

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TİP 2 DİABETTE TIMP-1 VE TIMP-2 GENETİK
VARYASYONLARININ ETKİSİ VE SERUM
DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

FARUK ÇELİK

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. Ş. ÜMİT ZEYBEK**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Faruk Çelik tarafından hazırlanan Tip 2 Diabette TIMP1 ve TIMP2 Genetik Varyasyonlarının Etkisi ve Serum Düzeylerinin İncelenmesi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

04 / 07 / 2012

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

1.PROF.DR İLHAN YAYLIM İ.Ü DETAE MOLEKÜLER TIP ABD

2.PROF.DR BEDİA AĞAÇHAN İ.Ü DETAE MOLEKÜLER TIP ABD

3.DOÇ.DR Ş.ÜMİT ZEYBEK (DANIŞMAN) İ.Ü DETAE MOLEKÜLER TIP ABD

4.DOÇ.DR H.ARZU ERGEN İ.Ü DETAE MOLEKÜLER TIP ABD

5.YRD.DOÇ.DR AYDIN ÇEVİK İ.Ü DETAE DEN.HAY.BİO. VE BİOM. UYG. TEK. ABD

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.

Faruk Çelik

İTHAF

Babam Enver ÇELİK'e,
Annem Fatime ÇELİK'e,
Hayat arkadaşım& Eşim Hafsa ÇELİK'e
ve Biricik kızım Amine ÇELİK'e
ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylın'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, tezimin tamamlanmasında desteklerini sunan saygıdeğer hocam Doç. Dr. H. Arzu Ergen'e ve Araş.Gör. Msc Bahar Toptaş'a,

Tez çalışmam süresince yardımları ve destekleri için Prof. Dr. Bedia Ağaçhan, Prof. Dr. Oğuz Öztürk, Doç. Dr. Hülya Yılmaz-Aydoğan, Msc. Canan Cacina, Msc. Özlem Timirci-Kahraman, Msc. Özlem Küçükhüseyin olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tezimin yapımı ve yazımı sırasındaki yardımları ve destekleri için çok değerli arkadaşlarım, özellikle her türlü desteğini sunan Msc. Leman Melis Yurdum'a ve Mol.Bio Muhammed Oğuz Gökçe'ye, laboratuvar çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Bio. Saime Turan 'a ve Bio. Melike Gezen'e.

Hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen değerli aileme ve özellikle yüksek lisans dönemimde ailemize katılan kızıma sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 9865

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. DIABETES MELLİTUS (DM)	3
2.1.1. Diyabetin Tanısı	3
2.2. DiYABETİN SINIFLANDIRILMASI	4
2.2.1. Tip 1 Diyabet	4
2.2.1.1. Tip 1 Diyabetteki Metabolik Değişiklikler	4
2.2.2. Tip 2 Diyabet	5
2.2.2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus'un Patogenezi	6
2.3. Diyabete Neden Olan Risk Etmenleri.....	7
2.3.1. Beslenme	7
2.3.2. Obezite	7
2.3.3. Alkol ve Sigara Tüketimi.....	8
2.3.4. Cinsiyet	8
2.3.5. Vücut Yağ Dağılımı	8
2.3.6. Genetik Belirteçler ve Kalıtım	8
2.3.7. İnsülin Direnci.....	8
2.3.8. Cinsiyet Hormonları.....	9
2.4. Diyabette İnflamatuvar Mekanizma	9
2.5. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR (MMPs).....	10
2.6 Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (TIMPs).....	11

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI	13
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	13
TIMP-2_303C>T polimorfizminin gözlemlendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nukleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir:	14
3.3. KULLANILAN GEREÇLER.....	14
3.4. ÇÖZELTİLER	14
3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	14
3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer).....	14
3.4.1.2. 0,5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH:8.0)	14
3.4.1.3. 4 Molar Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi.....	15
3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL).....	15
3.4.1.5. 1 Molar Tris Tamponu (Stok)	15
3.4.1.6. 9,5 Molar Amonyum Asetat Çözeltisi	15
3.4.1.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi	15
3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml).....	15
3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler.....	15
3.4.2.1. Etidyum Bromür (10 mg/ml)	15
3.4.2.2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x).....	16
3.4.2.3. 50x Tris - Asetik asit - Etilen Diamin Tetra Asetat (TAE) Tamponu.....	16
3.4.2.4. 5X Tris-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TBE) Tamponu	16
3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	16
3.5.1. PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU.....	16
3.5.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini	17
3.6. PZR Yöntemi İle TIMP-1_372, TIMP-2_418 ve TIMP-2_303 Gen Bölgelerinin Çoğaltılması ve RFLP Yöntemiyle Polimorfizm Analizi	17
3.6.1. PZR'da Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
3.6.2. TIMP-1_372T>C, TIMP-2_418G>C ve TIMP-2_303C>T Gen Bölgelerinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması.....	18
3.6.2.1. %3'lik Agaroz Jel Hazırlanması	20
3.6.2.2. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel'e Yüklenmesi	20
3.6.2.3. PZR Ürünlerinin Kontrolü	21
3.6.2.4. TIMP-1_372T>C geninden 175 bp, TIMP-2_418G>C geninden 304 bp ve TIMP-2_303C>T geninden 119 bp'lik Gen Polimorfizminin Belirlenmesi İçin PZR Ürünlerinde Restriksiyon Enzim Analizi	21

3.6.2.5. Restriksiyon Enzim Kesimleri	22
3.6.2.6. BssSI, BsoBI ve TspRI Enzimleri Kesim Ürünlerinin Kontrolü	23
3.6.2.7. BssSI, BsoBI ve TspRI Enzimleri Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi	23
BssSI Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi	23
3.7. SERUM TIMP-1 VE TIMP-2 DÜZEYLERİNİN ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ	25
3.7.1. ELISA Yönteminin Genel Prensipleri	25
3.7.1.1. Serumda Human TIMP-1 Düzey Tayin Protokolü	26
3.7.1.2. Serumda Human TIMP-2 Düzey Tayin Protokolü	26
3.7.2. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılacak İstatistiksel Yöntemler	27
4. BULGULAR.....	28
5.TARTIŞMA	40
KAYNAKLAR	44
ETİK KURUL KARARI	49
ÖZGEÇMİŞ	51

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: TIMP-1_372T>C gen bölgesi için kullanılan PZR Protokolü	18
Tablo 2 : TIMP-1_372T>C gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon sıcaklıkları...19	
Tablo 3 : TIMP-2_418G>C gen bölgesi için kullanılan PZR Protokolü.....	19
Tablo 4 : TIMP-2_418G>C gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon sıcaklıkları	19
Tablo 5 : TIMP-2_303C>T gen bölgesi için kullanılan PZR Protokolü.....	19
Tablo 6 : TIMP-2_303C>T gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon sıcaklıkları.....	20
Tablo 7 : BssSI enzimi için kesim protokolü.....	22
Tablo 8 : BsoBI enzimi için kesim protokolü.....	22
Tablo 9 : TspRI enzimi için kesim protokolü.....	22
Tablo 10 : Çalışma gruplarına ait demografik bilgiler	28
Tablo 11 : Çalışma gruplarında TIMP-1 T372C genotip ve allel dağılımları.....	29
Tablo 12:Çalışma gruplarında TIMP-1 T372C genotip dağılımına göre demografik bilgiler.....	30
Tablo 13 : Çalışma gruplarında TIMP-2 G418C genotip ve allel dağılımları.....	32
Tablo 14 :Çalışma gruplarında TIMP-2 G418C genotip dağılımına göre demografik bilgiler.....	33
Tablo 15: Çalışma gruplarında TIMP-2 G303A genotip ve allel dağılımları.....	34
Tablo 16:Çalışma gruplarında TIMP-2 G303A genotip dağılımına göre demografik bilgiler.....	35
Tablo 17: Çalışma gruplarında serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri.....	37
Tablo 18: Hasta grubunda genotip dağılımlarına göre serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri (ng/ml).....	37
Tablo 19: Kontrol grubunda genotip dağılımlarına göre serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri (ng/ml).....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Hiperglisemi'ye sebep olan faktörler.....	5
Şekil 2 : Tip 2 patogenezinde epigenetik mekanizma.	7
Şekil 3: Kalıtım ve Beslenmenin diyabetle ilişkisi.....	10
Şekil 4 : TIMP-1 ve TIMP-2'nin yapısı.....	13
Şekil 5 : TIMP-1_372T>C polimorfizmi kesim görüntüsü	25
Şekil 6 : TIMP-2_418G>C polimorfizmi kesim görüntüsü.....	26
Şekil 7 : TIMP-2_30G>A polimorfizmi kesim görüntüsü.....	27

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- MMP : Matriks metalloproteinaz
- ESM : Ekstrasellüler Matriks
- IL-1 : İnterlökin-1
- IL-6: İnterlökin-6
- TIMP: Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü
- IDDM: İnsüline bağımlı diabetes mellitus
- NIDDM: insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus
- GLUT-4: Glükoz taşıyıcısı
- TNF : Tümör Nekrozis Faktör
- PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- RFLP : Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi

ÖZET

Çelik F. Tip 2 Diabette TIMP1 ve TIMP2 Genetik Varyasyonlarının Etkisi ve Serum Düzeylerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans. İstanbul. 2012

Dünyada sık görülen kompleks hastalıklardan biri olan Diabetes mellitus, insülinin yokluğu ve eksikliğine bağlı olarak gelişen, açlık glikozunun artışı ve buna eşlik eden lipid ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ile karakterizedir. Genetik ve çevresel faktörler diyabet oluşumunda oldukça önem taşır.

Tip 2 diyabet, erişkin toplumda en yaygın görülen metabolizma hastalığı olmakla birlikte, lipid, protein ve karbonhidrat metabolizma bozuklukları gibi geniş bir komplikasyon yelpazesine sahiptir. Tip 2 diyabette insülin etkisi veya sekresyonu azalırken, insülin etkisindeki bozukluk nedeniyle insülin direnci gelişmektedir. Hastalıktan bir dizi aday genin sorumlu olduğu bildirilmektedir.

Diyabet oluşumu ve gelişmesinde sorumlu olan faktörlerin bazılarının ortaya çıkmasında etkin rolleri olan, multigenik bir peptidaz özelliğine sahip ekstraselüler matriks tarafından sentez, parçalanma ve yeniden hücre regülasyonu, dönüşümünde aracı olarak kullanılan moleküller MMP'lerdir . Bunun yanında MMP'leri inhibe eden bazı faktörler tanımlanmıştır. Bunlardan biri spesifik MMP doku inhibitörleridir (TIMP). TIMP'ler MMP'lerin aktivitesini hem proenzim aktivasyonu aşamasında hem de substrat parçalanması sırasında regüle eder. Etkin bir mekanizmaya sahip olan TIMP'lerde gerçekleşebilecek mutasyonların sonuçları yapılan bazı çalışmalarla bilim dünyasına sunulmuştur.

Çalışmamızda TIMP 1 ve TIMP 2 gen polimorfizmlerinin ve serum düzeylerinin tespit edilmesi ve TIP 2 diyabet hastalığına olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Elde edilecek veriler doğrultusunda, diyabet hastalığının tanısına ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacağımızı düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler : Diabetes Mellitus, TIMP-1, TIMP-2, Polimorfizm, ELİSA

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 9865

ABSTRACT

Çelik F. (2011). Investigation of gene polymorphisms and serum levels of TIMP-1 and TIMP-2 in patient with Type 2 Diabetes Mellitus. İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine. İstanbul 2012.

Diabetes mellitus is one of common complex diseases in the world, and it is characterized by the lack of insulin and developments due to the absence, fasting glucose increase by the accompanying of lipid and protein metabolism disturbances. Genetical and environmental factors are very important in the formation of diabetes.

Type 2 diabetes is the most common metabolic disease in adult population, although the lipid, protein and carbohydrate metabolism disorders have a wide range of complications. While the insulin effectiveness and secretion decreased on type 2 diabetes, on the other hand insulin resistance is developed caused by the disorders on the insulin effect.

MMP's that has an effective role in the emerge of some of the factors that are responsible for development of diabetes, and they are used in fragmentation and re-regulation of the cell, and has multigenic peptidase means and it is synthesized by the ESM. By the way there are some factors that inhibit MMP's. One of them is specialized MMP tissue inhibitor (TIMP's). TIMP's are regulating MMP's in proenzyme activation level and during fragmentation of substrate. Some of the study results have presented the mutations in TIMP's that have effective mechanism, to scientific world.

In our study we aimed to detect serum levels and gene polymorphisms of TIMP-1 and TIMP-2, and their effects on type 2 diabetes. According to the data obtained by the study we believe that we can contribute new diagnosis and new treatments of diabetes disease.

Key Words: Diabetes Mellitus, TIMP-1, TIMP-2, Polymorphism and ELISA

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 9865

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus, bütün dünyada sık görülen kompleks hastalıklardan biridir. İnsülinin yokluğu, yetersizliği ve eksikliğine bağlı olarak gelişen, yüksek açlık glikozu ve buna eşlik eden lipid ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Bu hastalığın ortaya çıkması ve yayılmasında hem genetik hem de çevresel faktörler oldukça önem taşır.

Tip 2 diyabet, erişkin toplumda en yaygın görülen metabolizma hastalığı olmakla birlikte gelişmiş ülkelerde toplumun % 5-10'nun bu hastalığı taşıdığı bildirilmektedir(1). Diyabet vakalarının yaklaşık % 80-90'nı oluşturan ve tipik olarak ileri yaşlarda ortaya çıkan bir hastalık şeklinde bilinen tip 2 diyabet (2), son dönemlerde genç erişkinlerde ve çocukluk çağında da görülmeye başlanmıştır (3). Tip 2 diyabetli olguların yaklaşık % 85'inin kilolu veya obez olduğu belirtilmektedir. Görme kaybı, böbrek yetersizliği ve ayak amputasyonu nedenlerinin başında diyabet gelmektedir. Diyabetli olmayan yaşlılarına kıyasla, tip 2 diyabetlilerde kardiyovasküler bozukluk riski 2-4 kat daha yüksektir. Ayrıca tip 2 diyabetlilerin %75'inde mortalite nedeni koroner arter hastalıklarından kaynaklanmaktadır (4,5). Günümüzde dünya üzerinde 200 milyon diyabet hastası bulunmakta olup, 2025 yılında 300 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir (6).

Tip 2 diyabet, lipid, protein ve karbonhidrat metabolizma bozuklukları gibi geniş bir komplikasyon yelpazesine sahiptir (7). 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 (7).

Heterojen bir hastalık olan tip 2 diyabette iki metabolik defekt söz konusudur. İnsülin etkisi veya sekresyonu azalmıştır. Diğer taraftan insülin etkisindeki bozukluk nedeniyle insülin direnci gelişmiştir. İnsülin sekresyonu da insülin direncini kompanse etmekten uzaktır(8). Hastalığın oldukça karmaşık bir genetik temeli olduğu bilinmekte ve bir dizi aday gen sorumlu tutulmaktadır. Yaşam tarzından kaynaklanan düzensiz ve dengesiz beslenme ile birlikte, fiziksel aktivite azlığı gibi çevresel faktörler hastalığın ortaya çıkışını hızlandırmaktadır. Bir çok olguda hastalık tanı konulmadan yıllarca önce başlamıştır. Diyabet riskini artıran faktörler modifiye edilebilir ve modifiye edilemez olmak üzere iki grupta toplanabilir. Modifiye edilebilir faktörler: obezite, fiziksel

aktivite azlığı, alkolü bırakmış olmak, sigara kullanmak ve posa oranı düşük, doymuş yağlardan zengin diyet ile beslenme tarzı tip 2 diyabet riskini artıran ve değiştirilmesi mümkün olan faktörlerdir. Modifiye edilemez faktörler: yaşlanma, cins, genetik yatkınlık, ailede diyabet öyküsü, hipertansiyon, hiperlipidemi ve düşük doğum tartısı gibi etkenler ise diyabet riskini artıran ve değiştirilmesi mümkün olmayan faktörlerdir(5). Bu gibi faktörlerin bazılarının ortaya çıkmasında etkin rolleri olan, multigenik bir peptidaz özelliğine sahip ekstra selüler matrik tarafından sentez, parçalanma ve yeniden hücre regülasyonu, dönüşümünde aracı olarak kullanılan, proenzim olarak fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller gibi çeşitli bağ dokusu hücrelerinden salgılanan, yara iyileşmesinde, kemiğin yeniden yapılanması, uterus ve meme dokusu fizyolojik fonksiyonlarında, ovulasyon, embriyogenezis, embriyo implantasyonu, laktasyon gibi fizyolojik süreçlerde rol alan, ayrıca tümör hücresinin invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerde yer alan primer yapısında birkaç farklı bölge içeren, 80-90 aminoasit içeren aminoterminal peptid olan matriks metaloproteinaz (MMP)'ların önemi çok büyüktür(9,10,11,12,13). MMP'leri inhibe eden bazı faktörler de tanımlanmıştır. Bunlardan biri spesifik MMP doku inhibitörleridir(TIMP). İn vivo koşullarda MMP aktivasyonunun regülasyonunda TIMP'ler önemli rol oynarlar(14,15,16). TIMP'lerin aktivitesi için bütünlüğü bozulmamış yapı gereklidir. TIMP'lerin aktivitesi EGF, TGF-beta, IL-1 beta, IL-6, retinoik asit, onkostatin, forbol esterleri, sitokinler, temel fibroblast büyüme faktörü gibi çeşitli ajanlarla arttırılabilir. Konkonovalin A ve deksametazon tedavisi sonrasında ise TIMP'lerin aktivitesi inhibe olur. TIMP'ler MMP'lerin aktivitesini hem proenzim aktivasyonu aşamasında hem de substrat parçalanması sırasında regüle eder(17). Böylesine etkin bir mekanizmaya sahip olan TIMP'lerde oluşabilecek herhangi bir mutasyonun sonuçları yapılan bazı çalışmalarda bilim dünyasına sunulmuştur(18,19). Çalışmamızda TIMP 1 ve TIMP 2 gen poliforfizimlerinin ve serum düzeylerinin tespit edilmesi ve TIP 2 diyabet hastalığına olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Elde edilecek veriler doğrultusunda, diyabet hastalığının tanısına ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacağımızı düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DIABETES MELLITUS (DM)

Diyabet, insülin sekresyonu veya insülin işlevinde oluşabilecek herhangi bir sorun sonucu ortaya çıkan hiperglisemi karakterinde bir metabolik bozukluktur. Yetersiz insülin salınımı nedeniyle oluşan metabolik değişiklikler, glukagonun artması ile daha da şiddetlenir. Diyabette anabolizma ve katabolizma arası hassas denge, insülinin uygun olmadığı durumlarda anabolik durumun bozulması ile sonuçlanmaktadır. Bunun sonucunda homeostaz katabolik yolağa yönlendirilir ve karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarının kronik olarak bozulması sonucunda kan damarları, böbrekler, gözler ve sinirleri etkileyen uzun süreli komplikasyonlar gelişir (20).

2.1.1. Diyabetin Tanısı

Karaciğerde glukoz üretimi, periferik dokular tarafından glukozun alınması ve kullanılması (başlıca iskelet kası), insülin ve glukagonlar gibi karşıt-düzenleyici hormonların etkileri gibi, normal glukoz homeostazı birbiri ile ilişkili üç süreç tarafından sıkı biçimde düzenlenmektedir. Kan glukoz değerleri bu kontrol yolları ile normalde çok dar bir aralıkta, çoğunlukla 70-110 mg/dl arasında tutulur (20).

Diyabetin klinik ve etiyolojik olarak ortaya çıkış evreleri şöyledir (21).

1. Genetik yatkınlık
2. İmmünolojik bozukluklar (insülin salınımı normal olup, otoantikörler ortaya çıkar)
3. İnsülin salınımında azalma
4. OGTT yanıtları bozulur ancak diyabet tanısı konacak düzeyde değildir.
5. Klinik olarak diyabet semptomları belirir, glukagona C-peptid yanıtı vardır.
6. Total diyabet evresi

Aşağıdaki üç kriterden herhangi biriyle Diabetes Mellitus'un tanısı konulabilmektedir. (8-22):

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

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

2.2. DİYABETİN SINIFLANDIRILMASI

Diabetes Mellitus hastaları iki gruba ayrılır: İnsüline-bağımlı diabetes mellitus (Tip 1-İDDM) ve İnsülin-den-bağımsız diabetes mellitus (Tip 2-NIDDM) (20).

2.2.1. Tip 1 Diyabet

Bu grup diyabetik hastalar, diyabetlilerin %10-20'sini oluşturmaktadır ve genellikle 25 yaş öncesi açığa çıkar ve viral/otoimmün atağı sonucu β -hücre ölümü gerçekleşmektedir. Tip 1 diyabet, insülin üreten ve salgılayan β -hücrelerinin insülin üretimi açısından yetersizliği ile karakterizedir. Bu hastalarda genelde insülini yerine koyma uygulanmaktadır ve bu durum insüline bağımlı diabetes mellitus (Insulin Dependent Diabetes Mellitus-İDDM) olarak isimlendirilir.

2.2.1.1. Tip 1 Diyabetteki Metabolik Değişiklikler

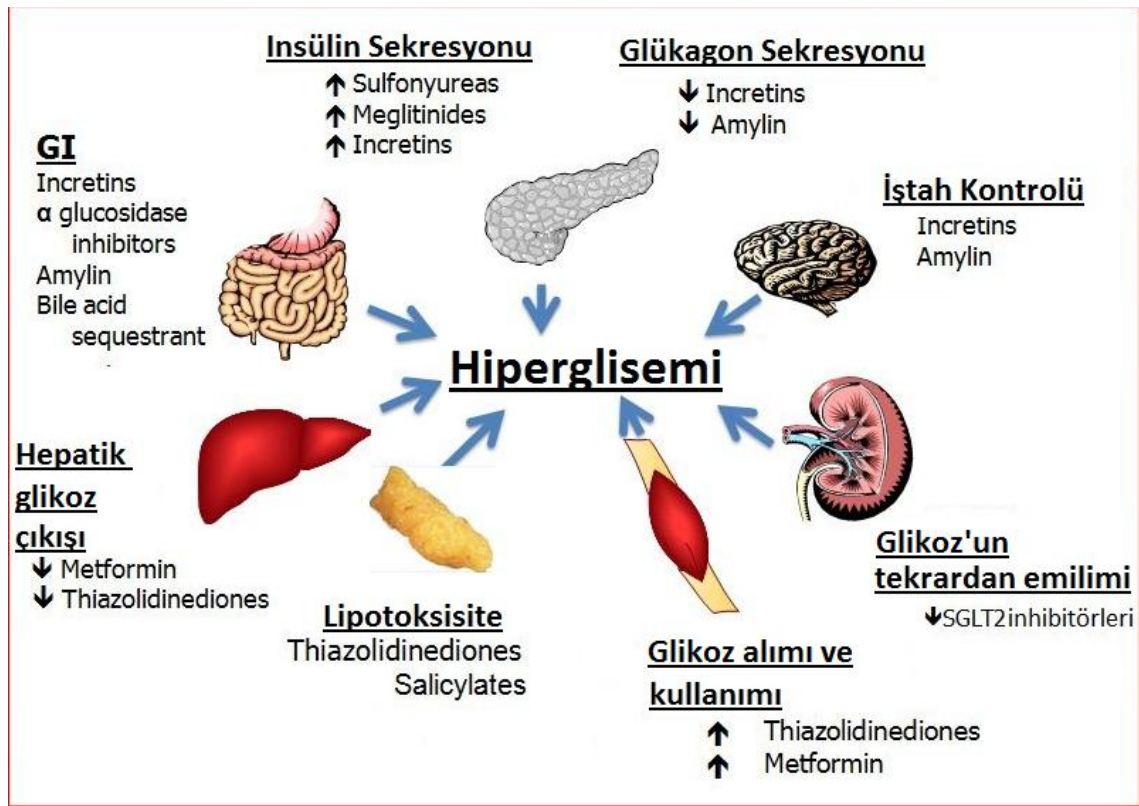
Yukarıda bahsedilen anabolizma ve katabolizma arasında bulunan hassas dengenin bozulması sonucu hemostazın katabolik ayağa yölendiğini ve belli metabolizmalarda değişikliğe sebep olduğunu bildirmiştik. Bu metabolik değişikliklerin olduğu metabolizmalar aşağıdaki gibidir:

a: Diyabette yağ asidi metabolizması: Sağlıklı kişilerde tokluk durumunda lipoliz sonrası yağ dokudan salınan yağ asitleri gliserol-3-fosfat ile tekrar esterleşerek triaçilgliserollerini yeniden oluşturan döngüye girmektedirler. Diyabette ise insülin eksikliğinden dolayı yağ hücrelerine giremeyen glikoz ve glikozdan oluşan gliserol-3-fosfatın da yetersiz olmasına neden olur ve söz konusu döngü kesintiye uğramaktadır. Sonuç olarak yağ asitlerinin esterleşmesi azalır ve yağ asitleri kana salınır. Normal şartlarda yağ hücreleri özellikle kas hücreleri tarafından oksidize edilmiş halde yakıt olarak kullanılmaktadırlar. Diyabet durumunda ise kanda bulunan fazla yağ asitleri karaciğere taşınıp asetil KoA oluşturacak olan β -oksidasyon döngüsüne dahil olmaktadır. Diyabette asetil KoA ile birleşen yağ asitleri keton cisimlerini oluşturmakta ve bunun sonucunda ketoasidoz ortaya çıkmaktadır.

b: Diyabette gliserol metabolizması: yağ dokudan salınan gliserol karaciğerde fosforillenerek gliserol 3-fosfat oluşturup kana salınır ardından glikoza metabolize edilir ve hiperglisemi oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

c: Diyabette protein ve aminoasit metabolizması: Sağlıklı kişilerde insülin kandan kas hücrelerine aminoasit alınımını arttırmaktadır. Diyabette ise bu durum tam tersine dönmektedir. Kas proteinleri yıkımı yapılarak aminoasitlere dönüştürülmektedir.

d: Diyabette glikojen ve glikoz metabolizması: Sağlıklı bireylerde insülin adiposit ve kas hücrelerine glikoz girişini sağlamaktadır. Bunu da glikoz taşıyıcıları plazma membranına GLUT-4 yerleştirerek yapmaktadır. Glikoz eksikliğinde insülin glikojen sentezini uyararak glikokinaz aktivitesini arttırmaktadır. Diyabette ise insülin yokluğunda glikojen sentezi sekteye uğramakta ve glikojenoliz sonucunda glikoz karaciğerden kana salınıp hiperglisemiye sebep olmaktadır. (23)



Şekil 1: Hiperglisemi'ye sebep olan faktörler

2.2.2. Tip 2 Diyabet

Diyabet hastalığının en sık görülen şekli Tip 2 diyabettir (20). Diyabetlilerin yaklaşık %90'ı tip 2'dir. Tip 2 diyabette genellikle insülin salınım bozukluğu ve direnç biraradadır. Genel biyokimyasal sebep olarak da insülinin etkisizliği olarak kabul edilmektedir. Karaciğer, kas ve adipoz dokuda insülin duyarlılığının azalması ve β -hücre fonksiyonunun bozulması ile karakterizedir. Genetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı kompleks etkileşime dayanan bir patogeneze sahiptir. Bu durumdaki kişilerde ya uygunsuz insülin salınımı ya da insülin anormal yapıda bulunup sadece kısmi fonksiyon

göstermektedir veya insülinin hücre içi sinyalinde kusur bulunmaktadır. Bir başka etmen olarak da glikoz hemostazında önemi bulunan bir enzimin gen ekspresyonu veya fosforilasyon yoluyla düzenlenmesinin bozulması söylenebilmektedir.

2.2.2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus'un Patogenezi

Diyabette daha yaygın olan tip 2 diabetes mellitus'ta genetik yatkınlık büyük bir rol oynamaktadır. Kalıtsal ve çevresel faktörler tarafından düzenlenen, çoklu genetik bozuklukların bir araya gelmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Tip 2'nin otoimmün hastalık olduğu düşünülmemektedir. Tip 2'nin karakteristiğini oluşturan iki metabolik bozukluk(20):

- insülin direnci
- β -hücre bozukluğudur

1. İnsülin Direnci

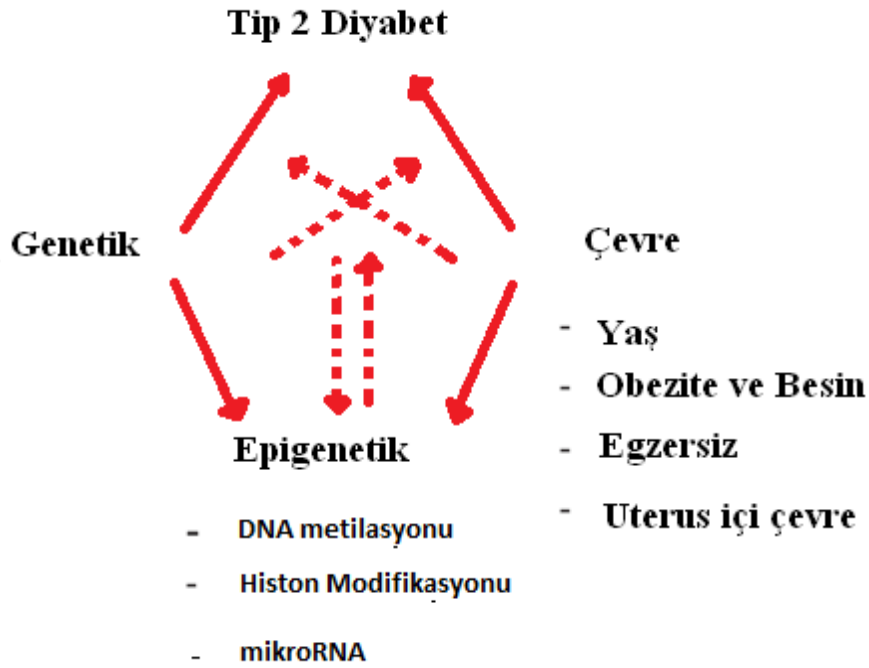
Periferik dokuların insüline yanıt verme yeteneğinin azalması sonucu insülin direnci oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda insülin reseptör fosforilasyonunda tirozin kinaz aktivitesinde azalma, insülin reseptör sayısında azalma ve insülin sinyal yolağında aktif araçların düzeyinde azalma gibi kantitatif ve kalitatif anomaliler olduğunu göstermiştir. İnsülin reseptörlerindeki mutasyonların Tip 2 diyabetli hastaların çok küçük bir bölümünden sorumlu olması, insülin direnci ile ilgili genetik faktörlerin büyük oranda sır olarak kalmasına neden olmuştur.

Diyabetle çevre faktörleri arasında en güçlü ilişki obeziteyle oluşmaktadır ve insülin direnci altında yatan esas nedendir. Vücut kitle indeksinin yükselmesi ile diyabet riski 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 almaktadır.(20).

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) (20).



Şekil 2: Tip 2 patogenezinde epigenetik mekanizma .

2.3. Diyabete Neden Olan Risk Etmenleri

2.3.1. 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 ve obezite ile birlikte diyabet riskini arttırmaktadır (22).

2.3.2. Obezite

Obezite fazla kiloların özellikle vücudun üst kısmında toplandığı abdominal obezite (santral obezite) tip 2 diyabet riski ile çok yakından ilişkilidir (22). 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 (20).

2.3.3. Alkol ve Sigara Tüketimi

Alkol ve sigara tüketimi ile tip 2 diyabet arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Fakat beden kitle indeksi ve fiziki aktivite düzenlendikten sonra bu parametreler ile istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır.

2.3.4. Cinsiyet

Gelişim sürecindeki toplumlarda hastalık kadınlarda daha sık görüldüğü halde gelişmiş toplumların çoğunda cinsiyet farkı bildirilmemiştir. Buna karşın İskandinav ülkelerinde erkeklerde prevalans daha yüksektir.

2.3.5. Vücut Yağ Dağılımı

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

2.3.6. Genetik Belirteçler ve Kalıtım

Bazı etnik gruplarda tip 2 diyabetin bazı HLA grupları ile ilişkili olabileceği bildirilmiş olup bazı ailevi özel diyabet formlarında da spesifik gen mutasyonları gösterilmiştir. 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 riskte yükselmektedir.

2.3.7. 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. insülin direnci gelişen ortamda, 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. Hiperglisemiye kompanse etmek için beta hücresinden fazla insülin salınımı gerçekleşir. Fakat beta hücresi de fonksiyonlarını kaybetmeye başlayınca, insülin salınım eksikliği sonucu diyabet gelişir (24).

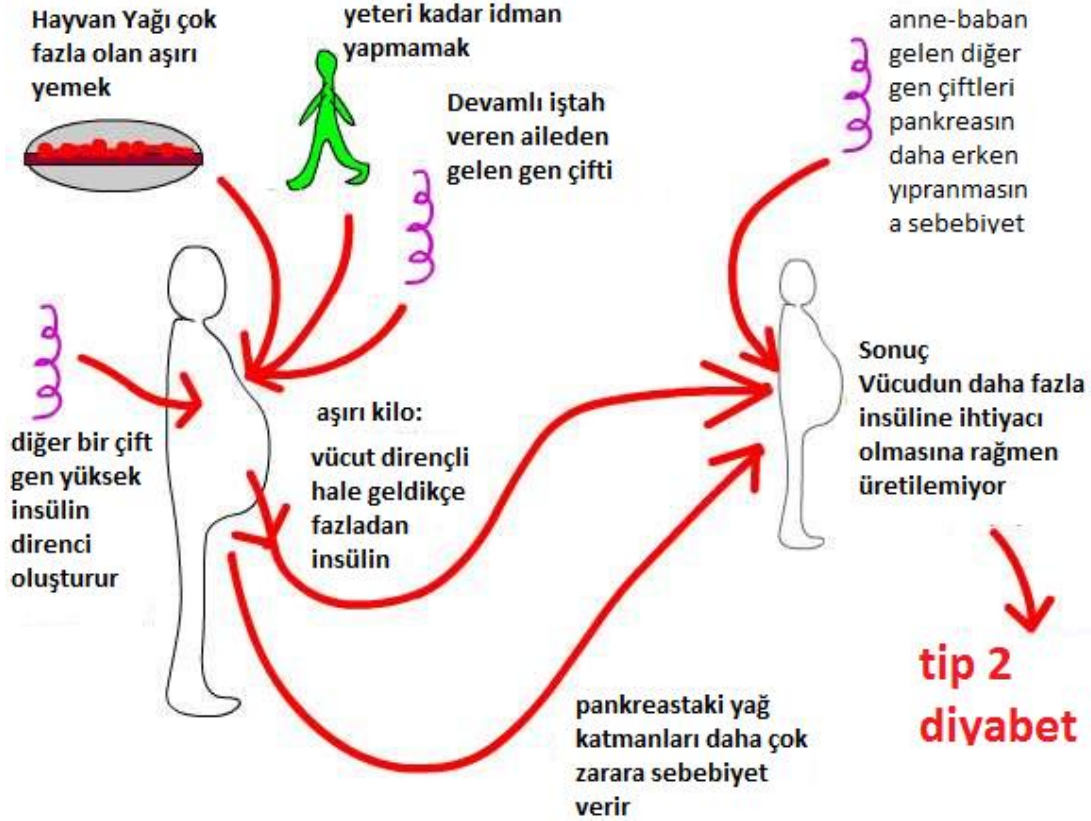
2.3.8. Cinsiyet Hormonları

Cinsiyet hormonları bağlayıcı globulin (SHBG) düzey 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 inflammatuar yolların, nefropati gibi diyabet komplikasyonlarındaki rolü de giderek önem kazanmaktadır. Bugünkü bilgilerimize göre değişik inflammatuar komponentlerin mekanizması oldukça karışıktır. Diyabetik nefropatide bu inflammatuar reaksiyonlarda etkili başlıca elementlerden biri Nükleer Faktör $\kappa\beta$ (NfK β) dir. NfK β proinflammatuar sitokinler ve mekanik güçleri kapsayan birçok stimulus tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür. Bunu takiben bu sinyaller inflammatuar yollarda ki diğer moleküllerin üretimi ve sentezini tetiklemektedir. Yani NfK β diyabetik nefropati patogeneğinde birçok kemokinin hücre adhezyon moleküllerinin, inflammatuar 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 (25).

Proinflammatuar sitokinlerin MMP ekspresyonunun düzenlenmesindeki rolünü gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinler MMP üretimini stimüle ederken, transforme edici büyüme faktörü, kortikoid hormonlar insülin benzeri büyüme faktörler MMP sentezini baskılamaktadır (26,27).). İn vivo koşullarda MMP aktivasyonunun regülasyonunda TIMP'ler önemli rol oynarlar. TIMP'lerin aktivitesi için bütünlüğü bozulmamış yapı gereklidir. TIMP'lerin aktivitesi EGF, TGF-beta, IL-1 beta, IL-6, retinoik asit, onkostatin, forbol esterleri, sitokinler, temel fibroblast büyüme faktörü gibi çeşitli ajanlarla artırılabilir(25,26,27).



Şekil 3: Kalıtım ve Beslenmenin diyabetle ilişkisi

2.5. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR (MMPs)

Hücrelerin yaşam ve fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için bulundukları ortamlarla etkileşimlerini hızlı şekilde düzenlemeleri önemlidir (28). Ekstrasellüler matriksin (ESM) şekillenmesi hücreler tarafından dışarıya salınan büyüme faktörleri, hücresel adezyon molekülleri ve proteinazlarla gerçekleştirilir (28,29).

Ekstrasellüler matriks bileşenlerini yıkabilme kapasitesine sahip iki proteolitik sistem mevcuttur (29,30):

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

Plazmin ekstrasellüler matriksin laminin ve fibronektin gibi bazı bileşenlerini direkt yıkabilirken elastin ve kollajen gibi temel bileşenler MMP'ler tarafından yıkıma uğratılmaktadır (31,32).

Ekstrasellüler Matriksi (ESM) degrade eden metalloenzimler, matriks metalloproteinazlar ya da matriksinler olarak adlandırılmalarına rağmen en yaygın olanı metalloproteinazlardır (MMPs) (33). 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 aktivasyona ihtiyaçları vardır (33).

MMP'ler birbiriyle örtüşen fakat farklı spektrumlara sahiptir (34). 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, mensturasyon ve endometriyal proliferasyon gibi üreme olaylarında MMP'ler anahtar rol oynamaktadırlar (35-37). MMP ve TIMP ekspresyonu arasındaki dengesizlik, tümör invazyonu, romatoid artrit, ateroskleroz, anevrizma, nefrit, doku ülserleri, fibrozis ve endometriozis gibi çeşitli medikal durumları kapsamaktadır (33-38).

2.6 Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (TIMPs)

TIMP ailesinin bilinen dört tane üyesi vardır. Öncelikli görevleri MMP'leri baskılamak ve aktivasyonlarını düzenlemektir. TIMP'ler hem proMMP'lerin hem de MMP'lerin çinko bağlanma bölgelerine bağlanarak aktif olanların aktivasyonunu düzenlerler aktif olmayanların ise aktivasyonunu engellerler. Moleküler büyüklükleri 21 ila 28 kDa arasında değişir ve primer yapıları arasında homolojileri oldukça düşüktür. Ama dördüncül yapıları arasında benzerlik vardır. TIMP'ler MMP'leri baskılamak için gerekli olan iki domaini N-terminal bölgelerinde taşırlar. C-terminal bölgelerinde ise TIMP'lerin spesifikliğini sağlayan domainler vardır. TIMP'ler 184-196 bazlık uzunlukta ve MMP inhibitörleri olarak görev alan aminoasitlerdir. N ve C terminali diye iki altdomene ayrılmaktadırlar. Her iki domen de üç adet disülfid bağlantıya sahiptir ve ayrıca N domen MMP inhibisyonunu aktive eden bağımsız bir birime sahiptir. TIMP'ler genellikle bütün MMP'leri aktive etmektedir. İstisna olarak kabul edilecek bir şey varsa o da TIMP-1'in MT1-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP ve MMP-19 için zayıf bir inhibitor olmasıdır. TIMP-3'lerin ADAMs (ADAM-10,-12 ve -17)'yi ve ADAMTSs (ADAMTS-1, -4 ve -5)'i inhibe ettiği gözlemlenmiştir. ADAM-10'u inhibe edenlerden birise de TIMP-1'dir. (39)

2.6.1 TIMP'lerin yapısı ve TIMP varyantlarının inhibisyon mekanizması

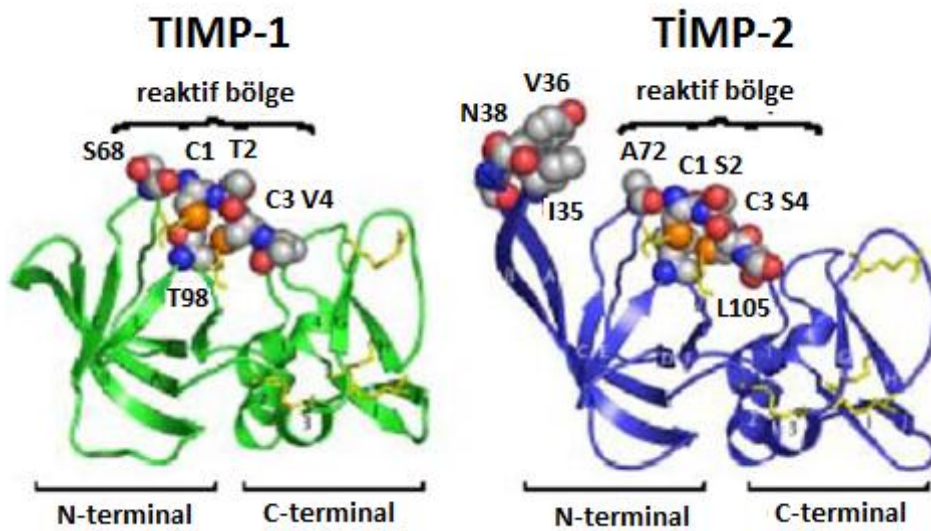
TIMP'lerin MMP'leri inhibisyon mekanizması, TIMP-MMP kompleksinin kristal yapısından yola çıkılarak araştırılmıştır(40). TIMP moleküllerinin genel şekli

“kama” biçimindedir ve N-terminal’inin kalıntıları da Cys1-Thr- Cys-Val4 ve MMP’lerin aktif bölgesinde yuvalanmış vaziyette bulunan Glu67-Ser-Val-Cys70 ile disülfid bağları kurmaktadır (TIMP-1 için özel). MMP-3 TIMP-1 katalitik bölge kompleksi oluşması durumunda bu bölgenin yaklaşık %75’i protein-protein ilişkisi ile meydana gelmektedir. Pozisyon 2 de oluşabilecek bir mutasyon (TIMP-1 de Thr) sonucu TIMP’lerin MMP’lere afinitesinde ve glisinde büyük bir düşüş söz konusu olmaktadır ve sonucunda MMP inhibisyonunda TIMP inaktivasyonu gerçekleşmektedir. İkili ya da üçlü mutasyonda ki bunlar Val4 ve Ser68 MMP-1, -2, -3’de etkileri değişmektedir. TIMP-1 ve TIMP-2 arasındaki en büyük fark TIMP-2’nin daha büyük AB sarmalının olmasıdır (şekil 4). TIMP-1’in MT1-MMP, MMP-19 ve ADAM17’ye karşı inhibisyonunun çok düşük olmasına rağmen yapılacak bazı girişimler sonucunda bunlara karşı aktivitesi artırılabilir. Bu da Thr98’in Leu ile değişmesi ile mümkün olmaktadır. ADAM17’yi inhibe edemeyen TIMP-2’yi TIMP-3’ün AB sarmalıyla (S2T/A70S/V71L) değiştirilirse aktive hale gelebilmektedir.(41)

TIMP-1_372 T>C X kromozomu (p11.3-p11.23) bölgesinde ekzon 5 phe124phe’de bulunmaktadır ve 6 exon içermektedir.

TIMP-2_418 G>C X kromozomu 17q25 bölgesinde bulunan promotörde bulunmaktadır (Şekil 6). Sp1 Bölgesinde 418 G>C mutasyonu gerçekleşmektedir.

TIMP-2_303 C>T X kromozomu 22q12.1-q13.2 bölgesi ekzom 3 ser101ser’de bulunmaktadır.



Şekil 4: TIMP-1 ve TIMP-2'nin yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi İç Hastalıklar Kliniği'nde takip edilen tip2 diyabet hastalığı tanısı konulmuş 75 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

İkinci grupta kontrol olarak kullanılmak üzere kendisinde ve 1. derece akrabalarında diyabet hastalığı olmayan 75 sağlıklı birey normal populasyondan 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 TIMP-1_372, TIMP-2_418 ve TIMP-2_303 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: TIMP1_372T>C polimorfizminin gözlemlendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir:

İleri primer: 5'- GCACATCACTACCTGCAGTC-3'
Geri primer: 5'- GAAACAAGCCCACGATTTAG-3'

TIMP-2_418G>C polimorfizminin gözlemlendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir:

İleri primer: 5' - CGTCTCTTGTTGGCTGGTCA-3'
 Geri primer: 5' - CCTTCAGCTCGACTCTGGAG-3'

TIMP-2_303C>T polimorfizminin gözlemlendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nukleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir:

İleri primer: 5' - TAGGAACAGCCCCACTTCTG-3'
 Geri primer: 5' - CCTCCTCGGCAGTGTGTG-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 aktararak 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 aktararak 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. Üzerlerine 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 süspanse 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 OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1,8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8'den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

3.6. PZR Yöntemi İle TIMP-1_372, TIMP-2_418 ve TIMP-2_303 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 $MgCl_2$), 2,5mM dNTP, 0,1 ünite Taq DNA polimeraz TIMP-1_372, TIMP-2_418 ve TIMP-2_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 $(NH_4)_2SO_4$ '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 1,5 µl eklendi.

3.6.2. TIMP-1_372T>C, TIMP-2_418G>C ve TIMP-2_303C>T Gen Bölgelerinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

TIMP-1_372T>C gen bölgesi optimize edilmiş PZR protokolü (Tablo 1) ve PZR şartları (Tablo 5) ile amplifiye edilmiştir.

TIMP-2_418G>C gen bölgesi optimize edilmiş PZR protokolü (Tablo 3) ve PZR şartları (Tablo 7) ile amplifiye edilmiştir.

TIMP-2_303C>T gen bölgesi optimize edilmiş PZR protokolü (Tablo 5) ve PZR şartları (Tablo 9) ile amplifiye edilmiştir.

Tablo 1 : TIMP-1_372T>C gen bölgesi için kullanılan PZR Protokolü

KİMYASALLAR	MİKTARLAR
SU	17,5 µl
dNTP	1,5 µl
MgFree Buffer	2,5 µl
MgCl	1,5 µl
Primer mix	1 µl
Taq	0,3 µl
DNA	1 µl

Tablo 2 : TIMP-1_372T>C gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon sıcaklıkları

95°C	5 dk	
94°C	45 sn	} 35 döngü
56°C	45 sn	
72°C	45 sn	
72°C	5 dk	

Tablo 3 : TIMP-2_418G>C gen bölgesi için kullanılan PZR Protokolü

KİMYASALLAR	MİKTARLAR
SU	17,5 µl
dNTP	1,5 µl
MgFree Buffer	2,5 µl
MgCl	1,5 µl
Primer mix	1 µl
Taq	0,3 µl
DNA	1 µl

Tablo 4: TIMP-2_418G>C gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon sıcaklıkları

95°C	5 dk	
94°C	45 sn	} 35 döngü
56°C	45 sn	
72°C	45 sn	
72°C	5 dk	

Tablo 5 : TIMP-2_303C>T gen bölgesi için kullanılan PZR Protokolü

KİMYASALLAR	MİKTARLAR
SU	17,5 µl
dNTP	1,5 µl
MgFree Buffer	2,5 µl

MgCl	1,5 µl
Primer mix	1 µl
Taq	0,3 µl
DNA	1 µl

Tablo 6 : TIMP-2_303C>T gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon sıcaklıkları

95°C	5 dk	
94°C	45 sn	
56°C	45 sn	35 döngü
72°C	45 sn	
72°C	5 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 çözündürüldü. Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde (50-55°C) çözünmüş 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 süktroz + %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

TIMP-1_372T>C, TIMP-2_418G>C ve TIMP-2_303C>T 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 TIMP-1_372T>C geninden 175 bp, TIMP-2_418G>C geninden 304 bp ve TIMP-2_303C>T geninden 119 bp'lık bir ürün elde edilmesi beklendi.

3.6.2.4. TIMP-1_372T>C geninden 175 bp, TIMP-2_418G>C geninden 304 bp ve TIMP-2_303C>T geninden 119 bp'lık Gen Polimorfizminin Belirlenmesi İçin PZR Ürünlerinde Restriksiyon Enzim Analizi

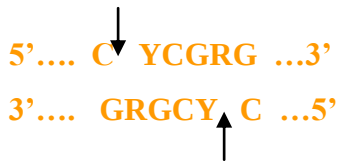
BssSI Kesim enzimi (10U/µl): BssSI enzimi 10X Buffer Tango ile birlikte TIMP-1_372T>C gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı.

BssSI enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



BsoBI Kesim enzimi (10U/µl): BsoBI enzim 10X NEBuffer 2 ile birlikte TIMP-2_418G>C gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı.

BsoBI enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



TspRI Kesim enzimi (10U/µl): TspRI enzim 10XBuffer Tango ile birlikte TIMP-2_303C>T gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı.

TspRI enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



3'.... **NNGTSACNN** ...5'

↑

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, BssSI, BsoBI ve TspRI enzimlerinin eklenmesi ile gerçekleştirildi. Bu kesim işlemlerinde kullanılan enzimlerden BssSI ve BsoBI için optimum sıcaklık 37°C’de 16 saat, TspRI enzimi için optimum sıcaklık 65°C’de 4 saat olmuştur. BssSI enzimi için kesim protokolü tablo 10’da, BsoBI enzimi için kesim protokolü Tablo 8’de ve TspRI enzimi için kesim protokolü Tablo 9’de verildiği gibidir.

Tablo 7 : BssSI enzimi için kesim protokolü

KİMYASALLAR	MİKTARLAR
Distile SU	4,5 µl
Buffer	0,5 µl
BssSI Enzim	0,25 µl
PZR Ürünü	10 µl

Tablo 8 : BsoBI enzimi için kesim protokolü

KİMYASALLAR	MİKTARLAR
Distile SU	4,5 µl
Buffer	0,5 µl
BsoBI Enzim	0,25 µl
PZR Ürünü	10 µl

Tablo 9: TspRI enzimi için kesim protokolü

KİMYASALLAR	MİKTARLAR
Distile SU	4,5 µl
Buffer	0,5 µl
TspRI Enzim	0,25 µl
PZR Ürünü	10 µl

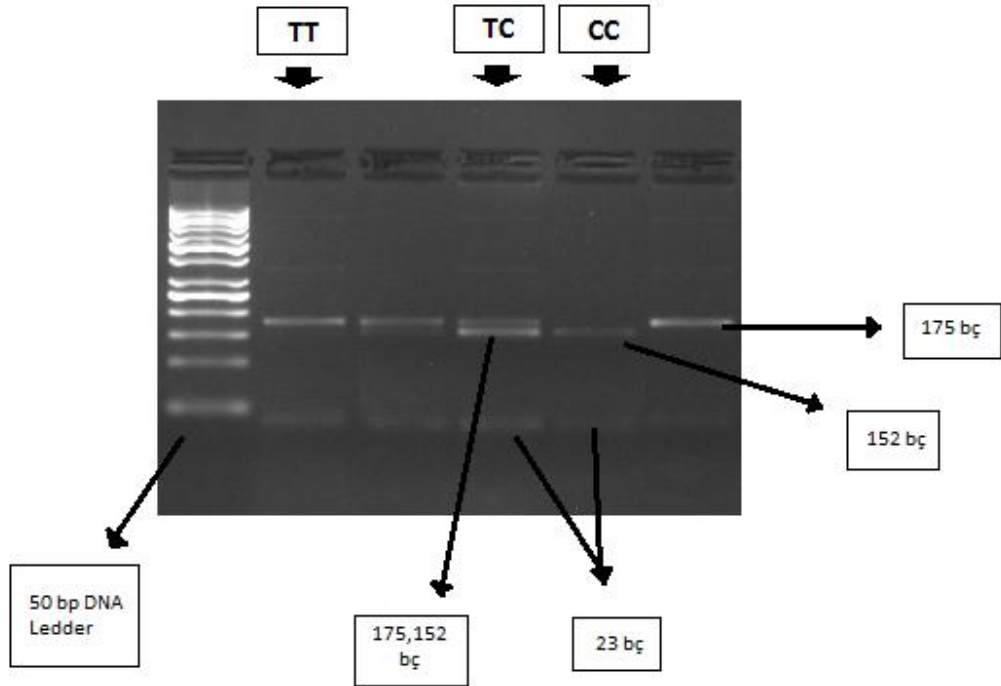
3.6.2.6. BssSI, BsoBI ve TspRI Enzimleri Kesim Ürünlerinin Kontrolü

%3'lük agaroz jel hazırlandı. BssSI kesim enzimi ile kesilen PZR ürününden 12 µl ve yükleme tamponundan 1 µl, BsoBI kesim enzimi ile kesilen PZR ürününden 12 µl ve yükleme tamponundan 1 µl ve TspRI kesim enzimi ile kesilen PZR ürününden 12 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. BssSI, BsoBI ve TspRI Enzimleri Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

BssSI Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

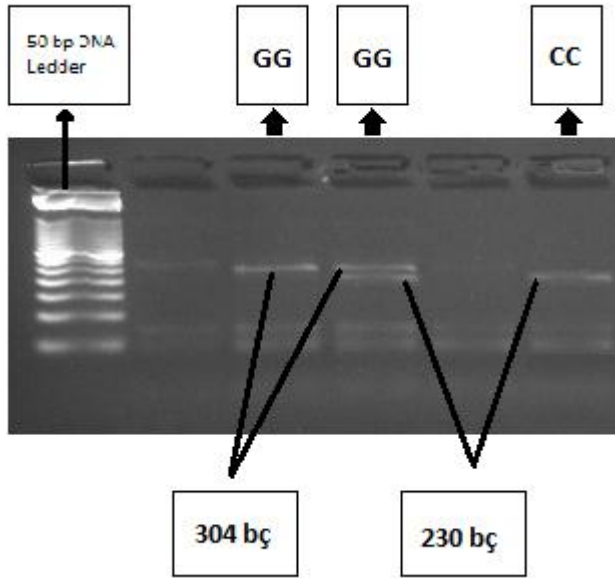
Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 175 bç olduğu saptandı. BssSI ile kesim sonrası; 175, 152 ve 23 bç büyüklüğünde bantlar görüldü. Kesim sonucu sadece 175 bç'lik bant görüldüğünde TT (polimorfizm yok), 152 ve 23 bç'lik bantlar görüldüğünde CC (homozigot mutant), 175, 152 ve 23 bç'lik bantlar görüldüğünde ise CT (heterozigot mutant) olarak değerlendirildi.



Şekil 5 : TIMP-1_372T>C polimorfizmi kesim görüntüsü

BsoBI Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

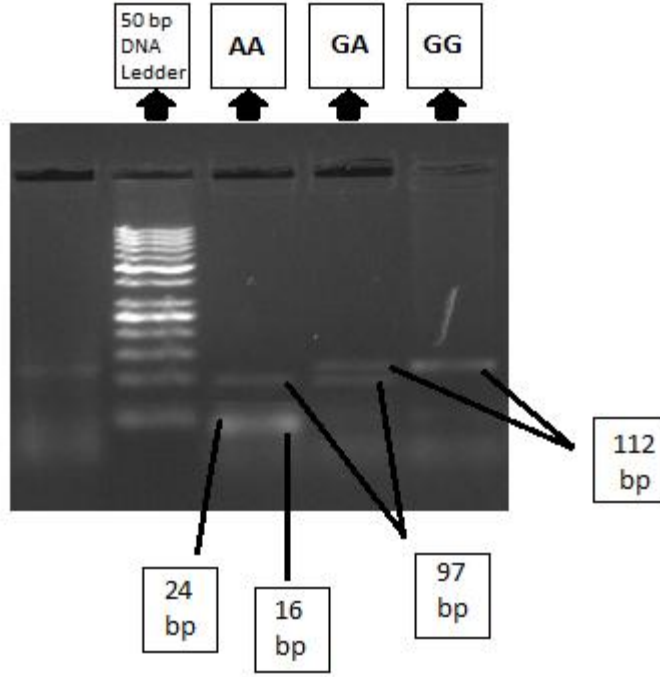
Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 304 bp olduğu saptandı. BsoBI ile kesim sonrası; 230, 51 ve 23 bp büyüklüğünde bantlar görüldü. Kesim sonucu sadece 304 bp'lik bant görüldüğünde AA (polimorfizm yok), 230, 51 ve 23 bp'lik bantlar görüldüğünde GG (homozigot mutant), 304, 230, 51 ve 23 bp'lik bantlar görüldüğünde ise AG (heterozigot mutant) olarak değerlendirildi.



Şekil 6 : TIMP-2_418G>C polimorfizmi kesim görüntüsü

TspRI Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 119 bp olduğu saptandı. BsoBI ile kesim sonrası; 97, 24 ve 16 bp büyüklüğünde bantlar görüldü. Kesim sonucu sadece 112 ve 16 bp'lik bant görüldüğünde GG (polimorfizm yok), 97, 24 ve 16 bp'lik bantlar görüldüğünde AA (homozigot mutant), 112, 97, 24, 16 bp'lik bantlar görüldüğünde ise GA (heterozigot mutant) olarak değerlendirildi.



Şekil 7 : TIMP-2_303G>A polimorfizm kesim görüntüsü

3.7. SERUM TIMP-1 VE TIMP-2 DÜZEYLERİNİN ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Hasta ve kontrol gruplarına ait kuru tüpe alınan kan örneklerinden santrifüjasyon 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 TIMP-1 Düzey Tayin Protokolü

Serum örneklerinde TIMP-1 seviyesi tayini Sandviç ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile Quantikine R&D System kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (42).

Kullanılan standart solüsyonlar 0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5 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 100 µl Assay Diluent RD1X eklenmiştir, oda sıcaklığında 500 rpm'de çalkalanmıştır.
- d) Her kuyucuk 400 µl Wash Buffer ile 3 defa yıkanmıştır.
- e) Her kuyucuğa 200 µl TIMP-1 konjugatı eklenip 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalanmıştır.
- f) Her kuyucuk 400 µl Wash Buffer ile 3 defa yıkanmıştır.
- g) Her kuyucuğa 200 µl Substrat solüsyonu eklenip oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübasyon yapılmıştır.
- h) Her kuyucuğa 50 µl Stop Solüsyonu eklenmiştir (kuyucukların rengi maviden sarıya dönmüştür).
- i) Referans olarak 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okuma yapılmıştır.

3.7.1.2. Serumda Human TIMP-2 Düzey Tayin Protokolü

Serum örneklerinde TIMP-2 seviyesi tayini Sandviç ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile Quantikine R&D System kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (43).

Kullanılan standart solüsyonlar 0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5 ng/ mL olacak şekilde hazırlanmıştır. İşlem aşamaları aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

- a) Her kuyucuğa 100 µl Assay Diluent RD1W eklenmiştir..
- b) Kuyucuklara 50 µl standart, kontrol ve örnek eklenip oda sıcaklığında 2 saat 500 rpm’de çalkalanmıştır.
- c) Her kuyucuk 400 µl Wash Buffer ile 4 defa yıkanmıştır.
- d) Her kuyucuğa 200 µl TIMP-2 konjugatı eklenip 2 saat oda sıcaklığında çalkalanmıştır.
- e) Her kuyucuk 400 µl Wash Buffer ile 4 defa yıkanmıştır.
- f) Her kuyucuğa 200 µl Substrat Solusyonu eklenip karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- g) Her kuyucuğa 50 µl Stop Solusyonu eklenmiştir(kuyucukların rengi maviden sarıya dönmüştür).
- h) 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 gruplarımıza ait demografik bilgiler tablo 10’da gösterilmiştir. Çalışma gruplarımızın yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Hasta grubunda kolesterol (p:0,035, %95Cl:0,92-25,23), LDL-K (p:0,001, %95Cl:12,38-34,05), ve açlık kan şekeri düzeyleri (p:0,001, %95Cl:0,90-12,23)kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olarak gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise hasta grubu ile karşılaştırıldığında HDL-K düzeyleri istatistiksel olarak artmış şekilde bulunmuştur (p:0,037, %95Cl:0,40-12,45).

Tablo 10: Çalışma gruplarına ait demografik bilgiler

	Grup	N	Ortalama±SD
Kolesterol	Diyabet	74	184,98±40,47*
	Kontrol	75	171,90±34,25
LDL-K	Diyabet	74	113,85±37,10**
	Kontrol	75	90,64±29,27
HDL-K	Diyabet	74	43,67±20,86
	Kontrol	75	50,10±15,95****
VLDL-K	Diyabet	74	33,08±13,86
	Kontrol	75	31,16±20,52
Trigliserid	Diyabet	74	167,36±69,12
	Kontrol	75	157,72±102,47
Açlık Kan Şekeri	Diyabet	77	166,25±35,25***
	Kontrol	75	91,23±10,98
CRP	Diyabet	46	11,10±12,14
	Kontrol	0	.
Homosistein	Diyabet	34	14,50±7,14
	Kontrol	0	.
AST	Diyabet	65	30,26±27,96
	Kontrol	0	.
ALT	Diyabet	65	25,24±12,89
	Kontrol	0	.
Ure	Diyabet	64	42,98±17,78
	Kontrol	0	.
BUN	Diyabet	65	20,28±9,27

	Kontrol	0	.
kreatinin	Diyabet	65	0,98±0,83
	Kontrol	0	.
HbA1c	Diyabet	74	9,15±9,47
	Kontrol	0	.
Yaş	Diyabet	77	64,44±9,80
	Kontrol	75	61,40±8,80

TIMP-1 T372C Genotip ve Allellerinin Dağılımı:

Çalışma gruplarımızda TIMP-1 T372C genotip ve allellerinin dağılımı tablo 11’de gösterilmiştir. Hasta grubunda doğal tip TT genotipi taşıma oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir (p:0,022, kıkare:5,23, OR:2,12, %95Cl:1,10-4,06). Kontrol grubunda ise CT genotipi (p:0,009, kıkare:6,78, OR:1,50, %95Cl:1,09-2,07) ve C alleli (p:0,022, kıkare:5,23, OR:1,41, %95Cl:1,04-1,92) taşıma sıklığı hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur.

Tablo 11: Çalışma gruplarında TIMP-1 T372C genotip ve allel dağılımları

Grup	TIMP-1 T372C				
	GENOTİPLER			ALLELLER	
	TT	TC	CC	T	C
Kontrol (n)	28	47**	0	103	47***
	(%)	37,3	62,7	0	68,6
Diyabet (n)	43*	32	2	118	36
	(%)	55,8	41,6	2,6	81,4

n:birey sayısı, *p:0,022; **p:0,009; ***p:0,022

TIMP-1 T372C Genotip Dağılımına Göre Demografik Bilgiler:

Tablo 12’de çalışma gruplarına ait demografik bilgilerin TIMP-1 T372C genotiplerine göre dağılımları gösterilmiştir. Buna göre hasta grubunda CC genotipine sahip bireylerde TC (p:0,007, %95Cl:7,40-45,91) ve TT genotipi (p:0,032, %95Cl: 1,90-40,06) taşıyanlara göre VLDL-K ve trigliserid düzeyleri artmış olarak gözlenmiştir. Kontrol grubunda istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır.

Tablo 12 :Çalışma gruplarında TIMP-1 T372C genotip dağılımına göre demografik bilgiler

TIMP 1 T372C		Hasta		Kontrol	
		N	Ortalama±SD	N	Ortalama±SD
Kolesterol	TT	42	191,33±39,73	28	171,10±39,98
	TC	30	173,73±39,90	47	172,38±30,80
	CC	2	220,50±26,16	0	
LDL-K	TT	42	112,33±36,20	28	92,85±32,85
	TC	30	114,92±39,87	47	89,31±27,20
	CC	2	129,70±0,42	0	
HDL-K	TT	42	46,73±26,19	28	48,50±13,80
	TC	30	39,99±9,57	47	51,06±17,18
	CC	2	34,50±2,12	0	
VLDL-K	TT	42	34,81±14,37	28	31,35±21,56
	TC	30	29,14±10,29	47	31,04±20,11
	CC	2	55,80±29,41	0	
Trigliserid	TT	42	174,64±72,04	28	158,75±107,46
	TC	30	149,66±51,81	47	157,10±100,55
	CC	2	280,00±145,66	0	
CRP	TT	29	11,93±14,28		
	TC	15	9,56±7,74	-	-

	CC	2	10,64±5,45		
homosistein	TT	20	14,54±6,81	-	-
	TC	12	13,30±7,61		
	CC	2	21,25±7,56		
AST	TT	37	25,54±10,39	-	-
	TC	26	37,96±41,70		
	CC	2	17,50±2,12		
ALT	TT	37	24,10±12,30	-	-
	TC	26	27,57±13,80		
	CC	2	16,00±8,48		
Ure	TT	37	42,88±17,71	-	-
	TC	25	43,16±18,95		
	CC	2	42,80±0		
BUN	TT	37	19,98±8,24	-	-
	TC	26	20,73±11,04		
	CC	2	20,00±0		
kreatinin	TT	37	0,93±0,46	-	-
	TC	26	1,05±1,20		
	CC	2	0,90±0		
HbA1c	TT	41	8,06±2,21	-	-
	TC	31	10,68±14,40		
	CC	2	7,85±3,04		

TIMP-2 G418C Genotip ve Allellerinin Dağılımı:

Çalışma gruplarını TIMP-2 G418C genotip ve allellerine göre kıyasladığımızda ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 13).

Tablo 13: Çalışma gruplarında TIMP-2 G418C genotip ve allel dağılımları

Grup	TIMP-2 G418C				
	GENOTİPLER			ALLELLER	
	GG	GC	CC	G	C
Kontrol (n) (%)	67	8	0	142	8
	89,3	10,7	0	94,6	5,4
Diyabet (n) (%)	69	6	2	144	10
	89,6	7,8	2,6	93,5	6,5

n:birey sayısı

TIMP-2 G418C Genotip Dağılımına Göre Demografik Bilgiler:

TIMP-2 G418C genotiplerine göre demografik bilgiler tablo 14’de gösterilmiştir. Hasta grubunda CRP (p:0,001, %95Cl:4,35-13,27) ve kreatinin (p:0,018, %95Cl: 0,07- 0,71) düzeylerinin GG taşıyan bireylerde GC genotipi taşıyanlara göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Tablo 14 :Çalışma gruplarında TIMP-2 G418C genotip dağılımına göre demografik bilgiler

TIMP2 G418C		HASTA		KONTROL	
		N	Ortalama± SD	N	Ortalama± SD
Kolesterol	GG	66	184,09±41,50	67	173,55±33,81
	GC	6	193,33±21,95	8	158,12±37,14
LDL-K	GG	66	113,28±37,01	67	93,02±28,63
	GC	6	105,36±37,57	8	70,62±28,57
HDL-K	GG	66	43,61±21,73	67	49,65±15,71
	GC	6	45,66±13,98	8	53,87±18,62
VLDL-K	GG	66	32,90±14,17	67	30,94±19,19
	GC	6	34,93±13,19	8	33,00±31,24
Trigliserid	GG	66	166,63±70,67	67	156,56±95,91
	GC	6	175,00±65,99	8	167,37±155,39
CRP	GG	41	12,06±12,52	-	-
	GC	5	3,24±2,25	-	-
homosistein	GG	30	15,23±7,13	-	-
	GC	4	8,97±4,78	-	-
AST	GG	59	30,76±29,26	-	-
	GC	5	23,40±5,36	-	-
ALT	GG	59	24,62±13,09	-	-
	GC	5	29,60±9,63	-	-
Ure	GG	58	43,85±18,28	-	-
	GC	5	35,09±9,87	-	-
BUN	GG	59	20,70±9,56	-	-
	GC	5	16,40±4,61	-	-
kreatinin	GG	59	1,01±,86	-	-
	GC	5	,62±,22	-	-
HbA1c	GG	67	9,13±9,93	-	-
	GC	6	8,65±1,92	-	-

TIMP-2 G303A Genotip ve Allellerinin Dağılımı:

TIMP-2 G303A genotip ve allel dağılımlarına göre çalışma gruplarını karşılaştırdığımızda şu sonuçları elde ettik: Hasta grubunda mutant AA genotipi (p:0,001, kıkare:21,15, OR:1,32, %95Cl:1,16-1,50) ve A alleli (p:0,004, kıkare:8,28, OR:2,67, %95Cl:1,35-5,28) taşıma sıklıkları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır. Kontrol grubunda ise GG genotipi (p:0,004, kıkare:8,28, OR:1,44, %95Cl:1,11-1,87) ve G alleli (p:0,001, kıkare:21,15, OR:1,32, %95Cl:1,16-1,50) taşıma oranlarında anlamlılık derecesinde yükselme gözlenmiştir (Tablo 15).

Tablo 15: Çalışma gruplarında TIMP-2 G303A genotip ve allel dağılımları

Grup	TIMP2G303A				
	GENOTİPLER			ALLELLER	
	GG	GA	AA	G	A
Kontrol (n)	55***	20	0	130*****	20
	(%)	73,3	26,7	0	87,3
Diyabet (n)	39	19	19*	97	57**
	(%)	50,6	24,7	24,7	62,9

n:birey sayısı, *p:0,001; **p:0,004; ***p:0,004; *****p:0,001

TIMP-2 G303A Genotip Dağılımına Göre Demografik Bilgiler:

TIMP-2 G303A genotip dağılımlarına göre demografik bilgileri incelediğimizde GA genotipine sahip hastalarda GG genotipi taşıyanlara göre kreatinin düzeylerini artmış olarak saptadık (p:0,042, %95Cl: 0,02-1,07). Kontrol grubunda istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 16).

Tablo 16:Çalışma gruplarında TIMP-2 G303A genotip dağılımına göre demografik bilgiler

TIMP 2 G303A		hasta		kontrol	
		N	Ortalama±SD	N	Ortalama±SD
Kolesterol	GG	37	186,08±40,188	55	172,85±34,57
	GA	19	189,52±41,99	20	169,30±34,10
	AA	18	177,94±40,87	-	-
LDL-K	GG	37	106,57±35,42	55	92,49±29,46
	GA	19	121,17±38,10	20	85,55±28,87
	AA	18	121,08±38,54	-	-
HDL-K	GG	37	40,80±10,97	55	49,05±15,55
	GA	19	51,73±36,71	20	53,00±17,10
	AA	18	41,05±9,42	-	-
VLDL-K	GG	37	33,58±12,98	55	32,05±22,02
	GA	19	34,46±13,41	20	28,70±15,92
	AA	18	30,58±16,39	-	-
Trigliserid	GG	37	171,54±65,44	55	162,16±109,83
	GA	19	173,42±65,77	20	145,50±79,98
	AA	18	152,38±80,96	-	-
CRP	GG	30	11,87±12,66		
	GA	10	5,44±4,99	-	-
	AA	6	16,67±15,76	-	-
homosistein	GG	21	14,67±7,78		
	GA	9	13,45±4,50	-	-

	AA	4	15,95±9,87		
AST	GG	36	34,44±36,27	-	-
	GA	13	27,76±11,41		
	AA	16	22,87±7,52		
ALT	GG	36	25,86±11,09	-	-
	GA	13	27,92±18,67		
	AA	16	21,68±11,08		
Ure	GG	36	42,53±14,54	-	-
	GA	13	50,46±28,62		
	AA	15	37,58±10,36		
BUN	GG	36	19,73±6,70	-	-
	GA	13	24,53±16,44		
	AA	16	18,06±4,87		
kreatinin	GG	36	0,85±0,27	-	-
	GA	13	1,40±1,78		
	AA	16	0,93±0,20		
HbA1c	GG	37	7,69±1,99	-	-
	GA	19	8,77±2,61		
	AA	18	12,57±18,78		

Hasta Grubunda TIMP-1 ve TIMP-2 Serum Düzeyleri Dağılımı:

Çalışma gruplarımıza ait serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri tablo 17’de gösterilmiştir. TIMP-1 düzeylerinin diyabetik hastalarda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak arttığı görülmüştür (p:0,001, %95Cl:1,11-2,84).

Tablo 17: Çalışma gruplarında serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri

	Grup	N	Ortalama±SD
TIMP-1 düzeyleri (ng/ml)	Diyabet	40	5,82±2,37*
	Kontrol	42	3,84±1,40
TIMP-2 düzeyleri (ng/ml)	Diyabet	40	3,01±0,97
	Kontrol	42	2,92±0,51

*p:0,001

Çalışmamızda yer alan her üç polimorfizme ait genotiplerin dağılımına göre hasta grubunda serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri tablo 18’de verilmiştir. Her üç polimorfizm açısından TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleriyle anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Tablo 18: Hasta grubunda genotip dağılımlarına göre serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri (ng/ml).

TIMP-2 G303A		N	Ortalama±SD	%95 Güven Aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
TIMP-1 düzeyleri	GG	22	5,33±1,39	4,71	5,95
	GA	10	6,40±2,50	4,60	8,19
	AA	8	6,43±3,97	3,11	9,76
TIMP-2 düzeyleri	GG	22	3,09±1,08	2,60	3,57
	GA	10	2,72±,65	2,25	3,18
	AA	8	3,15±1,02	2,29	4,00
TIMP-1 T372C		N	Ortalama±SD	%95 Güven Aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır

TIMP-1 düzeyleri	TT	20	5,64±2,68	1,17	1,90
	TC	19	6,00±2,13	1,18	1,86
	CC	1	6,10	-	-
TIMP-2 düzeyleri	TT	20	3,20±0,95	0,22	1,00
	TC	19	2,71±0,88	0,03	1,17
	CC	1	4,80	-	-
TIMP-2 G418C		N	Ortalama±SD	%95 Güven Aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
TIMP-1 düzeyleri	GG	36	5,85±2,49	0,99	1,70
	GC	4	5,50±0,88	0,99	1,70
	CC	0	-	-	-
TIMP-2 düzeyleri	GG	36	2,96±0,92	1,77	2,69
	GC	4	3,42±1,44	1,77	2,69
	CC	0	-	-	-

Kontrol Grubunda TIMP-1 ve TIMP-2 Serum Düzeyleri Dağılımı:

Kontrol grubunda ise aynı karşılaştırmayı yaptığımızda TIMP-1 CT genotipine sahip bireylerde TIMP-1 düzeylerinde artış gözlenmiştir (p: 0,015, %95Cl:0,22-1,94) (Tablo 19)

Tablo 19: Kontrol grubunda genotip dağılımlarına göre serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri (ng/ml)

TIMP-2 G303A		N	Ortalama±SD	%95 Güven Aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
TIMP-1 düzeyleri	GG	32	3,86±1,17	1,39	1,62
	GA	10	3,75±2,06	1,39	1,62
	AA	0	-	-	-
TIMP-2 düzeyleri	GG	32	2,89±0,49	0,34	0,55
	GA	10	3,00±0,60	0,34	0,55
	AA	0	-	-	-
TIMP-1 T372C		N	Ortalama±SD	%95 Güven Aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
TIMP-1 düzeyleri	TT	16	3,16±1,34	0,22	1,94
	TC	26	4,25±1,30	0,33	0,38

	CC	0	-	-	-
	TT	16	2,93±0,60	0,22	1,94
TIMP-2 düzeyleri	TC	26	2,91±0,45	0,33	0,38
	CC	0	-	-	-
TIMP-2 G418C		N	Ortalama±SD	%95 Güven Aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
	GG	42	3,84±1,40	-	-
TIMP-1 düzeyleri	GC	0	-	-	-
	CC	0	-	-	-
	GG	42	2,92±0,51	-	-
TIMP-2 düzeyleri	GC	0	-	-	-
	CC	0	-	-	-

Sonuç:

- TIMP-1 T372C doğal tip TT genotipi taşımanın diyabet için risk faktörü olabileceği ayrıca C alleli taşımanın ise tip 2 diyabete karşı koruyucu rol oynayabileceği izlenimi elde edilmiştir.
- TIMP-2 G303A mutant AA genotipi ve A alleli taşımanın tip 2 diyabet için risk faktörü olabileceği izlenimi elde edilmiştir.
- Her üç polimorfizmin de serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeylerine etkisi gözlenmemiştir.

5.TARTIŞMA

Ekstraselüler matriks degregasyonu MMP ve TIMP arasında ki dengeye bağlıdır. Bu dengenin değişmesi çeşitli patolojik sonuçlara neden olmaktadır. Matriks metalloproteinazlar (MMP) ekstrasellüler matriks protein bileşenleri (ECM) hidroliz eden çinko bağımlı bir grubudur. Substrat özelliklerine göre sınıflandırılırlar. MMP-1, -8 ve -13 yani *İnterstitiyel kollajenazlar* tip 1 kollajenin yıkımından sorumlu iken, MMP-2 ve -9 yani *jelatinazlar* tip 4 kollajenin, MMP-3, -7 ve -10 yani *stromelizinler* ise tip 4-5 kollajen ve proteoglikanların yıkımından sorumlu başlıca MMP sınıfı enzimlerdir. Bu enzimlerin aktivitesinde yada düzeylerinde oluşan değişikliklerin çeşitli patolojik durumlara neden olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. MMP ve TIMP'lerle ilgili yapılan bir çalışmada ESM(hücre dışı matriks)'i degrade etmekte etkili olan MMP'lerin tümör hücreleri tarafından dokulara saldırıda ve metastazda kullanılan esas enzim ailelerinden biri olduğu saptanmıştır. Bunun kontrolünü de MMP-TIMP arası bağlantıları kullanarak tümörün hızlı yayılmasını engellemek amacıyla kullanılabileceğini açıklamışlardır(44).

Yapılan diğer bir çalışmada ise TIMP'lerin aşırı ekspresyonuyla sadece tümör hücrelerini yavaşlatmada değil ayrıca eritrosit-potansiyelli aktivitesi, hücre büyümesini tetikleyici aktivite, fibroblastların nükleusunda bulunması, MCF7 göğüs karsinoma hücrelerinin yüzeyine tutunarak nükleusuna translokasyon yapmaktadır(45).

MMP'lerin salınımı çeşitli mekanizmalar ile kontrol edilmektedir. MMP'lerin özgül doku inhibitörleri (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-TIMP) MMP'lerin aktivitesini inhibe etmektedir. TIMP'ler, dokularda MMP enzimlerinin özgül ve doğal inhibitörleri olan proteinlerdir; MMP' lere sıkıca bağlanırlar ve kompleks oluştururlar. Dört değişik TIMP tanımlanmıştır (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). TIMP'ler hücre dışı matriksin depolanması ve yıkımı arasındaki dengenin sürdürülmesinde önemli rol oynarlar. TIMP-1'in; MMP-1, MMP-3 ve MMP-9 üzerine baskılayıcı etkisi, TIMP-2'nin ise MMP-2 üzerine baskılayıcı etkisi diğerlerine göre daha belirgindir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise MMP'lerin böbrek hastalığıyla ilişkisi ortaya konulmuştur. Bu çalışmaya göre böbrek hastası olan kişilerde MMP aktivitesi normal kişilere göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Böbrek hastalığını engellemek amacıyla MMP'leri baskılayan dolayısıyla çeşitli ajanların kullanılması önerilmiştir(46).

Yapılan çalışmalarda MMP-9'un disregülasyonun diabetik komplikasyonların gelişimi ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. MMP-2'nin diabette anjiyogenez mekanizmalarını aktive ettiğine dair bulguları olan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Özellikle MMP-2 ve MMP-9'un diabet ve komplikasyonlarının gelişiminde ki etkisi üzerine giderek daha fazla çalışma yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada ise diyabetik nefropatinin MMP'lerle ilişkisi araştırılmış ve vardıkları sonuca göre diyabetik nefropati olan hastalarda sağlıklı kişilere kıyasla ürede MMP konsantrasyonu daha yüksek çıkmıştır(47).

TIMP-1 endojen bir MMP inhibitörü olup, vasküler matriks fibrozis oluşumuna katkı sağlamaktadır. TIMP'in bu etkisi, diabete bağlı gelişen komplikasyonların oluşumunun hızlanmasına katkı sağlamaktadır. MMP'ler ve inhibitörleri TIMP'ler ateromada vasküler değişikliklerle iç içedir ve diyabette ikisinin de artışı olmaktadır. Yapılan bir çalışmada TIMP'lerin hipertansiyon ve kalp rahatsızlığı ile ilişkisi araştırılmış TIMP'lerin MMP'lerle, MMP'lerin ise ESM ile bağlantısından yola çıkılarak sonuca varılmıştır(48).

Genel olarak diabet hastalığında TIMP-1 serum düzeyinin yükseldiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada diyabetik hastalarda MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 serum düzeylerinin yüksek olduğu belirlenmiştir(t9). Yapılan bir diğer çalışmada ise TIMP'lerin mikroalbuminüri ve diyabetik nefropati ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada özellikle mikroalbuminüri oluşumuyla paralel serum seviyelerinde TIMP konsantrasyonunda artış gözlemlenmiştir(49).

Diabet hastalığında genel olarak anjiyogenez mekanizması da bozulmaktadır. TIMP-2'nin anjiyogenez dengesinin bozulmasında etkili olabileceği, artmış serum TIMP-2 düzeylerinin anormal damar oluşumu ile ilgili olabileceği düşünülmektedir(t9). Yapılan bir çalışmada MMP'lerin angiogenesis ile ilişkisi araştırılmıştır., bunu çalışmada MMP aktivitesinin artmasıyla hücre dışı matriks bileşenlerinin hücre yüzeylerine etki ederek anjiyogenez işlevinde rol almaktadır(50)

Tayebjee ve arkadaşlarının tip 2 diabet hastalarında yaptıkları çalışmada TIMP-1 ve TIMP-2 düzeylerinin hasta grubunda anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir(51).

Lee ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, diabet hastalarında TIMP-1 serum düzeylerinin sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Artan TIMP-1 düzeyi metalloproteinaz aktivitesini inhibe etmektedir. Bu durum da matriks yıkımının azalmasına neden olmaktadır(52).

Bizim çalışmamızda ise, TIMP-1 serum düzeyleri diabet hastalarında, sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Çalışma gruplarımız ve TIMP-2 serum düzeyi arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir. TIMP-1 geni 11. Kromozomun kısa kolunda lokalizedir (Xp11.3-p11.23), bu gen üzerinde 3 polimorfizm tespit edilmiş olup, TIMP-1 372T/C polimorfizmi fonksiyonel olarak en önemli ve en sık görülen polimorfizmdir (53). Hinterseher ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada MMP inhibitörü TIMP'lerin, ESM arter damarlarının tekrar modellemesindeki etkileri araştırılmış, TIMP sayısındaki düşüş MMP'lerin aktivitesinde artışa dolayısıyla ESM enzim degradasyonuna artışa sebebiyet verip AAA patogenezi ile sonuçlandığı belirlenmiştir (54).

TIMP-1 372T/C varyasyonunda T allel varlığının TIMP-1 proteininin azalmış ekspresyonuna neden olduğu bu değişikliğin özellikle inflamatuvar dokularda daha belirgin olduğu saptanmıştır.

Meijer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada TIMP-1 372 T allel varlığının inflamatuvar barsak hastalığına sahip erkeklerde TIMP-1 aktivitesinin azalması ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada MMP-TIMP ilişkisinin Crohn ve bağırsak hastalığıyla ilişkisi araştırılmıştır(55)

Tezimizde, diabet hastaların TIMP-1 372T/C genotiplerinin dağılımı açısından incelendiğinde, TT genotipinin CC ve CT genotiplerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda genotip dağılımı bakımında böyle bir anlamlılık belirlenmemiştir.

TIMP-2 enzimi, TIMP-1 enzimine göre 10 kat daha etkili bir enzimdir. Bu sebepten de TIMP-2 üzerinde ki transkripsiyonel aktiviteyi değiştiren varyasyonların çeşitli hastalıkların patagonezinde daha fazla etkili olabileceği düşünülmektedir.

Tezimizde, MMP-2 aktivitesini etkileyen 17q25.3'te lokalize TIMP-2 geni ve bu genin, promoter bölgede yer alan -418G/C ve TIMP2- G303A enzim fonksiyonunu değiştiren SNP'leri incelemiştir.

TIMP-2 -418G/C varyasyonu, transkripsiyon düzeyini değiştirerek, enzim aktivitesini etkilemektedir. Değişen TIMP-2 ve dolayısı ile MMP-2 aktivitesi anjiyogenez dengesini değiştirerek başta tümör gelişimi olmak üzere çeşitli vasküler hastalıkların gelişimine neden olmaktadır(56).

Yapılan çalışmalarda, TIMP-2 418 G/C varyasyonunda C alleli taşımanın çeşitli hastalıklar ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir. C alleli taşımanın azalmış plazma TIMP-2 düzeyi ile ilişkili olduğu CC genotipli bireylerde serum TIMP-2 düzeyinin GG genotipli bireylere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir(57).

TIMP-2 418 G/C varyasyonu genotiplerinin çalışma gruplarımıza göre dağılımında anlamlı bir fark belirlenmemiştir

Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre:

- TIMP-1 T372C doğal tip TT genotipi taşımanın diyabet için risk faktörü olabileceği ayrıca C alleli taşımanın ise tip 2 diyabete karşı koruyucu rol oynayabileceği izlenimi elde edilmiştir.
- TIMP-2 G303A mutant AA genotipi ve A alleli taşımanın tip 2 diyabet için risk faktörü olabileceği izlenimi elde edilmiştir.
- Her üç polimorfizmin de serum TIMP-1 ve TIMP-2 düzeylerine etkisi gözlenmemiştir.

KAYNAKLAR

1. Lakso M. Epidemiology and diagnosis of Type 2 diabetes. In: Goldstein BJ, Müller-Wieland D, eds. *Textbook of type 2 Diabetes*. New York: Martin Dunitz Taylor&Francis Group; 2003, p 1-12
2. Toktamış A, Demirel E. Tip 2 Diyabet İçin Bağımsız Bir Risk Faktörü: Sigara. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 2002; 24 (4): 209 –214.
3. Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: Impaired insülin secretion versus impaired insülin sensitivity. *Endocrine Rev.* 1998; 19 (4): 491-503.
4. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications . Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation *Diabet Med.* 1998 Jul;15(7):539-53
5. Satman I. Diabetes Mellitus ‘un epidemiyolojisi. In: Yenigün M, Altuntaş Y, eds. *Her Yönüyle Diabetes Mellitus*, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2001. P.69-83
6. Campagna FA, Imperatore G. Type 2 Diabetes in children. *BMJ* 2001; 322: 377-78.
7. Reel B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2006; 26:527-537.
8. Müller-Weiland D, Kotzka J, Goldstein BJ. Pathogenesis of type 2 diabetes. In : Goldstein BJ, Müller-Wieland D, eds. *TEextbook of Type 2 Diabetes*. New York : Martin Dunitz Taylor&Francis Group; p1-12
9. Apakkan-Aksun S, Özmen D, Bayindir O, Metalloproteinases, their inhibitors and related physiological and pathological conditions.
10. Ennis BW, Matrisian LM. Matrix degrading metalloproteinases. *Journal of Neuro-Oncology* 1994;18;105-9
11. Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NHV. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol* 2000;84;654-64
12. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Tig* April 1990; vol.6 no.4
13. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994; 7, 2062-72
14. Tanaka H, Mizayaki N, Oashi K, Tanaka S, Ocmichi M, Abe S. Sputum Matrix Metalloproteinase-9; tissue inhibitor metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. *J. allegry Clin Immunol*

15. Nagase H, Suzuki K, Itoh Y, Kan C-C, Gehring MR, Huang W, Brew K, Involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) during matrix Öetalloproteinase activation. *Intracellular Protein Catabolism*, New York, 1996;23-31.
16. Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H, Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000 Mar7; 1477(1-2): 267-83.
17. Murphy G. The regulation of connective tissue metalloproteinases by natural inhibitors progress in inflammation. *Research and Therapy* 1991.
18. Yu-Chiao Yi, Mu-Kuan Chen, Ling-Yun Chen, Esther Shih-Chu Ho, Tsung-Ho Ying, Po-Chiao Wang, Shun-Fa Yang. Genetic Polymorphism of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is associated with an increased risk of endometrial cancer.
19. Chen D, Wang Q, Ma Z-W, Chen F-M, Chen Y, Xie G-Y, Wang Q-T, Wu Z-F. MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 gene polymorphism in Chinese patient with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007;34: 384-389. Doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01071.x.
20. Sav A, Özdamar ŞO, *Hastalığın Patolojik Temelleri*. Güneş Tıp Kitabevi;2009.
21. Gürbüz E, *Temel ve Klinik Endokrinoloji*, Medikal Network;2005.
22. Atalay S. Metabolik Sendrom Ve Metabolik Kontrol Durumuna Göre Tıp 2 Diabetes
23. Salway J.G, çev.edit. Görmüş U, Ergen H.A, Zeybek Ş.Ü. Metabolizma atlası, bir bakışta metabolizma: İstanbul Tıp Kitapevi; 2012. P.108-119
24. Pamela CC, Richard AH, Denise RF,editor. *Lippincott's Illustrated Reviews*. Nobel Tıp Kitabevi; 2005.
25. 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.
26. Herder, C. Inflammation and type 2 diabetes: results from KORA Augsburg. *Gesundheitswesen* 67, 2005;S115–S121.
27. Thrailkill KM, Bunn RC, Fowlkes JL. Matrix Metalloproteinases: Their Potential Role In The Pathogenesis Of Diabetic Nephropathy,2009
28. Cummins PM, Offenbergl 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.
29. Somers P, Knaapen M. The histopathology of varicose vein disease. *Angiology*. 2006; 57(5): 546-555.
 30. Lijnen HR. Metalloproteinases in development and progression of vascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003-2004; 33: 275-81.
 31. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2001; 86(1): 324-333.
 32. Jones EA, Le Noble F, Eichmann A. What determines blood vessel structure? Genetic prespecification vs. hemodynamics. *Physiology (Bethesda)* 2006 21:388-395.
 33. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001;17:463–516.
 34. 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.
 35. 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.
 36. 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.
 37. 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.
 38. 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.
 39. Nagase H, Suzuki K, Cawston TE, Brew K. Involvement of a region near valine-69 of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in the interaction with matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1). *Biochem J*. 1997 Jul 1;325 (Pt 1):163-7. PubMed PMID: 9224642; PubMed Central PMCID: PMC1218541.
 40. Chaudhary AK, Singh M, Bharti AC, Asotra K, Sundaram S, Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. *J Biomed Sci*.

2010 Feb 15;17:10. Review. PubMed PMID: 20152059; PubMed Central PMCID:PMC2846899.

41. Lee SW, Song KE, Shin DS, Ahn SM, Ha ES, Kim DJ, Nam MS, Lee KW. Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2, and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005 Aug;69(2):175-9. PubMed PMID: 16005367.
42. R&D System Quantikine Human TIMP-1 ELISA kit, katalog no: DTM100/STM100/PDTM100.
43. R&D System Quantikine Human TIMP-2 ELISA kit, katalog no: DTM200.
44. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res.* 2001;7(1):14-23.
45. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003 May 2;92(8):827-39
46. Sağlam F. Matriks Metaloproteinazların Böbrek Hastalıklarındaki Rolü: *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi.*
47. Thrailkill KM, Bunn RC, Moreau CS, Cockrell GE, Simpson PM, Coleman HN, Frindik JP, Kemp SF, Fowlkes JL. Matrix metalloproteinase-2 dysregulation in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2007 Sep;30(9):2321-6. Epub 2007 Jun 11. Erratum in: *Diabetes Care.* 2007 Dec;30(12):3154.
48. Tayebjee MH, MacFadyen RJ, Lip GY. Extracellular matrix biology: a new frontier in linking the pathology and therapy of hypertension? *J Hypertens.* 2003 Dec;21(12):2211-8
49. Maxwell PR, Timms PM, Chandran S, Gordon D. Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2001 Oct;18(10):777-80.
50. Haas TL, Madri JA. Extracellular matrix-driven matrix metalloproteinase production in endothelial cells: implications for angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 1999 Apr-May;9(3-4):70-7.
51. Tayebjee MH, Lim HS, MacFadyen RJ, Lip GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in type 2 diabetes: effect of 1 year's cardiovascular risk reduction therapy. *Diabetes Care.* 2004 Aug;27(8):2049-51.
52. Lee SW, Song KE, Shin DS, Ahn SM, Ha ES, Kim DJ, Nam MS, Lee KW. Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2, and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005 Aug;69(2):175-9.
53. Wei JC, Lee HS, Chen WC, Shiu LJ, Yang SF, Wong RH. Genetic polymorphisms of the matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1) modulate the development of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2009 Nov;68(11):1781-6. Epub 2008 Nov 19.
54. Hinterseher I, Krex D, Kuhlisch E, Schmidt KG, Pilarsky C, Schneiders W, Saeger HD, Bergert H. Tissue inhibitor metalloproteinase-1 (TIMP-1) polymorphisms in a Caucasian population with abdominal aortic aneurysm. *World J Surg.* 2007 Nov;31(11):2248-54.
55. Gao Q, Meijer MJ, Kubben FJ, Sier CF, Kruidenier L, van Duijn W, van den Berg M, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in intestinal tissue of patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis.* 2005 Aug;37(8):584-92.

56. Zhou Y, Yu C, Miao X, Tan W, Liang G, Xiong P, Sun T, Lin D. Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes. *Carcinogenesis*. 2004 Mar;25(3):399-404. Epub 2003 Nov
57. Gai X, Zhang Z, Liang Y, Chen Z, Yang X, Hou J, Lan X, Zheng W, Hou J, Huang M. MMP-2 and TIMP-2 gene polymorphisms and susceptibility to atrial fibrillation in Chinese Han patients with hypertensive heart disease. *Clin Chim Acta*. 2010 May 2;411(9-10):719-24. Epub 2010 Feb 9.

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ETİK DEĞERLENDİRME KOMİSYONU



Toplantı Tarihi : 09/06/2010

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Değerlendirme Komisyonu Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 01

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Deneyisel Tıp ve Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Ş. Ümit ZEYBEK'in üstlendiği Yüksek Lisans Öğrencisi Moleküler Biyolog Faruk ÇELİK'in yürüteceği 2010/233-41 dosya numaralı "Tip 2 Diabette TIMP 1 ve TIMP 2 genetik varyasyonlarının etkisi ve serum düzeylerinin incelenmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması komisyonumuzca incelendi.

Etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmesi şartı ile uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İ.Ü. Farmakoloji ve Klinik Far. A.D.
Etik Değerlendirme Komisyon Başkanı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
İ.Ü. Kardiyoloji A.D. (Bşk. Yardımcısı)

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İ.Ü. İç Hastalıkları A. D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
İ.Ü. Nöroloji A. D.

Prof.Dr. Pınar SAİR
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Rukiye Eker ÖMEROĞLU
İ.Ü. Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.

Uzm.Dr. Ahmet Rıza URAS
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. Biyokimya

Doç.Dr. H. Hanzade DOĞAN
İ.Ü. Cerrahpaşa T.F. Deontoloji

Prof.Dr. Ayşen BULUT
Halk Sağlığı (Emekli)

Doç.Dr. Tufan TÜKEK
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. İç Hast.

Prof.Dr. Ünal KUZGUN (T. Katılmadı)
Şişli Etfal Eğitim ve Araş. Hst. Ortopedi

Prof.Dr. Ahmet O. ARAMAN (T. Katılmadı)
İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Eczacı

Prof.Dr. Demir TIRYAKI
Biyofizik (Emekli)

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
İstanbul Üniversitesi

M. Kerim AKMAN
İİBF İktisat Bölümü (Özel)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Faruk	Soyadı	Çelik
Doğ.Yeri	Vrapçište – Makedonya. C	Doğ.Tar.	28.11.1978
Uyruğu	Yabancı Uyruklu	TC Kim No	99787022138
Email	celikfaruk@yahoo.com	Tel	0554 944 69 44

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Tıp ABD.	2012
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik	2009
Lise	Pançe Poposki Lisesi –Makedonya C.	1998

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	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	89	TOEFL-209
Makedonca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		

*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): Spor, Film, Kitap okumak.