

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TİP 2 DİYABET HASTALIĞINDA MMP-3 VE MMP-12
GEN POLİMORFİZMLERİNİN VE SERUM
DÜZEYLERİNE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

LEMAN MELİS YURDUM

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. Ş. ÜMİT ZEYBEK**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Programında Leman Melis Yurdum tarafından hazırlanan Tıp 2 Diyabet Hastalığında MMP-3 ve MMP-12 Gen Polimorfizmlerinin ve Serum Düzeylerine Olan Etkisinin İncelenmesi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

10 / 06 / 2011

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.PROF.DR.İLHAN YAYLIM ERALTAN, İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp AD	
2.DOÇ.DR.ÜMİT ZEYBEK, İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp AD	
3.DOÇ.DR.BEDİA AĞAÇHAN, İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp AD	
4.DOÇ.DR.ARZU ERGEN, İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp AD	
5.DOÇ.DR.UZAY GÖRMÜŞ, Bilim Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya AD	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Leman Melis Yurdum

İTHAF

Annem Zeyneb Harika Yurdum'a, Babam Kamil Erkin Yurdum'a ve Anneannem Saliha Erişkin'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Turgay İsbir'e, DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım Eraltan'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, her konuda bana destek olan saygıdeğer hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Ş.Ümit Zeybek'e,

Tez çalışmam süresince yardımları ve destekleri için Doç. Dr. Bedia Ağaçhan Doç. Dr. H. Arzu Ergen, Doç. Dr. Hülya Yılmaz-Aydoğan, Prof. Dr. Oğuz Öztürk, Msc. Canan Cacına, Msc. Bahar Toptaş, Msc. Özlem Timirci-Kahraman, Msc. Özlem Küçük hüseyin olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tezimin yapımı ve yazımı sırasındaki yardımları ve destekleri için çok değerli arkadaşlarım, Mol. Bio. Nihal Yiğitbaşı'na, Bio. M. Fatih Seyhan'a, Bio. Özlem Gök'e, Bio. Yunus Emre Ekşi'ye, Msc. Birsu Çiçin'e ve Mol.Bio Adem Kocaman'a,

Hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4393

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
BEYAN.....	3
İTHAF.....	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	6
TABLolar LİSTESİ.....	9
ŞEKİLLER LİSTESİ	10
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	11
ÖZET	12
ABSTRACT.....	13
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	14
2. GENEL BİLGİLER	16
2.1. DIABETES MELLITUS	16
2.1.1. Diyabetin Tanısı.....	16
2.2. DiYABETİN SINIFLANDIRILMASI	17
2.2.1. Tip 1 Diyabet	17
2.2.1.1. Tip 1 Diyabetteki Metabolik Değişiklikler	17
2.2.2. Tip 2 Diyabet	18
2.2.2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus'un Patogenezi	18
2.3. Diyabete Neden Olan Risk Etmenleri.....	20
2.3.1. Vücut Yağ Dağılımı.....	20
2.3.2. Obezite	20
2.3.3. Cinsiyet	20
2.3.4. Beslenme.....	21
2.3.5. Genetik Belirteçler	21
2.3.6. Alkol ve Sigara Tüketimi.....	21
2.3.7. Kalıtım	21
2.3.8. İnsülin Direnci.....	21
2.3.9. Cinsiyet Hormonları.....	22
2.4. Diyabette İnflamatuvar Mekanizma	22

2.5. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR (MMPs).....	23
2.5.1. Matriks Metalloproteinazların Yapısı ve Sınıflandırılması	24
2.5.2. Matriks Metalloproteinazların Biyokimyası	27
MMP ailesinde yer alan enzimlerin 3 temel moleküler özelliği bulunur (32):.....	27
2.5.3. Matriks Metalloproteinazların Genel Özellikleri ve Görevleri.....	29
2.5.4. Matriks Metalloproteinazların Regülasyonu.....	29
2.5.5. Latent MMP'lerin (Pro-MMP) Aktivasyonu	30
2.5.6. MMP'lerin Fizyolojik Fonksiyonları	31
2.5.7. MMP-Aracılı Bölünmeyle Üretilen Biyolojik Aktiviteler.....	31
2.5.8. Matriks Metalloproteinazların Gen Ekspresyonlarının Düzenlenmesi.....	33
2.5.9. Gen Polimorfizmleri	35
2.6. Matriks Metalloproteinaz – 3 (MMP-3,Stromelisin-1) Geni.....	36
2.7. Makrofaj Metalloelastaz (MMP-12,Matrilisin)	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI	38
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	38
3.3. KULLANILAN GEREÇLER.....	39
3.4. ÇÖZELTİLER	39
3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	39
3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer).....	39
3.4.1.2. 0,5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH:8.0)	39
3.4.1.3. 4 Molar Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi.....	39
3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL).....	40
3.4.1.5. 1 Molar Tris Tamponu (Stok)	40
3.4.1.6. 9,5 Molar Amonyum Asetat Çözeltisi	40
3.4.1.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi	40
3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml).....	40
3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler.....	40
3.4.2.1. Etidyum Bromür (10 mg/ml)	40
3.4.2.2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x).....	41
3.4.2.3. 50x Tris - Asetik asit - Etilen Diamin Tetra Asetat (TAE) Tamponu.....	41
3.4.2.4. 5X Tris-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TBE) Tamponu	41
3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	41

3.5.1. PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU.....	41
3.5.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini	42
3.6. PZR Yöntemi İle MMP-3 ve MMP-12 Gen Bölgelerinin Çoğaltılması ve RFLP Yöntemiyle Polimorfizm Analizi.....	42
3.6.1. PZR'da Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	42
3.6.2. MMP-3 -1171 5A/6A ve MMP-12 -82A/G Gen Bölgelerinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması	43
3.6.2.1. %3'lik Agaroz Jel Hazırlanması	44
3.6.2.2. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel'e Yüklenmesi	44
3.6.2.3. PZR Ürünlerinin Kontrolü	45
3.6.2.4. MMP-3 -1171 5A/6A geninden 129 bç ve MMP-12 -82 A/G Gen Polimorfizminin Belirlenmesi İçin PZR Ürünlerinde Restriksiyon Enzim Analizi..	45
3.6.2.5. Restriksiyon Enzim Kesimleri	45
3.6.2.6. Tth111I ve PvuII Enzimleri Kesim Ürünlerinin Kontrolü.....	46
3.6.2.7. Tth111I ve PvuII Enzimleri Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	46
Tth111I Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	46
3.7. SERUM MMP-3 VE MMP-12 DÜZEYLERİNİN ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ	48
3.7.1. ELISA Yönteminin Genel Prensipleri	49
3.7.1.1. Serumda Human MMP-3 Düzey Tayin Protokolü.....	49
3.7.1.2. Serumda Human MMP-12 Düzey Tayin Protokolü.....	50
3.7.2. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılacak İstatistiksel Yöntemler	51
4. BULGULAR.....	52
5.TARTIŞMA	57
KAYNAKLAR	64
ETİK KURUL KARARI	73
ÖZGEÇMİŞ	74

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Matriks metalloproteinaz ailesi ve sitogenetik lokalizasyonları (22,24,29).....	26
Tablo 2: MMP'lerin biyolojik aktiviteleri ve spesifik substratları (21).....	32
Tablo 3 : MMP Genlerinin Transkripsiyonel Regülasyonu (60).....	35
Tablo 4 : MMP-3 -1171 5A/6A gen bölgesi için kullanılan PZR Protokolü.....	43
Tablo 5 : MMP-3 -1171 5A/6A gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon sıcaklıkları	43
Tablo 6 : MMP-12 -82 A/G gen bölgesi için kullanılan PZR Protokolü.....	44
Tablo 7 : MMP-12 -82 A/G gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon sıcaklıkları	44
Tablo 8 : Tth111I enzimi için kesim protokolü	46
Tablo 9 : PvuII enzimi için kesim protokolü	46
Tablo 10 : Çalışma gruplarına ait demografik bilgiler	52
Tablo 11 : Hasta grubuna ait demografik bilgiler	52
Tablo 12 : Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Serum Düzeyleri	53
Tablo 13 : Hasta ve Kontrol gruplarında MMP-3-1171 5A/6A genotip ve allel dağılımları.....	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Tip 2 patogenezinde epigenetik mekanizma (59).....	20
Şekil 2 : Tip 2 diyabette inflamasyonun gelişimi (59).....	23
Şekil 3: Matriks metalloproteinazların yapıları (34).....	28
Şekil 4 : Matriks metalloproteinazların genel yapısı (35).....	29
Şekil 5 : Latent MMP'lerin Aktivasyonu	31
Şekil 6 : MMP-3 -1171 5A/6A polimorfizmi kesim görüntüsü.....	47
Şekil 7 : MMP-12 -82A/G polimorfizmi kesim görüntüsü.....	48
Şekil 8: Hasta ve Kontrol Gruplarına ait MMP-3 6A5A Genotip Dağılımları.....	55
Şekil 9 : MMP-3-1171 5A/6A genotiplerine ait serum MMP-3 düzeyleri.....	56

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

MMP : Matriks metalloproteinaz

ESM : Ekstrasellüler Matriks

IL-1 : İnterlökin-1

TNF : Tümör Nekrozis Faktör

NfK β : Nükleer Faktör k β

OR : Risk Katsayısı

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RFLP : Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi

ÖZET

Yurdum LM. Tip 2 Diyabet Hastalığında MMP-3 ve MMP-12 Gen Polimorfizmlerinin ve Serum Düzeylerine Olan Etkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans. İstanbul. 2011.

Diabetes mellitus, bütün dünyada milyonlarca kişiyi etkileyen ve giderek artan bir sağlık problemidir. Type 2 diabetes mellitus, patogenezi kompleks moleküler yolları aktive etmesi ile karakterize edilir ve inflamatuvar yollar diyabetik nefropati gibi diyabetik komplikasyonların gelişiminde merkezi rol oynar. İnflamatuvar sitokinler, diyabet ile mikrovasküler komplikasyon patogenezinde önemlidir. IL-1,IL-6, IL-18 ve TNF inflamasyonun temel düzenleyicileridir. Bu moleküller, diyabetik nefropatinin patogenezinde rol oynar. Matriks metalloproteinazlar (MMPs), sitokinler tarafından düzenlenir. MMP'ler, rheumatoid, osteoartrit, metastatik kanser, metabolik kemik hastalığı, ateroskleroz gibi patolojik süreçlerde doku matrikslerini bozmaktadır. Çalışmamıza hasta grubu olarak 70 adet Tip 2 diyabet hastası , kontrol grubu olarak 100 sağlıklı kişi dahil ettik. MMP-3 -1171 5A/6A genotip frekansları diyabet hastalarında %20 6A/6A, %8 5A/5A , %42 6A/5A iken kontrol grubunda %38 6A/6A, %18 5A/5A , %44 6A/5A olduğunu bulduk. Hasta ve kontrol grupları arasında MMP-3-1171 5A/6A genotipleri ve allelleri açısından istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0.05). Heterozigot 6A/5A genotipine sahip bireylerin frekansının hasta grubunda kontrole göre anlamlı olarak yüksek olduğu ve diyabet gelişim riskinin 1,9 kat yükseldiği gözlenmiştir. Tez çalışmamızda MMP-12 genotipleme de yapılmış olup hasta ve kontrolde herhangi bir variant polimorfizme rastlanmamıştır. Çalışma gruplarının hepsinde AA genotipi tespit edilmiş olup istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

Anahtar Kelimeler : Diabetes Mellitus, MMP-3, MMP-12,Polimorfizm, İnflamasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4393

ABSTRACT

Yurdum LM. (2011). Investigation of gene polymorphisms and serum levels of MMP-3 and MMP-12 in patient with Type 2 Diabetes Mellitus. İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine. İstanbul 2011.

Diabetes mellitus is a growing public health problem that adversely affects the lives of millions of individuals around the world. The pathogenesis of Type 2 diabetes mellitus is characterized by activation of complex molecular pathways and evidence suggests that inflammatory pathways have a central role in the development of diabetic complications, such as diabetic nephropathy. Inflammatory cytokines are important in the pathogenesis of microvascular complication with diabetes mellitus.

IL-1, IL-6, IL-18 and TNF are the main regulators of inflammation. These molecules are cytokines reported to have key roles in pathogenesis of diabetic nephropathy. There are lots of investigation about matrix metalloproteinases (MMPs) which are regulated by cytokines. MMPs are implicated in many pathologic processes characterized by dysregulated turnover of connective tissue matrices, such as occurs in rheumatoid and osteoarthritis, metastatic cancer, metabolic bone disease, atherosclerosis. We used PCR, RFLP and gel electrophoresis techniques to detect MMP-3-1171 5A/6A and MMP-12-82A/G polymorphisms on 70 type II diabetes mellitus patients and 100 controls. In our study, we found MMP-3-1171 5A/6A genotypes %20 6A/6A, %8 5A/5A, %42 6A/5A in diabetes patients and %38 6A/6A, %18 5A/5A, %44 6A/5A in control group. There is no statistically mean frequencies and significant difference between diabetes mellitus and control groups in the distribution of MMP-3-1171 genotypes ($p < 0.05$). 6A/5A genotype frequencies increased 1,9 times in the diabetes group. We didn't determine MMP 12 GG and AG genotypes in patient and in control groups.

Key Words: Diabetes Mellitus, MMP-3, MMP-12, Polymorphism and Inflammatory

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 4393

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet vakalarının yaklaşık %80-90'nı oluşturan ve tipik olarak ileri yaşlarda ortaya çıkan bir hastalık olarak bilinen tip 2 diyabet (1), son dönemlerde genç erişkinlerde ve çocukluk çağında da görülmeye başlanmıştır (2). Günümüzde dünya üzerinde 200 milyon diyabet hastası bulunmakta olup, 2025 yılında 300 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir (3).

Tip 2 diyabet, lipid, protein ve karbonhidrat metabolizma bozuklukları ile seyreden retinopati, nefropati, nöropati, kalp hastalıkları, hipertansiyon, gebelik komplikasyonları çok geniş bir komplikasyon yelpazesine sahiptir (4). Tip 2 diyabet patogenezi oldukça karmaşıktır ve birçok yönden halen tartışma konusudur. Kalıtımı poligeniktir ve çevresel faktörlerle güçlü bir ilişkisi mevcuttur. Tip 2 diyabet patogenezinde bozulmuş insülin salınımı ve insülin duyarlılığı ile inflamatuvar yolların rolü de giderek önem kazanmaktadır (4).

Matriks metalloproteinazlar (MMP) ekstrasellüler matriks (ESM) bileşenlerini yıkıma uğratan, Zn^{++} ve Ca^{++} 'a bağımlı bir nötral endopeptidaz ailesidir (4). Bu enzimler doku rejenerasyonu, inflamasyon, morfogenez, yara iyileşmesi ve normal süreçlerin içinde bulunduğu fizyolojik durumlarda önemli rol oynarlar hem de tümör hücreleri invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar.

Fizyolojik koşullar altında MMP'lerin aktivitesi endojen doku inhibitörleri (TIMP) tarafından kontrol edilmektedir. Yapılan çalışmalarda sitokin ve büyüme faktörlerini uyaran gen transkripsiyonu, zimojen aktivasyonunun artışı ve MMP/TIMP oranındaki dengesizlik sonucu, MMP aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (4). MMP ve TIMP'ler normal şartlar altında dokularda düşük düzeyde ekspresyon göstermektedir. MMP'ler kanser ve ateroskleroz başta olmak üzere artrit, nefrit, gastrointestinal ülser, peridontal hastalık, kornea ülseri, deri ülseri, multipl skleroz, nörolojik hastalıklar, Alzheimer, karaciğer fibrozu, fibrotik akciğer hastalığı, amfizem, kan beyin bariyerinin yıkılması gibi birçok patolojik olayda rol oynamaktadır.

Kontrolsüz hiperglisemi, diyabet süresi, artmış oksidan düzeyleri ve enzimatik olmayan protein glikolizasyonu diyabetik komplikasyonların oluşmasında önemli rol oynarlar. Tip 2 diyabetin komplikasyonları arasında yer alan diyabetik nefropatide ekstrasellüler matriks kalınlaşmalarında rol oynamaktadır (4).

Bu alışmada, Tip 2 diyabet hastalarında ekstrasellular matriks proteinleri üzerine etki gösteren MMP-3 ve MMP-12 gen polimorfizmleri ve serum düzeylerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DIABETES MELLITUS

Diyabet insülin yokluğu, yetersizliği veya periferik dokulardaki insülin direncine bağlı olarak hiperglisemi ataklarıyla seyreden bir hastalıktır (5,6). Yetersiz insülin salınımı nedeniyle oluşan metabolik değişiklikler, glukagonun artması ile daha da şiddetlenir. Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarının kronik olarak bozulması sonucunda kan damarları, böbrekler, gözler ve sinirleri etkileyen uzun süreli komplikasyonlar gelişir (5).

2.1.1. Diyabetin Tanısı

Normal glukoz homeostazı birbiri ile ilişkili üç süreç tarafından sıkı biçimde düzenlenir: Karaciğerde glukoz üretimi, periferik dokular tarafından glukozun alınması ve kullanılması (başlıca iskelet kası), insülin ve glukagonlar gibi karşıt-düzenleyici hormonların etkileri. Kan glukoz değerleri bu kontrol yolları ile normalde çok dar bir aralıkta, çoğunlukla 70-110 mg/dl arasında tutulur (5).

Diyabetin klinik ve etiyolojik olarak ortaya çıkış evreleri şöyledir (7).

1. Evre : genetik yatkınlık
2. Evre : immünolojik bozukluklar (insülin salınımı normal olup, otoantikörler ortaya çıkar)
3. Evre : insülin salınımında azalma
4. Evre : OGTT yanıtları bozulur ancak diyabet tanısı konacak düzeyde değildir.
5. Evre : klinik olarak diyabet semptomları belirir, glukagona C-peptid yanıtı vardır.
6. Evre : total diyabet evresi

Diyabetes mellitus tanısı, kan glukoz yüksekliğinin üç kriterden herhangi biri ile gösterilmesi sonucunda konur (8):

- Kronik belirti ve semptomlar(sonra tartışılmıştır) ile birlikte herhangi bir zamanda 200 mg/dl veya üzerinde glukoz düzeyi

- 126 mg/dl veya üzeri açlık glukoz düzeyi
- Glukoz düzeyinin standart karbohidrat yüklemesinden 2 saat sonra 200 mg/dl veya üzerinde olduğu anormal oral glukoz tolerans test (OGTT)

2.2. DiYABETİN SINIFLANDIRILMASI

Diyabetikler iki gruba ayrılır: İnsüline-bağımlı diabetes mellitus (Tip 1 diyabet) ve İnsülden-bağımsız diabetes mellitus (Tip 2 diyabet) (5).

2.2.1. Tip 1 Diyabet

Bu hastalar, diyabetlilerin %10-20'sini oluşturmaktadır. Bu hastalıkta, pankreasın β -hücreleri ağır bir otoimmün atak nedeni ile hasara uğramıştır ve insülin tamamen eksiktir. Bu hasarın oluşması için çevresel bir uyarı (viral bir enfeksiyon gibi) ve/veya β -hücrelerinin 'yabancı' olarak tanınmasını sağlayan genetik bir kusur gereklidir. β -hücrelerinin %80-90'ı harabiyete uğradığında semptomlar aniden ortaya çıkar. Bu noktada, pankreas artık alınan glukozu yeterli yanıtı veremez ve metabolik kontrolü düzeltmek için insülin verilmesi gereklidir (6).

2.2.1.1. Tip 1 Diyabetteki Metabolik Değişiklikler

Tedavi edilmemiş diabetes mellitusta, hiperglisemi ve ketoasidoz görülür. Hiperglisemi, glukozun hepatik yapımının artmasıyla beraber periferik kullanımının azalması nedeni ile meydana gelmektedir. Ketoasidoz ise, adipoz dokudan yağ asidi salınımının artmasıyla beraber karaciğerde 3-Hidroksibütirat ve asetoasetat sentezinin artması sonucu oluşmaktadır. Ancak karaciğere gelen yağ asitlerinin hepsi oksidasyon veya keton cisim sentezinde kullanılmaz, bir kısmı triaçilgliserole dönüşür ve VLDL olarak paketlenerek kana verilir. Şilomikronlar, yemek sonrası diyet lipidlerinden barsak mukoza hücrelerinde sentezlenir. Diyabetiklerde, yağ dokusunda lipoprotein lipaz tarafından lipoprotein yıkımının düşük olması nedeni ile plazma şilomikron ve VLDL düzeyleri yükselmiştir. Bu da hipertrigliseridemiye yol açar. Bu metabolik değişiklikler insülin yetersizliği ve glukagonun kısmen yükselmesi nedeni ile oluşmaktadır. Glukagon glukoneogenez ve ketogenezin uyarılmasında önemli bir rol oynar. Bu değişimlerin çoğu açlıkta görülenlere benzemektedir, fakat daha ağır yaşanmaktadır (5).

Diyabet ve açlık arasındaki metabolik farklar şunlardır:

- **İnsülin düzeyleri** : Tip 1 diyabetlilerde kanda hiç insülin bulunmaz, açlıkta ise bir miktar bulunmaktadır. Bu nedenle, diyabetiklerde glukagonun metabolik etkilerine engel olunamamaktadır.
- **Kan glukoz düzeyleri** : Diyabetiklerde karakteristik olarak hiperglisemi görülür. Yiyecek yokluğunda ise kan glukozu normale yakındır.
- **Ketoasidoz** : Diyabette adipoz dokudan yağ asidi salınımı ve hepatik ketogenez, açlıkta olduğundan daha fazla görülmektedir. Sonuç olarak diyabette görülen ketoasidoz, açlıkta görülenden daha ciddidir.

2.2.2. Tip 2 Diyabet

Tip 2 diyabet hastalığın en sık görülen şeklidir (5). Tüm diyabetlilerin %90'ı tip 2 diyabetlidir. Karaciğer, kas ve adipoz dokuda insülin duyarlılığının azalması ve β -hücre fonksiyonunun bozulması ile karakterizedir. Patogenezi genetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı kompleks etkileşime dayanır. Tip 2 diyabet hastalığı genellikle obezitenin eşlik ettiği insülin direnci ve insülin salgısında anomali sonucu gelişir. Bu hastalarda insülin oldukça yüksek seviyelerdedir. Hiperpigmentasyon, akantozis nigrikans ve ensede derinin kalınlaşması gibi insülin direnci belirtileri oluşabilir (5).

2.2.2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus'un Patogenezi

Tip 2 diabetes mellitus çok daha yaygın bir tiptir ve bu tipte genetik yatkınlık daha büyük bir rol oynar. Hastalık, her biri kendi predispozan riskini içeren ve çevresel faktörler tarafından düzenlenen, çoklu genetik bozuklukların bir araya gelmesi sonucunda ortaya çıkar. Tip 1'den farklı olarak, Tip 2'nin otoimmün temeli olduğunu düşündüren kanıt yoktur. Tip 2'nin karakteristiğini oluşturan iki metabolik defekt insülin direnci ve β -hücre bozukluğudur (5).

1. İnsülin Direnci

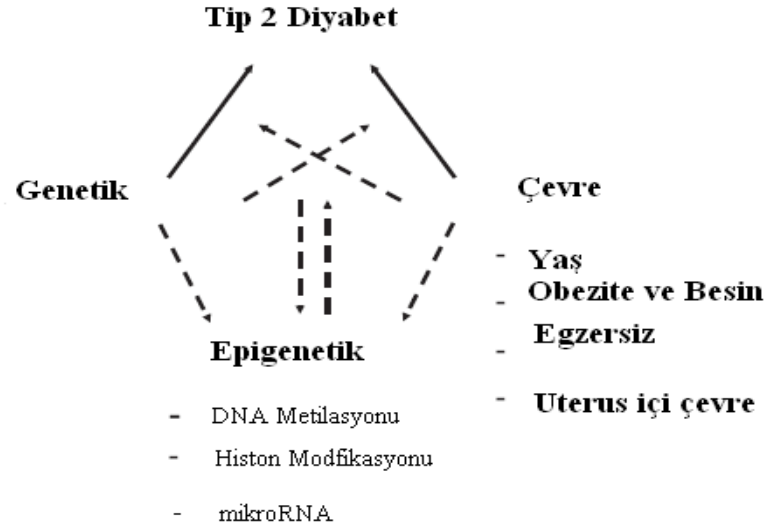
İnsülin direnci periferik dokuların insüline yanıt verme yeteneğinin azalmasıdır. İnsülin direnci olan bireylerde yapılan fonksiyonel çalışmalar sonucunda, insülin reseptör sayısında azalma, insülin reseptör fosforilasyonunda ve tirozin kinaz aktivitesinde azalma ve insülin sinyal yolağında aktif araçların düzeyinde azalma gibi

çok sayıda kantitatif ve kalitatif anomaliler tespit edilmiştir. İnsülin direncinin, çeşitli genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen kompleks bir fenomen olduğu anlaşılmıştır. İnsülin reseptörlerindeki mutasyonların Tip 2 diyabetli hastaların çok küçük bir bölümünden sorumlu olması, insülin direnci ile ilgili genetik faktörlerin büyük oranda sıır olarak kalmasına neden olmuştur.

Çevresel faktörler arasında obezite en güçlü ilişkiye sahiptir. Tip 2 diyabet ve obezitenin birlikteliği yıllardır bilinmektedir ve insülin direnci altta yatan nedendir. Vücut kitle indeksinin (vücut yağ içeriğinin bir ölçümü) yükselmesi ile diyabet artar. Bu durum vücut yağı ve insülin direnci arasında bir doz-yanıt ilişkisi olduğunu akla getirir. Obezitede insülin direncini etkileyen olası faktörler arasında insülin fonksiyonları ile zıt etki gösteren dolaşımda veya hücre içinde yüksek düzeyde serbest yağ asit düzeylerinin varlığı (lipotoksisite) ile leptin, adiponektin ve rezistin gibi adipoz doku tarafından salgılanan çeşitli sitokinler (adipokinler) yer alır. Peroksizom proliferatör –aktive reseptör $-\gamma$ (PPAR- γ), adipositlerdeki gen ekspresyonunu düzenleyebilir ve sonuçta insülin direncinin azalmasına yol açabilir (5).

2. β - Hücre Bozukluğu

β -hücre bozukluğu, hiperglisemi ve insülin direnci varlığında yetersiz insülin sekresyonu olarak belirti verir. β -hücre disfonksiyonu kalitatif (insülin sekresyonunun normal pulsatil ve dalgalı salınım gösteren paterninde kayıp ve plazma glukozundaki yükselme ile tetiklenen insülin sekresyonunun hızlı birinci fazında yavaşlama) ve kantitatif'tir (β -hücre kitlesinde azalma, adacık dejenerasyonu, adacıkta amiloid depolanması) (5).



Şekil 1: Tip 2 patogenezinde epigenetik mekanizma (59).

2.3. Diyabete Neden Olan Risk Etmenleri

2.3.1. Vücut Yağ Dağılımı

Toplumsal araştırmalar diyabet gelişme riskinin beden kitle indeksinden başka vücut yağ kitle artışı ile paralel olarak arttığını ortaya koymuştur.

2.3.2. Obezite

Obezite fazla kiloların özellikle vücudun üst kısmında toplandığı abdominal obezite (santral obezite) tip 2 diyabet riski ile çok yakından ilişkilidir (8). Tip 2 diyabetlilerin %85'i obez veya kiloludur. Yanlış beslenme ve fiziksel aktivitenin azalması sonucunda birçok toplumda obezite sıklığının artması, diyabet sıklığını da arttırmıştır. Vücut ağırlığındaki her 1 kg artışa karşılık diyabet prevalansının %9 arttığı bildirilmiştir (5).

2.3.3. Cinsiyet

Gelişmekte olan ülkelerde hastalık kadınlarda daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Bunu da gelişmiş toplumların çoğunda yapılan çalışmalar desteklemiştir. Buna karşın İskandinav ülkelerinde erkeklerde prevalans daha yüksektir.

2.3.4. Beslenme

Düzensiz ve dengesiz beslenme tip 2 diyabet gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Kalorisi yüksek, doymuş trans yağlardan zengin, posadan fakir beslenme ve öğün atlama insülin direnci obezite ile birlikte diyabet riskini arttırmaktadır (8).

2.3.5. Genetik Belirteçler

Bazı etnik gruplarda tip 2 diyabetin bazı HLA grupları ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca bazı ailevi özel diyabet formlarında da spesifik gen mutasyonları gösterilmiştir.

2.3.6. Alkol ve Sigara Tüketimi

Alkol ve sigara tüketimi ile tip 2 diyabet arasında pozitif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Fakat beden kitle indeksi ile egzersizden sonra bu parametreler ile istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır.

2.3.7. Kalıtım

Tek yumurta ikizlerinde tip 2 diyabetin %90'a varan oranda gözlenmesi hastalığın gelişmesinde kalıtımın önemli ölçüde rolü olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca ailede 1. derecede akrabalarda diyabet bulunması, diyabet riskini 2-6 kat arttırmaktadır. Ailedeki diyabetli sayısı arttıkça risk de yükselmektedir.

2.3.8. İnsülin Direnci

İnsülin direnci ekzojen veya endojen insüline karşı normal biyolojik yanıtın bozulması olarak tanımlanır. İnsülin karaciğerde glukoneogenezi ve glikojenolizi inhibe ederek hepatik glukoz üretimini baskılar. Aynı zamanda glukozun kas ve yağ dokusuna alınımını ve burada enerji kaynağı olarak depolanmasını sağlar. İnsülin direnci gelişen durumda, insülinin karaciğer, kas ve yağ dokusundaki bu etkilerine karşı direnç gelişir ve gerek hepatik glukoz çıkışında artış (hepatik insülin direnci) gerekse kas ve yağ dokusu içine alınamayan glukoz (periferik insülin direnci) ile kanda hiperglisemi gelişir. Hiperglisemiyi kompanse etmek için beta hücresinden fazla insülin salınımı gerçekleşir. Fakat beta hücresi de fonksiyonlarını kaybetmeye başlayınca, insülin salınım eksikliği sonucu diyabet gelişir (6).

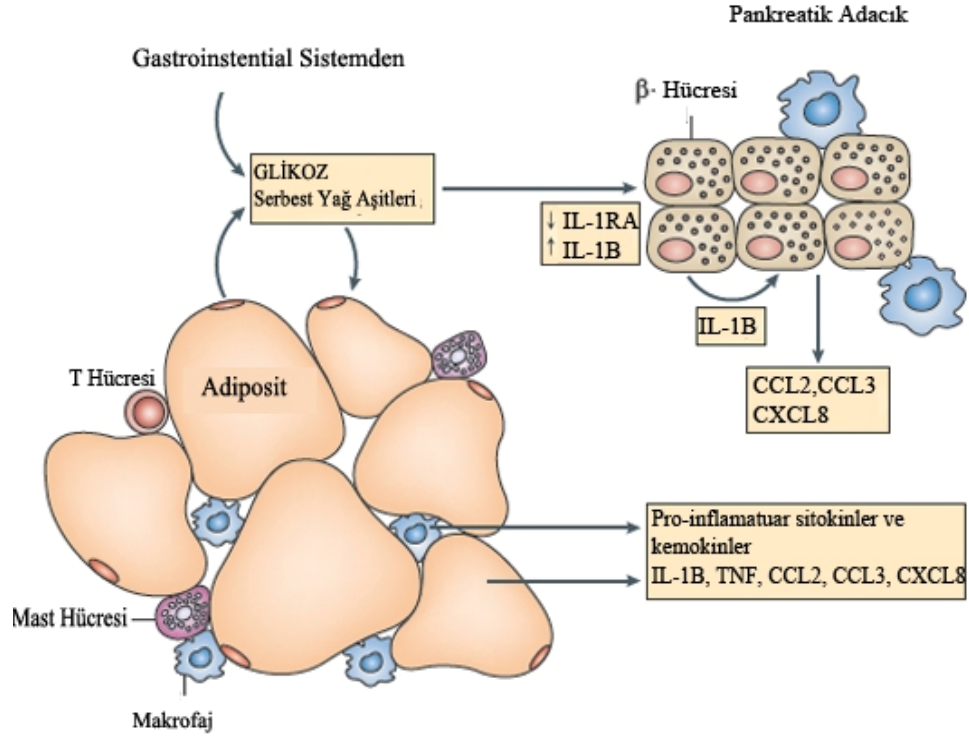
2.3.9. Cinsiyet Hormonları

Cinsiyet hormonları bağlayıcı globulin (SHBG) düşüklüğü, kadınlarda erişkin tip diyabet gelişeceğinin habercisi olarak görülmektedir. Hiperinsülinemi ve insülin direncinin birlikte olduğu polikistik over sendromunda diyabet prevalansının yüksek olduğu bildirilmiştir.

2.4. Diyabette İnflamatuar Mekanizma

Tip 2 diyabetin patogeneğinde birçok kompleks moleküler yolların aktivasyonu bilinmekle birlikte inflamatuvar yolların, nefropati gibi diyabet komplikasyonlarındaki rolü de giderek önem kazanmaktadır. Bugünkü bilgilerimize göre değişik inflamatuvar bileşiklerin mekanizması oldukça karışıktır. Diyabetik nefropatide bu inflamatuvar reaksiyonlarda etkili başlıca elementlerden biri Nükleer Faktör $\kappa\beta$ (NfK β) dir. NfK β proinflamatuvar sitokinler ve mekanik güçleri kapsayan birçok stimulus tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür. Bunu takiben bu sinyaller inflamatuvar yollardaki diğer moleküllerin üretimi ve sentezini tetiklemektedir. Yani NfK β diyabetik nefropati patogeneğinde birçok kemokinin hücre adhezyon moleküllerinin, inflamatuvar sitokinlerin regülasyonunda anahtar rol oynamaktadır. Yapılan birçok çalışmada sitokinler diyabetik nefropatide kapsayan, diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının patogeneğinde oldukça önemli olduklarını göstermişlerdir. IL-1, IL-6, IL-18 ve TNF- α inflamasyonun başlıca regülatörleri olup bu moleküller diyabetik nefropatinin patogeneğinde anahtar rol oynamaktadırlar (10).

Proinflamatuvar sitokinlerin MMP ekspresyonunun düzenlenmesindeki rolünü gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinler MMP üretimini stimüle ederken, transforming büyüme faktörü, kortikoid hormonlar insülin benzeri büyüme faktörler MMP sentezini baskılamaktadır (11,12). Glukoz ve ileri glikolizasyon son ürünlerinin MMP ekspresyonunu düzenlediği in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. MMP aktivasyonunun bozulması çeşitli diyabetik retinopati ve kronik diyabetik ülserler gibi çeşitli diyabetik komplikasyonların patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir. MMP-2'nin hiperglisemi aracılı artmış sentezi in vivo olarak arteriyel damarlaşmada, in vitro olarakta endotel hücreler, makrofajlar ve düz kas hücreleri gibi çeşitli vasküler bileşiklerde gösterilmiştir. Bu veriler ile uyumlu olarak serum MMP-2 ve MMP-9 konsantrasyonlarının tip 2 diyabette periferik arteriyel hastalıklarda veya akut koroner sendromda arttığı gösterilmiştir (12).



Şekil 2 : Tip 2 diyabette inflamasyonun gelişimi (59).

2.5. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR (MMPs)

Hücrelerin canlı kalabilmeleri ve işlevlerini sürdürebilmeleri için buldukları ortamla etkileşimlerini hızlı şekilde düzenlemeleri önemlidir (13). Ekstrasellüler matriksin (ESM) şekillenmesi hücreler tarafından dışarıya salınan büyüme faktörleri, hücresel adezyon molekülleri ve proteinazlarla gerçekleştirilir (14,15).

Ekstrasellüler matriks bileşenlerini yıkabilme kapasitesine sahip iki proteolitik sistem mevcuttur (16,15):

- Fibrinolitik sistem (plazminojen/plazmin),
- Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler).

Plazmin ekstrasellüler matriksin laminin ve fibronektin gibi bazı bileşenlerini doğrudan yıkabilirken elastin ve kollajen gibi temel bileşenler MMP'ler tarafından yıkıma uğratılmaktadır (16,17).

Ekstrasellüler Matriksi (ESM) degrade eden metalloenzimler, matriks metalloproteinazlar ya da matriksinler olarak adlandırılmalarına rağmen en yaygın olanı metalloproteinazlardır (MMPs) (18,21). MMP'ler proteolitik, çinko bağımlı, nötral pH' da işlevsel olan multijenik formda bulunan bir ailedir. İlk olarak proenzim (inaktif zimojenler) ya da pro-MMP halinde olan latent formda salgılanırlar ve proteolitik etkileşime ihtiyaçları vardır (18).

MMP'ler birbiriyle uyumlu fakat farklı mekanizma sahiptir (22). MMP'lerin aktivasyonu endojen inhibitör tarzında olan doku inhibitörleri (TIMPs) tarafından düzenlenmektedir. Birçok MMP embriyogenez oluşumunda merkezi rol oynamaktadır. Normal fizyolojik durumlarda örneğin proliferasyon, hücre motilitesi, şekil değişikliği, yara iyileşmesi, anjiyogenez, ovulasyon, embriyo aşılması, rahim, göğüs ve prostat küçülmesi, menstrasyon ve endometriyal proliferasyon gibi üreme olaylarında MMP'ler anahtar rol oynamaktadırlar(23-25). MMP ve TIMP ekspresyonu arasındaki dengesizlik, tümör invazyonu, romatoid artrit, ateroskleroz, anevrizma, nefrit, doku ülserleri, fibrozis ve endometriozis gibi çeşitli medikal durumları kapsamaktadır (21-26).

2.5.1. Matriks Metalloproteinazların Yapısı ve Sınıflandırılması

MMP'ler, genellikle prodomen, katalitik domen, menteşe bölgesi ve hemopeksin domen içeren karakteristik multidomenli bir yapıya sahiptir (21).

MMP'lerin üç boyutlu yapıları X-ray kristallografi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) ile belirlenmiştir. MMP-2, MMP-3 ve MMP-9' un prodomeni iç α -heliks ve bağlayıcı loplardan meydana gelmektedir. İlk lop proteaz duyarlı "aldatma bölgesi" ve katalitik domenin substrat bağlayıcı yarığı içine uzandıktan sonra peptid bölgesi 'dir. Korunan sistein, aktif çinko bölgenin dördüncü ligandı form değiştirerek zimojeni inaktif tutar (21). Polipeptid zincirler, 5-lifli β -katlı tabakadan, üç adet α -heliks ve bağlayıcı loplardan meydana gelmektedir. Bu proteinaz domen, bir adet katalitik çinko ve üç adet histidin tarafından koordine edilen bir yapısal çinko ile genel olarak üç kalsiyum iyonunu içermektedir. Glutamik asit, kataliz için gerekli birinci histidine bitişiktir. Lop bölgesi, katalitik çinkonun etrafında "Met-turn" olarak adlandırılan temel bir yapı içermektedir. Katalitik çinkonun dördüncü ligandı ise su molekülüdür (21,28).

Sinyal peptid, hücreden salgılanma üzerine etkilidir. Propeptid latent formdaki pro-MMP'nin sağlanması için gereklidir. Katalitik domain iyi biçimde korunan Zn bağlayıcı bölgeleri içermektedir. Prolince zengin menteşe bölgeleri katalitik domene C-terminal hemopeksine benzer domene eklenir. Bu kısım MMP'nin substrata özgüllüğünü belirlemede ve endojenöz inhibitörler ile etkileşimine aracılık etmektedir (27).

Bugüne kadar 26 farklı MMP ile bunları kodlayan 24 adet gen tanımlanmıştır (21,28).

Substrat özgüllüğü, dizi benzerliği ve domen organizasyonuna dayanarak omurgalı MMP'leri 6 gruba ayrılabilir: kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler, membran tip-MMP'ler ve diğer MMP'ler (21,22) (Tablo1).

Tablo 1: Matriks metalloproteinaz ailesi ve sitogenetik lokalizasyonları (22,24,29).

GRUP	MMP türü	Diğer isimler	Sitogenetik lokalizasyon
Kollajenazlar	MMP-1	Kollajenaz 1;intersitsyel kollajenaz	11q22.3
	MMP-8	Kollajenaz 2;nötrofil kollajenaz	11q22.3
	MMP-13	Kollajenaz 3	11q22.3
	MMP-18	Kollajenaz 4	
Stromelisinler	MMP-3	Stromelisin 1	11q22.3
	MMP-10	Stromelisin 2	11q22.3
	MMP-11	Stromelisin 3	22q11
Jelatinazlar	MMP-2	Jelatinaz A	16q21
	MMP-9	Jelatinaz B	20q11-q13
Matrilisinler	MMP-7	Matrilisin-1, PUMP1	11q22.3
	MMP-26	Endometaz, matrilisin-2	
Membran tipi MMP'ler	MMP-14	MT1-MMP	14q11-q12
	MMP-15	MT2-MMP	16q12-21
	MMP-16	MT3-MMP	8q21
	MMP-17	MT4-MMP	12q24.33
	MMP-24	MT5-MMP	20q11.2
	MMP-25	MT6-MMP	16p13.3
Diğerleri	MMP-12	Makrofaj metalloelastaz	11q22.3
	MMP-19	RASI	12q14
	MMP-20	Enamelisin	11q22
	MMP-21	MMP-23A	
	MMP-22	MMP-23B	1p36
	MMP-26	Endometaz, matrilisin-2	
	MMP-27		
	MMP-28	Epilizin	

2.5.2. Matriks Metalloproteinazların Biyokimyası

MMP'ler çinko veya kalsiyum bağımlı çalışan endopeptidazlardır ve birbirleriyle ileri derecede dizi homolojisi gösterirler (30).

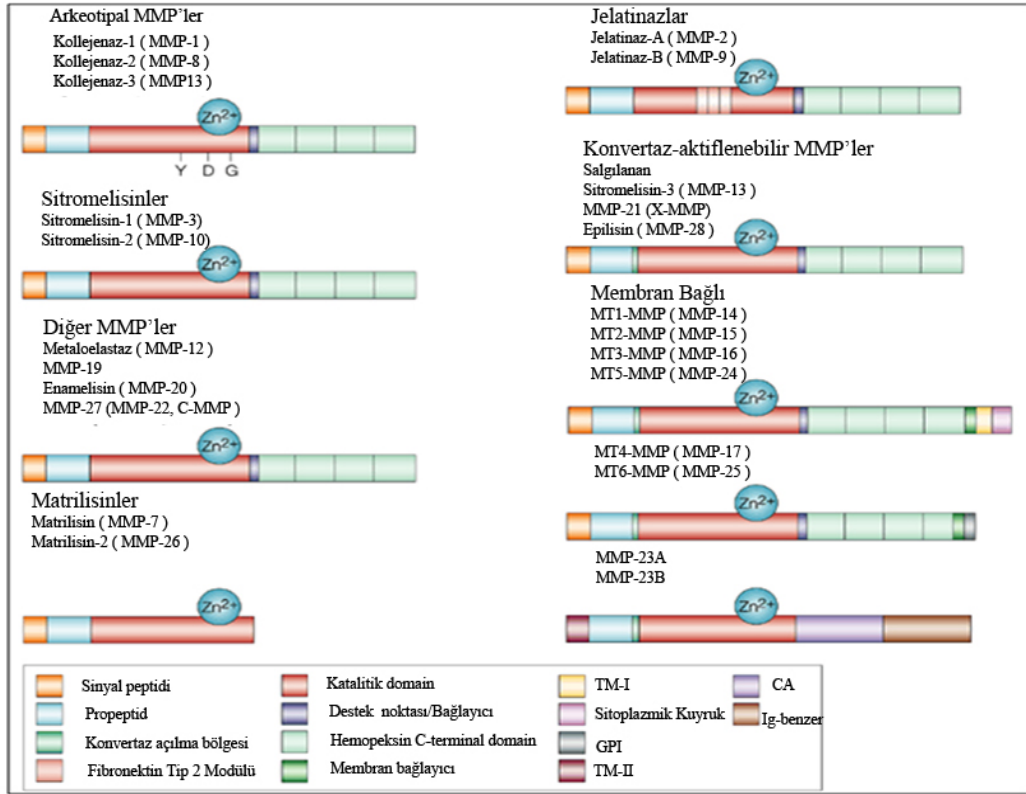
MMP'ler hücre membranına gömülü durumda bulunurlar ya da hücre dışına salınırlar. Hücre yüzeyinde buldukları durumlarda genellikle heparin sülfat glikozaminoglikanlarına bağlı olarak bulunurlar (16). Çoğu ekstrasellüler dokuda aktive edilmek üzere latent prekürsörler (zimojenler) olarak salgılanırlar (MMP-11 ve MT1-MMP bu durumun istisnasıdır) (30). Tüm MMP'lerin N-terminallerinde bir pre-domainleri, aktivasyon esnasında uzaklaştırılan bir adet 'pro' domainleri ve bir tane katalitik domainleri vardır (30). Matrilisin hariç tüm MMP'ler hemopeksin/vitronektin benzeri domain ve bunu katalitik bölgeye bağlayan bir bağlantı (menteşe) domaini içerirler (30,31).

MMP ailesinde yer alan enzimlerin 3 temel moleküler özelliği bulunur (32):

1. Kollajenaz-1 (MMP-1) ile dizi homolojisi taşırlar.
2. Prodomaindeki sistein dönüşüm motifi PRCGXPD, MMP'leri proMMP zimojen formunda tutar. Korunan sistein aktif çinko bölgesini şelatlar. Bunun istisnası MMP-23'tür.
3. Çinko bağlayıcı motif katalitik domainde bulunan HEXGHXXGXXH korunmuş dizisinde bulunan 3 histidin molekülünü bağlar.

MMP'ler sıkı kontrol edilen çinko-bağımlı bir endopeptidaz ailesidir. MMP'lerin çoğu inaktif proenzimler olarak salınmakta ve 17-29 aminoasitlik sinyal peptidi ile 77-87 aminoasitten oluşan propeptid domaininden meydana gelirler. Proenzimlerin sürekliliğini sağlayan katalitik çinko bağlayıcı sistein bölgesi içeren özel bir dizileri vardır (16,33). Yaklaşık 170 aminoasitten oluşan katalitik bölge ise metiyonin ve çinko-bağlayıcı bölge içeren özel bir yapıya sahiptir. Bu bölge ayrıca MMP'lerin stabilitesi ve enzimatik aktivitesi için gerekli olan ve üç boyutlu yapıyı koruyan ek kalsiyum ve çinko iyonları içermektedir. MMP-2 ve MMP-9 ek fibronektin-benzeri domain tekrarları içerdikleri için kollajen ve jelatinle etkileşirler. Hemopeksine benzeyen karboksil ucu ise 210 kadar aminoasitten oluşur. Elipsoidal disk şekilli

yapıdadır ve substrat spesifitesiyle ilgili bölgedir (16,33). ProMMP-2'nin hemopeksin domaini, MT1-MMP, MMP-7 ve MMP-26 ile hücre yüzeyinde aktivasyon için gereklidir. MMP-7 ve MMP-26'da bu domain yoktur. Katalitik ve hemopeksin domainler prolinden zengin bir bağlayıcı (hinge) bölge aracılığıyla birbirlerine bağlanırlar (33). (Şekil 2 ve Şekil 3).



Şekil 3: Matriks metalloproteinazların yapıları (34).

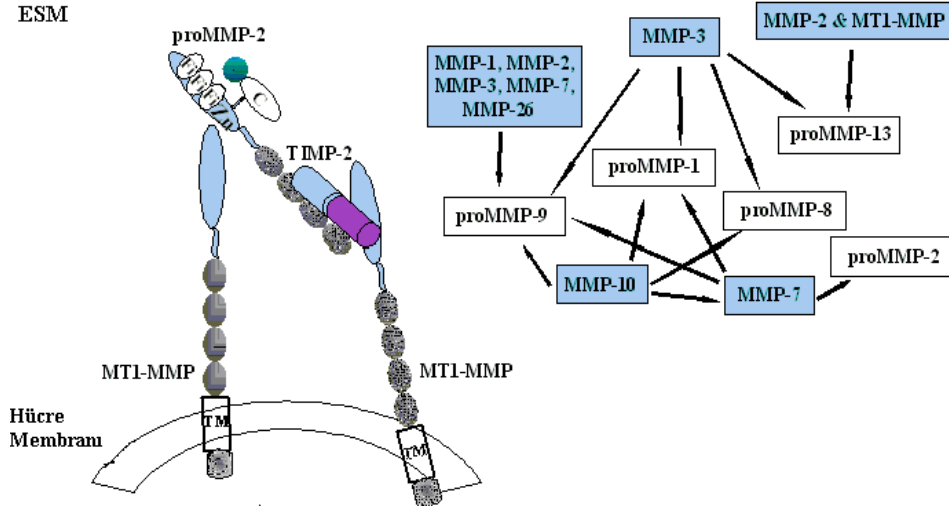
TIMP-3 ve TIMP-4) olan ve özgül bağlanan stekiyometrilere tarafından kontrol edilir (22).

In vitro, MMP'ler, plasmin, MMP-3 ve MT-MMP'leri içeren bazı proteazlar tarafından ya da organomerküriyal bileşenlerin iyileştirilmesi ile aktive edilebilirler. Bu enzimlerden birçoğu yetişkin dokularının düşük seviyelerinde eksprese edilir. Çoğu normal ve patolojik şekil değişikliği süreçleri sırasında up regüledir (24). Birçok MMP esas olarak in vivo hücreler tarafından eksprese edilmez fakat ekspresyonları, sitokinler, büyüme faktörleri, diğer hücre- matriks ya da hücre- hücre bağlantıları gibi ekzojen sinyaller aracılığı ile indüklenmektedir.

MMP'lerin ekspresyonu transkripsiyon seviyesinde düzenlenmektedir. Buna rağmen MMP mRNA'sı yarı ömrünün modülasyonunun büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığı ile olduğu belgelenmiştir. MMP'lerin proteolitik aktivitesi, TIMP'ler gibi spesifik inhibitörler, spesifik olmayan proteinaz inhibitörler olan α 1-proteinaz inhibitör ve α 2-makroglobulin, zimojen aktivasyonu ile inhibisyonu aracılığı ile düzenlenmektedir (24).

2.5.5. Latent MMP'lerin (Pro-MMP) Aktivasyonu

MMP'lerin çoğu ekstrasellüler alanda proteolitik olarak aktive edilen latent zimojenler şeklinde salınırlar. Latent MMP'ler katalitik çinko ile propeptid içinde korunmuş sisteinin kovalent bağlı formunda bulunan 'Sistein Anahtarı' ile korunan bir proformda yer alır. Çeşitli bileşikler örneğin, çeşitli denatüran ajanlar, in vitro olarak sisteinle reaksiyona girebilir ve onu bağ yapamaz forma dönüştürebilir, katalitik bölgeyi açığa çıkarabilir ve propeptidlerin otokatalitik olarak bölünmesine sebep olurlar(38) .



Şekil 5 : Latent MMP'lerin Aktivasyonu

2.5.6. MMP'lerin Fizyolojik Fonksiyonları

ESM proteinlerinin ve çok sayıda çözünür faktörlerin regülasyonu ile MMPlar, üreme sistemi başta olmak üzere, embriyogenez ve birçok fizyolojik faaliyette bulunmaktadır. Matrilisin, stromelisinler, jelatinaz A, kollajenaz-2 ve kollajenaz-3 doğum sonrası rahim involüsyonu sırasında teşvik edilir.

Deneyisel çalışmalar gösteriyor ki matrilisin, stromelisinler ve jelatinaz A kollajenaz-2 ve kollajenaz-3 ile birlikte de doğum sonrası rahim involüsyonunda rol almaktadırlar. Belirli MMPleri eksik olan mutant farelerle yapılan deneyler, MMPlar arasında veya bu enzimler ve plazminojen sistem bileşenleri arasında işlevsel bir fazlalık olabileceğini öngörmüşlerdir (24,39).

MMP-9 implantasyon ve endokondrial kemik oluşumundan sorumludur. MT1-MMP iskelet ve bağ doku gelişiminde ve angiogenezde rol oynamaktadırlar.

MMP'lerin doku modellemesine etkileri: MMP-2 ve MMP-3 memelilerde salgı bezi morfogenezini düzenlerken, MMP-2 ve MMP-9 adipogenezde rol alır, MMP-1 ise keratinosit göçü için gereklidir.

2.5.7. MMP-Aracılı Bölünmeyle Üretilen Biyolojik Aktiviteler

MMP'lerin önemli bir işlevinin doku rezorpsiyonunda ESM'nin kaldırılması olduğu düşünülmektedir. Ancak ESM sadece basit bir ekstrasellüler iskelet değil; aynı zamanda büyüme faktörleri gibi, biyolojik aktif moleküllere bir rezervuar gibi görev yapmaktadır. Bazı ESM bileşenlerini, proteolizde kritik biyolojik fonksiyonları gibi

ifade edebiliriz. Dolayısıyla, MMP tarafından ESM bileşenlerinin bozulması hücrel davranış ve fenotipleri değiştirebilir (Tablo 2).

Tablo 2: MMP'lerin biyolojik aktiviteleri ve spesifik substratları (21).

Biyolojik etki	Sorumlu MMPlar	Bağlandığı substrat
Adiposit farklılaşması	MMP-3,MMP-7	Fibronektin
Hücre Göçü	MMP-1,MMP-2,MMP-3,MMP-26	Fibronektin
Hücre Göçü	MT1-MMP	CD44
Memeli epitelyum hücre apoptosisi	MMP-3	En alt tabaka membran
Epitel-mezenşimal dönüşümü (Memeli epitel hücreleri)	MMP-3	E-kaderin
Alveolar dallanma morfogenezisi	MMP-3	Tanımlanmadı
İnnat intestinal immünite	MMP-7	Paneth hücrelerde Alfa defensin (kriptidin)
İltihaplı fenotiple mezenşimal hücre farklılaşması	MMP-2	Tanımlanmadı
Platelet agregasyonu	MMP-1	Tanımlanmadı
Anjiostatın benzer parçacıkların üretimi	MMP-2,MMP-3,MMP-7,MMP-9,MMP-12	Plasminojen
Endostatın benzer parçacıkların üretimi	MMP-3, MMP-7,MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-20	Tip XVIII kollajen
Neostatin-7 parçacığının üretimi	MMP-7	Tip IV kollajen
Artırılmış kollajen afinitesi	MMP-2,MMP-3,MMP-7, MMP-9, MMP-13	BM-40 (SPARC/osteonektin)
Böbrek tubulogenezisi	MT1-MMP,MMP-2, MMP-3,MMP-9	Tip I kollajen
bFGF salınımı	MMP-3,MMP-13	Perlecan
IGF1 in artırılmış biyoyararlılığı ve hücre proliferasyonu	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-19, MMP-11, MMP-26	IGFBP-3 IGFBP-5 IGFBP-1
VEGF aktivasyonu	MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13	CTGF (bağ doku büyüme faktörü)
Epitel hücre göçü	MMP-2, MT1-MMP	Laminin 5y2 zinciri
Embriyonik implantasyon	MMP-9	Tanımlanmadı
Apoptosis (amnion epitel hücreleri)	MMP-1, MMP-3, MMP-9	Tip I kollajen
Endometrial menstruasyon	MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9	Kollajen
Proinflamatuvar	MMP-1, MMP-3, MMP-9	Prekürsörden IL-1beta işlenmesi
Proinflamatuvar	MMP-8	Tip I ve II kollajen
Tümör hücre direnci	MMP-9	ICAM-1
Tümör büyüme azalması	MMP-2, MMP-11	Endotelial hücreler
Antiinflamatuvar	MMP-1, MMP-2, MMP-9	IL-1beta bozunumu
Antiinflamatuvar	MMP-1, MMP2, MMP-3, MMP-13, MMP-14	Monosit kemoatraktan protein-3
TGF-beta'nın artırılmış biyoyararlılığı	MMP-2, MMP-3, MMP-7	Decorin
Bozunmuş hücre agregasyonu ve artırılmış hücre invazyonu	MMP-3, MMP-7	E-kaderin
İndirgenmiş hücre adhezyonu ve yayılımı	MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP	Hücre yüzey doku transglutaminaz
Fas reseptör aracılı apoptosis	MMP-7	Fas ligand
İndirgenmiş IL-2 yanıtı	MMP-9	IL-2Ralfa

2.5.8. Matriks Metalloproteinazların Gen Ekspresyonlarının Düzenlenmesi

MMP'lerin gen ekspresyonları büyük oranda transkripsiyon aşamasında cis-elementleri ve trans-aktivatörleri aracılığıyla düzenlenmektedir. MMP promotorları birçok cis-elementini kapsarlar ve bunlar aracılığıyla MMP gen ekspresyonunu AP-1, PES3, Sp-I, beta-katenin/Tcf-4 ve NF- κ B gibi trans-aktivatörler ile düzenlerler (34). MMP promotorlarının çoğu çarpıcı bir şekilde birbirlerine benzerler, hatta çoğunun cis-elementleri ortaktır, fakat ilginç bir şekilde fonksiyonel olarak ilişkili çalışan MMP-2/MMP-9 (jelatinaz) veya MMP-1/MMP-8 (kollajenaz) gibi MMP'lerin promotor içerikleri birbirinden farklıdır (40).

Cis-elementlerinin içeriğine göre MMP promotorları 3 farklı kategoriye ayrılabilir (40,41):

- İlk grup MMP promotorlarının çoğunu kapsar. -30 bp uzunluğunda TATA kutusu (transkripsiyon bölgesine göre değişir) ve -70 bp uzunluğunda AP-I bağlanma bölgesi içerir. Bu promotor bölgelerin çoğu ayrıca üst kısmında PEA3-bağlanma bölgesine sahiptirler ve bu şekilde MMP transkripsiyonunu kontrol ederler.
- İkinci gruptaki MMP promotorları ise (MMP-8, MMP-11 ve MMP-21) TATA kutusu içerir, fakat proksimal AP-I bölgesi içermez. Bu promotorların düzenlenmesi diğer promotor gruplarından biraz daha basit ve farklıdır.
- Üçüncü grup promotorlar (MMP-2, MMP-14 ve MMP-28) TATA kutusu içermezler. Bu promotorlardan gerçekleşen transkripsiyon birçok noktadan başlar. Ayrıca bu gruptaki MMP'lerin ekspresyonu proksimal bir GC kutusu bölgesine bağlanan Sp-I ailesi tarafından belirlenir. MMP ekspresyonu bu ana sınıfta yapısaldir ve büyüme faktörleri ile sitokinlerden etkilenmez.

MMP promotorlarında bulunan AP-I bağlanma bölgesi, bu genlerin trans aktivatörlerin miktarına ve/veya aktivitesine hassas olmasını sağlar. İnterlökinleri, interferonları, EGF, KGF, NGF, HGF, bFGF, VEGF, PDGF, TNF-alfa ve TGF-beta gibi farklı ve çeşitli sitokinlerle, büyüme faktörleri, MMP'lerin transaktivasyonlarına etki ederek, AP-I ve PEA3 aracılığıyla etkileşimlerini sağlar (40).

AP-I ve PEA3 bağlanma bölgeleri dışında, MMP-7, MMP-14, MMP-12 ve MMP-26 promotorlarındaki Tcf-4 bölgesi ve MMP-9 promotorundaki NF- κ B bağlanma bölgesi de gen düzenlenmeleri için önemli yerlerdir. Tcf-4 bölgesi MMP ekspresyonunu Wnt sinyal ileti yoluyla etkileşim içinde gerçekleştirir (40).

Dokuya ya da hücreye özel MMP ekspresyonunun mekanizması henüz tam olarak anlaşılammakla beraber MMP genlerinin çoğunun fizyolojik ya da patolojik şekillenme mekanizmalarının aktif olduğu bölgelerde eksprese edildiği bilinmektedir (40,41). Bunların istisnası olan MMP-2, eksprese edilmeyen dokularda da etkin miktarda sentezlenmektedir. Dolayısıyla genetik düzenlenme dışındaki faktörler burada daha fazla önem taşımaktadır (41).

MMP ekspresyonu, sitokinler, büyüme faktörleri, tümör promotorları gibi etkenlerin yanında kimyasal ajanlar, fiziksel stres, aktive onkogenler ve ekstrasellüler matriks etkileşimleriyle de düzenlenmektedir (38). İnflamasyon ve karsinogenez gibi fizyolojik ve patolojik olaylarda rol alan güçlü bir biyolojik mediatör olan nitrik oksit (NO), bazı MMP ailesi üyelerinin ekspresyonunu arttırdığı düşünülmektedir (42). Epigenetik faktörlerin MMP gen regülasyonundaki rolleri henüz tam olarak aydınlatılmamakla beraber, bu genlerin ekspresyonlarının histon-düzenleyici enzimlerle ve kromatinleri yeniden şekillendiren kompleksler yardımıyla da kontrol edilebildiği bilinmektedir. Fakat her ne kadar MMP gen ekspresyonunun temel olarak transkripsiyonel düzeyde düzenlendiği düşünülse de son zamanlarda posttranskripsiyonel mekanizmaların da olaya katkıda bulunduğu da bahsedilmektedir (40).

Farklı durum ve patolojilerde MMP'lerin ve bunları düzenleyen sistemlerin etkilerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır (43-46). Kanserde, romatoid artrit, osteoartrit, sistemik lupus eritematozide, multiple sklerozda, polikistik böbrek hastalıklarında, periodontitte, abdominal aortik anevrizmada, akut miyokard infarktüsünde, lomber diskte çeşitli MMP düzeylerindeki değişimlerle ilgili çalışmalar yapılmıştır (33,41,47-51).

Tablo 3 : MMP Genlerinin Transkripsiyonel Regülasyonu (60).

	Hipoksi	Reoksijenasyon	OxLDL	IL-1	IL-1 β	TNF- α	TGF- β_1	CD40-L	Trombin
MMP-1			+	+		+		+	
MMP-2	+/-	+			+		+		+
MMP-3					+	+		+	+
MMP-8					+	+		+	
MMP-9			+			+	+	+	
MMP-12					+	+	-		
MMP-13					+				
MMP-14		+	+	+		+			

2.5.9. Gen Polimorfizmleri

Gen polimorfizmleri, genomik DNA'nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz-çifti değişiklikleridir (51). Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın görülür, etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler. Hücre metabolizması için önemli olan yollaklarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer alırlar. Bazı durumlarda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu polimorfizmlerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır (51).

DNA polimorfizmlerinin yaklaşık %90'ı tek nokta değişimleri (SNP) şeklinde gerçekleşmektedir (41). Bu SNP'lerden bazıları bir restriksiyon endonükleazının kesim bölgesinde meydana gelerek kesimin olmamasına ya da daha önce olmayan bir kesim bölgesinin oluşmasına neden olur. Bu tür polimorfizmlere restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmleri (RFLP) adı verilir (41).

2.6. Matriks Metalloproteinaz – 3 (MMP-3,Stromelisin-1) Geni

Stromelisin'ler ailesinde yer alan MMP-3 (stromelisin-1), MMP-10 (stromelisin-2) ve MMP-11(stromelisin-3), tip IV ve IX kollajenler, laminin, fibronektin, elastin ve proteoglikanları degrade eden enzimleri temsil etmektedir (21,55).

MMP-3'ün latent formu 57 kDa, aktif formu 46 kDa ağırlığındadır. MMP-3 geni 11q22,2-22,3'te lokalize olmuştur. Substratları; proteoglikanlar, laminin, fibronektin, tip III,IV,IX kollajen ve jelatinlerdir. MMP-3 üretimi fibroblast ve kondrasitlerde büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör promotörleri tarafından uyarılır (52).

MMP-3'ün, α 1-proteinaz inhibitörünü, tümör nekrozis faktör (TNF)- α prekürsörünü, miyelin temel protein interlökin (IL)-1 β 'yı bölerek degrade ve inaktive ettiği bildirilmiştir. MMP-10'dan daha yüksek proteolitik etki ortaya koymaktadır. MMP-3 birkaç pro-MMP'yi aktive etmektedir (21).

MMP-3 geninde promotör bölgenin -1171 bç. pozisyonunda tek adenin insersiyonu (6A) ya da delesyonu (5A) polimorfizmi (rs3025058) MMP-3 ekspresyonunu represör bağlanma bölgesinin affinitesini değiştirerek etkilemektedir. 6A allel sekansı represör bağlanma bölgesini güçlü biçimde tanımaktadır. MMP-3'ün transkripsiyonel aşamasında 5A allelinin varlığı yol göstericidir (41,53).

2.7. Makrofaj Metalloelastaz (MMP-12,Matrilisin)

MMP-12'nin latent formu 54 kDa , aktif formu 45 kDa ağırlığındadır. MMP-12 geni 11q22,2-22,3'te lokalize olmuştur (54).

MMP-9 ve MMP-12 insan plazminojenini anjiyotensin fragment üretimi için bölme yeteneğine sahiptir. Anjiyotensin fragmenti, anjiyogenezin inhibitörüdür. MMP-12 (Makrofaj Metalloelastaz), elastin, tip IV kollajen, tip I jelatin, fibronektin, laminin, vitronektin, proteoglikanlar, miyelin temel protein ve α 1-antitripsini degrade etmektedir (56).

Genetik seviyede MMP-12 -82 A/G polimorfizmi (rs2276109) A alleli bakımından transkripsiyon faktor active edici protein – 1 için yüksek affiniteye ve haberci gen çalışmalarında yüksek gen ekspresyonuna sahiptir. Fonksiyonel tek nükleotid polimorfizmi MMP-12 geninde protein ekspresyonu, tumor gelişimi ve ilerleyişi ile ilişkili olarak bozulma ile sonuçlanmaktadır (57).

Birçok araştırma MMP-12'nin anormal ekspresyonu ile malign tümörlerin metastazı ve infiltrasyonu arasında sıkı bir ilişki olduğunu göstermiştir (57).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda MMP-3 ve MMP-12 gen polimorfizmlerinin ve serum düzeylerinin tip 2 diyabet patogenezindeki rolünü incelemeyi amaçlamaktayız.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrin ve Metabolizma AD tarafından takip edilen tip2 diyabet hastalığı tanısı konulmuş 70 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

İkinci grupta kontrol olarak kullanılmak üzere kendisinde ve 1. derece akrabalarında diyabet hastalığı olmayan 100 sağlıklı birey normal popülasyondan rastgele seçilerek örnek olarak kullanılmıştır.

Seçilen vakalardan 10ml.lik kan örnekleri EDTA'lı ve kuru tüplere toplanmıştır. EDTA'lı tüplerdeki periferik kan lökositlerinden elde edilen DNA örneklerinde MMP-3 ve MMP-12 polimorfizmlerini saptamak için Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PZR), Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanılmıştır.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Agaroz (Promega MBG), Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorür (Sigma A-5666), Asetik asit (Merck K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768), dNTP seti (MBI Fermentas), EDTA (dihidrat)(Merck K-90602121), Etanol (%99), Brom fenol mavisi (Sigma B-6896), Etidyum bromür (Sigma E-8751), Mineral yağ (Sigma M-5904), Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Sodyum dodesil (lauril) sulfat (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Potasyumdihidrojenfosfat (Merck A-741071), Sodyum klorür (Carlo Erba 368257), Tris baz (Sigma T-1503), Taq DNA polimeraz (Invitrogen), DNA marker (50-100 bp DNA size marker; MBI Fermentas), Proteinaz K (Sigma), Potasyum hidroksit (Sigma P 1767), restriksiyon enzimleri (Tth111I,PvuII), primer dizileri (MBI Fermentas).

Kullanılan Primerler: MMP-3 geninde -1171 5A/6A polimorfizminin gözlemlendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir:

İleri primer: 5' - GGTTCTCCATTCCCTTTGATGGGGGGAAAGA -3'

Geri primer: 5' - CTTCTGGAATTTACATCACTGCCACCAC -3'

MMP-12 geninde -82 A/G polimorfizminin gözleendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir:

İleri primer: 5'- GAGATAGTCAAGGGAATGATATCA -3'
Geri primer: 5'- AAGAGCTCCAGAAGCAGTGG -3'

3.3. KULLANILAN GEREÇLER

Thermal Cycler cihazı (Gold Plate), Otoklav, Etüv, Hot plate, Dijital Görüntüleme sistemi, Elektroforez için güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation), Hassas terazi (Mettler), Polaroid kamera (Kodak), Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj, pH metre (Hanna), Pipet takımı (Eppendorf), Falkon santrifüj (Hettich), Spektrofotometre (Biochrom-S2100 diode array spectrophotometer), Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Elektroforez Sistemi (E-C 350 MIDICELL).

3.4. ÇÖZELTİLER

3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)

8,74 gram amonyum klorür, 1 gram potasyum bikarbonat, 200µl 0,5 molarlık etilen diamin tetra asetat (EDTA)'nın tartımları yapılarak erlen içine alınır. 900ml ddH₂O eklenir ve çözeltinin pH'sı bir normal sodyum hidroksit çözeltisi ile 7.4'e ayarlanır. Daha sonra balon joje içine alınarak bir litreye tamamlanır. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişeye alınarak 120°C'ye alınarak 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de saklanır.

3.4.1.2. 0,5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH:8.0)

186,1 gram etilen diamin tetra asetat tartılarak beher içine alınır ve 800ml ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürülür ve pH'sı sodyum hidroksit çözeltisi ile 8,0'e ayarlanarak ddH₂O ile 1lt'ye tamamlanır. Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

3.4.1.3. 4 Molar Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi

233,6 gram sodyum klorür tartılarak erlene alınır. Üzerine 800ml ddH₂O ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürülür. Balon jojeye

aktarılarak 1lt'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL)

25ml 4M sodyum klorür ve 50ml 0.5M etilen diamin tetra asetat (EDTA) direkt balon jojeye aktarılarak 1lt'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklanır.

3.4.1.5. 1 Molar Tris Tamponu (Stok)

121,1gram Tris baz tartılarak bir behere alınır. Üzerine 42ul hidroklorik asit ile yaklaşık 800ml ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürülür. Daha sonra balon jojeye aktarılır ve 1lt'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

3.4.1.6. 9,5 Molar Amonyum Asetat Çözeltisi

73,22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alınır. Üzerine 80ml ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Balon jojeye aktarılır ve ddH₂O ile 100ml'ye tamamlanır. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir ve +4°C'de saklanır.

3.4.1.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi

10 gr sodyum dodesil sülfat tartılır. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek beher içine alınır ve üzerine 80ml ddH₂O eklenir. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürülür ve pH'sı 7,2'ye ayarlanır. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir ve oda ısısında saklanır.

3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml)

20 mg proteinaz K tartılarak steril bir gode içinde steril ddH₂O ile 1ml'ye tamamlanır ve -20°C'de saklanır.

3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler

3.4.2.1. Etidyum Bromür (10 mg/ml)

10 gram etidyum bromür tartılarak steril ddH₂O ile 10ml'ye tamamlanır.

3.4.2.2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x)

20 gram Ficoll 400, 1gram SDS, 1,2ml 0,5 molarlık etilen diamin tetra asetat, 1ml 1molarlık Tris (pH 8.0), 200 mg Bromo fenol mavisi, 200 mg Ksilen siyanol tartılarak steril ddH₂O ile 100ml'ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

3.4.2.3. 50x Tris - Asetik asit - Etilen Diamin Tetra Asetat (TAE) Tamponu

242 gram tris baz tartılarak bir behere alınır. Üzerine 57,1ml Glasiyal asetik asit ve 100ml 0,5 molarlık etilen diamin tetra asetat ve 800ml ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve oda ısısında saklanır.

3.4.2.4. 5X Tris-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TBE) Tamponu

54 gram tris baz ve 27,5 gram borik asit tartılarak bir behere alınır. Üzerine 20ml 0.5 molarlık etilen diamin tetra asetat ve 800ml ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve oda ısısında saklanır.

3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.5.1. PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU

EDTA'lı tüplerle alınan 10ml.lik kan örnekleri çalışma için falkon tüplerine aktarılır. Üzerilerine 1:3 oranında lysis eklenerek +4°C'de 15dk. bekletilir. Daha sonra 1500rpm'de 10dk. santrifüj edilir ve süpernatant kısımları atılarak pelletler tamamen süspansiyon durumuna getirilir ve üzerlerine tekrar 15-20ml. lysis eklenir. Örnekler +4°C'de 15dk. bekledikten sonra 10dk.1500rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant kısımları atılır ve süspansiyon olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS, 75µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9,4 ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C'de su banyosunda bir gece inkübe edilir. İnkübasyondan sonra her 1ml örnek başına 0,37ml olacak şekilde 9,5M'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra karıştırılır ve 3000rpm'de 25dk santrifüj edilerek proteinler çöktürülür. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir falkona aktarılır ve üzerine 1:2 oranında %99'luk absolü alkol eklenir ve DNA'nın presipitasyonu sağlanır. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklenir ve DNA mikropipet ucuyla alınır. DNA %70'lik alkolde yıkanır ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisinde çözündürülerek +4°C'de saklanır.

3.5.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Elde edilen DNA örneklerinde konsantrasyon ve miktar tayini yapmadan önce her örnekten 20µl alınarak üzeri 380µl 0,5X TE tamponu ile tamamlandı ve bu şekilde 1/20 dilüsyonu sağlandı. Bu dilüsyon örneklerinin daha sonra spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında OD ölçümleri yapıldı.

Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. O.D.₂₆₀ / O.D.₂₈₀ oranı 1,7-1,8 olan DNA'lar temiz olarak kabul edildi. DNA'nın 50µg/ml çift iplikçikli içeriğinin 260 nm dalga boyunda bir optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

$$\text{DNA Konsantrasyonu (ng/}\mu\text{l)} : \text{Sulandırma katsayısı (100) x } A_{260} \times 50$$

DNA örneklerinin saflığı OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD₂₆₀/ OD₂₈₀ değeri yaklaşık 1,8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8'den küçük olacaktır. OD₂₆₀/OD₂₈₀ değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

3.6. PZR Yöntemi İle MMP-3 ve MMP-12 Gen Bölgelerinin Çoğaltılması ve RFLP Yöntemiyle Polimorfizm Analizi

Genomik DNA örneklerinde MMP-3 ve MMP-12 gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. DNA örneklerinin her birinin amplifikasyonu için 10x PZR tamponu (10mM Tris-HCl, 50 mM of KCl, 1,75 mM of MgCl₂), 2,5mM dNTP, 0,1 ünite Taq DNA polimeraz MMP-3 ve MMP-12 gen bölgelerine özgü her bir primerden 100pmol/µl ve 500ng DNA içeren toplam 25µl'lik PZR karışımı hazırlandı.

3.6.1. PZR'da Kullanılan Kimyasal Maddeler

DNA Taq polimeraz enzimi (5U/µl)

PZR reaksiyonundaki konsantrasyonu 2,5 unite olacak şekilde 50 µl'lik PZR karışımına 0,3 µl eklendi.

10 X DNA Taq PZR Tamponu (NH₄)₂SO₄'lü

Tris-HCl'den 100mM (pH 8,8, 25°C'de), 500mM KCl ve %0,8 Nonidet P40 içeren 10X Taq PZR tamponundan 25 µl'lik PZR karışımına 2,5 µl eklendi.

MgCl₂ (25mM/ml)

MgCl₂'den 25 µl'lik PZR karışımına 1,5 µl eklendi.

dNTP'ler (100 µmol/ml)

dNTP'den (2,5Mm) 25 µl'lik PZR karışımına 3 µl eklendi.

3.6.2. MMP-3 -1171 5A/6A ve MMP-12 -82A/G Gen Bölgelerinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

MMP-3 -1171 5A/6A gen bölgesi optimize edilmiş PZR protokolü (Tablo 4) ve PZR şartları (Tablo 5) ile amplifiye edilmiştir.

MMP-12 -82 A/G gen bölgesi optimize edilmiş PZR protokolü (Tablo 6) ve PZR şartları (Tablo 7) ile amplifiye edilmiştir.

Tablo 4 : MMP-3 -1171 5A/6A gen bölgesi için kullanılan PZR Protokolü

KİMYASALLAR	MİKTARLAR
SU	15,7 µl
dNTP	3 µl
10x Buffer	2,5 µl
Mg	1,5 µl (2.5Mm)
Primer F+R	1 µl (1+2)
Taq	0,3 µl
DNA	0,8 µl

Tablo 5 : MMP-3 -1171 5A/6A gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon sıcaklıkları

95 °C	4 dk
95° C	30 sn
58° C	30 sn
72° C	30 sn
	} 35 döngü
72°C	4 dk

Tablo 6 : MMP-12 -82 A/G gen bölgesi için kullanılan PZR Protokolü

KİMYASALLAR	MİKTARLAR
SU	15,7 µl
dNTP	3 µl
10x Buffer	2,5 µl
Mg	1,5 µl (2.5Mm)
Primer F+R	1 µl (1+2)
Taq	0,3 µl
DNA	0,8 µl

Tablo 7 : MMP-12 -82 A/G gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon sıcaklıkları

95 °C	3 dk	
95 °C	1 dk	} 35 döngü
58 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	7 dk	

3.6.2.1. %3'lik Agaroz Jel Hazırlanması

Elektforezde stok 5X TBE tamponundan hazırlanan 1 X TBE kullanıldı. 6 gr. agaroz (Promega MBG) tartılarak erlen içine konuldu. Üzerine son hacim 200 ml. olacak şekilde 1X TBE tamponu eklenerek, mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözüldürüldü. Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde (50-55°C) çözülmüş agaroz jel içine 1 µl etidyum bromür (10mg/ml) ilave edildi. Hazırlanan jel yatay jel yatağı içine dökülerek, yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

3.6.2.2. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel'e Yüklenmesi

Yükleme Tamponu (Loading Buffer : 6X)

Yükleme tamponu (loading buffer) olarak %40 sükröz + %0,25 bromfenol mavisi karışımı kullanıldı

%3'lik jel hazırlandıktan sonra 1X TBE tamponu içeren jel tankı içine uygun şekilde konuldu. Agaroz jelin üzerini 2-3 ml gelecek şekilde 1X TBE tamponu jel üzerine eklendi. 7 µl PZR ürününe, 1,5 µl yükleme tamponu (6X) eklenip pipetleme

yapılarak karıştırıldı. 10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi. Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (E-C apparatus Corporation, E-C4000P) 500 miliamper 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

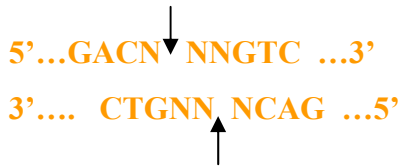
3.6.2.3. PZR Ürünlerinin Kontrolü

MMP-3 -1171 6A/5A ve MMP-12 -82 A/G genlerine ait istenilen bölgelerinin PZR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacı ile her iki bölge için de ayrı ayrı PZR tüpünden alınan 7 µl örnek 1,5 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yukarıda tanımlanan elektroforez sisteminde 120 voltluk elektrik akımında yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) PZR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi. PZR reaksiyonları sonucu MMP-3 -1171 6A/5A geninden 129 bç ve MMP-12 -82 A/G geninden 199 bç'lık bir ürün elde edilmesi beklendi.

3.6.2.4. MMP-3 -1171 5A/6A geninden 129 bç ve MMP-12 -82 A/G Gen Polimorfizminin Belirlenmesi İçin PZR Ürünlerinde Restriksiyon Enzim Analizi

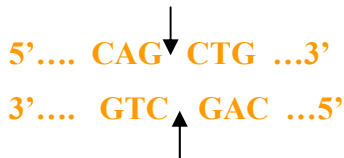
Tth111I Kesim enzimi (10U/µl): Tth111I enzimi 10X Buffer Tango ile birlikte MMP-3 -1171 6A/5A gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı.

Tth111I enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



PvuII Kesim enzimi (10U/µl): PvuII enzim 10X Buffer G ile birlikte MMP-12 -82A/G gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı.

PvuII enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



3.6.2.5. Restriksiyon Enzim Kesimleri

PZR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacimleri 10,5 µl ve 8,45 µl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimleri tablo de belirtilen çözeltilere, Tth111I ve PvuII

enzimlerinin eklenmesi ile gerçekleştirildi. Bu kesim işlemlerinde kullanılan her iki enzim için optimum sıcaklık 37°C'de 2 saat olmuştur. Tth111I enzimi için kesim protokolü tablo 8'de, PvuII enzimi için kesim protokolü Tablo 9'da verildiği gibidir.

Tablo 8 : Tth111I enzimi için kesim protokolü

KİMYASALLAR	MİKTARLAR
PZR Ürünü	5,25 µl
Distile Su	4,5 µl
10 x Buffer	0,5 µl
Enzim: Tth111I	0,25 µl

Tablo 9 : PvuII enzimi için kesim protokolü

KİMYASALLAR	MİKTARLAR
PZR Ürünü	5,25 µl
Distile Su	1,5 µl
10 x Buffer	1,4 µl
Enzim: Pvu II	0,3 µl

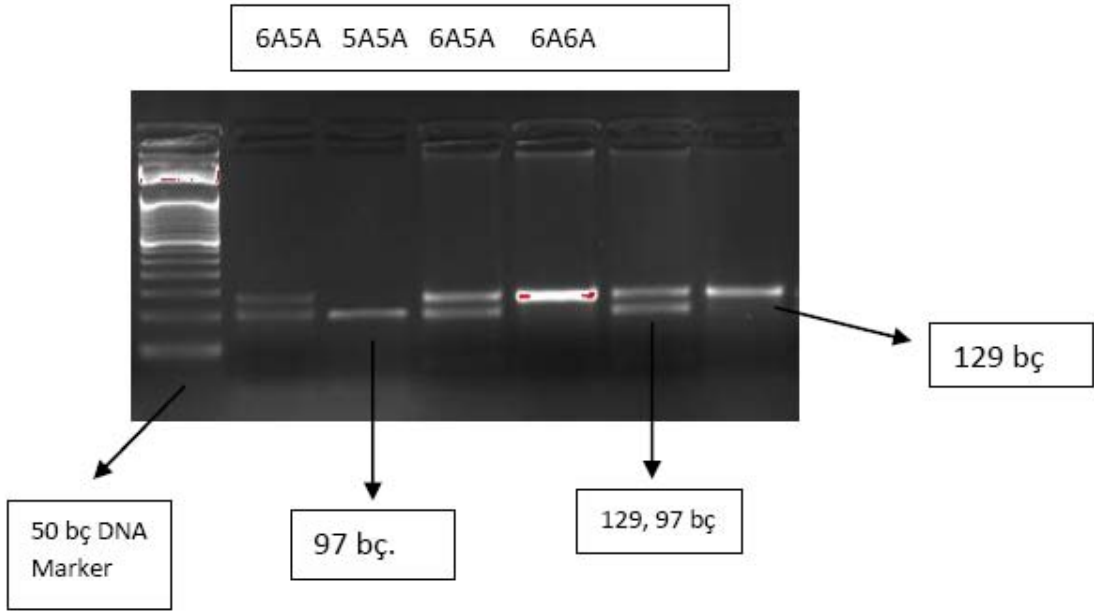
3.6.2.6. Tth111I ve PvuII Enzimleri Kesim Ürünlerinin Kontrolü

%3'lük agaroz jel hazırlandı. Tth111I kesim enzimi ile kesilen PZR ürününden 7 µl ve yükleme tamponundan 1 µl, PvuII kesim enzimi ile kesilen PZR ürününden 7 µl ve yükleme tamponundan 1 µl alınarak karıştırılıp %3'lük agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Kesim ürünleri (50 bp marker) DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık (304 nm) altında incelendi.

3.6.2.7. Tth111I ve PvuII Enzimleri Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tth111I Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

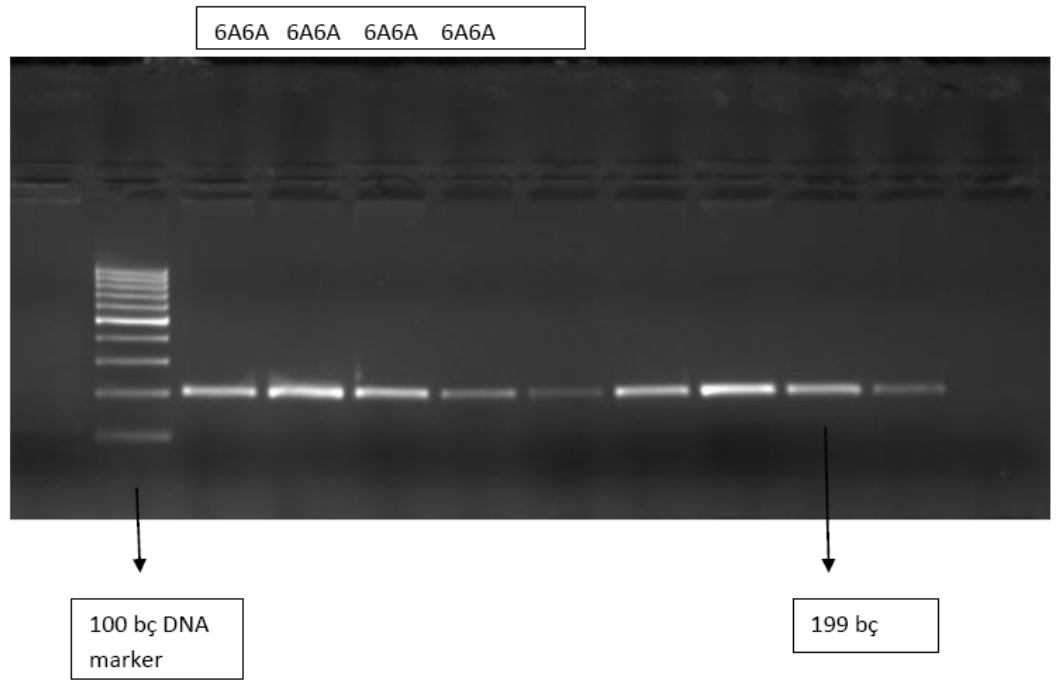
Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 129 bp olduğu saptandı. Tth111I ile kesim sonrası; 129, 97 ve 32 bp büyüklüğünde bantlar görüldü. Kesim sonucu sadece 129 bp'lik bant görüldüğünde 6A6A (polimorfizm yok), 97 ve 32 bp'lik bantlar görüldüğünde 6A5A (homozigot mutant), 129, 97 ve 32 bp'lik bantlar görüldüğünde ise 5A5A (heterozigot mutant) olarak değerlendirildi.



Şekil 6 : MMP-3 -1171 5A/6A polimorfizmi kesim görüntüsü

PvuII Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 117 bp olduğu saptandı. PvuII ile kesim sonrası; 199, 175 ve 24 bç büyüklüğünde bantlar görüldü. Kesim sonucu sadece 199 bç'lik bant görüldüğünde AA (polimorfizm yok), 175 ve 24 bç'lik bantlar görüldüğünde GG (homozigot mutant), 199, 175 ve 24 bç'lik bantlar görüldüğünde ise AG (heterozigot mutant) olarak değerlendirildi.



Şekil 7 : MMP-12 -82A/G polimorfizmi kesim görüntüsü

3.7. SERUM MMP-3 VE MMP-12 DÜZEYLERİNİN ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Hasta ve kontrol gruplarına ait kuru tüpe alınan kan örneklerinden santrifügasyon işlemi sonrasında serum örnekleri ayrılmıştır. Ayrılan serum örnekleri ELISA yöntemi ile çalışılana kadar -80°C'de dondurulmuştur.

3.7.1. ELISA Yönteminin Genel Prensipleri

ELISA saptanmak istenen antijen (Ag) veya antikorların (Ab) tayininde kullanılan duyarlı bir laboratuvar yöntemidir.

ELISA iki 2 farklı yöntem ile ölçüm yapar:

- 1) Ortamdaki antijenleri tanıyabilen antikorların kullanımı ile antijenleri saptar.
- 2) Kullanılan antijenler sayesinde ortamdaki antikorları saptar.

Antikorlar kullanılan test kitindeki kuyucukların duvarına yapışarak reaksiyona girerler. Antikor veya antijen varlığında bir renk değişimi meydana gelir, bu renk değişimi ışığın kırılma ve emilimi kuralına dayanarak çalışan bir alet sayesinde bize yoğunlaşma ve emilme olarak sonuçlar verir.

ELISA yöntemi 5 basamakta yapılan bir işlemdir:

- 1) ELISA kabındaki kuyucuklar antijen ile kaplanır.
- 2) Yanlış pozitif sonucu önlemek için antijen ile kaplanmamış yerler kapatılır.
- 3) Kuyucuklara antikor eklenir.
- 4) Bir enzime bağlı olan fare veya tavşan karşıtı IgG kuyucuklara eklenir. Bu ortamdaki ikinci antikordur.
- 5) Substratın enzimle reaksiyonu sonucu beklenen renk değişimi olursa bu bir pozitif reaksiyondur ve renk değişiminin ışığı emilimine göre yoğunluk belirlenir.

Kullanılan ELISA kitleri ile hedef protein miktarı fotometrik okuyucu sayesinde saptanan renk değişikliğinin şablon eğriye (standard curve) olan oranından yararlanılarak bulunabilir.

3.7.1.1. Serumda Human MMP-3 Düzey Tayin Protokolü

Serum örneklerinde MMP-3 seviyesi tayini Sandviç ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile invitrogen kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (61).

Kullanılan standart solüsyonlar 0, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ng/ mL olacak şekilde hazırlanmıştır. İşlem aşamaları aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

- a) Tüm ayıraçlar ve örnekler oda sıcaklığına getirilip vortekslenip karıştırılmıştır.
- b) Kullanılacak örnekler (serum, plazma vb.) standart seyreltici tampon ile sulandırılmıştır.
- c) Kuyucuklara 50 µl inkübasyon tamponu eklenmiştir
- d) Boş kuyucuklara 50 µl standart seyreltici tampon eklenmiştir.
- e) Uygun kuyucuklara 50 µl standart ya da örnek eklenmiştir.

- f) Her bir kuyucuğa 50 µl Biotin konjugatı eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 4 kez yıkanmıştır.
- g) Her bir kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP çalışma solüsyonu eklenerek 30 dakika sıcaklığında bekletilmiş ve 4 kez yıkanmıştır.
- h) Her bir kuyucuk içerisindeki sıvılar aspire edilip 100 µl stabilize kromojen ile 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir.
- i) Kuyucukların üzerine 100 µl stop solüsyonu eklenip, iyice karıştırılmıştır.(kuyucukların rengi stop solüsyon eklendiğinde maviden sarıya dönmüştür.)
- j) Referans olarak 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okuma yapılmıştır

3.7.1.2. Serumda Human MMP-12 Düzey Tayin Protokolü

Serum örneklerinde MMP-12 seviyesi tayini Sandviç ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile USCN Life Science Inc. kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (62).

Kullanılan standart solüsyonlar 0, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 ng/ mL olacak şekilde hazırlanmıştır. İşlem aşamaları aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

- a) Standart solüsyonlar için 7 kuyu , kör örnek için 1 kuyu hazırlanır. Diğer kuyulara örnekler (serum, plazma vb.) eklenir. 100 µl seyreltilmiş standart solüsyonlardan kör ve örnek kuyularına eklenir. Plate üzerine koruyucu kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilir.
- b) Kuyulardaki sıvı yıkamadan uzaklaştırılır.
- c) Her kuyu üzerine 100 µl deteksiyon reaktif A solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.
- d) Solüsyonlar aspire edilir ve 400 µl 1X yıkama solüsyonu ile her kuyu 1-2 dakika yıkanır. Sıvılar kurutma kağıdına vurularak uzaklaştırılır. bu işlem 3 kere tekrarlanır. En son yıkamadan sonra kalan sıvılar aspire edilerek uzaklaştırılır.
- e) 100 µl deteksiyon reaktif B solüsyonu kuyulara eklenerek oda sıcaklığında 30 dk. İnkübasyona bırakılır.

- f) Solüsyonlar aspire edilir ve 400 µl 1X yıkama solüsyonu ile her kuyu 1-2 dakika yıkanır. Sıvılar kurutma kağıdına vurularak uzaklaştırılır. bu işlem 3 kere tekrarlanır. En son yıkamadan sonra kalan sıvılar aspire edilerek uzaklaştırılır.
- g) Kuyulara 90 µl substrat solüsyonu eklenerek karanlıkta 15-25 dk. Oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Kuyuların rengi substrat solüsyonu eklendiğinde maviye dönecektir.
- h) Her kuyuya 50 µl sonlandırıcı solüsyon eklenir. Böylece kuyuların rengi maviden sarıya dönecektir.
- i) Referans olarak 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okuma yapılmıştır.

3.7.2. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılacak İstatistiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizi SPSS 11.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmıştır. Sonuçlar ortanca (median) ve median interquarter range (EQR) veya ortalama standart sapma olarak verilmiştir.

Genotip ve allelerin görülme sıklığının gruplararası farklılıklarının değerlendirilmesinde Ki Kare, Fisher, Kruskal Wallis ve Mann-Whitney testleri kullanılmıştır.

İnflamasyon belirteçlerinin birbirleri arasındaki ve inflamasyon belirteçleri ve lipid değerleri arasındaki ilişki Pearson Korelasyon Testi (Katsayısı) ile irdelenmiştir.

Genotip ve allellerin aktivite üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için Student's t-testi ve Anova kullanılmıştır. Allel frekansları gen sayma metoduna göre yapılmıştır.

Hasta ve kontrol grubuna ait serum düzeylerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışma gruplarına ait demografik bilgiler Tablo 10’da verilmiştir. Hasta grubu olarak çalışmaya 70 adet Tip 2 diyabet hastası dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak çalışmaya yaşları eşitlenmiş 100 diyabet ve MI hikayesi olmayan sağlıklı kişi dahil edilmiştir.

Tablo 10 : Çalışma gruplarına ait demografik bilgiler

PARAMETRELER	KONTROL N=100	HASTA N=70	P
Cinsiyet (Kadın/erkek)	65/35	39/31	0,26
Sigara(Var/Yok) %	40,2/59,8	21,4/78,6	0,016
Yaş (yıl)	46,46±11,20	51,04±13,31	0,079
Glikoz (mg/dl)	83±3,20	215,26±112,94	0,001

Tablo 11 : Hasta grubuna ait demografik bilgiler

PARAMETRELER	
Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)	28,32±8,60
Trigliserid (mg/dl)	174,80±198,94
Total kolesterol (mg/dl)	177,88±47,20
HDL-kolestrol (mg/dl)	33,76±12,11
LDL-kolesterol (mg/dl)	111,34±39,28
VLDL-kolesterol (mg/dl)	30,11±14,80
Glikoz (mg/dl)	215,26±112,94
HbA1c	9,22±3,06
İnsülin	18,58±18,98
CPeptid	5,32±5,71
Folat	7,48±3,57
Vitamin B12	509,60±404,73

Tablo 12’de hasta ve kontrol gruplarına ait MMP-3 ve MMP-12 serum düzeyleri görülmektedir. Serum MMP-3 düzeyinin hasta grubunda istatistiksel anlamlı olarak yükseldiği gözlenmiştir. Serum MMP-12 düzeyinin ise hasta grubunda düştüğü ancak istatistiksel anlamlılık oluşturmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 12 : Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Serum Düzeyleri

SERUM DÜZEYLERİ	KONTROL N=100	HASTA N=60	P
MMP-3 Düzeyi (ng/ml)	4,38±0,33	6,47±0,61	0,008
MMP-12 Düzeyi (ng/ml)	4,93±0,61	3,43±0,41	0,362

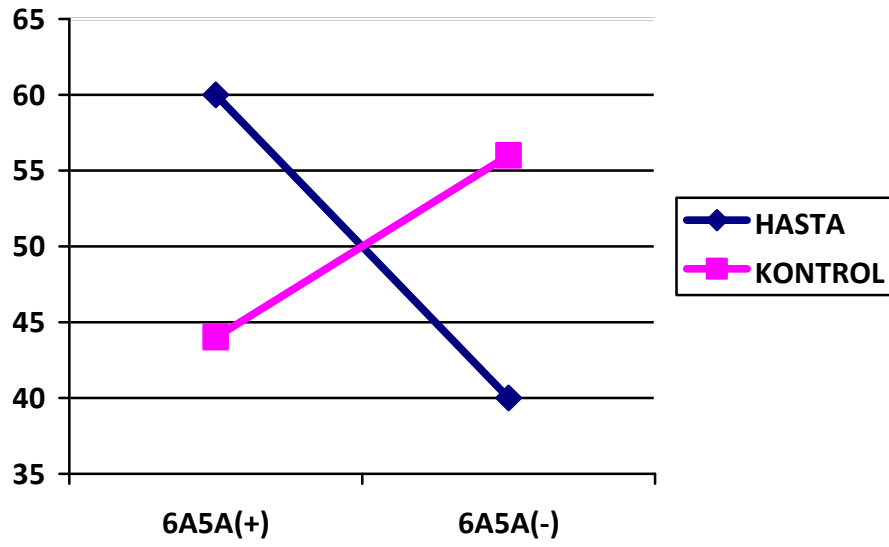
*Tablodaki değerler Ort±SE olarak verilmiştir. Değerlendirme Mann-Whitney Testi ile yapılmıştır.

Hasta ve kontrol gruplarına ait MMP-3-1171 5A/6A genotip ve allel dağılımları tablo 13’de görülmektedir. Hasta ve kontrol grupları arasında MMP-3-1171 5A/6A genotipleri ve allelleri açısından istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Homozigot genotipler tek tek incelendiğinde hasta ve kontrol grupları arasında da istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 13 : Hasta ve Kontrol gruplarında MMP-3-1171 5A/6A genotip ve allel dağılımları

MMP-3-1171 5A/6A GENOTİP VE ALLELERİ	KONTROL (N:100)	DM (N:70)	P
Genotip			
6A6A	38 (%38,0)	20 (%28,6)	
5A5A	18 (%18,0)	8 (%11,4)	
6A5A	44 (%44,0)	42 (%60,0)	0,115
Allel			
6A	120 (%60,0)	82 (%58,57)	
5A	80 (%40,0)	58 (%41,42)	0,791

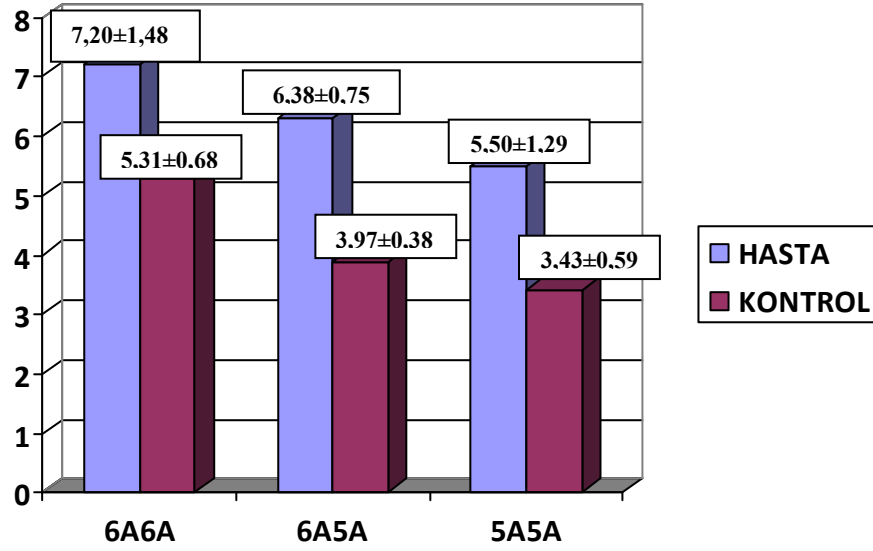
Heterozigot 6A/5A genotipine sahip bireylerin frekansının hasta grubunda kontrole göre anlamlı olarak yüksek olduğu ve diyabet gelişim riskinin 1,9 kat yükseldiği gözlenmiştir (p:0,040 χ^2 :4,21 OR:1,90 %95 CI 1,027-3,54).



Şekil 8: Hasta ve Kontrol Gruplarına ait MMP-3 6A5A Genotip Dağılımları

Tez çalışmamızda MMP-12 genotiplemesi yapılmış fakat hasta ve kontrolde herhangi bir varyant polimorfizme rastlanmamıştır. Çalışma gruplarının hepsinde AA genotipi tespit edilmiş olup istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

Şekil 9 : MMP-3-1171 5A/6A genotiplerine ait serum MMP-3 düzeyleri



Hasta ve kontrol grupları genotipler açısından karşılaştırıldığında sadece 6A5A genotipine sahip hasta grubunda MMP-3 serum düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde kontrole göre yükseldiği tespit edilmiştir (p:0,031 Mann-Whitney Testi). Hasta ve kontrol grupları kendi içinde MMP-3'ün her 3 genotipine göre serum düzeyleri incelendiğinde herhangi bir anlamlılığa rastlanmamıştır.

5.TARTIŞMA

Koroner arter hastalığının gelişmiş ülkelerde görülen ölümlerde temel nedenlerden biri olduğu bildirilmiştir (63). Yapılan birçok çalışmada oksidatif stres ile MMP-3'ün ilişkili olduğu gösterilmiştir (64,65). Aterosklerozisde MMP sistemleri ve artan oksidatif stres önemli faktörlerdendir (66). Kontrol grupları açısından bizim çalışmamıza paralellik gösteren Özkök ve ark.nın Türk populasyonunda yaptıkları araştırmada MMP-3 6A6A genotip frekansı %52,6, 6A5A genotip frekansı %35,1, 5A5A genotip frekansı %12,3 bulunmuştur. Ayrıca 6A alleli %0,70, 5A alleli ise %0,30 olarak tespit edilmiştir. Yaptıkları çalışmaya göre MMP-3 5A/6A varyantları ile koroner arter hastalığı arasında ilişki gözlenmiştir. MMP-3 5A/6A polimorfizminin hasta damarlar üzerinde etkiye sahip olmamasına rağmen koroner arter hastalarında hipertansiyon ve hiperlipidemi ile MMP-3'ün ilişkili olduğu bulunmuştur (67). Vanessa ve ark.nın Koroner arter hastalarında yaptığı araştırmada 6A6A genotipi %25, 6A5A genotipi %57, 5A5A genotipi %12, 6A allel frekansı %56 ve 5A allel frekansı %46 olarak tespit edilmiştir. MMP-3 6A6A genotipini, 6A5A ve 5A5A genotipleri koroner arter hastalığı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmıştır ($p<0,05$) (68).

Kadınlar arasında en sık görülen kanser türü meme kanseridir. Genetik faktörler, polimorfizmler ile meme kanser riskinin ve sıklığının hızlı şekilde arttığı bildirilmiştir. MMP genlerinde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmleri ile birçok kanser türü örneğin akciğer, baş, boyun, renal ve kolorektal kanserler arasında ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Birçok çalışmada MMP genlerindeki polimorfizmlerin meme kanser riski ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Ghilardi ve ark.'nın İtalyan populasyonunda yaptıkları MMP-3 -1171 6A/5A polimorfizminde kontrol grubunda %30,9 6A6A genotipi, %49,09 6A5A genotipi, %20 5A5A genotipine rastlamışlardır (69). Krippel ve ark. Avustralya populasyonunda yaptıkları polimorfizm çalışmasında kontrol grubunda %29 oranında 6A6A genotipi, %46,6 oranında 6A5A genotipi ve %23 oranında 5A5A genotipi belirlemişlerdir (70). Bir başka çalışmada ise Holliday ve ark. İngiliz toplumu üzerinde MMP-3 -1171 6A/5A polimorfizmini kontrol grubunda 6A6A genotipini %26,31, 6A5A genotipini %52,63, 5A5A genotipini %21,05 tespit etmişlerdir (71).

Bunların aksine McColgan ve ark.nın yaptığı çalışmada MMP-3 polimorfizmi ile meme kanseri arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (72).

Constantin ve ark.nın yaptığı diğer bir MMP-3 -1171 5A/6A polimorfizminin araştırıldığı çalışmada yer alan kontrol grubunda %28,5 oranında 6A6A genotipi, %54,8 oranında 6A5A genotipi, %16,7 oranında 5A5A genotipini saptanmışlar; 6A allel frekansı % 66 iken, 5A allel frekansı %44 olarak bulmuşlar, bunun yanında çalışma sonucunda elde edilen bu verilerin, MMP-3 gen promotörü ile romatoid artridin şiddetli ilerleyişi arasında bir ilişkinin bulunduğunu ancak romatoid artrid yatkınlığı açısından benzer bir ilişki bulunmadığını göstermektedir (73).

MMP-3'ün birçok MMP'yi aktive ederek solunum yolunun yeniden düzenlenmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Schimer ve ark. Brezilya'da, kronik obstrüktif pulmoner hastalığı (KOAH) gelişimi ile ilgili yaptıkları polimorfizm araştırmasında yer alan kontrol grubu verilerinde 6A6A genotipi %34,3, 6A5A genotipi %42,4, 5A5A genotipi ise %23,3 oranında bulunmuş olup, 6A allel frekansı %55,6 ve 5A allel frekansı 44,4 olarak tespit edilmiştir. Bu bilgilere göre KOAH üzerinde MMP polimorfizmlerinin anlamlı olarak bir etkisi olmadığı saptanmıştır (74).

Su ve ark.nın yaptığı araştırmanın kontrol grubu verileri MMP-3 -1171 5A/6A polimorfizminde %26 6A6A genotipi, %50 6A5A genotipi, %24 5A5A genotipi saptanmıştır. MMP-3 polimorfizminde 6A6A genotipi bulundurmanın hiç sigara içmeyen akciğer kanserli vakalarla yüksek ilişkili olduğu saptanmıştır (1.76, 95% CI, 1.04-2.97) (75).

Park ve ark. yaptıkları çalışmada MMP-3 -1171 5A/6A polimorfizmi açısından kontrol grubunda 6A6A genotipi %74, 6A5A genotipi %23 ve 5A5A genotipi %3 oranında gözlenirken, 6A allel frekansı %85,5, 5A allel frekansı ise %14.5 olarak saptanmıştır. Bu bulgular sonucunda MMP-3 6A/6A genotipinin Kawazaki hastalığında koroner arter lezyonları oluşumu için önemli risk faktörü olduğunu söylemişlerdir (76). Renal hücre karsinomlarında Hirata ve ark. yaptığı çalışmada kontrol grubunda MMP-3 6A6A genotipi %69,1, 6A5A genotipi %29,1 ve 5A5A genotipi %1,7 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada MMP-3 5A/6A polimorfizmi ile ilgili olarak istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir (77).

Tanya ve ark. ise genç ve yaşlı gruplarıyla yaptıkları çalışmada MMP-3 -1171 5A/6A genç gruba ait 6A6A genotipini %32 , 6A5A genotipini %41, 5A5A genotipini

ise %27 oranında bulunmuştur. Yaşlı grupta ise 6A6A genotipi %34 , 6A5A genotipi %45, 5A5A genotipi ise %21 oranında bulunmuştur (78). Çalışma sonuçlarına göre spontan gerçekleşen ve yaygın bir polimorfizm olan -1171 6A/5A MMP-3 promotorunu etkilemektedir. 5 veya 6 ardışık adeninler (5A/6A) transkripsiyon faktör bağlanmasını ve MMP-3 promotor aktivitesini değiştirmektedir. 5A alleli hücre kültür çalışmalarında artan promotor aktiviteye sahiptir. 5A alleli akut koroner olaylar, aortik anevrizma ve artan matriks degradasyonunu ile buna karşın 6A alleli karotid intima-medya kalınlaşması ve bypass sonrası hastalarda koroner arter hastalığı ilerleyişi ile ilişkilidir (78).

Ghilardi ve ark.nın İtalyan popülasyonunda meme kanseri geçirmiş hasta ve kanser şüphesi taşımayan sağlıklı grupta yaptığı çalışmada kontrol grubuna MMP-3 genine ait 6A6A genotipi %31, 6A5A genotipi %49, 5A5A genotipi %20 oranında tespit edilmiş olup MMP-3 gen promotor sekansında 5A allel varlığının meme kanserli hastalarda metastaz ve kanser büyümesi için kolaylaştırıcı faktör olabileceğini göstermiştir (79).

Cozzolino ve ark.nın hemodiyaliz hastaları ve kontrol grubu üzerinde yaptıkları MMP-3 genine ait promotor bölgedeki polimorfizm çalışmasında 6A6A genotipi %28, 5A6A genotipi %44, 5A5A genotipi %27 ve 6A alleli %6 oranında tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre hemodiyaliz hastaları ile normal popülasyon karşılaştırıldığında ilk defa MMP-3 gen polimorfizminde farklı bir dağılım sergilediği gözlenmiştir. Homozigot 6A6A genotipi taşıyan hemodiyaliz hastalarında ölüm oranının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (80).

Yemek borusu kanserlerinde Bradbury ve ark. yaptığı çalışmada hasta ve kontrol gruplarında MMP-3 -1171 6A/5A polimorfizmi araştırılmıştır. Kontrol grubunda 6A6A genotipi %26, 6A5A genotipi %51, 5A5A genotipi %23 oranında bulunmuştur. Sonuç olarak MMP-3 6A5A genotipi ile yemek borusu kanseri arasında anlamlı bir ilişki olduğu, fakat bu durumun kanser gelişimi üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır (81).

Çalışmamızda MMP-3 genotip dağılımının hasta grubunda %28,6 oranında 6A6A genotipi, %60 oranında 6A5A genotipi ve %11,4 oranında 5A5A genotipi, kontrol grubunda ise %38 oranında 6A6A, %44 oranında 6A5A ve %18 oranında

5A5A genotipi bulduk. Buna göre frekans dağılımımızın beyaz ırktaki çalışmalar ile uyumlu olduğu izlenimini edindik.

Kronik obstrüktif pulmoner hastalığın gelişiminde en önemli çevresel etmenin sigara olduğu ve bazı özel MMP genotiplerinin bu hastalığın gelişiminde risk faktörü olabileceği öngörülmüştür. MMP-12'nin solunum yolu inflamasyonunda ve anfizem gelişiminde önemli olduğu bildirilmiştir. Schimer ve ark. Brezilya populasyonunda MMP-12 -82 A/G polimorfizmi ile ilgili yaptıkları çalışmada GG genotipine rastlanmaz iken %84,1 oranında AA ve %15,9 oranında AG genotipi bulunmuştur. MMP-12 de %7,9 G alleli ve %92,1 A alleli tespit edilmiştir. MMP-12'nin promotorundaki -82A/G polimorfizminin MMP-12 ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. Brezilyalı bireylerden alınan örneklerde kronik obstrüktif pulmoner hastalığı gelişimi üzerinde MMP-12 -82A/G polimorfizminin anlamlı olarak bir etkisi olmadığı bulunmuştur (74). Su ve ark.nın yaptığı diğer bir MMP-12 -82 A/G polimorfizm çalışmasında %2 oranında GG genotipi, %76 oranında AA genotipi ve %22 oranında AG genotipine sahip bireyler bulunmuştur. Bu polimorfizm ile akciğer kanseri arasında ilişki saptanmamıştır (82).

Koroner arter hastalarında Vanessa ve ark.nın yaptığı MMP-12 -82 A/G çalışmada GG genotipi %1,5, %77,6 AA genotipi ve %20,9 AG genotipi bulunmuş olup, %12 G alleli , %88 A alleli tespit edilmiştir. Bu polimorfizm ile koroner arter hastalığının şiddeti üzerinde anlamlı ilişki gözlenmemiştir. (68).

Li ve ark.nın epitel yumurtalık kanseri (EOC) üzerine Çin populasyonuna ait kadınlarda yaptıkları -82 A/G polimorfizm çalışmasında kontrol grubunda GG genotipine rastlanmaz iken, %96,7 oranında AA, %3,3 oranında AG genotipi tespit edilmiş ve bunun yanı sıra A alleli %98,3 ve G alleli %1,7 oranında saptanmıştır. Bu bilgilere göre EOC ilerleyişi ve gelişiminde MMP-12 geninin -82A/G genetik varyantının risk faktörü olabileceğini ileri sürülmüştür (75). Bradbury ve ark.nın yemek borusu kanserlerinde yaptıkları çalışmada ise hasta ve kontrol gruplarında MMP-12 – 82 A/G polimorfizmi incelenmiştir. Kontrol grubunda MMP-12 geninde AA genotipine %82, AG genotipine %17, GG genotipine %1 oranında rastlanmıştır. MMP-12 -82A/G polimorfizminde G alleli ile yemek borusu kanseri arasında bu kanser türünde artan riske sebep olduğu bilirlmiştir (81). Bir diğer kanser türü olan kolorektal kanserli hastalar ve kontrol grubu üzerinde Woo ve ark.nın kore populasyonundaki

yaptıkları araştırmada MMP-12 -82A/G polimorfizminde %97 AA genotipi, %3 AG genotipi tespit edilirken, GG genotipine rastlanmamıştır. Koleraktal kanserli hasta ve kontrol grubu arasında allel frekansları ya da genotipler açısından herhangi bir farklılık belirlenememiştir. Ayrıca Kore populasyonu içinde herhangi istatistiksel bir anlam tespit edilememiştir. Promotor bölgedeki bu varyantların kolorektal kanserinde düşük etkinliğe sahip olabileceği bildirilmiştir.

Çalışmamızda MMP-12'ye ait varyant genotipe rastlamadığımızdan diğer populasyonlarla karşılaştırma yapılamamıştır. Schimer ve ark., Li ve ark. Woo ve ark.nın çalışmalarını incelediğimizde onlarında homozigot varyant genotip frekanslarının bizim çalışmamıza benzer şekilde çok düşük ya da hiç olmadığı gözlemledik.

Serum MMP düzeyleri ile ilgili araştırmalar yapılmış olup Kanesaka ve ark.nın multiple sklerozis hastaları üzerinde MMP-3 serum düzeyleri ile ilgili yaptıkları çalışmada hastalığın pro ile hastalık aktivitesi birbiri ile korele olduğu tespit edilmiştir. MMP-3 düzeyleri hastalığın tekrarlaması açısından belirteç olarak gözlemlemiştir (83). Tsukahara ve ark.nın yaptığı çalışmada Japon Romatoid Artrid hastalarında MMP-3 -1612ins/del A geontiplerinin MMP-3 serum düzeyleri üzerine etkisi incelenmiş ve serum düzeylerinin 5A5A < 5A6A < 6A6A şeklinde yükseldiği tespit edilmiştir (84). Miyokard iskemili hasta grubunda yapılan başka bir çalışmada ise kontrole göre hasta grubunda serum MMP-3 düzeylerinin miyokard iskemisinde yükseldiği tespit edilmiştir (85).

Çalışmamızda serum MMP-3 düzeylerini hasta grubunda kontrole göre yüksek olarak tespit ettik. Ayrıca MMP-3 serum düzeylerinin genotiplerden etkilendiğini Tsukahara ve ark.nın bulguları ile uyumlu şekilde 5A5A < 5A6A < 6A6A şeklinde yükseldiğini tespit ettik. Ayrıca serum MMP-12 düzeylerinin hasta grubundan kontrole göre azaldığını gözlemledik.

Yaptığımız literatür çalışmasında MMP-3 -1171 6A/5A polimorfizminin MMP-3 ekspresyonunu etkilediği, 6A allelinin MMP-3 ekspresyonunu arttırırken 5A allelinin MMP-3 ekspresyonunu düşürdüğü gösteren yayınlar bulunmaktadır (79,80,81).

6A allelinin represör bağlanma bölgesindeki affiniyi arttırarak ekspresyonun azalmasına, 5A allelinin varlığında ise represrn bağlanmasını azalttığından ekspresyonun artmasına sebep olduğu ileri sürülmektedir (79).

Ancak çalışmamızda 6A6A genotipinde yüksek MMP-3 düzeylerini gözlemlerken 5A5A genotipli bireylerde ise en düşük MMP-3 seviyelerini tespit ettik. Genel hipotezin aksine bu bulgumuz Tsukahara ve ark. ile Matthey ve ark.nın çalışmaları ile uyumlu çıkmıştır.

MMP-3 ekspresyonu normal dokularda düşüktür fakat ESM'nin yeniden düzenlenmesi ihtiyacında ekspresyon artmaktadır. MMP-3'ün birçok ESM degradasyonu, yeniden şekillenme, proliferasyon, anjiyogenez ve diğer MMP'lerin sentezinin indüklenmesinde (MMP-1,MMP-9) rol oynadığı bilinmektedir. MMP-3 transkripsiyonu değişik kanser türlerinde yüksek olarak tespit edilmiştir (MMP-9,MMP-12). MMP-3'ün promotor bölgesindeki 5A6A genotipinin MMP-3'ün farklı transkripsiyonlarına sebep olduğu bilinmektedir. 5A allelinin promotor aktivitesini 6A allele göre 2 kat arttırdığı gösterilmiştir. 5A alleli Avrupa popülasyonunda çok sık olarak görülmektedir (%40-50). Fakat Asya popülasyonunda %7-20 sıklıkta görülmektedir (MMP-14,MMP-16). 5A6A polimorfizmi düşük transkripsiyonel seviyeleri etkilemektedir. 5A alleli fibroblast ve düz kas hücrelerinde yüksek gen ekspresyonu ile sonuçlanırken 6A alleli düşük promotor reaktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (87).

5A alleli yüksek transkripsiyonel aktivite ile ilişkili iken 6A alleli düşük transkripsiyonel aktivite ile ilişkilidir. Bugüne kadar 6A6A genotipi erkek ve kadınlarda koroner arter hastalığının ilerlemesi ve tıkanmış damar sayısının artması ile ilişkilendirilmiştir (86).

6A allelinin düşük promotor aktivitesine, yetersiz MMP-3 ekspresyonuna, vasküler matriks proteinlerinin birikimine ve aterosklerozun hızlı gelişimine sebep olduğu bildirilmiştir. Genotipi artmış matriks protein birikimi ile ilişkili iken 5A5A ve 6A5A genotiplerinin artmış matriks degradasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Artmış MMP-3 ekspresyonunun plak yırtılmasını tetiklediği, 5A allelinin miyokard infarktüsü ile ilişkili olduğu bildirilmiş ve 5A allelini taşıyan bireylerin taşımayanlara göre miyokard infarktüsü geçirme riskini 1,5-2 kat arttırdığı ileri sürülmektedir. Çalışmamızda diyabette MMP-3 düzeylerini yüksek bulduk. MMP-3 düzeylerinin artması ESM birikimine, değişik büyüme faktörlerinin (tümör nekroz faktör- α , pro-dönüştürücü büyüme faktörü- β , insülin benzeri büyüme faktörü ve heparin-bağlayıcı-epidermal büyüme faktörlerinin) ve sitokinlerin salgılanmasını ya da

aktivasyonu arttırarak renal hipertrofinin başlamasına ve bunun sonucunda diyabetin başlıca komplikasyonlarından olan diyabetik nefropatinin gelişimine sebep olduğu ileri sürülmektedir.

Sonuç olarak:

1. Türk toplumuna ait MMP-3 frekans dağılımı beyaz ırk ile uyumludur.
2. MMP-3 genotipleri hasta sayısının az olması nedeni ile hastalık ile ilişkilendirilememiştir. Ancak hasta sayısının artması ile bu ilişkinin daha belirgin olacağı düşünülmektedir.
3. MMP-3 serum düzeyleri hasta grubunda yüksek bulunmuştur.
4. MMP-3 serum düzeylerinin MMP-3 -1171 6A/5A polimorfizminden etkilendiği tespit edilmiş olup 5A5A<6A5A<6A6A şeklinde arttığı belirlenmiştir.
5. 6A6A genotipine sahip bireylerde artmış MMP-3 düzeylerinin ekstraselluler matriks protein birikimine sebep olarak, diyabet komplikasyonlarının gelişimini tetikleyerek tip 2 diyabet gelişiminde etkili olabileceği tespit edilmiştir. Hasta sayısının arttırılarak bu ilişkinin destekleneceğini ümit etmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Toktamış A, Demirel E. Tip 2 Diyabet İçin Bağımsız Bir Risk Faktörü: Sigara. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 2002; 24 (4): 209 –214.
2. Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: Impaired insülin secretion versus impaired insülin sensitivity. *Endocrine Rev.* 1998; 19 (4): 491-503.
3. Campagna FA, Imperatore G. Type 2 Diabetes in children. *BMJ* 2001; 322: 377-78.
4. Reel B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2006; 26:527-537.
5. Sav A, Özdamar ŞO, *Hastalığın Patolojik Temelleri*. Güneş Tıp Kitabevi;2009.
6. Pamela CC, Richard AH, Denise RF,editor. *Lippincott's Illustrated Reviews*. Nobel Tıp Kitabevi; 2005.
7. Gürbüz E, *Temel ve Klinik Endokrinoloji*, Medikal Network;2005.
8. Atalay S. Metabolik Sendrom Ve Metabolik Kontrol Durumuna Göre Tip 2 Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Kanda Krom Düzeylerinin Karşılaştırılması;2008.
9. Navarro-González JF, Mora-Fernandez C, Muros de Fuentes M, Garcia-Perez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat. Rev. Nephrol.* 2011;
10. Pickup, JC, Mattock MB, Chusney CD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40, 1997;1286–1292.
11. Herder, C. Inflammation and type 2 diabetes: results from KORA Augsburg. *Gesundheitswesen* 67, 2005;S115–S121.
12. Thrailkill KM, Bunn RC, Fowlkes JL. Matrix Metalloproteinases: Their Potential Role In The Pathogenesis Of Diabetic Nephropathy,2009.
13. Cummins PM, Offenberg V, Sweeney N, Killeen MT, Birney YA, Redmond EM, Cahill PA. Cyclic strain-mediated matrix metalloproteinase regulation

- within the vascular endothelium: a force to be reckoned with. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292(1): 28-42.
14. Somers P, Knaapen M. The histopathology of varicose vein disease. *Angiology*. 2006; 57(5): 546-555.
 15. Lijnen HR. Metalloproteinases in development and progression of vascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003-2004; 33: 275-81.
 16. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2001; 86(1): 324-333.
 17. Jones EA, Le Noble F, Eichmann A. What determines blood vessel structure? Genetic prespecification vs. hemodynamics. *Physiology (Bethesda)* 2006 21:388-395.
 18. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001;17:463–516.
 19. Bruner-Tran KL, Eisenberg E, Yeaman GR, Anderson TA, Mcbean J, Osteen KG. Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice, *J Clin Endocrinol Metab*, 2002;87(10):4782–4791.
 20. Chung HW, Lee JY, Moon HS, Hur SE, Park MH, Wen Y, Polan ML. Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase–2 expression in ectopic and eutopic endometrium, *Fertil Steril*, 2002;78(4):787–795.
 21. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry, *Circ Res*, 2003;92(8):827–839.
 22. Brummer O, Böhmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry KU, Kühnle H. MMP–1 and MMP–2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation an immunohistochemical study, *Gynecol Oncol*, 2002;84(2):222–227.
 23. Curry TE, Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle, *Endocr Rev*, 2003;24(4):428–465.
 24. Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies, *Int J Dev Biol*, 2004;48(5–6):411–424.

25. Hashizume K. Analysis of utero-placental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine, *J Reprod Dev*, 2007;53(1):1–11.
26. Osteen KG, Igarashi TM, Bruner-Tran KL. Progesterone action in the human endometrium: induction of a unique tissue environment which limits matrix metalloproteinase (MMP) expression, *Front Biosci*, 2003;8:d78–86.
27. Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metallo-proteinase substrate binding domains, modules, and exosites, *Mol Biotechnol*, 2002;22(1):51–86.
28. Li M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of MMP–7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis, *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006;231(1):20–27.
29. Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis, *Thromb Haemost*, 2001;86(1):346–355.
30. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb*. 2003; 10(5): 275-282.
31. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005 ; 9(2): 267-285.
32. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75(2): 346-359.
33. Lijnen HR. Metalloproteinases in development and progression of vascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003-2004; 33: 275-81.
34. The University of British Columbia Department of Oral Biological & Medical Sciences Department of Biochemistry & Molecular Biology, The Overall Lab Website. [web page on internet] Erişim: 15.02.2011, http://www.clip.ubc.ca/archive/mmp_timp_folder/mmp_schematic_master.gif
35. Rossignol P, Cambillau M, Chatellier G, Jacob MP. Clinical Indications Of Serum Matriciel Metalloprotease Measurement. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 15(7), 365-73, 2003, http://www.john-libbey-eurotext.fr/en/revues/medecine/stv/e-docs/00/03/FD/7B/texte_alt_150sl.jpg.

36. Ishikawa Y, Asuwa N, Ishii T, Ito K, Akasaka Y, Masuda T, Zhang L, Kiguchi H. Collagen alteration in vascular remodeling by hemodynamic factors. *Virchows Arch.* 2000; 437(2): 138-148.
37. Shiomi T, Okada Y. MT1–MMP and MMP–7 in invasion and metastasis of human cancers, *Cancer Metastasis Rev*,2003;22(2–3):145–152.
38. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling, *Thromb Haemost*, 2001;86(1):324–333.
39. Ny T, Wahlberg P, Brändström IJ. Matrix remodeling in the ovary: regulation and functional role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems, *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187(1–2):29–38.
40. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* 2007; 211(1): 19-26.
41. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000;19(7): 623-629.
42. Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 2002; 95(9): 1902-1910.
43. Pannu H, Kim DH, Guo D, King TM, Van Ginhoven G, Chin T, Chang K, Qi Y, Shete S, Milewicz DM. The role of MMP-2 and MMP-9 polymorphisms in sporadic intracranial aneurysms. *J Neurosurg.* 2006;105(3): 418-423.
44. Zhao Z, Chang H, Trevino RP, Whren K, Bhawan J, Klempner MS. Selective up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression in human erythema migrans skin lesions of acute lyme disease. *J Infect Dis.* 2003; 188(8): 1098-1104.
45. Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Hommes DW, Verspaget HW. Role of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(21): 2960-2966.

46. Gremlich S, Nguyen D, Reymondin D, Hohlfeld P, Vial Y, Witkin SS, Gerber S. Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk. *J Reprod Immunol.* 2007; 74(1-2): 143-151.
47. Powell JT. Genes predisposing to rapid aneurysm growth. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1085: 236-241.
48. Dong DM, Yao M, Liu B, Sun CY, Jiang YQ, Wang YS. Association between the -1306C/T polymorphism of matrix metalloproteinase-2 gene and lumbar disc disease in Chinese young adults. *Eur Spine J.* 2007;16(11): 1958-1961.
49. Bauters C, Lamblin N, Ennezat PV, Mycinski C, Tricot O, Nague O, Segrestin B, Hannebicque G, Agraou B, Polge AS, de Groote P, Helbecque N, Amouyel P. A prospective evaluation of left ventricular remodeling after inaugural anterior myocardial infarction as a function of gene polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone, adrenergic, and metalloproteinase systems. *Am Heart J.* 2007;153(4): 641-648.
50. Gürkan A, Emingil G, Saygan BH, Atilla G, Cinarcik S, Köse T, Berdeli A. Gene polymorphisms of matrix metalloproteinase-2, -9 and -12 in periodontal health and severe chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(4): 337-345.
51. Mannsmann U, Herzig M. The use of SNP profiles as clinical markers. IMBI, University of Heidelberg.
<http://www.biometrie.uni-heidelberg.de/MannsmannUlrich>
52. Hinoda Y, Okayama N, Takano N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Hazama S, Kitamura Y, Kamatani N, Oka M. Association of functional polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 genes with colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2002;102:526–9.
53. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem.* 1996;271:13055–60.
54. Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, Neoptolemos JP. Role of Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Digestion,* 1997; 58:520-8.
55. Welgus HG. Stromelysin: Structure and function. *Progress in Inflammation Research and Therapy.* 1991; 61-5.

56. Shiomi T, Okada Y. MT1–MMP and MMP–7 in invasion and metastasis of human cancers, *Cancer Metastasis Rev*,2003;22(2–3):145–152.
57. Sun T, Gao Y, Tan W, et al. Haplotypes in matrix metalloproteinase genecluster on chromosome 11q22 contribute to the risk of lung cancer development and progression. *Clin Cancer Res*. 2006;12:7009-7017.
58. Ling C, Groop L. Epigenetics: A molecular link between environmental factors and type 2 diabetes, *Diabetes*,2009.
59. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease,*Nat. Rev. Imm*,2011.
60. Herrington DM, Jhones CB, Sane DC. Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome, *Cardovascular Research*,2003;812-823.
61. Invitrogen HUMAN MMP-3 ELISA kiti, katalog #KAC1542/KAC1541.
62. USCN Life Science Inc. HUMAN MMP-12 ELISA kiti, katalog E0402Hu.
63. Loyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D. Lifetime risk developing artery coronary disease. *Lancet*, 1999; 353: 89–92.
64. Kuremoto K, Watanabe Y, Ohmura H et al. R/R genotype of human paraoxonase (PON1) is more protective against lipoprotein oxidation and coronary artery disease in Japanese subjects. *J Atheroscler Thromb*, 2003; 10: 85–92.
65. Huang Y, Mironova M, Lopes-Virella MF. Oxidized LDL stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells.*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19: 2640–47.
66. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S et al.Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulates the activity of vascular matrix metalloproteinases *in vitro*. *J Clin Invest*, 1996; 98: 2572–79.
67. Özkök E, Aydın M, Babalik E,Özbek Z, İnce N, Kara İ. Combined impact of matrix metalloproteinase-3 and paraoxonase 1 55/192 gene variants on coronary artery disease in Turkish patients. *Med Sci Monit*, 2008;14(10): CR536-542.
68. Vanessa L, Dalepiane N, Daiane, Silvello N, Paludo CA, Roisenberg I, Simon D. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with coronary artery disease, *Genet. Mol. Biol*. 2007.

69. Ghilardi G, Biondi ML, Caputo M, Leviti S, De Monti M, Guagnellini E, Scorza R, A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility, 2002, *Clin Cancer Res*.8 (12);3820-3823.
70. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani B, Koppel H, Leithner A, Wascher T.C, Paulweber B, Samonigg H, The 5A/6A polymorphism of matrix metalloproteinase-3 gene promoter and breast cancer *Clin Cancer Res* 10(10):3518-3520.
71. Holliday DL, Hughes S, Shaw JA, Walker RA, Jones JL, Intrinsic genetic characteristics determine tumor-modifying capacity of fibroblasts: matrix metalloproteinase-3 5A/5A genotype enhances breast cancer cell invasion. *Breast Cancer. Res* 9(5):R67.
72. Zhou W, Su L, Asomaning K, Xihong L, Wain J.C, Lynch T.J, Liu G, Christani D, Genotypes and haplotypes of matrix metalloproteinase 1,3 and 12 genes and the risk of lung cancer, 2006, *Carcinogenesis Vol.27* no.5 pp 1024
73. Constantin A, Lauwers-Cancès V, Navaux F, Abbal M, Meerwijk Jv, Mazières B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A Stromelysin 1 (Matrix Metalloproteinase 3) And Hla-Drb1 Gene Polymorphisms: Association With Severity And Progression Of Rheumatoid Arthritis In A Prospective Study, *Arthritis & Rheumatism pages*, 2002;P54-1762.
74. Schirmer H, Basso Da Silva L, Teixeira Pj, Moreira Js, Moreira Al, Simon D. Matrix Metalloproteinase Gene Polymorphisms: Lack Of Association With Chronic Obstructive Pulmonary Disease In A Brazilian Population. *Genet. Mol. Res*, 2009; 25;8(3):1028-34.
75. Li Y, Jia J.H, Kang S, Zhang X.S, Zhao J, Wang N, Sun D.L, The functional polymorphisms on promoter region of Matrix Metalloproteinase-12-13 genes may alter the risk of epithelial ovarian carcinoma in Chinese, *Int J Gynecol cancer* 2009;129-133.

76. Park Ja, Shin Ks, Kim Ywp Olymorphism Of Matrix Metalloproteinase-3 Promoter Gene As A Risk Factor For Coronary Artery Lesions In Kawasaki Disease. *J Korean Med Sci.* 2005;20(4):607-11.
77. Hirata H, Okayama N, Naito K, Inoue R, Yoshihiro S, Hideyasu M, Suehiro Y, Hamanaka Y, Hinoda Y, Association of a haplotype of matrix metalloproteinase(MMP)-1 and MMP-3 polymorphism with renal cell carcinoma, 2004, *Carcinogenesis Vol.25* no.12 pp .2379-2384
78. Medley TL, Kingwell BA, Gatzka CD, Pillay P and Cole TJ. Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulating of gene and protein expression. *Circulation Research*, 2003;92,1254-1261.
79. Ghilardi G, Biondi ML, Caputo M, Leviti S, De Monti M, Guagnellini E, Scorza R, A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility, 2002, *Clin Cancer Res.*8 (12);3820-3823.
80. Cozzolino M, Biondi M.L, Galassi A, Turri O, Brancaccio, Galleni M, Matrix Metalloproteinase-1 and metalloproteinase(MMP)-3 gene promoter polymorphisms are associated with mortality in haemodialysis patients, *Nephrol Dial Transplant*, 2009;1-6
81. Bradbury PA, Zhai R, Hopkins J, Kulke MH, Heist RS et al, Matrix metalloproteinase 1,3 and 12 polymorphisms and esophageal adenocarcinoma risk and prognosis, *Carcinogenesis*, 2009; pp793-798.
82. Su L, Zhou W, Asomaning K, Xihong L, Wain J.C, Lynch T.J, Liu G, Christani D, Genotypes and haplotypes of matrix metalloproteinase 1,3 and 12 genes and the risk of lung cancer, 2006, *Carcinogenesis Vol.27* no.5 pp 1024.
83. Kanosaka T, Mori M, Hattori T, Oki T, Kuwebere S, Serum matrix Metalloproteinase-3 levels correlate with disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis, *J Neural Neurosurg Psychiatry*, 2006;77:185-188
84. Tsukahara S, Shinozaki M, Ikari K, Mochizuki T, Inoue E, Effect of Matrix Metalloproteinase-3 functional SNP on serum matrix Metalloproteinase-3 level outcome measures in Japanese RA patients, *Rheumatology* 2008;47;41-44

85. Karapanagiotidis GT et al. serum levels of matrix metalloproteinases 1,2,3 and 9 in thoracic aortic diseases and acute myocardial ischemia. *Biomed Central*, 2009.
86. Djuric T, Zivkovic MD et al. Association of MMP-3 5A/6A gene polymorphism with susceptibility to carotid atherosclerosis, *Clinical Bio*, 2008.
87. Chaudhary AK, Singh M, Bharti AC, Singh M, Shukla S, Singh AK, Mehrotra R, Synergistic effect of stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) promoter (-1171 5A/6A) polymorphism in oral submucous fibrosis and head and neck lesion, *BMC Cancer*, 2010.

ETİK KURUL KARARI



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 26/06/2009

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 7

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Ş.Ümit ZEYBEK'in üstlendiği ve Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Leman Melis YURDUM'un üstlendiği 2009/1944 protokol numaralı " Tip II Diyabet Hastalığında MMP-3 ve MMP-12 Gen Polimorfizmlerinin ve Serum Düzeylerine Olan Etkisinin İncelenmesi" başlıklı tez çalışması kurulumuzda incelendi. Etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Güher SARUHAN DİRESKENELİ
Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ
Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP
I.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKÖĞLU
Biokimya A.D

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK
İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
Hukukçu

Prof.Dr. Y. Sümer YAMANER
Genel Cerrahi A.D.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Leman Melis	Soyadı	Yurdum
Doğ.Yeri	Üsküdar-İstanbul	Doğ.Tar.	18.10.1985
Uyruğu	T.C	TC Kim No	53653075666
Email	melisyurdum@hotmail.com	Tel	0537 500 79 49

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Tıp ABD.	2011
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2008
Lise	Maltepe Süper Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	İyi	iyi	67,5	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): El sanatları ile uğraşmak, Kitap okumak.