

BAZI ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN GENETİK POLİMORFİZMLERİ İLE İSKEMİK İNME İLİŞKİSİ

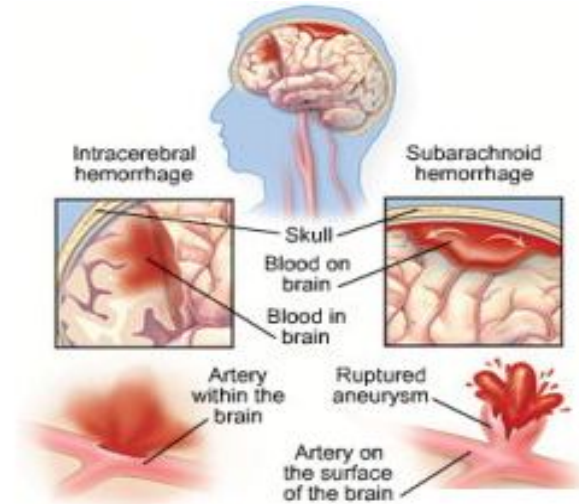
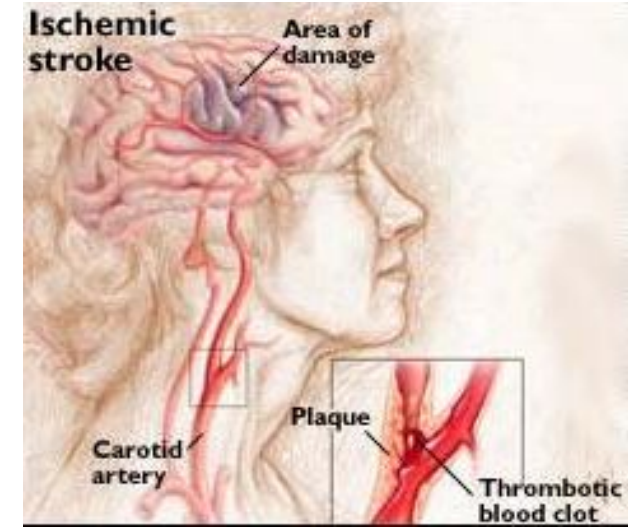
Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

- İnme nedir?
- Paraoksonaz 1 (PON1) polimorfizmleri
- Glutatyon S-transferaz (GST) polimorfizmleri
- Metodlar
- Sonuçlar

İNME (STROK, BEYİN FELCİ)

Beynin bir bölgesine kan akışının ani olarak kesilmesi ile gelişen ve çoğunlukla felç şeklinde ortaya çıkan beyin damar hastalığıdır.

- Kan akışının kesilmesi
 1. Damar tıkanıklığı (İSKEMİK İNME)
(tüm inmelerin %80'i)
 2. Damar kanaması (HEMORAJİK İNME)



İNMENİN ÖNEMİ

- İnme tüm dünyada ölüm nedenleri arasında 2. sırada gelmektedir (Dünya Sağlık Örgütü verileri)

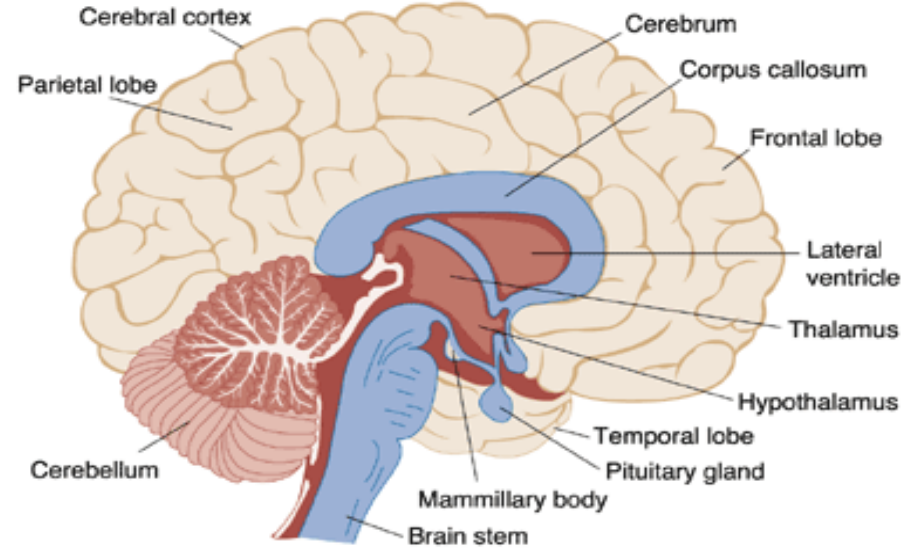
World	Deaths in millions	% of deaths
Ischaemic heart disease	7.25	12.8%
Stroke and other cerebrovascular disease	6.15	10.8%
Lower respiratory infections	3.46	6.1%
Chronic obstructive pulmonary disease	3.28	5.8%
Diarrhoeal diseases	2.46	4.3%
HIV/AIDS	1.78	3.1%
Trachea, bronchus, lung cancers	1.39	2.4%
Tuberculosis	1.34	2.4%
Diabetes mellitus	1.26	2.2%
Road traffic accidents	1.21	2.1%



- Orta ve ileri yaşta, **en fazla sakat bırakan hastalıkların başında gelmektedir.**
- İnmenin yol açtığı sakatlık gelişmiş toplumlarda sağlık ekonomisi üzerinde büyük bir yük oluşturur.

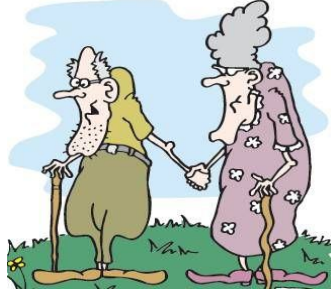
İNME BELİRTİLERİ

- Geçici bulanık görmeden kısa süreli körlüğe kadar değişen, bir veya her iki gözde **geçici görme bozuklukları**
- **El parmaklarında, bütün elde, bacakta veya bütün bir vücut yarısında uyuşukluk veya güçsüzlük hissi**
- **Kısa süreli konuşma veya anlama bozukluğu**
- **Baş dönmesi, bulantı, kusma**
- **Düşme atakları**

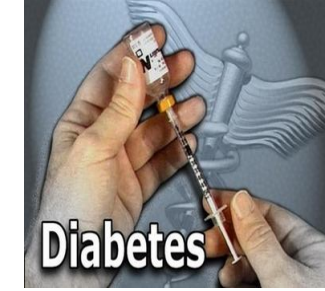
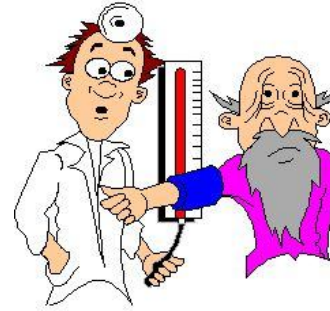


İNME RİSK FAKTÖRLERİ

Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

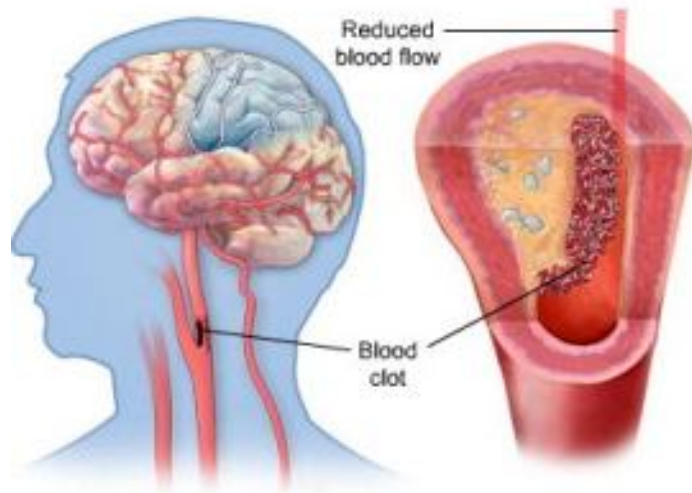


Değiştirilebilen Risk Faktörleri



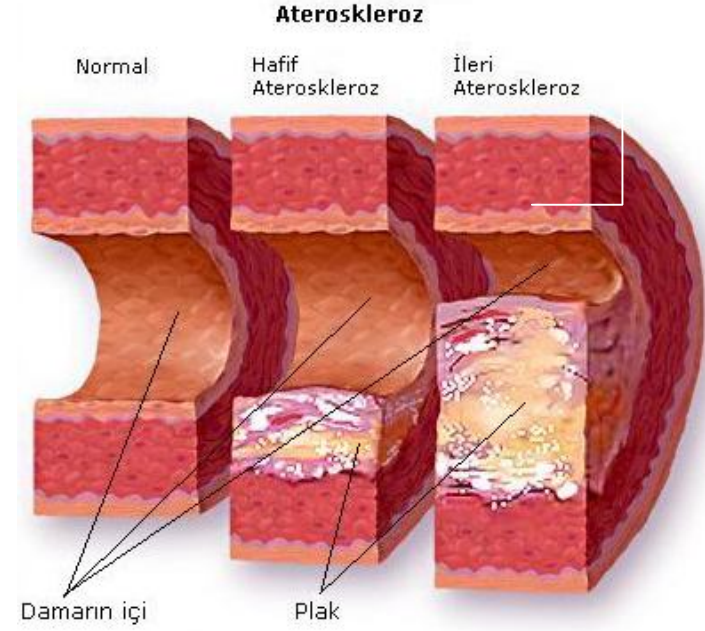
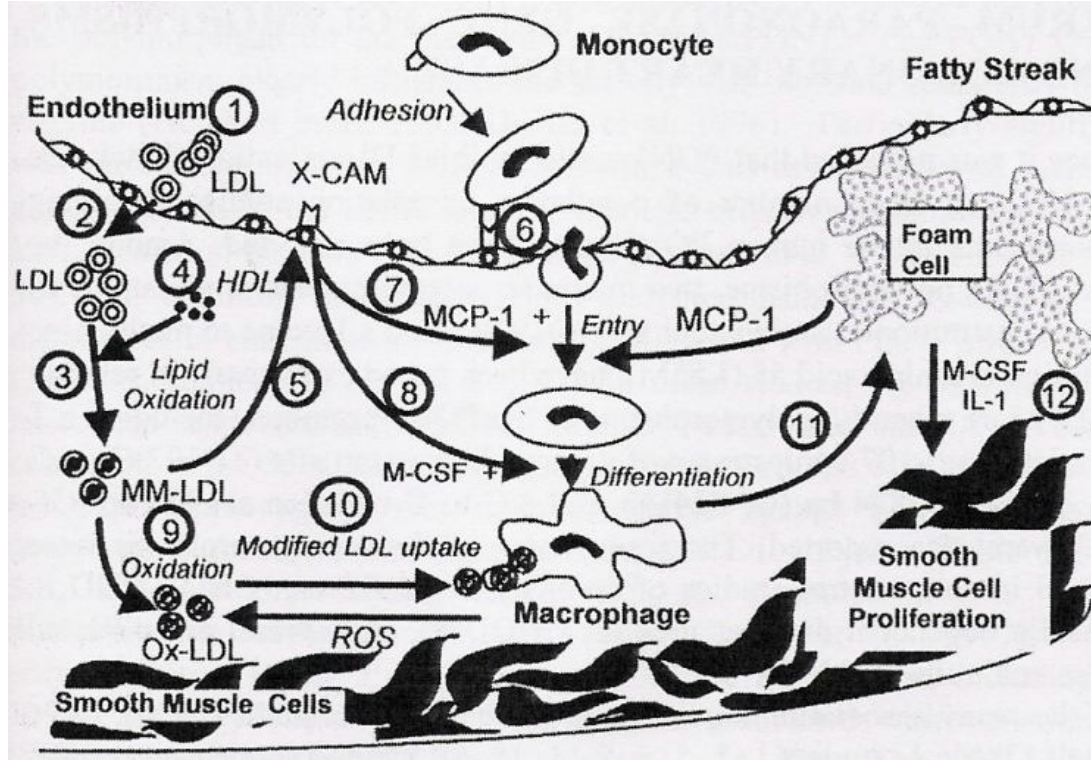
İSKEMİK İNME

- Trombotik (%60) → Ateroskleroz
- Embolik
- Hipoperfüzyon



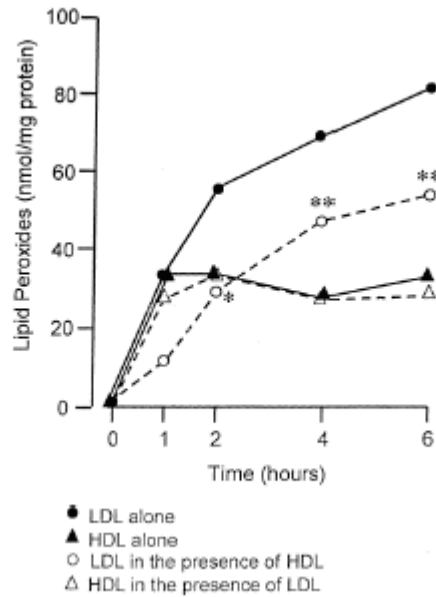
ATEROSKLEROZ

- Oksidatif stres ↑
- LDL oksidasyonu ↑



HDL'NİN ANTIOKSİDAN ROLÜ

- HDL ---ateroskleroza karşı koruyucu
- düşük HDL ► koroner kalp hastalığı riski



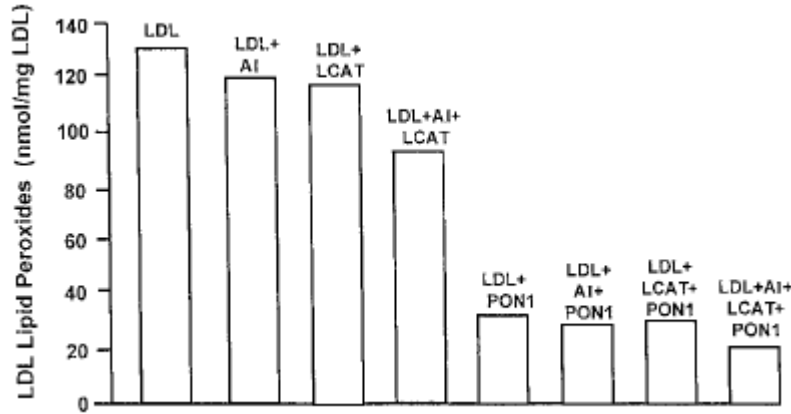
- 1 **Tersine kolesterol taşınımında görev alması**
- 2 **Lipit peroksidasyonunu engellemesi**
- 3 Inhibition of inflammatory processes
- 4 Reduction of blood viscosity
- 5 Maintenance of red-blood cell shape
- 6 Regulation of prostaglandin and thromboxane synthesis
- 7 Activation of fibrinolysis
- 8 Stimulation of nitric oxide synthase
- 9 Inhibition of apoptosis

HDL'nin yapısındaki enzimatik aktiviteye sahip proteinler

PARAOKSONAZ (PON1)

LCAT
PAFAH
Proteinaz (elastaz-benzeri)
Fosfolipaz A
Albumin
Apo A-I

PARAOKSONAZ 1 (PON1)'İN LDL OKSİDASYONUNU ENGELLEMESİ

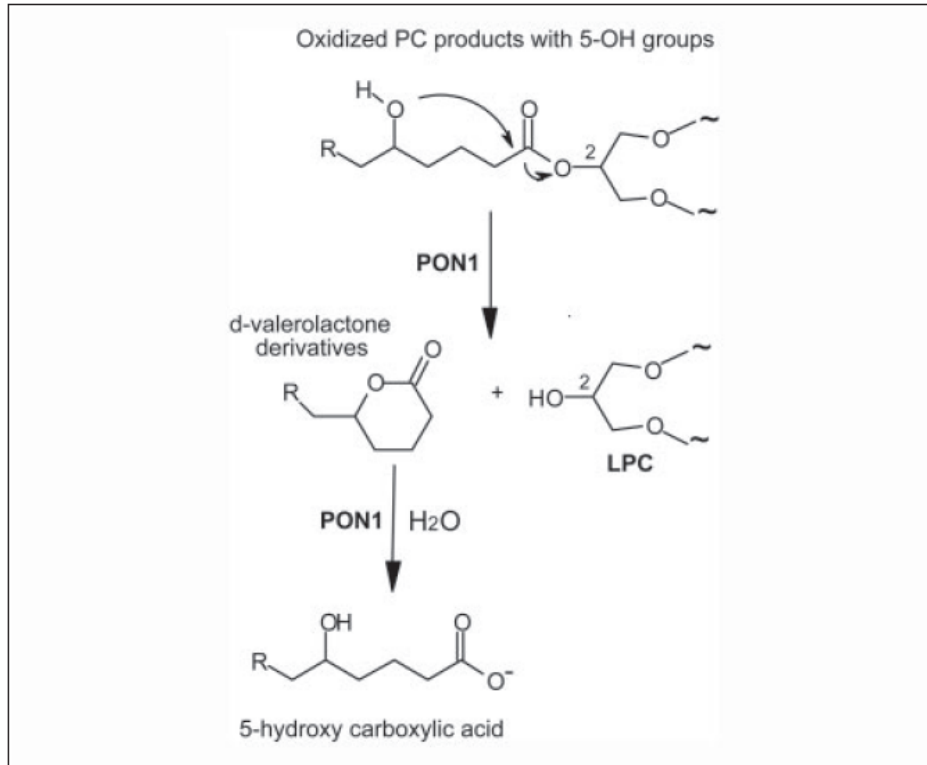


HDL'nin içindeki enzimatik aktiviteye sahip proteinler

PARAOKSONAZ (PON1)
LCAT
PAFAH
Proteinaz (elastaz-benzeri)
Fosfolipaz A
Albumin
Apo A-I

- HDL'ye bağlı PON1 konsantrasyonu bu lipoproteinin anti-oksidan kapasitesini belirleyen en önemli etkenlerden biridir.

OKSİDE LİPİTLERİN PON1 TARAFINDAN HİDROLİZİ



Okside lipitler PON1 tarafından laktonize edilerek LPC ve valerolakton ürünleri oluşur.

Valerolakton PON1 tarafından 5-hidrokarboksilik asit

PON1'İN ANTI-ATEROJENİK ETKİLERİ

1. LDL'yi oksidasyona karşı korur

↓ lipid peroksitleri

2. HDL'yi oksidasyona karşı korur ve fonksiyonlarını muhafaza eder

↑ makrofajlardan kolesterol akışını arttırır

3. Okside olmuş lipidlerin etkilerini azaltır

↓ iltihaplanmaya müsait ve sitotoksik okside fosfolipidleri azaltır

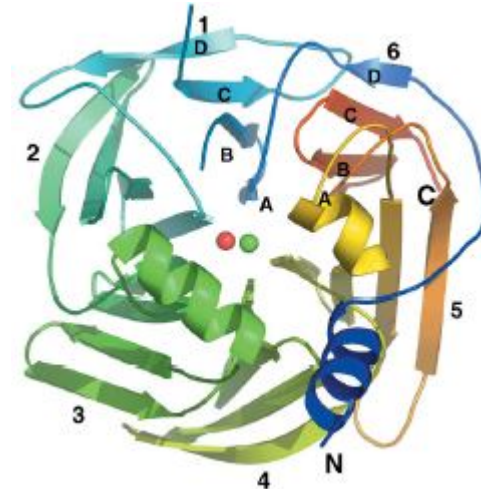
↓ makrofajlarca LDL alımını azaltır

↓ okside olmuş LDL tarafından indüklenen monosit transmigasyonunu azaltır

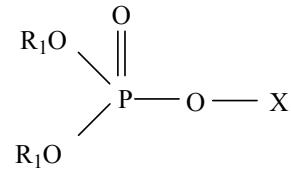
4. Aterosklerotik lezyonlardaki lipid peroksitlerini azaltır

PON1'İN ANTI-ATEROJENİK ETKİLERİ

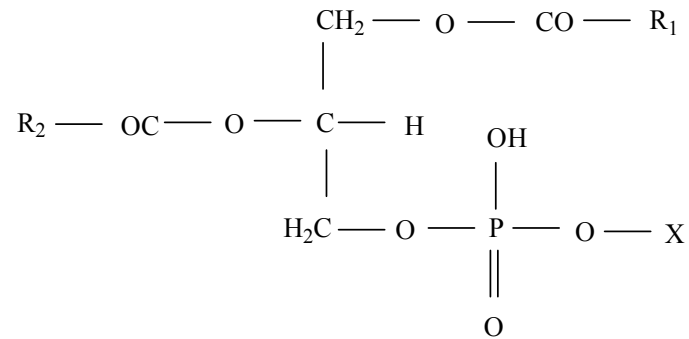
- Kuşlarda bulunan HDL'nin PON1 aktivitesi yok----- LDL'yi oksidasyondan koruyamaz
- PON1 knockout farelerde HDL... LDL'yi oksidasyondan koruyamadı Farelerde ateroskleroz gelişimi
- Yüksek seviyelerde PON1 ifade ettirilen farelerde aterosklerotik lezyonlarda azalma



PON1'İN LİPİT METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ



Organofosfat



Fosfolipit

Saflaştırılmış insan PON1--- LDL'nin lipit peroksidasyonunu engellemekte etkili

PARAOKSONAZ

PON1; aryldialkylphosphatase; **paraoxonase/arylesterase 1**; EC 3.1.8.1/3.1.1.2

3. Hydrolases

3.1 Acting on ester bonds

3.1.8 Phosphoric triester hydrolases

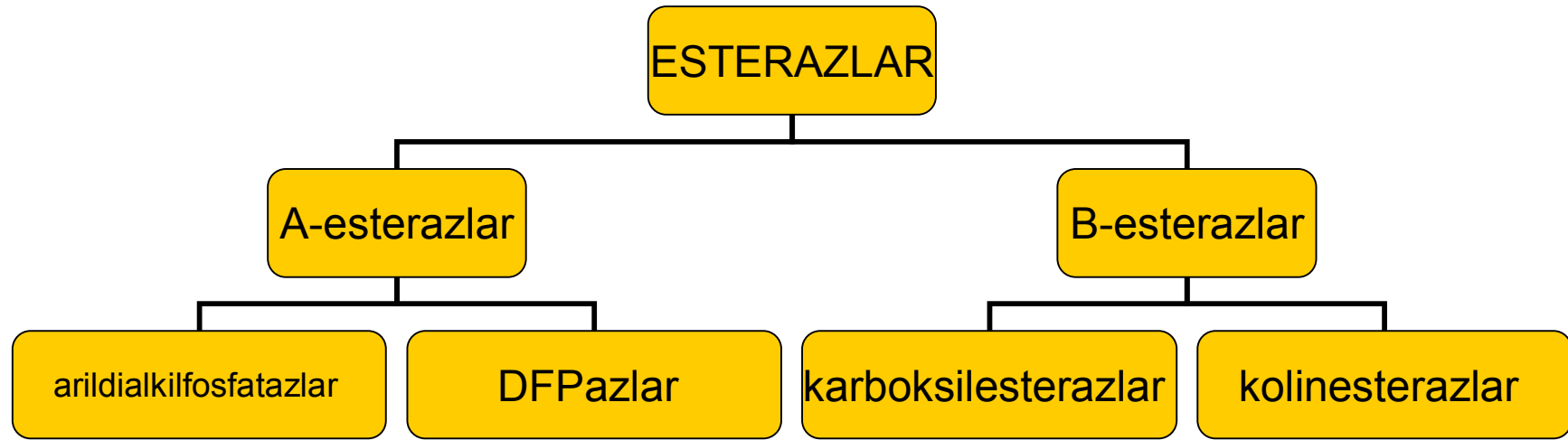
3.1.8.1 aryldialkylphosphatase; organophosphate hydrolase; paraoxonase; A-esterase; aryltriphosphatase; organophosphate esterase; esterase B1; esteraseE4; paraoxon esterase; pirimiphos-methyloxon esterase; OPA anhydrase; organophosphorus hydrolase; phosphotriesterase; paraoxonhydrolase; OPH; organophosphorus acidanhydrase

3. Hydrolases

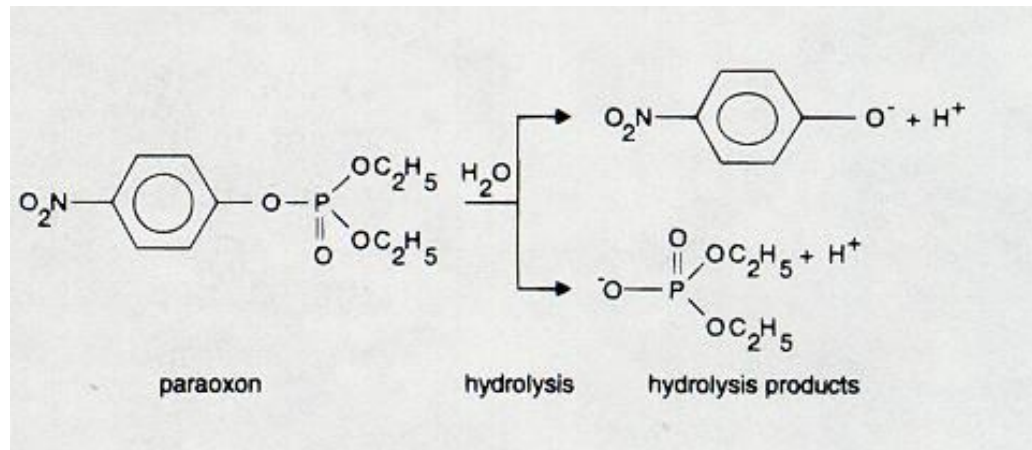
3.1 Acting on ester bonds

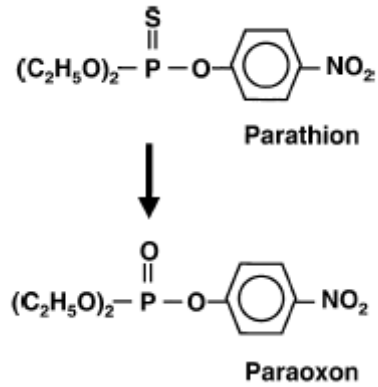
3.1.1 Carboxylic ester hydrolases

3.1.1.2 arylesterase; A-esterase; paraoxonase; aromatic esterase



- İlk kez 1946'da, Abraham Mazurorganofosforlu bileşiklerin hidrolizi
- Arildialkilfosfataz aktivitesinin çalışılması için en sık kullanılan substrat **paraokson**dur; bu nedenle bu enzim **PARAOKSONAZ** olarak adlandırılmıştır





- Oksidatif desülfürasyon
~CYP450
- karaciğerde

PARAOKSONAZ AKTİVİTESİNİN ORGAN VE TÜR DAĞILIMI

- PON aktivitesi

karaciğer*

böbrek

bağırsak

kan*

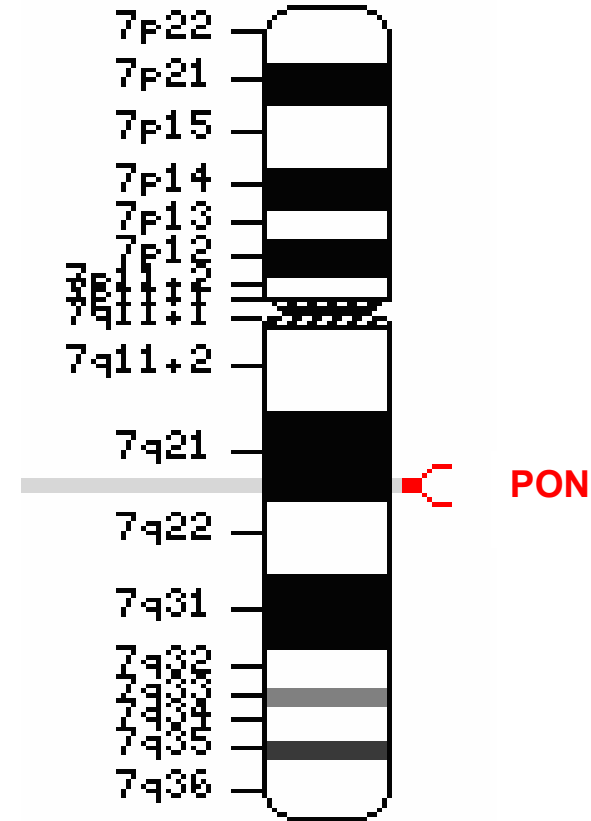
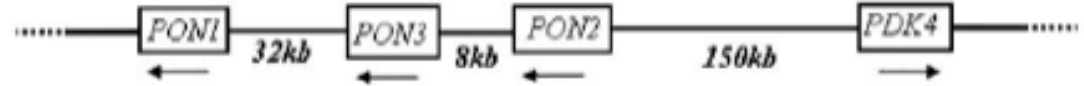
- Memeliler ** yüksek aktivite

- Diğer hayvan gruplarında (kuş, böcek ve balıklarda)

-----düşük veya sıfır aktivite

PARAOKSONAZ AİLESİ

- PON1, PON2, PON3
- PON1, PON3----- HDL
- PON2----- dokular
- Tarihsel bir isim
- PON1'in paraoksonaz aktivitesi zayıf
- PON2 ve 3'ün hemen hiç yok

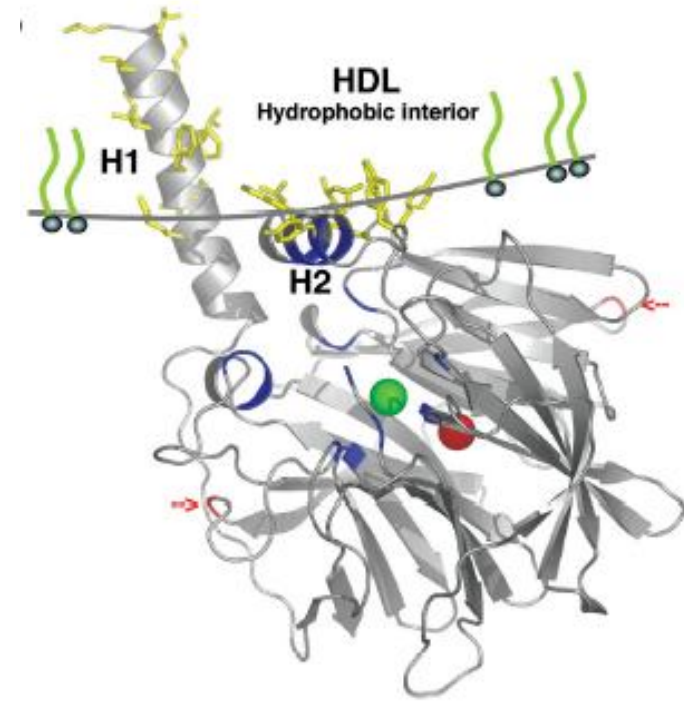


PARAOKSONAZIN FİZYOLOJİK GÖREVLERİ

- Fosfolipaz A2 aktivitesi
- Homosistein tiolaktonun hidrolizi ve inaktivasyonu
- LDL ve HDL'nin oksidasyonunun önlenmesi ***** PON1

PARAOKSONAZ1 (PON1) (EC 3.1.8.1/3.1.1.2)

- 43-kDa, 354 amino asit
- HDL'ye bağlı
- kalsiyuma bağımlı glikoprotein



```
1   makliatlI gmglalfrnh qssyqtrlna lrevqpvelp ncnlvkgiet gsedmeilpn
61  glafissglk ypgiksfnpn spgkillmdl needptvlel gitgskfdvs sfnpbgistf
121 tdednamyll vvnhpdakst velfkfqeee kslhlktir hklIpnlnDI vavgpehfyg
181 tndhyfldpy lqswemygl awsyvvyysp sevrvaegf dfanginisp dgkyvyiael
241 lahkihvyek hanwtltpk sldfntlvdn isvdpetgdI wvgchpngmk iffydsenpp
301 asevlriqni lteepkvtqv yaengtvIqg stvasvykgk lIigtvfhka lycel
```

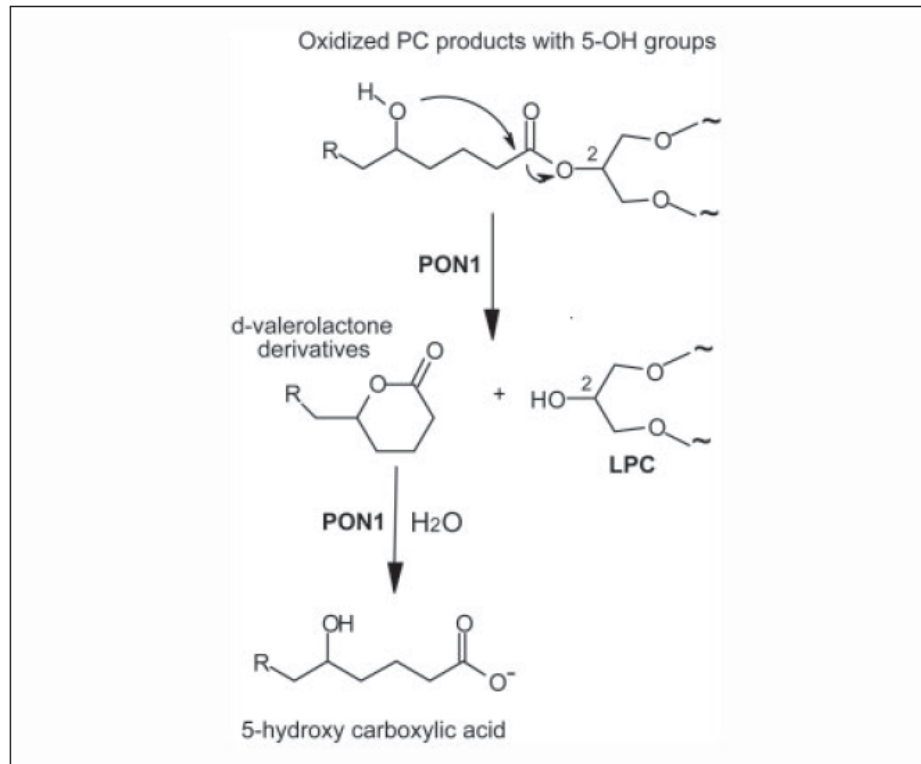
PON1'in substratları

Organofosfatların okson metabolitleri paraokson metil paraokson pirimifos-metil okson klorprifos okson diazokson klorthion okson EPN okson Fenitrokson	Aril (aromatik) esterler fenil asetat tiofenilasetat 2-naftilasetat
	Aromatik laktonlar
	Alifatik laktonlar
	Fosfolipid hidroperoksitler
Sinir ajanları (gazları) soman sarin armin	

PON1'İN FONKSİYONLARI

1. Fosfolipit hidroperoksitleri hidrolize etme fonksiyonu

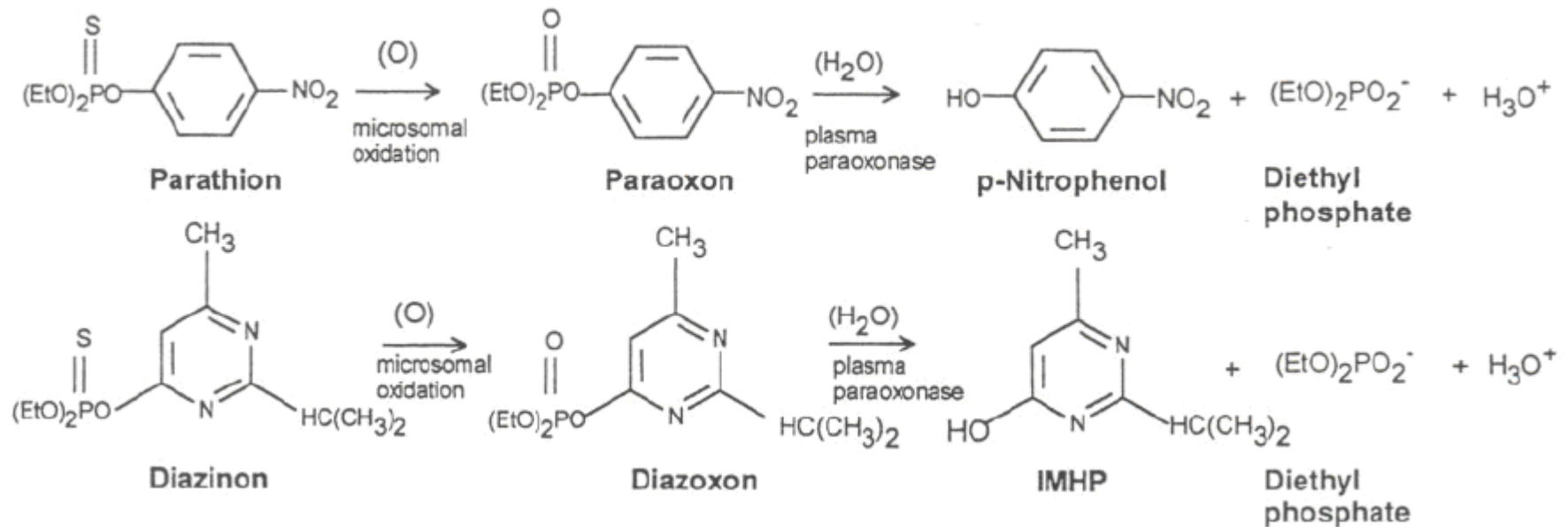
LDL ve HDL'yi oksidatif değişimlere karşı koruması



PON1'İN FONKSİYONLARI

2. Organofosforlu pestisitlere karşı koruma

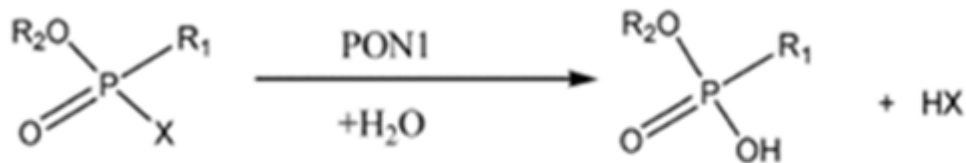
- Parathion ve diazinon, organofosforlu pestisitlerdir.
- İnsan vücuduna girdikten sonra bu bileşikler, karaciğerde P450 enzimlerince katalizlenen mikrozomal oksidatif desülfürasyon reaksiyonu sonucu aktif ve son derece toksik oksonlara dönüşürler.
- Bu toksik ara formlar karaciğer ve kanda, büyük ölçüde **paraoksonazlar** tarafından detoksifikasyona uğrarlar.



PON1'İN FONKSİYONLARI

3. Sinir gazlarına karşı koruma

Hydrolysis of chemical warfare agents ("nerve gases")



$\text{R}_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ $\text{X} = \text{CN}$ Ethyl N-dimethylphosphoroamidocyanide (Tabun)

$\text{R}_1 = \text{CH}_3$ $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $\text{X} = \text{F}$ Isopropyl methylphosphonofluoridate (Sarin)

$\text{R}_1 = \text{CH}_3$ $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$ $\text{X} = \text{F}$ Pinacolyl methylphosphonofluoridate (Soman)

PON1'İN FONKSİYONLARI

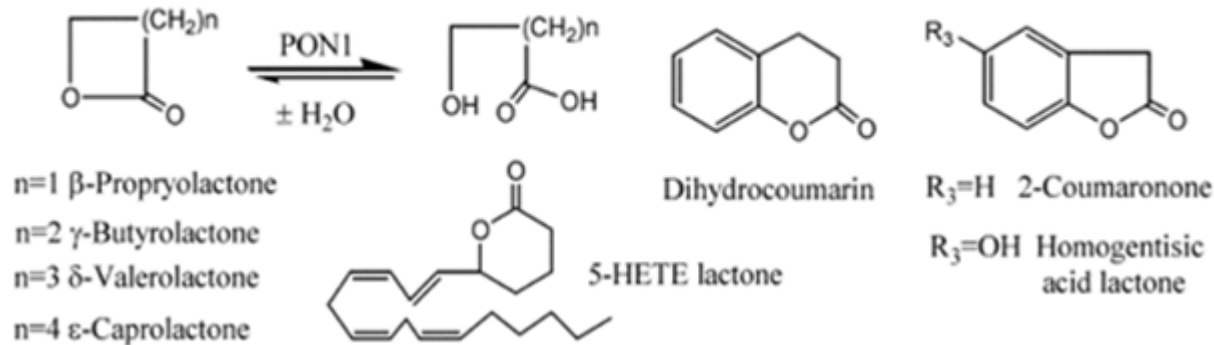
4. Bakteriyel endotoksinlere karşı koruma

Gram-negatif bakterilerin lipopolisakkaritlerine karşı koruma sağlar

5. Laktonları hidrolize etme fonksiyonu

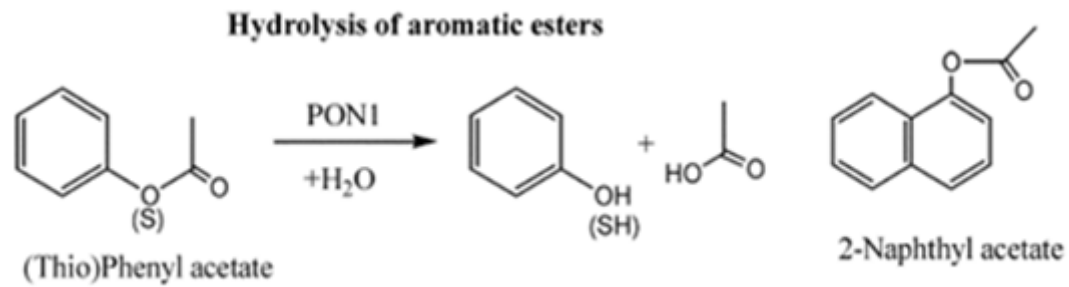
Homosistein tiolakton'un hidrolize edilmesi

Lactone hydrolysis and lactonization of hydroxy acids



PON1'İN FONKSİYONLARI

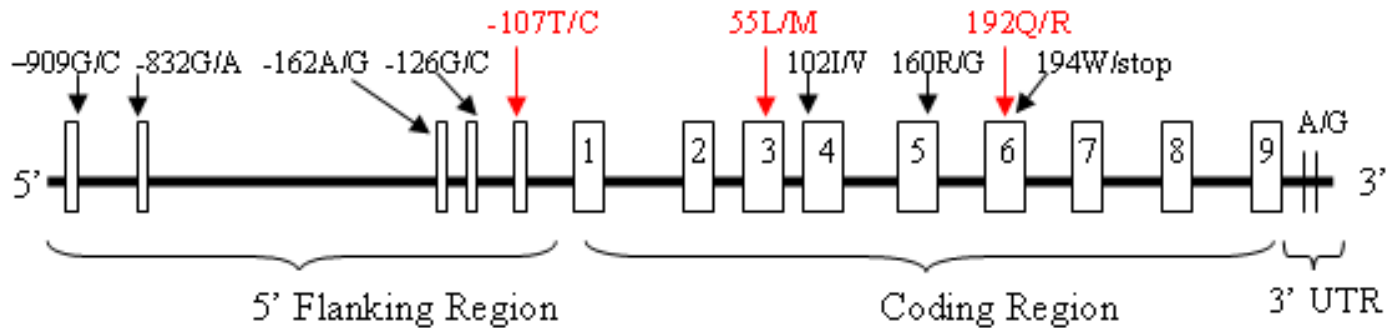
6. Aromatik esterleri hidrolize etme fonksiyonu



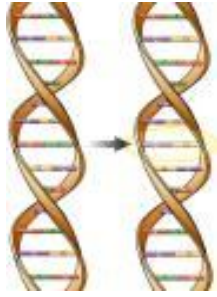
PON1 AKTİVİTE POLİMORFİZMİ

1970lerde,

- İnsanlar arasında serum PON1'in paraoksonu hidrolize etme aktivitelerinde 10 ila 40 kat arası fark bulunmaktadır.
- Bu farklılıklar, büyük ölçüde PON1 geninin protein kodlayan ve promotör bölgelerindeki SNP'lerden kaynaklanmaktadır.



SNP NEDİR?

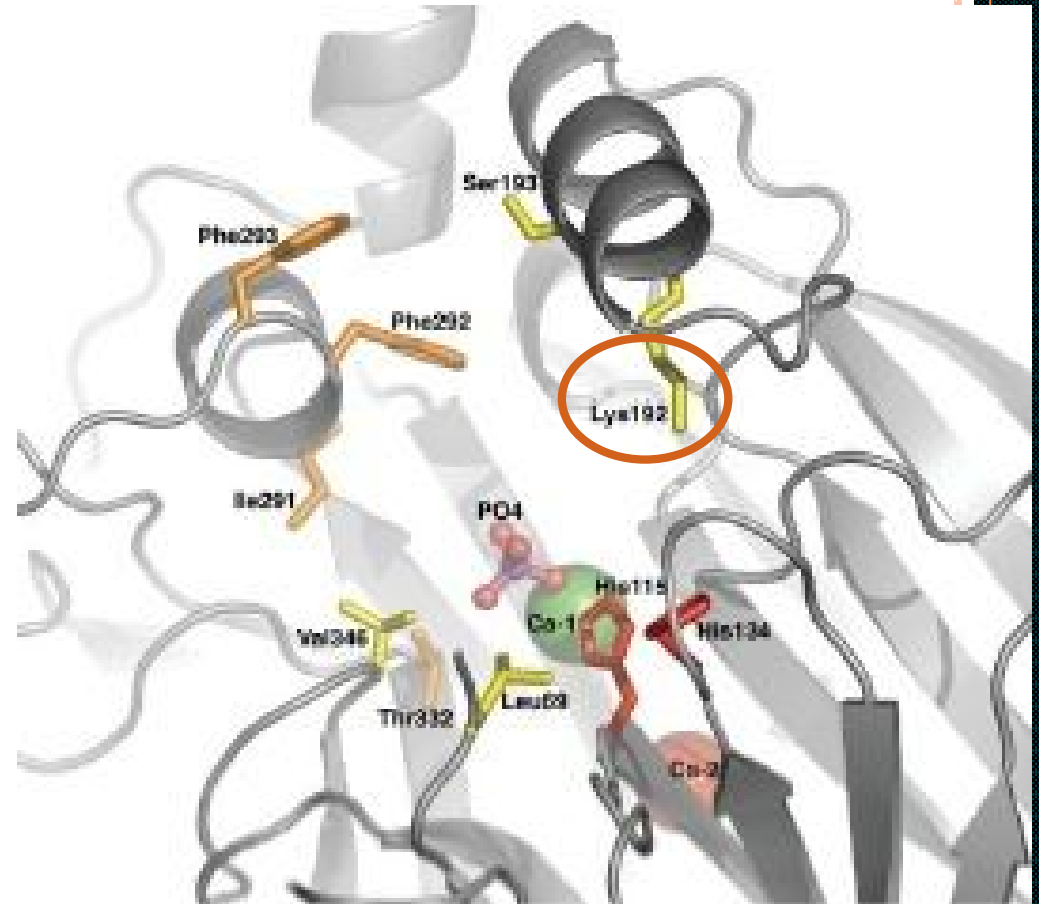
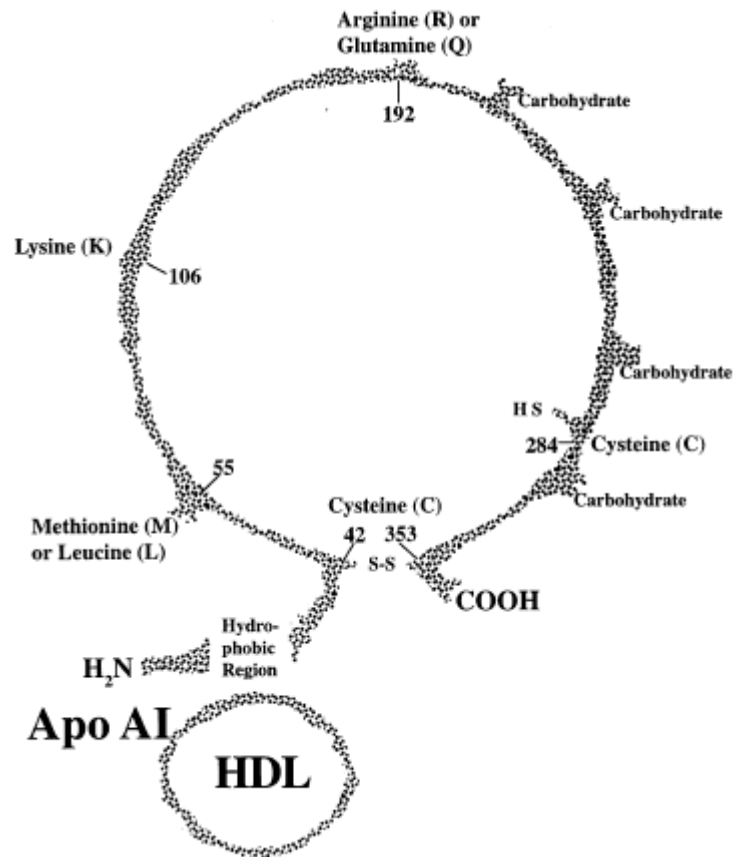


- Tek nükleotid polimorfizmleri (Single nucleotide polymorphisms; SNPs) genomda tek bir nükleotid (A,T,C,or G) bir başkasıyla yer değiştirdiğinde oluşan DNA dizi değişimleridir.
- Bir değişimin SNP olarak kabul edilmesi için toplumun en az %1'inde görülmesi gerekir.
- Frekans bundan düşükse bu alel mutasyon olarak kabul edilir.
- **Mutasyonlar** insanlarda direk ve açıkça hastalıklara yol açabilen dizi değişimleridir.
- Polimorfik sekans varyantları genellikle direk olarak hastalıklara neden olmazlar.
- Birçok SNP'nin hücre fonksiyonu üzerinde etkisi olmamasına rağmen bazı SNP'ler hastalıklara karşı yatkınlık kazandırmakta ya da ilaçlara verilen tepkiyi etkilemektedir.

PON1 192Q/R POLİMORFİZMİ

- 192 Glutamin (Q) → Arginin (R)
A → G

192 Q: düşük paraoksonaz aktivitesi
192 R : yüksek paraoksonaz aktivitesi



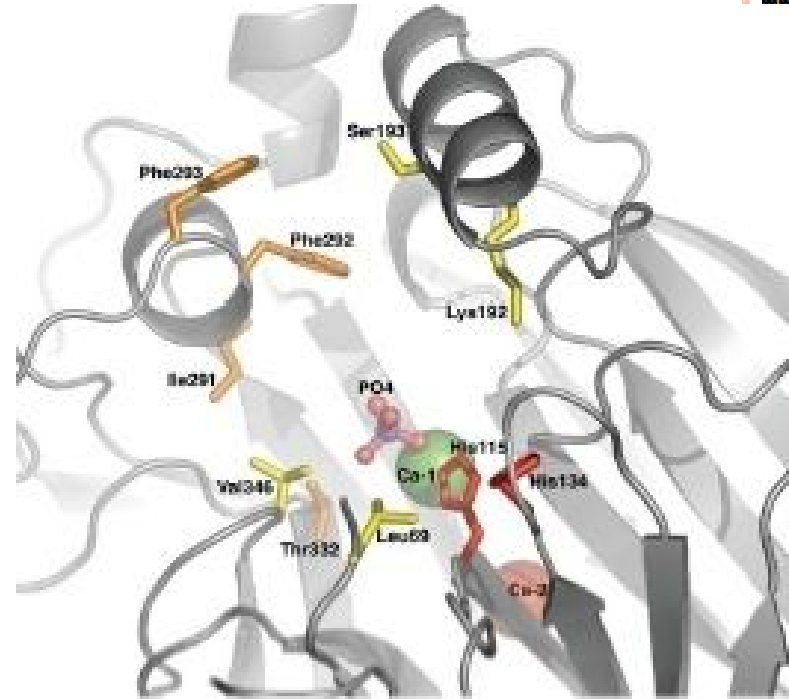
PON1 AKTİVİTE POLİMORFİZMİ SUBSTRATA BAĞIMLIDIR

192R (Arg) izozimi tarafından daha hızlı hidrolize edilen substratlar	Paraokson
	Metilparaokson
	Fenitrokson
	Klortion okson
	EPN okson
	Armin
Her iki izozim tarafından da benzer hızlarda hidrolize edilen substratlar	Fenil asetat
	Klorprifos okson
	2-Naftil asetat
192Q (Glu) izozimi tarafından daha hızlı hidrolize edilen substratlar	Diazokson
	Sarin
	Soman
	Fosfolipid hidroperoksitleri

PON1 55L/M POLİMORFİZMİ

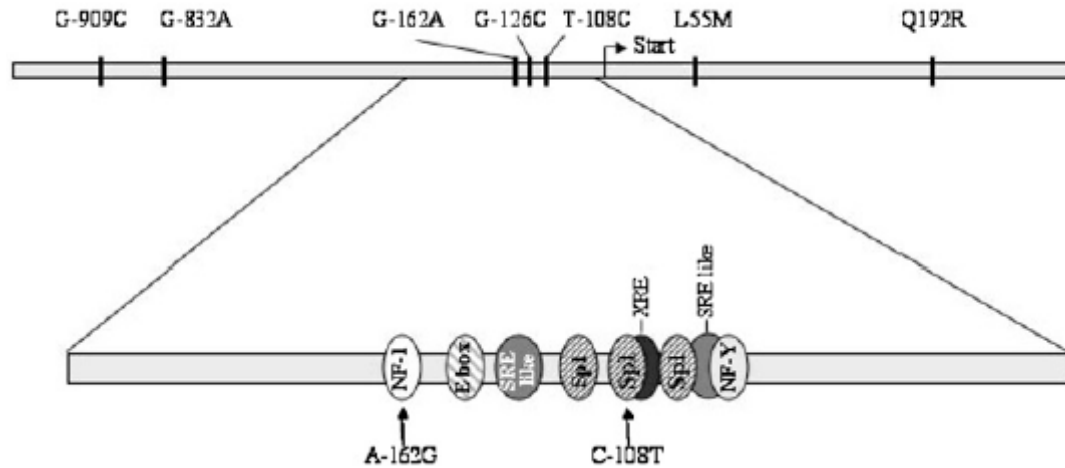
55 Lösin \longrightarrow Metionin
T \longrightarrow A

- PON1 55 L : yüksek paraoksonaz aktivitesi-düşük okside lipit hidroliz aktivitesi
- PON1 55 M : düşük paraoksonaz aktivitesi-yüksek okside lipit hidroliz aktivitesi
- PON1 55MM izoformunun stabilitesinin düşük olması
- promotör polimorfizmleriyle olan bağlantı dengesizliği (Linkage disequilibrium)



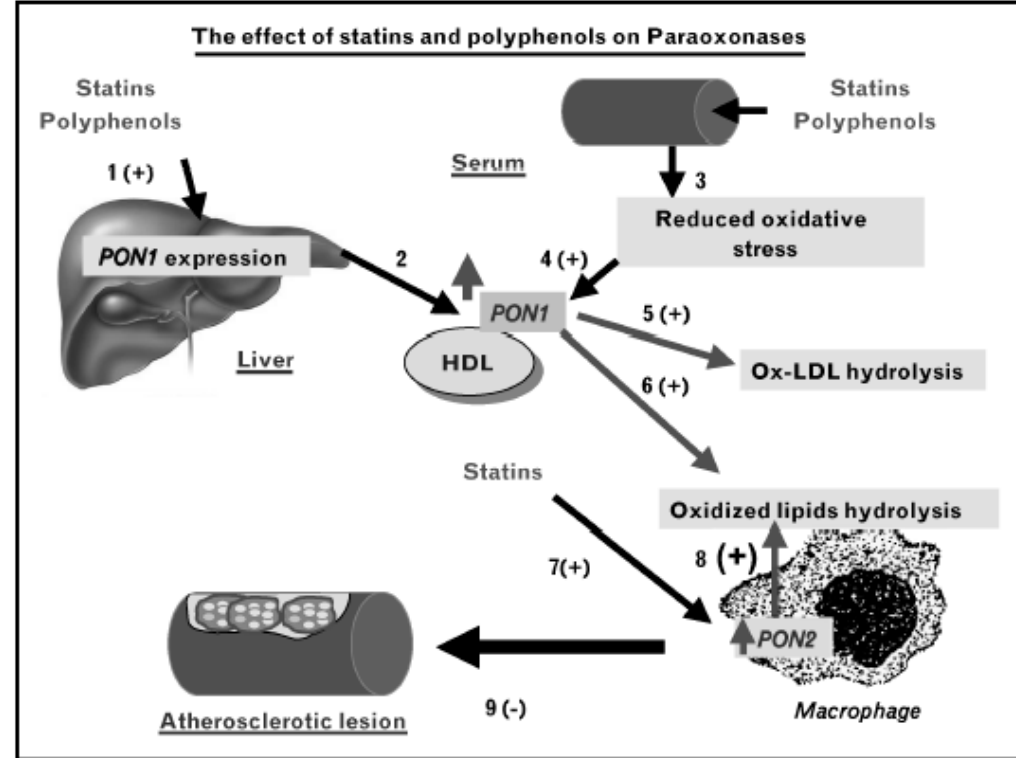
PON1 PROMOTÖR POLİMORFİZMLERİ

- PON1 geninin promotör bölgesinde 5 SNP tespit edilmiştir.
-107T/C, -126G/C, -162A/G, -832(824)G/A ve -909(907)C/G
- -107T/C SNP PON1 seviyelerindeki farklılıkların %23ünden sorumlu
- **-107TT genotipi** en düşük serum PON1 seviyeleri ile ilişkili bulunmuştur.



3. ÇEVRESEL FAKTÖRLER

- ❖ Antioksidan vitamin (C ve E vitaminleri) alımı, statin terapisi (kolesterol düşürücü ilaçlar), polifenoller (şarap, çay ve meyve suyunda bulunan), tekli-doymuş yağ asitlerinin alımı ve aspirin kullanımı PON1 aktivitesini artırır.
- ❖ Sigara, bozulmuş yemeklik yağlar, aterosjenik (yağ oranı yüksek) diyet PON1 aktivitesini düşürür.



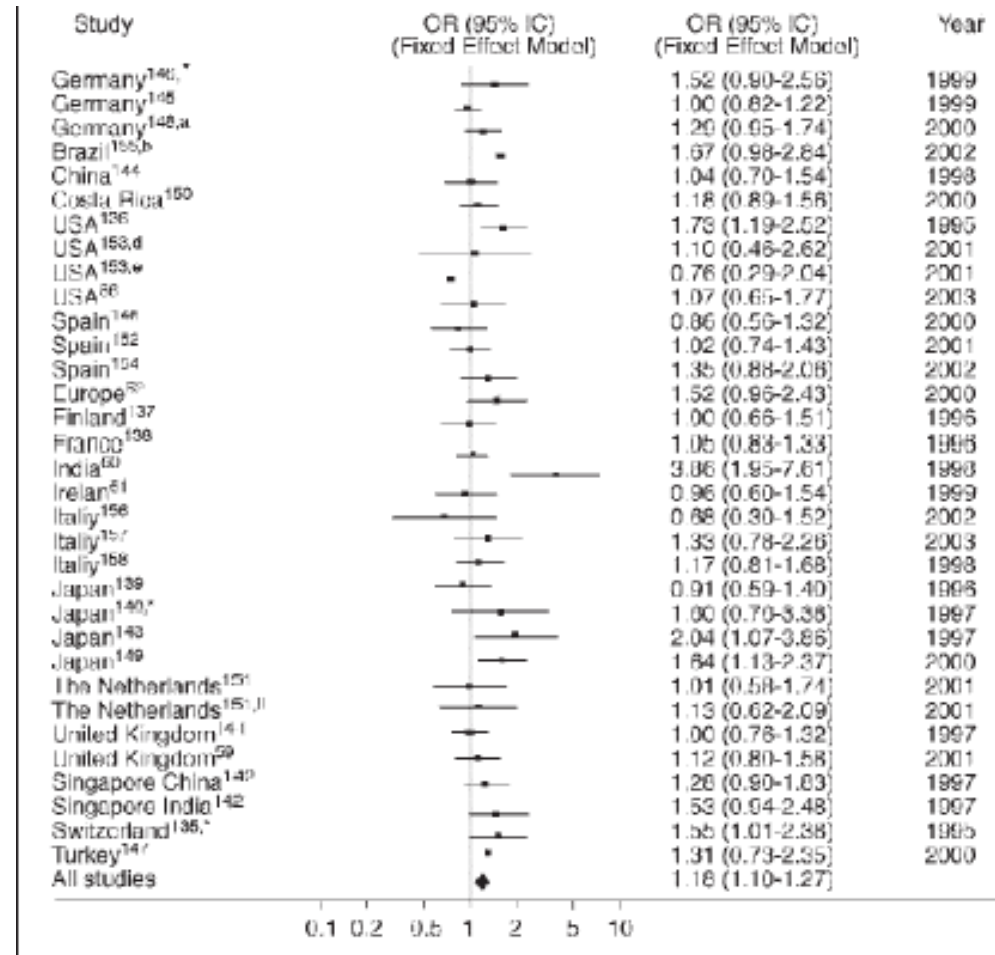
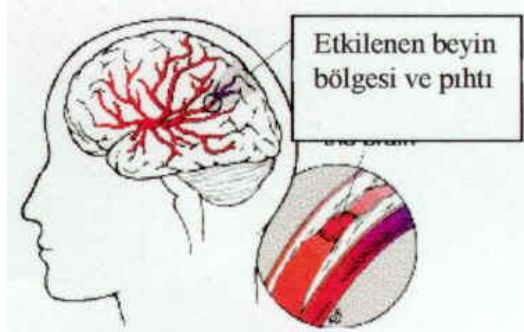
PON1 POLİMORFİZMLERİ VE ATEROSKLEROZ

- ❖ PON1 192Q izoformu insanlarda aterosklerotik lezyon homojenatlarının toplam lipid peroksid miktarlarını düşürmekte 192R'den **iki kat daha etkili**
- ❖ QQ/MM genotipli bireylerin HDL'si..... LDL'yi korumakta son derece etkili
- ❖ RR/LL genotipli bireylerin HDL'si.....LDL'yi korumakta etkisiz

192R izozimi tarafından daha hızlı hidrolize edilen substratlar	Paraokson
	Metilparaokson
Her iki izozim tarafından da benzer hızlarda hidrolize edilen substratlar	Fenil asetat
	Klorprifos okson
192Q izozimi tarafından daha hızlı hidrolize edilen substratlar	Diazokson
	Sarin
	Fosfolipid hidroperoksidleri

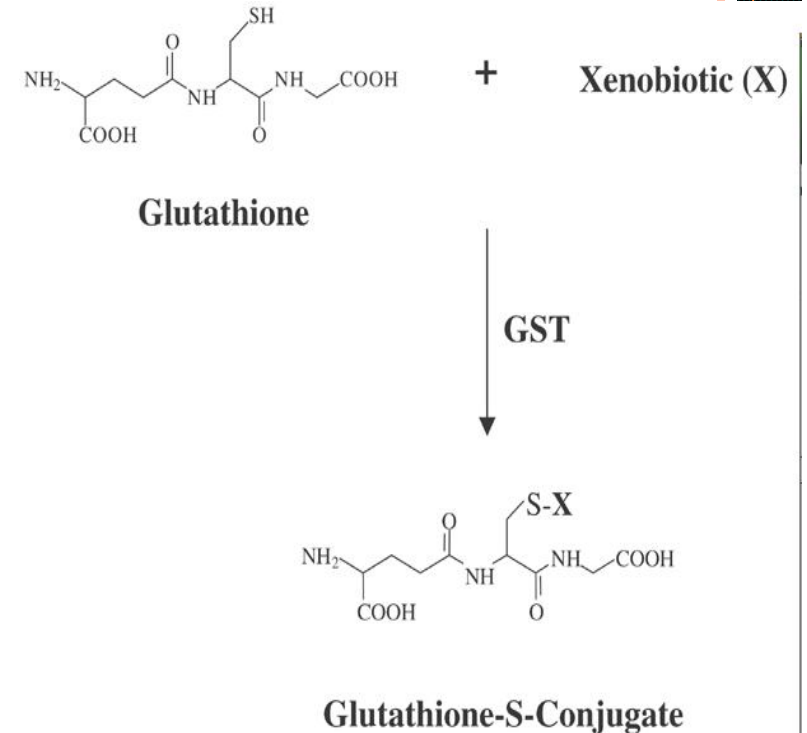
PON1 GENETİK POLİMORFİZMLERİ VE ATEROSKLEROTİK HASTALIKLAR

- PON1 192RR veya 55LL genotipleri..... koroner ve karotid vasküler hastalıklarda risk faktörü



GLUTATYON S-TRANSFERAZLAR

- Aterosklerozun patojenezinde oksidatif stres önemli rol oynamaktadır.
- Glutatyon S-transferazlar (GST; EC: 2.5.1.18) oksidatif stres sonucu oluşan metabolitlerin detoksifikasyonunu katalizler.
- İnsan GSTleri 4 gruba ayrılır:
- GST- α (A), GST- μ (M), GST- π (P) and GST- θ (T)
- GSTM1 ve GSTT1 null ----gen delesyonu
- Null genotipler-----düşük enzim aktivitesi





KAPSAM

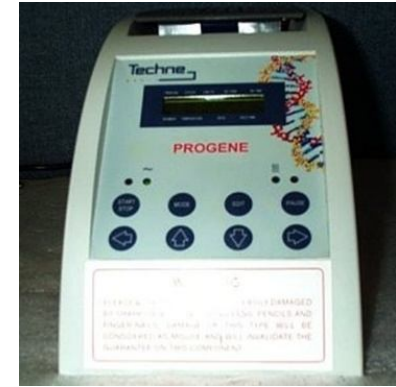


- ✓ İskemik inme geçirmiş hastalardan ve kontrollerden tam kan ve serum örnekleri toplandı (GATA Nöroloji)

- ✓ GENOTİPLEME (ODTÜ Biyoloji)

PON1: 55L/M, 192Q/R ve -107T/C
PCR-RFLP

GST: T1 -M1
Allele spesifik PCR



Stroke patients

should not have anterior circulation stroke

should not have other major illnesses, including autoimmune diseases, neoplasms, coagulopathies, hepatic or renal failure,

There should not be an embolic source known (aortic arch, cardiac or carotid),

They should not have a family history of myocardial infarction within 3 weeks or of transient ischemic attack or stroke at any time.

Control group

All above + not having carotid stenosis greater than 50% or ulcerated carotid plaque.

✓ FENOTİPLEME

Serumda PON'in 3 substrata karşı aktivitesi
paraokson (paraoksonaz aktivitesi)
diazokson (diazoksonaz aktivitesi)
fenilasetat (arilesteraz aktivitesi)

serumda GST'nin CDNB'ye karşı aktivitesi



Available online at www.sciencedirect.com



Clinical Biochemistry 41 (2008) 1–9

CLINICAL
BIOCHEMISTRY

Paraoxonase/arylesterase ratio, PON1 192Q/R polymorphism and PON1 status are associated with increased risk of ischemic stroke[☆]

Birsen Can Demirdögen^{a,*}, Aysun Türkanoglu^a, Semai Bek^b, Yavuz Sanisoğlu^c, Şeref Demirkaya^b, Okay Vural^b, Emel Arınç^a, Orhan Adalı^a

^a Department of Biochemistry, Institute of Natural and Applied Sciences, Middle East Technical University, 06531, Ankara, Turkey

^b Department of Neurology, Gülhane Military Medical Academy, 06018, Ankara, Turkey

^c Department of Monitoring and Evaluation, the Ministry of Health of Turkey, Ankara, Turkey

Received 5 May 2007; received in revised form 2 July 2007; accepted 10 August 2007

Available online 24 August 2007

CELL BIOCHEMISTRY AND FUNCTION

Cell Biochem Funct 2009; **27**: 558–567.

Published online 9 November 2009 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/cbf.1607

Analysis of paraoxonase 1 (PON1) genetic polymorphisms and activities as risk factors for ischemic stroke in Turkish population

Birsen Can Demirdögen^{1,*}, Şeref Demirkaya², Aysun Türkanoglu¹, Semai Bek², Emel Arınç¹ and Orhan Adalı¹

¹ Department of Biochemistry, Institute of Natural and Applied Sciences, Middle East Technical University, Ankara, Turkey

² Department of Neurology, Gülhane Military Medical Academy, Ankara, Turkey

Neurol Sci (2010) 31:727–734
DOI 10.1007/s10072-010-0330-5

ORIGINAL ARTICLE

Association analysis of GSTT1, GSTM1 genotype polymorphisms and serum total GST activity with ischemic stroke risk

Aysun Türkanoglu · Birsen Can Demirdögen ·
Şeref Demirkaya · Semai Bek · Orhan Adalı

BALKAN CLINICAL LABORATORY FEDERATION



BALKAN AWARD 2008. for Clinical Laboratory Research

About 2008 in Athens those were the winners:

WINNER

Birsen Can Demirdogen "PON1 -107TT and 55LL genotypes are risk factors and triple combined heterozygote haplotype (QRLMTC) is protective for ischemic stroke "Refik Saydam Central Hygiene Institute of Ankara (Turkey)

SECOND

Tatjana Jevtovic-Stoimenov "Polymorphism of TNF-a -308 and LT-a +250 and Endonuclease Activity in adults Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and Non-Hodgkin's lymphoma".Institute of Biochemistry of the Medical Faculty of University of Nis (Serbia)

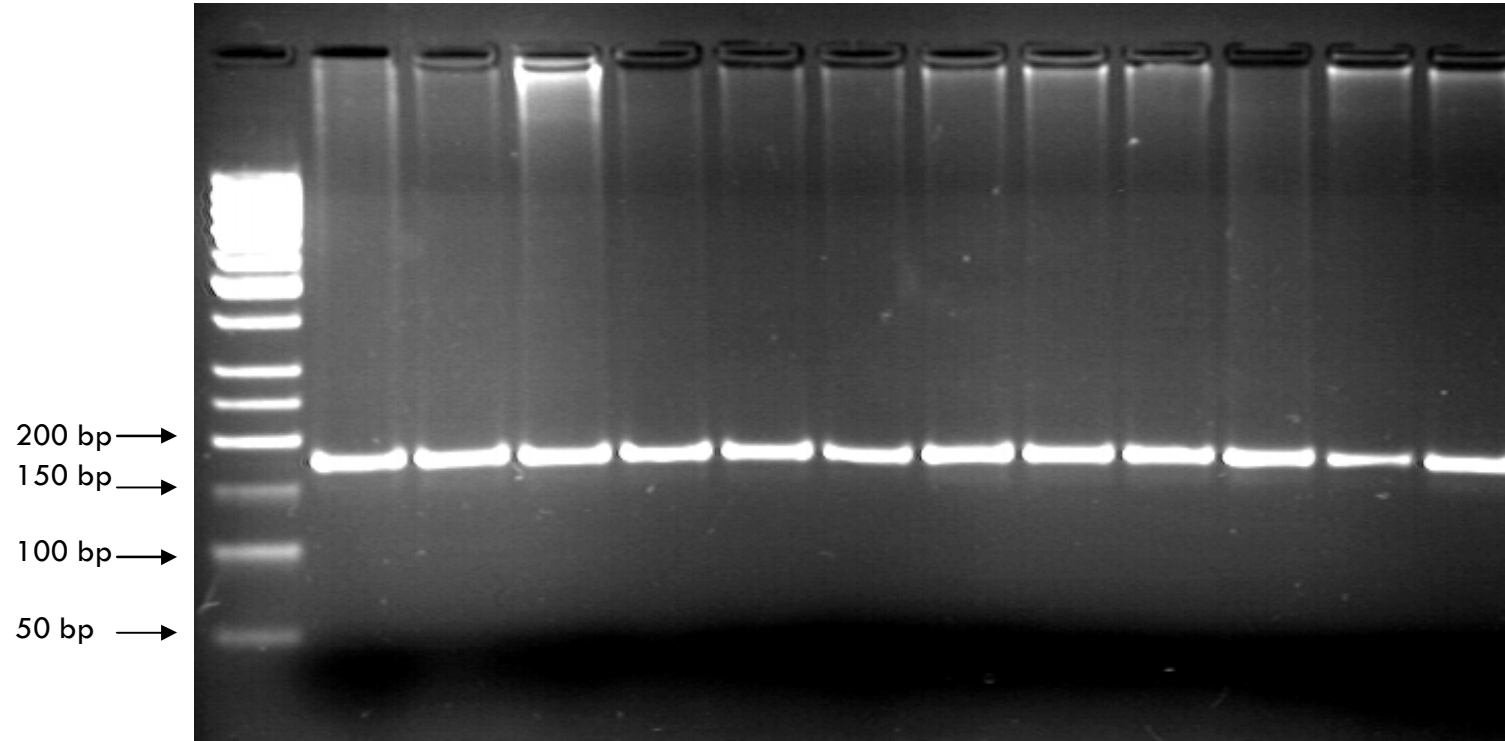
SONUÇLAR

Parametre	Hastalar (n=172)	Kontroller (n=105)	OR (95% CI)	P
Yaş ^a	66.6 ± 14.8	64.5 ± 12.8		0.093
Cinsiyet (erkek), n (%) ^b	97 (56.4)	52 (49.5)	1.318 (0.810-2.145)	0.266
Hipertansiyon, n (%) ^b	105 (61)	45 (43)	2.090 (1.276-3.422)	0.003
Diabetes mellitus, n (%) ^b	50 (29)	18 (17)	1.981 (1.082-3.627)	0.025
Sigara, n (%) ^b	39 (23)	14 (13)	1.906 (0.979-3.711)	0.055
Obezite, n (%) ^b	13 (7.6)	8 (7.6)	0.991 (0.397-2.478)	0.985
Total kolesterol (mmol/L) ^c	4.8 ± 1.3	4.9 ± 1.2		0.449
Trigliserit (mmol/L) ^c	1.5 ± 0.7	1.4 ± 0.7		0.376
HDL (mmol/L) ^c	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.3		0.007
LDL (mmol/L) ^c	2.8 ± 1.1	2.6 ± 1.0		0.296

PON1 Genotiplerinin Belirlenmesi

Çoğaltılacak bölge SNP pozisyonu	Primerler	PCR ürün uzunluğu	RE	Kırılma ürünlerinin uzunlukları ve olası genotipler
Kodlayan bölge 192Q/R (192 A/G) rs662 Exon 6	5' TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G 3' 5' CCT GAG AAT CTG AGT AAA TCC ACT 3'	238bp	AlwI	192QQ = 238bp 192QR = 238, 172, 66bp 192RR = 172, 66bp
Kodlayan bölge 55L/M (55 T/A) Exon 3	5' CCT GCA ATA ATA TGA AAC AAC CTG 3' 5' TGA AAG ACT TAA ACT GCC AGT C 3'	172bp	NlaIII	55LL =172bp 55LM =172, 106, 66bp 55MM =106, 66bp
Promotör bölge -107T/C	5' AGC TAG CTG CGG ACC CGG CGG GGA GGA G 3' 5' GGC TGC AGC CCT CAC CAC AAC CC 3'	240bp	BsrBI	-107TT = 240bp -107TC = 240, 212, 28bp -107CC = 212, 28bp

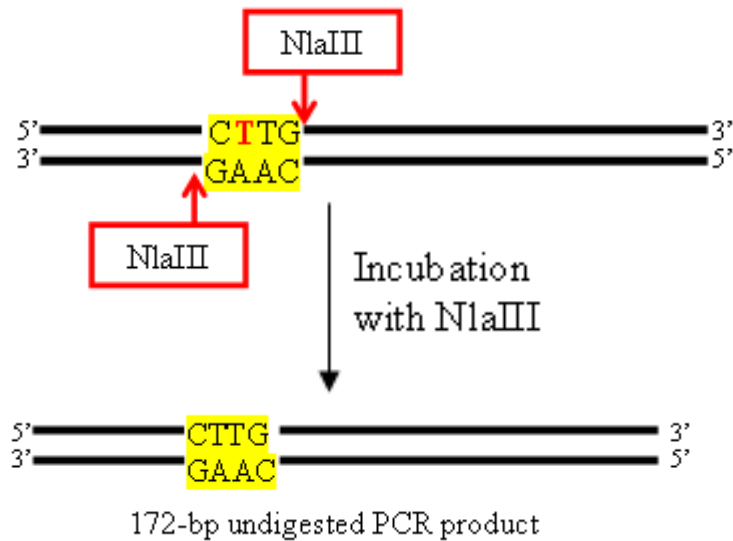
55L/M SNP BÖLGESİ İÇİN PCR ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ



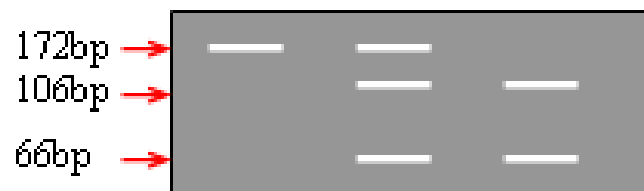
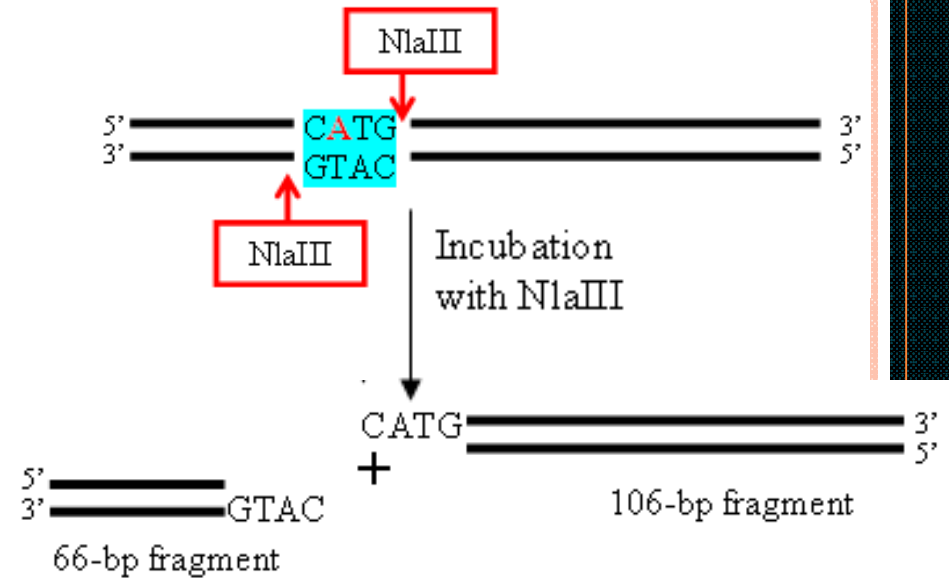
PCR ürününün beklenen uzunluğu: 172bp

PON1 55L/M Tek Nükleotid Polimorfizminin Belirlenme Yöntemi

55L allele

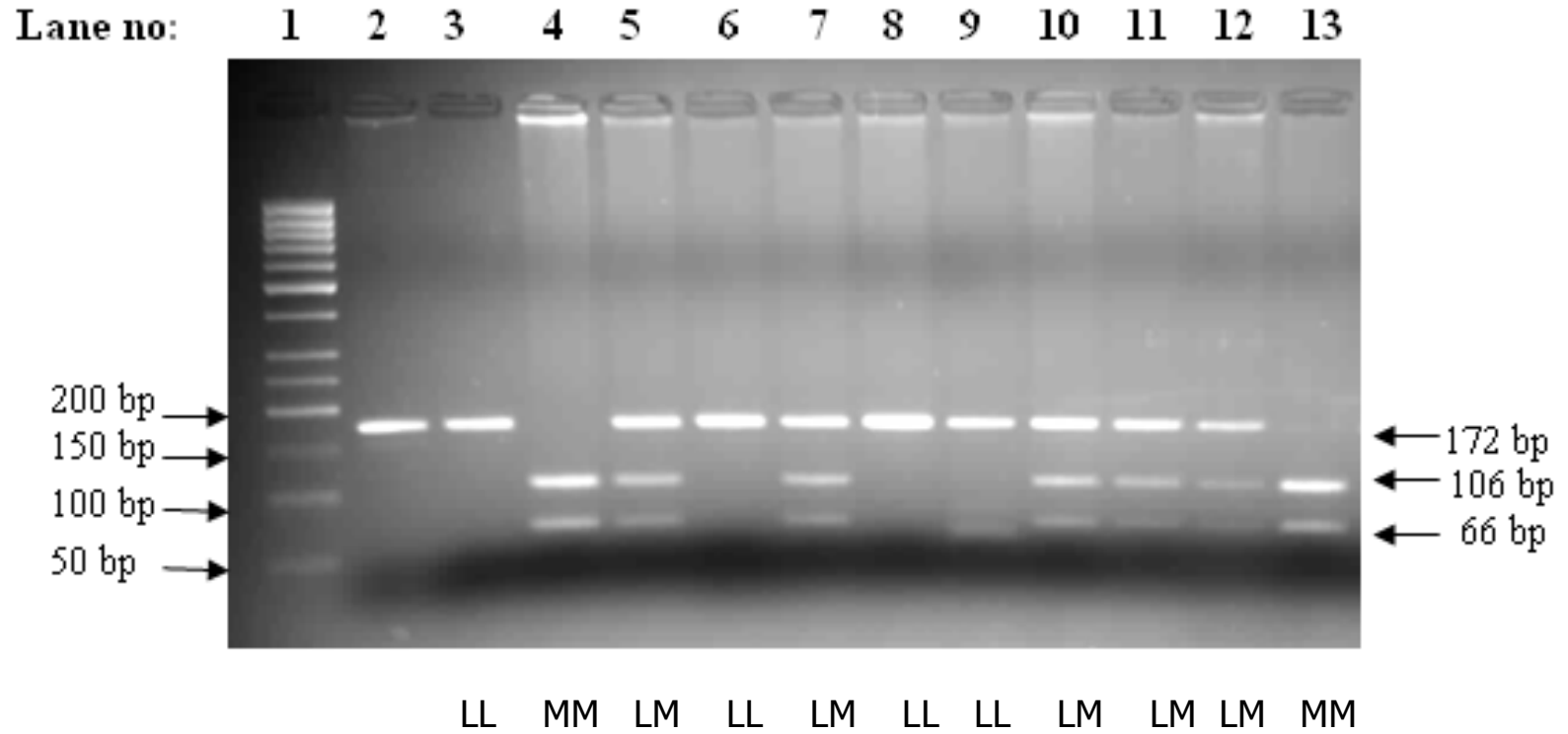


55M allele

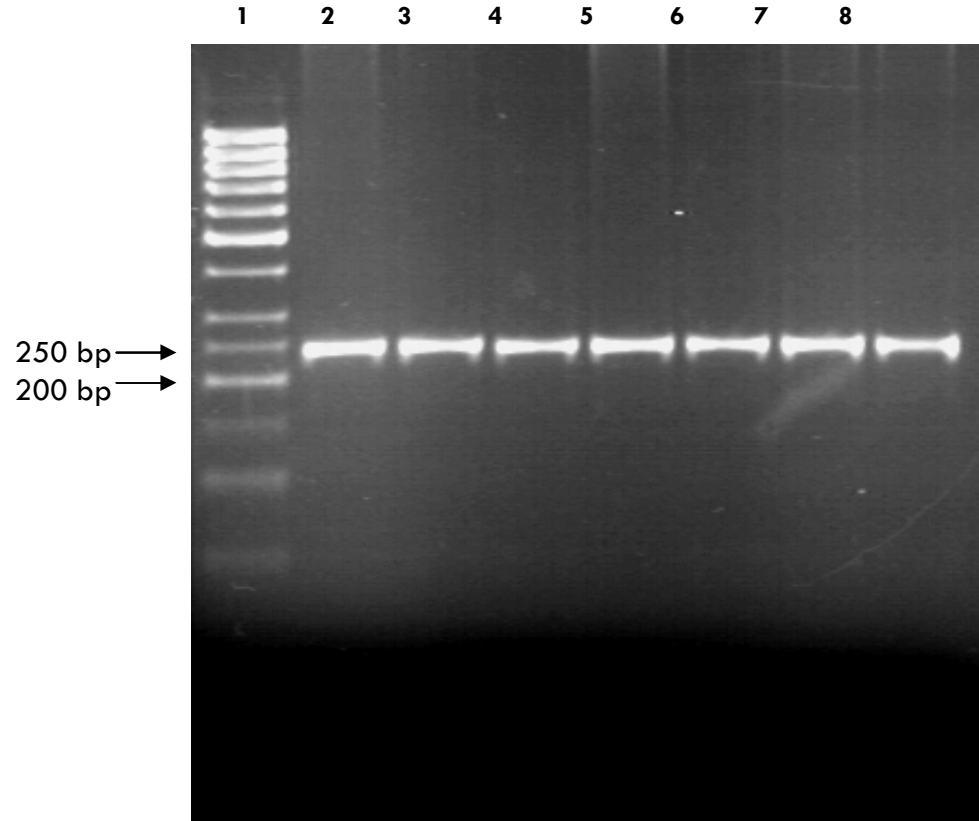


	55LL	55LM	55MM
Homozigot		Heterozigot	Homozigot
PON1 55LL		55 LM	PON1 55MM

55L/M SNP BÖLGESİ İÇİN RFLP ANALİZİ

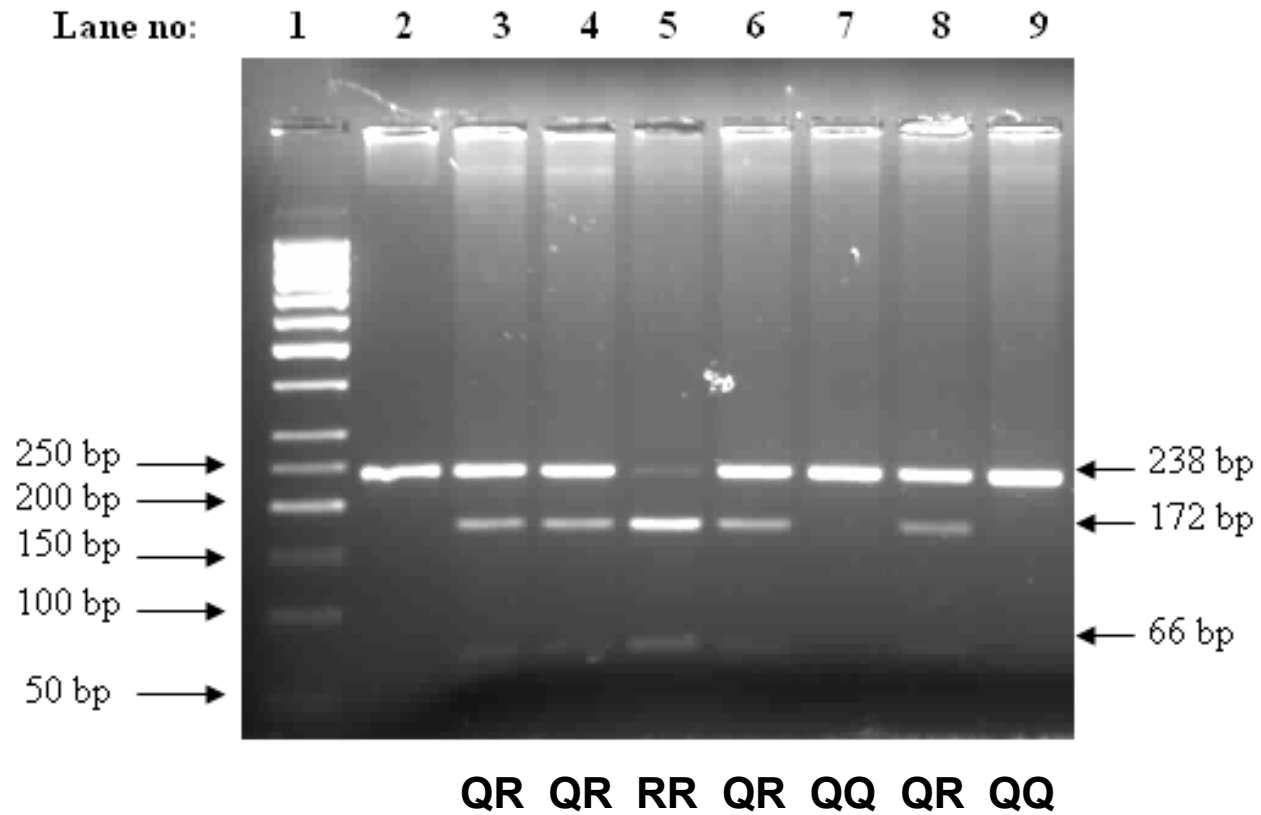


192Q/R SNP BÖLGESİ İÇİN PCR ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ



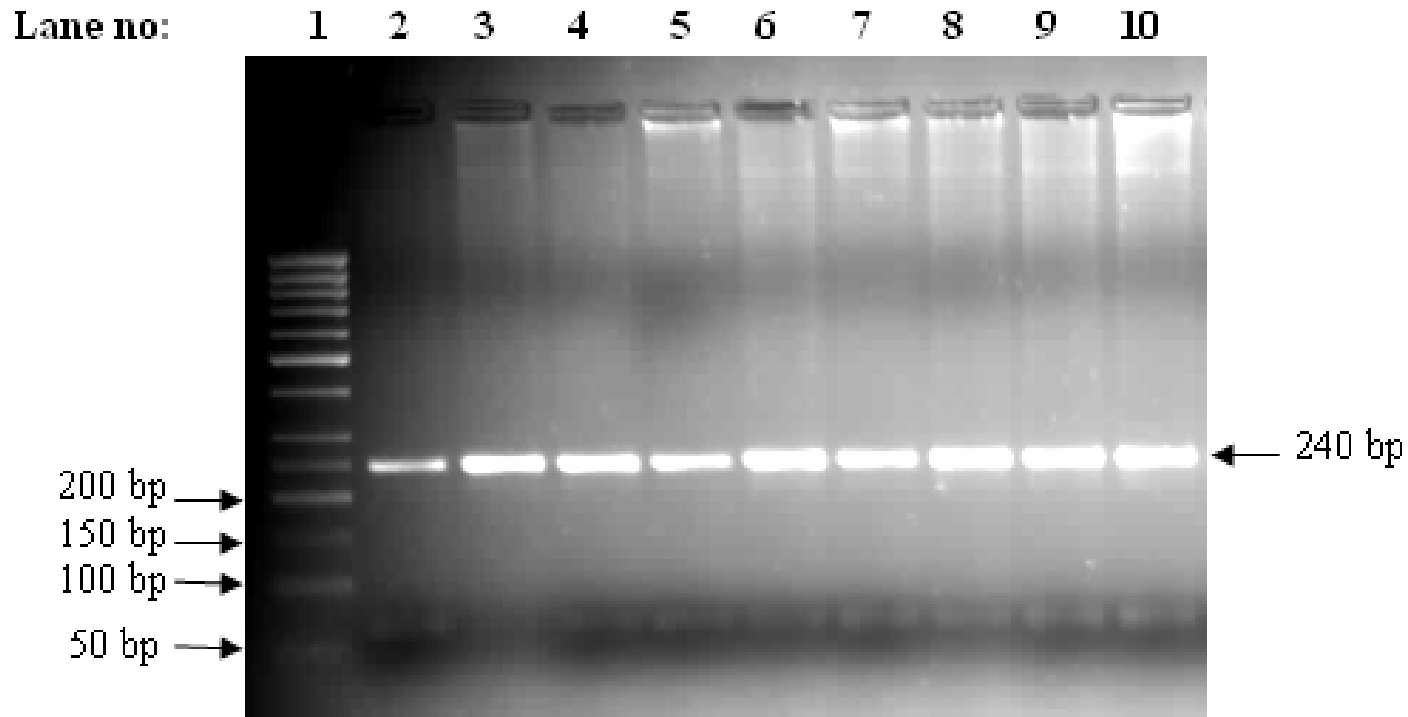
PCR ürünleri için %2'lik agaroz jel elektroforezi
PCR ürününün beklenen uzunluğu: 238 bp.

192Q/R SNP BÖLGESİ İÇİN RFLP ANALİZİ

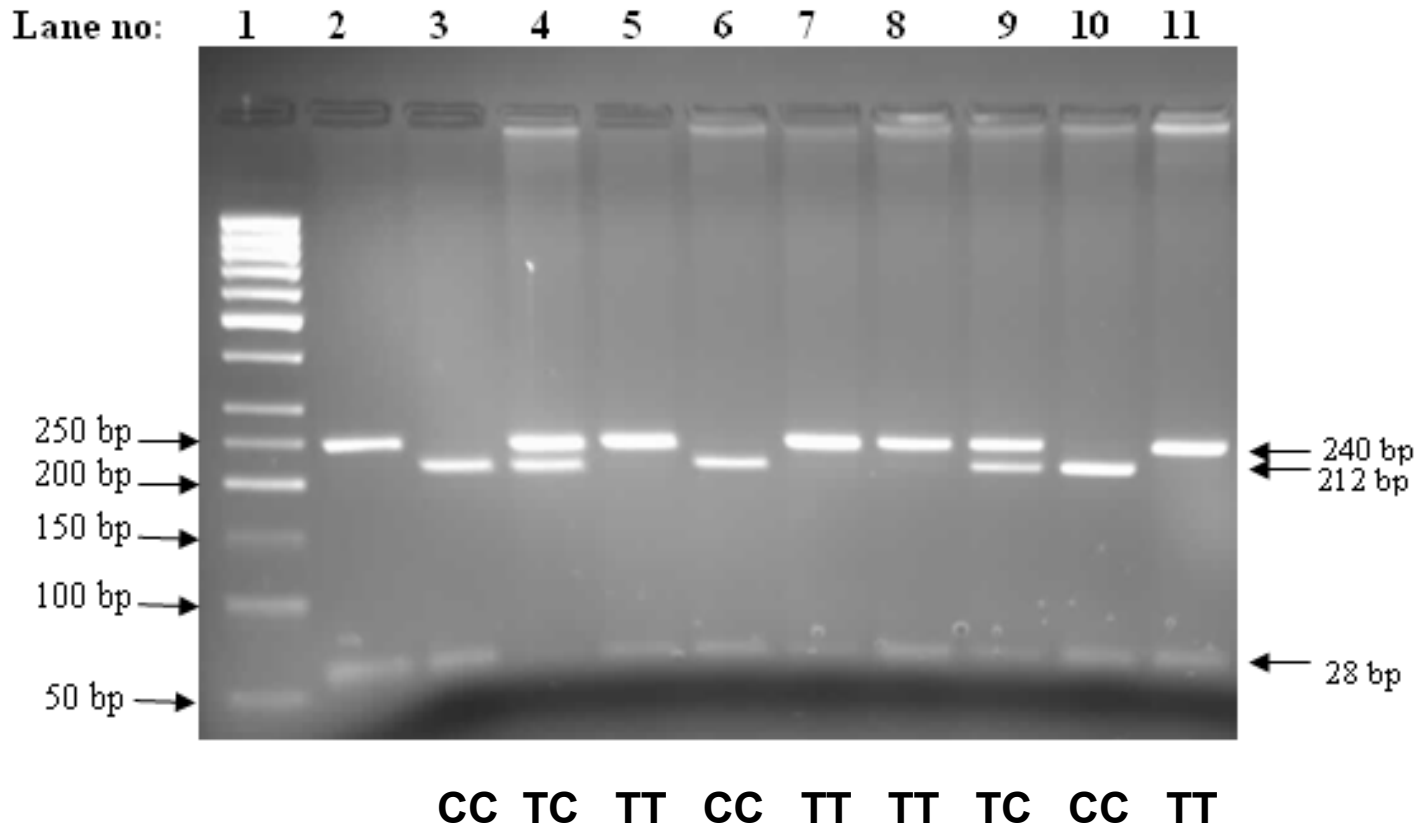


AlwI ----restriksyon endonükleaz

-107T/C SNP BÖLGESİ İÇİN PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ



-107T/C SNP BÖLGESİ İÇİN RFLP ANALİZİ



BsrBI----restriksyon endonükleaz

İskemik İnme ve Kontrol Gruplarında PON1 192Q/R Polimorfizminin Genotip ve Allel Dağılımı

	Hastalar (n=172)	Kontroller (n=105)	OR (95% CI)	P
PON1 192				
Genotipler, n (%)				
QQ	77 (44.8)	46 (43.8)		
QR	74 (43)	50 (47.6)		
RR	21 (12.2)	9 (8.6)	1.483 ^a (0.652-3.374)	0.345
Alleller				
Q	0.663	0.676		
R	0.337	0.324	1.065^b (0.880-1.278)	0.536

^aRR vs. QQ+QR, ^b R vs. Q

Alel	Strok	Kontrol	P	
192R	0.337	0.324	0.536	Can Demirdogen <i>et al.</i> , 2009
	0.361	0.346	0.483	Can Demirdogen <i>et al.</i> , 2008
	0.290	0.290	0.890	Pasdar <i>et al.</i> , 2006
	0.410	0.280	0.0001	Ranade <i>et al.</i> , 2005
	0.620	0.600	0.578	Ueno <i>et al.</i> , 2003
	0.430	0.310	0.010	Voetsch <i>et al.</i> , 2002
	0.480	0.340	<0.01	Aydin <i>et al.</i> , 2006
	0.750	0.650	0.0002	Imai <i>et al.</i> , 2000



İskemik İnme ve Kontrol Gruplarında PON1 55L/M Polimorfizminin Genotip ve Allel Dağılımı

	Hastalar (n=172)	Kontroller (n=105)	OR (95% CI)	P
PON1 55				
Genotipler, n (%)				
LL	83 (47.7)	44 (41.9)	1.293 ^c (0.792-2.110)	0.303
LM	68 (39.5)	42 (40.0)		
MM	21 (12.2)	19 (18.1)		
Aleller				
M	0.320	0.281		
L	0.680	0.619	1.309 ^d (0.914-1.875)	0.141

^cLL vs. LM+MM , ^d L vs. M

Alel	Strok	Kontrol	<i>P</i>	
55L	0.680	0.619	0.141	Can Demirdogen <i>et al.</i> , 2009
	0.690	0.628	0.003	Can Demirdogen <i>et al.</i> , 2008
	0.640	0.630	0.73	Pasdar <i>et al.</i> , 2006
	0.660	0.637	0.538	Ranade <i>et al.</i> , 2005
	0.900	0.960	0.013	Ueno <i>et al.</i> , 2003
	0.680	0.680	0.920	Voetsch <i>et al.</i> , 2002
	0.510	0.410	<0.05	Aydin <i>et al.</i> , 2006
	0.930	0.920	0.729	Imai <i>et al.</i> , 2000



İskemik İnme ve Kontrol Gruplarında PON1 -107T/C Polimorfizminin Genotip ve Allel Dağılımı

	Hastalar (n=172)	Kontroller (n=105)	OR (95% CI)	P
PON1 -107				
Genotipler n (%)				
TT	73 (42.4)	42 (40)	1.106 ^e (0.675-1.812)	0.689
TC	63 (36.6)	41 (39)		
CC	36 (20.9)	22 (21)		
Alleller				
C	0.392	0.405		
T	0.608	0.595	1.056 ^f (0.883-1.263)	0.553

^eTT vs. TC+CC, ^fT vs. C

Alel	Strok	Kontrol	<i>P</i>	
-107T	0.608	0.595	0.553	Can Demirdogen <i>et al.</i> , 2009
	0.380	0.410	0.570	Voetsch <i>et al.</i> , 2004
	0.471	0.480	0.829	Ranade <i>et al.</i> , 2005



Kombine Haplotiplerin Dağılımı

Üçlü kombine haplotipler n (%)	Hasta (n=172)	Kontrol (n=105)	OR	P
QRMMCC	0	0	–	–
QRMMTC	1 (0.6%)	0	–	–
QRMMTT	0	1 (0.95%)	–	–
QRLMCC	6 (3.5%)	3 (2.86%)	1.229	0.774
QRLMTC	7 (4.1%)	12 (11.4%)	0.329	0.019
QRLMTT	22 (12.8%)	9 (8.6%)	1.564	0.280
QRLLCC	11 (6.4%)	8 (7.6%)	0.828	0.696
QRLLTC	16 (9.3%)	11 (10.5%)	0.877	0.749
QRLLTT	11 (6.4%)	6 (5.7%)	1.093	0.865

Hipertansiyona bağlı inme riskinin PON1 192Q/R genotiplerine göre deđiřimi

Genotipler		Hipertensif	Normotensif	OR	P
Tüm Genotipler	Strok	105	67	2.089	0.003
	Kontrol	45	60		
192RR	Strok	14	7	7.000	0.025
	Kontrol	2	7		
192QR	Strok	52	22	2.182	0.039
	Kontrol	26	24		
192QQ	Strok	39	38	1.751	0.140
	Kontrol	17	29		

Hipertansiyona bağlı inme riskinin PON1 55L/M genotiplerine göre deđiřimi

Genotipler		Hipertensif	Normotensif	OR	P
Tüm Genotipler	Strok	105	67	2.089	0.003
	Kontrol	45	60		
55LL	Strok	52	31	2.66	0.010
	Kontrol	17	27		
55LM	Strok	28	40	0.63	0.251
	Kontrol	22	20		
55MM	Strok	13	8	2.23	0.210
	Kontrol	8	11		

Hipertansiyona bağlı inme riskinin PON1 -107T/C genotiplerine göre deęiřimi

Genotipler		Hipertensif	Normotensif	OR	P
Tüm Genotipler	Strok	105	67	2.089	0.003
	Kontro	45	60		
-107TT	Strok	45	28	2.89	0.007
	Kontro	15	27		
-107TC	Strok	35	28	1.76	0.160
	Kontro	17	24		
-107CC	Strok	25	11	1.57	0.421
	Kontro	13	9		

İnme risk faktörlerinin lojistik regresyon analizi (yaş, cinsiyet, hipertansiyon, diabet, sigara, 192RR, 55LL ve -107TT genotipleri ve PON1 aktiviteleri (PON, ARE, DIA) modele dahil edilmiştir)

Parametre	OR	95 % CI	<i>P</i>
Hipertansiyon	2.435	1.468-4.038	0.001
Sigara	2.687	1.339-5.390	0.005
PON aktivitesi	0.998	0.996-0.999	0.012
55LL genotipi	1.783	1.012-3.141	0.045

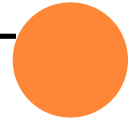


İnme risk faktörlerinin lojistik regresyon analizi (yaş, cinsiyet, hipertansiyon, diabet, sigara, total kolesterol, trigliseritler, HDL, LDL, PON1 aktiviteleri (PON, ARE, DIA) ve QRLMTC kombine haplotip modele dahil edilmiştir)

Parametre	OR	95 % CI	P
Hipertansiyon	3.080	1.750-5.422	0.000
Sigara	2.829	1.331-6.015	0.007
Total kolesterol	0.663	0.516-0.853	0.001
LDL-C	1.691	1.134-2.523	0.010
PON1 QRLMTC	0.144	0.044-0.468	0.001



$$1/0.144 = \mathbf{6.944}$$



59 yaş üstü bireylerde inme risk faktörlerinin lojistik regresyon analizi (cinsiyet, hipertansiyon, diyabet, sigara, total kolesterol, trigliseritler, HDL, LDL, PON1 aktiviteleri (PON, ARE, DIA) ve 192RR, 55LL, -107TT modele dahil edilmiştir)

Parametre	OR	95 % CI	P
Hipertansiyon	3.000	1.609-5.592	0.001
Sigara	3.235	1.093-9.578	0.034
Total kolesterol	0.655	0.486-0.882	0.005
LDL-C	1.579	1.000-2.494	0.050
PON1 -107TT genotip	1.973	1.014-3.839	0.045

59 yaş üstü bireylerde inme risk faktörlerinin lojistik regresyon analizi (cinsiyet, hipertansiyon, diyabet, sigara, total kolesterol, trigliseritler, HDL, LDL, PON1 aktiviteleri (PON, ARE, DIA) ve QRLMTC kombine haplotipi modele dahil edilmiştir)

Parameter	OR	95 % CI	P
Hipertansiyon	3.078	1.582-5.992	0.001
Sigara	6.472	2.062-20.313	0.001
Total kolesterol	0.670	0.480-0.937	0.019
LDL-C	1.590	1.004-2.516	0.048
PON1 QRLMTC	0.096	0.022-0.409	0.002



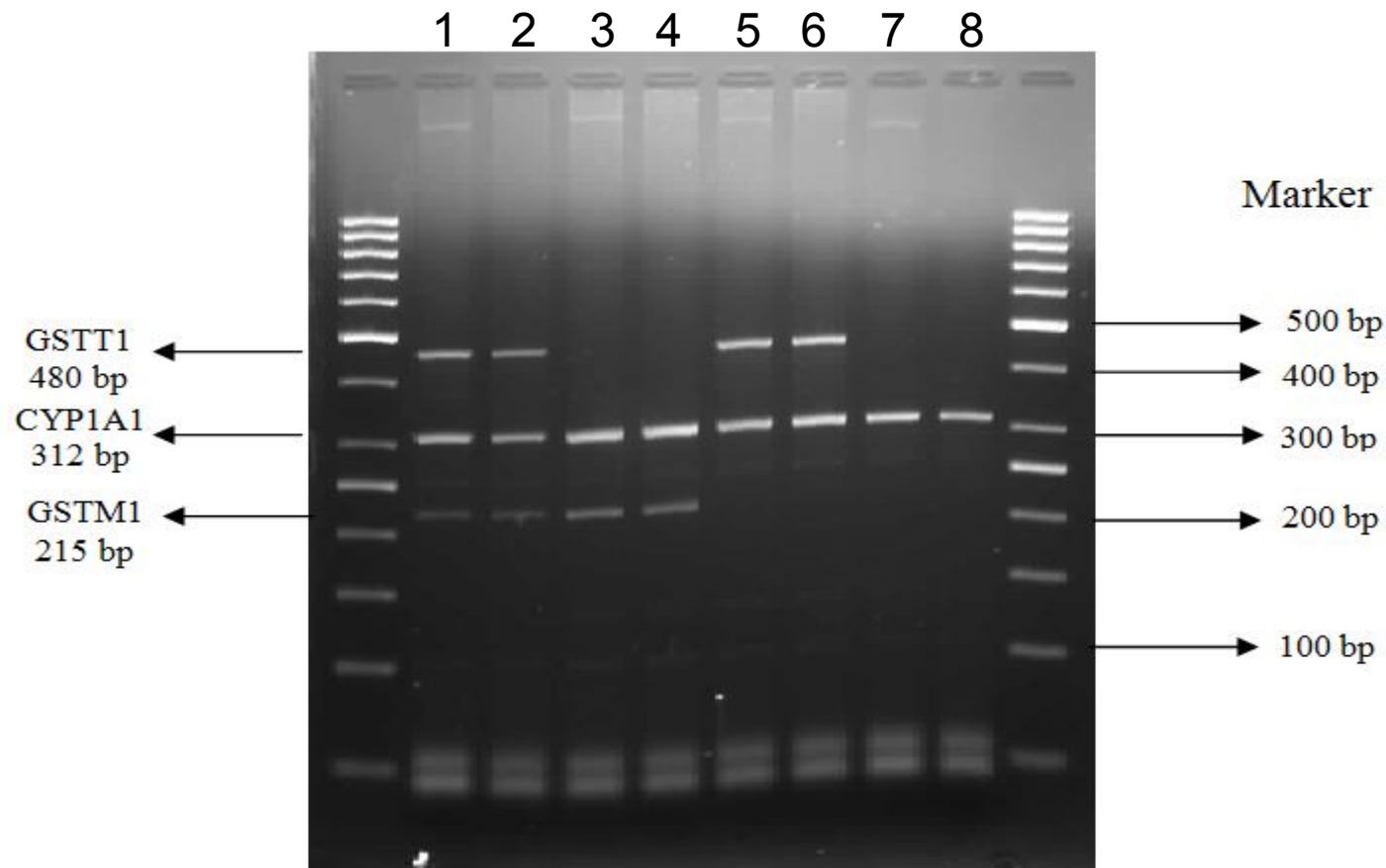
$$1/0.096 = \mathbf{10.4}$$

GST T1 VE M1'İN GENOTİPLEMESİ

	Primer sekansları	PCR ürünü
GST T1	5'-TTC CTTCTC-3' 5'-TCA CCGGCA-3'	480 bp
GST M1	5'-GAA CTCAGC-3' 5'-GTT GGGTGG-3'	215 bp
CYP1A1 (internal kontrol)	5'-GAA CTGTCT-3' 5'-CAG CTGCTC-3'	312 bp



Multipleks GSTM1 ve GSTT1 PCR



1-GST T1 +
GST M1 +
2-GST T1 +
GST M1 +

3-GST T1 null
GST M1 +
4-GST T1 null
GST M1 +

5-GST T1 +
GST M1 null
6-GST T1 +
GST M1 null

7-GST T1 null
GST M1 null
8-GST T1 null
GST M1 null



GST T1 VE M1 GENOTİPLERİNİN DAĞILIMI

Genotipler	Hasta (n=172)	Kontrol (n=105)	OR (95% CI)	P
GSTT1 (+)	138 (80.2%)	83 (79%)		
GSTT1 (-)	34 (19.8%)	22 (21%)	0.929 (0.509- 1.696)	0.812
GSTM1 (+)	85 (49.4%)	46 (43.8%)		
GSTM1 (-)	87 (50.6%)	59 (56.2%)	0.798 (0.49- 1.3)	0.364

GST T1 GENOTİPLERİ İLE HİPERTANSİYON İLİŞKİSİ

Genotipler		Hipertensif	Normotensif	OR	<i>P</i>
Tüm genotipler	Strok	105	67	2.089	0.003
	Kontrol	45	60		
GSTT1 (+)	Strok	83	55	1.703	0.056
	Kontrol	39	44		
GSTT1 (-)	Strok	22	12	4.888	0.006
	Kontrol	6	16		

GST M1 GENOTİPLERİ İLE HİPERTANSİYON İLİŞKİSİ

Genotipler		Hipertansif	Normotansif	OR	<i>P</i>
Tüm genotipler	Strok	105	67	2.089	0.003
	Kontrol	45	60		
GST M1 (+)	Strok	54	31	1.742	0.133
	Kontrol	23	23		
GST M1 (-)	Strok	51	36	2.383	0.011
	Kontrol	22	37		

ÖZETLE

- PON1 genetik polimorfizmleri tek başına ve hipertansiyon gibi risk faktörleri ile birlikte inme riskini etkilemektedir.
- 55LL genotipi 1.78 kat risk faktörü
- -107TT genotip 1.97 kat risk faktörü
- Hipertansiyon-inme riski 192RR, 55LL ve -107TT en yüksek
- GST M1 ve T1 null genotipleri de hipertansiyon-inme riskini etkilemektedir.

TEŐEKKÜRLER

ODTÜ

Prof. Dr. Orhan Adalı
Aysun Türkanođlu Özçelik

GATA

Prof. Dr. Şeref Demirkaya
Assist. Prof. Dr. Semai Bek