, Kawashima S, Wakabayashi T, Matsuzaki T, Takayama M et al. Comparison of the levels of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in aqueous fluid and serum with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Br J Ophthalmol* 1999;83: 834-837.
125. Tamama K, Sumino H, Ichikawa S, Kanda T, Kotajima N, Fukumura Y et al. Hormone replacement therapy causes a decrease in hepatocyte growth factor in hypertensive women. *J Hypertens* 2003; 21: 1151-1156.
126. Nakamura Y, Morishita R, Nakamura S, Aoki M. A vascular modulator, hepatocyte growth factor is associated with systolic pressure. *Hypertension* 1996;28: 409-413.
127. Hayashi Y, Saitoh S, Takagi S, Tuchihashi K, Miura T and Shimamoto K. Hepatocyte growth factor and 24-hour ambulatory blood pressure monitoring. *Hypertens Res* 2002;25: 655-660.
128. Katoh H, Shimada T, Inoue S-İ, Takahashi N, Shimizu H, Ohta Y et al. Reduced high serum hepatocyte growth factor levels after successful cardioversion in patients with atrial fibrillation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;31: 145-151.
129. Skrtic S, Niklason A, Leoo T. & T. Hedner For The Riahd Study Group. Risk factor identification and assessment in hypertension and diabetes (Riahd) study. *Blood Pressure* 2006;15: 367-374.
130. Middelbeek RJ-W.and Horton ES. The Role of glucose as an independent cardiovascular risk factor. *Curr Diab Rep* 2007;7: 43-49.
131. Landmesser U and Drexler H. Endothelial function and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2007;22: 316-320.
132. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G and et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001;104: 191-196.
133. Alexander RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 1995;25: 155-161.

134. Stirban AO and Tschoepe D. Cardiovascular complications in diabetes targets and interventions. *Diabetes Care* 2008;31(2): 215–221.
135. Schalkwijk CG and Stehouwer CDA. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci* 2005;109:143–159.
136. Chait A and Bornfeld KE. Diabetes and atherosclerosis: is there a role for hyperglycemia? *Journal of Lipid Research* 2009;50: 335-339.
137. Gossain VV. Endothelial function, type 2 Diabetes Mellitus and cardiovascular disease:A clinical perspective. *Int J Diab Dev Ctries* 2001;21: 163-171.
138. Özkan Y, Akbulut M, Koç Z, Ulusoy Şule C, Emir D. Hipertansiyon ve tip 2 Diabetes Mellitus. *T Klin J Cardiol* 2002;15: 394-398.
139. Arauz-Pacheco C, Parrottm A, Raskin P. The treatment of hypertension in adult patients with diabetes. *Diabetes Care* 2002;25(1): 134-147.
140. Govindarajan G, Sowers JR, Stump CS. Hypertension and Diabetes Mellitus. *European Cardiovascular Disease* 2006: 1-7.
141. Önder MR, Özerkan F. Diyabet ve Hipertansiyon. *T Klin J Cardiol* 2000;13: 401-403.
142. Duvnjak L, Sepuri KM., Car N, Metelko Z. Approach to the arterial hypertension in patients with Diabetes Mellitus. *Diabetol Croat* 2004;33: 77-83.
143. Laakso M. Hyperglycemia as a risk factor for cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Primary Care: Clinics in Office Practice* 1999;26: 830-839.
144. Witmer CT, Kusukawa N. *Nucleic Acid Techniques*. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. USA: Sanders, 2006: 1407-1449.
145. Santos CB, Boy RT, Santos JM, Silva MPS and Pimentel MMG. Chromosomal investigations in patients with mental retardation and/or congenital malformations. *Genet Mol Biol* 2000;23: 703-707.
146. Poxton IR. Molecular techniques in the diagnosis and management of infectious diseases: do they have a role in bacteriology? *Med Princ Pract* 2005;14: 20-26.
147. Powledge TM. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ* 2004;28: 44-50.

148. Yıldırım A, Turhan H, Yanmaz V, Bakan E. EDTA'lı Tam Kan Örneklerinden Otomatik DNA İzolasyonu: Manuel DNA İzolasyonu ile Karşılaştırma. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2008;3: 32-38.
149. Nolte FS, Hill C. Polymerase Chain Reaction and Other Nucleic Acid Amplification Technology. McPherson RA, Pincus MR, editors: *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 21st Edition: USA: WB Saunders Company, 2006:257-263.
150. Haque KA, Pfeiffer R, Beerman MB and et al. Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC Biotechnol* 2003;3: 1-10.
151. Cseke LJ, Wu W. and Tsai C-J. Isolation and purification of DNA. *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. In: Cseke LJ, Kaufman PB, Podila GK, Tsai C-J, editors. *Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, second edition. UK: CRC Pres, 2003: 17-18.
152. Cockerill F. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127: 1112-1120.
153. Lohmann S, Lehmann L and Tabiti K. Fast and flexible single nucleotide polymorphism (SNP) detection with the lightcycler system. *Biochemica* 2000;4: 23-28.
154. SNP for rs 2286194. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=rs2286194>.
155. Min J-K, Lee Y-M, Kim JH., Kim Y-M and et al. Hepatocyte growth factor suppresses vascular endothelial growth factor-induced expression of endothelial ICAM-1 and VCAM-1 by inhibiting the nuclear factor-kappa B pathway. *Circ Res* 2005;96: 300-307.
156. Gong R, Rifai A and Dworkin LD. Anti-inflammatory effect of hepatocyte growth factor in chronic kidney disease: targeting the inflamed vascular endothelium. *J Am Soc Nephrol* 2006;17: 2464-2473.
157. Mcinnes GT. Systolic hypertension as a cardiovascular risk factor. *Blood Pres* 2002;11: 134-143.
158. Morishita R, Higaki J, Hayashi S-I, Yo Y, Aoki M, Nakamura S. et al. Role of hepatocyte growth factor in endothelial regulation: prevention of high D-

- glucose-induced endothelial cell death by prostaglandins and phosphodiesterase type 3 inhibitor. *Diabetologia* 1997;40: 1053–1061.
159. Morishita R, Nakamura S, Hayashi S-i, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano T et al. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension* 1999;33:1379-1384.
 160. Carmena R, Duriez P, Fruchart J-C. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109: III-2–III-7.
 161. Howard BV, Robbins DC, Sievers ML, Lee ET, Rhoades D, Devereux RB. et al. LDL cholesterol as a strong predictor of coronary heart disease in diabetic individuals with insulin resistance and low LDL The Strong Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20: 830-835.
 162. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874.
 163. Boos CJ and Lip GYH. Elevated high-sensitive C-reactive protein, large arterial stiffness and atherosclerosis: a relationship between inflammation and hypertension? *J Hum Hypertens* 2005;19: 511–513.
 164. Pfützner A and Forst T. High-sensitivity C-reactive protein as a cardiovascular risk marker in patients with Diabetes Mellitus. *Diabetes Technol Ther* 2006;8: 28-36.
 165. Choi H, Cho DH, Shin HH, Park JB. Association of high sensitivity c-reactive protein with coronary heart disease prediction, but not with carotid atherosclerosis, in patients with hypertension. *Circ J* 2004; 68: 297-303.
 166. Tsunoda K, Arita M, Yukawa M, Ueyama M, Furuta M, Nakagawa T. et al. Retinopathy and hypertension affect serum high-sensitivity C-reactive protein levels in Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2005;19: 123-127.
 167. Cambien F, Poirier O, Nicaud V, Herrmann SF, Mallet C, Ricard S et al. Sequence diversity in 36 candidate genes for cardiovascular disorders. *Am. J. Hum. Genet* 1999;65: 183–191.
 168. Aybek H, Ercan F, Aslan D, Şahiner T. Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey. *Clin Biochem* 2007;40: 172-176.

169. Submitted SNP(ss) Details: ss7990335. Available From: URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ss.cgi?subsnp_id=7990335. 18 Mayıs 2009 tarihinde ulaşılmıştır.
170. Yoshitomi Y, Kojima S, Umemoto T, Kubo K, Matsumoto Y, Yano M. et al. Serum Hepatocyte growth factor in patients with peripheral arterial occlusive disease. *JCE & M* 1999;84: 2425-2428.
171. Kamide K, Yang J, Matayoshi T, Takiuchi S, Horio T, Yoshii M. et al. Genetic polymorphisms of L-type calcium channel $\alpha 1C$ and $\alpha 1D$ subunit genes are associated with sensitivity to the antihypertensive effects of L-type dihydropyridine calcium-channel blockers. *Circ J* 2009;73: 732-740.
172. Benjafeld AV, Jeyasingam CL, Nyholt DR Griffiths LR and Morris BJ. G-protein $\beta 3$ subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension* 1998;32: 1094-1097.
173. Morishita R, Aoki M, Nakamura S, Higaki J, Kaneda Y and Ogihara T. Gene therapy for cardiovascular disease using hepatocyte growth factor. *Ann N Y Acad Sci* 2000;902: 369-376.