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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

İSKEMİK İNMELİ HASTALARDA OSTEOPROTEGERİN (OPG) T245G (rs 3134069) GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Bahattin Erol KOÇAK

Referans no: 10244294

EDİRNE – 2019

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

İSKEMİK İNMELİ HASTALARDA OSTEOPROTEGERİN (OPG) T245G (rs 3134069) GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Bahattin Erol KOÇAK

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2018/229

Tez No:

EDİRNE – 2019

T.C

TRAKYA ÜNİVERSİTSİ

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 Bahattin Erol KOÇAK tarafından tez başlığı "İskemik İnmeli Hastalarda Osteoprotegerin (OPG) T245G (rs 3134069) Gen Polimorfizminin Araştırılması" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 29/03/2019 yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

JÜRİ BAŞKANI

İmza

Prof. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR

ÜYE

İmza

Doç. Dr. Oya ORUN

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Biyofizik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimi, deneyimiyle bana destek veren ve yönlendiren tez danışman hocam sayın Prof. Dr. Tammam SİPAHİ'ye başta olmak üzere; eğitimimde emeği geçen sayın Prof. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR'a, Araş. Gör. Dr. Arzu AY'a, Biyofizik AD çalışanlarına, Nöroloji Bölümü çalışanlarına; çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (TÜBAP), bu dönemde bana manevi desteklerinden dolayı anneanneme, dedeme ve aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

SEREBRAL DOLAŞIM 3

SEREBRAL KAN AKIMI VE METABOLİZMA 5

SEREBROVASKÜLER HASTALIKLARIN EPİDEMİYOLOJİSİ 7

SEREBROVASKÜLER HASTALIKLARIN SINIFLANDIRILMASI 8

İSKEMİK İNME 12

İSKEMİK İNMEDE RİSK FAKTÖRLERİ 13

İSKEMİK İNMENİN KALITIMLA İLİŞKİSİ 18

OSTEOPROTEGERİN 18

GEREÇ VE YÖNTEMLER 27

BULGULAR 36

TARTIŞMA 41

SONUÇLAR 44

ÖZET 46

SUMMARY 47

KAYNAKLAR 48

ŞEKİLLER LİSTESİ 59

ÖZGEÇMİŞ 61

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

A. : Arter
Bç : Baz çifti
DNA : Deoksiribonükleik Asit
G : Guanin
GİA : Geçici İskemik Atak
HDL : High Density Lipoprotein
KBB : Kan Beyin Bariyeri
LDL : Low Density Lipoprotein
OPG : Osteoprotegerin
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RANK : Nükleer Faktör NF-kB'nin Reseptör Aktivatörü
RANKL : Nükleer Faktör NF-kB Ligandının Reseptör Aktivatörü
RFUP : Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
T : Timin
UV : Ultraviyole

GİRİŞ VE AMAÇ

İnme, beyne giden kanın herhangi bir nedenle kesintiye uğraması sonucu gelişen bir hastalıktır (1). Dünya Sağlık Örgütü tarafından inme “24 saat veya daha fazla süren ölümle sonuçlanan, vasküler kaynak dışında belirgin bir neden olmaksızın beyin fonksiyonunun fokal veya global olarak etkilenmesi” şeklinde ifade edilir (2).

İnme, toplumda sosyoekonomik yönden önemi giderek artan bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütüne göre, inme, tüm dünyada 1990 yıllarında en önemli ölüm sebeplerinden 2. sırada gelmektedir (3).

Serebrovasküler hastalıkların yaklaşık %80’i iskemik, %20’si hemorajik sebeplere bağlı olarak gerçekleşmektedir (4).

İskemik inme, fokal serebral, spinal veya retinal infarkt sonucu gelişen nörolojik fonksiyon bozukluğu vakasıdır. (5). İskemik inme ülkemizdeki tüm inme vakalarının yaklaşık % 72’sini oluşturmaktadır. Batı ve Amerikan toplumlarında ise tüm inme bulgularının yaklaşık % 80’ini oluşturur (6).

İskemik inmede vasküler kalsifikasyon ve vasküler inflamasyon önemli risk faktörlerinden olduğu belirtilmiştir (7). Osteoprotegerin (OPG) serum konsantrasyonları ile bilinen vasküler risk faktörleri arasında birçok ilişki belirlenmiştir (8).

OPG, TNF (tümör nekroz faktör) bağımlı ailenin bir üyesi, NF-κB ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü ve NF-κB (RANK) reseptör aktivatörüdür (9).

Aterosklerotik (fibrotik) kalsifikasyon konusundaki bazı epidemiyolojik bilgiler, çelişkili sonuçlar göstermektedir. Bu bilgiler, inme ile ya hiç ilişki olmadığını (aorta'nın kalsifikasyonu), veya invers (plak ekolusensi) ya da pozitif ilişki olduğunu (koroner kalsiyum durumu) gösterir. Kronik ve ileri derece renal hastalıklarda ve diyabetik mildiyöde; mediyal kalsifikasyon ve vasküler kalsiflaksis ile birlikte artan vasküler kalsifikasyon sebebiyle OPG serum düzeyleri anlamlı bir şekilde artmaktadır (10).

OPG, OPG/RANK/RANKL ekseni vasküler enflamasyon için güvenilir bir belirteçtir. Ayrıca fibrinojen, yüksek duyarlıklı C-reaktif proteini, beyaz kan hücresi sayımı ve çözünebilen adezyon molekülleri için de kullanılabilir (11).

İskemik inme tüm dünyada mortalite ve morbidite açısından çok ciddi bir sağlık problemidir. İnmenin erken tanısının koyulması ve tedavisinin başlanması inme geçirme riski olan hastalarda inmeyi önleyebilmek açısından önemlidir (12).

Bu çalışmanın amacı; İskemik inme tanısı almış hastalar arasından seçilen hasta grubunda OPG T245G gen polimorfizmlerinin iskemik inme hastalığının gelişmesindeki olası rolünü araştırmaktır. İskemik inme gelişmesinde etkin olan genlerin bilinmesi, bu hastalıkla ilişkili yeni ilaçların geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Hastalığa bireysel genetik yatkınlığın belirlenmesi ile zamanında etkin ve koruyucu tedbirler alınabilecektir.

GENEL BİLGİLER

SEREBRAL DOLAŞIM

Beyin ağırlığı tüm vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturmasına rağmen, vücuttaki glukozun neredeyse %50'sini kullanmaktadır. Bu durum beyni vücuttaki en çok enerji tüketen organ haline getirmektedir. Bundan dolayı beyin en iyi perfüze olan organlardan biridir (13). Beynin kan dolaşımı Arter (A.) Carotis İnterna ve A. Vertebralis tarafından sağlanır (14). Bu arterler arcus aortanın dalarından ayrılırlar. Aorta, vücudun en büyük arteri olup ventriculus sinister'den çıkar. Aort dört bölümden oluşmaktadır: aorta ascendens, arcus aorta, aorta descendens ve aorta abdominalis. Arcus aorta, aorta ascendens ile aorta descendes'i birbirine bağlar. Başa, boyuna, omuzlara ve üst ekstremitelere kan akımını sağlayan üç adet arter arcus aorta'dan orijin alırlar (15,16).

- Turuncus brachiocephalicus: A. carotis communis dextra ve A. subclavia dextra dallarına ayrılır. A. subclavia, toraks boşluğundan ayrılmadan önce üç ana dal verir: A. thoracica interna, A. vertebralis ve truncus thyrocervicalis.
- Carotis communis sinistra
- Subclavia sinistra

Baş ve boynun kan dolaşımı 4 çift arterle sağlanır: 1 çift A. carotis communis ile her bir A. subclavia'dan gelen 3 çift dal (A. vertebralis, trucus thyrocervicalis ve truncus costocervicalis). A. carotis communis'ler en geniş kan dağılımına sahiptirler

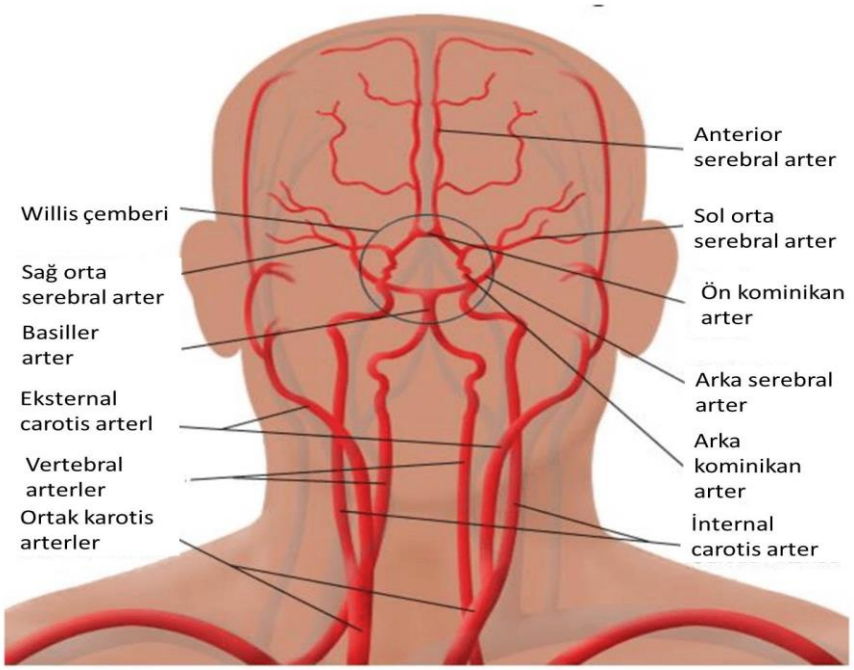
ve her biri iki ana dala ayrılır: A. carotis interna ve externa. Tam iki arterin ayrılma noktasında, A. carotis interna'daki hafif genişleme, sinus caroticus olarak bilinir. Bu bölgede yer alan baroreseptörler kan basıncının kontrolüne yardımcı olurlar. Hemen yanında yer alan kemoreseptörler ise solunumun kontrolünde görev alırlar ve karotid cisimcikler olarak da adlandırılırlar. Boyunda, sinüs caroticus çevresine basınç uygulanırsa; bu uyarı kan basıncının artmasına, vazodilatasyona ve beyne giden kan akımında azalmaya yol açar. Tüm bunların sonucunda bilinç kaybı meydana gelebilir (17,18).

A. Carotis Communis: A. carotis communis dextra, trucus brachiocephalicus'tan çıkar; A. carotis communis sinistra ise arcus aortae'nın ikinci dalıdır. Her iki arterde boynun lateralinden yukarı doğru uzanırlar (17). A. carotis communis, prominentia laryngea (Ademelması) seviyesinde A. carotis interna ve externa adlı iki ana dalına ayrılır. Beyin ve orbitalar haricinde başın büyük bir kısmı A. carotis externa tarafından beslenir. Bu arterlerin her biri yukarı doğru ilerlerler (17).

Orbitalar ve beynin %80'i ise daha büyük olan A. carotis interna tarafından beslenir. A. carotis interna cranium içinde ilk olarak A. opthalmica dalını, daha sonra da A. cerebri media ve A. cerebri anterior dallarını verir. Lobus frontalis ve lobus parietalis'in medial yüzeyinin kan ihtiyacı A. cerebri anterior tarafından sağlanır. A. cerebri anterior'lar, A. communicans anterior isimli kısa bir arter sayesinde birbirleri ile anastomoz yaparlar. A. cerebri media ise lobus frontalis, lobus parietalis, lobus temporalis'in lateral kısımlarının beslenmesini sağlar. Bu arter cerebral hemisfer'in sulcus lateralis'i boyunca ilerler (17).

A. Vertebralis: Boyun ile gövdenin birleştiği yerde A. subclavia'dan ayrılan A. vertebralis, cervical vertebra'ların processus transversus'larındaki foramen transversarium'larından geçerek yukarı doğru ilerler. Vertebralara, cervical spinal cord'a ve birçok derin boyun yapısına dallar verip, foramen magnum'dan geçerek cranium'a girer. Cranium içinde sağ ve sol A. vertebralis'ler bileşerek A. basilaris'i oluştururlar. A. basilaris, medulla oblongata ile pons'un anteriorunda yukarı doğru ilerler ve cerebellum, pons ve cochlea'ya dallar verir. Ayrıca pons-mesencephalon birleşme noktasında iki adet A. cerebri posterior dalına ayrılır. Bu arterler lobus temporalis ve lobus occipitalis'in inferior kısımlarını beslerler (19).

A. cerebri posterior'lar ön taraftan A. communicans posterior'lar vasıtasıyla A cerebri media'ya bağlanırlar. İki adet A. communicans posterior ve bir adet A. communicans anterior birleşerek circulus arteriosus cerebri'yi ya da diğer adıyla Willis poligonu'nu oluştururlar. Willis poligonu chiasma opticum ve glandula pituitaria'yı çevreler. Beynin anterior ve posterior kısımlarının beslenmesine katkıda bulunur ve bu kısımlardaki kan basıncının dengelenmesine yardımcı olur (Şekil 1). A. carotis veya A. vertebralis'te meydana gelecek olası bir tıkanıklık durumunda, kanı beyne ulaştırabilecek alternatif rotalar sağlar (20).



Şekil 1. Serebral dolaşım (21).

SEREBRAL KAN AKIMI VE METABOLİZMA

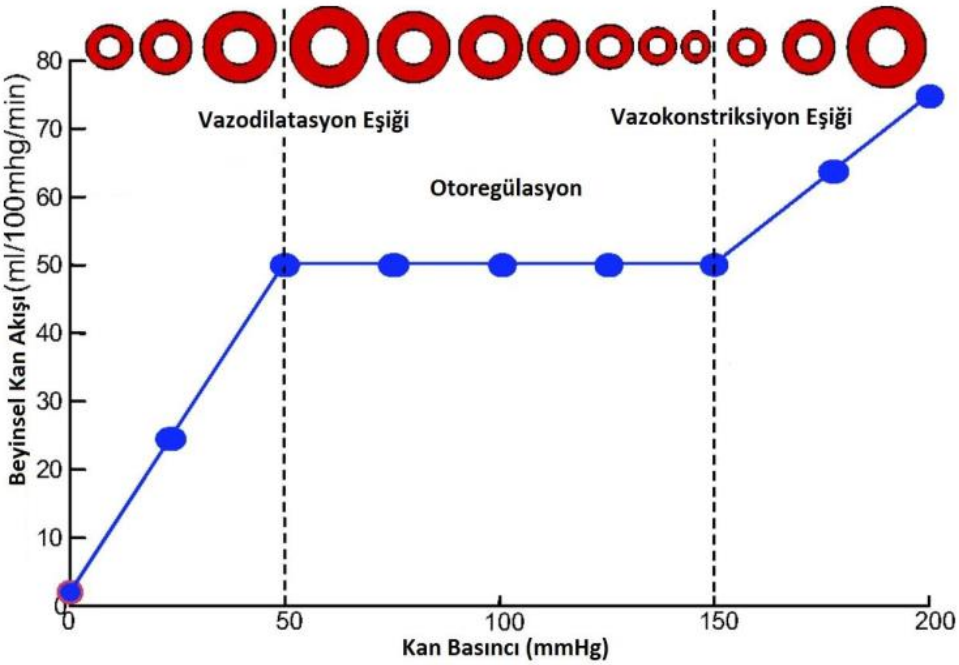
Normal beyin fonksiyonunu ve yaşamı sürdürmek için yeterli serebral kan akışının sağlanması gereklidir. İnsan beyni toplam kardiyak outputun %15'ini ve toplam oksijen tüketiminin %20'sini kullanır. Buradan da anlaşılacağı üzere beyin yüksek miktarda enerji tüketmektedir. Ancak yeterli düzeyde hücre içi enerji depolarına sahip değildir. Bu nedenle besinlerin, oksijenin ve yan ürünlerin hassas bir şekilde kontrol edilmesi gerekir. Bu da ancak iyi bir kan dolaşımı ile sağlanabilir (22,23).

Serebral kan akımı ve metabolizmanın düzenlenmesinde kan beyin bariyeri (KBB) önemli bir görev üstlenmektedir. KBB, beyin dokusunu dolaşımdaki toksik maddelerden korurken; hücrelerin ihtiyacı olan besinlerin hücre içine geçmesine olanak sağlayan özel bir yapıdır. KBB hem fiziksel hem de metabolik bir bariyer sistemidir (24,25).

KBB, kapiller damarların endotel hücreleri, perisitler, astrositler, bazal membran, pleksus koroideus, araknoid mater ve pia materden oluşur (24,25).

KBB şiddetli açlık ve karaciğer yetmezliği, santral sinir sistemi enfeksiyonları, sepsis, kafa içi kitle ve travma gibi durumlarda bozulabilir. Uzun süren açlığa bağlı olarak glukoz ve keton cisimlerinin transportu artar. Merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında KBB'nin bütünlüğü bozulur, lokositler bariyeri geçer ve glukoz transportunda anormal değişiklikler görülür. Beyin tümörleri, Tümör Angiogenesis Faktör salgılayarak ve kapiller permeabilitenin ve buna bağlı olarak da KBB'nin bozulmasına yol açarlar (25).

Serebral perfüzyon basıncı sıkı bir kontrol altındadır. Ancak serebral kan basıncını ve venöz dönüşü etkileyen bazı durumlarda bozulabilir. Kafa içi basınç, ortalama arteryel basınca (OAB) ulaştığı anda serebral kan akımı durma noktasına gelir. Ancak beyne olan kan akımı otoregülasyon mekanizması sayesinde 60-160 mmHg OAB aralığında sürdürülebilir (Şekil 2). OAB düştüğünde beyinde vazodilatasyon meydana gelir ve damar direnci düşer. OAB yükseldiğinde ise damar direncini arttırmak için vazokonstrüksiyon meydana gelir. Bu sayede serebral kan akımı sürdürülmüş olur. Otoregülasyon mekanizmasının bozulduğu durumlarda serebral kan akımı azalır ve serebral iskemi meydana gelebilir (26).



Şekil 2. Otoregülasyon şeması (27).

SEREBROVASKÜLER HASTALIKLARIN EPİDEMİYOLOJİSİ

İnme, toplumda sosyoekonomik gerekliliği giderek artan bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütüne göre, inme, tüm dünyada 1990 yıllarında en önemli ölüm sebeplerinden 2. sırada gelmektedir. İnme, Amerika Birleşik Devletlerindeki ölüm verilerine göre her 16 ölüm olayından birinden sorumludur. Amerika Birleşik Devletlerindeki verilere göre her 3-4 dakikada bir kişinin inme nedeni ile hayatını kaybettiği belirtilmiştir. İnme uzun süren sakatlık durumu nedeni ile çok büyük sosyoekonomik sorunlara yol açmaktadır. İnme geçirmiş bir hastanın hayatı boyunca maliyeti 30.000-59.800 dolar arasındadır. 2020'li yıllarda koroner arter hastalıkları ve inme sağlıklı yaşamın kaybında en önemli sorun olacağı düşünülmektedir (3).

İnme İnsidansı

İnme epidemiyolojisini incelemede en geçerli verilerden biri insidans (belirli bir zaman aralığında ve belirli bir popülasyonda ortaya çıkan yeni inmelerdir) verileridir. İskemik inme riski yılda 1000 kişi için 3,4-5,2 arasında saptanmıştır. Bölgesel çalışmalardaki verilere göre, 1980 yılından itibaren inme insidansında azalma olmadığı, hatta artma olacağı ortaya konulmuştur. İnme nedeni ile ortaya

çıkan mortalite oranı azalmasına rağmen inme insidansındaki artmadan dolayı engellilikle yaşayan inmeli birey sayısında artma olmaktadır ve bu artış, inme geçiren birey ailesinin, toplumun ve sağlık sisteminin üzerinde giderek artan bir yük halini almıştır. ABD'de 45 saniyede bir inme gelişmektedir bu veriye göre her yıl yaklaşık 700.000 kişi inme geçirmektedir (3).

İnme Prevalansı

Kumral E ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalar içinde 8.788 inme incelediğinde inme prevalansı (belirli bir zamanda bir populasyondaki olguların total sayısı) yaşla birlikte arttığı görülmektedir. Yaşın standardize edildiği inme prevalans çalışmalarında 65 yaş ve üzeri 1000 kişilik popülasyonda 46.1-73.3 oranında bulunmuştur. Kadınlarda inme prevalansı 32.2-61.2/1000 kişi olup, erkeklerde 58.8-92.6/1000 kişidir. 65 yaş üzerinde inme prevalansında birkaç bölge hariç önemli değişiklikler gözlenmemiştir (3).

SEREBROVASKÜLER HASTALIKLARIN SINIFLANDIRILMASI

Serebrovasküler hastalıkların %80'i iskemik, %20'si hemorajik sebeblere bağlı olarak gerçekleşmektedir (Tablo 1) (4). İskemik inmeler; trombotik, embolik, hipoperfüzyona bağlı olarak 3 alt gruba ayrılırlar. Hemorajik inmeler ise intraserebral ve travmatik olmayan subaraknoid kanamalar olarak 2 alt gruba ayrılırlar (28). Her iki inme sınıflamasında da esas problem nöronal perfüzyondaki değişimlerdir (1).

İnmenin etyolojisinde birçok sınıflandırma kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmalar içinde en yaygın kullanılanlar; Oxfordshire Community Stroke Project, Cousative Classification of Stroke System ve Trial of Organization in Acute Stroke Treatment (TOAST)'dır. Trial of Organization in Acute Stroke Treatment (TOAST) iskemik inmeyi sınıflandırmasında yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra serebral görüntülemeye, nörolojik belirtilere ve yardımcı test sonuçlarına göre inmenin farklı alt tiplere bölüneceğini belirler (29).

Tablo 1. Serebravaküler hastalıkların sınıflandırılması (30).

İnme tipi	Mekanizması	Ana nedenleri	Klinik notlar
iskemik			
Trombotik	Hasarlanmış vasküler lümenin daralması, insitu süreç, çoğunlukla pıhtı oluşumu	Ateroskleroz Vaskülit Arteriyal disseksiyon Polistemi Hiperkoagülasyon durumlan İnfeksiyonlar	Semptomlar genellikle basamaklı gidişli ve inişli çıkışlı olabilir. Geçici iskemik atağın sık nedenidir.
Embolik	Uzak bir kaynaktan kalkan materyal ile normal lümenin tıkanması	Valvüler vejetasyonlar Mural trombüs Paradoksal emboli Kardiyak tümörler (miksoma) Proksimal kaynaktan arterden artere emboli Yağ embolisi Partikül embolisi Septik emboli	Tipik olarak ani başlangıçlı iskemik inmelerin %20 nedeni
Hipoperfüzyon	Beynin hipoperfüzyonuna yol açan düşük kan akımlı durum	Sistemik hipotansiyona neden olan kalp yetmezliği	Sınır bölgelerinde diffüz hasar patemi Hemodinamik faktörlerle semptomlar inişli çıkışlı olabilir.
Hemorajik			
Intraserebral	Daha önce zayıflayan arteriyollerden intraparankimal hemoraji	Hipertansiyon Amiloidoz İyatrojenik antikoagülasyon Vasküler malformasyonlar Kokain kullanımı	İntrakranial basınç artışı sonucu lokal nöronlar hasar oluşumu. Kan elemanlarının yıkılması sonucu oluşan ürünler nedeniyle oluşan vasospazm veya nöronal mekanizmaların uzak perfüzyon değişikliklerine yol acması.
Travmatik olmayan subaraknoid	Subaraknoid alana kanama	Berry anevrizma rüptürü Vasküler malformasyon rüptürü	Öncesinde sentinel baş ağrısı olabilir, (öncü sızma)

TOAST Kriterlerine Göre İskemik İnme Sınıflanması

Geniş arter aterosklerozu

İskemik inmelerin yaklaşık %50'sini içerir (7). Klinik olarak ihmal, afazi, üst ekstremitede güç kaybı (kortikal fonksiyon kayıp) ile devam eden bir durumdur. Hastada geçmişinde periferik arter hastalığı hikayesi olması ya da geçici iskemik atak geçirmiş olması, nabız şiddetinde azalma ve karotis üfürümü gibi bulgularının olması hastalığın tanısında yardımcı olur. Hastada infarkt bölgesini besleyen intrakranial veya ekstrakranial bir arterde %50'den fazla darlığın saptanması yeterli olmaktadır. Bununla beraber hastalarda kardiyak nedenli olabilecek emboli dışlanmalıdır (31).

Kardiyoembolizm

İskemik inmelerin yaklaşık %20'sini içerirler (7). Kalpte oluşan emboliyle ilgili olduğu düşünülen arteriyel oklüzyon hastaları bu kategoridedir. Kardiyoemboli teşhisi için, en az bir tane kardiyoemboli kaynağı gösterilmiş olmalıdır. Bütün bu bulgular büyük atardamar aterosklerozuna benzemektedir. Tromboz ya da embolinin büyük atardamar aterosklerozu ile ilişkileri dışlanmalıdır.

Kardiyoembolik nedenler iki gruba ayrılırlar:

1) Düşük riskli nedenler; biyoprotez kapak, atriyal septal anevrizma, atriyal septal defekt, atriyal flutter, patent foramen ovale, mitral kapak prolapsusu, mitral annulus kalsifikasyonu, kalsifiye aortik stenoz, konjestif kalp yetmezliği hastalığı, akinetik-diskinetik ventrikül duvar segmenti, subaortik hipertrofik kardiyomiyopati, 4 haftadan önce geçirilmiş miyokard infarktüsü hikayesidir.

2) Yüksek riskli nedenler; atriyal fibrilasyon, hasta sinüs sendromu, sol atriyal miksoma, mitral stenoz, mekanik protez kapak, akinetik sol ventrikül segmenti, endokardit, dilate kardiyomiyopati, yeni geçirilmiş miyokard infarktüsüdür.

Küçük damar oklüzyonu

İskemik inmelerin yaklaşık %25'ini içerirler. Radyolojik görüntüleme yöntemlerinde lezyon ya hiç görülmez ya da Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) yapıldığında lezyonun 15 mm'den daha küçük, derin infarkt görülmesi; klinik olarak pür duyusal inme, pür motor hemiparezi, sensorimotor inme, ataksik hemiparezi gibi klasik laküner sendromların belirlenmesi ve başka iskemik inme sebeplerinin olmadığı gösterilmelidir (31).

Yaş, erkek cinsiyet, diyabet, koroner arter hastalık, geçici iskemik atak öyküsü, hipertansiyon, sigara kullanımı küçük damar oklüzyonunda özgün olmayan risk nedenleridir (7).

Diğer belirlenen etiyolojiler

İskemik inmelerin yaklaşık % 5'ini içerirler (32). Bunlar; Fabry hastalığı, antifosfolipid antikor sendromu, dissemine intravasküler koagülasyon, arteriyel diseksiyon, hipoperfüzyon sendromları, hemolitik üremik sendromu, heparin ile ilişkili trombositopeni, serebral otozomal dominant arteriyopati, damar duvar hastalıkları, moyamoya hastalığı, Sneddon sendromu, fibromusküler displazi, mitokondriyal hastalıklar, hiperviskozite sendromları, trombotik trombositopenik purpura, migren ilişkili inme, iyatrojenik nedenler, ilaç kullanımı ile ilişkili inmeler, orak hücreli anemi, menenjit gibi damar duvarı enfeksiyonları, santral sinir sistemi vaskülitleri, sinüs ven trombozu, tromboz ve hemostaz ile ilgili bozukluklar gibi nedenleri içerir. Bu hastalıklar leptomeningeal biyopsi, anjiyografi, ayrıntılı hematolojik, mikrobiyolojik ve biyokimyasal testler ile tanı konulabilir.

Sebebi belirlenemeyenler

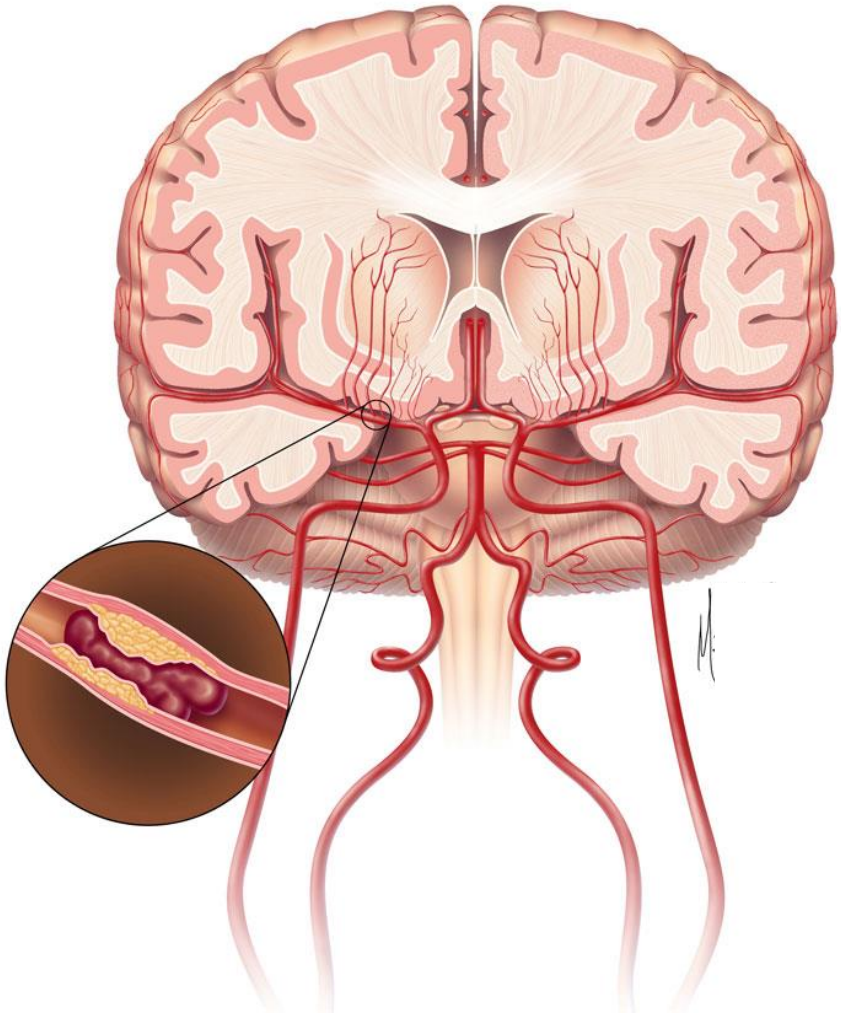
Tüm iskemik inmelerin çok az bir kısmını bu grup oluşturmaktadır. Bu gruptaki hastalar sebebe yönelik yapılan tüm gerek biyokimyasal, hematolojik ve mikrobiyolojik gerek radyolojik görüntüleme tetkiklerine rağmen etyolojisi aydınlatılamayanlardan oluşmaktadır (33).

İSKEMİK İNME

İskemik inme, fokal serebral, spinal veya retinal infarkt sonucu gelişen nörolojik fonksiyon bozukluğu vakasıdır (Şekil 3) (5).

Yaş ile doğru orantılı şekilde iskemik inmenin 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 ölümler gerçekleşmeye başlar (6).

İskemik inme ülkemizdeki tüm inme vakalarının yaklaşık % 72' sini oluşturmaktadır. Batı ve Amerikan toplumlarında ise tüm inme bulgularının yaklaşık % 80'ini oluşturur (6).



Şekil 3. İskemik inme (34).

İSKEMİK İNMEDE RİSK FAKTÖRLERİ

İskemik inme tüm dünyada mortalite ve morbidite açısından çok ciddi bir sağlık problemidir. İnmenin erken tanısının koyulması ve tedavisinin başlanması inme geçirme riski olan hastalarda inmeyi önleyebilmek açısından önemlidir (12).

İnmeye neden olan risk faktörleri kesinlikle inme geçirecek anlamına gelmez. Ancak bu risklerden bazısı veya bazılarını taşıyan bireylerde inme geçirme ihtimali artıyor olabilmektedir (35).

Risk faktörleri genel olarak değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri olarak iki ana başlık altında incelenmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. İskemik inmede risk faktörleri (29).

DEĞİŞTİRİLEBİLİR RİSK FAKTÖRLERİ		**DEĞİŞTİRİLEMEZ RİSK FAKTÖRLERİ**
KESİNLEŞMİŞ	**KESİNLEŞMEMİŞ**	
Hipertansiyon	Alkol Kullanımı	Yaş
Diyabetes Mellitus	Obezite	Irk
Dislipidemi	Beslenme Alışkanlıkları	Genetik
Kalp Hastalıkları	Fiziksel Aktivite	Cinsiyet
Sigara	İlaç Kullanımı ve Bağımlılığı	
Asemptomatik Karotis	Hormon Tedavisi	
Stenozu	İnflamasyon	
Orak Hücreli Anemi	Hiperhomosisteinemi	
Atriyal Fibrilasyon	Hiperkoagülabilite	

Değiştirilebilir Risk Faktörleri

Risk faktörlerinden değiştirilebilir risk faktörleri kesinleşmiş ve kesinleşmemiş olmak üzere iki grupta incelenir. Serebrovasküler hastalıkları önlemede değiştirilebilir risk faktörlerinin önlenmesi ve kontrol altına alınması önemli bir yere sahiptir.

Kesinleşmiş risk faktörleri

Hipertansiyon: Kronik hastalıklar arasında en sık görülenlerden birisi olan hipertansiyon tüm dünyada çok ciddi bir sağlık problemidir. İskemik ve hemorajik inmenin de en önemli sebepleri arasındadır. Sistolik ve diyastolik tansiyon yüksekliği iskemik inmenin sıklığını artırır. Hipertansiyon yaşlı popülasyonların iskemik inme geçirme ihtimalini önemli oranda artırır (32). Kan basıncı yüksekliği ne kadar fazla olursa inme geçirme riski o oranda artar (36). Yaşla birlikte tansiyon yüksekliği artar. Yapılan çalışmalarda hipertansiyon gelişme riski 55 yaşından sonra %90 oranında bulunmuştur (37). Hipertansiyon kontrolü inmeyi önlemede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (38). Hipertansiyon tedavisi inme insidansını %35-44 azalttığı gösterilmiştir (39).

Diyabetes mellitus: Diyabetin yapılan çalışmalarda bağımsız olarak bir etki gösterdiği ve iskemik inme riskini artırdığı gösterilmiştir (40). Hiperglisemi inme sıklığını azaltmaktadır (12).

Dislipidemi: Dislipidemi ile iskemik inme riski arasında hem kadınlarda hem de erkeklerde önemli bir ilişki vardır (12).
İskemik inme ve myokard infarktüsünde toplam kolesterol/High Density Lipoprotein (HDL) kolesterol seviyesindeki artış bilinen bir risk faktörüdür (41).

Kalp hastalıkları: İnmelerin %20'sinin kardiyak embolilerden kaynaklandığı görülmektedir (7). İnmeler asemptomatik veya semptomatik kalp hastalıkları ile yakından ilişkilidir (42). TOAST çalışmasına göre kalp hastalıkları düşük riskli ve yüksek riskli olarak ikiye ayrılmıştır (Tablo 3) (31).

Tablo 3. TOAST çalışmasına göre kalp hastalıklarının risk grupları (29).

DÜŞÜK RİSKLİ GRUP	YÜKSEK RİSKLİ GRUP
· Miyokard İnfaktüsü (<6ay) · Vertriküler Anevrizma · Sol Ventriküler Hipokinezi · Mitral Stenoz · Mitral Annujus Kalsifikasyonu · Biyoprotez Kapak · Lone AF · Konjestif Kalp Yetmezliği · Atriyal Septal Defekt · Atriyal Septal Anevrizma · Patent Foramen, Ovale · Mitral Valv Prolapsusu · Atriyal Flutter	· Mekanik Protez Kapak · Valvüler AF · Valvüler Olmayan AF · Miyokard İnfarktüsü (<4 hafta) · Sol Ventriküler Akinezi · Enfektif Endokardit · Hasta Sinüs Sendromu · Dilate Kardiyomiyopati · Sol Vetriküler Trombus · Sol Atriyal Trombüs · Sol Atriyal Miksoma

Sigara: İskemik inme için sigara kullanımı önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (12). Yapılan bir meta analizde sigara kullanımının subaraknoid hemorajiyi %2,9, iskemik inmeyi %1,9 oranında artırdığı görülmüştür (43). Buna ek olarak sigara kullanımı inme için olan diğer risk faktörlerini de artırabilir.

Asemptomatik Karotis Stenozu: 65 yaş üstü kadın ve erkeklerde %50'den fazla karotis darlığı %5-10 oranında görülmektedir (12). %50-99 asemptomatik karotis darlığı bulunan hastalarda aynı taraflı inme riski yıllık %1-3,4 olarak gösterilmekle beraber darlığın derecesinin artması ile orantılı olarak riski de arttığı belirtilmiştir (43, 44).

Orak Hücreli Anemi: Resesif geçişli otozomal kalıtsal bir hastalıktır. İnme prevelansı %11 dir. Erken çocukluk döneminde yüksek oranda inme olmaktadır (45).

Atriyal Fibrilasyon (AF): Persistan veya paroksismal atriyal fibrilasyonu olan hastalar embolik olaylar için yüksek risk taşımaktadırlar. Tek başına atriyal fibrilasyon 3-4 kat inme riskinin artışı ile ilişkilendirilmektedir (46).

Kesinleşmemiş risk faktörleri

Alkol Kullanımı: Alkol kullanımı birçok sağlık sorununa neden olması ile birlikte inmeye de yol açmaktadır. Hafif ve orta derece alkol kullanımının inme için koruyucu, ağır alkol alımı ve akolizmin ise inmenin tüm alt grupları için risk taşıdığı gösterilmiştir (47).

Obezite: Obezitenin tanımını Dünya Sağlık Örgütü beden kitle indeksine [BKİ=Ağırlık (kg)/Boy (m2)] göre yapmaktadır. Buna göre obezite: BKİ ≥30 kg/m2 ve fazla kilolu: BKİ=25.0-29.9 kg/m2 olarak kabul edilmektedir. Büyük ölçekli prospektif çalışmalardan elde edilen verilere göre kilo artışı ile artmış inme riski doğru orantılı olduğunu gösterilmiştir (48).

Beslenme Alışkanlıkları: Yapılan çalışmalarda sebze ve meyve tüketiminin azalmış inme riski ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (49). Yüksek sodyum alımı inme riskinin artışı ile (50), potasyum alımı ise inme riskinin azalması ile ilişkilendirilmiştir (51).

Fiziksel Aktivite: Fiziksel aktivite inme riskinin yanında kardiyovasküler riski de önemli ölçüde azaltır (52).

İlaç Kullanımı ve Bağımlılığı: Uyuşturucu bağımlılığı birçok sağlık sorunlarına neden olmakla birlikte; kokain, eroin, madde bağımlılığı, amfetamin gibi maddelerin kötüye kullanılması artmış inme riski ile ilişkilendirilmiştir (52,53).

Hormon Tedavisi: İçerdikleri österojen miktarından dolayı oral kontraseptifler pıhtılaşmayı etkileyerek tromboza yönelimi arttırırlar. Bundan dolayı inme riskini artırırlar (54).

İnflamasyon: İnme sebeplerinden birisi olan ateroskleroz, endotelde yüzey hasarı yapan kronik inflamatuvar bir durum olduğu için inflamasyon belirteçleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Artmış C-Reaktif Protein (CRP) seviyelerinin kadınlarda 3 kat erkeklerde 2 kat artan inme riski ile ilişkilendirilmiştir (55).

Hiperhomosisteinemi: Yüksek homosistein düzeyleri yapılan çalışmalarda iskemik inmeler ve aterosklerotik kalp hastalıkları arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Yaşla birlikte homosistein düzeylerinde artış göstermektedir (56). Bununla birlikte homosistein düzeylerinin yüksek olması tekrarlayan inmeler için risk faktörüdür (57).

Hiperkoagülabilite: Hiperkoagülabiliteye yol açan trombofililer; antikardiyolipin antikoru, antitrombin 3 eksikliği,protrombin G20210A mutasyonu, protein C eksikliği, protein S eksikliği, lupus antikoagülanı, aktive protein C direnci, faktör V Leiden mutasyonu, MTHFR mutasyonu şeklinde sınıflandırılabilirler. Özellikle lupus Antikoagülanları, pozitif antikardiyolipin, ve artmış trombosit agregasyonuna neden olan tabloların inme için risk faktörü olduğu gösterilmiştir (58).

Değiştirilemez Risk Faktörleri

Yaş: İnme riski ilerleyen yaşla birlikte artmaktadır. 55 yaşından itibaren inme geçirme olasılığı her on yılda bir neredeyse ikiye katlanır (59). Yapılan çalışmalarda 90 günlük mortalitedeki risk faktörlerinde yaşın anlamlı bir parametre olduğu ortaya koyulmuştur (60).

Irk: Beyazlara göre siyahların inme geçirme insidansı %38 oranında daha fazladır (61). Yapılan bazı çalışmalarda inme insidansının bazı Asyalı gruplarda daha fazla olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (62).

Genetik: Hem babada hem annede inme geçmişinin olması artmış inme riski ile ilişkilendirilir (62). İkizlerde yapılan çalışmalarda ise inme riskinde kalıtım faktörünü destekleyen anlamlı veriler bulunmuştur. Farklı yumurta ikizleri ile aynı yumurta ikizleri karşılaştırıldığında aynı yumurta ikizlerinin inme geçirme oranının 5 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (63). İskemik inmenin alt tipleri ile ilgili yapılan araştırılmada aile öyküsü küçük damar hastalığı ve geniş arter aterosklerozu açısından anlamlı bir risk faktörü olduğu, nedeni belirlenemeyen ve kardiyoembolik inmelerde ilişkili olmadığı gösterilmiştir (64).

Cinsiyet: İnme erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür (47). Buna rağmen 85 yaş üstü ve 35 ile 44 yaş arası inme insidansı kadınlarda daha fazladır (48). Erkeklerde kadınlara oranla inme daha sık görülmektedir (65). Buna rağmen 34-45 yaş arası ve 85 yaş üstü kadınlarda inme insidansı daha fazladır (66).

İSKEMİK İNMENİN KALITIMLA İLİŞKİSİ

İskemik inmenin oluşumundaki temel nedenlere ve gelişimi sırasında canlıda meydana gelen değişimlere bakıldığında kalıtımın rolünün fazla olmadığı ileri sürülmüştür. Bununla beraber iskemik inme geçirmiş kişinin birinci derece akrabalarında (anne, baba gibi) daha önceden iskemik inme geçirmiş ise bu kişilerin iskemik inme geçirme oranlarında artış gözlemlenmiştir. Aynı çevresel ya da kültürel etkileşimde bulunma, kalıtım, yaşam şekli, çevresel faktörler gibi durumlar iskemik inme riskini artırmaktadır (67).

OSTEOPROTEGERİN

1997 yılında, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper familyasının bir üyesi olan yeni bir glikoprotein, osteoprotegerin (OPG) keşfedilmiştir. RANKL (nükleer faktör NF-kB ligandının reseptör aktivatörü) ve hücresel reseptör RANK (nükleer faktör NF-kB'nin reseptör aktivatörü) ile birlikte OPG osteoklastogenezde önemli bir rol oynar. RANKL osteoblastik soy hücreleri tarafından bastırılır ve osteoklast apoptozunun önlenmesinin yanı sıra osteoklastların farklılaşmasını, hayatta kalmasını, füzyonunu ve aktivasyonunu teşvik etmek için spesifik reseptörünü (RANK) uyarır. Öte yandan OPG, RANKL için çözünebilir bir reseptör olarak görev yapar, RANK'a bağlanmasını inhibe eder ve böylece osteoklast oluşumunu önler (68).

OPG

OPG, kalp, böbrek, karaciğer, dalak ve kemik iliği dahil olmak üzere osteoblastlar haricinde birçok dokularda eksprese edilir (69). Ekspresyonu, osteoblastlar tarafından RANKL ekspresyonunu indükleyen faktörlerin çoğu tarafından düzenlenir. RANKL'ın genel yukarı regülasyonu ile ilgili çelişkili veriler,

olmasına rağmen OPG'nin aşağı regülasyonu veya OPG en azından alt indüksiyon RANKL oranı osteoklastojenezin lehine değişiklikleri OPG ile ilişkilidir. Birçok rapor, RANKL / OPG oranının kemik kitlesinin ana belirleyicisi olduğu iddiasını desteklemektedir (70). OPG'nin insanlarda osteoprotektif bir rolü, kemik remodelingi osteopeni ve kırıkların artmasıyla karakterize otozomal resesif bir hastalık olan juvenil Paget hastalığı olan iki hastada, OPG'nin homozigot delesyonlarının rapor edilmesiyle desteklenmiştir. Ayrıca, idiyopatik hiperfosfatazisi olan üç kardeşte OPG'nin ekson 3'ünde inaktive edici bir delesyonun tanımlanmasıyla desteklenir, ki bu da uzun kemiklerin deformiteleri, kifoz ve asetabular protrüzyon ile ilişkili artmış kemik döngüsüyle karakterize edilen otozomal-resesif bir kemik hastalığıdır. Son zamanlardaki şaşırtıcı bir bulgu, osteoblastik kemik oluşumunu düzenleyen osteoblastlardaki Wnt / β-katenin sinyalizasyonu ile OPG ekspresyonunun düzenlenmesidir. Böylece, kemik kütlesi osteoblast ve osteoklastların kombine çabaları ile belirlenir ve osteoblastlarda iki ana sinyal yolu ile düzenlenir: RANKL / RANK ve Wnt / β-katenin (71).

OPG ayrıca, OPG nakavt farelerinde görülen renal ve aortik kalsifikasyon gözlemine dayanarak, büyük kan damarlarını medial kalsifikasyondan koruyor gibi görünmektedir (72). Dahası, OPG / apolipoprotein E susturulmuş farelerde OPG'nin yokluğu, apolipoprotein E nakavt farelerinde gelişen kalsifik aterosklerozu hızlandırır ve bu da OPG'nin aterosklerozun bu komplikasyonuna karşı koruduğunu düşündürmektedir (73). OPG ve RANKL sinyallemesinin kardiyovasküler hastalıklarda önemli olup olmadığı rollerinin belirlenmesine ve tartışmaya açıktır. Örneğin, serumda yüksek seviyede OPG ve insanlarda kardiyovasküler hastalık, diyabet ve kronik böbrek yetmezliği arasında bir ilişki vardır (74). Bununla birlikte, bu son durumda OPG'nin, böbrek osteodistrofisi olan hastalarda veya vasküler kalsifikasyona karşı sekonder hiperparatiroidizmin artan kemik rezorpsiyonuna karşı iskeleti koruduğu görülmemektedir. Bu tür hastaların serumdaki OPG'nin bir plazma proteinine / proteinlerine bağlı olması ve dolayısıyla inaktif hale gelmiş olması mümkündür, ancak serumda RANKL / OPG oranının olup olmadığını sorgulayan bu gözlemlerin önemini belirlemek için daha fazla çalışma yapılması gerekecektir (71).

RANKL

RANKL, membrana bağlı ve salgılanmış olarak eksprese edilebilen bir tip II homotrimerik transmembran proteinidir ve salınan formu membran formundan proteolitik kırılma ya da alternatif kırılma (splicing) sonucu türetilir. (75). RANKL'ın proteolitik kırılması bir disintegrin ve metaloproteaz bölgesi (76) ve matriks metaloproteazları gerektirir (77).

Osteoblast / stromal hücrelerde RANKL ekspresyonu osteoklast oluşumunu ve aktivitesini stimüle ettiği bilinen faktörlerin çoğu tarafından uyarılır. Lenf nodları, timus ve akciğerde ve dalak ve kemik iliği de dahil olmak üzere çeşitli diğer dokularda düşük seviyelerde ifade edilir (69). İltihaplı eklemlerde sinoviyal hücreler tarafından eksprese edilir ve aktive edilmiş T hücreleri tarafından salgılanır. Bu RANKL kaynakları, en azından kısmen romatoid artritli hastalarda eklem yıkımına aracılık etmekten sorumlu gibi görünmektedir (78). TNF ayrıca romatoid artritte eklem yıkımına, dolaşımdaki osteoklast prekürsörü sayısını sistematik olarak artırarak ve kemik iliğinden çıkışını periferal kan içine ve daha sonra da bu hücrelerin RANKL ile birlikte osteoklastlara füzyonunu teşvik ettiği iltihaplı eklemlere doğru ilerleterek interlökin-1 (79). RANKL, TNF gibi, olgunlaşmamış progenitörlerin dolaşımda salınımını uyarır. Bununla birlikte, RANKL, kemik adezyonu ve rezorpsiyonu açısından kusurlu olan osteoklastlı protein tirozin fosfataz-ε knockout farelerde osteoklast prekürsörü mobilizasyonunu uyarmamaktadır (80). Böylece, RANKL kaynaklı osteoklast aktivasyonu, homeostazın ve konak savunmasının bir parçası olarak progenitörlerin işe alımını düzenleyebilir ve hematopoezisin düzenlenmesiyle kemik yeniden şekillenmesini birbirine bağlayabilir. Farelerdeki preklinik çalışmalar, RANKL'ın gebelik sırasında meme epitelyal hücrelerinde de eksprese olduğunu ve meme epitel hücreleri ve süt üretiminin laktasyonel hiperplazisi için gerekli olduğunu göstermiştir (81). Aynı zamanda, RANK'ı eksprese eden bazı habis tümör hücreleri tarafından da ifade edilir ve bu nedenle, bir otokrin mekanizması ile veya aktive edilmiş T gibi aksesuar hücreler tarafından üretildiği takdirde, bir parakrin tarzda tümör hücresi proliferasyonunu indüklemede bir rol oynayabilir (82). Bununla birlikte, RANKL T hücrelerinin oluşumlarını negatif olarak düzenlemek için c-Fos aracılığıyla aktive edilmiş osteoklastlar aracılığıyla interferon-y ekspresyonunu indükler (83). Bu mekanizma, RANK sinyallemesine aracılık

etmek için RANK'a eklenen temel bir adaptör proteini olan TNF reseptör ilişkili faktörü T hücresi tarafından üretilen interferon-γ ile arttırılabilir (84).

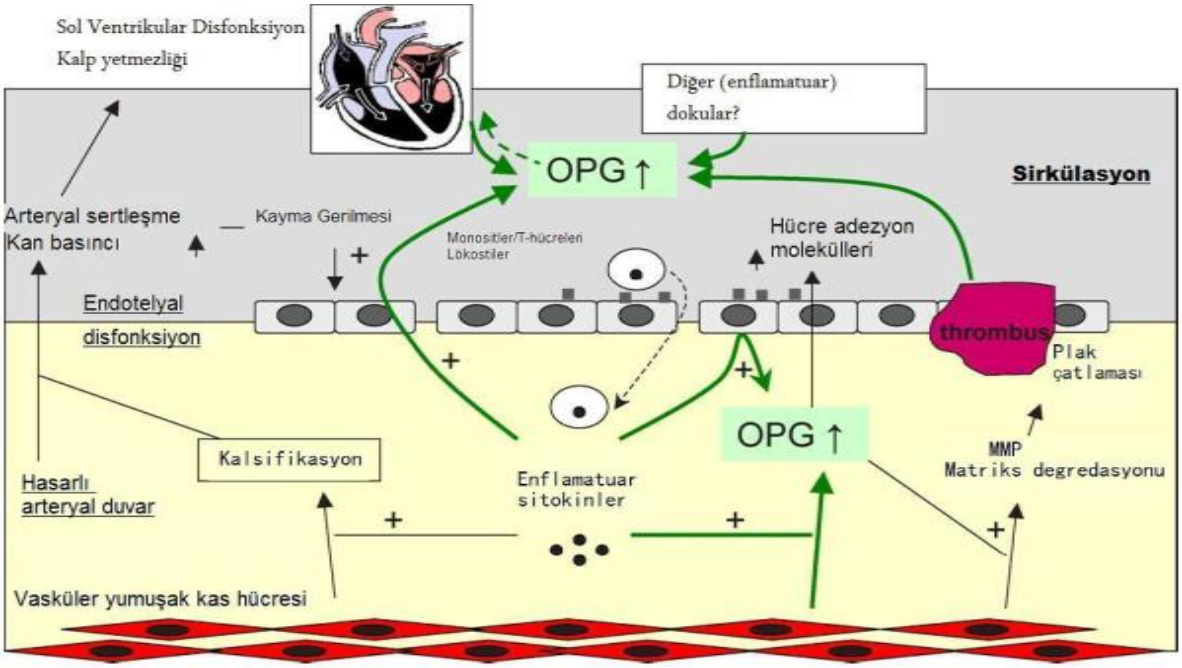
RANK

RANK, ifadesi başlangıçta sadece osteoklast prekürsörler, matür osteoklastlar ve dendritik hücreler üzerinde saptanan bir tip I homotrimerik transmembran proteinidir. Bununla birlikte, RANKL gibi, yaygın olarak ifade edilmektedir. RANK protein ekspresyonu meme bezinde ve meme ve prostat kanserleri dahil bazı kanser hücrelerinde, yüksek kemik metastazı potansiyeli olan iki tip tümörde bildirilmiştir. Bugüne kadar hiçbir insan RANK geninde etkisiz hale getirme veya silme tipi mustasyon tanımlanmamış olsa da, transgenik bir farede spontan bir silme mutasyonu ortaya çıkmış olup, sonuç olarak RANK'ın osteoklast için önemini doğrulayan RANK'ın hedeflenmiş silinmesi ile üretilen farelerin tüm özelliklerine sahip olmuştur. RANK aracılı nükleer faktör-κB (NF-κB) sinyallemesinde artışa neden olan RANK'ın ekson 1'inde aktive edici mutasyonlar ve Paget hastalığı olan bazı hastalarda görülen osteolizde osteopatis oluşumu ve aktivitesinde artış meydana gelir. Tümör hücresi proliferasyonunda RANK için potansiyel bir rol araştırılmaktadır ve kanıtlanırsa anti-tümör tedavisi için gelecekteki bir hedef olabilir (71).

OPG ve RANKL Sistemi

OPG, TNF (tümör nekroz faktör) bağımlı ailenin bir üyesi, NF-κB ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü ve NF-κB (RANK) reseptör aktivatörüdür. Bu sitokin ağı osteoklast'ın diferansiyasyonunu ve aktivasyonunu düzenler ayrıca kemik resorpsiyonu (osteoklast), kemik yapılanması (osteoblast) arasında önemli bir dengekurar. RANKL; osteoklast yüzeyindeki RANK'a bağlı olan osteoblastik, stromal ve T hücrelerde monositik hücrelerde eksprese olur (Şekil 4) (9).

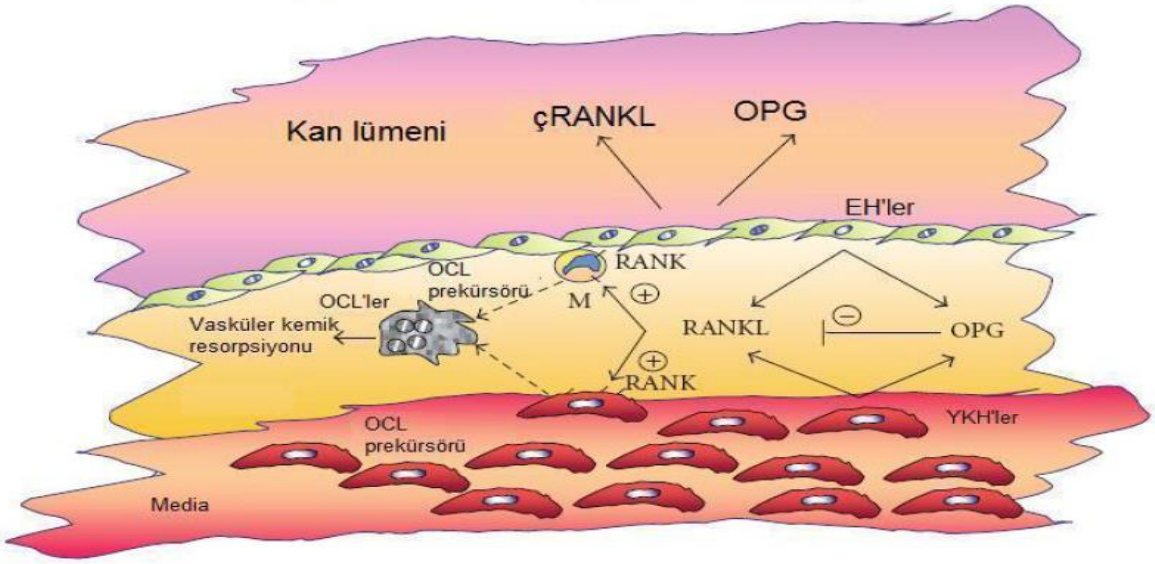
Şekil 4'te görüldüğü üzere; vasküler yumuşak kas hücresi ve endotelyal hücrelerde OPG üretimi, enflamatuar sitokinler tarafından arttırılır. Bu durum endotelyal disfonksiyona sebep olabilir. Buna ek olarak; plak çatlaması, kalp yetmezliği ve diğer enflamatuar dokular da OPG artışına sebep olabilir.



Şekil 4. OPG artışının şematik gösterimi (9).

RANKL-RANK etkileşimi; osteoklast diferansiyasyonu ve aktivasyonu için gerekli olan ve NF-κB'yi de içeren intraselüler sinyal iletişimini sağlar. OPG; kemik, endotelyal ve vaskuler yumuşak kas hücreleri de içeren birçok insan dokusunda çözünebilen ve eksprese olan glikoproteindir. RANKL ise sahte çözülebilen reseptör gibi davranarak; OPG, RANK-RANKL etkileşimini ve osteoklast diferansiyasyonunu, kemik resorpsiyonunu engeller. RANKL'den ayrı olarak; OPG, vasküler yumuşak kas hücresi ve T hücreleri tarafından eksprese edilen TNF-bağlı apoptoz indükleyici ligandın pro-apoptotik aksiyonlarını nötralize eder. İmmünolojik cevaplardaki başka bir rolü ise; dentritik hücreler ve T hücre poliferizasyonunun kapasitesini arttıran, dentritik ve T hücreler arasındaki RANK-RANKL bağında görülür. Ayrıca; OPG, antikor cevapları ve B hücre maturasyonunda önemli görevler alır (9).

Çözünebilen RANKL (çRANKL) ve OPG, yumuşak kas hücreleri (YKH) ve endotelyal hücreler (EH) tarafından, kanda ve aterosklerotik plakta salgılanmaktadır. çRANKL, osteoklast prekürsörünü osteoklast hücresine çevirir (kesikli çizgilerle gösterilmiştir). OPG, RANKL aktivitesini durdurur. Bu iki çözünebilen madde arasındaki denge, kalsifikasyonlu plaktaki kemik resorpsiyonunu düzenler (Şekil 5) (85).



Şekil 5. Plaktaki potansiyel OCL (osteoclast benzeri hücre) diferensiyasyonu (85).

OPG / nuklear faktör-κB reseptör aktivatörü (RANK) / nüklear faktör-κB ligand reseptör aktivatörü (RANKL) sistemi, vasküler hastalıklar ve kemik gelişimi için önemli bir anahtar olarak belirtilmiştir. RANKL, bunların içinde en sık kullanılan terimdir ancak osteoklast diferansiyasyon faktörü, OPG ligandı, tümör nekrozis faktör (TNF) bağımlı aktivasyon uyaran sitokin ve TNF süperailesi 11.üye terimleri de kullanılmaktadır (86).

OPG sitokin ağının üçüncü moleküldür (87). TNF reseptör süperailesi üyesi bir glikoprotein olan OPG, RANKL için çözünebilir bir reseptördür ayrıca çok daha az afiniteye sahip olmasına rağmen TNF-bağımlı apoptoz uyaran ligand'a bağlanabilir (88).

OPG, kemik ve vaskülatür de dahil olmak üzere çoğu insan dokusunda eksprese edilebilir. OPG eksikliği, RANKL'ın dengesiz aktivasyonu ile birlikte osteoklast formasyonunu arttırarak osteoporoz'a sebep olur . Diğer yandan, transgenik hayvanlarda OPG'nin aşırı ekspresyonu kemikleri etkilemekte ancak RANKL-eksikliği olan farelerde immün fenotipi etkilememektedir.

OPG mRNA'sının akciğer, kalp, böbrek, karaciğer, mide, bağırsak, beyin ve omurilik, tiroid bezi ve kemik gibi birçok doku eksprese olduğu belirlenmiştir (89).

OPG ve RANKL'ın serum düzeylerinin uzun süreli konsistansı, en az LDL veya yüksek duyarlıklı C-reaktif protein kadar yüksek bulunmuştur (90).

Myokard infarktüsünden sonraki akut fazda, OPG serum düzeyi geçici olarak artar ve olaydan birkaç hafta sonra eski düzeyine indiği gözlenmiştir (91).

Bunu takiben yapılan perkütanöz koroner müdahalede, periferik kan mononüklear hücrelerdeki (PBMCs) RANKL ekspresyonu önemli ölçüde artmış ve 24 saat içinde normale döndüğü gösterilmiştir (92).

OPG ve Vasküler Kalsifikasyon

Önceden, vasküler kalsifikasyonun tamamen pasif bir proses olduğu ve kemikten arteryal duvarlara kalsiyum taşınmasından ibaret olduğu düşünülürdü şimdi ise, spesifik damar iletimli kalsifikasyon inhibitör olması da dahil, kompleks pozitif ve negatif regülasyonlarda etkili olduğu bilinmektedir (93). OPG, kemik resorpsiyonunu inhibe etme kapasitesini kullanarak kalsifikasyonu önler ve OPG'nin lokal kalsifikasyon inhibitörü olduğu düşünülmektedir. OPG aktivitesi engellenmiş farelerin bilinen kemik matriksi yapısının incelenmesi sonucu, hiperkalsemi oluştuğu ve aortun media ve subintima bölgelerine kalsiyumun erken difüze olduğu görülmüştür (72).

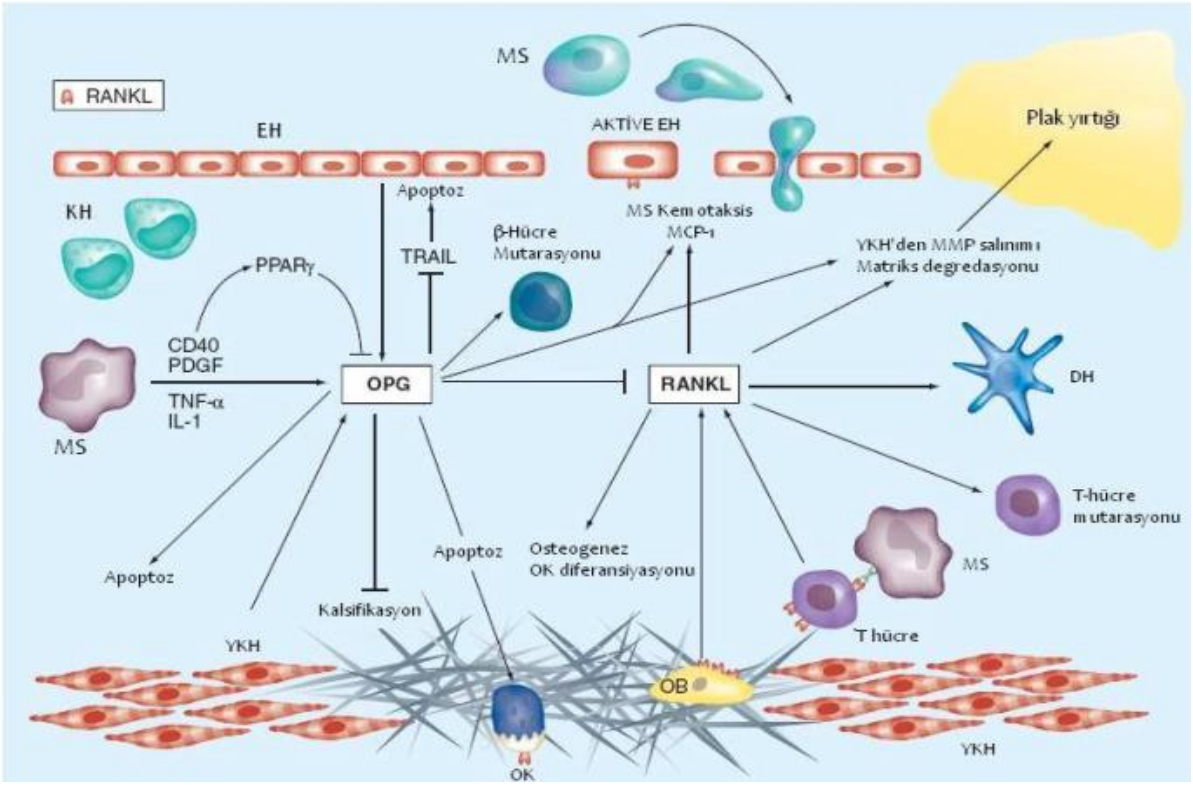
OPG-transgenik fare kullanarak melez ırk yetiştirildiğinde, normal bir genotip elde edilebilir . Bu durumda; eğer toksik varfarin dozları ile simultane bir şekilde yönetilirse, farelerde OPG tedavisi varfarin'in indüklediği vasküler kalsifikasyonu engeller . Bu merak uyandıran bilgilerin insan aterosklerozuna uygulanması açığa kavuşturulsa da kavuşturulmasa da, deney hayvanlarındaki kalsifikasyonun ve insanlardaki kalsifikasyonun aterosklerotik dokuları süre, lokasyon ve histolojik uygulamalar bakımından farklılık gösterir (94).

Gerçekte, aterosklerotik (fibrotik) kalsifikasyon konusundaki bazı epidemolojik bilgiler, çelişkili sonuçlar göstermektedir. Bu bilgiler, inme ile ya hiç ilişki olmadığını (aorta'nın kalsifikasyonu), veya invers (plak ekolusensi) ya da pozitif ilişki olduğunu (koroner kalsiyum durumu) gösterir. Kronik ve ileri derece renal hastalıklarda ve diyabetik miliyöde; mediyal kalsifikasyon ve vasküler kalsiflaksis ile birlikte artan vasküler kalsifikasyon sebebiyle OPG serum düzeyleri şaşırtıcı bir şekilde artmaktadır (10).

Histopatolojik çalışmalara göre, kalsifikasyonlu bölgelerde ve TRAIL aktivitesi olan ve aynı hücrede meydana gelen olgularda, OPG ekspresyonu kısmen

artış göstermektedir. Artmış OPG seviyesinin basitçe vaskülatürün osteogenik transformasyonun göstergesi olduğu ya da kalsifikasyon sürecini limitlemeye çalışan karşı regülatör olgu olduğu tam olarak bilinmese de, birçok araştırma ikinci seçeneğin doğru olduğu izlenimini vermektedir (95).

RANKL, kalsiyum depolarının çevresindeki ekstraselüler matrikste pozitif yönde regüle olur. Vasküler kalsifikasyonlar aterosklerotik plakları stabilize edebilirler (96) ancak belli şartlar altında, intima bölgesindeki kalsiyum depoları, plak kırılmalarını tetikleyen stres faktörlerinin engellenmesini arttırır (Şekil 6) (97).



Şekil 6. OPG ve RANKL reseptörünün arteroseklerоz ve vasküler hastalıklar üzerindeki etkilerinin gösterimi (98).

OPG'nin Vasküler Risk Faktörleriyle İlişkisi

OPG serum konsantrasyonları ile bilinen vasküler risk faktörleri arasında birçok ilişki belirlenmiştir. Bu ilişkilere örnek olarak, homosistein düzeylerinin pozitif korelasyonu, diyabet hastaları, sigara içme sıklığı, hipotiroid hastaları ve bazı böbrek hastalığı olan kişilerde ve yaşlılarda OPG'nin belirgin şekilde artışı, glukoz ve glukozlanmış hemoglobindeki artış gösterilebilir. Böbrek hastalıklarının; azalmış OPG atılımı, aterosklerozun etkilerinin artması ve kronik böbrek hastalığında damar kalsifikasyonlarına yol açması gibi etkilerinin bilinmesine karşın, bunlar henüz

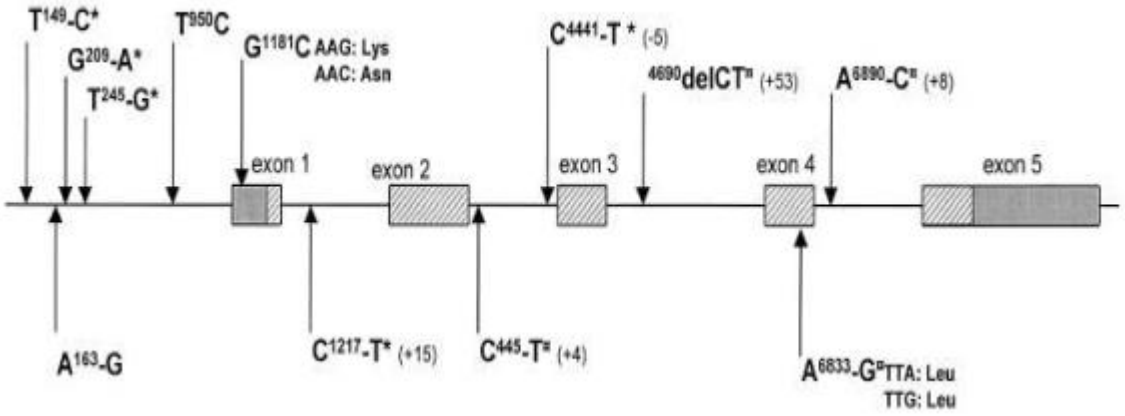
deneysel olarak ispatlanmamıştır (8). Bulgulara gore OPG, OPG/RANK/RANKL ekseni ve vasküler enflamasyon için güvenilir bir belirteçtir, laboratuvar analizlerinde de enflamasyon ve enfeksiyon belirteçleri gibi kullanılabilir. Ayrıca fibrinojen, yüksek duyarlıklı C-reaktif proteini, beyaz kan hücresi sayımı ve çözünebilen adezyon molekülleri için de kullanılabilir. Bel-kalça oranı, kan basıncı, kan basıncı ve kolesterol gibi diğer ilişkiler de açıklanmıştır, fakat eldeki veriler tam olarak tutarlı değildir (90). Çözünebilen RANKL düzeyleri, bilinen vasküler risk faktörleriyle ve standart laboratuvar parametreleriyle güçlü bir ilişki göstermemiştir (11).

OPG Yapısı, Görevleri ve Polimorfizmleri

OPG, tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ailesinin üyesi olan bir glikoprotein olup, NF-κB ligandının reseptör aktivatörünün reseptörü gibi davranarak osteoklast sürecini inhibe ettiği ve bu sayede osteoklast'ların diferansiyasyonunu engellediği ileri sürülmektedir (99). OPG, 60-kDa monomerik form ve ayrıca 120-kDa disulfid bağlı homodimerik formu olan ve 401 aminoasit biriminden oluşan bir glikoproteindir (100). İnsan OPG geni, 8.kromozomda bulunur (101).

OPG geninin promotor bölgesinde, 1-4 intronlarında ve 1-5 eksonları çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır (Şekil 7) (102,103).

Bunlar; 149 T C, 163 A G, 209 G A, 245 T G, 950 T C, 1181 G C (ekson 1), 1217 C T (ekson 2), 445 C T, 4441 C T (ekson 3), 4690 delesyon C T, 6833 A G (ekson4), 6890 A C (intron 4) olarak sıralanabilir.



Şekil 7. OPG geninde tanımlanan polimorfizmler (104).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

İskemik İnmeli Hastalarda Osteoprotegerin (OPG) T245G (rs 3134069) 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 22/11/2017 tarihli toplantısı sonucu alınan 20/07 sayılı karar ile tez çalışmamız kabul edilmiştir (Ek 1). Tez çalışmamız ayrıca 2018/229 nolu proje ile Bilimsel araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklendi (Ek 2).

Çalışmamız Özel Lüleburgaz Tıp Merkezi Nöroloji Polikliniğine başvurmuş ve iskemik inme tanısı almış hastalar ile diğer polikliniklere başvurmuş ancak iskemik inme tanısı almamış ve başka bir nörolojik rahatsızlığı bulunmayan kişilerin vermiş oldukları rutin kanlarla gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde Biyofizik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Hasta Grubu Olarak:

1) Özel Lüleburgaz Tıp Merkezi Fizik Tedavi Polikliniğine başvuran iskemik inme hastalığı tanısı almış olanlar,

2) Yaşları 19 veya 19'dan büyük olan yetişkin kadın ve erkek kişiler,

3) Diğer nörolojik hastalıkları (Parkinson, Alzheimer, Huntington, Wilson, Epilepsi, Polinöropatiler / Periferiknöropatiler gibi) bulunmayanlar,

4) İlaç ve alkol bağımlılığı olmayanlar 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 34 kişi erkek, 26 kişi ise kadındı. Kontrol gurubundaki 60 kişiden 30 kişi erkek, 30 kişi kadındı. Hasta grubunun yaş ortalaması 67,22 ve kontrol gurubunun yaş ortalaması 69,25 olarak hesaplandı.

Hasta ve kontrol gruplarından alınan kan örnekleri etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'li vakumlu tüplere alınarak Trakya Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı laboratuvarına 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. T245G gen polimorfizminin belirlenmesi için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) öncesinde istenen bölgeye özgü primerler sentezletildi ve PZR reaksiyonlarında $MgCl_2$ titrasyonu yapılarak kullanılacak uygun $MgCl_2$ miktarının 2,5 milimolar (mM) olduğu belirlendi.

Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle çoğaltılan DNA'lar %2'lik agarozlu jellere yüklendi. Jel hazırlanırken boyar madde olarak etidyumbromit (EtBr)

kullanıldı. Hazırlanmış olan %2'lik agaroz jele yüklenen örnekler yaklaşık 110 voltluk elektromotor kuvvet kullanılarak jel üzerinde yürümesi sağlandı. 30 dakika yürütülen DNA örnekleri transillüminatörle ultraviyole (UV) ışık altında gözlemlendi. Ardından çoğaltılan polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri istenen gen polimorfizmine özgü kesim enzimi kullanılarak restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFUP) yöntemi ile 37°C'de 1 saat kesime bırakıldı. Kesim işlemi sonucunda elde edilen ürünler etidyumbromid karıştırılarak hazırlanmış %3'lük agaroz jele yüklendi. Örnekler tekrardan 110 voltluk elektroforezde yürütüldü. 45 dakika yürütülen bu ürünler yine ultraviyole ışık altında incelenerek polimorfizmler saptandı. Osteoprotegerin (OPG) T245G gen polimorfizmi için Hinf I restriksiyon enzimi kullanıldı. Osteoprotegerin (OPG) T245G gen polimorfizm genotip dağılımı kesim sonucunda belirlendi (Tablo 4).

Hinf I Restriksiyon Enziminin Kesim Bölgesi

5' G↓ANTC 3'

3' CTNA↑G 5'

Tablo 4. Osteoprotegerin T245G gen polimorfizm kesim sonuçları

Polimorfizm Bölgesi	**Genotipler**	**Kesim Sonuçları**
OPG T245G	TT TG GG	195 ve 76 bç 271, 195 ve 76 bç 271 bç

TT: Timin-Timin; **TG:** Timin-Guanin; **GG:** Guanin-Guanin

PCR ile çoğaltılan Osteoprotegerin T245G geninin promotör bölgesinin HinfI kesim bölgesi (105).

CGAACCCTAGAGCAAAGTGC
CAAACTTCTGTCGATAGCTT
GAGGCTAGTGGAAAGACCTC
GAGGAGGCTACTCCAGAAGT
TCAGCGCGTAGGAAGCTCCG
ATACCAATAGCCCTTTGATG
ATGGTGGGGTTGGTGAAGG
GAACAGTGCTCCGCAAGGTTA
TCCCTGCCCCAGGCAGTCCA
ATTTTCACTCTGCA***G***

ATTCTCTCTGGCTCTAACTA
CCCCAGATAACAAGGAGTGA
ATGCAGAATAGCACGG***GCTT***
TAGGGCCAATCAGACA

KULLANILAN KİMYASAL MATERYALLER

Borik asit (Sigma)

Agaroz (İnvitrogen)

DNA marker seti, 100 bç (İnvitrogen)

Deoksinükleotittrifosfat (dNTP) (İnvitrogen)

Etanol (Riedel)

Etidyum bromür (EtBr) (İnvitrogen)

$MgCl_2$ (Fermentas)

Hinf I restriksiyon enzimi (ThermoScientific)

Primerler (İnvitrogen)

Proteinaz K (İnvitrogen)

Taq DNA polimeraz (İnvitrogen)

Tris (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)
Santrifüj Cihazları (HETTICH EBA 21, ALLEGRA X-22R)
Mikrodalga Fırın (VESTEL)
PZR cihazları (TECHNE, TECHNE TC-3000)

DNA izolasyonu

Kullanmış olduğumuz Thermo Fisher Purelink® Genomic DNA Mini Kit DNA izolasyon kiti kullanım protokolü:

1) 200 µl kana 20 µl Proteinaz K eklendi ve pipetle karıştırıldı.
2) Elde edilen örneğe 20 µl RNase A eklendi, vortekslendi ve 2 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
3) 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve homojen oluncaya kadar vortekslendi.
4) Ardından hazırlanmış olan karışım 55°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi.
5) 200 µl etanol eklendi ve otomatik pipet ile pipetleme yapılıp homojen oluncaya kadar vortekslendi..
6) Hazırlanmış olan karışım Thermo Fisher Purelink® Genomic DNA Mini Kit DNA izolasyon kitinin içerisinde bulunan spin kolonlarına aktarıldı ve 1 dakika 10000 RPM'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra alttaki kolon atılarak yerine yeni alt kolon yerleştirildi.
7) 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.

8) 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.

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

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

11) 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'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 primerler ve polimeraz enzimi kullanarak çoğaltılabildiği bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde kısa sürede milyonlarca gen kopyalanarak çoğaltılmaktadır. Bu teknik teşhis ve adli tıpta gen belirlenmesinde ya da özel DNA kısımlarının klonlanmasında ve gen ifadelerinin tespitinde kullanılabilmektedir (106).

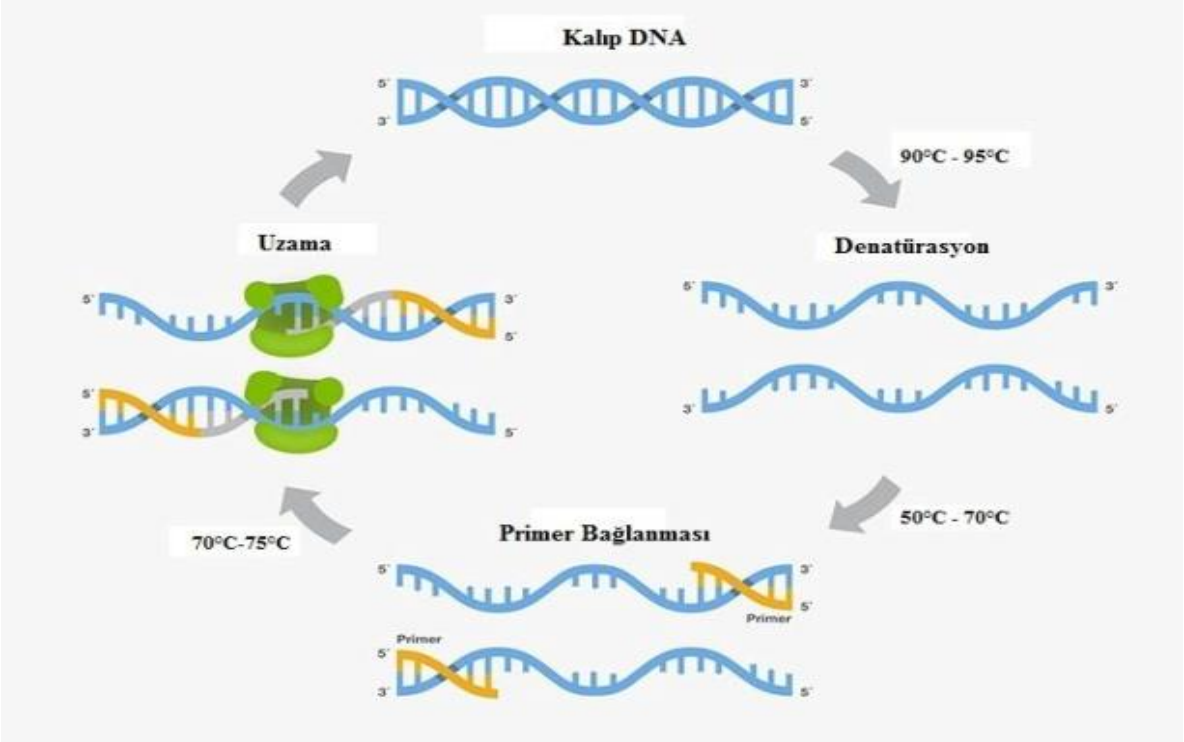
Polimeraz Zincir Reaksiyonu yönteminde sırasıyla üç temel aşamadan söz edilebilir. Bu aşamaların tekrarlanması sayısına bağlı olarak çoğaltılan DNA miktarı belirlenir.

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

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

3) DNA sentezi ya da primer uzaması (70-75ºC): DNA zincirinin uzadığı aşamadır (Şekil 8).

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 (106,107).



Şekil 8. Polimeraz zincir reaksiyon döngüsü (107).

Döngü bitince oluşan yeni DNA zincirleri sıradaki döngüler için kalıp DNA görevi üstlenebilir. İlk döngü sonucunda oluşan ürünler iki primerin bağlanma kısımları arası mesafesinden daha uzundur. İkinci döngü istenilen uzunluktaki DNA zincirini oluşturur. Döngü sayısına göre elde edilen ürün miktarı (2n-2n)x formülü ile hesaplanır. Bu formülde n döngü sayısını, x ise kalıp DNA'nın kopya sayısını göstermektedir (106). PZR yönteminde kullanılan temel bileşenler, kalıp DNA, Taq DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımları, enzim tamponu ve MgCl2'dir (108).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminde Kullanmış olduğumuz Primer Dizisi;

5' –CGA ACC CTA GAG CAA AGT GC- 3' (Forward)

5' –TGT CTG ATT GGC CCT AAA GC - 3' (Reverse)

Osteoprotegerin (OPG) T245G gen polimorfizmi için örnek başına kullanılan miktarlar;

2,5 µl PZR $MgCl_2$ Tamponu (Buffer)

2,5 µl $MgCl_2$

0,5 µl Primer F

0,5 µl Primer R

0,5 µl dNTP

0,25 µl Taq DNA polimeraz

1,5 µl izole edilmiş DNA

17,25 µl dH_2O

Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Koşullar

Osteoprotegerin (OPG) T245G gen polimorfizmi için;

Başlangıç : 95ºC, 5 dakika

94ºC, 60 saniye
56ºC, 30 saniye } 35 döngü
72ºC, 60 saniye

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 çoğunlukla bakterilerde, nadiren de virus ve ökaryot canlılarda bulunur (108). 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 (109).

Osteoprotegerin (OPG) T245G Gen Polimorfizmleri İçin Kesim Fragman Uzunluk Polimorfizmi Yöntemi

Örnek başına kullanılan miktarlar;
0,5 µl kesim enzimi (Hinf I)
1 µl 10x Fast Digest Buffer
Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünü
dH2O

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (Statistics Package of Social Science) v20 (Lisans No:10240642) istatistik programı ile yapılmıştır. Osteoprotegerin(OPG) T245G gen polimorfizmi genotip dağılımları yaş, hipertansiyon, diyabetes mellitus, sigara, alkol, kalp hastalıkları, açlık kan şekeri, kolesterol, trigliserid, HDL, LDL bulguları bakımından karşılaştırıldı. 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

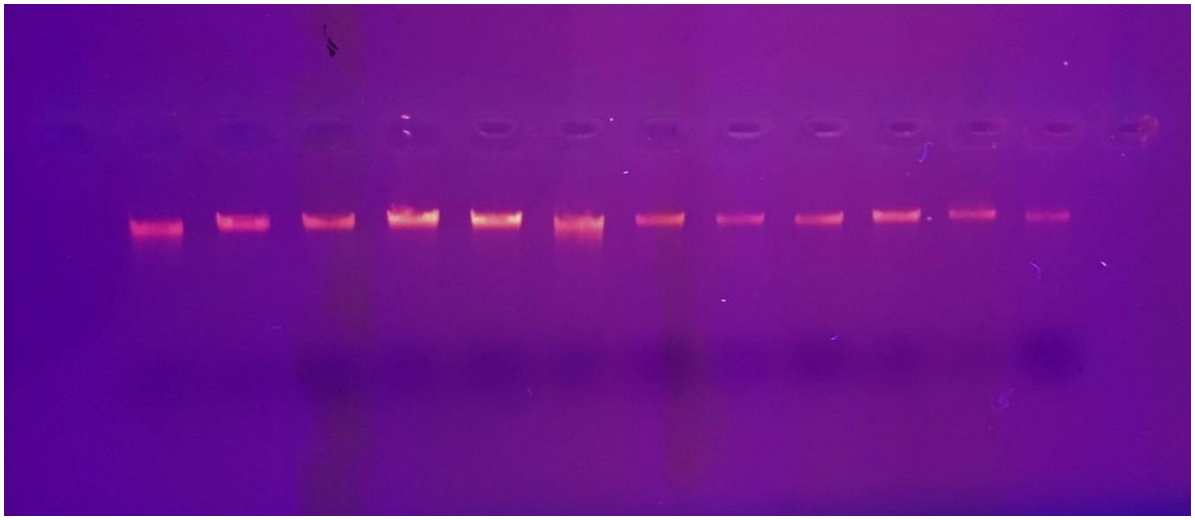
Yapılan tetkikler sonucunda iskemik inme tanısı almış olan hasta grubu ile kontrol grubu arasında yaş, hipertansiyon, diyabetes mellitus, sigara, alkol, kalp hastalıkları, açlık kan şekeri, kolesterol, trigliserid, HDL ve LDL bulguları karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Hasta ve kontrol grupları arasındaki bulguların karşılaştırılması

Hasta ve kontrol grupları klinik bulguları	Genel		P
	Hasta grubu n=60	Kontrol grubu n=60	
Yaş(yıl)	67,72±5,51	69,25±5,78	0,140
Hipertansiyon	%81,7(49)	%61,7(37)	0,015
Diyabetes mellitus	%51,7(31)	%35(21)	0,065
Sigara	%46,7(28)	%31,7(19)	0,092
Alkol	%21,7(13)	%16,7(10)	0,487
Kalp hastalıkları	%21,7(13)	%26,7(16)	0,522
Açlık kan şekeri(mg/dL)	111(101-38)	105(95-120)	0,063
Kolesterol (mg/dL)	183,81±46,00	179,58±29,93	0,551
Trigliserid (mg/dL)	132,50(111,50-158,75)	120(94,50-149,50)	0,188
HDL (mg/dL)	50,07±8,50	52,02±11,08	0,281
LDL (mg/dL)	114,62±29,90	126,47±23,78	0,018
Cinsiyet (Kadın)	%43,3(26)	%50(30)	0,464

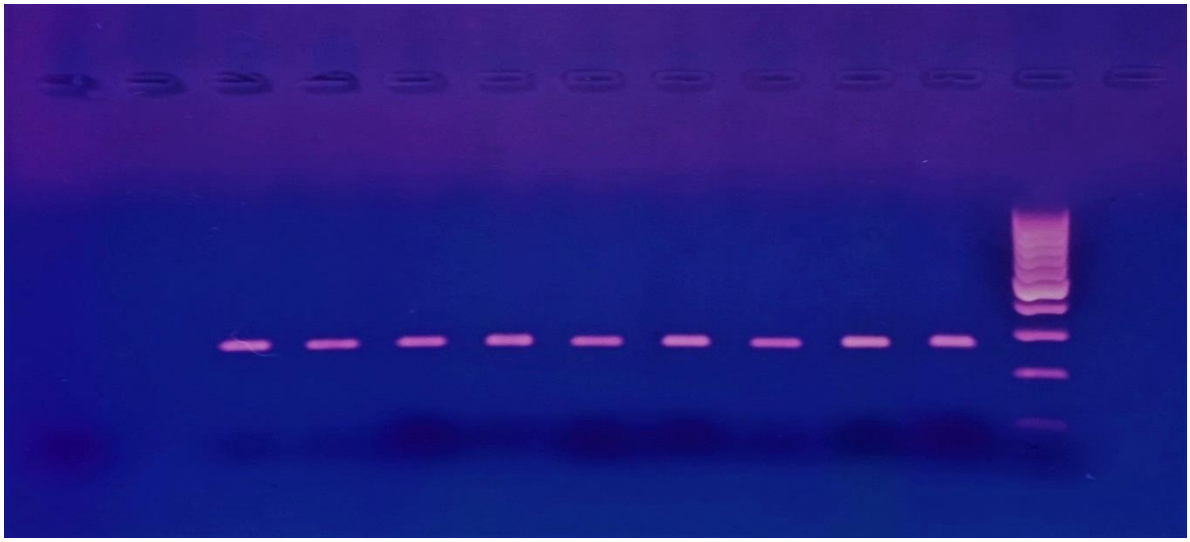
Ortalama ± standart sapma; ortanca (25 yüzdelik-75 yüzdelik); yüzde (sıklık)
LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein; HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein; p<0,05.

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 9).



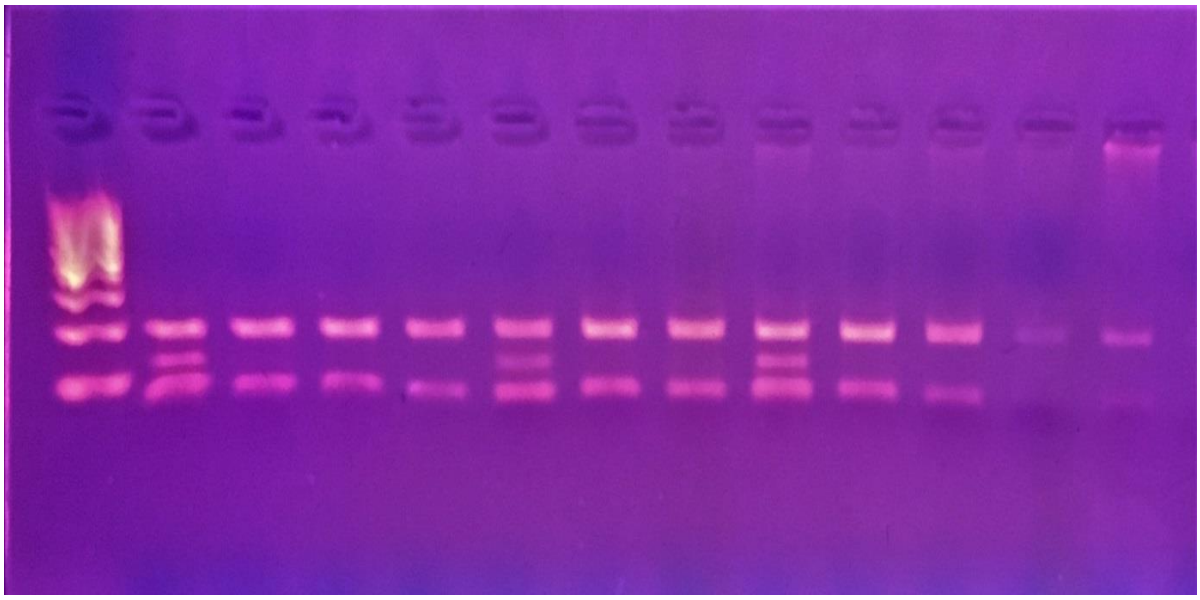
Şekil 9. Kan örneklerinden izole edilen DNA'ların %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek ultraviyole ışık altında görüntülenmesi.

İzole edilmiş olan DNA'lar % 0.8'lik agaroz jelde gözlemlendikten sonra osteoprotegerin T245G 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 10). Ürünlerin beklendiği gibi 271 bp aralığında olduğu gözlemlendi.



Şekil 10. Osteoprotegerin T245G gen polimorfizmi için hasta ve kontrol grupları için elde edilen PZR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde yürütülerek ultraviyole ışık altında görüntülenmesi.

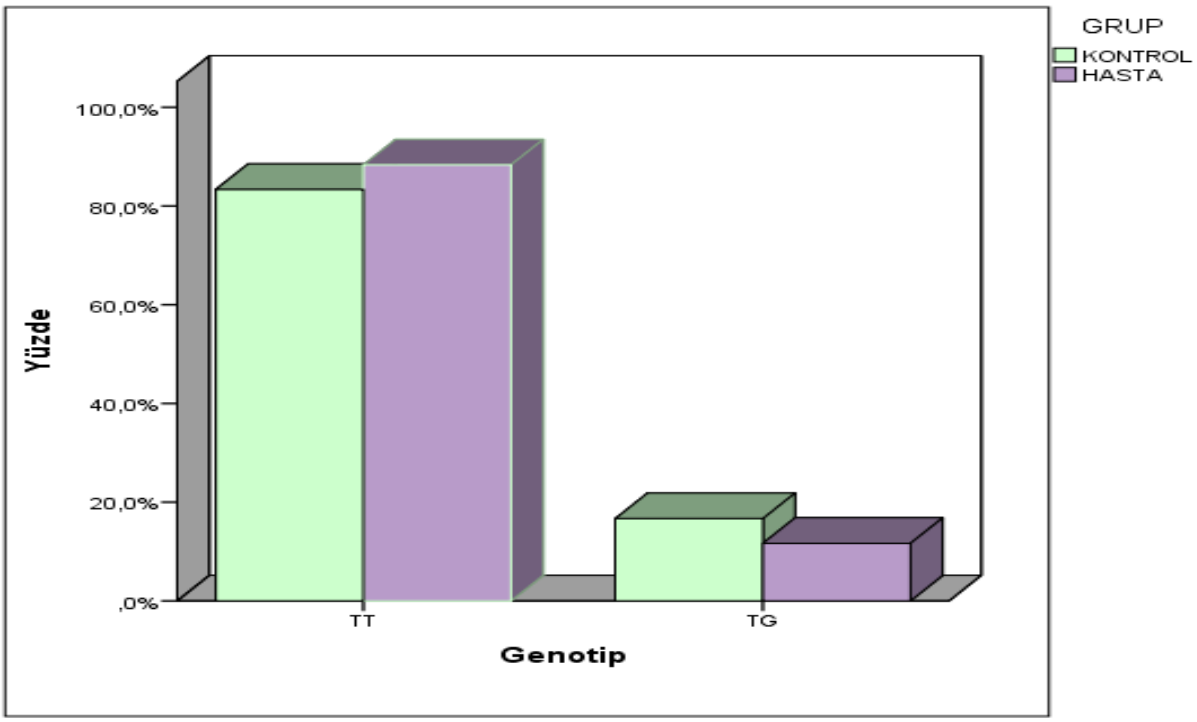
Osteoprotegerin T245G gen polimorfizmi sonucunda elde edilen PZR ürünleri ilgili bölgeye ait Hinf I kesim enzimi kullanılarak 37°C'de 1 saat süreyle bekletildi. 1 saat geçtikten sonra ürünler %3'lük agaroz jelde yürütüldü ve ultraviyole ışık altında gözlemlenerek hasta ve kontrol grupları için polimorfizmler belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Osteoprotegerin T245G gen polimorfizmi için kesim ürünlerinin %3'lük agaroz jelde yürütülmesinin ardından ultraviyole ışık altında görüntülenmesi.

Osteoprotegerin T245G Gen Polimorfizmi İçin Genotip Dağılımları

Osteoprotegerin T245G gen polimorfizmi için genotip dağılımı incelendiğinde, hasta grubunda TT genotipinin görüldüğü 53 (%88,3) hasta, TG genotipinin görüldüğü 7 (%30) hasta belirlenmiştir. Kontrol grubunda TT genotipinin görüldüğü 50 (%83,3) kişi, TG genotipinin görüldüğü 10 (%16,7) kişi görülmüş ancak GG genotipi her iki grupta da bulunamamıştır (Şekil 12).



Şekil 12. Hasta ve kontrol gruplarında OPG T245G gen polimorfizmi sonucunda elde edilen TT ve TG allelleri arasındaki ilişki.

Allel frekanslarına bakıldığında hasta grubunda T alleli için 113 (%94,17) , G alleli için 7 (%5,83) bulunmuştur. Kontrol grubunda ise T alleli için 110 (%91,67), G alleli için ise 10 (%8,33) bulunmuştur. İskemik inmeli hasta grubu ve kontrol grubu osteoprotegerin T245G gen polimorfizm bakımından incelendiğinde TT ve TG genotip sıklığı bakımından ve İstatistiksel olarak farklılık görülmemiştir (p:0,432) (Tablo 6).

Tablo 6. Hasta ve kontrol gruplarında OPG T245G gen polimorfizm dağılımları

OPG T245G	**Gruplar**		**p**
Genotipler / Allel Frekansları	**Hasta**	**Kontrol**	
TT	%88,3(53)	%83,3(50)	0,432
TG	%11,7(7)	%16,7(10)	
T Allel Frekansı	%94,17(113)	%91,67(110)	
G Allel Frekansı	%5,83(7)	%8,33(10)	

T: Timin; G: Guanin; TT: Timin-Timin; TG: Timin-Guanin; p<0,05.

Hasta ve kontrol gruplarının klinik özellikleri bakımından OPG T245G gen polimorfizminin TT ve TG allelleri ile ilişkisi incelendiğinde sadece sigara ve kalp hastalıkları için anlamlı bir istatistiksel fark gözlenmekle birlikte örneklem büyüklüğünün daha fazla genişletildiğinde anlamlı farkın daha da artacağını düşündürmüştür. TT ve TG allelleri için hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılan klinik özellikleri ve p değerleri Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Hasta ve kontrol gruplarında klinik bulgular ve gen polimorfizminin dağılımları

Hasta ve kontrol grupları klinik bulguları	Genel		P
	TT n=103	TG n=17	
Yaş(yıl)	68,22±5,69	70,06±5,52	0,218
Hipertansiyon	%71,8(74)	%70,6(12)	0,915
Diyabetes mellitus	%42,7(44)	%47,1(8)	0,738
Sigara	%42,7(44)	%17,6(3)	0,050
Alkol	%19,4(20)	%17,6(3)	0,864
Kalp hastalıkları	%27,2(28)	%5,9(1)	0,057
Açlık kan şekeri(mg/dL)	109(98-105)	105(100,50-121,50)	0,635
Kolesterol (mg/dL)	183,39±39,84	171,47±29,87	0,241
Trigliserid (mg/dL)	126(107-148)	135(97-168)	0,789
HDL (mg/dL)	51,38±10,12	49,00±8,22	0,360
LDL (mg/dL)	121,08±28,18	117,30±23,86	0,602
Cinsiyet (Kadın)	%48,5(50)	%35,3(6)	0,310

Ortalama ± standart sapma; ortanca (25 yüzdelik-75 yüzdelik); yüzde (sıklık) LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein; HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein; p<0,05.

TARTIŞMA

İskemik serebrovasküler hastalık, hem genetik hem de konvansiyonel risk faktörlerinden kaynaklandığı bilinen heterojen multifaktöriyel bir hastalıktır (110). İskemik inme gelişimi, genetik varyantlar, kronik hastalıklar, riskli davranışlar ve inflamasyon dahil olmak üzere birçok faktörün tek tek yada birlikte etkileşimine bağlıdır (111,115). Osteoklastogenez inhibitör faktör olarak da bilinen osteoprotegerin, sitokinler grubundaki tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesinin bir üyesidir (89). OPG, makrofajların farklılaşmasını bloke ederek osteoklastların üretimini inhibe eder ve aynı zamanda farklılaşmış osteoklastların işlevini de engelleyerek kemik tarafından emilimini önler. OPG'nin bu faktörün RANK'a bağlanmasını engelleyerek RANKL için sahte bir reseptör gibi davrandığı düşünülmektedir (116). Klinik olarak OPG, osteoporoz (117), inflamatuar kemik hastalıkları (118) ve aynı zamanda multipl miyelom ve malign kemik rezorpsiyonu (119) oluşumunda rol oynayabilir. Ayrıca OPG mutasyonları Paget hastalığının değişik formlarına yol açabilmektedir (120). İskelet sistemindeki rolüne ek olarak, OPG vasküler hastalık oluşumunda da rol oynayabilir. Bunların yanında yapılan klinik çalışmalarda OPG eksikliği olan farelerde aort ve renal arterlerin ciddi osteoporoz ve vasküler kalsifikasyonu arttırdığını göstermiştir (72). Bu fenotipin, rekombinant OPG veya transgenik müdahalelerle aşırı ekspresyonunun önlenebilir olduğu da bulunmuştur (94). OPG / RANKL / RANK sisteminin üyelerinin artan sistemik ve miyokardiyal ekspresyonu, hem klinik hem de deneysel kalp yetmezliğinde ayrıca kalp yetmezliğinin patogenezinde rol oynayan kemik

homeostazını da etkilediği düşündürmektedir (121). Yükselmiş serum OPG konsantrasyonlarının, periferik arter hastalığının şiddeti (122), kalp yetmezliği (121) ve semptomatik karotis darlığı (123) ile uyumlu olduğu da bulunmuştur. Angina (124), hassas karotis plakları (125) ve akut miyokard enfarktüsü (91), stabil aterosklerozlu kontrollerle karşılaştırılıp OPG geninde birkaç genetik polimorfizm tanımlanmıştır: bu SNP'lerin klinik önemi, bu gen varyantları tarafından plazma seviyelerinin ve / veya fonksiyonel aktivitenin kuvvetli bir şekilde etkilenebileceği gerçeğine dayanmaktadır. Son zamanlarda, yapılan çalışmalarda OPG genindeki T245G, T950C ve G1181C polimorfizmlerinin, internal karotis arter darlığı olan hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak daha yüksek olan median OPG protein konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (126). Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, Türk popülasyonunda T245G (rs 3134069), polimorfizmin iskemik serebrovasküler hastalıkta rol oynayıp oynamadığını belirlemektir.

Bilimsel literatürler incelendiğinde bu konuda yapılan fazla bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürdeki mevcut çalışmalara göre Biscetti ve arkadaşlarının İtalyan popülasyonunda 487 inme hastası ve 543 kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada rs3134069 gen polimorfizminin kontrol grubuna göre anlamlı oranda farklı olduğu gösterilmiştir (127).

Biscetti ve arkadaşlarının İtalyada yaptıkları başka bir çalışmada ise diyabetik hastalarda T245G (rs 3134069) gen polimorfizmi ile iskemik inme arasındaki ilişki araştırılmış. 364 hastada 124 GG, 176 TG ve 64 TT genotipi bulunmuştur. Bu sonuçlar kontrol grubuna göre anlamlı oranda farklılık göstermektedir (47 GG, 237 TG ve 208 TT) (126). Bu çalışma, OPG geninin rs 3134069, rs 2073617 ve rs 2073618 varyant genotiplerinin, diyabetik hastalarda artan iskemik inme riski ile anlamlı ve bağımsız olarak ilişkili olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Ayrıca bu çalışmanın önemli bir sonucu da, bu üç gen polimorfizminin inme öyküsü olan hastalarda sinerjik olarak etkilediğini göstermesidir.

Çin'de yapılan bir araştırmada da TNFRSF11B genindeki rs3134069 polimorfizmi ile iskemik inme arasında yeni ve oldukça önemli bir ilişki olduğu belirlenmiş (128). İtalya'da Biscetti tarafından 2013'te yapılan çalışmaya sadece diyabetik hastalar dahil edilmişken bu araştırmada böyle bir sınırlandırma yapılmamış ve daha kompleks bir popülasyon üzerinde araştırma yapılmış. rs3134069'daki risk alleli C ve azalmış TNFRSF11B ekspresyon seviyelerinin

iskemik inme patogenezi için bir risk faktörü olduğu gösterilmiş olup sonuçlar: daha önce yapılan araştırmaların tersine bir sonuç ortaya koymuştur. 2001 yılında yapılan başka bir çalışmada artmış serum OPG düzeyleri ile ölümcül inme arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (129). Literatürdeki bölgemiz popülasyonunda yapılan başka bir çalışmada Güldiken ve arkadaşları 51 inmeli hastada serum OPG düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış olduğunu tespit etmişlerdir (130). Üstündağ ve arkadaşları ise sağlıklı kontroller ile geçici iskemik atak geçiren hastalarla kardiyoembolik ve aterotrombotik inmeli hastaları karşılaştırdıkları başka bir çalışmada hasta grubunda serum OPG düzeylerinde anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir (131). Tüm bu sonuçlar serum OPG düzeyleri ve TNFRSF11B genotipindeki değişikliklerin vücudun ateroskleroza ve inmeye karşı adaptasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Bizim bu çalışmamız sonucunda ise 60 hastanın 53'ünde TT, 7'sinde de TG genotipi olduğu görülmüş olup ayrıca GG genotipine rastlanılmamıştır. Bulduğumuz bu sonuçlar kontrol grubu ile de anlamlı olarak farklı görülmemiştir (50 TT, 10 TG). Sonuçların bu şekilde farklı çıkmasının nedeni çalışmaya dahil edilen hasta sayıları, çevresel faktörler, etnik köken ve çalışmaya dahil etme kriterlerinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmaya dahil edilen hasta sayısının nispeten az olması, sadece tek bir merkeze başvuran hastaların alınması gibi faktörler çalışmamızın zayıf yönlerini oluşturmaktadır.

Sonuç olarak çalışmamızda amacımız T245G (rs 3134069), polimorfizminin iskemik serebrovasküler hastalıklarda rolünü tespit etmek olup ikisi hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Daha çok merkezin dahil edildiği, daha büyük gruplarda, hatta farklı etnik kökenlerden gelen kişiler üzerinde yapılacak çalışmalar ile T245G (rs 3134069) gen polimorfizmi ile inme arasındaki ilişkinin aydınlatılması sağlanabilir.

SONUÇLAR

Çalışmamızda Özel Lüleburgaz Tıp merkezi nöroloji polikliniğine başvuran ve yapılan tetkikler sonucunda iskemik inme tanısı konmuş olan 60 kişiden oluşan hasta grubu ile herhangi bir nörolojik rahatsızlığı olmayan 60 kişiden oluşan kontrol grubu için Osteoprotegerin T245G gen polimorfizmleri incelendi.

İskemik inmeli hasta grubu ve kontrol grubundan alınan kan örneklerinin osteoprotegerin T245G gen polimorfizmi işlemi sonucunda TT ve TG genotipleri karşılaştırıldığında önemli bir farklılık görülememiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde de hasta ve kontrol grupları arasında osteoprotegerin T245G gen polimorfizmi genotipleri bakımından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (p:0,432)

Hasta ve kontrol gruplarındaki klinik bulguların OPG T245G gen polimorfizmi sonucunda elde edilen TT ve TG allelleri ile ilişkisi incelendiğinde sigara (p:0,050) diğer klinik bulgular için anlamlı bir fark gözlenmedi.

Hasta ve kontrol gruplarındaki klinik bulguların OPG T245G gen polimorfizmi genotip dağılımlarının karşılaştırılmasında genel olarak erkek ve kadınlarda anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05).

Sonuç olarak literatürdeki çalışmalarda OPG T245G gen polimorfizmin iskemik inme ile ilişkisi olduğu saptanmış ise de, biz yapmış olduğumuz çalışmamızda OPG T245G gen polimorfizmin iskemik inme ile ilişkisi olmadığını bulduk. Sonuçların bu şekilde farklı çıkmasının sebebi; kontrol ve hasta grubundaki popülasyonların seçim kriterlerinin aynı olmaması, kişilerin farklı çevre koşullarında

yaşıyor olması, etnik köken farklılıkları, çalışmalara katılan örneklem sayılarının eşit olmaması ve az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Önemli bir sağlık problemi olan iskemik inmenin oluşumunda etkili olan genler bulunursa, iskemik inme geçirme riski taşıyan kişiler belirlenmiş olacak ve iskemik inme için yeni tedavi yöntemleri ve ilaçlar geliştirilebilecektir.

ÖZET

İnme, morbitide ve mortalite açısından bütün dünyada çok ciddi bir sağlık sorunudur. İnme geçirme oranı hipertansiyon, diyabetes mellitüs, kalp hastalıkları dislipidemi, sigara, arterial fibrasyon gibi bilinen risk faktörlerine bağlıdır. İskemik inmenin epidemiyolojik çalışmalarında elde edilen güçlü kanıtlar iskemik inmenin ortaya çıkmasında genetik faktörlerin önemli olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmanın amacı iskemik inme hastalarında Osteoprotegerin T245G gen polimorfizmleri genotip dağılımlarını inceledik. Biz bu polimorfizmlerin iskemik inme hastalığı için genetik bir risk faktörü olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda hasta grubu olarak 60 iskemik inmeli hasta ve kontrol grubu olarak nörolojik hastalığı olmayan 60 kişi bulunmaktadır. Osteoprotegerin T245G gen polimorfizmi, polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Çalışmamız sonucunda ise Osteoprotegerin T245G gen polimorfizminin iskemik inme hastalığı için genetik risk faktörü olmadığı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler:İskemik inme, OPG T245G gen polimorfizmi, Osteoprotegerin T245G gen polimorfizmi.

INVESTIGATION OF OSTEOPROTEGERIN (OPG) T245G GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE

SUMMARY

Stroke is a very serious health problem in terms of, morbidity and mortality. The rate of stroke depends on known risk factors such as hypertension, diabetes mellitus, heart disease dyslipidemia, smoking, arterial fibrillation. The strong evidence obtained in the epidemiological studies has showed the importance of genetic factors in ischemic stroke.

The aim of this study was to investigate the genotype distributions of osteoprotegerin T245G gene polymorphisms in patients with ischemic stroke. We aimed to investigate whether these polymorphisms are a genetic risk factor for ischemic stroke disease.

In our study, there were 60 patients with ischemic stroke as the patient group and 60 as the control group without neurological disease. Osteoprotegerin T245G gene polymorphism was determined using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism methods.

As a result of our study, it was found that osteoprotegerin T245G gene polymorphism was not a genetic risk factor for ischemic stroke disease.

Keywords: Ischemic stroke, OPG T245G gene polymorphism, Osteoprotegerin T245G gene polymorphism.

KAYNAKLAR

1. Steven D. Tintinalli's emergency medicine: a comprehensive study guide. Stroke Syndromes. 8th ed: New York: McGraw-Hill; 2016.

2. Aho K, Harmsen P, Hatano S, Marquardsen J, Smirnov VE, Strasser T. Cerebrovascular disease in the community: results of a WHO collaborative study. Bulletin of the World Health Organization. 1980;58(1):113.

3. Kumral E. İnmede Etyoloji, Sınıflandırma ve Risk Faktörleri. In: Sevin Balkan, editor. Serebrovasküler Hastalıklar. 3rd ed. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009. p. 51-63.

4. Sudlow C, Warlow C. Comparing stroke incidence worldwide: what makes studies comparable? Stroke. 1996;27(3):550-8.

5. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors J, 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.

6. 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.

7. Emre M. İnme Sınıflandırması. In: Emre M, editor. Nöroloji Temel Kitabı 1st ed. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2013. p. 692-95.

8. Kazama JJ, Shigematsu T, Yano K, Tsuda E, Miura M, Iwasaki Y, et al. Increased circulating levels of osteoclastogenesis inhibitory factor (osteoprotegerin) in patients with chronic renal failure. Am J Kidney Dis. 2002;39(3):525-32.

9. Van Campenhout A, Golledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. Atherosclerosis. 2009;204(2):321-9.

10. Nitta K, Akiba T, Uchida K, Otsubo S, Takei T, Yumura W, et al. Serum osteoprotegerin levels and the extent of vascular calcification in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant. 2004;19(7):1886-9.

11. Schett G, Kiechl S, Redlich K, Oberhollenzer F, Weger S, Egger G, et al. Soluble RANKL and risk of nontraumatic fracture. Jama. 2004;291(9):1108-13.

12. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, et al. Primary prevention of ischemic stroke: A guideline from the American heart association/American stroke association stroke council: Cosponsored by the atherosclerotic peripheral vascular disease interdisciplinary working group; cardiovascular nursing council; clinical cardiology council; nutrition, physical activity, and metabolism council; and the quality of care and outcomes research interdisciplinary working group: The American academy of neurology affirms the value of this guideline. Stroke. 2006;37(6):1583-633.

13. Fehm H, Kern W, Peters A. The selfish brain: competition for energy resources. Progress in brain research. 2006;153:129-40.

14. Chandra A, Li WA, Stone CR, Geng X, Ding Y. The cerebral circulation and cerebrovascular disease I: Anatomy. Brain Circulation. 2017;3(2):45.

15. Snell RS. Clinical anatomy for medical students: Little, Brown Medical Division; 1995.

16. Drake R, Vogl A, Mitchell A. Gray's Anatomy for Students. 3rd ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone. Elsevier; 2016.

17. Yıldırım M. Resimli sistematik anatomi: Nobel Tıp Kitabevleri; 2013.

18. Li WA, Geng X, Ding Y. Stroke is a global epidemic: new developments in clinical and translational cerebrovascular diseases research. Neurological research. 2017;39(6):475.

19. Eskander MS, Drew JM, Aubin ME, Marvin J, Franklin PD, Eck JC, et al. Vertebral artery anatomy: a review of two hundred fifty magnetic resonance imaging scans. Spine. 2010;35(23):2035-40.

20. Van Seeters T, Hendrikse J, Biessels GJ, Velthuis BK, Mali WP, Kappelle LJ, et al. Completeness of the circle of Willis and risk of ischemic stroke in patients without cerebrovascular disease. Neuroradiology. 2015;57(12):1247-51.

21. Mamo YA. Cerebrovascular effects of vasoactive drugs: University of Melbourne; 2015.

22. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. Nature neuroscience. 2007;10(11):1369.

23. Bjerring PN, Gluud LL, Larsen FS. Cerebral blood flow and metabolism in hepatic encephalopathy–a meta-analysis. Journal of clinical and experimental hepatology. 2018.

24. Obermeier B, Verma A, Ransohoff RM. The blood–brain barrier. Handbook of clinical neurology. 133: Elsevier; 2016. p. 39-59.

25. Daneman R, Prat A. The Blood–Brain Barrier. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2015;7(1).

26. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. Vander insan fizyolojisi: vücut fonksiyon mekanizmaları: Güneş Tıp Kitabevleri; 2014.

27. Pires PW, Ramos CMD, Matin N, Dorrance AM. The effects of hypertension on the cerebral circulation. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2013;304(12):H1598.

28. Committee AH. A classification and outline of cerebrovascular diseases II. Stroke. 1975;6:564-616.

29. McArdle PF, Kittner SJ, Ay H, Brown RD, Meschia JF, Rundek T, et al. Agreement between TOAST and CCS ischemic stroke classification: The NINDS SiGN Study. Neurology. 2014;83(18):1653-60.

30. Meckler G, Quereshi N, Al-Mogbil M, Kentab O. Tintinalli's emergency medicine: a comprehensive study guide: New York: McGraw-Hill; 2016.

31. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. 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.

32. Kutluk K. İskemik İnme. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2004. p. 135-45.

33. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. The Lancet. 2006;367(9524):1747-57.

34. Rubin M, Safdieh JE. Netter's Concise Neuroanatomy Updated Edition E-Book: Elsevier Health Sciences; 2016.

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

36. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. The Lancet. 2002;360(9349):1903-13.

37. Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, Larson MG, Kannel WB, D'agostino RB, et al. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. Jama. 2002;287(8):1003-10.

38. Chobanian A, Bakris G, Black H, Cushman W, Green L, Izzo Jr J, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. JAMA. 2003;289(19):2560.

39. Neal B, MacMahon S, Chapman N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Lancet 2000;356(9246):1955-64.

40. Burchfiel CM, Curb JD, Rodriguez BL, Abbott RD, Chiu D, Yano K. Glucose intolerance and 22-year stroke incidence. The Honolulu Heart Program. Stroke. 1994;25(5):951-7.

41. Simons LA. Triglyceride levels and the risk of coronary artery disease: a view from Australia. American Journal of Cardiology. 1992;70(19):H14-H8.

42. Urbinati S, Di Pasquale G, Andreoli A, Lusa AM, Ruffini M, Lanzino G, et al. Frequency and prognostic significance of silent coronary artery disease in patients with cerebral ischemia undergoing carotid endarterectomy. American Journal of Cardiology. 1992;69(14):1166-70.

43. Shinton R, Beevers G. Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. Bmj. 1989;298(6676):789-94.

44. Autret A, Saudeau D, Bertrand PH, Pourcelot L, Marchal C, De Boisvilliers S. Stroke Risk In Patients With Carotid Stenosis. The Lancet. 1987;329(8538):888-90.

45. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular Accidents in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors. Blood. 1998;91(1):288-94.

46. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. Stroke. 1991;22(8):983-8.

47. Hillbom M, Numminen H, Juvela S. Recent heavy drinking of alcohol and embolic stroke. Stroke. 1999;30(11):2307-12.

48. Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, et al. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. Jama. 1997;277(19):1539-45.

49. Johnsen SP, Overvad K, Stripp C, Tjonneland A, Husted SE, Sorensen HT. Intake of fruit and vegetables and the risk of ischemic stroke in a cohort of Danish men and women. Am J Clin Nutr. 2003;78(1):57-64.

50. Perry IJ, Beevers DG. Salt intake and stroke: a possible direct effect. J Hum Hypertens. 1992;6(1):23-5.

51. Khaw KT, Barrett-Connor E. Dietary potassium and stroke-associated mortality. A 12-year prospective population study. The New England journal of medicine. 1987;316(5):235-40.

52. Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, Arena R, Balady GJ, Bittner VA, et al. Exercise standards for testing and training: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 2013;128(8):873-934.

53. Perez JA, Jr., Arsura EL, Strategos S. Methamphetamine-related stroke: four cases. J Emerg Med. 1999;17(3):469-71.

54. Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, Siscovick DS, Mouton CP, Rifai N, et al. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. Jama. 2002;288(8):980-7.

55. Folsom AR, Aleksic N, Catellier D, Juneja HS, Wu KK. C-reactive protein and incident coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. Am Heart J. 2002;144(2):233-8.

56. Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Selhub J, Bowman BA, Gunter EW, et al. Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Clin Nutr. 1999;69(3):482-9.

57. Boysen G, Brander T, Christensen H, Gideon R, Truelsen T. Homocysteine and risk of recurrent stroke. Stroke. 2003;34(5):1258-61.

58. Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F, Taub NA, Hunt BJ, Hughes GR. The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. The New England journal of medicine. 1995;332(15):993-7.

59. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation. 2009;119(3):480-6.

60. Wei W, Li S, San F, Zhang S, Shen Q, Guo J, et al. Retrospective analysis of prognosis and risk factors of patients with stroke by TOAST. Medicine (Baltimore). 2018;97(15):e0412.

61. Rosamond WD, Folsom AR, Chambless LE, Wang CH, McGovern PG, Howard G, et al. Stroke incidence and survival among middle-aged adults: 9-year follow-up of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) cohort. Stroke. 1999;30(4):736-43.

62. He J, Klag MJ, Wu Z, Whelton PK. Stroke in the People's Republic of China. I. Geographic variations in incidence and risk factors. Stroke. 1995;26(12):2222-7.

63. Brass LM, Isaacsohn JL, Merikangas KR, Robinette CD. A study of twins and stroke. Stroke. 1992;23(2):221-3.

64. Jerrard-Dunne P, Cloud G, Hassan A, Markus HS. Evaluating the genetic component of ischemic stroke subtypes: a family history study. Stroke. 2003;34(6):1364-9.

65. Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. Stroke incidence, prevalence, and survival: secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989. Stroke. 1996;27(3):373-80.

66. Sacco RL, Boden-Albala B, Gan R, Chen X, Kargman DE, Shea S, et al. Stroke incidence among white, black, and Hispanic residents of an urban community: the Northern Manhattan Stroke Study. Am J Epidemiol. 1998;147(3):259-68.

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

68. Jorgensen HL, Kusk P, Madsen B, Fenger M, Lauritzen JB. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios. J Bone Miner Metab. 2004;22(2):132-8.

69. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med. 2006;12(1):17-25.

70. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. Jama. 2004;292(4):490-5.

71. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. Arthritis Res Ther. 2007;9 Suppl 1:S1.

72. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes & development. 1998;12(9):1260-8.

73. Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, et al. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE-/- mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(9):2117-24.

74. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. Circ Res. 2004;95(11):1046-57.

75. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. Endocrinology. 2001;142(4):1419-26.

76. Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, et al. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. J Biol Chem. 2006;281(48):36846-55.

77. Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, et al. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. Cancer Cell. 2005;7(5):485-96.

78. Schett G, Hayer S, Zwerina J, Redlich K, Smolen JS. Mechanisms of Disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. Nat Clin Pract Rheumatol. 2005;1(1):47-54.

79. Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Ma L, Looney RJ, Ritchlin CT, et al. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11bhigh osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. Arthritis Rheum. 2004;50(1):265-76.

80. Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. Nat Med. 2006;12(6):657-64.

81. Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. Cell. 2000;103(1):41-50.

82. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. Mol Cell Biol. 2006;26(3):1002-13.

83. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. Nature. 2002;416(6882):744-9.

84. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. Nature. 2000;408(6812):600-5.

85. Montecucco F, Steffens S, Mach F. The immune response is involved in atherosclerotic plaque calcification: could the RANKL/RANK/OPG system be a marker of plaque instability? Clin Dev Immunol. 2007;2007:75805.

86. Kiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2006;4(6):801-11.

87. Beckman J, Ganz J, Creager M, Ganz P, Kinlay S. Relationship of clinical presentation and calcification of culprit coronary artery stenoses. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2001;21(10):1618-22.

88. Truneh A, Sharma S, Silverman C, Khandekar S, Reddy MP, Deen KC, et al. Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. J Biol Chem. 2000;275(30):23319-25.

89. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 1997;89(2):309-19.

90. Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberhollenzer M, Mayr A, et al. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. Circulation. 2004;109(18):2175-80.

91. Crisafulli A, Micari A, Altavilla D, Saporito F, Sardella A, Passaniti M, et al. Serum levels of osteoprotegerin and RANKL in patients with ST elevation acute myocardial infarction. Clinical science (London, England : 1979). 2005;109(4):389-95.

92. Schoppet M, Sattler AM, Schaefer JR, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC. Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2003;88(3):1024-8.

93. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004;286(5):E686-96.

94. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. The Journal of experimental medicine. 2000;192(4):463-74.

95. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21(12):1998-2003.

96. Tintut Y, Demer LL. Recent advances in multifactorial regulation of vascular calcification. Curr Opin Lipidol. 2001;12(5):555-60.

97. Huang H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT. The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. Circulation. 2001;103(8):1051-6.

98. Esen B. Diyabet hastalığında osteoprotegerin (opg) proteini t950c gen polimorfizminin incelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2010.

99. Rhee EJ, Oh KW, Jung CH, Lee WY, Oh ES, Yun EJ, et al. The relationship between four single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the

osteoprotegerin gene and aortic calcification or coronary artery disease in Koreans. Clinical Endocrinology. 2006;64(6):689-97.

100. Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, et al. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. J Biol Chem. 1998;273(9):5117-23.

101. Mizuno A, Murakami A, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Morinaga T, et al. Structure of the mouse osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) gene and its expression in embryogenesis. Gene. 1998;215(2):339-43.

102. Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, et al. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. J Hum Genet. 2002;47(8):400-6.

103. Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K, Daly M, Shanahan F, Molloy MG, et al. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. Calcif Tissue Int. 2002;71(1):26-35.

104. Jono S, Shioi A, Ikari Y, Nishizawa Y. Vascular calcification in chronic kidney disease. J Bone Miner Metab. 2006;24(2):176-81.

105. Guo C, Hu F, Zhang S, Wang Y, Liu H. Association between osteoprotegerin gene polymorphisms and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients. Genetics and molecular biology. 2013;36(2):177-82.

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

107. [cited 2018 December 11]. Available from: 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.html.

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

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

110. Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. The Lancet Neurology. 2007;6(2):149-61.

111. Hassan A, Markus HS. Genetics and ischaemic stroke. Brain : a journal of neurology. 2000;123 (Pt 9):1784-812.

112. Elkind MS. Inflammatory mechanisms of stroke. Stroke. 2010;41(10 Suppl):S3-8.

113. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. The New England journal of medicine. 2005;352(16):1685-95.

114. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Forte GI, Casuccio A, Vaccarino L, Scola L, et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of pro-inflammatory/anti-inflammatory and thrombotic/fibrinolytic genes in patients with acute ischemic stroke in relation to TOAST subtype. Cytokine. 2012;58(3):398-405.

115. Santl Letonja M, Letonja M, Ikolajevic-Starcevic JN, Petrovic D. Association of manganese superoxide dismutase and glutathione S-transferases genotypes with carotid atherosclerosis in patients with diabetes mellitus type 2. International angiology : a journal of the International Union of Angiology. 2012;31(1):33-41.

116. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 2003;423(6937):337-42.

117. Dai Y, Shen L. Relationships between serum osteoprotegerin, matrix metalloproteinase-2 levels and bone metabolism in postmenopausal women. Chinese medical journal. 2007;120(22):2017-21.

118. Turk N, Cukovic-Cavka S, Korsic M, Turk Z, Vucelic B. Proinflammatory cytokines and receptor activator of nuclear factor kappaB-ligand/osteoprotegerin associated with bone deterioration in patients with Crohn's disease. European journal of gastroenterology & hepatology. 2009;21(2):159-66.

119. Goranova-Marinova V, Goranov S, Pavlov P, Tzvetkova T. Serum levels of OPG, RANKL and RANKL/OPG ratio in newly-diagnosed patients with multiple myeloma. Clinical correlations. Haematologica. 2007;92(7):1000-1.

120. Whyte MP. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. Annals of the New York Academy of Sciences. 2006;1068:143-64.

121. Ueland T, Yndestad A, Oie E, Florholmen G, Halvorsen B, Froland SS, et al. Dysregulated osteoprotegerin/RANK ligand/RANK axis in clinical and experimental heart failure. Circulation. 2005;111(19):2461-8.

122. Ziegler S, Kudlacek S, Luger A, Minar E. Osteoprotegerin plasma concentrations correlate with severity of peripheral artery disease. Atherosclerosis. 2005;182(1):175-80.

123. Golledge J, McCann M, Mangan S, Lam A, Karan M. Osteoprotegerin and osteopontin are expressed at high concentrations within symptomatic carotid atherosclerosis. Stroke. 2004;35(7):1636-41.

124. Sandberg WJ, Yndestad A, Oie E, Smith C, Ueland T, Ovchinnikova O, et al. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(4):857-63.

125. Straface G, Biscetti F, Pitocco D, Bertoletti G, Misuraca M, Vincenzoni C, et al. Assessment of the genetic effects of polymorphisms in the osteoprotegerin gene, TNFRSF11B, on serum osteoprotegerin levels and carotid plaque vulnerability. Stroke. 2011;42(11):3022-8.

126. Biscetti F, Straface G, Giovannini S, Santoliquido A, Angelini F, Santoro L, et al. Association between TNFRSF11B gene polymorphisms and history of ischemic stroke in Italian diabetic patients. Human genetics. 2013;132(1):49-55.

127. Biscetti F, Giovannini S, Straface G, Bertucci F, Angelini F, Porreca C, et al. RANK/RANKL/OPG pathway: genetic association with history of ischemic stroke in Italian population. European review for medical and pharmacological sciences. 2016;20(21):4574-80.

128. Xiong X, Naji DH, Wang B, Zhao Y, Wang J, Wang D, et al. Significant Association between OPG/TNFRSF11B Variant and Common Complex Ischemic Stroke. Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association. 2018;27(6):1683-91.

129. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2001;86(2):631-7.

130. Guldiken B, Guldiken S, Turgut B, Turgut N, Demir M, Celik Y, et al. Serum osteoprotegerin levels in patients with acute atherothrombotic stroke and lacunar infarct. Thrombosis research. 2007;120(4):511-6.

131. Ustundag M, Orak M, Guloglu C, Tamam Y, Sayhan MB, Kale E. The role of serum osteoprotegerin and S-100 protein levels in patients with acute ischaemic stroke: determination of stroke subtype, severity and mortality. The Journal of international medical research. 2011;39(3):780-9.

ŞEKİLLER LİSTESİ

TABLOLAR

Tablo 1. Serebravaküler hastalıkların sınıflandırılması 9
Tablo 2. İskemik inmede risk faktörleri..... 13
Tablo 3. TOAST çalışmasına göre kalp hastalıklarının risk grupları 15
Tablo 4. Osteoprotegerin T245G gen polimorfizmleri kesim sonuçları 29
Tablo 5. Hasta ve kontrol grupları arasındaki bulguların karşılaştırılması..... 36
Tablo 6. Hasta ve kontrol gruplarında OPG T245G gen polimorfizmleri genotip dağılımları 39
Tablo 7. Hasta ve kontrol gruplarında klinik bulgular ve gen polimorfizminin dağılımları 40

ŞEKİLLER

Şekil 1. Serebral Dolaşım. 5
Şekil 2. Otoregülasyon şeması. 7
Şekil 3. İskemik İnme. 12
Şekil 4. OPG artışının şematik gösterimi. 22
Şekil 5. Plaktaki potansiyel OCL (osteoclast benzeri hücre) diferensiyasyonu. 23
Şekil 6. OPG ve RANKL reseptörünün arterosekleroz ve vasküler hastalıkla üzerindeki etkilerinin gösterimi. 25

Şekil 7. OPG geninde tanımlanan polimorfizmler. 26
Şekil 8. Polimeraz zincir reaksiyon döngüsü.....33
Şekil 9. Kan örneklerinden izole edilen DNA'ların %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek ultraviyole ışık altında görüntülenmesi. 37
Şekil 10. Osteoprotegerin T245G gen polimorfizmi için hasta ve kontrol grupları için elde edilen PZR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde yürütülerek ultraviyole ışık altında görüntülenmesi.....37
Şekil 11. Osteoprotegerin T245G gen polimorfizmi için kesim ürünlerinin % 2.5'lik agaroz jelde yürütülmesinin ardından ultraviyole ışık altında görüntülenmesi.....38
Şekil 12. Hasta ve kontrol gruplarında OPG T245G gen polimorfizmi sonucunda elde edilen TT ve TG allelleri arasındaki ilişki. 39

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Konya'nın Ereğli ilçesinde doğdum. Lise eğitimimi 2009 yılında Konya Ereğli Anadolu Lisesi'nde tamamladım. Lisans eğitimimi 2012-2016 yılları arasında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesinde Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü'nde tamamladım. 2016 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım. 2016 yılından beri özel bir tıp merkezinde Fizyoterapist olarak görev yapmaktayım.

EKLER

Ek 1

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

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2017/281	
	PROTOKOL ADI	İskemik İnmeli Hastalarda Osteoprotegerin (OPG) T245G (rs 3134069) Gen Polimorfizminin Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof. Dr. Tammam SİPAHİ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 20/07**	**Tarih:22.11.2017**	
	Fakültemiz Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tammam SİPAHİ'nin sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Bahattin Erol KOÇAK'ın 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 ödetilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği 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. Rugül KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E H	E H	İzinli
Yrd. Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E (H)	(E) H	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN 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	
Yrd. Doç. Dr. Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji 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	
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	İzinli
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E (H)	E H	
Avukat Gönül ÜSTÜN Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E (H)	(E) H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd.

Ek 2

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı

Sayı : 59803669-604.99 -E.119486 31/08/2018
Konu : Sözleşme

Sayın Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz, yüksek lisans öğrencisi Bahattin Erol KOÇAK'ın "İskemik İnmeli Hastalarda Osteoprotegerin (OPG) T245G (Rs3134069) Gen Polimorfizminin Araştırılması" başlıklı yüksek lisans projesinin, 12 (on iki) ay süre ve 14.972,00 TL ile desteklenmesine Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 14.08.2018 tarih ve 2018/12 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 8. maddesinin 4. bendi uyarınca düzenlenen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Mümin ŞAHİN
Rektör Yardımcısı

Ek:Protokol sözleşmesi (2 sayfa)

BELGENİN ASLI
ELEKTRONİK İMZALIDIR
03.09.2018

Evrakı Doğrulamak İçin : https://ebys.trakya.edu.tr/enVision/Validate_Doc.aspx?V=BE5U4PTHB

Adres:Trakya Üniversitesi Rektörlüğü İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı Balkan Yerleşkesi Edirne 22030
Telefon:2842234210 Faks2842235507
E-Posta:idamali@trakya.edu.tr Elektronik Ağ:http://imdb.trakya.edu.tr/
Bilgi için: Cennet AYYILDIZ
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ SÖZLEŞMESİ

PROJE NO: 2018/229
PROJE NİTELİĞİ: YÜKSEK LİSANS

1-PROJE BAŞLIĞI

İskemik inmeli hastalarda Osteoprotegerin (OPG) T245G (rs3134069) gen polimorfizminin araştırılması.

2-PERSONEL BİLGİLERİ

	Adı ve Soyadı	Unvanı	Telefon
Proje Yöneticisi	Prof.Dr. Tammam SİPAHİ	Prof.Dr.	(284)235-7641
Araştırmacılar	Öğrenci Bahattin Erol KOÇAK	Öğrenci	(554)640-8385

3-PROJE BÜTÇESİ

Teçhizatın Tanımı :	**Detay listesi ektedir.**
Ekonomik Kod	**Toplam Fiyatı (TL)**
03.03 Yolluk	
03.05 Hizmet Alımı	
03.02 Tüketime Yönelik Mal ve Malzeme Alımı	14,972.00
03.07 Menkul Mal, Gayrimaddi Hak Alım, Bakım ve Onarım Giderleri	
06.01 Mamul Mal Alımı	
TOPLAM ÖDENEK	14,972.00

3-PROJE GELİŞİMİ

1.Projenin Kabul Tarihi: 14-08-2018		
2.Projenin Başlama Tarihi :29-08-2018	**1.Ara Rapor** : 28-02-2019	**Sonuç :** ..... (+ / -)
3.Projenin Bitiş Tarihi : 29-08-2019	**Sonuç Raporu** : 31-08-2019	**Sonuç :** ..... (+ / -)
4.Projenin Süresi: 12 Ay		

5.İLGİLİ BÖLÜM VE FAKÜLTE:

TIP FAKÜLTESİ / TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ

6.PROJENİN UYGULAMASI

1. Bu proje 2547 sayılı YÖK Kanununun 4684 sayılı Kanunla değişik 58.maddesi gereğince, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma Projeleri Hakkında Yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Uygulama Yönergesi çerçevesinde yürütülür.

2. Proje süresinde ve harcama fasıllarında Rektörlük onayı alınmadan değişiklik yapılamaz.

3. Proje Yöneticisi her 6 ayın sonunda gelişme raporunu, Bölüm Başkanlığı ve ilgili Dekanlık veya Enstitü Müdürlüğü aracılığı ile Rektörlüğe iletmekle yükümlüdür.

4. Projelerden alınan teçhizat tüm öğretim üyelerinin kullanımına açıktır.

5. Bir ay geçtiği halde gelişme raporu verilmemiş veya süresi bitmiş olup süre uzatımı talebinde bulunulmamış projeler iptal edilir. Bakiye ödenek, BAP Komisyonu tarafından kabul edilecek yeni projelere tahsis edilir veya diğer projelere aktarılır.

	Adı-Soyadı	Tarih	İmza
Proje Yöneticisi :	Prof.Dr. Tammam SİPAHİ	04.09.2018	

Komisyon Başkanı

Prof. Dr. Mümin ŞAHİN
Rektör Yardımcısı