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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

İSKEMİK İNMELİ HASTALARDA MATRİX Gla PROTEİNİN G-7A VE T-138C GEN POLİMORFİZMLERİNİN HASTALIK İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Damla Duru KOÇER

EDİRNE-2020

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

İSKEMİK İNMELİ HASTALARDA MATRİX Gla PROTEİNİN G-7A VE T-138C GEN POLİMORFİZMLERİNİN HASTALIK İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Damla Duru KOÇER

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2019/65

Tez No:

EDİRNE-2020

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 Damla Duru KOÇER tarafından tez başlığı "İskemik İnmeli Hastalarda Matrix Gla Proteinin G-7A ve T-138C Gen Polimorfizmlerinin Hastalık ile İlişkisinin Araştırılması" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı **02/01/2020** yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
JÜRİ BAŞKANI

Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ÜNLÜ
ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU
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 birikimiyle, 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, Dr. Öğr. Üyesi Metin BUDAK'a, Biyofizik AD çalışanlarına, Nöroloji Bölümü çalışanı Dr. Hatice SEĞMEN'e; Biyoistatistik AD çalışanı Dr. Öğr. Üyesi Selçuk Korkmaz'a, çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (TÜBAP), bu dönemde bana manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ…… 1

GENEL BİLGİLER…… 3

SEREBROVASKÜLER HASTALIK……..……. 3

SEREBRAL DOLAŞIM……. 3

OTOREGÜLASYON MEKANİZMASI…….. 6

İNME……. 7

İSKEMİK İNME…….. 9

KALITIM İLE İLİŞKİSİ……... 11

MATRİX GLA PROTEİNİ……...…..…….. 12

GEREÇ VE YÖNTEMLER…… 14

BULGULAR…….. 26

TARTIŞMA…… 33

SONUÇLAR……... 36

ÖZET…….. 39

SUMMARY…… 41

KAYNAKLAR……... 43

ŞEKİLLER LİSTESİ…… 47

ÖZGEÇMİŞ…… 49

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

MGP : Matrix Gla Protein

SVH : Serebrovasküler Hastalık

SNP : Single Nucleotide Polymorphism(Tek Nükleotid Polimorfizmi)

DALY : Disability Adjusted Life Year(Yeti Yitimine Ayarlanmış Yaşam Yılı)

TOAST : Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment

BT : Bilgisayarlı Tomografi

MR : Manyetik Rezonans

USG : Ultosonografi

GİRİŞ VE AMAÇ

Serebrovasküler hastalıklar heterojen bir etyolojik yapıya sahiptir. Genellikle klinik olarak akut nörolojik defisit olarak kendini gösterir, ayrıca inme olarak da bilinir veya daha az yaygın olarak baş ağrısı veya nöbet gibi semptomlarla görülür (1).

İnme, beyne giden kan akımının, damarların pıhtı ile tıkanması ya da zedelenmesi sonucu kesilmesi ile oluşur (2). İnme uzun vadeli ciddi sakatlıklara neden olabilen önemli bir hastalıktır (1). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre inme, dünyanın ikinci önde gelen ölüm nedenidir, yılda yaklaşık 6.000.000 kişinin ölümüyle sonuçlanmaktadır ve bu verilere göre dünyada yaşayan herhangi bir bireyin yaşam boyu inme riski %8 ile %10 arasındadır (3,4). Tüm inmelerin %85'ini iskemik inme (damar tıkanıklığı) oluştururken geri kalan kısmını ise hemorajik inme (intraserebral kanamalar) oluşturur (5). İskemi, normal hücresel fonksiyonu sürdürmek için gerekli olan kanın akışında azalma olarak tanımlanır. Beyin dokusu iskemiye son derece hassastır, kısa iskemik dönemler bile hücresel ölümle sonuçlanabilecek karmaşık bir olaylar dizisini başlatabilmektedir (6).

Arter duvarlarına kalsiyum tuzu birikmesi, iskemik inme gelişimi için önemli bir olaydır. Damar kalsifikasyonunda rol oynayan faktörler arasında, yumuşak dokuların mineralleşmesinin doğal bir inhibitörü ve K vitaminine bağlı protein grubunun bir temsilcisi olan Matriks Gla proteini (MGP) kendini göstermektedir. MGP geni, insanların 12. kısa kromozom kollarında (12p13.1 – p12.3) bulunur. Olgun proteinin 84 tane kodlu amino asit rezidüsünü ve transmembran sinyal peptidinin 19 rezidüsünü içerir. Gen uzunluğu, 3900

nükleotittir ve genel gen uzunluğunun % 80'ini oluşturan üç intronla bölünmüş dört ekzondan oluşur. MGP'nin damar duvarı kalsifikasyonu gelişimi üzerindeki muhtemel etkilerini göz önüne alarak, MGP gen ekspresyonu durumunu etkileyen genetik polimorfizmin, kalsifikasyonla ilişkili hastalıkların ilerleyişini ve dolayısıyla ana komplikasyonlarının gelişimini belirleyici olduğunu varsayabiliriz (7).

Bu çalışmada, insan MGP genindeki tek nükleotid polimorfizmlerinden, G-7A'nın (rs1800801) ve T-138C'nin (rs1800802) polimorfizmlerine bakılmıştır. Buradan yola çıkarak günümüzde iskemik inmenin yol açtığı komplikasyonlara neden olan gen polimorfizmlerinin bilinmesi, bunların rol oynadıkları fonksiyonel sorunların düzeltilmesine yönelik ilaçların geliştirilmesini sağlayacaktır. Bireysel genetik yatkınlığın belirlenmesi, doğru zamanda tedbirler alınmasını sağlayacaktır. İlaçlara olan bireysel duyarlılığın bilinmesi ilaçların doğru dozda kullanımını sağlayacak ve bireylerde oluşan ilaç kullanımından kaynaklanan komplikasyonların oluşumunu engelleyecektir.

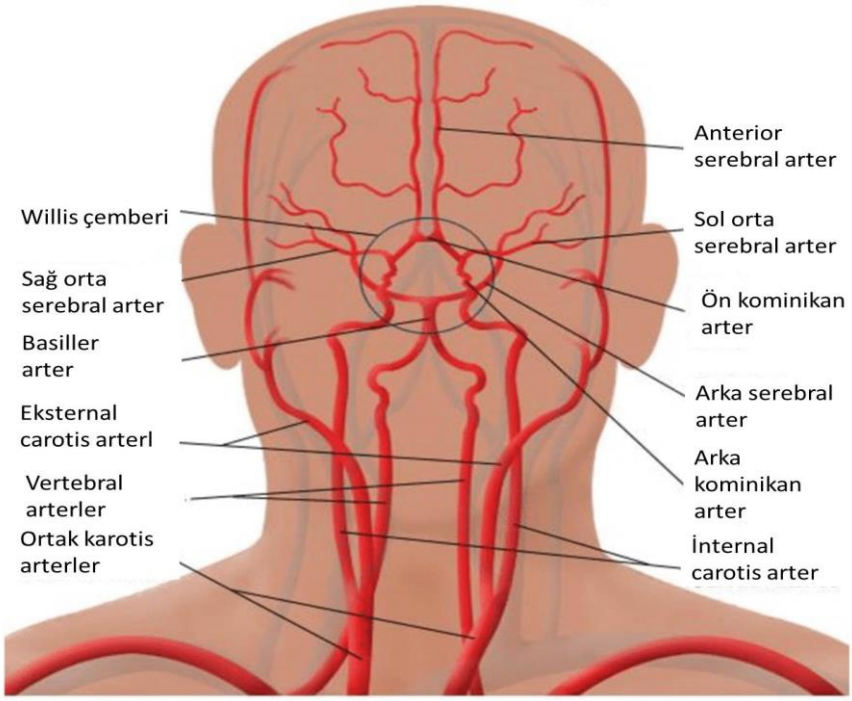
GENEL BİLGİLER

SEREBROVASKÜLER HASTALIK

Serebrovasküler olay, beyinde bir bölgenin geçici veya kalıcı biçimde, iskemi veya kanama sebebiyle etkilendiği ve/veya beynin besleyici damarlarınının tutulduğu tüm hastalıkları kapsar. SVH'ı klinik olarak; asemptomatik SVH, fokal beyin disfonksiyonu ile giden SVH (geçici iskemik atak ve inme), vasküler demans ve hipertansif ensefalopati olmak üzere 4 grupta sınıflandırabiliriz.

SEREBRAL DOLAŞIM

Beyin kan akımı, beyin tabanında Willis çemberini yapan iki karotis ve iki vertebral olmak üzere dört büyük arterden sağlanır. Willis çemberinden çıkan bu arterler beyin boyunca seyrederler ve pial arter denen dallarını verirler, bunlar da delici arter ve arteriyoller olarak daha küçük damarlara ayrılırlar (Şekil 1). Delici damarlar beyinden Virchow-Robin boşlukları olarak adlandırılan subaraknoid boşluğun genişlemesiyle hafifçe ayrılırlar. Delici damarlar beyinin içine girerek önce beyin içi arter dallarını verirler, sonra ise kan ve dokular arasındaki oksijen, besinler, karbondioksit ve metabolik ürünlerin değiştirildiği kapiller dallara ayrılırlar (9).



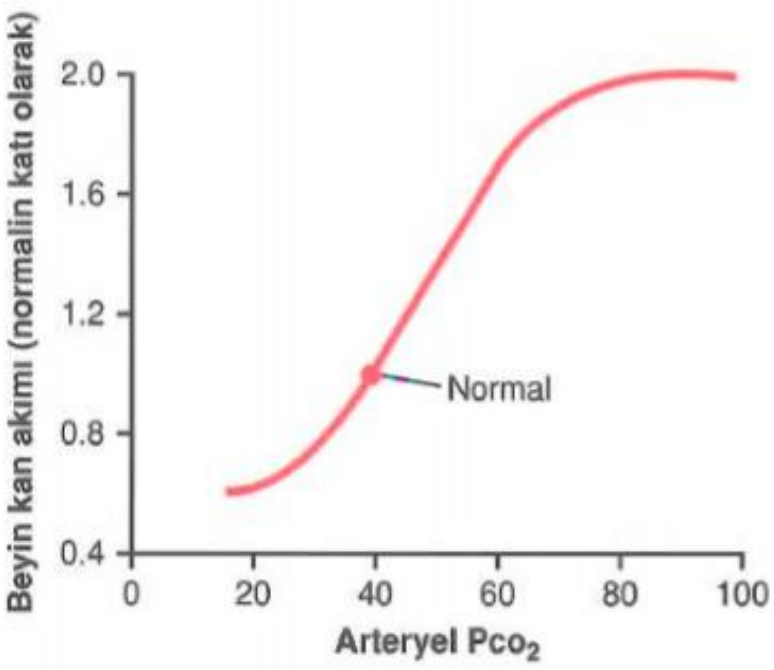
Şekil 1. Serebral dolaşım (8)

Serebral Dolaşımın Düzenlenmesi

Yetişkin bir bireyde beyinden geçen normal kan akımı her 100 gr beyin dokusu için ortalama dakikada 50-65 mililitredir. Tüm beyinde bu miktar 750-900 ml/dk'dır. Bu değerlere göre beyin, vücut ağırlığının yaklaşık sadece %2'sini içerdiği halde dinlenme sırasındaki kalp debisinin %15'ini alır. Başka dokulardaki gibi beyin dolaşımı da doku metabolizması ile oldukça ilgilidir. Bazı metabolik faktörler beyin dolaşımının düzenlenmesine katkı sağlar. Bunlar;

1) Karbondioksit konsantrasyonu
2) Hidrojen iyonu konsantrasyonu
3) Oksijen konsantrasyonu
4) Astrositler tarafından serbestlenen bazı maddeler'dir.

Artmış karbondioksit konsantrasyonu ya da artmış hidrojen iyon konsantrasyonu beyin kanlanmasını arttırır. Beynin perfüzyonunu sağlayan arterlerdeki kanın karbondioksit konsantrasyonundaki artışlar beyin kanlanmasını da büyük oranlarda artırır (10). Arterlerin kısmi karbondioksit basıncı (PCO_2)'deki %70 oranında bir artış beyin kan akımını 2 kata yakın artırır (Şekil 2).



Şekil 2. Arteryel PCO_2 ve beyin kan akımı arasındaki ilişki (8)

Bulgulara göre karbondioksit vücut sıvılarındaki su ile birleşip karbonik aside dönüşür sonrasında ise hidrojen iyonlarına ayrışır. Hidrojen iyonları beyin damarlarında vazodilatasyona sebep olur. Bu vazodilatasyon hidrojen iyon konsantrasyonun artışıyla doğrudan orantılıdır ve kan akımını normal değerlerin iki katına çıkarır. Beyin dokusunda asiditeyi artıran ve bunun sonucunda hidrojen iyonu konsantrasyonunu artıran başka maddeler (laktik asit, pirüvik asit) de bu yolla beyin kanlanmasını artıracaktır.

Karbondioksit ve hidrojen iyonlarının beyin kanlanmasının düzenlenmesinde şöyle bir rolü vardır; artmış hidrojen iyonu konsantrasyonu nöronal aktiviteyi baskılar ve beyin kanlanmasını da aynı zamanda artırır ki bu da fazla olan hidrojen iyonlarının, karbondioksitin ve diğer asidik maddelerin beyinden uzaklaştırılmalarını sağlar. Karbondioksitin azalması karbonik asidin de dokulardan uzaklaştırılmasını sağlar, bu şekilde diğer asitlerin de uzaklaştırılması sonucu hidrojen iyon konsantrasyonu normale döner. Bu mekanizma beyinde hidrojen iyon konsantrasyonunu ve nöron aktivitesini sabit düzeyde normal olarak tutmaya yardımcı olur (11).

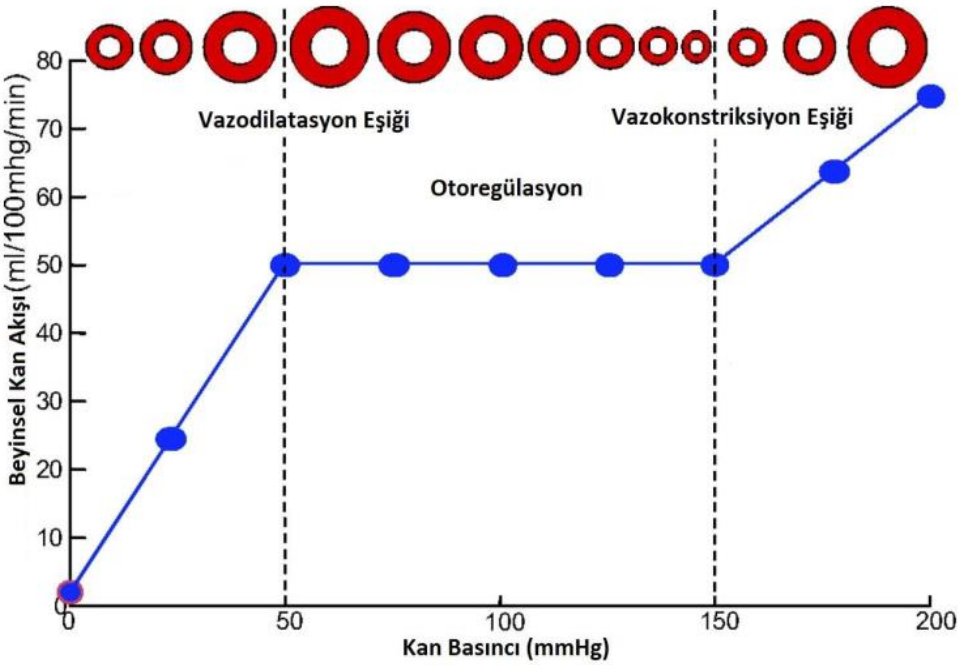
Oksijenin beyin kanlanmasına etkisi ise şöyle açıklanabilir; beyin dokusunun her 100 gr'ı için gereken oksijen miktarı 3,5 mililitre civarındadır. Beyin kanlanması yetersiz olur ve gereken oksijen sağlanamazsa, bu eksiklik hızlı bir şekilde vazodilatasyon yapar ve beyinin normal sınırlarda kan almasına yardımcı olur. Bu kanlanmayı regüle etme mekanizması

koronerler ve vücudun birçok dolaşım alanındaki mekanizmalara benzer. Beyin dokusu oksijen kısmi basıncı (PO_2) 30 mmHg'dan aşağı inerse beyin kanlanması hızla artar. PO_2 20 mmHg'nin altına düştüğü zaman beyin işlevleri bozulacağı için bu kan akımı artışı çok yararlıdır. Yani bu beyin kanlanmasının bölgesel olarak regülasyonuna katkı sağlayan oksijen mekanizması beyin nöronal aktivitesini korumada oldukça önemli bir role sahiptir (12).

Son olarak, astrositlerden serbestlenen maddelerin beyin kan akımını düzenlemeye etkisi olduğu düşünülmektedir. Astrositler, merkezi sinir sisteminde kan damarlarını çevreleme ve besin sağlamanın yanında nöronları koruyan ve destekleyen, yıldız biçiminde ve nöron olmayan hücrelerdir. Çalışmalara göre elektriksel olarak glutaminerjik nöronların uyarılması astrositlerin ayaksı çıkıntılarındaki kalsiyum iyonlarının (hücre içi) artışına ve yakın arteriyollerde vazodilatasyona yol açmaktadır. Vazodilatasyon nedeninin astrositlerden serbestlenen vazoaktif maddeler olduğu düşünülmektedir. Bu mediyatörlerden bazıları nitrik oksit, araşidonik asidin metabolizma ürünleri, K iyonları, adenozin gibi maddelerdir (13,14).

OTOREGÜLASYON MEKANİZMASI

Beyin kan akımının bu regülasyon mekanizması beyni arterlerdeki basınç değişimlerinden korur. Heyecan ve ağır aktivite durumlarında arteryel kan basıncı yüksek düzeylere çıkar, uyku sırasında ise düşük düzeylere iner ve bu şekilde dalgalanmalar olur. Bu dalgalanmalarla birlikte beyinde kan akımının 60-140 mmHg arteryel basınçları arasında kalmasını sağlayan büyük bir otoregülasyon mekanziması vardır (Şekil 3). Bu mekanizma içinde beyin kan akımı pek de bir değişim göstermeden ortalama arteryel basınç 60 mmHg ve 140 mmHg arasında gidip gelebilir. Ancak arteryel basınç 60 mmHg'nın altına düşerse beyin kanlanmasında ciddi bir düşüş olacaktır (15).



Şekil 3. Otoregülasyon mekanizması

Sempatik Sinir Sisteminin Rolü

Beyin dolaşımı boyundaki superior servikal ganglionlardan yukarı gelen sempatik bir innervasyona sahiptir. Bu sempatik sinirler beynin büyük arterlerinin ve beyin dokusunun içine giren arterlerin innervasyonunu sağlar. Ancak kan akımının otoregülasyon mekanizması sayesinde sempatik sinirlerde kesilme gibi durumlar genellikle büyük değişimlere neden olmaz. Ağır egzersiz gibi artmış dolaşım aktivitelerinde ortalama arteryal basınç çok yükselir ve sempatik sinir sistemi küçük damarlara basıncın yüksek ulaşmasını engellemek için büyük ve orta boy damarları daraltır. Bu koruma mekanizması da beyin içi kanamaları ve dolayısıyla inmeyi önlemede oldukça önemlidir (16).

İNME

Yaşlı kişilerin çoğunda, mikro beyin arterlerinin bir kısmında tıkanıklık görülür. Bu kişilerin de bir kısmında inme adı verilen ve beyin fonksiyonlarının ciddi düzeyde bozulmasına yol açan boyutta bir tıkanma söz konusudur (17).

İnmenin Çeşitleri

İnmeler çoğu zaman (%75) beynin besleyici arterlerinden birinde ya da fazlasında oluşan aterosklerotik plaklar sebebiyle ortaya çıkar. Plaklar kanın pıhtılaşma mekanizmasını etkinleştirebilir ve pıhtı arteri tıkayabilir. Bu şekilde bölgesel bir alanda beyin işlevinin ani kaybına yol açar. Bu inme çeşidine iskemik (tıkayıcı) inme denir. İnme gelişen kişilerin ¼'ünde kan basıncının yüksek seyretmesi nedeni ile damarlarda patlama olabilir bunun sonucunda kanama gelişir ve bu kanama, beyin dokusunu sıkıştırarak fonksiyonları tehlikeye sokar. İnmenin bu çeşidine hemorajik inme denir (18).

İnmenin Klinik Görünümü

İnmenin nörolojik etkileri, beyinde hangi bölgelerin etkilendiğine bağlıdır. İnmenin birçok tipi vardır. En yaygın tiplerinden biri, beyin hemisferlerinden birinin orta kısmını kanlandıran orta beyin arterlerinden birinin tıkanmasıdır. Eğer orta beyin arteri sol beyin tarafında blokaj yaşarsa, sol beyindeki konuşmayı kavramayı sağlayan Wernicke alanının fonksiyonunu kaybetmesi sonucu hasta bunamış bir klinik görünümde olur. Bunun gibi yine kelime oluşumu için fonksiyon gösteren Broca motor alanının hasarı nedeniyle konuşma yeteneğini kaybedebilir. Sol beyin kısmındaki nöral motor fonksiyonlarının bozulması halinde, vücudun karşı taraf kaslarında spastik felç gelişebilir. Posterior beyin arterinin bloke olması, hangi tarafta bloke olduysa aynı tarafın oksipital lobunda infarktüse ve iki göz retinasının da aynı taraf yarımında görme fonksiyonu kaybına yol açar (19).

İnmenin Önemi

İnme, 15 yaş ve üstü erişkinlerde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve hastalık yükünün DALY'de ölçüldüğü gibi en sık 4 nedeninin içinde bulunmaktadır. İnme, 2005 yılında tahminen 5 milyon ölüme neden olmuştur ve bu ölümlerin % 87'si düşük gelirli ve orta gelirli ülkelerdeydi. İnme ile ilgili küresel ölüm sayısının 2015 yılında 6,5 milyona, 2030'da 7,8 milyona çıkacağı tahmin ediliyor. Özellikle düşük gelirli ve orta gelirli ülkelerde artan inme yükü, dünya çapında inme için bir hedef önerilmesine yol açmaktadır; daha iyi vaka yönetimi ve tedavisi sonucu hastalıkta % 2 azalma olabilecektir (20).

İnmenin Prevelansı

İnme prevelansı belirli bir zaman içinde bir popülasyondaki inme olgularının tamamını ifade eder. Yaşla birlikte prevalans artmaktadır. Coğrafi faktörler prevelansı büyük ölçüde etkiler. Ülkemizde bu konuda yapılmış sağlıklı bir çalışma olmasa da Batı ülkelerinden gelen bilgilere göre inme prevelansı 8/1000, Japonya'dan gelenlere göre ise 20/1000'dir (21).

İSKEMİK İNME

İskemik İnmenin Tanımı

İnme, serebral işlevlerin akut olarak sıklıkla fokal, nadiren de global kaybına bağlı klinik semptom ve/veya bulgularıdır. İnme semptomları 24 saatten uzun sürer ya da ölüm gelişebilir ve çoğu zaman vasküler orijin dışında bir neden saptanamaz (1).

İskemik İnmenin Sınıflandırılması

1993 yılında yapılan TOAST "Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment" çalışmasında kullanılan sınıflandırmada, klinik bulgular ve etyoloji bir arada değerlendirilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre inme aşağıdaki 5 grupta açıklanmıştır (22).

1. Geniş arter aterosklerozu (tromboz veya emboli).

2. Kardiyoembolizm.

3. Küçük damar oklüzyonu (lakün).

4. Diğer belirlenen nedenlere bağlı iskemik inme.

5. Nedeni belirlenemeyen iskemik inme.

Geniş arter aterosklerozu: İskemik inmelerin %50'si bu nedene bağlıdır. Bu iskemi, çoğu zaman ekstrakranyal ve nadir olarak intrakranyal damarlarda ve bu damarların bifurkasyonlarında oluşan aterom plaklarının rüptürü ve tromboza bağlı olarak gelişir.

Proksimal arterde %70- 80 ve üzerinde darlıklar buna yol açar. Bu inmeli olgularda sorgulandığında, 15 dk. ile 1 saat arasında süren geçici iskemik ataklar ve intermittant kladikasyo hikayesi bulunur. Nörolojik bozukluk olarak, ekstremitelerde kuvvet kayıpları ve fokal kortikal bulgular ortaya çıkar. Bu inmenin tanısını koymak için ayrıntılı radyografik

incelemeler yapılır. Beyin tomografisi (BT), kranyal manyetik rezonans (MR), Doppler ultrasonografi (USG) ve anjiografi tanıda kullanılan mutlak gerekli araçlardır.

Kardiyoembolizm: İskemik inmelerin %20'sini oluşturur. Arteriyal oklüzyonun sebebi olan emboliler kalpten kaynaklanmaktadır. Hastalık prognozunda başta sık olarak epileptik nöbetler inmeyle birliktedir, bu inme tipinde bazı olgularda ilerleyen saatlerde, nörolojik defisitte hızlı iyileşmeler gözlenebilir.

Küçük damar oklüzyonu (laküner infarktlar): Sıklıkla hipertansiyon veya diyabet birlikteliği olan yaşlı olgularda ortaya çıkar. Bu tip inme, tüm iskemik inmelerin %25'ini oluşturur. Tanı için, laküner infarktlara spesifik klinik bulguların varlığı (pür motor ve sensoryal, sensorimotor inme ve ataksik hemiparezi vb) ile BT/MR bulgularının birlikte olması gerekmektedir.

Diğer belirlenen etyolojiler: İskemik inmelerin içinde % 5 'den daha az görülürler. Merkezi sinir sisteminin primer ve sekonder vaskülitleri, serebral otozomal dominant arteryopati subkortikal infarktlar ve lökoensefalopati, serebral amiloid anjiopati gibi nadir küçük damar hastalıkları, konjenital damar hastalıkları, mitokondriyal patolojiler, travmalar ve kan hastalıkları bu grupta yer alır. Diğer tanılar ekarte edildikten sonra ileri incelemelerle tanısı konur.

Sebebi belirlenemeyen nedenler: Ayrıntılı tetkiklere rağmen etyolojisi açıklanamayan vakaları tanımlar.

İskemik İnmenin Risk Faktörleri

İskemik inmeye neden olan veya olabilecek risk faktörlerinin saptanması büyük önem taşır (Tablo 1). İnmede değiştirilemeyen risk faktörleri yaş, ırk, cinsiyet olarak sıralanırken, kazanılmış risk faktörleri arasında sigara kullanımı, hipertansiyon, diyabet ve obezite ön sıralarda yer almaktadır (23).

Tablo 1. İnme risk faktörleri sınıflaması

DEĞİŞTİRİLEMEYEN RİSK FAKTÖRLERİ	DEĞİŞTİRİLEBİLEN RİSK FAKTÖRLERİ	
	KESİNLEŞMİŞ	KESİNLEŞMEMİŞ
Yaş	Hipertansiyon	Alkol kullanım
Cins	Diabetes Mellitus	Obezite
Irk	Kalp hastalıkları	Beslenme alışkanlıkları
Aile Öyküsü	Hiperlipidemi	Fiziksel inaktivite
	Sigara	Hiperhomosistinemi
	Asemptomatik karotis stenozu	İlaç kullanımı ve bağımlılığı
	Orak hücreli anemi	Hormon tedavisi
		Hiperkoagülabilite
		Fibrinojen
		İnflamasyon

KALITIM İLE İLİŞKİSİ

İnmede yukarıda belirtilen risk faktörleri belli ölçüde rol almaktadır ancak bununla birlikte genetik etkenlerin inmeye olan etkisi hala tartışılmaktadır. 1989 yılında Sacco ve ark.'nın 1805 inme hastasında yaptıkları prospektif bir çalışmada bu risk faktörlerinin hastaların %50'sinde görüldüğü, geri kalan grupta genetik nedenlerin rol aldığı vurgulanmıştır (24).

Heterojen etiyopatogenezi nedeniyle inmede genetik etkenlerin rolü tartışmalıdır. İnmeye neden olan genetik etkenler tek gen polimorfizmleri ya da poligenik polimorfizmler olarak sınıflanmaktadır. Literatürde inme için potansiyel risk oluşturan genlerle ilgili çok sayıda çalışma olmasına karşın en büyük gelişmeler tek gen polimorfizmleri ile ilgilidir (25).

İnmenin genetik bağlantısı göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda birçok gen ile kesin ilgisi saptanmıştır. Bunlar; Faktör V geni (Q506 Leiden), Protrombin geni (G20210A), Faktör VII (R353Q, 323A2), Fibrinojen (G455A, β148(C/T), β448(1/2)), PAI 1(4G/5G), Factor XIII (Val34Leu), GpIIb/IIIa (P1A2, HPA1/HPA3), GpIb/IX (HPA2/VNTR), GpIa/Iia (HPA5, C807T), ACE (I/D, CT 2/3), Anjiyotensinojen (M235T), eNOS (ecNOS 4a/b, Glu298Asp), MTHFR (C677T), apo E (apoε2/ε3/ε4), apo A1/CIII (*Sst*I, *Xmn*I), apo B (*Xba*I), Lipoprotein lipase (A291G), Paraoxonase 1 (glu192arg, met54leu)'dır (26).

MATRİKS GLA PROTEİNİ

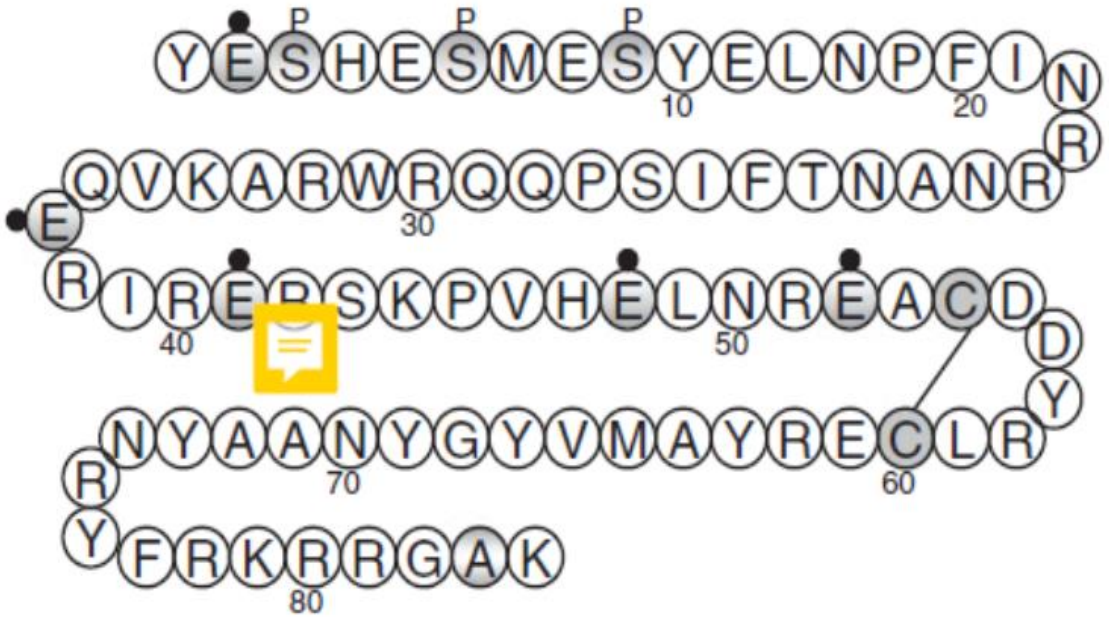
Matriks Gla Proteini arter duvarlarında kalsiyum tuzu birikmesi, miyokard enfarktüsü ve iskemik inme gibi kanın koronal ve serebral dolaşımının akut bozukluklarının gelişimi için önemlidir (27). Faktörler arasında, damar kireçlenmesinde önemli bir rol oynayan yumuşak dokuların mineralleşmesinin doğal bir önleyicisi ve K vitaminine bağlı protein grubunun bir temsilcisi olan MGP ayırt edilir (28).

MGP geninin uzunluğu 3900 nükleotittir üç intronla bölünmüş dört ekzondan oluşur. İnsanların 12. kısa kromozom kollarında (12p13.1-p12.3) bulunur. Matür proteinin 84 kodlu aminoasitini ve transmembran sinyal peptidinin 19 rezidüsünü içerir (29).

Serebral arterin sklerotik bozuklukları, yani aterosklerotik plak ilerlemesi, aterotrombotik inme gelişimine neden olur. Yırtılması ve daha sonra kan pıhtılaşması, arter intimasındaki dejeneratif işlemlerden ve ateromatöz plaklardaki kalsiyum tuz birikiminden kaynaklanır (30). Çok çeşitli araştırmalar, kalkerli aterosklerotik plaklarda mineralizasyon işlemleriyle bağlantılı proteinlerin olduğunu kanıtlamaktadır. MGP bu gibi proteinlerden biridir (Şekil 4). MGP'nin damar duvarı kalsifikasyonu gelişimi üzerindeki muhtemel etkilerini göz önüne alarak, MGP gen ekspresyonunun durumunu etkileyen genetik polimorfizmin, aterosklerotik hastalıkların ilerleyişini ve dolayısıyla iskemik inme gibi ana komplikasyonlarının gelişimini belirleyici olduğunu varsayabiliriz (31,32). İskemik inme ile ilgili olarak, MGP geninin polimorfizmleri ile bağlantısı konusunda net bir sonuca varılamamış olduğundan bu alandaki araştırmalara devam edilmesine neden olmuştur. MGP

vasküler kalsifikasyonunu inhibe eden önemli proteinlerden biri olduğu için inmeli hastalarda SNP'ler ile vasküler kalsifikasyon progresyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır (33). Tanımlanan birçok polimorfizm çeşidi arasında gen transkripsiyon işleminin başladığı promotör G-7A'nın (rs1800801) polimorfizmine dikkat çekilmektedir (34). G-7A'da promoter pozisyonunda (-7) adenin yerine guaninin gelmesinin, transkripsiyonel gen aktivitesini değiştirebilecek bir durum olduğu ve bunun sonucu olarak, ana biyolojik proteinin antikalsiyum-genik özelliğinin etkilenebileceği düşünülmüştür. İn vitro ve in vivo olarak tarif edilen olay, kalsiyum iyonları ve oksyapatit kristalleri ile etkileşime girebilen moleküler MGP'deki Gla kalıntılarının mevcudiyeti anlamına gelir. Bu gerçek, Gla yerine glutamik asit (Glu) içeren dekarboksilatlı MGP incelendiğinde ve MGP'nin antikalsinojenik etkisini kaybettiği görüldüğünde kanıtlanmıştır (35).

Ayrıca bu çalışmada daha önce yapılan çalışmalar baz alınarak T-138C (rs1800802) polimorfizmini de hasta ve kontrol grupları açısından değerlendirildi (36).



Şekil 4. Matris Gla proteini için amino asit dizisi (34)

Siyah nokta içeren glutamik asit kalıntıları (E) γ-karboksilasyon bölgelerini gösterir. Yukarıda "P" olan serin artıkları (S) fosforilasyon için olası bölgeleri gösterir. MGP proteininde, amino asit 83'te alanin (A) veya treonin (T)'nin bulunduğu ortak bir polimorfizm vardır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması için öncelikle Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuru yapıldı. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı tarafından örnek bir çalışmanın genotip dağılımları esas alınarak yapacağımız çalışmanın etki büyüklüğü hesaplanmıştır. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun 19.11.2018 tarihli toplantısı sonucu alınan 19/31 sayılı karar ile tez çalışmamız kabul edilmiştir (Ek1). Tez çalışmamız ayrıca 2019/65 nolu proje ile Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Ek2,Ek3).

Çalışmamız 52 hasta ve 60 kontrol grubu olmak üzere toplam 112 kişi ile gerçekleştirildi. Hasta grubunun yaş ortalaması 67,27±12,195 ve kontrol grubunun yaş ortalaması 69,25±5,780 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi 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. Çalışmaya katılanlara ayrıntılı bilgi verildikten sonra onayları alınmıştır. Deneysel çalışmalar Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde Biyofizik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Hasta Grubu Olarak:

1) Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji 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 / Periferik nöropatiler 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 52 kişiden oluşan hasta grubu ve yine 60 kişiden oluşan kontrol grubu olmak üzere toplam 112 kişi ile gerçekleştirilmiştir. Hasta grubundaki 52 kişiden 33 kişi erkek, 19 kişi ise kadındır. Kontrol gurubundaki 60 kişiden 30 kişi erkek, 30 kişi kadındır. Hasta grubunun yaş ortalaması 67,27±12,195 ve kontrol gurubunun yaş ortalaması 69,25±5,780 olarak hesaplandı.

Hasta ve kontrol gruplarından 2'şer ml periferik kan örnekleri EDTA'lı vakumlu tüplere alınıp Sigma Kiti kullanılarak DNA izole edildi. DNA kalitesi % 0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek gözlendi. DNA izolasyonundan sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile G-7A geni polimorfizmini içeren ürünler % 2'lik agaroz jellere yüklenip EtBr ile boyanarak elektroforezde 110 voltta yürütüldü. Daha sonra PZR ürünleri G-7A geninin polimorfizm bölgesine özgü NcoI restriksiyon enzimi kullanılarak Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile 37°C de 3 saat inkübasyon yapılarak kesime bırakıldı. Kesim sonucu ürünler %3'lük agaroz jelde EtBr ile boyanarak elektroforezde 110 voltta yürütüldükten sonra UV ışık altında polimorfizmler saptandı.

T-138C gen polimorfizmi için yine DNA örnekleri bu bölgeye özgü primerlerle çoğaltıldı. PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek gözlendi. Daha sonra PZR ürünleri T-138C geni polimorfizm bölgesine özgü BseNI restriksiyon enzimi kullanılarak RFLP yöntemi ile enzim 65°C de 3 saat inkübasyon yapılarak kesime bırakıldı. Kesim sonucu

ürünler %3'lük agaroz jelde EtBr ile boyanarak elektroforezde 110 voltta yürütüldükten sonra UV ışık altında polimorfizmler saptandı.

GEREÇLER

KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER

Agaroz (Sigma)

Borik Asit (Sigma)

DNA Marker seti, 50bç (Fermentas)

DNA Marker seti, 100bç (Fermentas)

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (MBI)

Etanol %100 (Riedel)

Etidyum Bromit (Sigma)

Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) (Sigma)

Magnezyum klorür (Fermentas)

BseNI restriksiyon enzimi (Fermentas)

NcoI restriksiyon enzimi (Fermentas)

Primerler (Fermentas)

Proteinaz K (Sigma)

Taq DNA polimeraz seti (Fermentas)

Trisma (Base) (Bio Basic)

KULLANILAN CİHAZLAR

Agaroz elektroforez tankı (MINICELL PRIMO EC 320)

Derin dondurucu (AEG)

Güç kaynağı (EC-105)

Manyetik karıştırıcı (Nüve)

Otoklav (Heraeus)

Otomatik mikro pipetler (ISOLAB)

Santrifüj (Allegra X-22R)

Terazi (Sartorius)

Thermal Cycler (Boeco TS-100)

Vorteks (VELP Scientifica)

ÇÖZELTİLER

10 Tris Borat Elektroforez (TEB) Çözeltisi (1 litre) pH: 7.4

60.5 gr Tris

3.72 gr Na2EDTA.2H2O

30.85 gr borik asit

YÖNTEMLER

DNA İZOLASYONU

Hasta ve kontrol gruplarından EDTA'lı tüplere alınan 2ml kan örneklerinden Sigma DNA Kiti ile DNA'lar izole edildi (Tablo 2). DNA miktarları aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi:

DNA (µg/ml)= 260 nm'deki optik yoğunluğu (OD) x Seyreltme faktörü (Dilution factor) x Katsayı (DNA için 50)

DNA'nın saflığı 260 nm ile 280 nm dalga boylarındaki optik yoğunluk değerlerinin oranıyla belirlendi.

Tablo 2. Sigma kiti ile DNA izolasyonu

0.5 ml EDTA'lı kan 2 ml'lik toplama tüpüne koyuldu.

↓ 4°C'de 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında çözeltinin üst fazı atıldı.

Toplama tüpüne 0.8 ml TBP Buffer eklenip, vortekslendi.

↓ 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Oluşan çözeltinin yine üst fazı atıldı.

Çözeltiye 0.5 ml TBM Buffer eklenip, hızlıca vortekslendi. 3 µl proteinaz K (20mg/ml) eklendi.

↓ 55°C'de 30 dakika inkübe edildi.

Çözelti 5000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip, üst sıvı 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı, üzerine 260 µl saf ethanol eklendi.

↓ Toplama tüpündeki çözelti, kolona aktarılıp 10000 rpm'de 2dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki atık sıvı atıldı.

Üst sıvı + 500 µl Yıkama Solüsyonu eklendi.

↓ 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, atık sıvı atıldı.

Yıkama solüsyonundan arta kalanı çıkarmak için 10000 rpm' de tekrar santrifüj edildi.

↓

Kolon 1.5 ml'lik tüplere yerleştirilip, 50 µl Elution Buffer eklendi.

↓

50°C'de 2 dakika inkübe edilip, 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra DNA elde edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

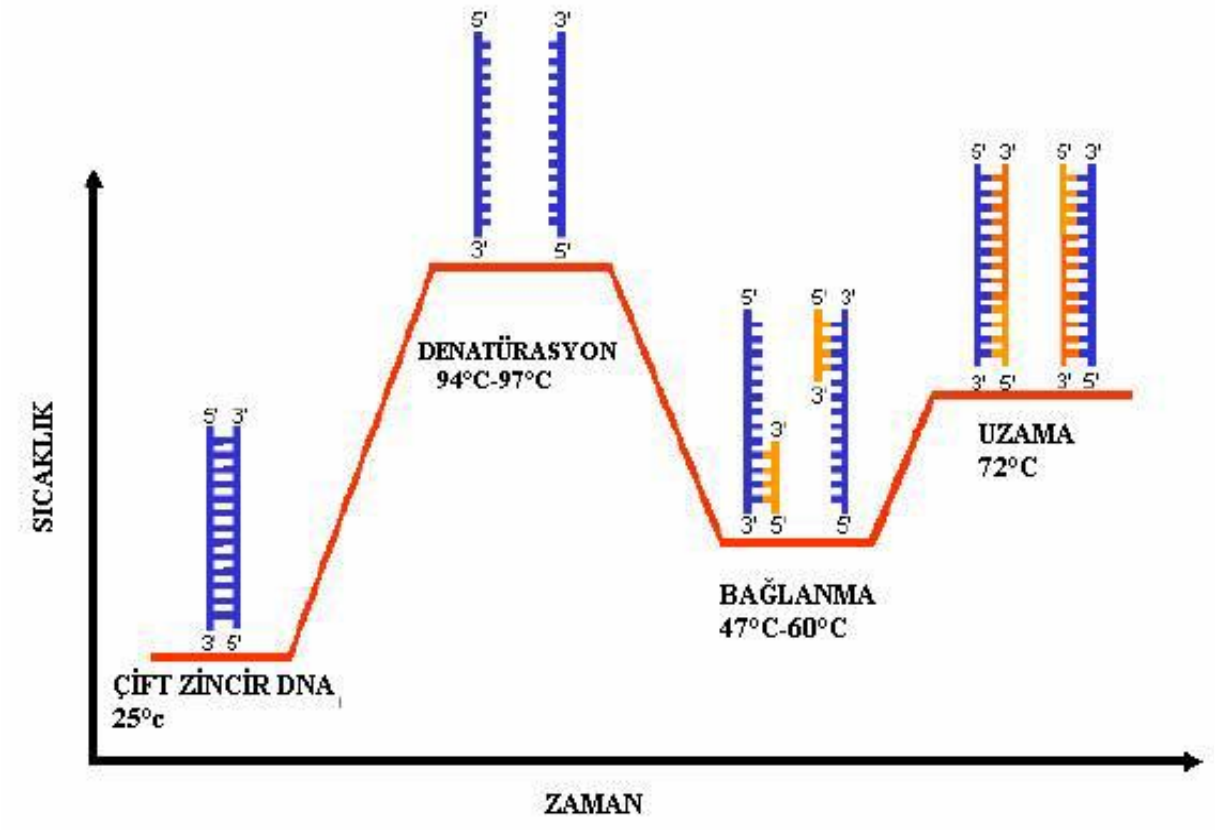
PZR, ilk kez 1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan, Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen metodla bilim dünyasına sunulduğundan itibaren hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarında tanıda yeni bir çığır açmıştır. PZR in vitro koşullarda DNA'nın çoğaltılması olarak tanımlanmıştır. PZR'de üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış DNA miktarı, bu üç adımın tekrarına bağlıdır (Şekil 5).

1) Denatürasyon (94-97ºC)

2) Primer bağlanması (47-60ºC)

3) DNA sentezi (72ºC)

Bu üç adım bir PZR siklüsünü oluşturur. İlk adımda çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. İkinci adımda primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Son aşamada ise istenilen DNA bölgesinin sentezi gerçekleşir.



Şekil 5. PZR döngüsü

PZR'nin temel bileşenleri; kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi (Taq polimeraz), enzim tamponu, primerler, dNTP (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) karışımı ve $MgCl_2$'dir. İlgili gen bölgeleri verilen primer dizileri kullanılarak çoğaltıldı. Reaksiyon toplam 25µl'lik hacimde gerçekleştirildi. Daha sonra PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek, kontrol ve hastaların T-138C ve G-7A gen polimorfizm bölgeleri EtBr ile boyandıktan sonra UV ışık altında incelendi.

PZR'de kullanılan Primer Dizileri:

MGP G-7A gen polimorfizminin gözlendiği 4. ekson bölgesini çoğaltmada kullanılan primerler:

F: 5'-CTAGTTCAGTGCCAACCCTTCCCCACC-3'

R: 5'-TAGCAGCAGTAGGGAGAGAGGCTCCCA-3'

MGP geninde T-138C polimorfizminin gözlendiği promotör bölgesini çoğaltmada kullanılan primerler:

F: 5'-AAGCATACGATGGCCAAAACTTCTGCA-3'

R: 5'-GAACTAGCATTGGAACTTTTCCCAACC-3'

PZR İçin Hazırlanan Karışımlar

G-7A için:

Bir hasta için kullanılan miktarlar:

2 mM $MgCl_2$

1 PZR Tamponu

10 nmol primer 1

10 nmol primer 2

0.2 mM dNTP

1.25 Ünite Taq polimeraz

dH_2O ile 24 µl'e tamamlandı

1 µl izole edilmiş DNA elendi.

Toplam hacim: 25 µl

T-138C için:

Bir hasta için kullanılan miktarlar:

2.5 mM $MgCl_2$

1 PZR Tamponu

10 nmol primer 1

10 nmol primer 2

0.2 mM dNTP

1.25 ünite Taq polimeraz

dH2O ile 24 µl'e tamamlandı

1 µl izole edilmiş DNA eklendi

Toplam hacim: 25 µl

PZR İçin Gerekli Koşullar

G-7A için:

Başlangıç: 94°C 3 dakika

94°C 30 saniye
64°C 60 saniye — 30 Döngü
72°C 60 saniye

Sonlanma: 72ºC, 5 dakika

T-138C için:

Başlangıç: 94°C 3 dakika

94°C 30 saniye
57°C 60 saniye } 30 Döngü
72°C 60 saniye

Sonlanma: 72ºC, 5 dakika

Restriksiyon Enzim Kesimi Yöntemi

Restriksiyon enzimleri, kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden çift yönlü simetrik olarak DNA'yı kesen enzimlerdir. Bu enzimlerin büyük bir kısmı bakterilerde, çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlarda bulunmaktadır. Belli bir restriksiyon enzimi DNA'yı keseceği, 4-8 nükleotitlik restriksiyon noktası tanır. Kontrol ve hastaların G-7A polimorfizmi; PZR aşamasından sonra PZR ürünlerinin NcoI restriksiyon enzimi ile 3 saat 37ºC'de kesime bırakılmaları, % 3'lük agaroz jelde yürütülmeleri ve UV ışık altında incelenmeleri sonucunda belirlendi. T-138C polimorfizmi için ise, PZR aşamasından sonra PZR ürünlerinin BseNI restriksiyon enzimi ile 3 saat 65ºC'de kesime bırakılmaları, % 3'lük agaroz jelde yürütülmeleri ve UV ışık altında incelenmeleri sonucunda belirlendi.

G-7A İçin Restriksiyon Enzim Kesimi Yöntemi

PZR sonucu elde edilen ürünler kullanılarak;

1 M tampon 1.0µl

5 ünite NcoI Restriksiyon enzimi (0.5µl NcoI Restriksiyon enzimi)

2.0µl PZR reaksiyon ürünü

6.5µl dH_2O

Toplam hacim: 10 µl sağlandıktan sonra karışım birkaç saniye yavaşça karıştırıldı. 37ºC'de 3 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresinin sonunda ürünler 2.5 µl EtBr ile hazırlanan % 3'lük agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında oluşan bantlar gözlendi. Elde edilen alleller tablodaki kesim ürünlerine göre belirlendi.

T-138C İçin Restriksiyon Enzim Kesimi Yöntemi

PZR sonucu elde edilen ürünler kullanılarak;

1 M tampon 1.0µl

5 ünite BseNI Restriksiyon enzimi (0.5µl BseNI Restriksiyon enzimi)

2.0µl PZR reaksiyon ürün

6.5µl dH_2O

Toplam hacim: 10 µl sağlandıktan sonra karışım birkaç saniye yavaşça karıştırıldı. 65ºC'de 3 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresinin sonunda ürünler 2.5 µl EtBr ile hazırlanan % 3'lük agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında oluşan bantlar gözlendi. Elde edilen alleller tablodaki kesim ürünlerine göre belirlendi.

NcoI İçin Restriksiyon Enziminin Mekanizması

NcoI restriksiyon enzimi özgün olduğu bölgeden aşağıdaki şekilde kesim yapar (Tablo 3).

5'-……..C ↓ C A T G G……..-3'

3'-……..G G T A C ↑ C…….….-5

BseNI İçin Restriksiyon Enziminin Mekanizması

BseNI restriksiyon enzimi özgün olduğu bölgeden aşağıdaki şekilde kesim yapar (Tablo 4).

5'-……. A C T G G N↓ …….-3'

3'-……..T G A C ↑ C N…….….-5'

Tablo 3. G-7A polimorfizmi için kullanılan primer tablosu ve restriksiyon enziminin kesim sonuçları

Polimorfizm Bölgesi	Kullanılan Primer Dizileri	Ürün Uzunluğu		
		PZR ürünleri	Enzim Kesimi Sonucu	
			G Alleli Normal Allel	A Alleli Mutant Allel
G-7A	G-7A F: 5'-CTAGTTCAGTGCC AACCCTTCCCCACC-3' G-7A R: 5'-TAGCAGCAGTAGGG AGAGAGGCTCCCA-3'	138 bç	138 bç	109 bç 29 bç

Tablo 4. T-138C polimorfizmi için kullanılan primer tablosu ve restriksiyon enziminin kesim sonuçları

Polimorfizm Bölgesi	Kullanılan Primer Dizileri	Ürün Uzunluğu		
		PZR ürünleri	Enzim Kesimi Sonucu	
			C Alleli Normal Allel	T Alleli Mutant Allel
T-138C	T-138C F: 5'AAGCATACGATGGCC AAAACTTCTGCA-3' T-138C R: 5'GAACTAGCATTGGAA CTTTTCCCAACC-3'	142 bç	142 bç	118 bç 24 bç

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar sayı (yüzde) ya da ortalama ± std. sapma olarak ifade edildiler. Yaş, AKŞ, TG, Kolesterol, HDL, LDL değişkenlerinin gruplar arasında karşılaştırmalarında Student t testi kullanıldı. MGP genotiplerinin gruplar arası karşılaştırmalarında ki-kare testi kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

BULGULAR

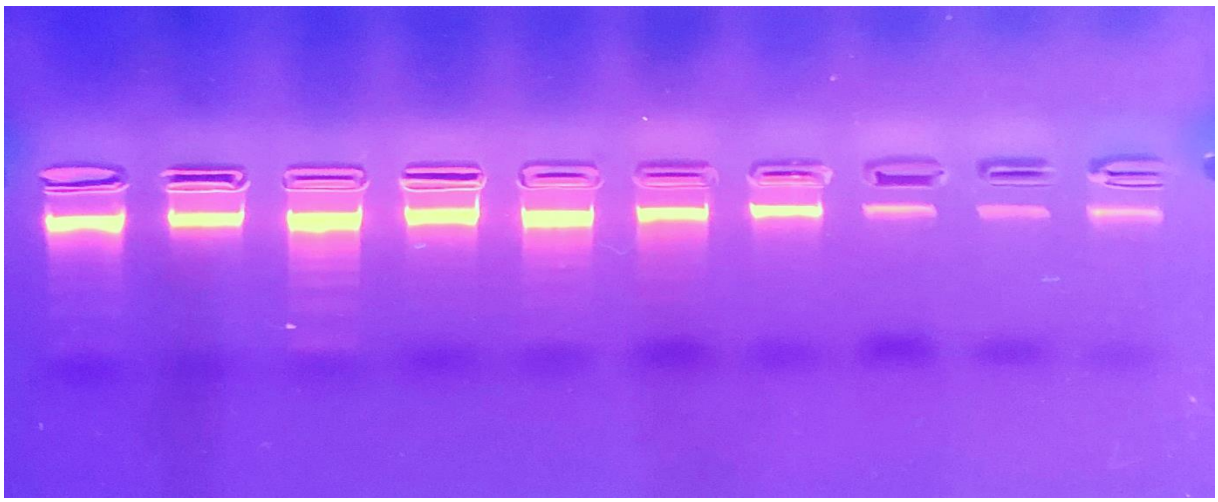
Yapılan tetkikler sonucunda iskemik inme tanısı almış olan hasta grubu ile kontrol grubu arasında yaş, hipertansiyon, diyabetes mellitus, sigara, alkol, kalp hastalıkları, açlık kan şekeri, kolesterol, trigliserid, HDL, LDL ve cinsiyet bulguları karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Hasta ve kontrol gruplarının klinik bulguları

KLİNİK BULGULARI	HASTA VE KONTROL GRUPLARI		P
	HASTA (N:52)	KONTROL (N:60)	
YAŞ(yıl)	67,27±12,195	69,25±5,78	0,265
HİPERTANSİYON	%82,69(43)	%61,67(37)	0,014
DİYABETES MELLİTUS	%48,08(25)	%35(21)	0,161
SİGARA	%34,62(18)	%31,67(19)	0,741
ALKOL	%1,923(1)	%16,67(10)	0,009
KALP HASTALIKLARI	%55,77(29)	%26,67(16)	0,002
AKŞ (mg/dL)	125(90,50-185,50)	105(95-120)	0,08
KOLESTEROL(mg/dL)	176,27±49,475	179,58±29,93	0,665
TRİGLİSERİD(mg/dL)	153,50(117,25-206,00)	120(94,50-149,50)	<0,001
HDL(mg/dL)	39,63±11,46	52,02±11,08	<0,001
LDL(mg/dL)	100,9±31,901	126,47±23,78	<0,001
CİNSİYET(kadın)	%36,54(19)	%50(30)	0,152

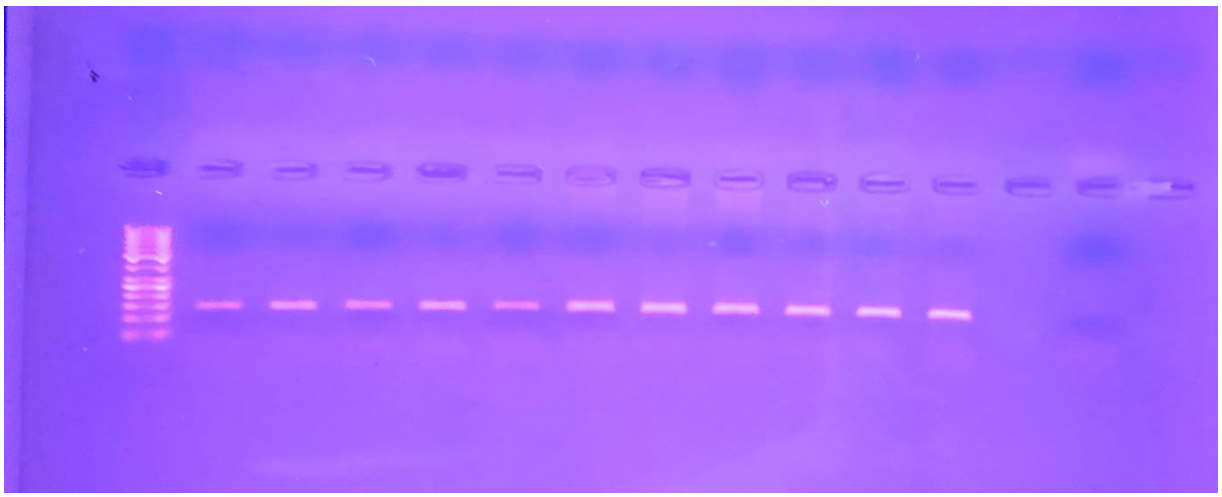
HDL: HDL kolesterol, LDL: LDL kolesterol, Student t testi, Ortalama ± standart sapma; ortanca (25 yüzdelik-75 yüzdelik); yüzde (sıklık)

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



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

İzole edilmiş olan DNA'lar % 0.8'lik agaroz jelde gözlemlendikten sonra T-138C gen polimorfizmi için özgün bölgelere ait primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütüldü. 30 dakika civarında yürütülen ürünler ultraviyole ışık alında incelendi (Şekil 7). Ürünlerin beklendiği aralıklarda olduğu gözlemlendi.



Şekil 7. Elde edilen PZR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde yürütülme görüntüsü

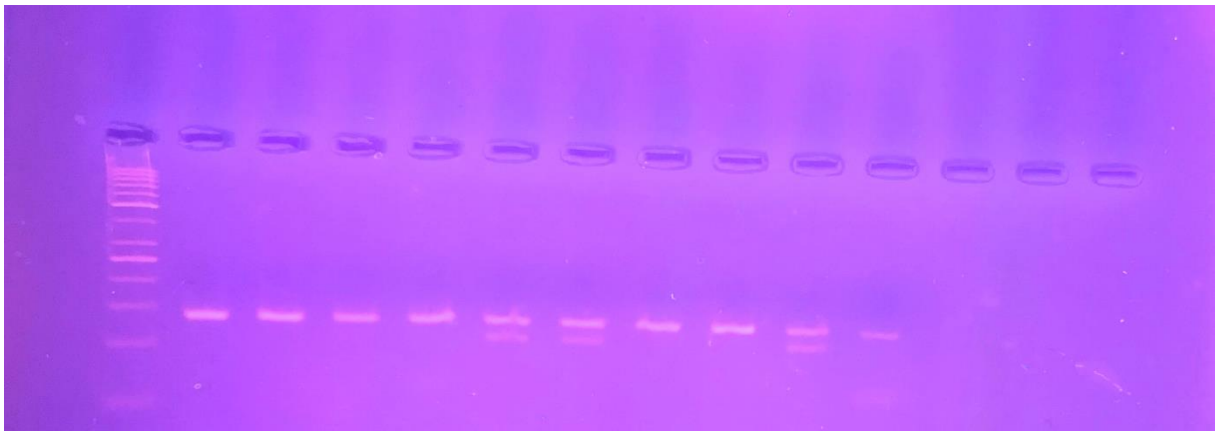
G-7A İçin Restriksiyon Enzim Kesimi

G-7A bölgesinin kesimi için PZR sonucu elde edilen ürünlerle NcoI enzimi kullanılarak, kesim yönteminde gösterilen şekilde enzim kesimi gerçekleştirildi. Restriksiyon işlemi sonucunda MGP geninin 4. ekson bölgesindeki G→A polimorfizmi elde edilen bant oluşumları sonucunda belirlendi (Şekil 8).

GG genotipinde kesim görülmez ve 138 bç'lik tek bant oluşur.

AA genotipinde iki DNA zinciri bölgesinde kesim gerçekleşir, 109 ve 29 bç'lik iki bant oluşur.

GA genotipinde ise bir DNA kesim bölgesinde kesim gerçekleşir ve 138, 109, 29 bç uzunluklarında üç bant gözlenir.



Şekil 8. G-7A polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü

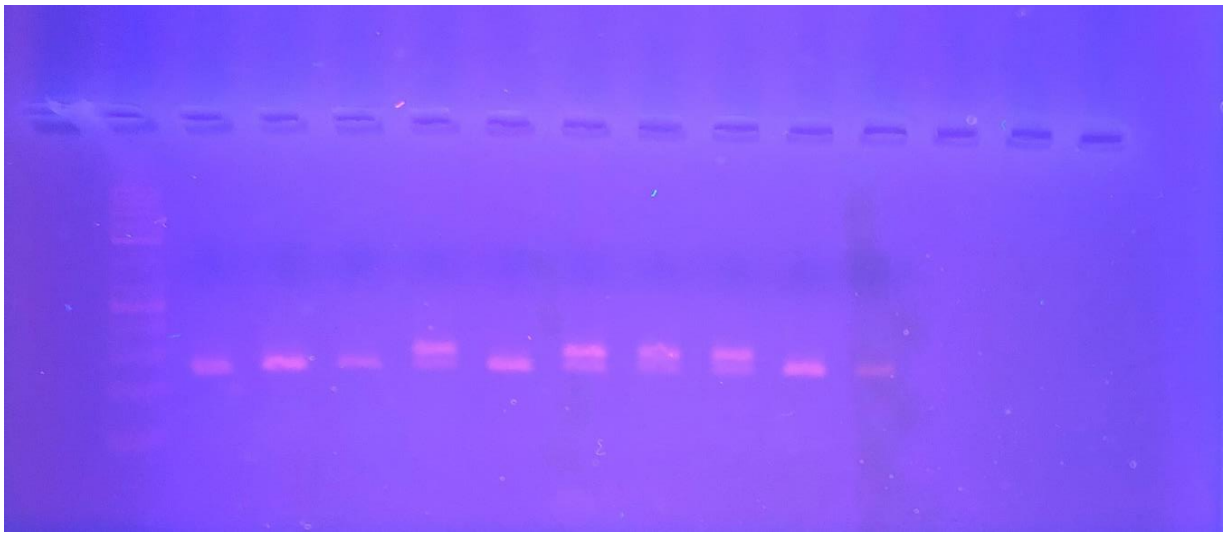
T-138C İçin Restriksiyon Enzim Kesimi

T-138C bölgesinin kesimi için PZR sonucu elde edilen ürünlerle BseNI enzimi kullanılarak kesim yönteminde gösterilen şekilde enzim kesimi gerçekleştirildi. Enzim kesimi işlemi sonucunda MGP geninin promotör bölgesindeki T→C polimorfizmi elde edilen bant oluşumları sonucunda belirlendi (Şekil 9).

CC genotipinde kesim görülmez ve 142 bç'lik tek bant oluşur.

TT genotipinde iki DNA zinciri bölgesinde kesim gerçekleşir, 118 ve 24 bç'lik iki bant oluşur.

CT genotipinde ise her iki allel de görülür ve 142, 118, 24 bç uzunluklarında üç bant gözlenir.



Şekil 9. T-138C polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü

Çalışılan hasta ve kontrol gruplarının G-7A ve T-138C genotip dağılımları incelendiğinde;

G-7A için;

İnmeli grubun AA genotipi 3 hasta olup % 5.8, GA genotipi 24 hasta olup % 46.1 ve GG genotipi 25 hasta olup %48.1. Kontrol grubunun AA genotipi 6 kişi olup % 10, GA genotipi 30 kişi olup %50 ve GG genotipi 24 kişi olup %40'dır. Hasta grubu ve kontrol grubu arasında önemli bir fark görülememiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde G-7A genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 6).

Tablo 6. G-7A genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

G-7A	GRUP		P
GENOTİP	HASTA	KONTROL	
AA	3 (%5.8)	6 (%10)	0.594
GA	24 (%46.1)	30 (%50)	
GG	25 (%48.1)	24 (%40)	
TOPLAM	52 (%100)	60 (%100)	

AA: Adenine-Adenine; GA: Guanine-Adenine; GG: Guanine-Guanine

Ki kare testi

T-138C için;

İnmeli grubun CC genotipi 6 hasta olup % 11.6, CT genotipi 23 hasta olup % 44.2 ve TT genotipi 23 hasta olup % 44.2 'dir. Kontrol grubunun CC genotipi 2 kişi olup % 3.3, CT genotipi 19 kişi olup % 31.7 ve TT genotipi 39 kişi olup % 65'tir. İnmeli grubun CC genotipi kontrole göre daha yüksek bulunmuşken TT genotipleri daha düşük bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde T-138C genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 7).

Tablo 7. T-138C genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

T-138C	GRUP		P
GENOTİP	HASTA	KONTROL	
CC	6 (%11.6)	2 (%3.3)	0.051
CT	23 (%44.2)	19 (%31.7)	
TT	23 (%44.2)	39 (%65)	
TOPLAM	52 (%100)	60 (%100)	

CC: Cytosine-Cytosine; CT: Cytosine-Timine; TT: Timin-Timin

Ki kare testi

G-7A ve T-138C gen polimorfizmleri için 112 kişinin (hasta+kontrol) istatistiksel sonuçlarına göre inmeli hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

TARTIŞMA

İnme, erken ölüm ve sakatlığın önde gelen bir nedenidir (36). Konvansiyonel risk faktörleri, tüm inme riskinin sadece küçük bir kısmını açıklar (37). İkizlerin ve aile öyküsü çalışmalarından elde edilen kanıtlar, genetik yatkınlığın önemli olduğunu göstermektedir (38). Çevresel risk faktörlerinin çoklu genlerle etkileşime girdiği düşünülen diğer birçok karmaşık hastalıkta olduğu gibi, inme riskine katkıda bulunan altta yatan moleküler mekanizmaların belirlenmesi zor olmuştur (39). İnmenin yaklaşık % 80'i iskemik iken % 20'si kanamaya bağlıdır (40). İskemik inme, en yaygın olarak büyük damar hastalığı inmesi, küçük damar hastalığı inmesi ve kardiyoembolik inme olarak, farklı patofizyolojik mekanizmalara sahip birkaç alt tipi içerir (41).

MGP, vasküler düz kas hücreleri (VSMC'ler) ve doku kalsifikasyonunun ana düzenleyicisi olduğu düşünülen kondrositler tarafından sentezlenen mineral bağlayıcı bir hücre dışı matriks proteinidir. Yapılan bazı çalışmalar, G-7A ve T-138C gen polimorfizmlerinin VSMC'leri ve doku kalsifikasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (42). 2000 yılında Braam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ciddi ateroskleroz gelişimine, kan serumunda artan MGP konsantrasyonlarının eşlik ettiği belirtildi (45). O'Donell ve ark., kandaki MGP düzeyi ile bir dizi farklı ateroskleroz risk faktörü arasındaki bağlantıyı yaptıkları çalışmada ortaya koymuşlardır, ancak MGP içeriği ve koroner damar kalsifikasyonu arasında bir ilişki bulamamışlardır (46).

MGP'nin G-7A ve T-138C gen polimorfizmlerine göre inme hastaları ve kontrol grubundaki hastaların genetik tiplemesinin yapılması, bu genlerin üç varyantının frekansını bulmak genel olarak gruplar ve alt gruplar arasındaki karşılaştırmaları tespit etmeyi sağlamıştır. Bu polimorfizmlerden G-7A gen polimorfizmi için AA, GA ve GG allellerinin sıklığı inmeli hasta grubunda sırasıyla 3 (%5.8), 24 (%46.1) ve 25 (%48.1) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 6 (%10), 30 (%50) ve 24 (%40) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında inmeli hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.597$, $p>0.05$). T-138C polimorfizmi için ise CC, CT ve TT allellerinin sıklığı inmeli hasta grubunda sırasıyla 6 (%11.6), 23 (%44.2) ve 23 (%44.2) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 2 (%3.3), 19 (%31.7) ve 39 (%65) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında inmeli hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadıysa da ($p=0.051$) CC alellerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre istatiksel açıdan belirgin olarak yüksek olduğu bulunmuştur.

Farzaneh ve diğ. çalışmalarında, sağlıklı kişilerin kan serumlarında G-7A gen polimorfizmi ile MGP içeriği arasında ilişki saptamazken, T-138C gen polimorfizmi arasında istatistiksel olarak güvenilir bir bağlantı olduğunu tespit ettiler (47). Serum MGP düzeyi ile ateroskleroz gelişim riski arasındaki bağlantıyı göz önüne alarak kendi çalışmamız için söyleyebiliriz ki bulduğumuz T-138C gen polimorfizmdeki yakın değerler bize T-138C gen polimorfizminin inme ile yüksek oranda ilişkili olabileceğini gösterir ve bu bağlamda çalışma genişletilerek bu ihtimal araştırılabilir. Ataman ve ark. MGP geninin A/A varyantının, Ukrayna popülasyonunun kadınlarında bir iskemik inme risk faktörü olduğunu 2012'de yaptıkları çalışmada kanıtlamışlardır (48). Kendi çalışmamızda ise Türk toplumu için kadınlarda böyle bir risk faktörü tanımlayamadık.

İnme prognozunu belirlemede etkili bulunmuş birçok faktör vardır. Bu faktörlerden biri olan yaş için bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ancak yapılan çalışmalara göre ileri yaş, inme prognozunda olumsuz etkiye sahiptir. Gelişmiş ülkelerde beklenen hayat süresinin uzaması, ileri yaş kavramını da değiştirmektedir (43). İnmenin prognozunu incelerken, Yang ki Ming ve ark. 80 yaş üzerini ileri yaş kategorisinde değerlendirmişlerdir ve 80 yaş üzeri akut SVH vakalarında prognozun yaş ile birlikte olumsuz sonuçlar verdiğini söylemişlerdir (44). Bu çalışmalardaki farklı sonuçları etnik köken farklılığı, çevrenin aynı olmaması ya da hasta ve kontrol grupları için farklı kriterlerin olması gibi durumlar açıklamaktadır. Kuzey Kıbrıs'ta Ferda ve ark. 2013'te

yaptığı çalışmada hipertansiyon, hiperlipidemi ve diabetes mellitus varlığının inme için risk faktörleri olduğu söylenmiştir (26). Bizim çalışmamızda da hipertansiyon ve çeşitli lipid değerleri için hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Gerek daha önce yapılan çalışmalar gerekse bu çalışmada T-138C gen polmorfizmi açısından bir takım veriler elde edilmiştir. İleride bilim adamlarının yapacakları diğer çalışmalar bu gen polimorfizminin inmeye etkisini anlamayı kolaylaştıracaktır. Bu çalışma gibi yapılacak diğer çalışmalarla, insan hayatı için büyük bir yükü olan inmenin etkisi azaltılacaktır hatta belki de inme diye bir hastalık kalmayacaktır.

SONUÇLAR

Çalışmada Kanuni Sultan Süleymen EAH nöroloji polikliniğine başvuran ve yapılan tetkikler sonucunda iskemik inme tanısı konmuş olan 52 kişiden oluşan hasta grubu ile herhangi bir nörolojik rahatsızlığı olmayan 60 kişiden oluşan kontrol grubu için G-7A ve T-138C gen polimorfizmleri incelendi. Çalışmaya alınan inmeli hasta grubu ve kontrol grubunun yaş, cinsiyet, kalp hastalıkları varlığı, sigara ve alkol kullanımı, hipertansiyon , AKŞ, TG, Kolesterol, HDL, LDL klinik bulguları belirlendikten sonra çalışma Biyofizik Anabilim Dalında başlatılmıştır.

Bu polimorfizmlerden G-7A gen polimorfizmi için AA, GA ve GG allellerinin sıklığı inmeli hasta grubunda sırasıyla 3 (%5.8), 24 (%46.1) ve 25 (%48.1) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 6 (%10), 30 (%50) ve 24 (%40) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında inmeli hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.597$, $p>0.05$).

T-138C gen polimorfizmi için ise CC, CT ve TT allellerinin sıklığı inmeli hasta grubunda sırasıyla 6 (%11.6), 23 (%44.2) ve 23 (%44.2) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 2 (%3.3), 19 (%31.7) ve 39 (%65) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında inmeli hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadıysa da ($p=0.051$) CC alellerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre istatiksel açıdan belirgin olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Bu nedenle daha fazla sayıda hasta ve

kontrol grubu kullanarak çalışmanın genişletilip T-138C gen polimorfizmi yönünden anlamlı bir fark bulunacağına kanaat getirilerek çalışma sonlandırılmıştır.

Hasta ve kontrol gruplarında bakılan klinik parametreler içinde cinsiyet, yaş, diabetes mellitus varlığı, sigara kullanımı, alkol kullanımı, kolesterol değerleri açısından gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Açlık kan şekeri değerleri için istatiksel olarak gruplar arası anlamlı bir fark olmamakla birlikte hasta grubunda AKŞ ortancası yüksek bulunmuştur.

Hipertansiyon varlığı açısından gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır. ($p<0.05$)

Kalp hastalıkları varlığı açısından gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır. ($p<0.05$)

Trigliserid değerleri açısından gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. ($p<0,05$)

HDL değerleri açısından gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. ($p<0,05$)

LDL değerleri için analiz yapıldığında beklenenin tersine, kontrol grubu değerleri hasta grubu değerlerinden yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi olarak hasta grubunun yüksek kolesterol değerlerine sahip olmaları nedeniyle kolesterol düşürücü ilaç kullanımları gösterilebilir.

Sonuç olarak, çalışma sonucunda elde edilen bu değerler G-7A gen polimorfizminin inme üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı yönünde bilgi vermektedir.

T-138C gen polimorfizmi için ise bulunan p değerinin 0,05'e belirgin yakın oluşu daha geniş kapsamlı çalışmalarda istatiksel olarak anlamlı bir değer bulunabileceğini ve bu gen polimorfizminin inme hastalığı ile ilişkisinin olabileceğini göstermiştir.

Klinik bulgulara bakılırsa HT varlığının, kalp hastalıklarının, yüksek Trigliserid değerlerinin ve düşük HDL değerlerinin inme geçirme riskini artırdığını söylenebilir.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında çalışmamızın gelecek çalışmalar için bir dayanak olabileceği görülmektedir.

ÖZET

İnsan sağlığı ve bu konuda yapılan araştırmalar günümüzde hala önemini yitirmemiştir. Uzun yıllardan beri kişilerin hayat kalitesini düşüren hastalıklar arasında yerini koruyan inme ve çok nedenli etiyolojisi, bu konuda araştırmacıları çalışma yapmaya itmiştir. Beynin kanlanmasını sağlayan damarlardan bir ya da birkaçının tıkanması ile meydana gelen iskemik inme ise en sık görülen inme grubudur. İskemik inme etyolojisinde birden çok faktör bulunmakla birlikte kalıtım ile olan ilişkisi de uzun zamandır araştırmalara konu olmaktadır.

Çalışmamızın amacı Matrix Gla Proteini G-7A ve T-138C gen polimorfizmlerinin iskemik inme hastalığı için genetik risk faktörü olma ihtimalini araştırmaktır.

Çalışmamızda belirlenen istatiksel analizlere göre, hasta grubu olarak 52 iskemik inmeli hasta ve kontrol grubu olarak 60 nörolojik hastalığı olmayan kişi bulunmaktadır. Matrix Gla Proteini G-7A ve T-138C gen polimorfizmleri, polimeraz zincir reaksiyonu ve ardından restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi yöntemleri yardımıyla belirlenmiştir.

Çalışmamız sonucunda MGP gen polimorfizmlerinden G-7A için hem istatiksel hem de klinik olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. T-138C için ise istatiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da klinik anlamlılık gösteren sonuçlar bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: İskemik inme, MGP G-7A gen polimorfizmi, MGP T-138C gen polimorfizmi.

INVESTIGATION OF MATRIX Gla PROTEIN G-7A AND T-138C GENE POLYMORPHISMS IN ISCHEMIC STROKE PATIENTS

SUMMARY

Human health and research on this subject has not lost its importance today. Stroke and its multifactorial etiology, which have been among the diseases that decrease the quality of life of people for many years, have led researchers to work on this subject. Ischemic stroke, caused by obstruction of one or more of the vessels that provide blood to the brain is the most common stroke group. Although there are multiple factors in the etiology of ischemic stroke, its relationship with heredity has long been the subject of research.

The aim of this study was to investigate the possibility that Matrix Gla Protein G-7A and T-138C gene polymorphisms are genetic risk factors for ischemic stroke disease.

According to the statistical analysis determined in our study, there were 52 ischemic stroke patients as the patient group and 60 people without neurological diseases as the control group. Matrix Gla Protein G-7A and T-138C gene polymorphisms were determined by polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism.

As a result of our study, no statistically significant difference was found between MGP gene polymorphisms and G-7A. Although there was no statistically significant difference for T-138C, clinical results were found.

Keywords: Ischemic stroke, MGP G-7A gene polymorphism, MGP T-138 C gene polymorphis

KAYNAKLAR

1. World Health Organisation. The WHO STEP wise approach to stroke surveillance. Geneva: WHO, 2005.

2. World Health Organization. Chronic Disease prevention and control. Geneva: WHO, 2014.

3. WHO Global Infobase. Chronic Disease mortality. Geneva: WHO, 2014.

4. Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase CS, Au R, Kannel WB, Wolf PA: The lifetime risk of stroke - Estimates from the Framingham Study. Stroke 2006, 37:345-50.

5. Beal CC: Gender and stroke symptoms: A review of the current literature. Journal of Neuroscience Nursing 2010, 42:80-7.

6. Mattson MP, Duan W, Pedersen WA, Culmsee C: Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. Apoptosis 2001, 6:69-81.

7. A.V. Atamana, A.V. Polonikovb, V.Yu. Garbusovaa, Yu.A. Atamana and O. I. Matlaja ISSN 0095_4527, Cytology and Genetics, 2013, Vol. 47, No. 5, pp. 287–293.

8.A.C.Guyton-John E.Hall, Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji 13.baskı(çeviri), Prof. Dr. Berrak Ç. Yeğen, Prof. Dr. İnci Alican, Prof. Dr. Zeynep Solakoğlu (Çeviri Editörü), Güneş Tıp Kitapevleri, 2017.

9. Mamo YA. Cerebrovascular effects of vasoactive drugs: University of Melbourne, 2015.

10. Chesler M: Regulation and modulation of pH in the brain. Physiol Rev 83:1183, 2003.

11. Ainslie PN, Duffin J: Integration of cerebrovascular CO2 reactivity and chemoreflex control of breathing: mechanisms of regulation, measurement and interpretation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 296: R1473, 2009.

12. Barres BA: The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. Neuron 60:430, 2008.

13. Filosa JA, Iddıngs JA: Astrocyte regulation of cerebral vascular tone, Am J Physiol Heart Circ Physiol 305:H609, 2013.

14. Sloan SA, Barres BA: Mechanisms of astrocyte development and their contrubutions to neurodevelopmental disorders. Curr Opin Neurobiol 27C:75,2014.

15. Sykova E, Nicholson C: Diffusion in brain extracellular space. Physiol Rev 88:1277, 2008.

16. Dunn KM, Nelson MT: Neurovascular signalling in the brain and the pathological consequences of hypertension, Am J Physiol Heart Circ Physiol 306:H1, 2014.

17. Iliff JJ, Nedergaard M: Is there a cerebral lymphatic system? Stroke 44 (6 Suppl 1): S93, 2013.

18. Pires PW, Dams Ramos CM, Matin N, Dorrance AM: The effects of hypertension on the cerebral circulation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 304:H1598, 2013.

19. Schönfeld P, Reiser G: Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. J Cereb Blood Flow Metab 33:1493, 2013.

20. AD Lopez, CD Mathers, M Ezzati, DT Jamison, CJL Murray: Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: Systematic analysis of population health data Lancet, 367 (2006),pp. 1747-1757.

21. Taraka H, Hayashi M, Date C et al. Epidemiologic studies of stroke in Slubata, a Japanese provincial city preliminary report on risk factors for cerebral infarction. Stroke 1985; 16:773-780) (Ashok P, Radhakrishnan K, Sridharan R, Elmangoush M: Incidence and pattern of cerebrovascular disease in Benghazi, Libya. J Neurol, Neurosurgery Psychiatry 1986;49: 519-523.

22. Adams Jr HP, Bendixen BH, Kapelle J, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, The TOAST investigators. Classification of subtypes of acute ischemic stroke. Definition for use in multicenter clinical trial. Stroke.1993; 24:35-41.

23. Eda Kılıç Çoban, Nilüfer Kale İçen, Mesude Özerden Acar, Melek Çolak Atmaca, Aysun Soysal, The Role of Genetics Among Stroke Risk Factors: Discussion of Two Rare Genetic Syndromes Associated with Stroke and Literature Review, Bakırköy Research and Training Hospital for Psychiatry, Neurology and Neurosurgery, Turk J Neurol 2015; 21:104-9.

24. Sacco RL, Ellenberg JH, Mohr JP, Tatemichi TK, Hier DB, Price TR, Wolf PA. I Infarcts of undetermined cause: the NINCDS Stroke Data Bank. Ann Neurol 1989; 25:382-390.

25. Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. Lancet Neurol 2007; 6:149-161.

26. Ahamad Hassan, Hugh S. Markus, Department of Clinical Neurosciences, St. George's Hospital Medical School, London, UK. Brain, 2000, 123, 1784-181.

27. Detrano, R.C., Wong, N.D., Doherty, T.M and Shavelle, R. Prognostic significance of coronary calcific deposits in asymptomatic high risk subjects, Am. J. Med., 1997, vol. 102, pp. 344–349.

28. Fraser, J.D. and Price, P.A., Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin k dependent matrix Gla protein, J. Biol. Chem., 1988, vol. 263, pp. 11033–11036.

29. Cancela, L., Hsiehg, C.L., Francket, U., and Price, P.A., Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene, J. Biol. Chem. 1990, vol. 265, pp. 15040–15048.

30. Stanford, W. Coronary artery calcification as an indicator of preclinical coronary artery disease, Radiographics, 1999, vol. 19, pp. 1409–1419.

31. Shanahan, C.M., Proudfoot, D., Tyson, K.L., et al., Expression of mineralization regulating proteins in association with human vascular calcification, Z. Kardiol. 2000, vol. 89, suppl. 2, pp. 64–68.

32. Giachelli, C.M. Vascular calcification mechanisms, J. Am. Soc. Nephrol. 2004, vol.15, pp. 2959–2964.

33. Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. Proc Natl Acad Sci USA. 1976; 73: 1447–51.

34. Proudfoot, D. and Shanahan, C.M. Molecular mech anisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein, Nephrology (Carlton), 2006, vol. 11, pp. 455–461.

35. Kazuhiro Yoshikawa, Hideharu Abe, Tatsuya Tominaga, Masayuki Nakamura, Seiji Kishi, Motokazu Matsuura, Kojiro Nagai, Kenji Tsuchida, Jun Minakuchi, Toshio Doi, Polymorphism in the human matrix Gla protein gene is associated with the progression of vascular calcification in maintenance hemodialysis patients, Clin Exp Nephrol ,2013, 17:882–889 DOI 10.1007/s10157-013-0785-9.

36. Department of Health. Reducing brain damage: faster access to better stroke care. National Audit Office; London: 2005.

37. Sacco RL, Ellenberg JH, Mohr JP. Infarcts of undetermined cause: the NINCDS Stroke Data Bank. Ann Neurol. 1989; 25:382–390.

38. Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. Lancet Neurol. 2007; 6:149–161.

39. Dichgans M, Markus HS. Genetic association studies in stroke: methodological issues and proposed standard criteria. Stroke. 2005; 36:2027–2031.

40. Markus HS. Stroke genetics. Hum Mol Genet. 2011; 20: R124–R131.

41. Jerrard-Dunne P, Cloud G, Hassan A, Markus HS. Evaluating the genetic component of ischemic stroke subtypes: a family history study. Stroke. 2003; 34:1364–1369.

42. Afshin Farzaneh-Far, John D. Davies, Levienja A. Braam, Henri M. Spronk, Diane Proudfoot, Shiu-Wan Chan, et al. A Polymorphism of the Human Matrix γ- Carboxyglutamic Acid Protein Promoter Alters Binding of an Activating Protein-1 Complex and Is Associated with Altered Transcription and Serum Levels. The Journal Of Biological Chemistry 2001;276(35):32466-32473.

43. Gustavo Saposnik, MD, MSc, FAHA; Robert Cote. Stroke Outcome in Those Over 80, A Multicenter Cohort Study Across Canada Gustavo Saposnik .DOI:10.1161/STROKEAHA.107.511402.

44. Yang-Ki Minn. Yonsei. Long-term Outcomes of Acute Ischemic Stroke in Patients Aged 80 Years and Older. Med J Vol. 49, No. 3, 2008.

45. Braam, L.A., Dissel, P., Gijsbers, B.L. et al., Assay for human matrix Gla protein in serum. Potential applications in the cardiovascular fields, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2000, vol. 20, pp. 1257–1261.

46. Donnell, C.J., Kyla, SheaM., Price, P.A., et al. Matrix Gla protein is associated with risk factors for atherosclerosis but not with coronary artery calcification, Arteriosckler. Thromb. Vasc. Biol., 2006, vol.26, pp. 2769–2774.

47. Farzaneh Far, A., Davies, J.D., Braam, L.A., et al., A polymorphism of the human matrix γ carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein1 complex and is associated with altered transcription and serum levels, J. Biol. Chem., 2001, vol. 276, pp. 32466–32473.

48. ISSN 00954527, Cytology and Genetics, 2013, Vol.47, No.5, pp. 287–293. Allerton Press, Inc., 2013. Original Ukrainian Text. A.V. Ataman, A.V. Polonikov, V.Yu. Garbusova, Yu.A. Ataman, O.I. Matlaj, 2013, published in Tsitologiya i Genetika, 2013, Vol. 47, No. 5, pp. 33–40.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Serebral Dolaşım

Şekil 2. Arteryel PCO2 ve beyin kan akımı arasındaki ilişki

Şekil 3. Otoregülasyon Mekanizması

Şekil 4. Matris Gla proteini için amino asit dizisi (MGP)

Şekil 5. PZR döngüsü

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

Şekil 7. Elde edilen PZR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde yürütülmesi

Şekil 8. G-7A polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü

Şekil 9. T-138C polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü

TABLOLAR

Tablo 1. İnme Risk Faktörleri Sınıflaması

Tablo 2. Sigma kiti ile DNA izolasyonu

Tablo 3. G-7A polimorfizmi için kullanılan primer tablosu ve restriksiyon enziminin kesim sonuçları

Tablo 4. T-138C polimorfizmi için kullanılan primer tablosu ve restriksiyon enziminin kesim sonuçları

Tablo 5. G-7A ve T-138C için kontrol ve hasta gruplarının klinik bulguları

Tablo 6. G-7A genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

Tablo 7. T-138C genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

ÖZGEÇMİŞ

AD-SOYAD : DAMLA DURU KOÇER

DOĞUM YERİ : İSTANBUL

DOĞUM TARİHİ : 25.08.1993

E-POSTA ADRESİ : damla.duru.kocer.1993@gmail.com

EĞİTİM BİLGİSİ : Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi

Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü (2011-2015)

EKLER

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

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2018/413	
	PROTOKOL ADI	İskemik İnmeli Hastalarda Matrix Gla Proteinin G-7A ve T-138C Gen Polimorfizmlerinin Hastalık ile İlişkisinin 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: 19/31** **Tarih:19.11.2018** Fakültemiz Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tammam SİPAHİ'nin sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Damla Duru KOÇER'in 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	
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	
Dr. Öğr.Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi 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	
Dr. Öğr. Üyesi 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	Mazeretli
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	Mazeretli
Prof. 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	Mazeretli
Avukat Özden İPÇİ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E H	E H	Mazeretli
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.

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ SÖZLEŞMESİ

PROJE NO: 2019/65	
PROJE NİTELİĞİ: YÜKSEK LİSANS	

1-PROJE BAŞLIĞI

İskemik inmeli hastalarda Matrix Gla proteini G-7A ve T-138C gen polimorfizmlerinin hastalık ile ilişkisinin araştırılması

2-PERSONEL BİLGİLERİ

	Adı ve Soyadı	Unvanı	Telefon
Proje Yöneticisi	Prof.Dr. Tammam SİPAHİ	Prof.Dr.	(284)235-7641
Araştırmacılar	Öğrenci Damla Duru KOÇER	Öğrenci	(536)641-2814

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	14,993.00
03.07 Menkul Mal, Gayrimaddi Hak Alım, Bakım ve Onarım Giderleri	
06.01 Mamul Mal Alımı	
06.03 Gayrimenkul Hak Alım,Yazılım Alımları	
TOPLAM ÖDENEK	14,993.00

3-PROJE GELİŞİMİ

1.Projenin Kabul Tarihi: 19-03-2019	**1.Ara Rapor** : 21-09-2019	**Sonuç :** ..... (+ / -)
2.Projenin Başlama Tarihi :22-03-2019	**2.Ara Rapor** : 21-03-2020	**Sonuç :** ..... (+ / -)
3.Projenin Bitiş Tarihi : 22-03-2022	**3.Ara Rapor** : 21-09-2020	**Sonuç :** ..... (+ / -)
4.Projenin Süresi: 36 Ay	**4.Ara Rapor** : 21-03-2021	**Sonuç :** ..... (+ / -)
	5.Ara Rapor : 21-09-2021	**Sonuç :** ..... (+ / -)
	Sonuç Raporu : 21-03-2022	**Sonuç :** ..... (+ / -)

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	04.04.2019	

Komisyon Başkanı

Prof. Dr. Cem UZUN
Rektör Yardımcısı

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

Sayı : 59803669-604.99 -E.142014
Konu : Sözleşme

01/04/2019

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

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz ve yüksek lisans öğrencisi Damla Duru KOÇER'in "İskemik inmeli hastalarda Matrix Gla proteini G-7A ve T-138C gen polimorfizmlerinin hastalık ile ilişkisinin araştırılması" başlıklı yüksek lisans projesinin, 36 (otuz altı) ay süre ve 14.993,00 TL ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 19.03.2019 tarih ve 2019/04 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. Cem UZUN
Rektör Yardımcısı

Ek:Protokol sözleşmesi (2 sayfa)

BELGENİN ASLI ELEKTRONİK İMZALIDIR

Evrakı Doğrulamak İçin : https://ebys.trakya.edu.tr/enVision/Validate_Doc.aspx?V=BELCB7H6C 02.04.19

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.