T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

İSKEMİK İNMELİ HASTALARDA MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9 C-1562T GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

İsmail KARA

Referans no: 10119518

EDİRNE – 2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

İSKEMİK İNMELİ HASTALARDA MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9 C-1562T GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

İsmail KARA

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2017/55

Tez No:

EDİRNE – 2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Tammam SİPAHİ danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi İsmail KARA tarafından tez başlığı "İskemik İnmeli Hastalarda Matriks Metalloproteinaz-9 C-1562T Gen Polimorfizminin Araştırılması" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 22/12/2017 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Yüksek Lisans Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
JÜRİ BAŞKANI

İmza
Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR
ÜYE

İmza
Yard. Doç. Dr. Suat ÇAKINA
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdür V.

TEŞEKKÜR

Tezimin belirlenmesinden bitimine kadar rehberliğini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Tammam SİPAHİ'ye, hocam Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR'a, Araş. Gör. Dr. Arzu AY'a, Araş. Gör. Dr. Metin BUDAK'a ve Araş. Gör. Mustafa YILDIZ'a, hasta materyalini sağlamamda yardımcı olan Nöroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Babürhan GÜLDİKEN'e ve Araş. Gör. Dr. Aslı SERT'e, Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Necdet SÜT'e, manevi desteklerinden dolayı aileme ve projemizin gerçekleşmesinde desteklerinden dolayı TÜBAP birimine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **BEYİNSEL DOLAŞIM** 3
- **BEYİNSEL KAN AKIŞI VE METABOLİZMA** 5
- **SEREBROVASKÜLER HASTALIKLAR (SVH)** 6
- **TIKAYICI TİPTE SEREBROVASKÜLER HASTALIKLAR** 6
- **İNMENİN TANIMI** 6
- **İNMENİN SINIFLANDIRILMASI** 7
- **İSKEMİK İNME** 7
- **İSKEMİK İNME HASTALIĞINDA RİSK FAKTÖRLERİ** 8
- **İSKEMİK İNMENİN FİZYOPATOLOJİSİ** 10
- **İSKEMİK İNMEDE ETİYOLOJİK SINIFLANDIRMA** 12
- **İSKEMİK İNMENİN KALITIM İLİŞKİSİ** 14
- **MATRİKS METALLOPROTEİNAZ ENZİMLERİ** 14
- **MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9'UN İSKEMİK İNME İLE İLİŞKİSİ** 17
- **MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9 C1562T GEN POLİMORFİZMİ** 18

GEREÇ VE YÖNTEMLER 19

BULGULAR 27

TARTIŞMA 31

SONUÇLAR 34

ÖZET **36**
SUMMARY **37**
KAYNAKLAR **38**
ŞEKİLLER LİSTESİ **44**
ÖZGEÇMİŞ **45**
EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

Bç **:** Baz çifti

DNA **:** Deoksiribonükleik Asit

GİA **:** Geçici İskemik Atak

HDL **:** High Density Lipoprotein

LDL **:** Low Density Lipoprotein

MDI **:**Metalloproteinazın Doku İnhibitörü

MMP **:**Matriksmetalloproteinaz

OD **:** Optik Dansisite

PZR **:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RFUP **:** Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi

SVH **:** Serebrovasküler Hastalıklar

UV **:** Ultraviyole

GİRİŞ VE AMAÇ

Serebrovasküler hastalıklar beyin damarlarında ve bu damarlardan geçmekte olan kanın özelliklerinde gelişen bozukluklar sonucu damarların tıkanması ya da kanamasıyla ortaya çıkan merkezi sinir sistemi bozukluklarıdır (1).

Serebrovasküler hastalıklar (SVH) içerisinde yer alan stroke(inme) ise beyine giden kan akımının aniden azalması veya durmasıdır. Nadiren beyin damarlarından birinin yırtılıp kanın beyin dokusu veya beyin zarları içine kanaması ile oluşabilir. İnmenin oluştuğu beyin bölgesi ve yakın çevresi etkilenir. Etkilenen beyin bölgesine göre konuşma, kas gücü, koordinasyon-denge, görme veya hafızada kayıp ortaya çıkar (2).

İnmeler tipine göre, iskemik inme ve hemorajik inme olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (3).

İskemik inme, beyinsel kan akımının azalması veya beyin için gerekli olan oksijen ve glikozun olması gerektiği değerlerin altına inmesi ile bu olayın devam etmesi durumunda ortaya çıkan ve hücre bozulması ile sonuçlanan bir durumdur (4).

Matriksinler olarak da adlandırılan matriks metalloproteinazlar (MMP); ekstrasellüler matriks ile bazal membran bileşenlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren, kalsiyum bağımlı homolog bir enzim ailesidir. Büyük çoğunluğu bağ dokusu hücreleri ve inflamatuvar fagositler tarafından salınmaktadır (5). MMP'ler ekstrasellüler matriks bileşenlerini yıkıma uğratan, Zn^{++} ve Ca^{++}'a bağımlı bir nötral endopeptidaz ailesi olup aterosklerozun patogenezinde ve vasküler hastalıklarda önemli rolü vardır. MMP'ler, bazal membran ve ekstrasellüer matriks bileşenlerinde bozulmalara neden olan; yapısal olarak benzer ancak genetik olarak farklılık gösteren enzim ailesidir. MMP'ler; doku büyümesi, remodeling, yara iyileşmesi gibi fiziksel süreçlerde de görev alırlar. Hücreler arası iletişimin düzenlenmesinde, moleküler değişim ve bağışıklık üzerinde; hücre yüzey reseptörleri,

sitokinler, hormonlar, defensin, adezyon molekülleri ve büyüme faktörlerinin biyolojik etkinliğini işleyerek önemli rol oynarlar. MMP'lerin ve bunların en büyük endojen inhibitörü olan matriksmetalloproteinaz doku inhibitörleri (tissueinhibitor of metalloproteinase) yani TIMP'lerin sentezi arasındaki hassas denge ile kontrol edilir. MMP'lerin katalitik etkinliği proenzimlerin aktivasyonu ve TIMP'lerin inhibe edilmesi yoluyla sağlanır (6).

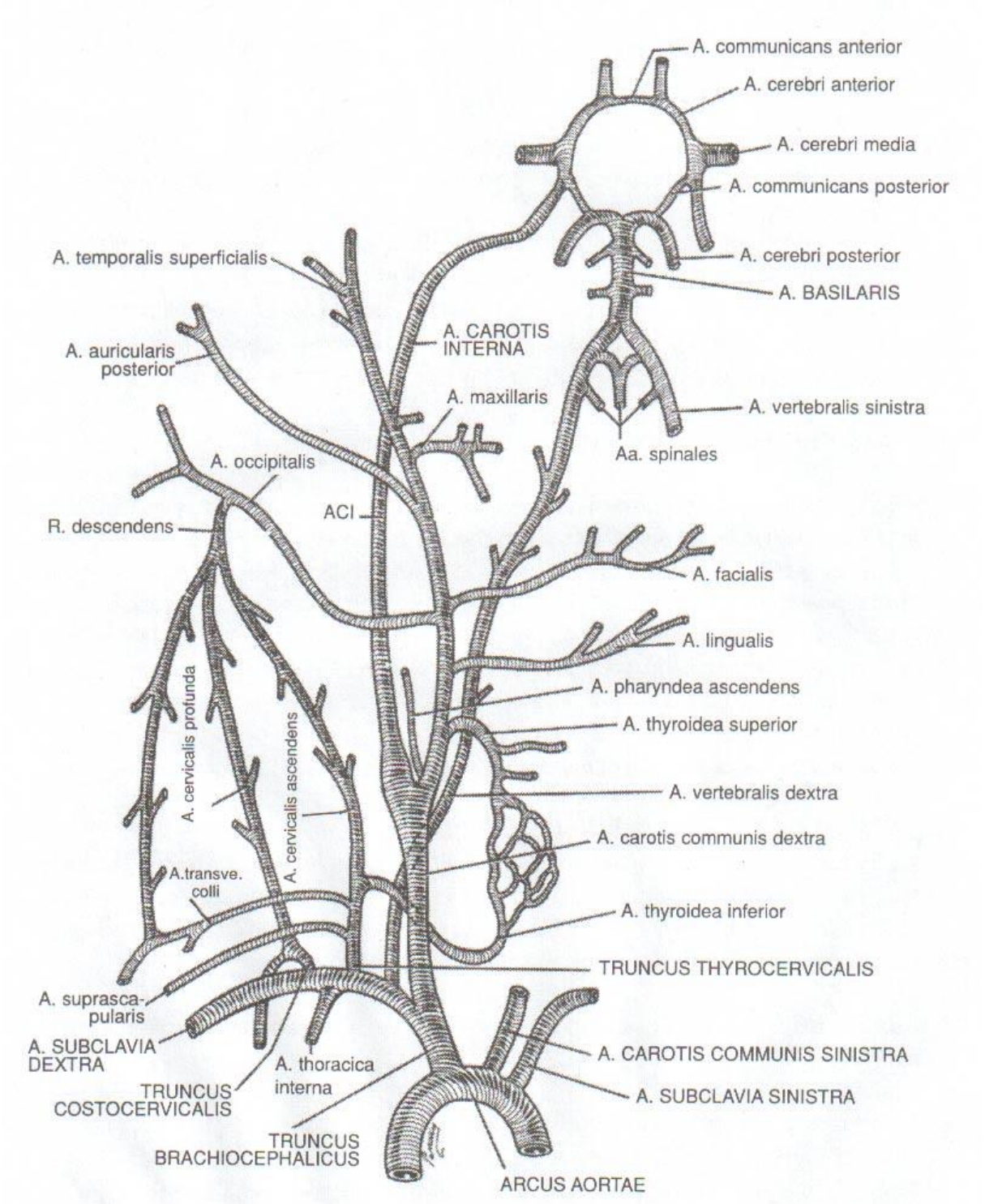
MMP etkinliğinin ateromatöz plak oluşumu, arter duvarı ve plağın yırtılması gibi süreçleri etkileyerek iskemik inmeye neden olabileceği ileri sürülmektedir. Hem ateroskleroz gelişim sürecinde hem de plak yırtılmasında rolü olduğu düşünülen MMP'ler arasında özellikle MMP-9'un normal arterlerde bulunmayıp aterosklerotik plaklarda bulunması nedeni ile bu çalışmada, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran ve iskemik inme tanısı almış hastalar arasından seçilen hasta grubunda MMP-9 C-1562T gen polimorfizmini ve bu polimorfizmin iskemik inme hastalığının gelişmesindeki olası rolünü araştırarak erken teşhis için bir belirteç olarak kullanılabilir mi sorusuna ışık tutmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

BEYİNSEL DOLAŞIM

Beyin, birçok dallanmaları bulunan arterlerle yoğun bir şekilde beslenen organdır. Beyinin beslenmesi glikozun aerobik metabolizması ile sağlanır (7). Beyin vücut ağırlığının yaklaşık % 2'sini oluşturur. Ve vücutta metabolik olarak en aktif organlardan biridir. Beyine gerekli olan aktivite sağlanabilmesi için iyi bir kan akışı gerekmektedir (3). Beyin, Kalpten çıkan kan debisinin % 15'i ile vücudun tamamına dağıtılan oksijenin % 20 - %25'ini kullanmaktadır. Beyine çok kısa süre (10 - 20 saniye) kan geçişi olmadığında şuur kaybı yaşanmaktadır (7).

Beynin arteriyel kan akımı, dört ana gövdeden sağlanır. Bu ana gövdelerin kökleri arkusaortaya bağlıdır (Şekil 1). Bu arterler beyinin ön bölgesinde karotis sistemini, arka bölgesinde vertebrobaziller sistemini oluşturur. Arkusaortanın sağ tarafından brakiosefalik arter ayrılarak, ana karotid ve subklavian arter dallarını vermektedir. Subklavian arter ve ana karotid ise direk aortadan köken almaktadır. Boyun kısmında vertebral arterler subklavian arterlerden ilk dal olarak ayrılmaktadırlar. İnternal kapsülün büyük bir kısmı, temporal lobların lateral kısımları, frontal ve parietal lobların tamamı ve bazal ganglionların kan ile dolması internal karotid arterlerden sağlanır. Talamusun çoğu kısmı, temporal lobların alt bölümü, oksipital loblar, beyin sapı ve orta beyinin kan ile dolması vertebral arterlerin dalları sayesinde sağlanır.



Şekil 1. Arkus aorta ve dalları (8)

Beyinde bulunan küçük arterlere end arterler denir. End arterlerin tıkanması sonucu iskemi gerçekleşir (3).

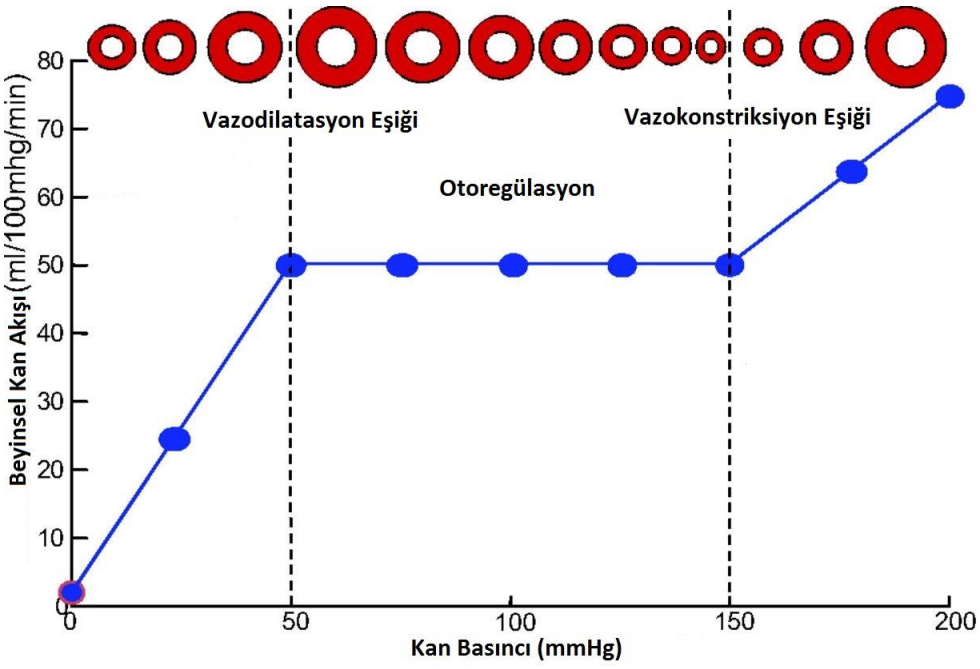
Arter alanlarının etkilenmesine bağlı olarak iskemik inmeli hastalarda lokalizasyon yapılabilmektedir. Arterlerin kan çıkışı yaptığı yerler ve vertebral arterin dura zarını deldiği

yerler en sık tutulum olan bölgeler olarak bilinmektedir. Küçük damarların tutulumu lipohyalinozis ile ortaya çıkmaktadır (3).

BEYİNSEL KAN AKIŞI VE METABOLİZMA

Beyinsel kan akışı beynin beslenmesi için çok önemlidir. Beyinsel perfüzyon basıncı ve beyinsel vasküler direnç arasındaki oran beyinsel kan akışını gösterir. Ortalama arteriyel basınçtan intrakraniyal basınç çıkarılırsa beyinsel perfüzyon basıncı elde edilir. Normal koşullarda beyinsel perfüzyon basıncı stabildir. Fakat nadiren oluşan durumlarda değişebilmektedir. Bu durumlar serebral venöz dönüşü ve kan basıncını etkilerler.

Beyinsel kan akımı, intrakraniyal basıncın ortalama arteriyel basınca ulaştığı anda durmaktadır. Ancak otoregülasyon adı verilen mekanizma ile beyinsel kan akışı 60-160 milimetre civa (mmHg) aralığında devam ettirilir (Şekil 2). Eğer ortalama arteriyel basınç düşük ise, beyin arteriyollerinin dilatasyonu ile direnç azalır. Eğer ortalama arteriyel basınç yükselir ise direnci arttırmak için arteriyoller daralmaktadır. Beyine gelen kan belirli bir düzeyin altına inerse serebral iskemi oluşur. Yüksek veya düşük kan basınçlarına göre beyinsel kan akımı değişir. Kan basıncı arttığında vazodilatasyon gerçekleşir. Kan basıncı düştüğü anda ise vazokonstriksiyon gerçekleşir. Vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon sayesinde beyinsel kan akışı stabil olmaktadır. Bu kendi kendine düzenleme mekanizması bazen bozulabilmektedir. Bunlardan birisi de iskemik inmedir (9).



Şekil 2. Otoregülasyon şeması (10)

SEREBROVASKÜLER HASTALIKLAR (SVH)

Serebrovasküler hastalıklar (SVH) beyinin belirli bir bölgesinin geçici veya kalıcı şekilde, iskemi veya kanama nedeniyle etkilendiği ve beyni besleyen damarların patolojik bir süreç ile ilişkilendirildiğibütün hastalıkları kapsar. Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO)'na göre inme, hızla gelişen beyinsel işlevlerin bozukluğuna göre oluşan 24 saatten uzun süren ya da ölümle sonuçlanan klinik bulgular olarak tanımlanır. Serebral iskemiye bağlı geçici ataklar, tümör gibi nedenlere bağlı infarkt veya kanama, travma, enfeksiyon ve subdural hematom bu tanımlamaya dahil edilmemiştir (11).

İnmelerin tamamında iskemik inme yaklaşık olarak %80 (%70-85), intraserebral kanama yaklaşık olarak %15 (%7-15) ve subaraknoid kanama yaklaşık olarak %5 (%2-8) oranında görülmektedir (12).

TIKAYICI TİPTE SEREBROVASKÜLER HASTALIKLAR

Tıkayıcı tipte serebrovasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalıkların % 80- 85'ini oluşturmaktadır. Sinirsel hastalıklarda çok sık görülebilir ve ölüme neden olabilmektedir. Tıkayıcı tip Serebrovasküler hastalıklarda görülen klinik bulguların değişkenliğinde beyni besleyen arterlerin anatomik farklılıkları, kollateral dolaşımın durumu ve Willis poligonunun fizyolojik özellikleri etkindir. Tıkayıcı tip serebrovasküler hastalıklar aniden ortaya çıkmaktadır. Bu özellik embolilerde daha da dikkat çekicidir. Aynı şekilde trombotik olgularda bu olay çok kısa sürede oluşur ve saatlerce devam edebilir. Trombotik olgularda oluşan bu durumun kalıcı olması beyin ödemine sebep olur. Oluşan ödem ilk 4-5 gün maksimum düzeye gelir, ardından ağır ağır azalır. Bu olay olduktan sonra hastanın yaşamsal fonksiyonlarında yavaşlama süreci başlar. Hastalık aniden oluşsa da gerilemesi uzun zaman almaktadır (9).

İNMENİN TANIMI

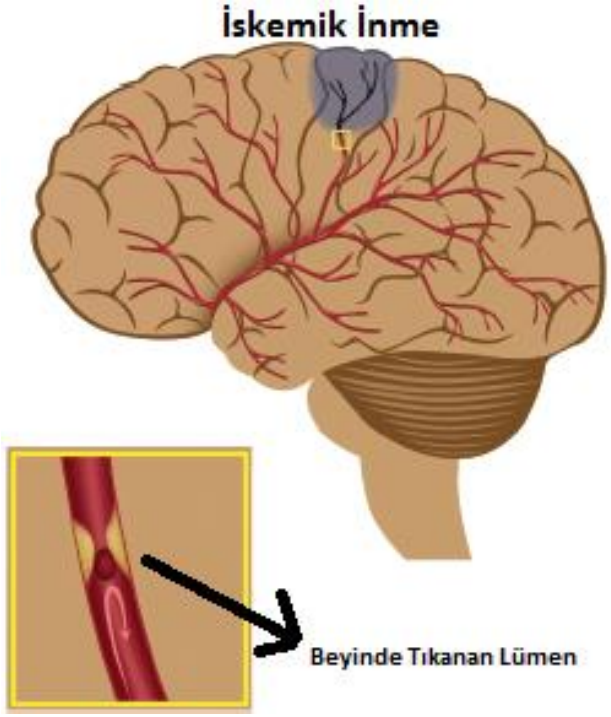
İnme, beyine gelen kan akışının herhangi bir şekilde durmasına bağlı olarak ortaya çıkan beyin fonksiyonlarındaki ani bozukluk şeklinde tanımlanabilir. Sinirsel işlevlerin sürekli veya geçici şekilde kaybolması görülebilir. Dünyada işgücü kaybı ve hastalığa bağlı ölüm oranının önemli nedenleri arasındadır (13). İnmelerin en belirgin niteliği sinirsel bulguların aniden başlamasıdır (1). Bir günden daha az sürede tamamen iyileşen inmelere geçici iskemik atak (GİA) denilmektedir (2). İnmelerin tamamının % 80 - %85'i serebral infarkt, % 10 - %15'i intraserebral hematom ve % 6 - %8'i ise subaraknoid kanamadır (1).

İNMENİN SINIFLANDIRILMASI

İnmelerin yaklaşık olarak % 87' sini iskemik inmeler, yaklaşık % 13' ünü ise hemorajik inmeler oluşturur. Hemorajik inmeler; kanama olan bölgelere göreintraserebral ve subaraknoid kanama olmak üzere iki gruba ayrılır. İntraserebral kanamalar tüm inmelerin yaklaşık % 10' unu oluştururken, subaraknoid kanamalar ise % 3' ünü oluşturur (14). Hemorajik inmeler kanın irritan etkisi, hipoksik kalan beyin dokusu ve kafa içi basıncın artması nedeniyle diğer inmelerden daha tehlikeli olarak kabul edilir (15).

İSKEMİK İNME

İskemik İnme, fokal serebral, spinal veya retinal infarkt sonucu gelişen nörolojik disfonksiyon vakasıdır (16). Yaş ile orantılı şekilde iskemik inme riski artmaktadır. Beyinde kan akımının yaklaşık 22 mililitre/100gram/dakika olması durumunda sinirsel sorunlar oluşmaya başlar, benzer şekilde kan akımının 12 mililitre/100gram/dakika'nın altına inerse sinirsel ölüm gerçekleşir (4). İskemik inme Batı ve Amerikan toplumlarındaki tüm inme bulgularının yaklaşık % 80'ini, ülkemizdeki tüm inme bulgularının ise yaklaşık % 72' sini oluşturmaktadır (4).



Şekil 3. İskemik İnme (17)

İSKEMİK İNME HASTALIĞINDA RİSK FAKTÖRLERİ

İskemiye sebep olan risk faktörleri kesin şekilde iskemik inme olacağını göstermemektedir. Ancak bu risk faktörleri izlenen birisinde iskemik inme olma ihtimali artıyor anlamına gelir (1). Risk faktörlerinin değiştirilebilir veya değiştirilemezliğine ve bu risk faktörleri ile iskemik inmenin alakasının kesinliği göz önüne alınarak iskemik inme risk faktörleri sınıflandırılır (2). Değiştirilen ve değiştirilemeyen olmak üzere iskemik inme risk faktörleri 2 temel gruba ayrılabilir. Benzer şekilde değiştirilebilen risk faktörleride kendi içerisinde 2 alt gruba ayrılır. Bunlar kesinleşmiş risk faktörleri ve kesinleşmemiş risk faktörleridir (4).

Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

Yaş: İleri yaşta (65 ve üzeri) olan kişiler için iskemik inme olma ihtimali yüksektir. Bu nedenle yaş arttıkça iskemik inme riski de artar. 55 yaş ve üzeri kişiler için iskemik inme riski önceki yaşlarına nazaran yaklaşık iki kat artmaktadır.

Cinsiyet: Her ne kadar iskemik inme sonucu ölenlerin çoğunluğu kadın olsada, erkeklerin iskemik inme olma ihtimali daha yüksektir.

Irk: Siyah ırkların hipertansiyon ve diyabet olma olasılığı yüksek olduğundan beyaz ırklara nazaran iskemik inme oranı yüksektir. Beyaz ırklarda yapılan araştırmalar sonucunda Japon ve Çin'lilerde iskemik inme oranının diğer beyaz ırklara oranla yüksek olduğu görülmüştür.

Aile öyküsü: Aynı ailede yaşayan kişilerin benzer beslenme alışkanlıkları, yaşam stilleri ve en önemlisi genetik özellikleri iskemik inme olmada önemli risk faktörlerindendir. Babanın veya annenin iskemik inme yaşaması çocuğun da iskemik inme riskini arttırır (1). Tek yumurta ikizlerinin iskemik inme riski, çift yumurta ikizlerine nazaran daha fazladır. Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda iskemik inmenin genetik merkezli olduğu, ancak iskemik inmenin sebebinin yalnızca bir genin sebep olmadığı, bunların yanında çevresel farklılıkların da etkin olduğu belirlenmiştir (3).

Değiştirilebilen Risk Faktörleri

İskemik inme riskini arttıran fakat değiştirilebilir sebepleri olan risk faktörlerine değiştirilebilir risk faktörleri denir (2).

Kesinleşmiş faktörler:

Hipertansiyon: Kan basıncının artışı aterosklerozu hızlandırır, kalpten kaynaklı hastalıkların riskini arttırır ve bu olaylar doğrudan iskemik inme riskini arttırır. (1).

Hiperinsülinemi, glikoz intoleransı ve diyabetesmellitus: Bu hastalıklar iskemik inmenin büyük damar hastalığı alt tipinde önemli bir risk faktörüdür (4). Sağlıklı kişilerin iskemik inme olasılığı diyabetesmellituslu hastalara göre 2-3 kat daha azdır. Hiperinsülinemi, glikoz intoleransı veya diyabetesmellitusa hipertansiyon ya da hiperlipidemi eklenirse iskemik inme riski daha da artmaktadır.

Kalp hastalıkları: Normalde tek başına romatizmal olmayan kronik atriyalfibrilasyon yeterince yüksek inme riski taşır. Ancak kronik atriyalfibrilasyona ek olarak koroner arter kalp hastalığı da eklenirse iskemik inme riski iki katına çıkmaktadır.

Dislipidemi: İskemik inme için Serum lipoprotein seviyesinin fazlalığı çokönemlidir (1). Serum kolesterol düzeyinin 280 miligram/desilitre'den fazla olması iskemik inme riskini arttıran faktörlerdendir (9).

Sigara: Sigara içmek başta iskemik inme olmak üzere diğer tüm inmeler için risk faktörüdür (1). Sigara içmeyi bırakan bir kişinin iskemik inme olma riski sigara içmeyen kişilerin iskemik inme olma olasılığı seviyelerine kadar gelebilmektedir. Pasif içici olarak adlandırılan sigara dumanı olan ortamlarda bulunan ancak sigara içmeyen kişilerde de % 1 - %2 oranında iskemik inme riski bulunmuştur (3).

Geçici iskemik atak: Geçici iskemik atak geçirmiş bir kişinin takip eden birinci ay içerisinde iskemik inme olması riski yüksektir. Sürekli geçici iskemik atak geçirilmesi iskemik inme riskini arttırır.

Hemostatik faktörler: Kan viskozitesinin artması, hemoglobin yoğunluğu ve hematokrit iskemik inme olasılığını arttıran risk faktörlerindendir. Benzer şekilde plazma fibrinojen veya plazma homosistein düzeylerinin yüksek olması da tek başına iskemik inmede önemli bir risk faktörüdür. Düşük olan serum folat düzeyi de iskemik inme için risk faktörlerindendir (1).

Orak hücreli anemi: Orak hücreli anemi hastalarında 20 yaşına kadar inme olma olasılığı yaklaşık % 11 kadardır. Sık sık kan nakli yapılırsa bu risk yeterince azalmaktadır (3).

Kesinleşmemiş faktörler:

Alkol kullanımı: Alkolün fazla kullanılması trigiliseridi ve kan basıncını arttırmaktadır. Sürekli alkol kullanımı birçok hastalıkta olduğu gibi inmelerin tamamı için risk faktörüdür.

Obezite: Obezite türlerinden olan abdominal obezite iskemik inme ile bağlantılıdır. Bel/kalça oranı arttıkça, kişilerde iskemik inme riski de artmaktadır (2).

Fiziksel inaktivite: Düzenli egzersiz yapmak birçok hastalıkta olduğu gibi iskemik inme riskini de azaltır.

İlaç kullanımı ve bağımlılığı: Bağımlılık yapan maddeler (Kokain, eroin vb.) ani şekilde kan basıncını arttırdığından iskemik inme riskini de arttırmaktadır (3).

Enfeksiyonlar: Özellikle sifiliz, tüberküloz ve malarya gibi enfeksiyonlar iskemik inme riskini arttırmaktadır. Bakteriyel olan enfeksiyonların bazıları da iskemik inme için risk faktörü olabilmektedir.

Migren: Migren olan kişilerde trombosit aktifliği ve trombosit-lökosit toplanmasında görülen artış iskemik inme riskini arttırabilmektedir (18).

İSKEMİK İNMENİN FİZYOPATOLOJİSİ

Metabolik gereksinimi fazla olan beyin, enerjisini öteki organlara kıyasla yalnızca glukozdan elde eder. 100 gram beyin dokusunun dakikada kullandığı glukoz miktarı yaklaşık 4.5-7 miligram arasıdır. Glukoz hem aerobik hem de anaerobik yol ile metabolizmaya dahil olur. Anaerobik yolla elde edilen enerji kısmı sinirsel bütünlüğü korumada yetersizdir. Benzer şekilde kalsiyum ile sodyumun hücrenin dışında ve potasyumunda hücrenin içinde tutulması için gereken adenozintrifosfat (ATP) ihtiyacını karşılamak için yetersizdir. Dinlenme durumunda bulunan beynin normal beyinsel kan akımı ortalama 50/55 ml/dk/100g'dır. Bu şekildeki beynin kan akımı serebral perfüzyon basıncı da normal ise dokunun metabolik ihtiyacını karşılayabilir. Dinlenme durumunda beyine istemli şekilde yapılan hareketten dolayı motor korteks uyarılacağından bu bölgede metabolik ihtiyaç artar. Beyin de oluşan bu ihtiyaca bölgesel olarak kan akımını arttırarak karşılık verir. Ortalama sistematik kan basıncı değerleri 60 - 160 mmHg arasında durumlarda beyinde kan akışı statik kalmaktadır. Ancak ortalama arteriyel basıncın azalmasıyla ya da kafa içi basıncın artmasıyla beyinsel dokuların beslenme basıncı azalır. Bu durumda prekapiller damarların çeper genişlemesinden dolayı serebrovasküler direnim düşmekte ve beyinin kan akışı statik kalmaktadır. Benzer şekilde serebralm perfüzyon basıncının artmasıyla damar çapında daralma oluşur, direnim de artış

olur ve beyinde kan akışı sabitlenir. Bu şekilde beyindeki kan akışının sabit tutulduğu mekanizmaya otoregülasyon denilmektedir. Hipertansif ensefalopati benzeri olaylarda damarın çapı yeterince daralamadığından otoregülasyon bozulur. Otoregülasyon bozulması hiperemiyi ve vazojenik ödemi ortaya çıkarır. Beyindeki kan akışı değerinin kritik eşik noktasında (15 ila 18 ml/100gr beyin dokusu/dk.) birkaç saatlik sürmesi sonucunda inme oluşmaktadır. Eğer beyindeki kan akışı 10-20 ml/dk/100 gr olursa bu durumda iskemik penumbra denilen bölge oluşur. İskemik penumbra ise beyinsel damar tıkanmasında infarktın oluştuğu ağır iskemik merkezi çevreleyen kolleteral dolaşımın oluşturduğu rezidüel beyinsel kan akışı sebebinden dolayı akut hücre nekrozunun görülemediği bir bölgedir (19). Yeniden beyin akımı sağlanabilirse potansiyel olarak kurtarılabilineceği iddia edilmektedir (20). Eğer beyindeki kan akışı kesilirse yaklaşık olarak 3 dakikada hücre ölümleri görülmeye başlar. Hücre ölümlerinin böyle aniden olmasıyla inme durumlarında girişimlerin imkansız olabileceği düşünülmektedir. Fakat uygulamada iskemik inmelerin büyük kısmı küçük bir bölgeyi çevreleyen tamamlanmamış iskemik alan penumbra şeklinde olur (21). Penumbradaki sinir hücreleri perfüzyonun düşmesine rağmen canlı kalabilirler. Penumbra statik değildir. Penumbrada iskeminin geri dönüşümü 36 saati bulabilir. İskemiden dolayı olan infarktlar majör vasküler kollateral damarların borderzonlarını, daha küçük olan uç damarları veya hemisferin tamamını tutabilir. İki tip borderzon vardır. Bunlar anterior ve posterior borderzondur. Anterior borderzon, orta serebral ve anterior arterlerin merkezi arteriyel dallarınca beslenir. Posterior borderzon ise posterior serebral ve orta arterlerin merkezi arteriyel dallarınca beslenir (22). Vasküler oklüzyonun akabinde Willis poligonu sayesinde direkt olarak kollateral akım distaliskemik dokuyu besleyebilmektedir. Yan ana vasküler dallardan çıkan leptomeningeal kollateraller de bölgesel kan akışını oluşturabilir (23). İskemi olan yerde otoregülasyonun kaybolmasının yanında adenozintrifosfat (ATP) pompaları ve iyon geçişinin disfonksiyonu bulunmaktadır. Beyindeki kanın akışının durması, kısa sürede sinirsel elektriksel aktifliğin durmasına ve takip eden birkaç dakika içerisinde kan homeostazının bozulmasına sebep olabilir. Bu olayların sonucunda zardaki iyon pompası iflas eder, potasyum hücreden uzaklaşır, su, klor, sodyum ve kalsiyum da hücrenin içerisine girerek zarda depolarizasyona sebep olur. Beyin hücreleri iskemide ATP'nin kayıp olmasını bir saat gibi bir süre idare edebilir. İskemik olan bir hücrede ATP, anaerobik şekilde güçsüz olan glukoz ve glikojen depolarından yeterli düzeyde üretilememektedir. Laktat ve hidrojen iyonları karbonhidratın depolanması miktarına göre birikmeye başlar. Astroglial zedelenmeler, hidrojen iyonlarının demire bağlı olan serbest radikallerin oluşmasını

başlattığından artar. Bozulan iyon pompası hücre içi ve hücre dışı iyonların dengesinin bozulmasına yol açar. Hücre içi ve hücre dışı iyonların dengesinin bozulmasına olayına anoksik depolarizasyon adı verilir. Anoksik depolarizasyon olduğunda potasyum iyonları hücrenin dışarısına, kalsiyum, sodyum ve klor iyonları da hücrenin içerisine girer. Glutamat ve aspartat gibi eksitatör aminoasitler de zehirleyici düzeyde salınır. Kalsiyumun hücrenin içerisine girişi iskemik sinir hücresinde zedelenmeyi fazlalaştırır. ATP'nin tükenmesi aşırı miktarda kalsiyumun hücrenin içerisine girişine ve hücre içindeki bölümlerde salınımına sebep olmaktadır. Fosfolipaz, kalsiyum tarafından aktif edilerek hücre zarına bağlı olan gliserofosfolipidlerin serbest yağ asitlerinin hidrolizine ve öteki zar lipidlerinin serbest radikal peroksidasyonuna sebep olur. Kalsiyum da proteaz enzimlerinin aktifliğine sebep olduğundan proteinlerin lizisine ve nitrikoksit sentatazın aktifliğiyle serbest radikallerin çıkmasına sebep olur. Olan bu olaylar irreversibl hücre hasarını ortaya çıkarır (11). İskemi olduğu andaki kan miktarı ve iskeminin süresi parenkimal dokunun hasar miktarını etkilemektedir. Dokuların normal fonksiyonlarına dönebilmesi için iskemi olan dokuların bir süre sonra reperfüze olması gerekmektedir. Kan akışı normal haline gelmesi süresince oluşan hasara "reperfüzyon hasarı" adı verilir (24). Etkilenen hücrelerin iskemiye karşı reaksiyonuna göre beyin iskemisinin prognozu değişir. İskeminin süresi, iskeminin derecesi ve kollateral kan akışının yeterli olması iskeminin prognozunu etkileyen faktörlerdendir. Farklı hücre tipleri iskemilere farklı yanıtlar verirler. İskemiye en çok reaksiyon gösteren hücreler sinir hücreleridir. Sinir hücrelerinden sonra iskemiye reaksiyon gösteren hücre türleri; endoteliyal hücreler, astrositler, mikroglialar ve oligodendroglialardır. Beyinsel kan akışındaki farklılıklar, zaman, oluştuğu yer ve potansiyel kollateral döngü beyinsel arteriyel oklüzyonun prognozunda farklılıkara sebep olur (25).

İSKEMİK İNMEDE ETİYOLOJİK SINIFLANDIRMA

İskemik inmede etiyoloji, hastanın yönetimine, prognoz ve sonuçlaraetki etmektedir. Alt tipteki inmelerin dikkatli çözümlenmesi, teşhise yönelik testler, klinik nitelik ve potansiyel etiyolojik etmenler hakkında bilgi toplamayı gerektirmektedir (26). Sebebe dönük en geniş çerçevede tercih edilen sınıflandırma sistemi, TOAST sınıflandırmasıdır (27). Bu sınıflandırma Akut İnme Tedavisinde Org 10172'de Deneme (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) için geliştirilmiş ve etiyolojiyi esas almış iskemik inmenin alt tip kategorilendirme sistemidir (26).

TOAST sınıflamasında 5 kategori bulunmaktadır:

1. Büyük atardamar aterosklerozu

2. Kardiyoembolik İnme

3. Küçük damar oklüzyonu

4. Bilinen nedenlere bağlı inme

5. Nedeni bilinmeyen inme

Genelde beyinsel infarkt hastaların %20'sinin sebebi kardiyak emboli, %50'sinin sebebi büyük damar hastalığı ve %25'inin sebebi ise küçük damar hastalığıdır. Net bir şekilde nedeni belirlenemeyen hastalar ise beyinsel infark hastaların %25 - 39'unu oluşturmaktadır (28). Teşhis, klinik nitelikler ve beynin görüntülenmesi, kalbin görüntülenmesi, ekstrakraniyal atardamarların çift taraflı görüntülemesi, arteriyografi ve tromboz yatkınlığı gibi durumların laboratuvar tetkiklerinden elde edilen verilere dayanmaktadır.

Büyük Atardamar Aterosklerozu

Bu tip hastalarda boyun ya da beyin damarlarında, büyük ihtimalle ateroskleroza bağlı önemli (>%50) stenozu veya oklüzyonuna ait klinik veya görüntülü bulgular vardır. Klinik bulgularda beyinsel kortikol işlev kaybı ya da beyinsel disfonksiyon bulunmaktadır. %50' nin üzerinde stenozu gerektiren intrakraniyal veya ekstrakraniyal arter vardır. Bu oran, arteriyografi ya da çift taraflı görüntüleme ile ispatlanmıştır. Teşhise yönelik çalışmalar, olası kardiyoemboli nedenlerini dışta bırakmalıdır.

Kardiyoembolik İnme

Kalpte oluşan emboliyle ilişkili olduğu düşünülen arteriyel oklüzyon hastaları bu kategoriye dahildir. Olma ihtimali olan bir kardiyoemboli teşhisi için, minimum bir adet kardiyoemboli kaynağı belirlenmiş olmalıdır. Tüm bulgular büyük atardamar aterosklerozuna benzemektedir. Kardiyoembolik inme tanısını, sistemik emboliyada birçok kez vasküler bölgede vuku bulmuş GİA desteklemektedir. Emboli ya da trombozun büyük atardamar aterosklerozu ile ilişkili potansiyel nedenleri dışlanmalıdır.

Küçük Damar Oklüzyonu

Lakünerinfarkt şeklinde tanımlanan hastalar bu kategoride bulunmaktadır. Klinik laküner sendromların en az birisi hastada olmak zorundadır. Aynı zamanda hastada serebral kortikal disfonksiyon bulunmaması gerekmektedir. Hastaların hipertansiyon ya da diabetes

mellitus geçirmiş olması teşhisi desteklemektedir. Kardiyoemboli kaynağı ve ekstrakraniyal büyük atardamarların değerlendirmelerinde ipsilateral bir atardamarda %50' den çok astenoz bulunmaması gerekmektedir.

Bilinen Nedenlere Bağlı İnme

Hematojik bozukluklar, non-aterosklerotik vaskülopati, ya da hiperkoagülabilite benzeri seyrek olan inme nedenleri bu kategoride bulunmaktadır. Bu hastaların klinik değerlendirmelerinde, yer ve boyuttan bağımsız akut iskemik inme teşhisi olması gerekmektedir. Hastaya yapılan arteriyografiyada kan testleri gibi teşhise yönelik testler bu nedenlerden birisini göstermelidir.

Nedeni Bilinmeyen İnme

İnmeye sebep olan herhangi bir şey net bir şekilde bulunamazsa burada kategorize edilir. Hastaların bir kısmında detaylı tetkik yapılmasına rağmen etiyoloji saptanamaz. Hastaların bir kısmında ise yapılan inceleme detaylı değildir ve hastalığın sebebi bulunamaz. Birçok potansiyel nedenlerin bulunduğu ve tam olarak tanı konulamayan durumlarda bu kategoride bulunur (26).

İSKEMİK İNMENİN KALITIM İLİŞKİSİ

İskemik inmenin kaynağı ve gelişmesi sırasında organizmada meydana gelen değişiklikler bütününe bakıldığında kalıtımın fazla rolü olmadığı ileri sürülmüştür. Ancak anne, baba gibi birinci derece akrabalarında iskemik inme tanısı konmuş kişilerin kendisin de iskemik inme riskinde artış gözlemlenmiştir. Öte yandan aynı çevresel ya da kültürel etkileşimlerde bulunma, yaşam şekli, kalıtım ve çevresel faktörlerin arasındaki etki gibi durumlarda da iskemik inme riski artmaktadır (2).

MATRİKS METALLOPROTEİNAZ ENZİMLERİ

Matriksmetalloproteinaz enzim ailesini ilk Charles Lapiere ve Jerome Gross 1962 yılında iribaşın metamorfozu sırasında tanımlamışlardır. MMP enzimleri ekstraselüler matriksin yıkımına neden olan, çinko bağımlı 28'den fazla enzim bulunduran proteaz kaynaklı grubu oluşturmaktadır. Matriksmetalloproteinaz enzimleri ekstraselüler matriksin tüm bileşenlerini yıkıma uğratma özelliği vardır. Bu enzimler yani matriksmetalloproteinazlar

doğumdan sonra dokuların onarılmasında, fetal gelişim sürecinde ve ektraselülermatriksin yeniden yapılanmasında önemli rolü vardır. Serum içeriğinde matriksmetalloproteinaz seviyesinde artışa sebep olan patolojik durumlardan en önemlilerinden birisi kanserdir. Kanser olan kişiden alınmış serum numunelerinde bazı matriksmetalloproteinaz enzimlerin arttığı, bazılarınında azaldığı görülmüştür (29).

Matriksmetalloproteinazlar substrat özgüllüğüne göre 5 gruba ayrılabilir.

a) Kollajenazlar(MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18)

b) Jelatinazlar(MMP-2, MMP-9)

c) Stromelisinler(MMP-3, MMP-10, MMP-11)

d) Membran tipi (MT) matriksmetalloproteinazlar(MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25)

e) Herhangi bir sınıfa dahiledilemeyenmatrikesmetalloproteinazlar(MMP-7, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP23, MMP-26, MMP-27, MMP-28) (30).

Matriksmetalloproteinaz enzimlerinin substrat özgüllüğü baz alınarak kategorize edilmiştir (Şekil 4).

Grup adı	Tanımlayısı isim	Temel substrat
Kollajenazlar	İnterstisyel kollajenaz	Kollajen 1, 2, 3, 7, 10, jelatin, PG
	Nötrofil kollajenaz	Kollajen 1, 2, 3, PG
	Kollajenaz-3	Kollajen Tip 1, 2, 3, PG
	Kollajenaz-4	Kollajen Tip 1, 2, 3, PG
Jelatinazlar	Jelatinaz A	Jelatin, kollajen 4, 5, 7, 10, 11, elastin
	Jelatinaz B	Jelatin, kollajen 4, 5, 14, elastin, PG
Stromelisinler	Stromelisin 1 Stromelisin	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen 3, 4, 9, 10
	2 Stromelisin 3	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen 3, 4, 9, 10
		PG, laminin, elastin, entaktin, tenaksin, versikan,
		jelatin, kollajen 3, 4, 9, 10
Membran tipi	MT1-MMP	Kollajen 1, 2, 3, FN, laminin, VN
MMP'ler	MT2-MMP	Agrekan, FN, laminin, tenaksin
(MT-MMP'ler)	MT3-MMP	Kollajen 3, FN, jelatin
	MT4-MMP	Jelatin
	MT5-MMP	PG
	MT6-MMP	Kolllajen 4, fibrin, fibronektin, jelatin
Diğer MMP'ler	Matrilisin 1	Serin proteaz inhibitörleri
	RASI-I	Kollajen 4, FN, jelatin, lamini, tenaksin
	Enamalisin	Agrekan, amelogenin
	X-MMP	Tanımlanmamıştır
	CA-MMP	Tanımlanmamıştır
	Matrilisin 2	Kollajen 4, FN, Jelatin, VN
	CMMP	Tanımlanmamıştır
	Epilisin	Tanımlanmamıştır
	Metaloelastaz	Kollajen 1, 4, elastin, FN, jelatin, laminin, VN

FN:Fibronektin PG:Proteoglikan VN:Vitronektin

Şekil 4. MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre kategorilendirilmesi (31).

Matriks metalloproteinaz-2 ve matriks metalloproteinaz-9 enzimleri 5 temel bölümden meydana gelir.

1) Sinyal Peptit

2) Propeptit

3) Katalizör bölüm (Çinko bağlayan kısım içermektedir.)

4) Hemopeksine benzer bölüm (Bu kısım substrat çeşitliliğini belirler.)

5) Hemopeksine benzer bölüme katalizör bölümü bağlayan zengin prolin içeren bölüm (32).

Matriksmetalloproteinaz enzimleri çeşitli şekilde kategorize edilse de yapı olarak benzerlikleri vardır. Hücrede endoplazmikretikulumda sentezi olan ilk protein yapı sinyal peptittir. Propeptit bölüm çinko bağlayan kısım ile etkileşerek enzimin aktif olmamasını yani pasif kalmasını sağlayan bölümdür. Katalizör bölüm propeptit bölümün ayrılması ile içerisinde bulunan çinko iyonundan (Zn^{+2}) dolayı enzim aktifliğini sağlayan bölümdür. Matriks metalloproteinaz-7 ve matriks metalloproteinaz-26 dışarısında olan öteki matriksmetalloproteinaz enzim türlerinin C terminalinde hemopeksin / fibronektin bölümü bulunmaktadır. Bu bölüm peptit yapıdadır. Metalloproteinazın doku inhibitörlerinin jelatinaz grubundaki matriksmetalloproteinaz enzimlerine (matriks metalloproteinaz-2 ve matriks metalloproteinaz-9) ve matriks metalloproteinaz-13'e bağlanmasıyla alakalıdır (31). Matriksmetalloproteinazların proteolitik aktivasyonları hem nonspesifik hemde spesifik inhibitörler (metalloproteinazın doku inhibitörleri) ile engellenebilmektedir. Metalloproteinazın doku inhibitörleri bağ dokusunun metabolizmasında görevli olmakla beraber birçok doku ve vücut sıvılarında da bulunmaktadırlar. Matriksmetalloproteinaz doku inhibitörleri matriksmetalloproteinaz enzimlerine sadece kovalent olarak ayrılabilecek şekilde bağlanır. Böylece pasif olan enzim formu aktif olur ve katalitik aktivitenin sürdürülmesi inhibe edilir. Bu şekilde matriksmetalloproteinaz enzim aktifliği sayesinde metalloproteinazın doku inhibitörü dengesi dengelenmiş olur. Günümüze kadar 4 tip metalloproteinazın doku inhibitörü (MDI) tanımlanmıştır. Bunlar; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4'türler. Bu inhibitörler kas hücreleri, bağ dokusu hücreleri, endotel hücreler ve makrofajlar tarafınca sentezlenir. Metalloproteinazın doku inhibitörleri, matriksmetalloproteinazların inhibesi açısından birbirlerine benzerdir. Ancak matriks içerisinde bulundukları yerlere ve gen ekspresyonunun derlenmesi açısından farklılıkları vardır. Bunun yanı sıra çeşitli matriksmetalloproteinaz tiplerine göre çeşitlilik göstermektedirler. Mesela; Jelatinaz A (matriks metalloproteinaz-2) tercih olarak TIMP-2 ile

inhibe edilmektedir. Öte yandan Jelatinaz B (matriks metalloproteinaz-9) tercihen TIMP-1 ile inhibe edilmektedir (33). Matriksmetalloproteinaz enzimlerinin hastalıklarla alakalarına bakıldığında önemli oluşunun nedeni kolaylıkla anlaşılmaktadır. Göğüs kanseri, romatid artrit ve aterosklerozun kollajenaz enzimlerle ilişkili olduğu görülmüştür. Akciğer kanseri, kolon kanseri, yumurtalık kanseri, göğüs kanseri, kötü huylu beyin tümörü, kronik astım, kistikfibrosiz, hipertansiyon gibi rahatsızlıklar ile jelatinaz enzimlerin ilişkili olduğu görülmüştür (34).

MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9'UN İSKEMİK İNME İLE İLİŞKİSİ

Matriksmetalloproteinazlar, insan dokularında yaygın olan, yapısal olarak çinko bağlayıcı proteolitik enzimlerle ilişkisi iyi bilinen inflamatuar enzim ailesidir. Hücre dışı matriksin fizyolojik ve patolojik süreçlerinde neredeyse tüm bileşenlerini indirgeyebilmektedir (35). Matriksmetalloproteinazlar aterosklerozun patogenezindeki migrasyonun aktivasyonunda, düz kasın proliferasyonunda ve aterosklerotik plakların indüksiyonu ve destabilizasyonunda yer alırlar (36,37). Dengeli olmayan matriksmetalloproteinaz aktivitesi kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklarıda içeren klinik bulgularda rapor edilmiştir (38,39). Özellikle matriks metalloproteinaz-2 ve matriks metalloproteinaz-9, iskemik inme ve intraserebral kanamalarda matriksmetalloproteinazların ekspresyonunu aktif etme ve değiştirmede rolü vardır. Bazı raporlar inmenin akut fazında matriks metalloproteinaz-9'un serum seviyelerinin yükseldiğini göstermiştir. Benzer şekilde matriks metalloproteinaz-2 seviyelerininde birkaç gün sonra yükseldiği belirtilmiştir (40,41). Düzensiz matriksmetalloproteinaz aktivitesi ekstraselülermatrikste ve bazal lamina proteinlerinde kontrolsüz şekilde bozulmaya sebep olur. Bu bozulma kan-beyin bariyeri bütünlüğünü etkiler ve nöroinflamatuar sonuçlar doğurur (42,43). Akut iskemik inmedeki yüksek seviyeli matriks metalloproteinaz-9'un inmedeki inflamasyonun düzenlenmesinde ilişkili olduğu bilinmektedir (44,45). Matriksmetalloproteinaz geni kromozomda 20q12.2-13.1 bölgesinde bulunur. Sıra analizleri birkaç tekli nüktelotid polimorfizimlerinin diğerleri ile işlevsel açıdan önemli olduğunu ortaya çıkarmıştır (46,47). Daha önceki çalışmalar insandaki matriksmetalloproteinaz-9 geninin, promoter bölgesinde matriksmetalloproteinaz-9 aktivitesini fonksiyonel olarak -1562C/T polimorfizminin kontrol ettiği bilinmektedir (48, 49). Reporterassay tekniği kullanılarak T-1562 alelinin promoter aktivitesinin C-1562 alelinin promoter aktivitesinden yüksek olduğu anlaşılmıştır (46,47). İnsan aortik örneklerindeki T aleli taşıyıcılarında, matriks metalloproteinaz-9, messenger ribonükleik asit ve protein

ekspresyonunun önemli şekilde yüksek olduğu görülmüştür (49). Matriks metalloproteinaz-9 gen polimorfizminin inme ile ilişkisini değerlendirmek için henüz sadece birkaç çalışma bulunmaktadır (50,51,52).

MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9 C1562T GEN POLİMORFİZMİ

Matriksmetalloproteinaz C-1562T polimorfizmi gen promoterinde 1562'nci nükleotit olan sitozinin timin ile yer değiştirmesiyle oluşur. İn vitro olarak sitozinin timin ile yer değişimi sonucunda, matriks metalloproteinaz-9 gen promoterinin bu kısmına bir nükleer proteinin bağlanmasında kayıp oluştuğu ve makrofajlarda transkripsiyonel aktifliğin fazlalaştığı bilinmektedir (53). Çinde yaşayan ağız, akciğer, kolorektal ve mide kanserli hastalar ile yapılmış olan çalışmalar matriksmetalloproteinaz-2 C1306T ve matriks metalloproteinaz-9 C1562T polimorfizmlerinin önemini ortaya koymuştur (54,55). Yapılan bu çalışmalardan ikisinde C1562T polimorfizminin CC genotipinin etkin olduğu belirtilmiştir (56,57).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

İskemik İnmeli Hastalarda Matriks Metalloproteinaz-9 C-1562T Gen Polimorfizminin Araştırılması başlıklı tez çalışması için öncelikle Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuru yapıldı.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından örnek bir çalışmanın genotip dağılımları esas alınarak yapacağımız çalışmanın etki büyüklüğü 0,333 olarak hesaplandı. Etki büyüklüğünde %5 yanılma payı ve %95 power değeriyle saptayabilmek için 120 kişinin (60 hasta, 60 kontrol) çalışmaya alınabileceği hesaplandı.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun 20/07/2016 tarihli toplantısı sonucu alınan 13/20 sayılı karar ile tez çalışmamız kabul edilmiştir (Ek 1).

Tez çalışmamız ayrıca 2017/55 nolu proje ile Bilimsel araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklendi (Ek 2).

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvurmuş ve iskemik inme tanısı almış hastalar ile diğer servislere başvurmuş ancak iskemik inme tanısı almamış kişilerin vermiş oldukları rutin kanlarla gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde Biyofizik ve Nöroloji Anabilim Dallarında gerçekleştirilmiştir.

Hasta grubu olarak:

1) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran ve iskemik inme tanısı almış olanlar.

2) 19 ve üzeri yaşında olan yetişkinler çalışmaya alınmıştır.

Kontrol grubu olarak:

1) Yaşları 19 veya 19'dan büyük olan yetişkin kişiler,

2) Kronik, sistematik ve metabolik hastalığı bulunmayanlar,

3) İlaç ve alkol bağımlılığı olmayanlar çalışmaya alınmıştır.

Çalışma 60 kişiden oluşan hasta grubu ve yine 60 kişiden oluşan kontrol grubu olmak üzere toplam 120 kişi ile gerçekleştirilmiştir. Hasta grubundaki 60 kişiden 38 kişi erkek, 22 kişi ise kadındı. Kontrol gurubundaki 60 kişiden 31 kişi erkek, 29 kişi kadındı. Hasta grubundaki erkeklerin yaş ortalaması 65,45, kadınların yaş ortalaması ise 67,86 idi. Kontrol gurubundaki erkeklerin yaş ortalaması 56,19 ve kadınların yaş ortalaması ise 63,86 idi. Genel olarak hasta grubunun yaş ortalaması 66,33 iken, kontrol grubunun yaş ortalaması 59,9 'dur.

Hasta ve kontrol gruplarından alınan kan örnekleri etilendiaminentetraasetik asit (EDTA)'li vakumlu tüplere alınarak Trakya Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı laboratuarına götürülmüştür. Alınan kan örneklerinden Thermo Fisher Purelink® Genomic DNA Mini Kit saflaştırma kiti sayesinde DNA'lar izole edilmiştir. İzole edilmiş olan DNA'lar % 0,8'lik agarozlu jel elektroforezinde yürütülerek ve ayrıca nanodrop cihazıyla ölçümler yapılarak izolasyon saflığı gözlendi ve konsantrasyonları nanogram / mikrolitre (ng/µl) olarak belirlendi. C1562T gen polimorfizmlerinin belirlenmesi için gerekli olan polimeraz zincir reaksiyonu öncesinde istenen bölgelere özgü primer çeşitleri kullanılarak $MgCl_2$ titrasyonu ile kullanılacak uygun miktarın tüm gen bölgeleri için 2,5 milimolar (mM) olduğu belirlendi.

Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle çoğaltılan deoksiribonükleik asitler %2'lik agarozlu jellere yüklendi. Jel hazırlanırken boyar madde olarak etidyumbromit (EtBr) kullanıldı. Hazırlanmış olan %2'lik agaroz jele yüklenen örnekler yaklaşık 110 voltluk elektrik enerjisi kullanılarak jel üzerinde yürümesi sağlandı. Yeterince yürütülen DNA örnekleri transmilatörle ultraviyole (UV) ışık altında gözlemlendi. Ardından çoğaltılan polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri istenen bölgelere özel kesim enzimleri kullanılarak restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFUP) yöntemi ile 37°C'de 1 saat kesime bırakıldı. Kesim işlemi sonucunda elde edilen ürünler etidyumbromid karıştırılarak hazırlanmış %2,5'luk agaroz jele yüklendi. Yine 110 voltluk elektroforezde yürütüldü. Yeterince yürütülen bu ürünler yine ultraviyole ışık altında incelenerek polimorfizmler saptandı.

Matriks metalloproteinaz-9 C1562T gen polimorfizmi için SphI (PAEI) restriksiyon enzimi kullanıldı. Matriks metalloproteinaz-9 C1562T gen polimorfizmleri genotip dağılımı kesim sonucunda belirlendi (Tablo 1).

SphI (PAEI) Restriksiyon Enziminin Mekanizması

5' GCATG↓C 3'

3'C↑GTACG 5'

RFUP yöntemi kullanılarak elde edilen kesim sonuçları

Tablo 1. Matriks Metalloproteinaz-9 C1562T gen polimorfizmleri kesim sonuçları

Polimorfizm Bölgesi	**Genotipler**	**Kesim Sonuçları**
MMP-9 C1562T (435 bç)	TT	188 ve 247 bç
	CC	435 bç
	CT	435 bç, 247 bç, ve 188 bç

TT: Timin-Timin; **CT:** Sitozin-Timin; **CC:** Sitozin-Sitozin; **bç:** baz çiftçi.

KULLANILAN KİMYASAL MATERYALLER

Borik Asit (Sigma)

Agaroz (İnvitrogen)

DNA Marker seti, 100 bç (İnvitrogen)

Deoksinükleotittrifosfat (dNTP) (İnvitrogen)

Etanol (Riedel)

EtidyumBromid (EtBr) (İnvitrogen)

$MgCL_2$(Fermentas)

SphI (PAEI) restriksiyon enzimi (ThermoScientific)

Primerler (İnvitrogen)

Proteinaz K (İnvitrogen)

Taq DNA polimeraz (İnvitrogen)

Trisma (Bio Basic)

KULLANILAN CİHAZLAR

Agaroz jel için kullanılan elektroforez tankı (MINICELL PRIMO EC 320, Cleaver Scientific)

Derin dondurucu (HOTPOİNT - ARİSTON)

Güç kaynağı (EC-105, Cleaver Scientific MP-300V)

Otoklav (NÜVE)

Etüv (HARAEUS)

Otomatik mikro pipetler (FINN PIPETTE – THERMO SCIENTIFIC)

Terazi (SARTORIUS)

ThermalCycler (BOECO TS-100)

Vorteks (VELP SCİENTİFİCA)

Nanodrop (ALLSHENG NANO – 200)

Santrifüj Cihazları (HETTICH EBA 21, ALLEGRA X-22R)

Mikrodalga Fırın (VESTEL)

PZR Cihazları (TECHNE, TECHNE TC-3000)

YÖNTEMLER

DNA izolasyonu

DNA moleküllerinin absorblandığı dalga boyunun 260 nanometre olduğu bilinmektedir. Deoksiribonükleik asit konsantresinin belirlenmesinde de bu dalga boyu değeri kullanılmaktadır. 1 Optical Density (OD)'nin 50 µl/ml'ye tekabül ettiğini varsayarsak, DNA miktarı için; DNA = OD_{260} (260 nanometredeki optik yoğunluk) x Seyreltme Faktörü (DilutionFactor) x 50 formülü kullanılabilir (58). Teoride OD_{260} / OD_{280} değerleri 1,75 ile 2 arasında bulunmalıdır. Eğer bu oran beklenen değerler arasında bulunuyorsa sebebi ultraviyole skaladaki absorb nükleik asitlerdir. OD_{260} / OD_{280} değeri 1,75'ten daha az ise protein ve öteki ultraviyole absorblayıcıların var olduğu anlamı çıkarılır. OD_{260} / OD_{280} değeri 2 değerinden fazla ise alınan numunenin fenol yada kloroform ile kontaminasyon olma ihtimalinden söz edilebilir. OD_{260} / OD_{280} oranından farklı olarak OD_{260} / OD_{230b}oranıda nükleik asitlerin saflığının belirlenmesinde kullanılabilir. Ancak bu oranın OD_{260} / OD_{280} oranına kıyasla hasassiyeti daha azdır (59).

Kullanmış olduğumuz Thermo Fisher Purelink® Genomic DNA Mini Kit DNA izolasyon kit protokolü şöyledir:

1) 200 µl kana 20 µl Proteinaz K eklendi ve pipetle karıştırıldı.

2) Yapılmış olan karşıma 400µl Lysis Buffer eklendi ve homojen oluncaya kadar vortekslendi.

3) Ardından hazırlanmış olan karışım 56°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi.

4) 200 µl etanol eklendi ve otomatik pipet ile pipetleme yapıldı.

5) Hazırlanmış olan karışımThermo Fisher Purelink® Genomic DNA Mini Kit DNA izolasyon kitinin içerisinde bulunan spin kolonlarına aktarıldı ve 1 dakika 8000 RPM'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra alttaki kolon atılarak yerine yeni alt kolon yerleştirildi.

6) Üst kolona 500 µl Wash Buffer I eklendi ve 10.000 RPM'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra alt kolon otomatik pipet yardımıyla boşaltıldı.

7) Üst kolona 500 µl WashBuffer II eklendi. Ardından 3 dakika boyunca 14.000 RPM'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda alttaki kolon atıldı. Üstte kalan kolon ise yeni steril 1,5 ml kolonun üzerine yerleştirildi.

8) Üstte kalan kolonun alt kısmının tam ortasına değecek şekilde 200 µl Elution Buffer eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

9) Hazırlanan karışım 1 dakika 10.000 RPM'de santrifüj edildi. Bu kez üstte bulunan kolon atıldı.

10) Alt kolonda kalan izole edilmiş DNA'lar -20 °C'de saklandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

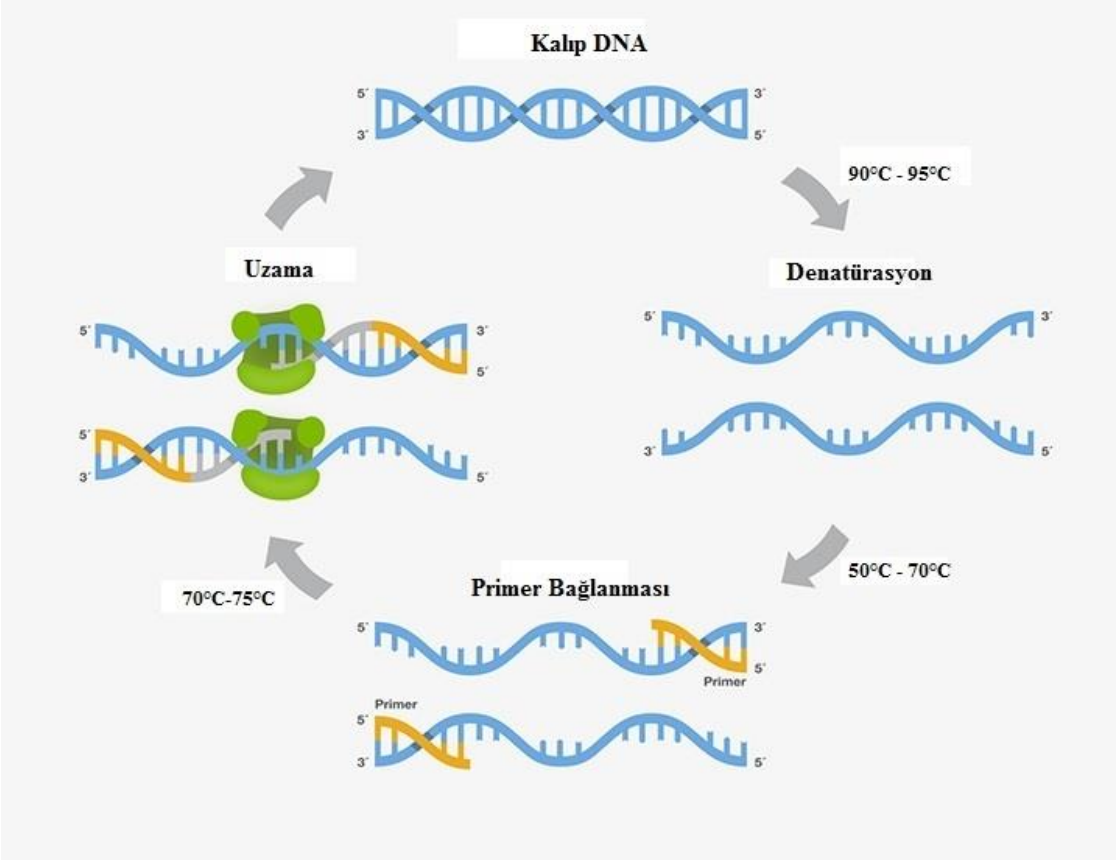
Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ilk olarak 1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde bulunan Cetus adlı şirkette çalışmakta olan Kary Mulis ve arkadaşlarınca keşfedilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu, DNA'da bilinen iki parçanın arasında uzanan spesifik DNA bölümünün enzimler kullanarak çoğaltılabildiği bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde kısa sürede milyonlarca gen kopyalanarak çoğaltılmaktadır. Bu teknik teşhiş ve adli tıpta gen belirlenmesinde ya da özel DNA kısımlarının klonlanmasında ve gen ifadelerinin tespitinde kullanılabilmektedir (60).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu yönteminde sırasıyla üç temel aşamadan söz edilebilir. Bu aşamaların tekrarlanması sayısına bağlı olarak çoğaltılan DNA miktarı belirlenir.

1) Denatürasyon(90-95ºC): Bu aşamada normalde çift sarmalı olan DNA yüksek sıcaklığın etkisiyle tek sarmal haline gelir.

2) Primerbağlanması (50-70ºC): Primerler bu aşamada amaçladığımız DNA'ya bağlanır.

3) DNA sentezi ya da primer uzaması (70-75ºC): DNA zincirinini uzadığı aşamadır. Magnezyum (Mg^{+2}) iyonları olduğundan primerlere eklenir, katalize olan DNA polimeraz sayesinde nükletotid eklenir ve bu şekilde DNA zinciri uzamış olur. Bu üç aşama birlikte PZR yönteminde bir döngüyü (cycle) oluşturur (60, 61).



Şekil 5. Polimeraz zincir reaksiyon döngüsü (61)

Döngü bitince oluşan yeni DNA zincirleri sıradaki döngüler için kalıp DNA görevi üstlenebilir. İlk döngü sonucunda oluşan ürünlerin iki primerinin bağlanma kısımları arası mesafesi daha uzundur. İkinci döngü istenilen uzunluktaki DNA zincirini oluşturur. Döngü sayısına göre elde edilen ürün miktarı $(2^n-2n)x$ formülü ile hesaplanır. Bu formülde n döngü sayısını, x ise kalıp DNA'nın kopya sayısını göstermektedir (60).

PZR yönteminde kullanılan temel bileşenler, kalıp DNA, Taq DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımları, enzim tamponu ve $MgCl_2$'dir (62).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminde Kullanmış olduğumuz Primer Dizisi;

5^{l}-GCCTGGCACATAGTAGGCCC-3^{l} (Forward)

3^{l}-CTACGGCCGACCGATCCTTC-5^{l} (Reverse)

Matriks metalloproteinaz-9 C1562T gen polimorfizmi için örnek başına kullanılan miktarlar;

2,5 µl 10 x PZR $MgCl_2$Tamponu (Buffer)

1,25 µl $MgCl_2$

0,3 µl Primer F

0,3 µl Primer R

0,5 µl dNTP

0,3 µl Taq DNA polimeraz

1,5 µl izole edilmiş DNA

18,35 µl dH_2O (Enjeksiyonluk Su)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Koşullar

Matriks metalloproteinaz-9 C1562T gen polimorfizmi için;

Başlangıç : 95ºC, 6 dakika
94ºC, 30 saniye
61,5ºC, 30 saniye 35 döngü (cycle)
72ºC, 1dakika

Bitiş : 72ºC, 7 dakika

Kesim Fragment Uzunluk Polimorfizmleri

DNA diziliminin kısa kısımlarını özelleştirilmiş şekilde tanıyan ve bu dizilimlere yakın kısımlardan ya da dizilimlerin içerisindeki özgül kısımlardan çift taraflı ve simetrik şekilde DNA'yı kesen enzimlere kesim (restriksiyon) enzimleri denir. Kesim enzimleri çoğunluklukla bakterilerde, nadiren de virus ve ökaryot canlılarda bulunur (62). DNA fragmanlarının büyüklüğüne göre kullanılacak kesim enzimi belirlenir. Restriksiyon işlemi sonucunda oluşan ürünlere kesim parçaları adı verilir. RFUP yöntemi kolay uygulanabilen, ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Bu yöntemde kesim enzimlerinin DNA'da bulunan kesim noktalarındaki farklılaşmalardan yararlanılır (58).

Matriks Metalloproteinaz-9 C1562T Gen Polimorfizmleri İçin Kesim Fragman Uzunluk Polimorfizmi Yöntemi

Örnek başına kullanılan miktarlar;

0,4 µl kesim enzimi (SphI(PAEI))

0,8 µl 10x Fast Digest RedBuffer

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünü

6 µl dH_2O (Enjeksiyonluk su)

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (Statistics Package of Social Science) v20 (Lisans No:10240642) istatistik programı ile yapılmıştır. Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi genotip dağılımları hipertansiyon, diyabetes mellitus, kalp hastalığı, geçirilmiş olan SVH, alkol kullanımı, sigara kullanımı bakımından karşılaştırılmıştır. Polimorfizm sonucu elde edilen genotip dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının kontrolü için ki-kare analiz yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

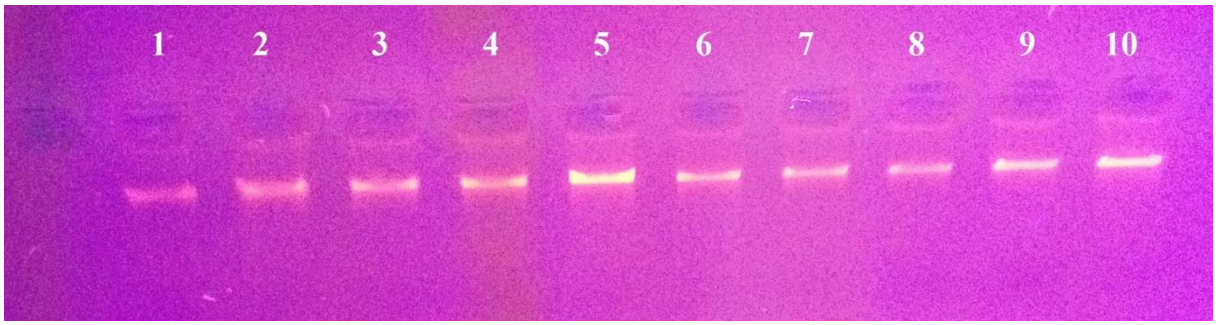
BULGULAR

Yapılmış olan tetkiklerin sonucunda iskemik inme tanısı almış olan hasta ile kontrol grupları aralarında yaş, diyabetes mellitus, hipertansiyon, sigara kullanımı, alkol kullanımı, kalp hastalıkları karşılaştırması yapılmıştır. Elde edilmiş olan sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Hasta ve kontrol grupları arasındaki bulguların karşılaştırılması

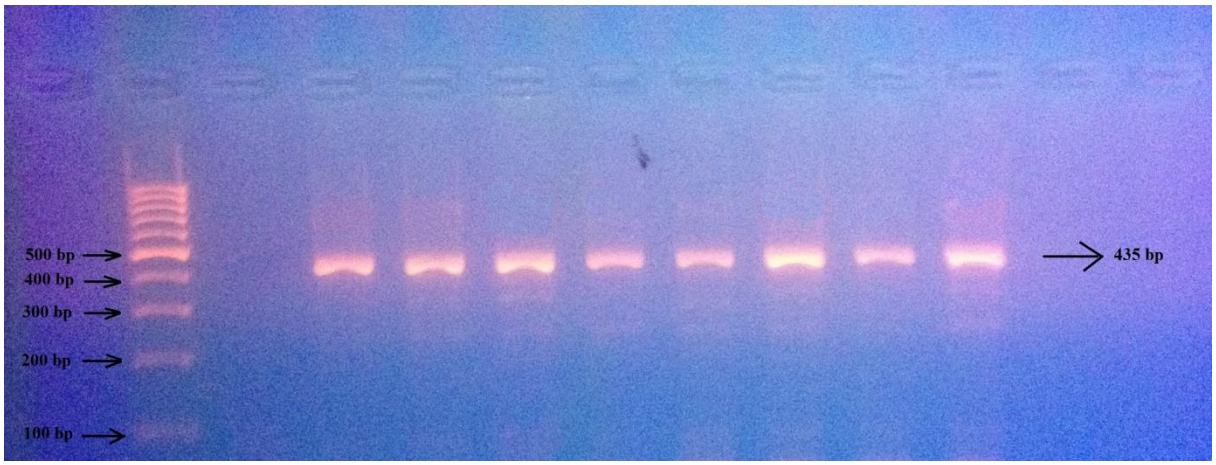
Bulgular	**Genel**		**p**
	Hasta Grubu (n=60)	**Kontrol Grubu (n=60)**	
Yaş	66,33 ± 13,226	59,90 ± 14,499	0, 01
Hipertansiyon	% 63,3	% 40,0	0, 01
Diyabetes Mellitus	% 21,7	% 25	0, 67
Geçirilmiş SVH	% 10	% 0	0, 01
Sigara	%41,7	%26,7	0, 08
Alkol	% 20,0	%21,7	0, 82
Kalp Hastalıkları	%25,0	% 0	0,00

Hasta grubu ve kontrol grubundan alınan kanlardan izole edilmiş olan DNA'lar % 0.8'lik agaroz jelde yürütülerek elde edilen bantların ultraviyole ışık altında gözlemlendi (Şekil 6).



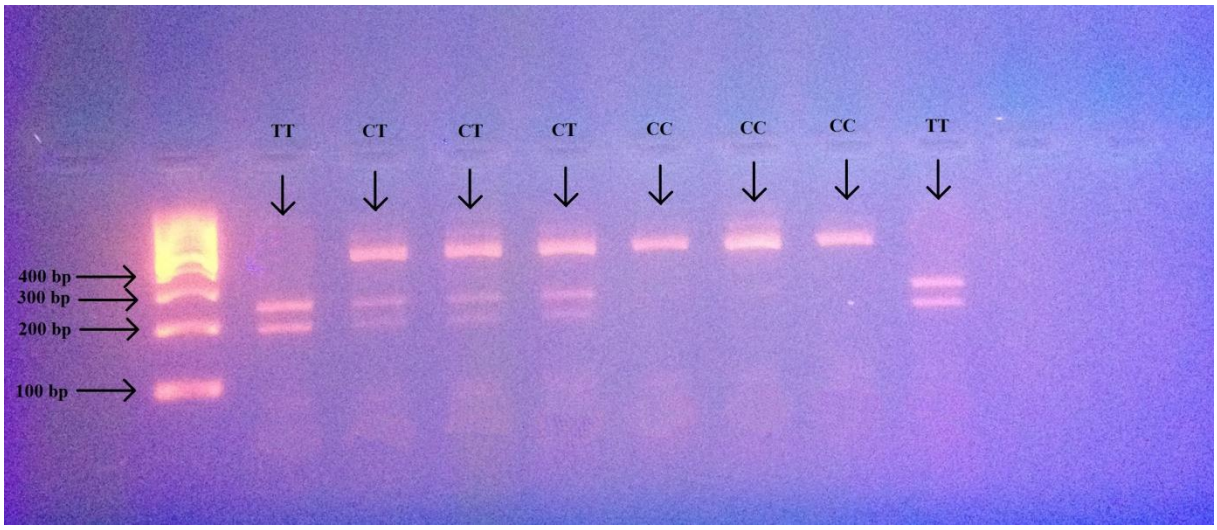
Şekil 6. Kan örneklerinden izole edilen DNA'ların % 0.8'lik agaroz jelde yürütülerek ultraviyole ışık altında görüntülenmesi

İzole edilmiş olan DNA'lar % 0.8'lik agaroz jelde gözlemlendikten sonra matriks metalloproteinaz -9 C-1562T gen polimorfizmi için özgün bölgelere ait primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütüldü. Yeterince yürütülen ürünler ultraviyole ışık alında incelendi (Şekil 7). Ürünlerin beklendiği gibi 435 bp aralığında olduğu gözlemlendi.



Şekil 7. Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi için hasta ve kontrol grupları için elde edilen PZR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde yürütülerek ultraviyole ışık altında görüntülenmesi

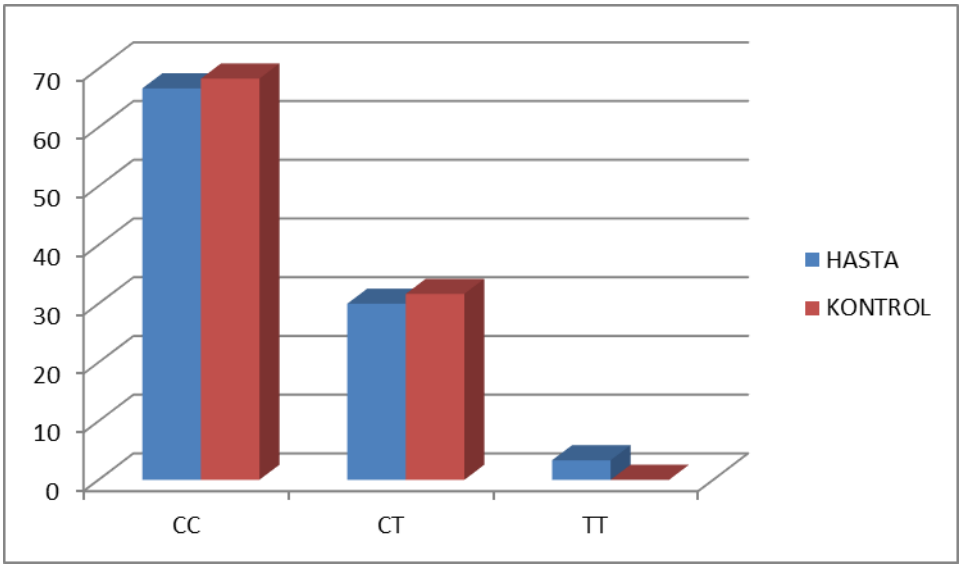
Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi sonucunda elde edilen PZR ürünleri ilgili bölgeye ait sphI kesim enzimi kullanılarak 37°C'de 1 saat süreyle bekletildi. 1 saat geçtikten sonra ürünler % 2.5'lik agaroz jelde yürütüldü ve ultraviyole ışık altında gözlemlenerek hasta ve kontrol grupları için polimorfizmler belirlendi (Şekil 8).



Şekil 8. Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi için kesim ürünlerinin % 2.5'lik agaroz jelde yürütülmesinin ardından ultraviyole ışık altında görüntülenmesi

MMP-9 C-1562T Gen Polimorfizmi İçin Genotip Dağılımları

Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi için genotip dağılımı incelendiğinde, hasta grubunda CC genotipinin görüldüğü 40 hasta (% 66,67), CT genotipinin görüldüğü 18 hasta (% 30) ve TT genotipinin görüldüğü 2 hasta (% 3,33) belirlenmiştir. Kontrol grubunda CC genotipinin görüldüğü 41 kişi (% 68,33), CT genotipinin görüldüğü 19 kişi (% 31,66) görülmüş ancak TT genotipi görülmemiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Hasta ve kontrol gruplarında MMP-9 C-1562T gen polimorfizmi sonucunda elde edilen CC, CT ve TT allelleri arasındaki ilişki

Allel frekanslarına bakıldığında hasta grubunda T alleli için 22 (% 18,33) bulunmuş, C alleli için 98 (% 81,67) bulunmuştur. Kontrol grubunda ise T alleli için 19 (% 15,83), C alleli için ise 101 (% 84,17) bulunmuştur. İskemik inmeli hasta grubu ve kontrol grubundan alınan kan örneklerinin matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi işlemi sonucunda CC, CT ve TT genotipleri karşılaştırıldığında önemli bir farklılık görülememiştir. İstatistiksel olarak değerlendiriğinde de hasta ve kontrol grupları arasında matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi genotipleri bakımından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (p:0,26) (Tablo 3).

Tablo 3. Her iki grupta MMP-9 C-1562T gen polimorfizmleri genotip dağılımları

MMP-9 C-1562T	**GRUPLAR**		**p**
GENOTİPLER / ALLEL FREKANSLARI	**HASTA**	**KONTROL**	
CC	40 (% 66,67)	41 (%68,33)	0,26
CT	18 (% 30,0)	19 (%31,66)	
TT	2 (% 3,33	0 (% 0,00)	
C ALLEL FREKANSI	98 (%81,67)	101 (% 84,17)	
T ALLEL FREKANSI	22 (% 18,33)	19 (% 15,83)	

T: Timin, **C:** Citozin, **CC:** Citozin-Citozin **, TT:** Timin-Timin, **CT:** Citozin-Timin.

TARTIŞMA

İskemik inme beyin damarlarındaki kan akışının bozulması sonucu ortaya çıkan kalıcı olarak ya da uzun süre sakatlığa yol açan bazen de ölümle sonuçlanan bir hastalıktır (2). İskemi oluşması sırasında vücutta endotel hücreler ve sinir hücreleri gibi birçok hücrenin aktif olduğu bilinmektedir (9). İskemik inme, kalıtıma ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişen özelliktedir (63).

İnmeyi etkileyen genlerde yapılan birçok çalışmada gen polimorfizminin de etkin olduğu ortaya atılmış ancak yapılan çalışmalar genel bir kanı vermemiştir. 2009 yılında Firdevs Kuderli ve arkadaşlarının yapmış olduğu "Plazminojen aktivatör inhibitör-1 4G/5G gen polimorfizminin iskemik inme riski üzerine etkisi" adlı çalışmada iskemik inme ile Plazminojen aktivatör inhibitör-1 4G/5G gen polimorfizminin ilişkili olmadığını gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde 2007 yılında Amy R. Tso ve arkadaşlarının yaptığı "Interleukin-6 −174G/C Polymorphism and Ischemic Stroke" adlı çalışmasında da iskemik inme ile interlökin-6 -174G/C polimorfizminin ilişkili olmadığını gözlemlemişlerdir. Polimorfizm, yaşanılan yer, ırk ve etnik köken gibi farklılıklara göre değişen bir durumdur. Örneğin 2014 yılında Çinli 396 iskemik inme hastası ile yapılmış olan çalışmada TT genotipi ve T alelinin sıklığının MMP-9 -1562 C/T gen polimorfizminde önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (64). Ancak 2010 yılında Polonyalı 418 iskemik inme hastası ile yapılmış olan çalışmada CC, CT ve TT genotiplerinde ya da C ve T alellerinde sağlıklı kişilere göre önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir (51).

Matriks metalloproteinaz C1562T gen polimorfizmi, gen promoterinde 1562. nükleotit olan sitozinin timin ile yerlerini değiştirmesi sonucu olur (53). Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi geçmişte bir çok hastalık üzerinde incelenmiştir. El-Aziz ve ark.

tarafından, 184 Mısırlı akut miyokardiyal enfarktüs hastası ve 180 kontrol grubu ile yapılan çalışmada, MMP-9 C1562T gen polimorfizminde TT genotipinin önemli ölçüde farklılaştığını gözlemlemiştir (65). Zohreh Rahimi ve ark. tarafından, 125 Batı İranlı Multipl Skleroz (MS) hastası ve 235 kontrol grubu ile yapılan çalışmada, MMP-9 C-1562T polimorfizminde T alelinin sıklığında farklılık gözlemleyememişlerdir (66). Banday ve ark. tarafından 142 etnik kaşmiri popülasyonundan ve kolorektal kanser hastası ile 184 kontrol grubunun bulunduğu çalışmada, MMP-9 C-1562T polimorfizminde heterozigot genotipinin (CT) kolorektal kanser ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu saptamışlardır (67). Juan Z. ve ark. tarafından yapılan meta analizde 3952 Asyalı miyokardiyal enfarktüs hastası ve 4977 kontrol grubu dahil edilmiştir. Matriks metalloproteinaz-9 C1562T polimorfizmleri sonucunda T aleli (TC + TT genotipi) taşıyan kişilerin miyokardiyal enfarktüse olan yatkınlığının önemli ölçüde fazla olduğu sonucuna varılmıştır (68). Yine Çin'de yapılan 150 obstrüktif uyku apnesi hastası ve 225 kontrol grubu içeren çalışmada Chao Cao ve ark. Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T polimorfizmi ile obstrüktif uyku apnesi arasında ilişki olduğunu saptamıştır (69). Zohreh Rahimi ve ark. tarafından, 101 meme kanseri olan kürt kökenli Batı İran'lı hasta ve 104 kontrol grubu ile yapılan çalışmada, Matriks metalloproteinaz-9 C1562T polimorfizminin meme kanserinin gelişiminde işe yarar biyobelirteç olabileceğini belirtmişlerdir (70). Li-Li Xing ve ark. Çinli 137 kolorektal kanser hastasından oluşan hasta grubu ve 199 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubu ile yapmış olduğu çalışmada matriks metalloproteinaz-9 C-1562T polimorfizminin kolorektal kanser hastalarının lenfatik metastaz riskinde etkin olduğu sonucuna varmışlardır (71). Ziba Rahimi ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada ise İran'ın batısında yaşayan 168 preeklampsi (gebelik zehirlenmesi) hastası ve 154 sağlıklı gebe kadından oluşan kontrol grubu ile yapmış olduğu çalışma sonucunda matriks metalloproteinaz-9 C-1562T polimorfizminin preeklampside etkin olduğunu belirtmişlerdir (72).

Yaşları yüksek olan kişilerin iskemik inmeye yatkın olduğu bilinmektedir. Geçici iskemik ataklarda ve hemorajik inmede sistolik ve diyastolik kan basıncının yüksek olduğu görülmüştür. Hemorajik ve kardiyoembolik tiplere nazaran küçük damar hastalığında homosistein düzeylerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Hemorajik inmede trigliserid düzeyi kardiyoembolik inmeye göre daha düşüktür. Kardiyoembolik inmede yaş faktörünün ve kolestrol düzeylerinin diğer tip inmelere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (73).

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi NörolojiAnabilim Dalı'na başvuran ve yapılan kontroller sonucunda iskemik inme tanısı konmuş 60 iskemik inmeli hastadan oluşan

hasta grubu ile 60 nörolojik hastalığı saptanmayan kontrol grubundan oluşmaktadır. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmleri incelendi. İskemik inme teşhisi konmuş olan hastalar ile kontrol grubu arasında cinsiyet, yaş, hipertansiyon, sigara kullanımı, alkol kullanımı, kalp hastalıkları bulguları karşılaştırılmıştır.

Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi için genotip dağılımları incelendiğinde; iskemik inmeli hasta grubunda TT genotipinin görüldüğü 2 hasta (% 3,33), CT genotipinin görüldüğü 18 hasta (% 30) ve CC genotipinin görüldüğü 40 hasta (% 66,67) bulundu. Kontrol grubunda iseCT genotipinin görüldüğü 14 kişi (% 35) ve CC genotipinin görüldüğü 26 kişi (%65) bulunmuş fakat TT genotipi görülememiştir (% 0). Allel frekansları için hasta grubunda T alleli için 22 (% 18,33) bulunmuş, C alleli için 98 (% 81,67) bulunmuştur. Kontrol grubunda ise T alleli için 19 (% 15,83), C alleli için ise 101 (% 84,17) bulunmuştur. İskemik inmeli hasta grubu ve kontrol grubundan alınan kan örneklerinin matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi işlemi sonucunda CC, CT ve TT genotipleri karşılaştırıldığında önemli bir farklılık gözlemlenememiştir. İstatistiksel olarak değerlendiriğinde de hasta ve kontrol grupları arasında matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi genotipleri bakımından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (p:0,265)

Hasta alt gruplarının MMP-9 C-1562T gen polimorfizmi genotip dağılımları ile karşılaştırılmasında genel olarak kadınlarda ve erkeklerde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$)

Hasta ve kontrol grupları için klinik bulgular ile C-1562T gen polimorfizmlerinin karşılaştırılmasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Her ne kadar Kinga Buraczynska ve ark. (52) Polonya'lı kişiler ile gerçekleştirdikleri çalışmada C-1562T gen polimorfizminin iskemik inme hastalığı için genetik bir risk faktörü olduğunu saptamış olsa da yapmış olduğumuz çalışmada bu polimorfizmin iskemik inme hastalarında genetik risk faktörü olmadığı görülmüştür. Bu çalışmalardaki çeşitliliklerin etnik köken, çevresel faktörler ya da hasta ve kontrol grupları için daha farklı kriterlerin olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

SONUÇLAR

Yapmış olduğumuz çalışmada Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran, yapılan tetkikler sonucunda iskemik tanısı almış 60 kişiden oluşan hasta grubu ile Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi polikliniklerinden yada diğer servislere başvuran, yapılan tetkik ve kontroller sonucunda herhangi bir sinirsel hastalığı saptanmayan 60 kişiden oluşan kontrol grubu için matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmleri incelendi.

Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi için genotip dağılımları incelendiğinde; hasta ve kontrol grubu arasında MMP-9 C-1562T polimorfizmi genotip dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Hasta alt gruplarında matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi genotip dağılımları ile karşılaştırılmasında genel olarak erkek ve kadınlarda anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0,05$).

Hasta ve kontrol grupları için klinik bulgular açısından MMP-9 C-1562T gen polimorfizmi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Literatürde birçok çalışmada MMP-9 C-1562T gen polimorfizminin iskemik inme ile ilişkisi olduğu saptanmış ise de, yapmış olduğumuz çalışmamız ile birlikte MMP-9 C-1562T gen polimorfizminin iskemik inme ile ilişkisi olmadığı sonucuna varılan çalışmalarda vardır. Sonuçların farklı çıkmasının sebebi; etnik köken farklılıkları, farklı yerlerde yaşayan veya aynı bölgenin farklı yerleşim bölgelerinde yaşayan kişiler veya çalışmalar için seçilen hasta ve kontrol grubu popülasyonunun seçim kriterlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İleride yapılacak olan çalışmalarda hasta ve kontrol grubu sayısının arttırılmasıyla daha iyi sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir. Farklı yerlerde yaşayan

kişiler ya da farklı etnik kökeni olan kişilerle veya farklı genlerin eklenmesi ile bu genlerde meydana gelen gen polimorfizmleri açısından değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Eğer iskemik inmenin gelişiminde etkili olan genler bilinirse, iskemik inme için erken tanı ya da iskemik inme geçirmiş kişiler için yeni ilaçlar geliştirilebilecektir.

ÖZET

Büyük bir sağlık sorunu olarak ortaya çıkan inme, morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. İnme oranının yüksekliği hipertansiyon, hiperlipidemi, diabetes mellitus, iskemik kalp hastalığı, atriyal fibrilasyon ve sigara gibi bilinen risk faktörlerine bağlıdır. İskemik inme beyine kan getiren damardaki tıkanma sonucu ortaya çıkar. Epidemiyolojik araştırmalardan elde edilen güçlü kanıtlar, iskemik inmenin patogenezindeki genetik etkileri ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamızın amacı matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizminin iskemik inme hastalığı için genetik risk faktörü olma ihtimalini araştırmaktır.

Çalışmamızda hasta grubu olarak 60 iskemik inmeli hasta ve kontrol grubu olarak 60 nörolojik hastalığı olmayan kişi bulunmaktadır. Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi, polimeraz zincir reaksiyonu ve ardından restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi yöntemleri yardımıyla belirlenmiştir.

Çalışmamız sonucunda matriks metalloproteinaz-9 C-1652T gen polimorfizminin iskemik inme hastalığı için genetik risk faktörü olmadığı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: MMP-9 C-1562T, matriks metalloproteinaz-9, iskemik inme, gen polimorfizmi.

INVESTIGATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 C-1562T GENE POLYMORPHISM IN ISCHEMIC STROKE PATIENTS

SUMMARY

Stroke, which has emerged as a major health problem, is an important cause of morbidity and mortality. A high proportion of strokes has an ischemic nature for which well-known risk factors as hypertension, hyperlipidemia, diabetes mellitus, ischemic heart disease, atrial fibrillation and smoking. Ischemic strokes occur as a result of an obstruction within a blood vessel supplying blood to the brain. Strong evidence from epidemiological studies has implicated genetic influences in the pathogenesis of ischemic stroke.

The aim of our study is to investigate the possibility of genetic risk factor of the matrix metalloproteinase-9 C-1562T gene polymorphism in ischemic stroke disease.

Our study include 60 patients with ischemic stroke for patient group and 60 subjects without neurological disease for control group. The matrix metalloproteinase-9 C-1562T gene polymorphism were identified using polymerase chain reaction and subsequent to restriction fragment length polymorphism methods.

Consequence of our study, we found that matrix metalloproteinase-9 C-1562T gene polymorphism isn't a genetic risk factor in ischemic disease.

Key Words: MMP-9 C-1562T, matrix metalloproteinase-9, ischemic stroke, gene polymorphism.

KAYNAKLAR

1. Bozkurt M. Serebrovasküler Hastalıklarda Metabolik Sendrom (tez). İstanbul: İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi;2008.

2. Kuserli F. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 4G/5G Gen Polimorfizminin İskemik İnmeRiski Üzerine Etkisi (tez). Ankara: Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi;2009.

3. Yıldırım B. Akut Serebrovasküler Hastalıklar ve Tiroid Fonksiyon Bozuklukları İlişkisi(tez). İstanbul: Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi;2008.

4. Küçükarabacı B. Akut Strok ile Plazminojen Aktivatör İnhibitör Tip-1 (PAI-1) Geni4G/5G Polimorfizmi ve PAI-1 Enzim Aktivitesi Arasındaki İlişkinin Araştırılması (tez).Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi;2007.

5. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. J Cell Mol Med 2005;9:267-85.

6. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host enzymes in gingival crevice fluid. Periodontology 2003;31:77–104.

7. Yıldırım M. Resimli Sistematik Anatomi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi;2013.

8. Yıldırım M. Resimli İnsan Anatomisi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi-2015.

9. Şahan M. İskemik İnme ile Acil Servise Başvuran Hastalarda Akut Faz Reaktanları veSitokin Düzeyleri ile Kısa Dönem Mortalite Arasındaki İlişki (tez). Adana: ÇukurovaÜniversitesi Tıp Fakültesi;2009.

10. Paulo W. Pires, Carla M. Dams Ramos, Nusrat Matin, Anne M. Dorrance. The effects of hypertension on the cerebral circulation. Am J Physiol 2013; vol.304 no.12: 1598-614

11. Kumral K, Kumral E. Santral Sinir Sisteminin Damarsal Hastalıkları, Inme Epidemiyolojisi ve Risk Faktorleri. Ege Universitesi Tip Fakultesi Yayinlari 1993;72:9-10.

12. Smith WS, English JD, Johnston SC. Cerebrovascular diseases. In: Facuci AS, Braunwald E, Kasper DL, editors. Harrison's Principle of Internal Medicine. 17th ed. USA: McGraw Hill; 2008. pp. 2513–6.

13. Aşık Ö. Akut İskemik Serebrovasküler Hastalık ve Geçici İskemik Atağın Tanısında ve Hastalıkların Şiddetinde Kan Hemogram Parametrelerinin Önemi (tez). İzmir Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2016.

14. Mozaffarian D, Benjamin EJ. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation 2016;133(4):38-60.

15. Deb P, Sharma S, Hassan KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. Pathophysiology 2010;17(3):197-218.

16. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A et al. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke. 2013;44(7):2064-89.

17. David F, Todd Mc G, Edward J. Timely Prehospital Management of Stroke Victims Crucial for Patient Outcome; 2015.

18. Derle Çiftçi E. Vasküler Risk Faktörleri Bulunan Asemptomatik ve Semptomatik Hastalarda Aspirin Direnci ve Trombosit Glikoprotein IIIA Gen Polimorfizminin Rolü(tez). Ankara: Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi;2007.

19. Garcia J H, Yoshida Y, Li Y, Zhang Z G, Lian J, Chen S, Chopp M. Progression from İschemic İnjury to İnfact following middle cerebral artery occlusive in the rot. Am J Pathol 1993;142:623-635.

20. Heiss WD. Experimental evidence of ischemic thresholds and functional recovery. Stroke 1992;23:1668-72.

21. Abe O, Aoki S, Shirouzu I, Kunimatsu A, Hayashi N, Masumoto T et al. MR imaging of ischemic penumbra. Euro J Radiol 2003;46:67-78.

22. Lee SH, Rao KCVG, Zimmermann RA: Cranial MRI and CT, Fourth Edition, USA, McGraw-Hill 1999, 557-99.

23. Lownie S, Barnett HJM, Mohrr JP, Stein BM, YasuFM Cerebral Angiography In Stroke Pathophysiology, Diagnosis and Management, 2ed. New York Churcill Livingstone; 1992: 215-40.

24. Hallenbeck JM, Dutka AJ. Background review and current concepts of reperfusion injury. Arch Neurol J 1990;47:1245-54.

25. Osborn AG. Diagnostic Neuroradiology. St Louis: Mosby-Yearbook, 1994;98-330.

26. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL et al. 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke 1993;24(1):35-41.

27. Chen PH, Gao S, Wang YJ, Xu AD, Li YS, Wang D. Classifying Ischemic Stroke, from TOAST to CISS. CNS Neurosci Therapeut 2012;18(6):452-6.

28. Ihle-Hansen H, Thommessen B, Wyller TB, Engedal K, Fure B. Risk factors for and incidence of subtypes of ischemic stroke. Functional Neurol J 2012; 27(1):35-40.

29. Gohji K, Fujimoto N, Komiyama T, Fujii A, Ohkawa J, Kamidono S et al. Elevation of serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -3 as new predictors of recurrence in patients with urothelial carcinoma. Cancer 1996;78(11):2379-87.

30. Hidalgo M. and Eckhardt S.G. Development of matrix metalloproteinaseinhibitors in cancer therapy. J National Cancer Isttitute 2001;93(3):178–93.

31. Reel, B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 2006;26: 527-537.

32. Bourboulia, D. and Stetler-Stevenson, W.G. Matrix metalloproteinases (MMPs)and Tissue Inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators intumor cell adhesion. Seminars Cancer Biol 2010;20(3):161–8.

33. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connectivetissue remodeling. FASEB J 1991;5:2145–54.

34. Öztürk ÖG. Matriks Metalloproteinaz Enzim Ailesi. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 2013;22 (2):209-20.

35. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. Circulation Res 2003;92:827–39.

36. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly. Circulation Res 2002;90:251–62.

37. Naoto K, Mitsuyoshi T, Hideaki K, Ikki S, Keizo O, Fukashi I et al. Accumulation of gene polymorphisms related to plaque disruption and thrombosis is associated with cerebral infarction in subjects with type 2 diabetes. Diabetes Care 2010;33(2):390–5.

38. Siefert SA, Sarkar R. Matrix metalloproteinases invascular physiology and diseases. Vascular 2012;20(4): 210–216.

39. Qishan C, Min J, Feng Y, Jianhua Z, Qingzhong X, Li Z. Matrix metalloproteinases: ınflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. Mediators Inflammation 2013; 2013:1-14.

40. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expressionincreases after cerebral focal ischemia in rats: Inhibition ofmatrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. Stroke 1998;29:1020–30.

41. Fatar M, Stroick M, Griebe M, Hennerici N. Matrixmetalloproteinases in cerebrovascular diseases. Cerebrovasc Dis 2005;20:141–51.

42. Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverseroles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors ofmetalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. Neurosci 2009;158:983–94.

43. Kurzepa J, Kurzepa J, Golab P, Czerska S, Bielewicz J. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2and MMP-9 in the ischemic stroke. Int J Neuroscience 2014:124(10):707–16.

44. Cojocaru IM, Cojocaru M, Sapira V, Socoliuc G, Hertea C, Paveliu S. Changes in plasma matrix metalloproteinase-9 levels in patients with acute ischemic stroke. Romanian J Internal Med 2012;50:155-8.

45. Demir R, Ulvi H, Ozel L, Ozdemir G, Guzelcik M, Aygul R. Relationship between plasma metalloproteinase-9 levelsand volume and severity of infarct in patients with acuteischemic stroke. Acta Neurologica Belgica 2012;112: 351–6.

46. Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. Human Genet 1999;105(5); 418–23.

47. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A et al. Functional polymorphism in the regulatoryregion of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. Circulation 1999;99(14):1788–94.

48. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G et al. Plasma concentrations and geneticvariation of matrix metalloproteinase-9 and prognosis of patientswith cardiovascular disease. Circulation 2003;107(12):1579–85.

49. Medley TL, Cole TJ, Dart AM, Gatzka CD, Kinmgwell BA. Matrix metalloproteinase-9 genotype influenceslarge artery stiffness through effects on aortic gene and proteinexpression. Arteriosc Thrombosis Vasc Biol 2004;24:1479–84.

50. Kaplan RC, Smith NL, Zucker S, Heckbert SR, Rice K, Psaty BM. Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) andMMP-9 genes and risk of myocardial infarction, ischemic stroke,and hemorrhagic stroke. Atherosclerosis 2008;201:130–7.

51. Szczudlik P, Borratynska A. Association between the -1562 C/T MMP-9 polymorphism and cerebrovascular disease ina Polish population. Neurologia Neurochirurgia Polska 2010; 44:350–7.

52. Kinga B, Jacek K, Andrzej K, Monika B, Konrad Re. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Gene Polymorphismin Stroke Patients. Neuromol Med 2015; 17: 385–90.

53. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases Matrix Biol 2000;19(7):623-9.

54. Chunyuan Yu, Kaifeng Pan, Deyin Xing, Gang Liang, Wen Tan, Lian Zhang et al. Correlation Between A Single Nucleotide Polymorphism in The Matrix Metalloproteınase-2 Promoter And Risk Of Lung Cancer. Cancer Res 2002;62:6430-3.

55. Xu E. Lai M, Lv B, Xing X, Huang Q, Xia X. A Single Nucleotide Polymorphism inThe Matrix Metalloproteınase-2 Promoter is Associated With Colorectal Cancer. Biochemical And Biophysical Research Communications 2004;324(3):999-1003

56. Zhang XM, Miao XP, Xiong P, Yu CY, Tan W, Qu SN, et al. Association Of FunctionalPolymorphisms in Matrix Metalloproteinase-2 And MMP-9 Genes With RiskOf Gastric Cancer in A Chinese Population. Ai Zheng 2004;23(11):1233-7.

57. Zhou Y, Yu C, Miao X, Wang Y, Tan W, Sun T, et al. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 and lung cancer susceptibility. Carcinogenesis 2005; 26(6): 1117-21.

58. Oral B. Laktik Asit Bakterilerinde Tür İçi ve Türler Arası Ayrımda 16S-Ardra Tekniğinin Değerlendirilmesi (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi;2010.

59. Akçay F. İnsan Serum Paraoksonaz Enzimi (Pon 1) 192 Gln-Arg Gen PolimorfizmininBelirlenmesi (tez). Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi;2006.

60. Maddalena Querci, Marco Jermini, Guy Van den Eede. Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri Kurs Elkitabı Bölüm 6; Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR). JRJ European Commission 2006 (Çeviri 2010);9-10.

61. https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/ invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations/jcr:content/MainParsys/image_c912/foregroundimg.img.320. medium.jpg/1498953629356.jpg. Erişim tarihi: 21 Temmuz 2017.

62. Alkanlı N. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim ve Anjiyotensin II Tip 1 Reseptör GenPolimorfizmlerinin Türk Kadınlarında Görülen Preeklampsi İle İlişkisi (tez). Edirne:Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi;2007.

63. Öztürk Ş. Serebrovasküler hastalık epidemiyolojisi ve risk faktörleri: Dünya ve Türkiye perspektifi. Turkish Journal of Geriatris 2009;13(1):51-58.

64. Nie SW, Wang SF, Tang ZC. Correlations between MMP-2/MMP-9 promoter polymorphisms and ischemic stroke. Int J Clin Experimental Med 2014;7:400–4.

65. Tarek A, Abd El-Aziz, Rasha H Mohamed. Matrix metalloproteinase-9 polymorphism and outcome after acute myocardial infarction. Int J Cardiol 2017;227:524-8.

66. Zohreh R, Zahra A, Ziba R, Nazanin R, Hadis S, Asad VR et al. Functional promoter polymorphisms of MMP-2 C-735T and MMP-9 C-1562T and their synergism with MMP-7 A-181G in multiple sclerosis. J Mol Cell Immunol 2016;45:543-52.

67. Banday MZ, Sameer AS, Mir AH, Mokhdomi TA, Chowdri NA, Haq E. Matrix metalloproteinase (MMP) -2, -7 and -9 promoter polymorphisms in colorectal cancer in

ethnic Kashmiri population - A case-control study and a mini review. Gene 2016;589:81-9.

68. Zhang J, Zhang WG, Song HL, Wan DG. Association of matrix metalloproteinase 9 C-1562T polymorphism with genetic susceptibility to myocardial infarction: a meta-analysis. Clin Exper J 2015;77:40-5.

69. Chao C, Bin W, Yanping W, Yiming Y, Hongying M, Shifang S et al. Functional polymorphisms in the promoter region of MMP-2 and MMP-9 and susceptibility to obstructive sleep apnea. Scientific Rep 2015;5 doi: 10.1038/srep08966 .

70. Zohreh R, Kheirolah Y, Ziba R. Matrix metalloproteinase-9 -1562T Allele and its combination with MMP-2 -735 C allele are risk factors for breast cancer. Asian Pacific J Cancer Prev 2015;16: 1175-1179.

71. Xing LL, Wang ZN, Jiang L, Zhang Y, Xu YY, Juan L et al. Matrix metalloproteinase-9-1562C>T polymorphism may increase the risk of lymphatic metastasis of colorectal cancer. World J Gastroenterol 2007;13(34):4626–9.

72. Ziba R, Leila K, Shohreh MK, Farid N, Zohreh R. Matrix metalloproteinase-7 A-181G and its interaction with matrix metalloproteinase-9 C-1562T polymorphism in preeclamptic patients: association with malondialdehyde level and severe preeclampsia. Arch Gynecol Obstetrics 2015;291:45-51

73. Dikmen M. Homosistein metabolizması ve hastalıklarla ilişkisi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004;24:645-52.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER **Sayfa**

Şekil 1. Arkus aorta ve dalları 4
Şekil 2. Otoregülasyon Şeması 5
Şekil 3. İskemik İnme 7
Şekil 4. MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre kategorilendirilmesi 15
Şekil 5. Polimeraz zincir reaksiyon döngüsü 24
Şekil 6. Kan örneklerinden izole edilen DNA'ların % 0.8'lik agaroz jelde yürütülerek ultraviyole ışık altında görüntülenmesi 28
Şekil 7. Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi için hasta ve kontrol grupları için elde edilen PZR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde yürütülerek ultraviyole ışık altında görüntülenmesi 28
Şekil 8. Matriks metalloproteinaz-9 C-1562T gen polimorfizmi için kesim ürünlerinin % 2.5'lik agaroz jelde yürütülmesinin ardından ultraviyole ışık altında görüntülenmesi. 29
Şekil 9. Hasta ve kontrol gruplarında MMP-9 C-1562T gen polimorfizmi sonucunda elde edilen CC, CT ve TT allelleri arasındaki ilişki 29

TABLOLAR

Tablo 1. Matriks Metalloproteinaz-9 C1562T gen polimorfizmleri kesim sonuçları 21
Tablo 2. Hasta ve kontrol grupları arasındaki bulguların karşılarştırılması 27
Tablo 3. Her iki grupta MMP-9 C-1562T gen polimorfizmleri genotip dağılımları 30

ÖZGEÇMİŞ

Ad:	**İsmail**
Soyad:	**Kara**
Doğum Yeri:	**Edirne**
Doğum Tarihi:	**17/06/1987**
Görev Yeri:	**Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik A.D.**
Yabancı Dil:	**İngilizce**
E-Posta Adresi	**ismailkara3@trakya.edu.tr**
Tarih	**Eğitim**
25/02/2014	**Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümü**
Varsa, İyi Klinik Uygulamalar Kapsamında Aldığı Eğitimler.	
Akademik Ünvanları	
İş Tecrübesi	
2011 - 2017	**Ceza İnfaz Kurumu Katipi**
2017 - halen	**Bilgisayar İşletmeni**
Varsa, Araştırmacı Olarak Katıldığı Klinik Araştırmalar	
Varsa, Monitör/İzleyici Olarak Katıldığı Klinik Araştırmalar	
Varsa, Saha Görevlisi Olarak Katıldığı Klinik Araştırmalar	

EKLER

Ek 1

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2016/176	
	PROTOKOL ADI	İskemik İnmeli Hastalarda Matriks Metalloproteinaz-9 C-1562 T Gen Polimorfizminin Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Tammam SİPAHİ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 13/20**	**Tarih:20.07.2016**	
	Fakültemiz Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Tammam SİPAHİ'nin sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi İsmail KARA'nın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin, gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oybirliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E☐ H☐	E☐ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E☐ H☐	E☐ H☐	
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	E	E☐ H☐	E☐ H☐	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E☐ H☐	E☐ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	
Prof. Dr. Selma Arzu VARDAR Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	E☐ H☐	E☐ H☐	
Doç. Dr. Salim DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Vedat UĞUREL Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E☐ H☐	E☐ H☐	
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E☐ H☐	E☐ H☐	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	
Prof. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	E☐ H☐	E☐ H☐	
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E☐ H☐	E☐ H☐	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU
Dekan a.
Dekan Yrd.