

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**



**MATRİKS METALLOPROTEİNAZ 1 (-1607 G/2G), 3 (-1171
5A/6A) VE 9 (-1562 C/T) PROMOTOR
POLİMORFİZMLERİNİN OBSTRÜKTİF UYKU APNE
SENDROMU İLE İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEVLÜT KOÇAK

BALIKESİR, HAZİRAN - 2019

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



MATRİKS METALLOPROTEİNAZ 1 (-1607 G/2G), 3 (-1171
5A/6A) VE 9 (-1562 C/T) PROMOTOR
POLİMORFİZMLERİNİN OBSTRÜKTİF UYKU APNE
SENDROMU İLE İLİŞKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEVLÜT KOÇAK

Jüri Üyeleri : Dr. Öğr. Üy. Ayla SOLMAZ AVCIKURT (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

BALIKESİR, HAZİRAN - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Mevlüt KOÇAK tarafından hazırlanan “MATRİKS METALLOPROTEİNAZ 1 (-1607 G/2G), 3 (-1171 5A/6A) VE 9 (-1562 C/T) PROMOTOR POLİMORFİZMLERİNİN OBSTRÜKTİF UYKU APNE SENDROMU İLE İLİŞKİSİ.” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 10.06.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Ayla SOLMAZ AVCIKURT

Üye
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Üye
Prof. Dr. Sezai TÜRKEL


.....

.....

.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

ÖZET

MATRİKS METALLOPROTEİNAZ 1 (-1607 G/2G), 3 (-1171 5A/6A) VE 9 (-1562 C/T) PROMOTOR POLİMORFİZMLERİNİN OBSTRÜKTİF UYKU APNE SENDROMU İLE İLİŞKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEVLÜT KOÇAK

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜY. AYLAK SOLMAZ AVCIKURT)

BALIKESİR, HAZİRAN - 2019

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), hücre dışı matriksin bileşenlerini ve sayısız matriks olmayan proteinleri parçalayabilen çinkoya bağlı proteinazlardır. Matriks Metalloproteinaz-1 (MMP1), fibril kollajenleri ve elastin, fibronektin, agrekan ve versikan gibi birkaç temel ECM bileşenini doğrudan parçalayabilir. MMP1 promotor bölgesi -1607 pozisyonunda G/2G olarak bilinen polimorfizm bir guaninin eklenmesi veya silinmesine bağlı olarak ekspresyon seviyesini etkilemektedir. MMP3 promotor bölgesi -1171 (-1612) pozisyonunda 5A/6A olarak bilinen polimorfizm bir adenin bazının delesyonundan kaynaklanmaktadır. MMP9 promotor bölgesi -1562 pozisyonunda C/T olarak bilinen polimorfizm, C nükleotidin T nükleotidi ile yer değiştirmesiyle meydana gelir. Uyku Apne Sendromu, uyku sırasında solunum duraklamaları ile karakterize birincil uyku bozukluğudur. Uyku Apne Sendromu'nun alt tipi olan obstrüktif uyku apnesi (OSA) gittikçe yaygınlaşan uyku ile ilgili solunum bozukluğudur. Henüz Uyku Apne Sendromu'na neden olan mekanizma kesin olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'ün gen ekspresyon seviyesini etkileyen promotor polimorfizmlerinin uyku apne sendromu ile ilişkisi araştırıldı.

MMP-1 (-1607) G/2G, MMP-3 (-1171) 5A/6A ve MMP-9 (-1562) C/T genlerinin promotor bölgesindeki polimorfik bölgenin genotipini belirlemek için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı. Hasta ve kontrol grubu yaş ve cinsiyet açısından değerlendirildiğinde anlamlı farklılık bulunmadı. Vücut Kitle İndeksi hasta grubunda anlamlı yüksek bulunmuştur ($p=0,01^{**}$). MMP1 -1607 Genotip dağılımında G/G varyantı hastaların %43,5'inde görülmüştür. Kontrol grubunda ise G/2G varyantı %52,6'sında gözlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında varyant dağılımı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,037$). MMP3 -1171 genotip dağılımında 5A/6A varyantı kontrol grubunda %88,7 oranında görülmüş fakat gruplar arası varyant dağılımı anlamlı çıkmamıştır. MMP9 -1562 genotip dağılımında hem hasta hem de kontrol grubunda C/C varyantı daha sık izlendi. Gruplar arası varyant dağılımında istatistiksel olarak anlamlılık yoktu.

ANAHTAR KELİMELELER: Matriks metalloproteinaz, MMP-1, MMP-3, MMP-9, obstrüktif uyku apnesi, PZR, RFLP, promotor.

ABSTRACT

**THE RELATIONSHIP BETWEEN MATRIX METALLOPROTEINASE 1
(-1607 G/2G), 3 (-1171 5A/6A) AND 9 (-1562 C/T) PROMOTOR
POLYMORPHISMS WITH OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA
SYNDROME
MSC THESIS
MEVLÜT KOÇAK
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS
(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. AYLA SOLMAZ AVCIKURT)
BALIKESİR, JUNE 2019**

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-bound proteinases that can disrupt the components of the extracellular matrix and numerous non-matrix proteins. Matrix Metalloproteinase-1 (MMP1) can directly break down fibril collagen and a few basic ECM components such as elastin, fibronectin, aggrecan and versikan. The polymorphism, known as G/2G at the position of the MMP1 promoter region -1607, is affected by the expression or deletion of a guanine. The polymorphism known as 5A/6A in the MMP3 promoter region -1171 (-1612) originates from the deletion of an adenine base. Polymorphism, known as C / T in the MMP9 promoter region at position -1562, takes place by replacing the C nucleotide with the T nucleotide. Sleep Apnea Syndrome is a primary sleep disorder characterized by respiratory pauses during sleep. Obstructive sleep apnea (OSA), the subtype of Sleep Apnea Syndrome, is an increasingly common form of sleep-related respiratory distress. The mechanism that causes the Sleep Apnea Syndrome is not known exactly.

In this study, we investigated whether promoter polymorphisms that affect the gene expression level of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 are related to sleep apnea syndrome. MMP-1 (-1607) G / 2G, MMP-3 (-1171) 5A/6A and MMP-9 (-1562) PCR-RFLP method was used to determine the genotype of the polymorphic region in the promoter region of the C/T genes. No significant difference was found between the patient and control groups in terms of age and gender. Body Mass Index was found to be significantly higher in the patient group ($p=0,01^{**}$). MMP1 -1607 G/G variant in genotype distribution was seen in 43.5% of patients. In the control group, 52.6% of the G / 2G variant was observed. Variant distribution was statistically significant between the patient and control groups ($p = 0.037$). In the MMP3 -1171 genotype distribution, the 5A/6A variant was seen as 88.7% in the control group, but the variance distribution among the groups was not significant. MMP9 -1562 genotype distribution was observed more frequently in both patient and control groups. There was no statistically significant difference between the groups.

KEYWORDS: Matrix metalloproteinase, MMP-1, MMP-3, MMP-9, obstructive sleep apnea, PCR, RFLP, promotor.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler).....	1
1.1.1 MMP'lerin Tarihçesi.....	2
1.1.2 MMP'lerin Yapısı.....	3
1.1.3 MMP'lerin Sınıflandırılması.....	5
1.1.4 MMP'lerin Substratları.....	7
1.1.5 MMP'lerin Etkinliğinin Düzenlenmesi.....	10
1.1.5.1 Transkripsiyonel Düzenleme.....	11
1.1.5.2 Proenzim Aşamasında Düzenleme.....	11
1.1.5.3 Enzim Aktivitesinin İnhibe Edilmesi.....	12
1.1.6 MMP'lerin Fizyolojik ve Patolojik Süreçlerdeki Rollerini.....	13
1.1.7 MMP-1.....	13
1.1.8 MMP-3.....	14
1.1.9 MMP-9.....	15
1.2 Uyku Apnesi.....	17
1.2.1 Obstrüktif Uyku Apnesi.....	18
1.3 Amaç.....	18
2. MATERYAL VE METOD.....	20
2.1 Materyal.....	20
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	20
2.1.2 PZR-RFLP Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler.....	21
2.1.3 PZR Çalışmalarında Kullanılan Primerler.....	22
2.1.4 RFLP Çalışmalarında Kullanılan Enzimler.....	23
2.1.5 PZR Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler.....	23
2.1.6 Agaroz Jel Elektrofrezisi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler.....	24
2.2 Metod.....	24
2.2.1 Biyoinformatik Analiz.....	24
2.2.1.1 PZR-RFLP Çalışması için Primer Tasarımı ve Kesim Enzimi Seçimi.....	24
2.2.2 Genotip Analizi.....	28
2.2.2.1 Genomik DNA İzolasyonu.....	28
2.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	30
2.2.2.3 PZR Ürünlerinin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP).....	31
2.2.2.4 Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	35

2.2.3	İstatistiksel Analiz.....	37
3.	BULGULAR	38
3.1	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	38
3.1.1	MMP-1 – 1607 G/2G PZR Ürünü	38
3.1.2	MMP3 -1612 (-1171) 5A/6A PZR Ürünü	39
3.1.3	MMP9 -1562 C/T PZR Ürünü	40
3.2	PZR-RFLP Ürünleri	40
3.2.1	MMP-1 – 1607 G/2G PZR-RFLP Ürünü	41
3.2.2	MMP3 -1612 (-1171) 5A/6A PZR-RFLP Ürünü	42
3.2.3	MMP9 -1562 C/T PZR-RFLP Ürünü	43
3.3	İstatistiksel Bulgular	43
3.3.1	Çalışmaya Katılan Hasta ve Sağlıklı Grubu Özellikleri	43
3.3.2	MMP-1-G/2G MMP-3-5A/6A ve MMP-9 C/T allelerin H-Weinberg Eşitliği	45
3.3.3	MMP1 -1607 Genotip Dağılımları	49
3.3.4	MMP3 -1171 Genotip Dağılımları	50
3.3.5	MMP9 -1562 Genotip Dağılımları	51
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	53
5.	KAYNAKLAR.....	59
6.	EKLER.....	71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 3.1:** MMP-1 -1607 G/2G polimorfik bölgesinin PZR ürünü, 50 bp marker kullanılarak elde edilen % 1,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü. 39
- Şekil 3.2:** MMP-3 -1612 (1171) 5A/6A polimorfik bölgesinin PZR ürünü, 100 bp marker kullanılarak elde edilen % 1,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü. 39
- Şekil 3.3:** MMP-9 -1562 C/T polimorfik bölgenin PZR ürünü, 100 bp marker kullanılarak elde edilen % 1,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü. 40
- Şekil 3.4:** MMP-1 -1607 G/2G polimorfik bölgesinin PZR ürünü AlwI (BspPI) enzimi ile kesilip 100 bp marker kullanılarak elde edilen % 3,5'luk garoz jeldeki görüntüsü..... 42
- Şekil 3.5:** MMP-3 -1612 (1171) 5A/6A polimorfik bölgesinin PZR ürünü PsyI (Tth111I) enzimi ile kesilip 100 bp marker kullanılarak elde edilen % 3,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü. 42
- Şekil 3.6:** MMP-9 -1562 C/T polimorfik bölgesinin PZR ürünü PaeI (SphI) enzimi ile kesilip 100 bp marker kullanılarak elde edilen % 3,5'luk garoz jeldeki görüntüsü. 43
- Şekil 3.7:** OSA hasta grubundaki AHİ skorlama dağılımı. 45

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: MMP'lerin sınıflandırılması.....	6
Tablo 1.2: MMP'lerin substratları.....	9
Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan cihazların listesi.....	20
Tablo 2.2: PZR-RFLP çalışmasında kullanılan malzemelerin listesi.....	21
Tablo 2.3: PZR'da kullanılan primerlerin listesi.....	22
Tablo 2.4: RFLP reaksiyonunda kullanılan enzimlerin listesi.....	23
Tablo 2.5: PZR çalışmasında kullanılan çözeltilerin listesi.....	23
Tablo 2.6: Agaroz jel elektroforezi çalışmasında kullanılan çözeltilerin listesi.....	24
Tablo 2.7: MMP1 -1607 G/2G PZR ile çoğaltılacak DNA bölgesi.....	25
Tablo 2.8: MMP3 -1612 5A/6A PZR ile çoğaltılacak DNA bölgesi.....	25
Tablo 2.9: MMP9 -1562 C/T PZR ile çoğaltılacak DNA bölgesi.....	26
Tablo 2.10: Hedef genlerin PZR-RFLP çalışması için tasarlanan primerler.....	27
Tablo 2.11: Seçilen kesim enzimleri ve kesilen allel tipleri.....	27
Tablo 2.12: PZR-RFLP sonucunda beklenen bant büyüklükleri ve genotip analizi.....	28
Tablo 2.13: PZR bileşenleri.....	30
Tablo 2.14: Hedef genlerin PZR koşulları.....	31
Tablo 2.15: MMP-1 – 1607 G/2G RFLP reaksiyon içeriği.....	32
Tablo 2.16: MMP-1 – 1607 G/2G RFLP ürünü ve genotip tipleri.....	32
Tablo 2.17: MMP3 -1612 5A/6A RFLP reaksiyon içeriği.....	33
Tablo 2.18: MMP3 -1612 5A/6A RFLP ürünü ve genotip tipleri.....	33
Tablo 2.19: MMP9 -1562 C/T RFLP reaksiyon içeriği.....	34
Tablo 2.20: MMP9 -1562 C/T RFLP ürünü ve genotip tipleri.....	35
Tablo 2.21: Agaroz jel elektroforezi çalışma içerikleri ve şartları.....	36
Tablo 3.1: Demografik özellikler.....	44
Tablo 3.2: OSA ve Kontrol grubun demografik özelliklerin dağılımı.....	44
Tablo 3.3: OSA hasta grubunda MMP-1 G/2G alleli için H-Weinberg eşitliği (n=85).....	46
Tablo 3.4: OSA hasta grubunda MMP-1 (p+q=1).....	46
Tablo 3.5: Kontrol grubunda MMP-1 G/2G alleli için H-Weinberg eşitliği (n=97).....	46
Tablo 3.6: Kontrol grubunda MMP-1 (p+q=1).....	46
Tablo 3.7: OSA hasta grubunda MMP-3 5A/6A alleli için H-Weinberg eşitliği (n=85).....	47
Tablo 3.8: OSA hasta grubunda MMP-3 (p+q=1).....	47
Tablo 3.9: Kontrol grubunda MMP3 5A/6A alleli için H-Weinberg eşitliği ..	47
Tablo 3.10: Kontrol grubunda MMP3 5A/6A (p+q=1).....	48
Tablo 3.11: OSA hasta grubunda MMP-9 C/T alleli için H-Weinberg eşitliği (n=85).....	48
Tablo 3.12: OSA hasta grubunda MMP-9 (p+q=1).....	48
Tablo 3.13: Kontrol grubunda MMP-9 C/T alleli için H-Weinberg eşitliği (n=85).....	49
Tablo 3.14: Kontrol grubunda MMP-9 (p+q=1).....	49
Tablo 3.15: MMP1 -1607 genotip dağılımları.....	50

Tablo 3.16: MMP3 -1171 genotip dağılımları.	50
Tablo 3.17: MMP9 -1562 genotip dağılımları.	51

SEMBOL LİSTESİ

MMP	: Matriks metalloproteinaz
ECM	: Ekstrasellüler matriks
TIMP	: Matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri
Zn	: Çinko
Ca	: Kalsiyum
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
CAT	: Katalitik
Hpx	: Hemopeksin
MT-MMP	: Membran tipi MMP.
GPI	: Glikosilfosfatidil-inositol
IgG	: İmmunoglobulin G
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi 'Single nucleotide polymorphism'
RFLP	: Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
TNF	: Tümör nekrozis faktör
IL-1	: İnterlökin-1
NF-Kb	: Nükleer faktör-kappa B
MAPK	: Mitogen activated protein kinaz
TGF	: Transforming growth faktör
tPA	: Doku plazminojen aktivatör
uPA	: Ürokinaz tipi plazminojen aktivatör
MI	: Miyokard iskemisi
ERK	: Extracellular-regulated kinase
AP-1	: Aktivatör protein-1
bp	: Baz çifti (bç) 'Base pair'
GAG	: Glikozaminoglikanlar
uPAR	: Ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörü
PI3K	: Fosfatidilinozitol-3'-kinaz
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
NO	: Nitrik oksit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
aa	: Amino asit
BBB	: Kan-beyin bariyeri
kDa	: Kilodalton
PAR-1	: G proteinine bağlı reseptör-1
AP-2	:Aktivator protein-2
PEA-3	: Polima güçlendirici aktivite-3
ZBP-89	: Çinko bağlayıcı protein-89
FN2	: Fibronektin tip II
Cys	: Sistein
SAF -1	: Serum amiloid A aktive edici faktör-1
SP-1	: Spesifik protein 1

AHI	: Apne-hipopne indeksi
OSA	: Obstrüktif uyku apnesi
TAE	:Tris asetik asit EDTA
EtBr	: Etidyum bromid
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
HNC	: Baş ve boyun kanseri
ESCC	: Özofagus skuamöz hücreli karsinom
EAC	: Özofagus adenokarsinom
CP	: Kronik periodontitis
DN	: Diyabetik nefropati
GBM	: Glomerüler bazal membran
DVT	: Derin venöz trombozu
KKY	: Kronik kalp yetmezliği
T2DM	: Tip 2 diabetes mellitus
CAS	: Koroner arter darlığı
KAH	: Koroner arter hastalığı
DMI	: Mikrovasküler komplikasyonlar
MS	: Multipl skleroz
nm	: Nanometre

ÖNSÖZ

Bu çalışma konusunun belirlenmesinde ve çalışma basamaklarının her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini, değerli zamanlarını, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen, bana her fırsatta yardımcı olan danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Ayla SOLMAZ AVCIKURT'a, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Başkanımız değerli hocam Sayın Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a,

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, Annem Feriřnaz KOÇAK'a, Babam Abdulaziz KOÇAK'a, Ablam ve Kardeşlerim Fatma KOÇAK'a, Vedat KOÇAK'a, Kadir KOÇAK'a, Fırat KOÇAK'a, Serhat KOÇAK'a, Tuba KOÇAK'a, Yeğenlerim Özgür KOÇAK'a, Barış KOÇAK'a ve Tuba KOÇAK'a,

Yüksek Lisans sürecinde her zaman yanımda, olan maddi, manevi desteğini esirgemeyen, ev arkadaşım, Sayın Ehed Muhammed AYMAZ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca tanımdan keyif aldığım değerli arkadaşlarım, Kamil TOK'a, Ayça ÇELİÇEKEN'e, Pakize ÖZKAYA'ya, İrem AKINCI'ya, Ulaş KUMRAL'a, Niyazi CÖMERT'e, Tuğçe BEYÇİÇ'e,

Sonsuz teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

1. GİRİŞ

1.1 Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler)

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), hücre dışı matriksin bileşenlerini ve sayısız matriks olmayan proteini parçalayabilen çinkoya bağlı proteinazlardır [1]. MMP'lerin çoğunda, katalitik domainde karakteristik çinko bağlama motifi HEXXHXXGXXH olan histidin rezidü bulundurur [2]. Matriksinler olarak da adlandırılan Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler), MEROPS veritabanında (<http://www.merops.sanger.ac.uk/>) çinko metalloproteaz ailesi metzinkin (M10)'in alt familyasına ait olarak sınıflandırılır [3]. MMP'ler, katalitik alandaki çinko atomunun, prodomain içindeki sistein rezidüsünün sülfhidril grubu ile etkileşimi nedeniyle aktif olmayan latent zimojenler (pro-MMP'ler) olarak salgılanırlar [4]. Pro-MMP'lerin aktivasyonu, genellikle diğer MMP'ler veya diğer proteazlar tarafından hücre dışı olarak gerçekleştirilir [5]. MMP'ler, kolajen, jelatin, elastin ve fibronektin gibi matriks proteinlerin yanı sıra, büyüme faktörleri, kemokinler ve adezyon molekülleri gibi matriks olmayan substratların parçalanmasından da sorumludur [1]. Kollajen (tip I'den X'a kadar ve XIV), MMP'lerin bilinen substratlarıdır. MMP'ler bazı ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinin yıkımından sorumludur ve tam yıkımın gerçekleştirmek için birkaç MMP'nin ortak etkileşimi gerekebilir. MMP-1 ve MMP-8, fibril heliksleri parçalara ayırır ve üçlü sarmal yapılarını açar. Bu şekilde oluşturulan tekli α -zincirleri daha sonra jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) ile oligopeptidlere indirgenir [6]. Hücre yüzeyindeki biyoaktif molekülleri etkileyerek sinyal yollarını modüle ederler [7]. MMP'ler, hücre-matriks bileşimini düzenleyen ana enzim grubudur [8]. MMP'ler hücre dışı proteinlerdir, ancak MMP-1, MMP-2 ve MMP-11 hücre içinde de bulunarak hücre içindeki proteinlere etki edebilmektedirler [3]. MMP'ler normal fizyolojik koşullarda homeostaziyi korumak için genellikle düşük seviyede sentezlenirler [8].

MMP'ler embriyolojik gelişimden apoptoza kadar birçok hücrenel süreçte yer alırlar [9]. Hücre çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını destekleyip, hücre apoptozisinde, anjiyogenezde, doku onarımında ve immün yanıtta rol oynarlar [7].

Ayrıca artrit, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve periodontal hastalıklar gibi birçok patolojik süreçlerde rol oynarlar [9]. MMP'ler, fibroblastlar, osteoblastlar, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller ve lenfositler dahil olmak üzere pro-enflamatuar hücreler tarafından sentezlenir [10]. MMP'lerin etkinliği üç farklı aşamada kontrol edilir. Bu aşamalar; transkripsiyon aşamasında düzenlenme, proenzim aşamasında düzenlenme (zimogen aktivasyonu) ve aktif formların Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (TIMP'ler) veya α_2 -Makroglobulin tarafından inhibe edilmesi şeklindedir [3, 9]. MMP'lerin transkripsiyonel düzenlenmesi hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından belirlenir [10].

1.1.1 MMP'lerin Tarihçesi

Matriks metalloproteinazlar'dan ilk defa 1949 yılında tümör büyümesinde ve anjiyogenezde oynadığı rolleri nedeniyle depolimerize edici enzimler olarak bahsedilmiştir [11]. MMP'ler, ilk defa 1962 yılında Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından kurbağa yavrusu dokusunda kollajenolitik aktivite sergileyen enzim olarak tanımlandı [12]. Eisen ve arkadaşları 1968 yılında ilk insan MMP'sini deriden izole etti [13]. 1974 yılında, aynı zamanda jelatinaz B olarak da bilinen Matriks Metalloproteinaz 9 (MMP-9) keşfedildi [14]. 1990 yılında, enzimleri inaktif formda tutmaktan sorumlu bir "sistein anahtarı" mekanizması olduğu keşfedildi. İnsan genom diziliminin tamamlanmasından sonra, yirmi dört farklı genin bir grup insan MMP'sini kodladığı tespit edildi [15]. Ayrıca matriksinler meyve sineği (*Drosophila melanogaster*), nematod (*Caenorhabditis elegans*), denizkestanesi (*Paracentrotus lividus*), hydra (*Hydra vulgaris*) gibi omurgasızlarda ve bitkilerde (*Arabidopsis thaliana*) bulundu [16].

1.1.2 MMP'lerin Yapısı

MMP'ler, proteazların metzinkin süper ailesine ait endopeptidazlar veya matriksinler ailesinin üyesidirler. MMP'ler, ECM'nin çeşitli protein bileşenlerini bozan, yüksek oranda homolog, multidomain, çinko (Zn^{2+}) ve kalsiyum (Ca^{2+}) içeren metalloproteinazlardır [7].

MMP ailesi üyelerinin üç boyutlu yapısı nükleer manyetik rezonans (NMR) ve X-ışını kristalografisi ile belirlenmiştir [15]. MMP'ler, sinyal peptit bölgesi (predomain) ve bunu takip eden yaklaşık 80 amino asitlik N-terminal prodomain (propeptit), yaklaşık 170 amino asitlik katalitik (CAT) domain, değişken uzunluktaki menteşe bölgesi (Linker), yaklaşık 200 amino asitlik C-terminal hemopeksin benzeri (Hpx) domaininden oluşur [2, 17].

Bu domain yapısı bazı MMP'lerde farklılık gösterir [7]. MMP-2 ve MMP-9, katalitik domainde 3 tekrarlı fibronektin tip II motifine sahiptirler [7, 17]. Matrilisinler (MMP-7 ve MMP-26) ve MMP-23 linker bölgesinden ve hemopeksin domaininden yoksundurlar [17]. MMP-23, katalitik domainden sonra benzersiz bir sistein bakımından zengin bölge ve immünoglobulin benzeri prolin bakımından zengin bir bölge içerir. MMP-11, MMP-21, MMP-28 ve bütün Membran Tipi MMP'ler, propeptidin C-terminalinde furin benzeri enzim tanıma motifine sahiptirler [7]. Tip I Membran Tipi MMP'ler (Tip I MT-MMP), ek olarak bir transmembran (TM) domain ve TM domainini takip eden küçük bir sitoplazmik kuyruk (tail) içerirler [2, 7]. Glikosilfosfatidil-inositol (GPI)'a bağlı Membran Tipi MMP'ler (MMP-17 ve MMP-25) ise C-terminalde bir glikosilfosfatidilinositol (GPI) rezidüye sahiptirler [7].

MMP'lerin çoğu üç önemli özellik gösterir. İlk olarak, MMP'ler kollajenaz-1 (MMP-1) ile homoloji göstermektedirler. MMP-7, MMP-23 ve MMP-26, bağlayıcı peptit ve hemopeksin domainden yoksun oldukları için farklılık gösterirler. Ayrıca MMP-23, katalitik domainin C-terminalinden hemen sonra benzersiz bir C-terminal sistein bakımından zengin domain ve bir immünoglobulin benzeri domain içerir [7, 18]. İkinci olarak, prodomain bölgelerinde MMP'leri inaktif proMMP zimojen formda tuttukları bir sistein anahtarı motifi PRCGXPD içerirler [17].

MMP-23 ve MMP-28 prodomain'deki sistein bağlama motiflerindeki farklılıklarından dolayı istisnalardır. MMP-23 bir sistein anahtarı motifi olan PRCGXPD'den yoksun olup farklı bir ALCLLPA sekansını içerir. MMP-28 ise biraz farklı bir sistein anahtar motifi olan PRCGVTD'ye sahiptir [19, 20]. Üçüncü olarak, MMP'lerin katalitik domaininde çinko (Zn^{2+}) bağlama motifi olan HEXXHXXGXXH olan histidin rezidü bulunur [7].

1. Predomain (Sinyal peptit bölgesi): MMP'yi endoplazmik retikuluma (ER) yönlendiren bir N-terminal dizisidir [21].

2. Prodomain (Propeptit bölgesi): Prodomain, enzimleri inaktif halde tutan bölgedir [21]. Yaklaşık 80 amino asit içerir [22]. Sistein rezidünün katalitik domaindeki katalitik Zn^{2+} ile koordine ettiği ve proMMP'yi inaktif bir yapıda tuttuğu "sistein anahtarı" motifi PRCGXPD bulundurur [6].

3. Katalitik domain: MMP'lerin katalitik domaini proteolitik aktiviteye sahiptir. Bu bölge, beş β katmanı, üç heliks ve bağlantı halkasından oluşur. 170 amino asitten oluşur ve metiyonin döngüsü olarak bilinen benzersiz bir yapı oluşturan metiyonin ile ilişkili çinko bağlayıcı bir motif (X'in herhangi bir amino asidi temsil ettiği (His-Glu-His-XX-XXXX-Gly-His) içerir. Katalitik bölge, iki çinko iyonu ve iki veya üç kalsiyum iyonu içerir. Aktif bölgede bulunan ilk Zn^{2+} iyonu doğrudan katalitik işlemlere katılır. İkinci Zn^{2+} iyonu ve Ca^{2+} iyonları, katalitik bölgedeki Zn^{2+} iyonundan yaklaşık 12 nm uzaklıktadır. Katalitik alan yapısının stabilize edilmesi için kalsiyum iyonları gereklidir [22].

4. Mentşe Bölgesi (Linker peptit, Prolinden zengin bölge): Hemopeksin benzeri etki alanı ile katalitik domain arasında bulunan bölgedir. MMP-9 enzimin işlevi için kritik olabilecek esnekliği sağlar [23].

5. Hemopeksin benzeri bölge: Hemopeksin benzeri bölge, kollajenaz için karakteristiktir ve interstisyel kollajendeki spesifik amino asit dizilerinin parçalanması için gereklidir [22]. MMP'lerin substrat tanınmasında önemlidir [24]. MMP-7, -26 ve -23 dışında, tüm MMP ailesi üyelerinin substrat tanımada, proteolitik aktivitede ve inhibitör bağlanmasında rol oynadığı bilinen bir bölgedir [21].

1.1.3 MMP'lerin Sınıflandırılması

Bugüne kadar insana ait 26 MMP keşfedilmiştir [25]. MMP'ler MMP-1 den başlanarak MMP-28 kadar numaralandırılmıştır. Daha sonra MMP-29 dahil edilmiştir [11, 25]. MMP'ler, substrat spesifikliği ve homolojisi bakımından kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler, membran tipi MMP'ler ve diğer MMP'ler olmak üzere altı aile grubuna ayrılabilir [26].

1. Kolajenazlar arasında MMP-1 (interstisyel kollajenaz), MMP-8 (nötrofil kollajenaz), MMP-13 ve MMP-18 bulunur. Bu MMP'ler üçlü sarmal yapıya sahip fibriller kollajen tip I, II ve III'ün karakteristik 3/4 ve 1/4 oranında parçalara ayrılmasında önemli rol oynarlar. Bu MMP'ler önce fibriller kollajenlerin üçlü sarmal yapısını gevşetirler, ardından da peptid bağlarını hidrolize ederler. MMP'lerin C-terminal hemopeksin (Hpx) alanları, doğal fibriller kollajenin parçalanması için zorunludur. Katalitik alanlar ise kollajen olmayan protein ve peptidlerin parçalanması için gereklidir [7, 27, 28].

2. Jelatinazlar grubunda MMP-2 ve MMP-9 bulunmaktadır. MMP-2 ve MMP-9, MMP ailesindeki diğer proteinazlara yapısal olarak benzerlik gösterirler. Fakat katalitik domainin N-terminalinde jelatinin bağlanması için gerekli olan fibronektin tip II benzeri 3 tekrar bölgesinden oluşan ayrı bir kollajen bağlanma domainine sahip olmaları bakımından farklılık gösterirler [7]. Bu jelatinazlar, tip IV, V ve XI kollajenleri, laminin ve agrekan çekirdek proteini de dahil olmak üzere bazı ECM moleküllerini sindirebilirler [29].

3. Stromelisinler grubunda MMP-3, MMP-10 ve MMP-11 bulunmaktadır. Stromelisinler, kolajenazlarla aynı domain düzenlemelerine sahiptirler, ancak interstisyel kollajeni parçalamazlar. MMP-3 ve MMP-10, bir dizi ECM molekülünü sindirir ve proMMP aktivasyonuna katılır, ancak MMP-11, ECM moleküllerine karşı çok zayıf bir aktiviteye sahiptir. Ayrıca, MMP-3 ve -10, inaktif proMMP olarak hücrelerden salgılanır, ancak MMP-11, hücre içinde furin tarafından aktive edilir ve hücrelerden aktif bir enzim olarak salgılanır [30].

4. Matrilisinler MMP-7 ve MMP -26'yı içerir ve her ikisi de hemopeksin bölgesini ve menteşe bölgesinden yoksundur [7].

5. Membran Tipi MMP'ler (MT-MMP'ler) dört adet tip-I transmembran MMP'lerini (MMP-14, -15, -16 ve -24) ve iki adet glikozil-fosfatidilinositol (GPI) bağlantılı MMP'lerini (MMP-17 ve -25)'i içerir [7]. MT-MMP'ler, propeptidin C-ucunda furin benzeri enzim tanıma bölgesine sahiptir. Hücre içi olarak aktive edilirler ve aktif enzim olarak hücre yüzeyinde varlık gösterirler [6]. MT-MMP'ler, membran bağlama alanlarına sahiptir ve hücre yüzeyinde proteaz aktivitesi gösterirler [31]. T4-MMP (MMP-17) dışındaki tüm MT-MMP'ler, proMMP-2'yi aktive edebilir[6]. MT1-MMP (MMP-14) ise hücre yüzeyinde proMMP-13'ü aktive eder [31].

MMP'ler esas olarak zara bağlı veya çözünür salgılanır. Plazma zarına bağlanan MMP'ler, sadece transmembran ve (GPI) domain içeren Membran Tipi MMP'ler (MT-MMP'ler) ile sınırlı değildir. MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-13 ve MMP-19 gibi çözünür olarak salgılanan MMP'ler de plazma zarına bağlanabilir [29].

6. Diğer MMP'ler, sırasıyla MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27, MMP-28 ve MMP-29'u içerir [7, 26].

Tablo 1.1: MMP'lerin sınıflandırılması [7, 10, 22, 32].

MMP	Enzim ismi	SINIFI	Doku dağılımı	Latent/ Aktif (kDa)	Kromozom lokasyonu
MMP-1	Kollajenaz-1 (intersitisyel kollojenaz)	Kollajenazlar.	Endotel, fibroblastlar, trombositler, varisli damarlar	55/45	11q22-q23
MMP-2	Jelatinaz A	Jelatinazlar.	Endotel, trombositler, lökositler..	72/63	16q13
MMP-3	Stromelisin-1	Stromelisinler.	Endotel, trombosit, sinovyal fibroblastlar.	57/45	11q23
MMP-7	Matrilisin-1	Matrilisinler.	Endotel, uterus, varisli damarlar (PUMP)	29/20	11q21-q22
MMP-8	Kollojenaz-2 (nötrofil- kollojenaz)	Kollajenazlar.	Makrofajlar, nötrofiller	75/55	11q21-q22
MMP-9	Jelatinaz-B	Jelatinazlar.	Endotel, mikrodamarlar, makrofajlar, varisli damarlar	92/86	20q11.2-q13.1
MMP-10	Stromelizin-2	Stromelisinler.	Uterus, artrit, karsinoma hücreleri	57/44	11q22.3-q23
MMP-11	Stromelizin-3	Stromelisinler.	Beyin, rahim.	51/44	22q11.2
MMP-12	(Makrofaj elastaz) metalloelastaz	Diğer enzimler.	Fibroblastlar, makrofajlar.	54/45 - 22	11q22.2-q22.3

Tablo 1.1: (devamı).

MMP-13	Kollojenaz-3	Kollajenazlar.	Makrofajlar, varisli damarlar, meme kanseri	60/48	11q22.3
MMP-14	MT-1MMP	MT-MMP.	Fibroblastlar, trombositler, beyin, uterus.	66/56	14q11-q12
MMP-15	MT-2MMP	MT-MMP.	Fibroblastlar, lökositler.	72/50	16q12.2-q21
MMP-16	MT-3MMP	MT-MMP.	Lökositler.	64/52	8q21
MMP-17	MT-4MMP	MT-MMP.	Beyin, meme kanseri	57/53	12q24
MMP-18	Kollojenaz-4 (Xenopus kollajenaz)	Kollajenazlar.	Kalp, akciğer	70/53	11q14
MMP-19	(RASI-1)	Diğer enzimler.	Karaciğer	54/45	12q14
MMP-20	(Enamelisin)	Diğer enzimler.	Diş minesini	54/22	11q22.3
MMP-21	(Xenopus-MMP)	Diğer enzimler.	Fibroblastlar, makrofajlar, plasenta	62/49	10q26.13
MMP-22	(Tavuk-MMP)	Diğer enzimler.	Tavuk fibroblastları	51	1p36.3
MMP-23	(CA-MMP)	Diğer enzimler.	Testis, prostat	28/19	1p36.3
MMP-24	(MT-5MMP)	MT-MMP.	Lökositler, akciğer, pankreas, böbrek, beyin.	57/53	20q11.2
MMP-25	(MT-6MMP)	MT-MMP.	Lökositler, glioblastomlar	34/28	16p13.3
MMP-26	Matrilisin-2, (Endometaz)	Matrilisinler.	Meme kanseri, endometrial tümörler	28/19	11p15
MMP-27	(İnsan MMP-22 homologu)	Diğer enzimler.	Kalp, lökositler, makrofajlar, böbrek, kemik, meme kanseri	-	11q24
MMP-28	(Epilisin)	Diğer enzimler.	Deri, keratinositler	56/45	17q21.1
MMP-29	isimlendirilmemiş	-	-	-	-

1.1.4 MMP'lerin Substratları

MMP substratları birçok yapısal hücre dışı matris (ECM) proteinlerini, diğer proteinazları, proteinaz inhibitörlerini, pıhtılaşma faktörlerini, büyüme faktörlerini, hücre yüzeyi reseptörlerini ve hücre-hücre yapışma moleküllerini içerir [33].

ECM üç ana bileşene sahiptir; lifler, proteoglikanlar ve polisakaritlerdir. Lifler büyük ölçüde kolajen ve elastin içeren glikoproteinlerdir [6].

Kolajenler insan vücudunda en bol bulunan proteinlerdir ve hücre dışı matriksin (ECM) ana bileşenleridir [34]. İstisnai olarak glikozillenmemiş elastinler ise cilt, arterler ve akciğerler için esneklik sağlar. Laminin, epitelin bazal laminasında lokalize olan bir glikoproteindir. Fibronektin, hücreleri ECM'ye bağlayan, hücre-hücre iskeletini düzenleyen ve hücre hareketini kolaylaştıran bir glikoproteindir. Proteoglikanlar, yapılarında proteinlerden daha fazla karbonhidrat içerir ve ECM'yi sulu tutmak için ortamdan su çeker. Proteoglikanlar, büyüme faktörlerinin ECM ortamına bağlanmasını sağlar ve depo eder. Proteoglikanlar, kırıkta, ligament ve aort duvarına gerilme mukavemeti sağlayan kondroitin sülfat, anjiyojenez ve kan pıhtılaşması gibi biyolojik aktiviteleri düzenleyen heparan sülfat, kırıkta ve kemikte ise keratan sülfat içerir. Sindekan-1, enflamatuvar süreç sırasında kemotaktik sitokinleri bağlayan bir proteoglikan ve integral transmembran proteinidir. Diğer ECM proteinleri, vitronektin, agrekan, enaktin, fibrin ve tenasin gibi glikoproteinleri ve hyaluronik asit gibi polisakaritleri içerir [6, 7].

Kollajen ailesi en az 28 üyeden oluşur [34]. Kollajenlerin üç α zincirinden oluşan üçlü sarmal yapısı, olağanüstü mekanik mukavemet, proteolitik enzimlere karşı geniş direnç sağlar. Kolajenler α zincirlerine göre sınıflandırılmıştır [34]. Kollajenler tip II ve III (Homotrimerik kollajenler) aynı sekansa sahip üç α zinciri içerir. Kollajen tip I (Heterotrimerik kollajenler) aynı sekansa sahip iki α zincirine ve farklı sekansa sahip bir α zincirini içerir. Kollajen tip VI ise farklı sekanslara sahip üç α zincirini içerir. En yaygın kollajenler (tip I, II, III, V ve XI) fibril yapılaradır. Tip I, II ve III kollajen, interstisyel kollajen alt ailesini oluşturur. İnterstisyel kollajenler, hücre dışı alanda hücrelere olan yakınlıklarından dolayı bu şekilde adlandırılır [34].

Kollajen, elastin, jelatin ve diğer matriks glikoproteinleri ve proteoglikanlar dahil olmak üzere çeşitli ECM proteinleri MMP'lerin substratlarıdır. Kollajen ve elastin, damar duvarının yapısal bütünlüğü için önemlidir ve önemli MMP substratlarıdır. MMP'ler kollajen tiplerini (tip I'den X'a kadar ve XIV) farklı etkinliklerle parçalamaktadır. MMP'ler, ECM'ye ait bazı protein formların tam bozulmalarını gerçekleştirmek için birkaç MMP'nin ortak etkinliğine ihtiyaç

duyabilir. MMP-1 ve MMP-8, fibril heliksleri parçalara ayırır ve üçlü sarmal yapılarını açar. Bu şekilde oluşturulan tekli α -zincirleri daha sonra jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) ile oligopeptidlere parçalanır.

Kazein fizyolojik bir MMP substratı olmasa da, birkaç MMP tarafından sindirilir [6]. Ayrıca IgG proteinleri MMP-3 ve MMP-7'nin substratlarıdır [35].

Tablo 1.2: MMP'lerin substratları [7, 22, 32].

MMP	Enzim ismi	Kollajen olan substratlar	Kollajen olmayan ECM kaynaklı substratlar	Diğer hedef ve substratlar
MMP-1	Kollajenaz-1 (intersitisyel kollojenaz)	I, II, III, VII, VIII, X, jelatin.	Agrekan, proteoglikan bağ proteini.	IL-1 β , pro-TNF- α .
MMP-2	Jelatinaz A	I, II, III, IV, V, VII, X, XI, jelatin	Agrekan, elastin, fibronektin, laminin, proteoglikan bağ proteini.	IL-1 β , pro-TNF- α , TGF- β .
MMP-3	Stromelisin-1	II, III, IV, IX, X, XI, jelatin.	Agrekan, elastin, fibronektin, laminin, perlekan, proteoglikan.	proMMP-1, -8 ve -9, pro-TNF-a.
MMP-7	Matrilisin-1	IV, X, jelatin.	Agrekan, elastin, fibronektin, laminin, proteoglikan bağlantı proteini.	proMMP-2, -7 ve -8, pro-TNF-a, syndecan.
MMP-8	Kollojenaz-2 (nötrofil-kollajenaz)	I, II, III, V, VII, VIII, X, jelatin.	Agrekan, elastin, fibronektin, laminin.	α 2-antiplazmin, proMMP-8.
MMP-9	Jelatinaz-B	IV, V, VII, X, XIV, jelatin.	Agrekan, elastin, fibronektin, laminin, proteoglikan bağ proteini.	IL-1, plazminojen, pro-TNF-a, TGF- β .
MMP-10	Stromelizin-2	III, IV, V, jelatin.	Agrekan, elastin, fibronektin, laminin.	ProMMP-1, proMMP -8 ve proMMP -10.
MMP-11	Stromelizin-3		Agrekan, fibronektin, laminin.	α 1-antitripsin, α 1-proteinaz inhibitörü.
MMP-12	(Makrofaj elastaz) Metalloelastaz	IV, jelatin.	Elastin, fibronektin, laminin.	plazminojen
MMP-13	Kollojenaz-3	I, II, III, IV, jelatin.	Agrekan, fibronektin, laminin, perlekan.	ProMMP-9 ve proMMP -13.
MMP-14	MT-1MMP	II, III, jelatin.	Agrekan, elastin, fibrin, fibronektin, laminin, perlekan, proteoglikan.	proMMP-2 ve ProMMP -13, Pro-TNF- α .
MMP-15	MT-2MMP	Jelatin.	Fibronektin, laminin.	ProMMP-2 ve ProMMP -13,
MMP-16	MT-3MMP		Agrekan, fibronektin, laminin, perlekan.	Kazein, proMMP-2 ve proMMP -13.
MMP-17	MT-4MMP	Jelatin	Fibrin.	-
MMP-18	Kollojenaz-4 (Xenopus kollajenaz)	II, III, jelatin.	-	α 1-antitripsin.
MMP-19	(RASI-1)	I, IV, jelatin.	Agrekan, fibronektin, laminin.	Kazein.

Tablo 1.2: (devam).

MMP-20	(Enamelisin)	V.	Agrekan, kırkırdak oligomerik proteini.	-
MMP-21	(Xenopus-MMP)	-	-	α 1-antitripsin
MMP-22	(Tavuk-MMP)	Jelatin.	-	-
MMP-23	(CA-MMP)	Jelatin.	-	-
MMP-24	(MT-5MMP)	Jelatin.	fibrin, fibronektin.	ProMMP-2 ve ProMMP -13
MMP-25	(MT-6MMP)	IV, jelatin.	-	proMMP-2, α 1-proteinaz inhibitörü
MMP-26	Matrilisin-2, (Endometaz)	IV, jelatin.	Fibrinojen, fibronektin.	Kazein, proMMP-2
MMP-27	(İnsan MMP-22 homologu)	-	-	-
MMP-28	(Epilisin)	-	-	kazein
MMP-29	-	-	-	-

1.1.5 MMP'lerin Etkinliğinin Düzenlenmesi

MMP'ler farklı seviyelerde düzenlenir: Gen ekspresyonu, proenzimlerin proteolitik aktivasyonu, katalitik aktivitenin Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (TIMP'ler), α ₂-makroglobulin veya biyolojik ve kimyasal ajanlar tarafından inhibe edilmesidir [3, 9, 36].

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), genomdaki spesifik pozisyonlarda meydana gelen tek nükleotid varyasyonlardır ve protein yapısını, transkripsiyon faktörü bağlanmasını, m RNA yıkımını veya kodlayıcı olmayan RNA'ların nükleotid dizilerini etkiler [37].

1.1.5.1 Transkripsiyonel Düzenlenme

MMP'ler, fizyolojik koşullarda temel seviyelerde ifade edilirler, ancak MAPK, JNK ve NF- κ B'ye bağımlı sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla bazı hormonlara, büyüme faktörlerine ve enflamatuar ve fibrojenik sitokinlere cevap olarak farklı şekilde ifade edilirler [36]. MMP ekspresyonu sayısız transkripsiyon faktörü ile düzenlenir. MMP'ler, promotorlarındaki cis-etkili eleman bağlama alanlarına dayalı olarak üç ana kategoride sınıflandırılmıştır. İlk kategoride bulunan MMP'lerde, transkripsiyon başlangıç bölgesinden -30 bp uzaklıkta TATA kutusu, -70 bp uzaklıkta aktivatör protein -1 (AP-1) bölgesi ve buraya bitişik bir polima güçlendirici aktivite -3 (PEA-3) bölgesi bulunur. İkinci kategoride yer alan MMP'ler (MMP-8, -11, ve -21), TATA kutusuna sahiptirler ama (AP-1) bölgesi bulundurmazlar. Son kategoride yer alan MMP'ler (MMP-2, -14, ve -28) ise TATA kutusu bulundurmazlar [38].

1.1.5.2 Proenzim Aşamasında Düzenleme

MMP'ler, ön-proenzimler olarak sentezlenir ve proMMP üretmek için çeviri sırasında sinyal peptidi (predomain) çıkarılır. ProMMP'lerde, sistein rezidüsünün katalitik domaindeki Zn^{2+} iyonu ile etkileşime girdiği ve pro-MMP'yi aktif olmayan formda tuttuğu bir "sistein anahtarı" motifi PRCGXPD bulunur [5].

Pro-MMP'lerdeki sistein- Zn^{2+} etkileşimi 'sistein anahtarı' olarak adlandırılır ve çinko atomuna bir su molekülünün bağlanmasını engeller. Pro-MMP'lerdeki, sistein anahtarının diğer proteazların proteolitik etkisi, nitrik oksit (NO), reaktif oksijen türleri (ROS) ve hipoksi süreçleri tarafından oluşturulan konformasyonel değişiklikler veya sodyum dodesil sülfat ve düşük pH gibi birçok farklı mekanizmalar tarafından bozulması durumunda, bir su molekülünü çinko atomuna bağlanmasına izin vererek tam aktivasyonu için propeptidi hidrolize etme yeteneği kazanır [4].

MMP-11, MMP-21, MMP -28 ve MT-MMP'ler, propeptidin C-ucunda furin benzeri enzim tanıma bölgesine sahiptirler ve hücre içi furin tarafından aktive edilirler [30].

MT-MMP'ler önce furin tarafından hücre içi aktivasyona uğrar, daha sonra diğer proMMP'leri parçalayabildiği ve aktive edebildiği hücre yüzeyine ilerler [39].

ProMMP-7, yüksek sülfatlı glikozaminoglikanlar (GAG'lar) ile aktive edilebilir [4].

MMP'lerde temel fizyolojik aktivatör plazmindir. Plazmin, ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü (uPA) tarafından aktif hale getirilir. Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ise, uPA üzerinde inhibitör etkiye sahip olup ve aktivasyon kaskadı ile zıt çalışır. uPA aracılı aktivasyon kaskadında bir MMP diğer MMP'yi aktif hale getirir. Plazmin, pro-MMP-1, pro-MMP-3 ve pro-MMP-9'u aktif hale getirir. Ardından MMP-3, pro-MMP-1'i aktif hale getirir. Aktif hale gelen MMP-1, MMP-9'u aktif forma dönüştürür. MMP-2, MMP-9 makrofajlar tarafından üretilen serbest radikallerin etkisiyle aktif hale gelirler [40, 41].

1.1.5.3 Enzim Aktivitesinin İnhibe Edilmesi.

MMP'ler hem endojen hem de eksojen inhibitörler tarafından inhibe edilir. TIMP'ler, MMP'lere 1/1 oranında bağlanan endojen MMP inhibitörleridir. TIMP'ler bir N-terminal alanına (125 aa) ve C-terminal alanına (65 aa) sahiptir ve her biri 3 disülfid bağı içerir. N-terminal alanı ayrı bir birim olarak katlanır ve MMP'leri inhibe edebilir [5, 26]. TIMP molekülü, MMP'nin aktif bölge yarığına substratinkine benzer bir şekilde bağlanır. Dört homolog TIMP tanımlanmış ve TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olarak adlandırılmıştır. TIMP-1 ve TIMP-3, glikoproteinlerdir. Fakat TIMP-2 ve TIMP-4 yapılarında karbonhidrat içermez. TIMP'ler, farklı etkinliklere sahip birden fazla MMP'yi inhibe edebilir. Örneğin, TIMP-2 ve TIMP -3, MT1-MMP ve MT2-MMP'yi inhibe ederken, TIMP-1, MT1-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP ve MMP-19'un zayıf bir şekilde inhibe eder [42].

Endojen TIMP'lere ek olarak, α 2-Makroglobulin, kan ve doku sıvılarında bulunan başka bir endojen MMP inhibitörüdür. MMP aktivitesi kısmen α 2-Makroglobulin ve ilgili proteinler tarafından düzenlenir. İnsan α 2-Makroglobulin dört aynı alt birimden oluşan bir glikoproteindir. α 2-Makroglobulin, MMP'ler dahil çoğu endopeptidazları, makroglobülin içine hapsederek inhibe eden geniş spektrumlu bir proteinaz inhibitörüdür [43].

1.1.6 MMP'lerin Fizyolojik ve Patolojik Süreçlerdeki Rollerini

MMP'lerin hücre sağkalımı, anjiyogenez, iltihaplanma, sinyal ve yara iyileşmesinin düzenlenmesinde ve çoğu zaman ECM'nin yeniden düzenlenmesinde rol oynarlar. Güçlü proteolitik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle, anormal MMP fonksiyonları, ateroskleroz, tümör metastazı ve sinir sistemi hastalıkları olan multipl skleroz, malign gliomalar ve alzheimer hastalığı gibi birçok patolojik koşullara da katkıda bulunabilirler [33].

MMP genlerinin promotor bölgesindeki genetik polimorfizmler, genlerin transkripsiyon aktivitesini değiştirerek canlıların çeşitli hastalıklara yatkınlığında önemli rol oynarlar [44].

Merkezi sinir sistemindeki ECM esas olarak proteoglikanlardan oluşur ve nöronal hücre gelişimi, hayatta kalma ve aktivite için gereklidir. MMP'ler sadece beyin ECM'sinin yeniden şekillenmesine ve aşırı bozunmasına katkıda bulunmazlar. Aynı zamanda mikroglial aktivasyon, iltihaplanma ve kan-beyin bariyeri (BBB) bozulması gibi merkezi sinir sistemindeki çeşitli biyolojik ve patolojik işlemlerde de rol oynarlar [45].

1.1.7 MMP-1

Aynı zamanda interstisyel kollajenaz ve fibroblast kollajenaz olarak da bilinen Matriks Metalloproteinaz-1 (MMP1), Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler) ailesinin bir üyesidir [46]. MMP1, 11q22 kromozomunda bulunur. Stromal fibroblast hücreleri, makrofajlar, endotel ve epitel hücreleri tarafından üretilir [47]. MMP-1'in inaktif formu 43 kDa, aktif formu 55 kDa ağırlığında olup interstisyel kollajeni parçalamada rol alır [48].

MMP1 fibril kollajenlerini ve elastin, fibronektin, agrekan gibi birkaç temel ECM bileşenini doğrudan parçalayabilir [49]. Matriks Metalloproteinaz-1 (MMP-1), interstisyel tip I, II, III kolajenleri ve ayrıca kazeinleri içeren çok çeşitli substratları bozabilir ve hücrel mikro-ortamın değişmesine katkıda bulunabilir [50]. MMP1, MMP8 ve MMP13 ile birlikte üçlü-heliks fibriller kolajenleri 3/4 ve 1/4 fragmanlarına parçalayabilmektedir [51].

Ayrıca, MMP1 G proteinine bağlı reseptör olan PAR-1'i proteolitik olarak aktif hale getirdiği ve sinyal yolları üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir [49].

MMP1 genin promotor bölgesi, AP-1, AP-2 ve Ets/PEA-3 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerin bağlanma bölgelerini içerir. Ayrıca glikokortikoidlere, retinoik asit ve siklik adenozin monofosfata duyarlı elemanlar içerir. Bu bölgedeki polimorfizmler, bu transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını etkileyerek MMP1 ekspresyonunu düzenleyebilir [52, 53]. MMP-1'in sentezi, tümör nekrozis faktörü-a (TNF-a) ve interleükin-1 (IL-1) gibi enflamatuar sitokinler ile artırılır [54].

MMP1 promotor bölgesi -1607 pozisyonunda G/2G olarak bilinen polimorfizm bir guaninin eklenmesi veya silinmesine bağlı olarak ekspresyon seviyesi etkilenir. Promotor bölgesi - 1607 pozisyonundaki bir guaninin insersiyonu ETS transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesi için bir bağlanma bölgesi (5'-GGA-3) oluşturur. Bu polimorfizm, normal fibroblastlarda ve melanom hücrelerinde 1G polimorfizminden anlamlı olarak daha yüksek ekspresyon seviyesine sahip olmasına yol açar [44, 55-57]. Bu Ets bağlama bölgeleri (-1607 bp), promotor aktivitesini en az 2 kat arttırmak için yakındaki bir AP-1 bölgesi (-1602 bp) ile işbirliği içinde çalışır [58].

1.1.8 MMP-3

Aynı zamanda stromelisin-1 olarak da bilinen MMP-3, 11q22.3 kromozomunda bir gen lokusuna sahiptir. MMP-3'un inaktif formu 57 kDa, aktif formu 46 kDa ağırlığındadır [48]. MMP-3, çinko kısmı kobalt, manganez, kadmiyum veya nikel iyonları ile değiştirilse bile proteaz yeteneğini korur, ancak değiştirilen maddeye bağlı olarak, proteaz aktivitesi farklı substratlara duyarlı hale gelir. MMP-3, kollajen tip II, IV ve IX'in yanı sıra çeşitli proteoglikanlar, elastin, fibronektin ve laminin'i degrade eder. MMP-3, MMP-1, MMP-7 ve MMP-9 da dahil olmak üzere doku remodelingi için gerekli diğer MMP'leri aktive edebilir [10].

MMP-3'ün proteolitik etkisi yüksektir. ECM üyeleri olan Proteoglikanlar, laminin, fibronektin, kollajen ve jelatini parçalamasının yanında pro-MMP'lerin bir kaçını aktif hale getirir.

Bu aktivasyon MMP-1'in tam aktivasyonu için gereklidir [59]. MMP-3, kondrositlerde ve fibroblastlarda büyüme faktörleri, sitokinler ile indüklenir [60].

MMP3 promotör bölgesi -1171 (-1612) pozisyonunda 5A/6A olarak bilinen polimorfizm bir adenin bazının delesyonundan kaynaklanmaktadır ve 5A alleli ile sonuçlanmaktadır [61, 62]. Bu polimorfizm transkripsiyon başlangıç noktasına göre -1608 ile -1612 (veya -1613) nükleotid pozisyonlarındadır [62]. 5A allel çinko bağlayıcı protein-89 (ZBP-89) veya nükleer faktör-kappa B (NF-κB) transkripsiyon faktörleri tarafından aracılık edilen artmış transkripsiyon seviyeleri ile karakterize edilir [61]. Diğer allel tipi ise 6 adenine sahip 6A allelidir. 5A Allel tipi, 6A Allelden iki kat daha yüksek bir promotör aktivitesine sahiptir [57, 63].

1.1.9 MMP-9

1974 yılında keşfedilen matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9), aynı zamanda jelatinaz B olarak da bilinir. Proteolitik enzimlerin süper ailesine aittir [14]. MMP-9 (jelatinaz-B), 20q11.2-q13.1 kromozomu üzerinde bir gen lokusuna sahip bir tip IV kollajenazdır [31, 64]. En yaygın araştırılan MMP'lerden biri olan MMP-9, birçok biyolojik süreçte hayati bir rol oynayan önemli bir proteazdır. İnsanlarda nötrofiller, makrofajlar, fibroblastlar ve endotel hücreler MMP-9'u sentezleyebilir ve salgılayabilir [23, 64]. Bu proteaz geniş bir substrat aralığına sahiptir. MMP-9'un önemli substratları arasında, jelatin, kolajen ve elastin bulunur. MMP-9, ECM yeniden yapılanması (remodeling) düzenlemek için proteolitik bölünme yoluyla birçok hücre dışı matris (ECM) proteinini bozabilir [23]. Bazı plazma membran proteinleri MMP-9'un hedefleridir. MMP-9, hücreler içinde aktive edildikten sonra hücre içi substratları da parçalayabilir [23].

Bazı çalışmalar, MMP-9'un bazı domainleri hakkındaki yapısal bilgiler ortaya koymuş olmalarına rağmen, enzimin tam yapısı hala bilinmemektedir. Enzim tam yapısının ortaya çıkarılmamasının bir nedeni, MMP-9'un bazı bölgelerinin, menteşe bölgesinin bazı kısımları gibi oldukça esnek olmasıdır [23].

İnsan MMP-9 geni 13 ekzon ve 12 intron içerir. İnsan MMP-9 proteini, hemopeksin benzeri domain, katalitik domain, sinyal peptidi bölgesi, menteşe alanı ve propeptit bölgesini içerir.

MMP-9'un katalitik domaini, fibronektin tip II (FN2) alanlarını, aktif bölgeyi ve çinko bağlama bölgesini içerir. Çinko bağımlı endopeptidazların bir üyesi olan MMP-9, katalitik domaininde iki çinko iyonu ve beş kalsiyum iyonu içerir. Fibronektin tip II (FN2) alanı MMP-9 için önemlidir. Bu alan bazı substratların bağlanması ve bozunması için önemlidir [23, 65]. Menteşe bölgesi, hemopeksin benzeri etki alanı ile katalitik etki alanı arasında bulunur. Bu bölge MMP-9 enzimi için esneklik sağlar. MMP-9'un Hemopeksin benzeri domaini katalitik bölgenin substrat tanınmasında ve (TIMP'ler)'i bağlamada rol oynar [23, 64].

MMP-9, hücreler içinde 19 amino asit N-terminal sinyal peptidi ile ön-proenzim olarak sentezlenir. Daha sonra, aktif olmayan pro-MMP-9 (yaklaşık 92 kDa) olarak hücre dışı ortama salgılanır. MMP-9'un aktivasyonu, pro-MMP-9'un salgılanmasından sonra diğer proteazlar tarafından bölünmesini gerektirir. N-terminal propeptit bölgesini kaybetmiş aktif MMP-9 yaklaşık 82 kDa'dur. Bir sistein anahtarı, MMP-9'un aktivasyonu için hayati öneme sahiptir. Pro-MMP-9 propeptidindeki bir sistein (Cys99) rezidüsü, bu proteinin katalitik çinko iyonu ile etkileşime girebilir. Bu etkileşim, Pro-MMP-9 korunma süresi için gereklidir. Propeptit bölgesinin proteolitik olarak uzaklaştırılması bu etkileşimi tamamen bozacaktır ve enzimi aktive edecektir. Aktivasyondan sonra MMP-9, substratlarını bölebilir. Proteolitik aktivasyona ek olarak, bazı ajanlar bazı reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit gibi MMP-9'un aktivitesini de etkileyebilir [23]. MMP-9 enzim aktiviteri, gen transkripsiyonu, pro-enzim aktivasyonu ve (TIMP) tarafından inhibe etme yoluyla kontrol edilir [66].

MMP-9, Transkripsiyonel seviyede birçok faktör tarafından düzenlenir. Bunların birkaç tanesi, E-26 (ETS) transkripsiyon faktörleri, NF-kB, serum amiloid A-aktive edici faktör (SAF) -1, Polima Güçlendirici Aktivite-3 (Pea3) ve spesifik protein 1 (SP-1)'dir [67].

MMP9 promotor bölgesi -1562 pozisyonunda C/T olarak bilinen polimorfizm, C'nin T ile yer değiştirmesiyle meydana gelir. İn vitro olarak sitozinin timin ile yer değişimi sonucunda, MMP-9 gen promotorunun bu lokasyonunda bir nükleer proteinin bağlanmasında kayıp olduğu ve makrofajlarda transkripsiyonel aktifliğin arttığı bilinmektedir [68, 69].

1.2 Uyku Apnesi

Uyku apnesi, uyku sırasındaki solunum duraklamaları ile karakterize birincil uyku bozukluğudur. 3 tür uyku apnesi vardır. Bunlar obstrüktif uyku apnesi, merkezi uyku apnesi ve karmaşık uyku apnesidir. Bir obstrüktif apne, hava akışının en az 10 saniye boyunca durması olarak tanımlanır ve uyku sırasında üst solunum yolunun tamamen veya kısmen tıkanmasından kaynaklanır. Buna karşılık, merkezi bir apne sırasında, hava akımının kesilmesi, genellikle beyin solunum merkezlerinden solunumu kontrol eden kaslara kadar nefes alma çabası olmadığında meydana gelir. Bazı hastalar, komplike uyku apnesi olarak adlandırılan hem obstrüktif hem de merkezi apnenin bir kombinasyonu ile ortaya çıkar [70].

Uyku apnesi polisomnografi sırasında teşhis edilebilir, burada uyku apnesinin şiddeti uyku saati başına solunum olaylarının sayısı ile belirlenir. Klinik semptomlarla birlikte uyku apnesinin tanısı için saatte en az 5 atak (Apne-Hipopne İndeksi ≥ 5) gereklidir [70]. Yaygın kriterlere göre, 5-14 arası bir Apne-Hipopne İndeksi hafif uyku apnesi, 15 ila 29 orta şiddette uyku apnesi, saatte 30'dan fazla olay ağır uyku apnesi olarak kabul edilmektedir. Risk altındaki hastaları belirlemek için uyku apnesi için çeşitli tarama ölçekleri geliştirilmiştir. Klinikte en sık kullanılanlardan biri STOP-BANG anketidir. Bu anket uyku apnesinin klinik belirtileri ile ilgili 4 evet ya da hayır sorusu içermektedir (S: horlama; T: gündüz yorgunluk; O: gözlenen apne; P: yüksek tansiyon). Ayrıca uyku apnesinin risk faktörleri olarak bilinen (B: vücut kitle indeksi > 35 , A: Yaş > 50 yıl, N: Boyun çevresi > 40 cm, G: erkek cinsiyet) 4 adet soru daha içerir. STOP-BANG anketinde 3 veya daha fazla soru olumlu cevaplanırsa, birey uyku apnesi riski altındadır [71].

Genel olarak orta yaşlı popülasyonda, orta ile şiddetli uyku apnesi erkeklerin yaklaşık %30-50'sinde ve kadınların %11-23'ünde bulunabilir [72, 73]. Klinik semptomlar, çoğunlukla yüksek sesle horlama, boğulma, soluk kesilmesi, aşırı uykululuk ve yorgunluk ve sabah baş ağrısını içerir. Uyku apnesinin hasta ve ailesinin yaşam kalitesini etkileyici etkileri vardır. Tedavi edilmediğinde, uyku apnesi aynı zamanda önemli olumsuz sağlık sonuçlarına da neden olabilir; hipertansiyon, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar riskini artırır [70, 74].

1.2.1 Obstrüktif Uyku Apnesi

Obstrüktif uyku apnesi (OSA) gittikçe yaygınlaşan uyku ile ilgili solunum bozukluğudur [75]. OSA, uyku sırasında faringeal hava yolunun periyodik olarak daralması ve tıkanması ile karakterize edilir [76, 77]. Gece uykusu kalitesi ve buna bağlı gündüz yorgunluğu ve uykululuk üzerindeki etkisi yaygın olarak kabul edilmektedir. Obstrüktif uyku apnesi, sistemik hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık, felç ve anormal glukoz metabolizması dahil olmak üzere çeşitli klinik sonuçlar için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir [75]. Eğer tedavi edilmezse, ciddi sağlık, ve ekonomik problemler ile sonuçlanır [78]. OSA patogenezi çok faktörlüdür ve anatomik” ve “anatomik olmayan” nedenleri vardır [79]. Son yıllarda, OSA patofizyolojisinde faringeal anatomi ve kraniyofasiyal yapı dışındaki faktörlerin rol oynadığı bilinmektedir [78, 79]. Birçok çalışma OSA'nın önemli sebebi olarak anatomik olmayan faktörleri gösterir [80]. OSA'nın oluşmasında anatomik olmayan nedenler arasında düşük solunum uyarılma eşiği, solunumun dengesiz kontrolü ve bozulmuş faringeal dilatör kas fonksiyonu bulunur [79]. OSA'da hava yolu tıkanıklığının sadece uyku sırasında meydana geldiği göz önüne alındığında, bireylerdeki anatomik ve anatomik olmayan nedenlerin birleşimi, bu yaygın sendromda çok önemli etkenlerdir [80-82].

Üst solunum yolunda 20'den fazla kas var. Bunlar solunum ve solunum dışı görevlerde (konuşma, çiğneme, yutma ve solunum) yer almaktadır. Bu kaslar solunum sırasında solunum yolu stabilitesinde baskın bir rol oynar [83]. Uyku sırasında, kas aktivitesinde duruma bağlı azalma, solunum yolunun kapanmasına neden olabilir [84]. Bu nedenle, hava yolu kaslarının sinir kontrolünü ve mekanik sonuçlarının anlaşılması, OSA'nın nedenleri ve önleyici tedbirlerin geliştirilmesi için önemlidir [79].

1.3 Amaç

Bu çalışmada amacımız MMP1 (rs1799750) -1607 1G/2G, MMP3 (rs35068180 veya rs3025058) -1171 (-1612) 5A/6A ve MMP9 (rs3918242) -1562 C/T değişimlerin Obstrüktif Uyku Apnesi ile ilişkisini tespit etmektir.

MMP'ler bağ dokusu ve fibroblastlar, osteoblastlar, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller ve lenfositler dahil olmak üzere pro-enflamatuar hücreler tarafından sentezlenir. MMP'ler embriyolojik gelişimden apoptoza kadar birçok hücrenel süreçte yer alırlar. Hücre çoğalması, göçü ve farklılaşmasını destekleyip, apoptozis, anjiyogenez, doku onarımı ve immün yanıtta rol oynarlar. Ayrıca artrit, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve periodontal hastalıklar gibi birçok hastalığın oluşmasında rol oynarlar.

Obstrüktif uyku apnesi (OSA) gittikçe yaygınlaşan uyku ile ilgili solunum bozukluğudur. OSA, uyku sırasında faringeal hava yolunun periyodik olarak daralması ve tıkanması ile karakterizedir. OSA patogenezi çok faktörlüdür ve anatomik” ve “anatomik olmayan” nedenleri vardır. Üst solunum yolunda 20'den fazla kas var ve solunum sırasında solunum yolu stabilitesinde baskın bir rol oynarlar. Bu nedenle, hava yolu kaslarının sinir kontrolünü ve mekanik sonuçlarının anlaşılması, OSA'nın nedenleri ve önleyici tedbirlerin geliştirilmesi için önemlidir.

Günümüzde uyku apne sendromunun patofizyolojisine neden olan mekanizmaların neler olduğuna dair birçok çalışma bulunmaktadır. Fakat henüz uyku apne sendromu neden olan mekanizma kesin olarak bilinmemektedir. Ayrıca uyku apnesi ile ilgili yapılan birçok çalışmada; hasta gruplarındaki bireylerin kanlarında MMP'lerin ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'ün gen ekspresyon seviyesini etkileyen promotor polimorfizmlerinin uyku apne sendromuyla ilişkili olup olmadığı araştırıldı.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve deneysel malzemeler; Fermantes, Biolabs ve Sigma'dan temin edilmiştir.

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan tüm laboratuvar cihazları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan cihazların listesi.

Cihaz İsmi	Firması
Nanodrop	Maestrogen MN-913
Buzdolabı, derin dondurucu	Beko, Türkiye ,Uğur ,Türkiye
Vorteks	Biosan Ombi-Spin
Santrifüj	Mikro 200R
Otoklav	Hirayama HV85
Laminar Flow Kabin	Logic Labconco
Mikrodalga fırın	Beko, Türkiye
PZR cihazı	Techne TC-3000X, Applied Biosystems Veriti 96 Well
Isıtmalı Manyetik karıştırıcı	Ika C-mag
Elektronik Hassas Tartı	Denver instrument
Etüv	Memmert in 55
Otomatik pipetler	Thermo scientific

Tablo 2.1: (devam).

pH metre	Hanna Instrument
Saf su cihazı	-
Elektroforezi güç kaynağı	Thermo scientific
Jel görüntüleme sistemi	-
Buz makinesi	-
DNA elektroforezi cihazı	Thermo scientific
Isıtıcı blok	Thermo scientific
Bilgisayar	Casper

2.1.2 PZR-RFLP Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler.

Bu çalışmada kullanılan deneysel malzemeler Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2: PZR-RFLP çalışmasında kullanılan malzemelerin listesi.

İsmi	Firması
Tris	Sigma
EDTA	Sigma
Asedik Asit (Asetat)	Sigma
Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri	Thermo scientific
Agaroz	Sigma
Etidyüm Bromür	Sigma
Taq DNA Polimeraz seti	İnvitrogen, thermo scientific
PureLink Genomik DNA Mini kit	İnvitrogen, ABD

Tablo 2.2: (devamı).

dNTP Seti	İnvitrogen
6X Loading Dye	Thermo scientific
100 Bp Plus DNA Ladder	Thermo scientific
Primerler	Sentegen
Etil Alkol	Thermo scientific

2.1.3 PZR Çalışmalarında Kullanılan Primerler.

Bu çalışmadaki amplifikasyon çalışması için kullanılan primerler Tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tablo 2.3: PZR’da kullanılan primerlerin listesi.

Primerler		Primer Dizisi (5’->-3’)	Baz uzunluğu	Tm sıcaklığı
MMP1 -1607	İleri Primer	CTATTTTCTTTGTCTGTGCTGGAGTC	26	56°C
	Geri Primer	TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCAGATC	29	56°C
MMP3 -1612 (-1171)	İleri Primer	GGTTCTCCATTCCTTTGATGGGGGGAAAG A	30	61°C
	Geri Primer	GGAATTCACATCACTGCCACCACTCTG	27	61°C
MMP9 -1562	İleri Primer	ATTATCTCCATCTCACAGTCTC	22	52°C
	Geri Primer	ATATTCACCTTCTTCAAAGCCC	22	52°C

2.1.4 RFLP Çalışmalarında Kullanılan Enzimler

Bu çalışmadaki RFLP reaksiyonları için kullanılan enzimler Tablo 2.4’de verilmiştir.

Tablo 2.4: RFLP reaksiyonunda kullanılan enzimlerin listesi.

Enzim Adı	Kesim Dizisi	İnkübasyon Şartı	İnaktivasyon Şartı
AlwI (BspPI)	5' GGATCNNNN↓ 3' 3' CCTAGNNNN↑ 5'	- 55 °C - 1-16 saat	-80 °C - 20 dakika
PsyI (Tth111I)	5' GACN↓NNGTC 3' 3' CTGNN↑NCAG 5'	- 37 °C - 5 dakika	- 80 °C - 5 dakika
PaeI (SphI)	5' GCATG↓C 3' 3' C↑GTACG 5'	- 37 °C - 5 dakika	- 65 °C - 5 dakika

2.1.5 PZR Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

PZR çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanma yöntemleri Tablo 2.5’de verilmiştir.

Tablo 2.5: PZR çalışmasında kullanılan çözeltilerin listesi.

İsmi	Hazırlanışı
10 mM dNTP Karışımı	Her bir nükleottiten (100 mM dATP , 100 mM dCTP, 100 mM dGTP, 100 mM dTTP) 10 µl alındı ve distile su ile 100 µl’ye tamamlanarak karıştırıldı.
100 µM stok İleri Primerler (MMP-1,MMP-3,MMP-9)	Kurutulmuş olarak teslim alınan ileri primerleri 100 µM stok haline getirebilmek için gerekli miktarlar kadar distile su eklenip çözdürüldü.
100 µM stok Geri Primerler (MMP-1,MMP-3,MMP-9)	Kurutulmuş olarak teslim alınan Geri primerleri 100 µM stok haline getirebilmek için gerekli miktarlar kadar distile su eklenip çözüldü.
10 µM İleri Primerler (MMP-1,MMP-3,MMP-9)	Her bir ileri primer için ayrı olarak; 100 µM stok İleri Primerden 10 µl alındı ve distile su ile 100 µl’ye tamamlanarak karıştırıldı.
10 µM stok Geri Primerler (MMP-1,MMP-3,MMP-9)	Her bir Geri primer için ayrı olarak; 100 µM stok Geri Primerden 10 µl alındı ve distile su ile 100 µl’ye tamamlanarak karıştırıldı.

2.1.6 Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Agaroz Jel Elektroforezi çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanma yöntemleri Tablo 2.6'da verilmiştir.

Tablo 2.6: Agaroz jel elektroforezi çalışmasında kullanılan çözeltilerin listesi.

İsmi	Hazırlanışı
50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu PH: 8.00	242 g Tris Base, 57,1 mL Asetat (%100 Asetik Asit), 100 mL 0,5 M EDTA (PH: 8.00) tartıldı. Üzeri distile su ile eklenerek 1 litreye tamamlandı.
1X TAE	20 ml 50X TAE tartıldı ve üzeri distile su ile 1 litreye tamamlandı.
50 bp ve 100 bp DNA Büyüklük Belirteci (0.083 µg/µL)	20 µl DNA ladder (0,5 µg/µl) ve 10 µL loading dye (6X) 40 µl distile suda çözdürülerek hazırlandı.
Etidyum Bromür Çalışma Solüsyonu	Son konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde etrafı alüminyum folyo ile sarılı şişede kullanıma hazır hale getirildi.

2.2 Metod

2.2.1 Biyoinformatik Analiz

2.2.1.1 PZR-RFLP Çalışması için Primer Tasarımı ve Kesim Enzimi Seçimi

MMP-1 -1607 G/2G, MMP-3 -1612 (-1171) 5A/6A ve MMP-9 -1562 C/T SNP'lerin konumlandığı promotor bölgelerindeki nükleotid dizilerine erişim, bu Tek Nükleotid Polimorfizmlere (TNP) ait "rs numaraları" NCBI SNP veri tabanına (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) girilerek sağlandı.

PZR-RFLP yönteminde MMP-1 -1607 G/2G, MMP-3 -1612 5A/6A ve MMP-9 -1562 C/T değişimlerin seçiciliğini sağlayacak olan kesim enzimlerinin tespiti için Restriction Mapper version3 (<http://www.restrictionmapper.org>) kullanıldı.

MMP1 geni promotor bölgesi - 1607 konumundaki TNP'ye ait G ve 2G allel tiplerinin, MMP3 geni promotor bölgesi -1612 konumundaki TNP'ye ait 5A ve 6A allel tiplerinin ayırımı sağlayacak herhangi bir kesim enzimine ait tanıma bölgesi bulunmadığından dolayı diziler üzerinde nükleotid değişimi yapılarak Tablo 2.7'de gösterilen MMP1 2G allel tipi için Alw I kesim enzimine ait tanıma bölgesi, Tablo 2.8'de gösterilen MMP3 5A alleli tipi için PsyI (Tth111I) tanıma bölgesi oluşturuldu. Yapılan bu tek nükleotidlik değişimlerin primer vasıtasıyla hedef DNA'dan çoğaltılacak PZR ürünüde var olması için MMP1 geninde geri primer ters komplementer nükleotid dizisinde olması, MMP3 geninde ise ileri primer nükleotid dizisinde olması hedeflendi. Daha sonra çoğaltılacak PZR ürününün büyüklüğü göz önünde bulundurularak, MMP1 genine ait ileri primer dizisi, MMP 3 genine ait geri primer ters komplementer dizisi belirlendi.

Tablo 2.7: MMP1 -1607 G/2G PZR ile çoğaltılacak DNA bölgesi.

```
5'CTATTTCTTTGTCTGTGCTGGAGTCACTTCAGTGGCAAGTGTCTTTGGTCTCTGCCGCACCCTCCC  
TCTGATGCCTCTGAGAAGAGGATTTCTTTTTGTGAGAATGTCTTCCCATTCTTCTTACCCTCTTGAA  
CTCACATGTTATGCCACTTAGATGAGGAAATTGTAGTTAAATAATTAGAAAAGNAT(A→C)TGACTTATCT  
ALW I  
CAAATCAATCCAAG3'
```

Tablo 2.8: MMP3 -1612 5A/6A PZR ile çoğaltılacak DNA bölgesi.

```
5'GGTTCTCCATTCCCTTTGATGGGGGGAAA(A→G)ANCCATGTCCTTGTCTGCTGATTG  
PsyI (Tth111I)  
AAATACAGGGAAAATATTTGGCCACATTGATATGAGGACAAGGAGAAACAGAGT  
GGTGGCAGTGATGTGAATTCC3'
```

MMP 9 geni promotor bölgesi -1562 konumundaki TNP' ye ait T alleli, NspI, SphI, NlaIII kesim enzimlerin tanıma bölgesine sahip olması sebebiyle dizi üzerinde başka kesim enzimin tanıma dizisini oluşturacak nükleotid değişikliğine gerek duyulmadan Tablo 2.9'da gösterilen ileri primer ve geri primer ters komplementer dizisi belirlendi.

Tablo 2.9: MMP9 -1562 C/T PZR ile çoğaltılacak DNA bölgesi.

```
ATTATCTCCATCTCACAGTCTCATTATTAGATAAGCATATAAAATGCCTGGCACATAGTAGGCCCTTTAAATAC
AGCTTATTGGGCCGGGCGCCATGGCTCATGCCCGTAATCCTAGCACTTTGGGAGGCCAGGTGGGCAGATCAC
TTGAGTCAGAAGTTCGAAACCAGCCTGGTCAACGTAGTGAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAAATTTA
GCCAGGCGTGGTGGCGCA(C/T)GCCTATAATACCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAAC
CCGGGAGGCAGATGTTGCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTGACAGAGTGATACTAC
ACCCCCAAAAATAAAATAAAATAAAATAACAACCTTTTGTAGTTGTTAGCAGGTTTTTCCCAAATAGGGCTT
TGAAGAAGGTGAATAT
```

Belirlenen MMP1 MMP3 MMP9 genlerine ait geri primer ters komplementer dizileri <https://www.bioinformatics.org>'un "reverse complement" veri tabanını kullanarak geri primerlere dönüştürüldü.

Böylece belirlenen TNP'lerin PZR-RFLP Metoduyla analiz edilmesi için Tablo 2.10'da gösterildiği gibi ileri ve geri primerler tasarlandı. Daha sonra NCBI BLAST veri tabanına (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn>) girilerek her primer dizisinin E değerine (E value) ve primer çiftlerin hedef dizi amplifikasyonu için de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> girilerek kontrol edildi.

Tablo 2.10: Hedef genlerin PZR-RFLP çalışması için tasarlanan primerler.

Gen ismi	Pozisyon	Primer İsmi	Primer Dizisi (5'->-3')	Baz Uzunluğu (bp)
MMP 1	-1607	İleri primer	CTATTTTCTTTGTCTGTGCTG GAGTC	26
		Geri primer	TCTTGGATTGATTTGAGATA AGTCAGATC	29
MMP 3	-1612 (-1171)	İleri primer	GGTTCTCCATTCCTTTGATG GGGGGAAAGA	30
		Geri primer	GGAATTCACATCACTGCCAC CACTCTG	27
MMP 9	-1562	İleri primer	ATTATCTCCATCTCACAGTC TC	22
		Geri primer	ATATTCACCTTCTTCAAAGC CC	22

Tasarlanan primerlerle çoğaltılacak MMP1 -1607 G/2G, MMP3 -1612 5A/6A ve MMP9 -1562 C/T genlerine ait allel tipleri için seçilen kesim enzimi ve kesim sonucunda elde edilecek DNA parçaları Tablo 2.11’de gösterildi.

Tablo 2.11: Seçilen kesim enzimleri ve kesilen allel tipleri.

Seçilen Enzim	Gene Ait Allel Tipi	Allel Baz Uzunluğu (Bp)	Kesim Sonucu (Bp)
AlwI 5' GGATCNNNN↓ 3' 3' CCTAGNNNNN↑ 5'	MMP1 -1607 G allel	- 216 bp	- Kesim yok
	MMP1 -1607 2G allel	- 217 bp	- 196 bp - 20 bp
. PstI (Tth1111) 5' GACN↓NNGTC 3' 3' CTGNN↑NCAG 5'	MMP3 -1612 6A allel	- 124 bp	- Kesim yok
	MMP3 -1612 5A allel	- 123 bp	- 90 bp - 32 bp
PaeI (SphI) 5' GCAT G↓C 3' 3' C↑G TACG 5'	MMP9 -1562 C allel	- 451 bp	- Kesim yok
	MMP9 -1562 T allel	- 451 bp	- 236 bp - 211 bp

Çalışmamızda bu biyoinformatik bilgiler doğrultusunda PZR-RFLP sonucunda beklenene bant büyüklükleri Tablo 2.12’de olduğu gibi saptandı.

Tablo 2.12: PZR-RFLP sonucunda beklenen bant büyüklükleri ve genotip analizi.

Gen	Genotip	PZR-RFLP Analizinde Beklenen Bant Büyüklükleri (Bp)
MMP1 -1607	1G1G	- 216 bp
	1G2G	- 216 bp - 196 bp - 20 bp
	2G2G	- 196 bp - 20 bp
MMP3 -1612	5A5A	- 90 bp - 32 bp
	5A6A	- 124 bp - 90 bp - 32 bp
	6A6A	- 124 bp
.MMP9 -1562	CC	- 451 bp
	CT	- 451 bp - 236 bp - 211 bp
	TT	- 236 bp - 211 bp

2.2.2 Genotip Analizi

Bu çalışmada hedef genlerin Tek Nükleotid Polimorfizmini (TNP) tespit etmek için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı. RFLP ürünleri Agaroz Jel Elektroforezi cihazında yürütüldükten sonra görüntülenerek genotip tespiti yapıldı.

2.2.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmamızda kandan Genomik DNA İzolasyonu için 250 preplik PureLink DNA Mini Kiti (Invitrogen) kullanıldı. Firma tarafından belirlenen ve aşağıda gösterilen kit protokolü adım adım uygulanarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. Hemogram tüplerinden alınan 200 µL kan örnekleri 1,5 mL'lik Steril mikrosantrifüj tüplere aktarıldı.
2. Üzerine 20 µl proteinaz K ve RNase A eklenip 15 saniye boyunca vortekslendi ve ardından oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
3. 200 µl Lizis/binding buffer ilave edildi ve 15 saniye boyunca vortekslendi.
4. 55°C'ye ayarlanmış termal blokta 10 dakika boyunca inkübe edildi.
5. Mevcut lizatın üzerine 200 µl % 96-100'lük etanol eklendi ve 5 saniye boyunca vortekslendi.
6. Meydana gelen 640 µl'lik lizatı kolon tüplere aktarıldı ve 10,000 x g' de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Toplama tüpü çıkartılarak uzaklaştırıldı ve yerine yeni toplama tüpü yerleştirildi.
8. Kolon tüpüne 500 µL wash buffer 1 eklenerek DNA yıkama işlemine başlandı.
9. 10,000 x g' de 1 dakika santrifüj edildi ve ardından toplama tüpü çıkartılıp yerine temiz toplama tüpü yerleştirildi.
10. Kolon tüpüne 500 µl wash buffer 2 eklenerek DNA yıkama işlemine devam edildi.
11. En yüksek devirde 3 dakika santrifüj edildi ve ardından toplama tüpü çıkartılıp elüsyona uygun (kapaklı) temiz toplama tüpü yerleştirildi.
12. Elüsyon için kolona 102 µl elüsyon buffer eklenip oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi.
13. En yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilerek toplama kabında Genomik DNA elde edildi.

İzolasyon sonucunun değerlendirilmesi için genomik izolatlar %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Daha sonra izolatların sahip oldukları konsantrasyon ve kirlilik değerlerini saptamak için nanodrop cihazında ölçüldü ve değerleri kayıt altına alındı.

Ardından bütün izolatlar eşit konsantrasyona sahip olacak şekilde seyreltilerek hedef genlerin PZR ile çoğalma reaksiyonuna hazır hale getirildi. Daha sonra -20 °C' de koruma altına alındı.

2.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

2.2.2.2.1 MMP-1 -1607 G/2G, MMP-3-1612 5A/6A ve MMP-9-1562 C/T Hedef Genlerinin PZR ile Amplifikasyonu

MMP-1 -1607 G/2G, MMP-3-1612 5A/6A ve MMP-9-1562 C/T genlerinin promotor bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirmek için PZR yöntemi kullanıldı. Bu işlem için MMP-1 geni -1607, MMP-3-1612 ve MMP-9-1562 genlerine ait primerler kullanılarak son hacim 50 µl olacak şekilde çalışma solüsyonu hazırlandı. Tablo 2.13'de gösterildiği gibi Taq Polimeraz enzimi haricindeki diğer bileşenler PZR tüpüne konularak nazikçe karıştırıldı ve ardından kısaca santrifüj edildi. Daha sonra taq polimeraz enzimi eklenerek hızlıca PZR cihazına yerleştirildi.

Tablo 2.13: PZR bileşenleri.

PZR İçeriği	Kullanılan miktar ve stok konsantrasyonu		
	MMP-1 – 1607 G/2G	MMP-3-1612 5A/6A	MMP-9 -1562 C/T
Kalıp DNA	5 µl (20 ng/µl)	5 µl (20 ng/µl)	5 µl (20 ng/µl))
10X tampon KCl	5 µl (10X)	5 µl (10X)	5 µl (10X)
dNTP mix	1 µl (10 mM)	1 µl (10 mM)	1 µl (10 mM)
MgCl ₂	5.5 µl (25 mM)	5 µl (25 mM)	4 µl (25 mM)
İleri Primer	1 µl (10 mM)	1 µl (10 mM)	1 µl (10 mM)
Geri primer	1 µl (10 mM)	1 µl (10 mM)	1 µl (10 mM)
Taq DNA polimeraz	0.25 µl (5U/ µl)	0.25 µl (5U/ µl)	0.25 µl (5U/ µl)
dH ₂ O	31.75 µl	32.25 µl	32.25 µl
Toplam Hacim	50 µl	50 µl	50 µl

PZR programına uygun koşullar girilerek reaksiyon başlatıldı. PZR ile amplifikasyonu gerçekleştirmek için kullanılan PZR koşulları Tablo 2.14'de gösterilmiştir.

Tablo 2.14: Hedef genlerin PZR koşulları.

PZR AŞAMASI	PZR Koşulları			
	MMP1 - 1607 G/2G	MMP3-1612 5A/6A	MMP9 -1562 C/T	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94°C, 5 dk	94°C, 5 dk	94°C, 5 dk	1
Denatürasyon	94°C, 1 dk	94°C, 1 dk	94°C, 1 dk	35
Primer Bağlanması	55,5°C, 1 dk	61°C, 1 dk	52°C, 1 dk	
Uzama	72°C, 1 dk	72°C, 1 dk	72°C, 1 dk	
Son Uzama	72°C, 5 dk	72°C, 5 dk	72°C, 5 dk	1
Bekleme	+4°C, ∞	+4°C, ∞	+4°C, ∞	∞

İlgili genlerin PZR ile amplifikasyon sonuçlarını incelemek için Agaroz Jel Elektroforezi kullanıldı. PZR ürünleri %1,5 agaroz jelde yürütülerek görüntüledi.

2.2.2.3 PZR Ürünlerinin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP)

2.2.2.3.1 MMP-1 G/2G PZR Ürünün RFLP Reaksiyonu

MMP-1 –1607 G/2G polimorfik bölgesinin PZR ile çoğaltılan ürünü AlwI (BspPI) Enzimi ile kesilmiştir. Tablo 2.15’de gösterildiği gibi malzemeler PZR tüpüne konularak 32 µL’lik RFLP reaksiyon çalışma solusyonu hazırlandı. Ardından hafifçe karıştırılıp, kısa sürede santrifüj edildi. RFLP reaksiyonunu optimum seviyede gerçekleştirmek için 55°C’ye ayarlanmış termal blokta 16 saat inkübe edildi. RFLP reaksiyonunu sonlandırmak için ise reaksiyon tüpü 80 °C’de 20 dakika bekletilerek, AlwI (BspPI) enzimi inaktive edildi. RFLP reaksiyon sonucunda PZR ürünü sahip olduğu 216 bp’lik G allelinde kesim olmayacak, 2G allelinde ise kesim olacak ve 196 bp, 20 bp şeklinde fragmentler meydana gelecektir.

Tablo 2.15: MMP-1 – 1607 G/2G RFLP reaksiyon içeriği.

RFLP Reaksiyon İçeriği	Kullanılan miktar ve stok konsantrasyonu
PZR ürünü	10 l (0.5 g/ l)
Buffer Tango	2 l (10X)
AlwI (BspPI) Enzim	2 l (2U/l)
Su (dH ₂ O)	18 l
Toplam Hacim	32 l

AlwI (BspPI) Enzim ile kesilen PZR rnlerini(RFLP) incelemek için Agaroz Jel Elektroforezi kullanıldı. RFLP rnlerinin kontrolü % 3,5'luk Agaroz Jelde yürütülerek görüntülendi. AŞağıdaki Tablo 2.16'da gösterildiği gibi Agaroz jelde gözlemlenen RFLP bant büyüklükleri ile genotip saptandı.

Tablo 2.16: MMP-1 – 1607 G/2G RFLP ürünü ve genotip tipleri.

Gen	Genotip	PZR-RFLP Beklenen Bant Büyüklükleri (Bp)
MMP1 -1607	1G1G	- 216 bp
	1G2G	- 216 bp
		- 196 bp
2G2G	- 20 bp	
	- 196 bp	
		- 20 bp

2.2.2.3.2 MMP-3 -1612 5A/6A PZR rnn RFLP Reaksiyonu.

MMP3 -1612 5A/6A polimorfik bölgesinin PZR ile çoğaltılan ürünü PstI (Tth111I) enzimi ile kesilmiştir. Tablo 2.17'de gösterildiği gibi malzemeler PZR tüpüne konularak 30 l 'lik RFLP reaksiyon çalışma solusyonu hazırlandı. Ardından hafifçe karıştırılıp, 15 saniye santrifüj edildi. RFLP reaksiyonunu optimum seviyede gerçekleştirmek için 37°C'ye ayarlanmış termal blokta 25 dakika inkübe edildi.

RFLP reaksiyonunu sonlandırmak için ise reaksiyon tüpü 80 C'de 5 dakika bekletilerek PstI (Tth111I) enzimi inaktive edildi.

RFLP reaksiyon sonucunda PZR ürünü 124 bp'lik 6A alleleline sahip ise kesim olmayacak, 123 bp'lik 5A alleleline sahip ise kesim olacak ve 90-32 bp şeklinde fragmentler ortaya çıkacaktır.

Tablo 2.17: MMP3 -1612 5A/6A RFLP reaksiyon içeriği.

RFLP Reaksiyon İçeriği	Kullanılan miktar ve stok konsantrasyonu
Pcr ürünü	10 µl (0.2 µg/ µl)
FastDiegest Green Buffer	2 µl (10X)
PsyI (Tth111I) FastDigest enzim	1 µl (10U/µl)
Su (dH2O)	17 µl
Toplam Hacim	30 µl

PsyI (Tth111I) Enzim ile kesilen PZR ürünlerini (RFLP) incelemek için Agaroz Jel Elektroforezi kullanıldı. RFLP ürünlerin kontrolü % 3,5'luk agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Tablo 2.18'de gösterildiği gibi Agaroz jelde gözlemlenen RFLP bant büyüklükleri ile genotip saptandı.

Tablo 2.18: MMP3 -1612 5A/6A RFLP ürünü ve genotip tipleri.

GEN	GENOTİP	PZR-RFLP Beklenen Bant Büyüklükleri (bp)
MMP3 -1612	5A5A	- 90 bp - 32 bp
	5A6A	- 124 bp - 90 bp - 32 bp
	6A6A	- 124 bp

2.2.2.3.3 MMP-9 -1562 C/T PZR Ürünün RFLP Reaksiyonu

MMP9 -1562 C/T polimorfik bölgesinin PZR ile çoğaltılan ürünü PaeI (SphI) Enzimi ile kesilmiştir. Tablo 2.19’da gösterildiği gibi malzemeler PZR tüpüne konularak 30 µl’lik RFLP reaksiyon çalışma solüsyonu hazırlandı.

Ardından hafifçe karıştırılıp, kısa sürede santrifüj edildi. RFLP reaksiyonunu en uygun seviyede gerçekleştirmek için 37°C’ye ayarlanmış termal blokta 25 dakika inkube edildi. RFLP reaksiyonunu sonlandırmak için ise reaksiyon tüpü 65°C’de 5 dakika bekletilerek PaeI (SphI) enzimi inaktive edildi. RFLP reaksiyon sonucunda PZR ürünü C alleleline sahip ise kesim olmayacak, T alleleline sahip ise kesim olacak ve 236-211 bp şeklinde fragmentler oluşacaktır.

Tablo 2.19: MMP9 -1562 C/T RFLP reaksiyon içeriği.

RFLP Reaksiyon İçeriği	Kullanılan miktar ve stok konsantrasyonu
Per ürünü	10 µl (0.2 µg/ µl)
FastDiegest Green Buffer	2 µl (10X)
PaeI (SphI)	1 µl (10U/µl)
Su (dH ₂ O)	17 µl
Toplam Hacim	30 µl

PaeI (SphI) enzim ile kesilen PZR ürünlerini (RFLP) incelemek için Agaroz Jel Elektrofrezisi kullanıldı. RFLP ürünlerinin kontrolü % 3,5’luk Agaroz Jelde yürütülerek görüntülendi. Tablo 2.20’de gösterildiği gibi Agaroz jelde gözlemlenen RFLP bant büyüklükleri ile genotip saptandı.

Tablo 2.20: MMP9 -1562 C/T RFLP ürünü ve genotip tipleri.

Gen	Genotip	PZR-RFLP Beklenen Bant Büyüklükleri (Bç)
MMP9 -1562	CC	- 451 bp
	CT	- 451 bp - 236 bp 211 bp
	TT	- 236 bp - 211 bp

2.2.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi

Bu çalışmada RFLP ürünlerin yürütmek için Agaroz Jel Elektroforezi kullanılmıştır. Genomik DNA'ları değerlendirmek için % 1'lik agaroz jel, hedef genlerin PZR ürünlerini değerlendirmek için % 1,5'luk agaroz jel ve ilgili genlerin RFLP ürünlerini değerlendirmek için de % 3,5'luk agaroz jel kullanılmıştır.

Bu çalışmadaki Agaroz Jel Elektroforezinin çalışma alanı ve kullanım koşulları Tablo 2.21'de gösterilmiştir.

Tablo 2.21: Agaroz jel elektroforezi çalışma içerikleri ve şartları.

YÖNTEM	JEL (%)	JEL BİLEŞENLERİ	KULLANILAN DNA KAYNAĞI	YÜKLEME KOŞULU	YÜRÜTME KOŞULU
DNA izolasyonu	% 1'LİK	- 50 ml 1X TAE - 0.5 gr toz agaroz - 2 µl EtBr	DNA İZOLATLARI	- 5 µl genom izolatları - 1 µl 6X DNA loading dye - 4 µl 100 bp DNA ladder - 4 µl 50 bp DNA ladder	-90 V -220 A -40 dk
PZR	% 1,5'luk	- 50 ml 1X TAE - 0.75 gr toz agaroz - 2.5 µl EtBr	MMP-1 MMP-3 MMP-9	- 8 µl PZR ürünü - 1.5 µl 6X DNA loading dye - 3 µl 100 bp DNA ladder - 3 µl 50 bp DNA ladder	-90 V -220 A -40 dk
RFLP	% 3,5'luk	- 50 ml 1X TAE - 1.75 gr toz agaroz - 3 µl EtBr	MMP-1	- 16 µl RFLP ürünü -2 µl 6X DNA loading dye - 2µl 100 bp DNA ladder -2 µl 50 bp DNA ladder	-90 V -220 A -85 dk
			MMP-3	-15 µl RFLP ürünü -2 µl 100 bp DNA ladder - 2 µl 50 bp DNA ladder	-90 V -220 A -85 dk
			MMP-9	-15 µl RFLP ürünü -2 µl 100 bp DNA ladder -2 µl 50 bp DNA ladder	-90 V -220 A -60 dk

Tablo 2.21'de gösterildiği gibi istenilen konsantrasyonlarda ve hacimlerde jel hazırlanması için gerekli miktarlardaki agaroz ve 1X TAE solüsyonu erlenmayere eklenerek karıştırıldı. Ardından mikrodalga fırında 1-1,5 dakika kaynatılarak çözdürüldü. Homojen karışım 60-80°C'ye kadar soğutuldu. Polimerleşme reaksiyonu gerçekleşmeden, istenilen konsantrasyonda jel için 0,5-0.75 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde etidyum bromür eklendi ve çalkalanarak homojen bir şekilde karışması sağlandı. Jel kalıbı elde edilmesi için karışım, jel standına döküldü. Yükleme kuyucuğu eldesi için de jel tarakları takıldı ve soğumaya bırakıldı. Polimerleşme reaksiyonundan sonra jelden taraklar çıkarıldı.

Agaroz jel, elektroforezi tankına yerleştirildi ve jel yüzeyini 1cm geçecek şekilde tankın içine 1X TAE doldurularak yüklemeye hazır hale getirildi.

MMP-3 ve MMP-9 PZR ürünleri için RFLP reaksiyonu gerçekleştirilirken kullanılan enzim sistemine ait tampon (green buffer) floresan boya içeriğine sahip olduğu için ekstra yükleme boyası kullanılmamıştır.

Tablo 2.21’de belirtildiği gibi kuyucuklara markör ve belirtilen miktarlarda örnek ve yükleme boyası karışımı yüklenerek katoddan anoda doğru DNA yürütme işlemi gerçekleştirildi.

Yürütme sonrasında jel görüntüleme işlemi; jel görüntüleme sisteminde yapıldı ve fotoğrafı çekilerek bilgisayarda kayıt altına alındı.

2.2.3 İstatistiksel Analiz

DeneySEL sonuçların istatistiksel analizi için SPSS versiyon 20.0 programı kullanılarak yapıldı. MMP-1, MMP-3, MMP-9 genotip dağılımları Hardy Weinberg eşitliği ile değerlendirildi. Tanımlayıcı analizler normal dağılan değişkenler için ortalama ve standart sapma kullanılarak verildi. Ortalama, standart sapma, medyan (ortanca), minimum değer, maksimum değer gibi niceliksel verilerin karşılaştırılmasında student t testi kullanıldı. Pearson Chi-Square Test ise niteliksel verilerin karşılaştırılmasında kullanıldı. P değeri 0,05 altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

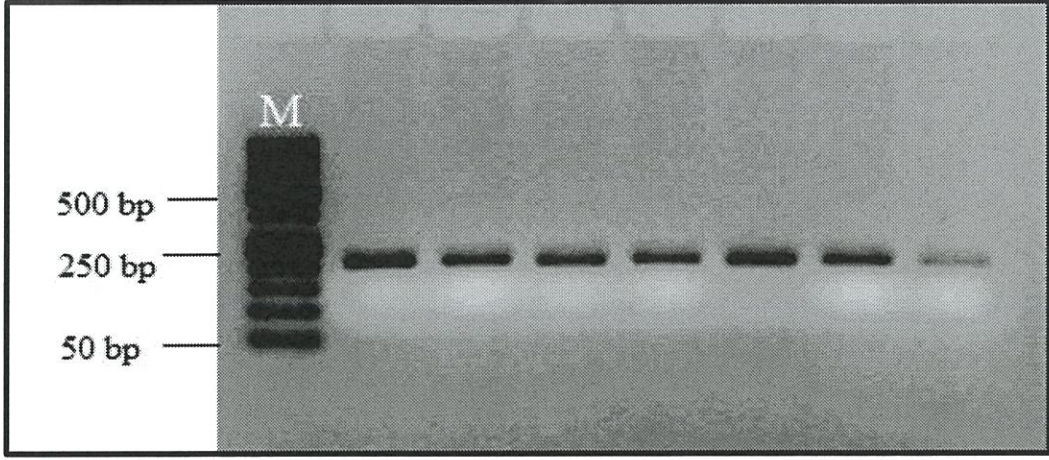
3. BULGULAR

3.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MMP-1 -1607 G/2G, MMP-3 -1171 (-1612) 5A/6A ve MMP-9-1562 C/T genlerinin promotor bölgesindeki polimorfik bölgenin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için PZR yöntemi kullanıldı. OSA hastalarından ve kontrol grubuna dahil edilen bireylerden toplanan kan örnekleri, Bölüm 2.2.22.2.2.1'de anlatıldığı gibi üretici firmaya ait kit protokolü uygulanarak DNA izolasyonu yapıldı. İlgili gen bölgelerinin PZR ile amplifikasyonunu gerçekleştirmek için Tablo 2.3'de verilen MMP-1 geni -1607, MMP-3-1612 (-1171) ve MMP-9-1562 primerleri kullanılarak, Tablo 2.13'de verilen PZR bileşenleri karıştırılarak PZR cihazına yerleştirildi. Tablo 2.14 verilen koşullarda PZR ile amplifikasyon gerçekleştirildi. PZR ürünleri Tablo 2.21'de verildiği gibi agaroz jel elektroforezde yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi. Jeldeki PZR ürünlerin büyüklüğü Tablo 2.12'de verilen büyüklüklerle karşılaştırılarak kontrol edildi.

3.1.1 MMP-1 – 1607 G/2G PZR Ürünü

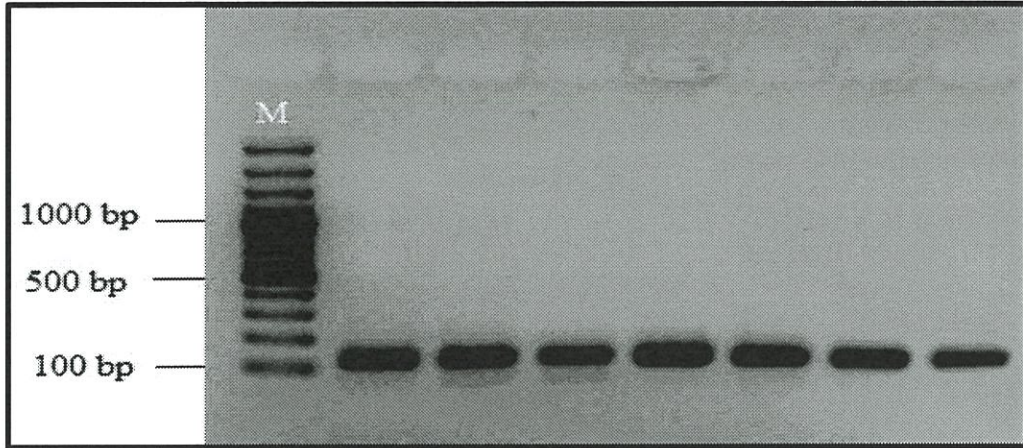
Obstrüktif uyku apnesi (OSA) hastalarına ve kontrol grubundaki bireylere ait DNA'lar kullanılarak MMP-1 -1607 G/2G polimorfik bölgesi çoğaltıldı. PZR sonucunda oluşan 216 bp'lik PZR ürünleri, 50 bp marker kullanılarak % 1,5'lük agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1: MMP-1 -1607 G/2G polimorfik bölgesinin PZR ürünü, 50 bp marker kullanılarak elde edilen % 1,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü.

3.1.2 MMP3 -1612 (-1171) 5A/6A PZR Ürünü

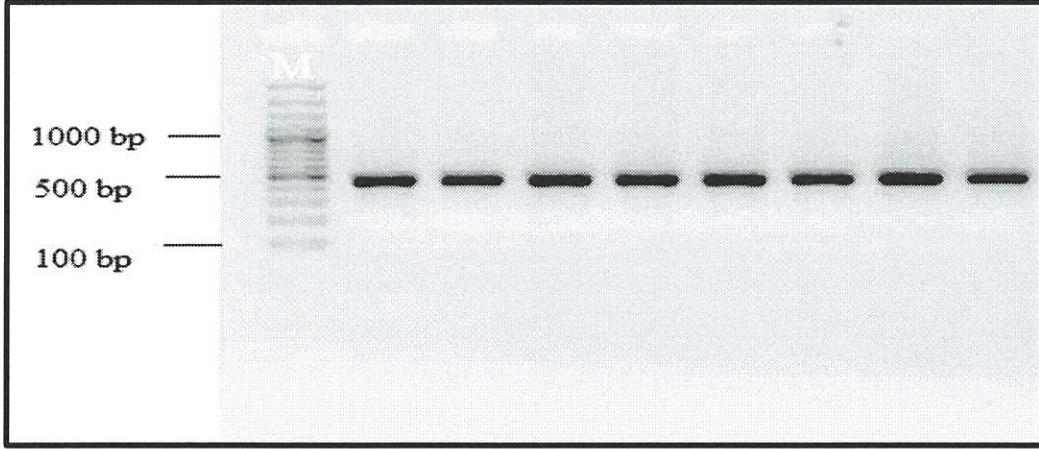
OSA hastalarına ve kontrol grubundaki bireylere ait DNA'lar kullanılarak MMP-3 -1612 (-1171) 5A/6A polimorfik bölgesi çoğaltıldı. PZR sonucunda oluşan 124 bp'lik PZR ürünleri, 100 bp marker kullanılarak % 1,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2: MMP-3 -1612 (1171) 5A/6A polimorfik bölgesinin PZR ürünü, 100 bp marker kullanılarak elde edilen % 1,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü.

3.1.3 MMP9 -1562 C/T PZR Ürünü

OSA hastalarına ve kontrol grubundaki bireylere ait DNA'lar kullanılarak MMP-9 -1562 C/T polimorfik bölgesi çoğaltıldı. PZR sonucunda oluşan 451 bp'lik PZR ürünleri, 100 bp marker kullanılarak % 1,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.3'de gösterilmektedir.



Şekil 3.3: MMP-9 -1562 C/T polimorfik bölgenin PZR ürünü, 100 bp marker kullanılarak elde edilen % 1,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü.

3.2 PZR-RFLP Ürünleri

MMP-1 -1607 G/2G, MMP-3-1612 (-1171) 5A/6A ve MMP-9-1562 C/T genlerinin promotor bölgesindeki polimorfik bölgenin genotipini belirlemek için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı. PZR-RFLP reaksiyonu için OSA hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin PZR ürünleri seçildi.

MMP-1 -1607 G/2G polimorfik bölgesinin PZR ürünü Tablo 2.15'de gösterildiği gibi AlwI (BspPI) kesim enzimi ile muamele edilerek Bölüm 2.2.2.3.1'de açıklandığı gibi PZR-RFLP ürünü elde edildi. PZR-RFLP ürünleri Tablo 2.21'de verildiği gibi agaroz jel elektroforezide yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi. Jeldeki PZR-RFLP ürünlerin bant büyüklükleri Tablo 2.16'da verilen bant büyüklükleri ile karşılaştırılarak genotipler saptandı.

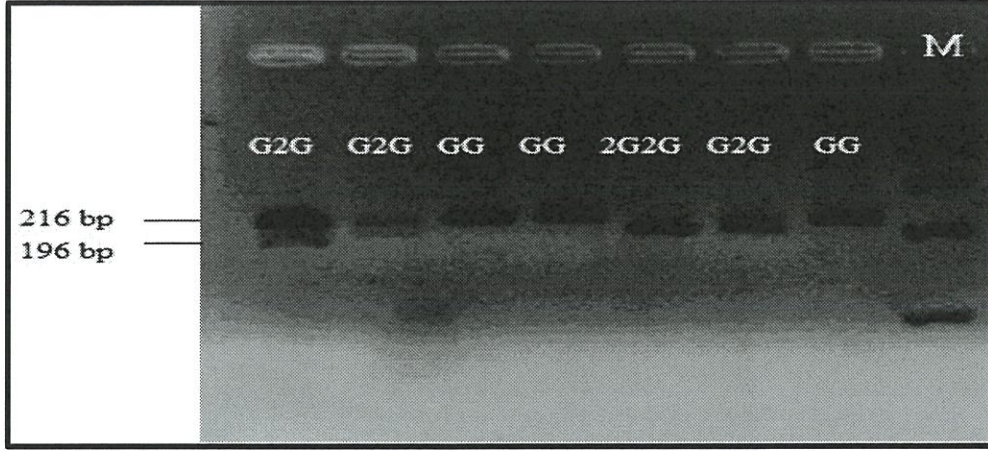
MMP-3-1612 (-1171) 5A/6A polimorfik bölgesinin PZR ürünü Tablo 2.17'de gösterildiği gibi PsyI (Tth111I) kesim enzimi ile muamele edilerek Bölüm 2.2.2.3.2'de anlatıldığı gibi PZR-RFLP ürünü elde edildi.

PZR-RFLP ürünleri Tablo 2.21'de verildiği gibi agaroz jel elektroforezide yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi. Jeldeki PZR-RFLP ürünlerin bant büyüklükleri Tablo 2.18'da verilen bant büyüklükleri ile karşılaştırılarak genotipler belirlendi.

MMP-9-1562 C/T polimorfik bölgesinin PZR ürünü Tablo 2.19'da gösterildiği gibi PaeI (SphI) kesim enzimi ile muamele edilerek Bölüm 2.2.2.3.3'de açıklandığı PZR-RFLP ürünü elde edildi. PZR-RFLP ürünleri Tablo 2.21'de verildiği gibi agaroz jel elektroforezide yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi. Jeldeki PZR-RFLP ürünlerin bant büyüklükleri Tablo 2.20'da verilen bant büyüklükleri ile karşılaştırılarak genotipler saptandı.

3.2.1 MMP-1 – 1607 G/2G PZR-RFLP Ürünü

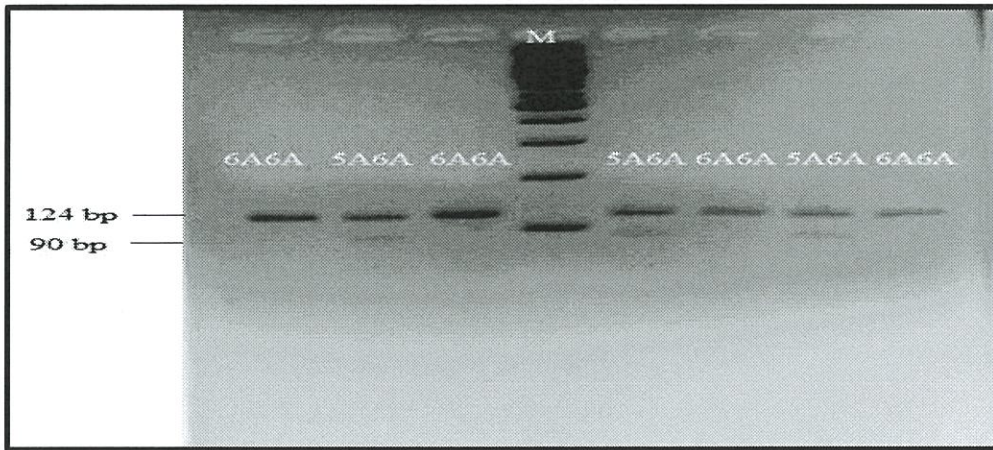
MMP-1 -1607 G/2G polimorfik bölgesinin PZR ürünü AlwI (BspPI) kesim enzimi ile kesilerek genotipler saptandı. PZR-RFLP ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsünde sadece 216 bp'lik bant görüldüğünde GG genotipli birey, 216, 196 ve 20 bp'lik bant görüldüğünde G2G genotipli birey ve 196 ve 20 bp'lik bant görüldüğünde 2G2G genotipli birey olarak değerlendirildi. PZR-RFLP ürünleri, 100 bp marker kullanılarak % 3,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü şekil 3.4'de gösterilmektedir.



Şekil 3.4: MMP-1 -1607 G/2G polimorfik bölgesinin PZR ürünü AlwI (BspPI) enzimi ile kesilip 100 bp marker kullanılarak elde edilen % 3,5'luk garoz jeldeki görüntüsü.

3.2.2 MMP3 -1612 (-1171) 5A/6A PZR-RFLP Ürünü

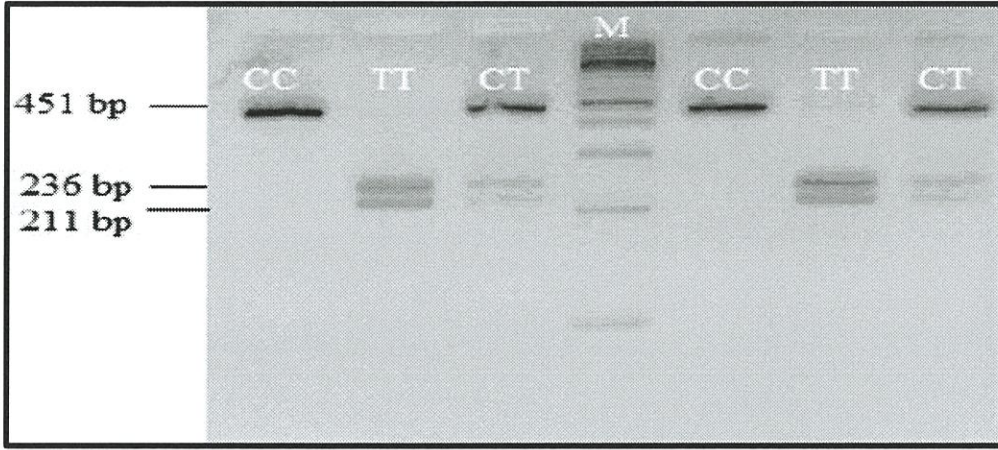
MMP-3-1612 (-1171) 5A/6A polimorfik bölgesinin PZR ürünü PstI (Tth111I) kesim enzimi ile kesilerek genotipler saptandı. PZR-RFLP ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsünde sadece 124 bp'lik bant görüldüğünde 6A6A genotipli birey, 124, 90 ve 32 bp'lik bant görüldüğünde 5A6A genotipli birey ve 90 ve 32 bp'lik bant görüldüğünde 5A5A genotipli birey olarak değerlendirildi. PZR-RFLP ürünleri, 100 bp marker kullanılarak % 3,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü şekil 3.5'de gösterilmektedir.



Şekil 3.5: MMP-3 -1612 (1171) 5A/6A polimorfik bölgesinin PZR ürünü PstI (Tth111I) enzimi ile kesilip 100 bp marker kullanılarak elde edilen % 3,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü.

3.2.3 MMP9 -1562 C/T PZR-RFLP Ürünü

MMP-9-1562 C/T polimorfik bölgesinin PZR ürünü PaeI (SphI) kesim enzimi ile kesilerek genotipler saptandı. PZR-RFLP ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsünde sadece 451 bp'lik bant görüldüğünde CC genotipli birey, 451, 236 ve 211 bp'lik bant görüldüğünde CT genotipli birey ve 236 ve 211 bp'lik bant görüldüğünde TT genotipli birey olarak değerlendirildi. PZR-RFLP ürünleri, 100 bp marker kullanılarak % 3,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü şekil 3.6'da gösterilmektedir.



Şekil 3.6: MMP-9 -1562 C/T polimorfik bölgesinin PZR ürünü PaeI (SphI) enzimi ile kesilip 100 bp marker kullanılarak elde edilen % 3,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü.

3.3 İstatistiksel Bulgular

3.3.1 Çalışmaya Katılan Hasta ve Sağlıklı Grubu Özellikleri

Balıkesir Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındıktan sonra çalışma başlatıldı. Çalışmaya 85 obstrüktif uyku apne sendromlu ve herhangi bir kronik hastalığı olmayan ve düzenli ilaç kullanmayan 97 sağlıklı kontrol eklendi. Kontrol grubundaki kişilerin koroner kalp hastalığı, kronik böbrek hastalığı, uyku apne sendromu ve diabet hastalığı yoktu.

Çalışmada kullanılan kan örnekleri Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran hastalardan temin edildi. Öncelikle tüm hasta ve kontrollerden genomik DNA izole edilerek çalışma başlatıldı. Çalışmaya katılanların yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Demografik özellikler.

Demografik Özellikler	Çalışma Populasyonu		
	Min-Mak (Medyan)	Ort±Ss	N(%)
Yaş (yıl)	22-80 (45,00)	43,44±11,59	182
	Erkek		98 (54,1)
Cinsiyet	Kadın		83 (45,9)
	BKİ (kg/m ²)	17,73-48,54	28,03±5,83
			182

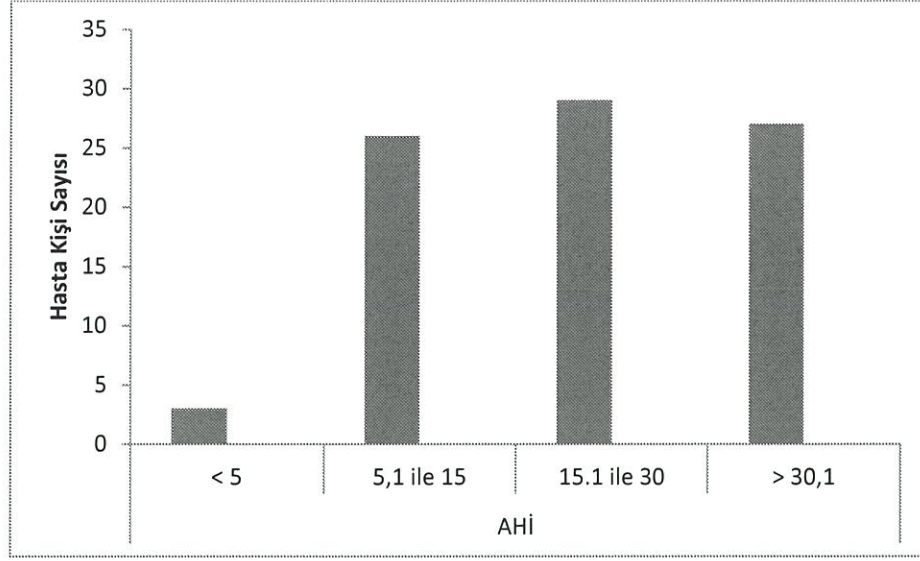
Çalışmaya katılan kişilerin 98’i (%54,1) erkek 83’ü(45,9) kadındı. Yaşları 22 ile 80 arasındaydı. Yaş ortalama±standart sapma 43,44±11,59 olarak bulundu. Tüm olguların Vücut Kitle İndeksi (BKİ) 17,7 ile 57,13 arasındaydı ve ortalama±standart sapma; 28,03±5,83 olarak belirlendi.

Tablo 3.2: OSA ve Kontrol grubun demografik özelliklerin dağılımı.

Demografik özellikler	İstatistiksel Özellikler	OSA n=85	Kontrol n=97	p
Yaş (yıl)	Min-Mak(Medyan)	22-80 (44)	23-65 (43)	0,112 *
	Ort±Ss	42,16±11,02	43,16±11,97	
Cinsiyet	Erkek	47	51	0,767 **
	Kadın	38	46	
BKİ (kg/m ²)	Min-Mak(Medyan)	20,96-57,13 (30,44)	17,73-36,33 (24,72)	0,01 **
	Ort±Ss	31,61 ±5,76	24,88 ±3,71	

*Student T Test ** Pearson Chi-Square

Tablo 3.2’de gösterildiği gibi OSA ve kontrol grubu yaş ve cinsiyet açısından değerlendirildiğinde anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0,112*, P=0,767 **). Vücut Kitle İndeksi, hasta grubunda anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0,01**).



Şekil 3.7: OSA hasta grubundaki AHI skorlama dağılımı.

OSA hasta grubuna dahil edilen bireylerin AHI değerlerinin dağılımı tablo 3.7'de gösterilmiştir.

3.3.2 MMP-1-G/2G MMP-3-5A/6A ve MMP-9 C/T allelerin H-Weinberg Eşitliği.

G.H. Hardy ve Wilhelm Weinberg'e göre ideal koşullarda allel frekanslarından genotip frekansları hesaplanabilir.

G ve 2G gibi iki allel için Hardy-Weinberg binomial dağılımı:

-P= G frekansı ve q=2G frekansı, p+q=1

-P²GG

-2pqG2G

-q²2G2G

Tablo 3.3: OSA hasta grubunda MMP-1 G/2G alleli için H-Weinberg eşitliği (n=85).

MMP1	Varyant	Gözlenen frekans		Beklenen frekans	
		N	%	N	%
	G/G	37	%43,5	33,04	% 38,8
G/2G	32	%37,6	39,90	% 46,9	
2G/2G	16	%18,8	12,04	% 14,1	

Tablo 3.4: OSA hasta grubunda MMP-1 (p+q=1).

	n	Gen frekansları		Genotip frekansları		
		P(G)	P(2G)	P ²	2pq	q ²
Gözlenen	85	0,62	0,38	0,388	0,469	0,141

Allel frekansları; G için 0,62 2G alleli için ise 0,38 oranında saptanmıştır. Beklenen ve gözlenen frekanslara göre hesaplanan Ki-kare değerimiz, $\chi^2=3,336$ olarak saptanmıştır. Populasyon Hardy-Weinberg dengesindedir. (p=0,067).

Tablo 3.5: Kontrol grubunda MMP-1 G/2G alleli için H-Weinberg eşitliği (n=97).

MMP1	Varyant	Gözlenen frekans		Beklenen frekans	
		N	%	N	%
	G/G	25	%25,8	26,291	%27,0
G/2G	51	%52,6	48,417	%50,0	
2G/2G	21	%21,6	22,291	%23,0	

G ve 2G gibi iki allel için Hardy-Weinberg binomial dağılımı:

-P= G frekansı ve q=2G frekansı, p+q=1

-P²GG

-2pqG2G

-q² 2G2G

Tablo 3.6: Kontrol grubunda MMP-1 (p+q=1).

	n	Gen frekansları		Genotip frekansları		
		P(G)	P(2G)	P ²	2pq	q ²
Gözlenen	97	0,52	0,48	0,271	0,499	0,229

Allel frekansları; G için 0,52 2G alleli için ise 0,48 oranında saptanmıştır. Beklenen ve gözlenen frekanslara göre hesaplanan Ki-kare değerimiz, $\chi^2=0,275$ olarak saptanmıştır. Populasyon HardyWeinberg dengesindedir. ($p=0,599$).

Tablo 3.7: OSA hasta grubunda MMP-3 5A/6A alleli için H-Weinberg eşitliği (n=85).

	Varyant	Gözlenen frekans		Beklenen frekans	
		N	%	N	%
MMP3	6A/6A	16	%18,8	30,00	%35,2
	5A/6A	69	%81,2	40,99	%48,2
	5A/5A	0	0	14,00	%16,6

5A ve 6A gibi iki allel için Hardy-Weinberg binomial dağılımı:

-P= 6A frekansı ve q=5A frekansı, $p+q= 1$

- P^2 6A6A

- $2pq$ 5A6A

- q^2 5A5A

Tablo 3.8: OSA hasta grubunda MMP-3 ($p+q=1$)

	n	Gen frekansları		Genotip frekansları		
		P(6A)	P(5A)	P^2	$2pq$	q^2
Gözlenen	85	0,594	0,405	0,352	0,482	0,164
Beklenen	85	0,594	0,405	0,352	0,482	0,164

Allel frekansları; 6A alleli için 0,6 5A alleli için ise 0,4 oranında saptanmıştır. Beklenen ve gözlenen frekanslara göre hesaplanan Ki-kare değerimiz, $\chi^2=39,68$ olarak saptanmıştır. Populasyon HardyWeinberg dengesindedir ($p=3,01$).

Tablo 3.9:kontrol grubunda MMP3 5A/6A alleli için H-Weinberg eşitliği

	Varyant	Gözlenen frekans		Beklenen frekans	
		N	%	N	%
MMP3	6A/6A	11	%11,3	30,06	%31,0
	5A/6A	86	%88,7	47,876	%49,0
	5A/5A	0		19,06	%20,0

5A ve 6A gibi iki allel için Hardy-Weinberg binomial dağılımı:

-P= 6A frekansı ve q=5A frekansı, p+q=1

-P²6A6A

-2pq5A6A

-q² 6A6A

Tablo 3.10: Kontrol grubunda MMP3 5A/6A (p+q=1)

	n	Gen frekansları		Genotip frekansları		
		P(6A)	P(5A)	P ²	2pq	q ²
Gözlenen	97	0,56	0,44	0,309	0,493	0,196

Allel frekansları; 6A alleli için 0,56 5A alleli için ise 0,44 oranında saptanmıştır. Beklenen ve gözlenen frekanslara göre hesaplanan Ki-kare değerimiz, $\chi^2=61,51$ olarak saptanmıştır. Populasyon HardyWeinberg dengesindedir (p=4,41).

Tablo 3.11: OSA hasta grubunda MMP-9 C/T alleli için H-Weinberg eşitliği (n=85).

	VARYANT	Gözlenen frekans		Beklenen frekans	
		N	%	N	%
MMP9	CC	59	%69,4	59,305	%70,0
	CT	24	%28,)	23,388	%27,5
	TT	2	%2,4	2,305	%2,7

C ve T gibi iki allel için Hardy-Weinberg binomial dağılımı:

-P= C frekansı ve q=T frekansı, p+q=1

-P²CC

-2pqCT

-q²TT

Tablo 3.12: OSA hasta grubunda MMP-9 (p+q=1).

	n	Gen frekansları		Genotip frekansları		
		P(C)	P(T)	P ²	2pq	q ²
Gözlenen	85	0,835	0,164	0,697	0,275	0,027

Allel frekansları; C alleli için 0,83 T alleli için ise 0,16 oranında saptanmıştır. Beklenen ve gözlenen frekanslara göre hesaplanan Ki-kare değerimiz, $\chi^2=0,058$ olarak saptanmıştır. Populasyon HardyWeinberg dengesindedir ($p=0,809$).

Tablo 3.13: Kontrol grubunda MMP-9 C/T alleli için H-Weinberg eşitliği (n=85).

	Varyant	Gözlenen frekans		Beklenen frekans	
		N	%	N	%
MMP9	CC	74	%76,3	71,878	74
	CT	19	%19,6	23,242	24
	TT	4	%4,1	1,878	2

C ve T gibi iki allel için Hardy-Weinberg binomial dağılımı:

- $P = C$ frekansı ve $q = T$ frekansı, $p+q=1$

- P^2 CC

- $2pq$ CT

- q^2 TT

Tablo 3.14: Kontrol grubunda MMP-9 ($p+q=1$).

	n	Gen frekansları		Genotip frekansları		
		P(C)	P(T)	P^2	$2pq$	q^2
Gözlenen	97	0,860	0,139	0,741	0,239	0,019

Allel frekansları; C alleli için 0,86 T alleli için ise 0,13 oranında saptanmıştır. Beklenen ve gözlenen frekanslara göre hesaplanan Ki-kare değerimiz, $\chi^2=3,23$ olarak saptanmıştır. Populasyon HardyWeinberg dengesindedir ($p=0,072$).

3.3.3 MMP1 -1607 Genotip Dağılımları

OSA ve Kontrol grubunda MMP1 -1607 genotip ve allel dağılımı Tablo 3.15'de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.15: MMP1 -1607 genotip dağılımları.

MMP1		OSA (n=85)	Kontrol (n=97)	P
	G/G	37 (%43,5)	25 (%25,8)	0,037*
	G/2G	32 (%37,6)	51 (%52,6)	
	2G/2G	16 (%18,8)	21(%21,6)	
Allel				
	G	106(%62,4)	101(%52,00)	0,012*
	2G	64(%37,6)	93(%48,00)	

*Pearson Chi-Square

MMP1 -1607 genotip dağılımında, G/G varyantı OSA grubunda %43,5, kontrol grubunda %25,8 görüldü. G/2G varyantı OSA grubunda %37,6, Kontrol grubunda ise %52,6 gözlemlenmiştir. 2G/2G varyantı OSA ve kontrol grubunda sırasıyla %18,8 ve %21,6 olarak gözlemlendi. Hasta ve kontrol grubu arasında varyant dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ($p=0,037$).

MMP1 -1607 allel dağılımında, G alleli OSA grubunda %62,4, Kontrol grubunda %52,00 görüldü. 2G alleli OSA grubunda %37,6, Kontrol grubunda ise %48,00 gözlemlenmiştir. OSA ve Kontrol grubu arasında allel dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ($p=0,012^*$).

3.3.4 MMP3 -1171 Genotip Dağılımları

OSA ve Kontrol grubunda MMP3 -1171 genotip ve allel dağılımı Tablo 3.16'de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.16: MMP3 -1171 genotip dağılımları.

MMP3		OSA (n=85)	Kontrol (n=97)	P
	6A/6A	16 (%18,8)	11 (%11,3)	0,156*
	5A/6A	69 (%81,2)	86 (%88,7)	
Allel				
	6A	101(%59,4)	108(%55,7)	0,156*
	5A	69(%40,6)	86(%44,3)	

*Pearson Chi-Square Test

MMP3 – 1171 (- 1612) genotip dağılımında, 6A/6A varyantı OSA grubunda %18,8, kontrol grubunda %11,3 görüldü. 5A/6A varyantı OSA grubunda %81,2'sinde, Kontrol grubunda ise %88,7'sinde gözlemlenmiştir. 5A/5A varyantı OSA ve Kontrol grubunda gözlemlenmedi. Hasta ve kontrol grubu arasında varyant dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (p=0,156).

MMP3 – 1171 (- 1612) allel dağılımında, 6A alleli OSA grubunda %59,4, Kontrol grubunda %55,7 görüldü. 5A alleli OSA grubunda %40,6, Kontrol grubunda ise %44,3 gözlemlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında allel dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (p=0,156).

3.3.5 MMP9 -1562 Genotip Dağılımları

OSA ve Kontrol grubunda MMP9 -1562 genotip ve allel dağılımı Tablo 3.17'de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.17: MMP9 -1562 genotip dağılımları.

MMP9		OSA (n=85)	Kontrol (n=97)	P
	CC	59 (%69,4)	74 (%76,3)	0,340*
	CT	24 (%28,2)	19 (%19,6)	
	TT	2(%2,4)	4 (%4,1)	
Allel				
	C	142 (%83,5)	167(%86,00)	0,190*
	T	28(%16,5)	27(%14,00)	

*Pearson Chi-Square **Fisher-Exact Test

MMP-9 -1562 genotip dağılımında, C/C varyantı OSA grubunda %69,4, kontrol grubunda %76,3 görüldü. CT varyantı OSA grubunda %28,2'sinde, Kontrol grubunda ise %19,6'sında gözlemlenmiştir. T/T varyantı OSA ve kontrol grubunda sırasıyla %2,4 ve %4,1 olarak gözlemlendi. Hasta ve kontrol grubu arasında varyant dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (p=0,340).

MMP-9 -1562 allel dağılımında, C alleli OSA grubunda %83,5, Kontrol grubunda %86,00 görüldü. T alleli OSA grubunda %16,5, Kontrol grubunda ise %14,00 gözlemlenmiştir Hasta ve kontrol grubu arasında allel dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı ($p=0,190^*$).

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

MMP'ler, hücre dışı matriksi parçalayan proteolitik enzimlerdir [85]. MMP-1 (interstisyel kollajenaz) ve MMP-3 (stromelisin), çok işlevli enzimlerdir. MMP-1, MMP-3 fizyolojik ve patolojik süreçlerde doku yeniden yapılanmada görev alan, kromozom 11q'da lokalize olan genlerdir [86]. MMP3'ün bazal membran kollajenini sindirdiği ve MMP1 ve MMP9 (Jelatinaz B) gibi diğer MMP'lerin sentezini indüklediği bilinmektedir [87]. MMP-9 (jelatinaz-B), 20q kromozomu üzerinde bir gen lokusuna sahip bir tip IV kollajenazdır [31, 64]. MMP-9, birçok biyolojik süreçte hayati bir rol oynayan önemli bir proteazdır. İnsanlarda nötrofiller, makrofajlar, fibroblastlar ve endotel hücreler MMP-9'u sentezleyebilir ve salgılayabilir [23, 64].

MMP'ler, fizyolojik koşullarda temel seviyelerde ifade edilirler, ancak MAPK, JNK ve NF- κ B'ye bağımlı sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla bazı hormonlara, büyüme faktörlerine ve enflamatuar ve fibrojenik sitokinlere cevap olarak farklı şekilde ifade edilirler [36]. Her ne kadar metaloproteinazların gen ekspresyon seviyesi transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalarla düzenlenmiş olsa da, transkripsiyonel mekanizmalar en fazla etkiye sahiptir. Çoğu MMP, aşağıdaki transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgeleri oluşturan promotör bölgelerinde ortak dizileri barındırır. Bunlar, aktivator protein- 1 ve -2 (AP-1-2) bölgesi, Polima güçlendirici aktivite-3 (PEA3) bölgesi, SP -1 bölgesi, NF- κ B bölgesi ve STAT bölgesidir.[88, 89]

Transkripsiyon faktörlerinin veya transkripsiyon baskılayıcılarının bağlanma bölgelerindeki nükleotit dizilerindeki değişiklikler, MMP gen ekspresyonunun düzenlenmesini değiştirerek obstrüktif uyku apne sendromu üzerinde bir etkiye sahip olabilir.

Osteomyelit, mikrobiyal enfeksiyonların neden olduğu kemik erimesinin eşlik ettiği enflamatuar bir süreçtir. 2017 yılında Kong Q ve arkadaşlarının Çin Han popülasyonunda MMP-1 geni -1607 2G/1G polimorfizminin osteomyelit riski ile ilişkisini inceledikleri çalışmada 2G2G genotipi ve 2G alelin osteomyelit oluşumunu kolaylaştırdığını belirlemişlerdir [90].

2012 yılında Abd-Allah SH ve arkadaşları MMP-1 (-1607) 1G / 2G değişiminin osteoartrit ile ilişkisini inceledikleri çalışmada 2G allelin osteoartrite katkıda bulunduğunu göstermişlerdir [91]. 2001 yılında Ghilardi G ve arkadaşları MMP- 1 -1607 G/2G polimorfizmin kolorektal kanser metastazı ve invazivliği ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, MMP -1 promotor bölgesinde 2G polimorfizminin varlığının kolorektal kanser hastalarında metastatik süreci destekleyebileceğini ve kötü prognoz için risk faktörü olarak bakılabileceğini belirlediler [92]. 2011 yılında Liu, L. ve arkadaşları MMP-1 –1607 G/2G polimorfizminin akciğer kanserinin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, 2G2G genotipinin önemli ölçüde akciğer kanserinin hem gelişimiyle hem de ilerlemesiyle ilişkili olduğunu gösterdiler [93]. 2011 yılında Malik, N. ve arkadaşlarının Kuzey Hindistan popülasyonunda MMP-1 gen polimorfizminin glioblastoma multiforme ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, 2G2G genotipinin ve 2G alelinin glioblastoma multiformeyi geliştirme duyarlılığının artmasıyla ilişkili olduğunu gösterdiler [94]. 2009 yılında Huang, C. D. ve arkadaşları Tayvan popülasyonunda astımda kalıcı hava yolu tıkanıklığı ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, G alleli içeren genotiplerin (1G2G ve GG) astımda kalıcı hava yolu tıkanıklığı ile ilişkili olduğunu ve heterozigot 1G genotipinin (1G/2G) astımdaki kalıcı hava yolu tıkanıklığına en duyarlı olduğunu belirlediler [95].

MMP1 promotor bölgesinin -1607 pozisyonunda G/2G olarak bilinen polimorfizm (rs1799750) bir guaninin eklenmesi veya silinmesine bağlı olarak genin ekspresyon seviyesini etkilemektedir. Promotor bölgesi -1607 pozisyonundaki bir guaninin insersiyonu ETS transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesi olan E26 için bir bağlanma bölgesi oluşturur ve 2G alleli G allelinden daha yüksek ekspresyona uğrar [44, 55-57, 93].

Bizim çalışmamızda; MMP1 -1607 genotip dağılımında, G/G varyantı OSA grubunda %43,5, kontrol grubunda %25,8 görüldü. G/2G varyantı OSA grubunda %37,6, kontrol grubunda ise %52,6 gözlemlenmiştir. 2G/2G varyantı OSA ve kontrol grubunda sırasıyla %18,8 ve %21,6 olarak gözlemlendi. OSA ve kontrol grubu arasında varyant dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulundu (p=0,037).

MMP1 -1607 allel dağılımında, G alleli OSA grubunda %62,4, kontrol grubunda %52,00 görüldü. 2G alleli OSA grubunda %37,6, kontrol grubunda ise %48,00 gözlemlenmiştir. OSA ve kontrol grubu arasında allel dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ($p=0,012^*$).

2014 yılında Çin popülasyonunda Guan X ve arkadaşları MMP3 -1612 (-1171) 5A/6A polimorfizmin özofagus skuamöz hücreli karsinom (ESCC) riski ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, MMP3 -1612 5A/6A polimorfizminde 6A5A ve 5A5A genotipleri, 6A6A genotipine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek ESCC riskine sahipti. 5A alelini taşıyan hastalar, 6A alelini taşıyan kişilere kıyasla ESCC gelişimi için önemli derecede daha yüksek bir riske sahip olması 5A allelin ESCC gelişimi için genetik bir yatkınlık faktörü olabileceğini bildirdiler [96]. 2015 yılında Ding C. ve arkadaşları MMP3 -1612 (-1171) 5A / 6A polimorfizmin periodontitis riski ile ilişkisini inceledikleri çalışmada MMP3 5A/6A polimorfizminde transkripsiyonel olarak daha aktif olan 5A aleli ile periodontitis arasında bir bağlantı olduğunu göstermişlerdir [97]. 2003 yılında Beyzade S. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 6A alelinin koroner aterosklerozun ilerlemesinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Buna benzer başka bir çalışmada 2013 yılında Sakowicz, A. ve arkadaşları tarafından MMP3 -1171 5A/6A polimorfizmin ateroskleroz ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, 6A6A genotipli bireylerin, diğer genotipli bireylere göre daha fazla miktarda koroner aterosklerozu olduğu bildirildi [98-102]. 2016 yılında Li, X. P. ve arkadaşları Çin Han popülasyonunda MMP3 -1171 5A/6A polimorfizmin derin venöz trombozu (DVT) ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, 5A6A ve 6A6A genotipleri taşıyan DVT hastaların serumlarında MMP3 düzeyi kontrol grubundan yüksek olduğunu ve 6A allelin, DVT riskindeki artışla ilişkili olabileceğini gösterdiler [103]. 2015 yılında Teplyakov, A. T. ve arkadaşları MMP-3 -1171 5A/6A polimorfizminin kronik kalp yetmezliği (KKY) gelişimi ve seyri üzerindeki etkisi ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, 5A5A genotipin ve 5A alelin KKY gelişimi ve ciddi seyri üzerinde etkili olduğunu gösterdiler [104]. 2011 yılında Liu, D. ve arkadaşları MMP-3 - 1171 5A/6A polimorfizmin kolorektal kanser riski arasındaki ilişkiyi inceledikleri meta-analizinde, MMP-3 -1171 5A/6A polimorfizminde 6A6A genotipin kolorektal kanser riskini arttırdığını gösterdiler [105].

2010 yılında Fallah, S. ve arkadaşları Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) hastalarında MMP-3 -1612 5A/6A polimorfizmin koroner arter darlığı (CAS) ve hastalıklı damar sayısı duyarlılığı ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, MMP3 geninin 6A alelinin CAS için bağımsız bir risk faktörü olduğunu gösterdiler [106].

MMP3 promotor bölgesi -1171 veya -1612 pozisyonunda 5A/6A olarak bilinen polimorfizm (rs35068180 veya rs3025058) bir adenin bazının delesyonundan kaynaklanmaktadır ve 5A alleli ile sonuçlanmaktadır [61, 62]. MMP3 -1171 (-1612) 5A/ 6A polimorfizmi ile ilgili olarak, 5A alleli Nf-KappaB bölgesi taşıırken, 6A alleli Nf-kappaB bölgesinden yoksundur ve bu durum 6A allelin transkripsiyon aktivitesinin azalmasına neden olur [85, 97].

Bizim çalışmamızda; MMP3 -1171 (-1612) genotip dağılımında, 6A/6A varyantı OSA grubunda %18,8, kontrol grubunda %11,3 görüldü. 5A/6A varyantı OSA grubunda %81,2, kontrol grubunda ise %88,7 gözlemlenmiştir. 5A/5A varyantı OSA ve kontrol grubunda gözlemlenmedi. OSA ve kontrol grubu arasında varyant dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı ($p=0,156$). MMP3 -1171 (-1612) allel dağılımında, 6A alleli OSA grubunda %59,4, kontrol grubunda %55,7 görüldü. 5A alleli OSA grubunda %40,6, kontrol grubunda ise %44,3 gözlemlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında allel dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı ($p=0,156$).

2013 yılında Chen L ve arkadaşlarının MMP-9 -1562 C/T promotor polimorfizmlerinin KOAH duyarlılığı ile ilişkisini inceledikleri meta-analizinde, MMP-9 -1562 C/T polimorfizminde en az bir T aleli taşıyan bireylerin KOAH için C homozigot taşıyanlardan daha yüksek bir risk taşıyabileceğini gösterdiler [107]. 2015 yılında Buraczynska, K. ve arkadaşları MMP-9 -1562 C/T polimorfizmin inme riski ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, T allelin inme riski ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğunu gösterdiler [68]. 2009 yılında Rybakowski, J. K. ve arkadaşları MMP-9 -1562 C/T polimorfizmin bipolar duygudurum bozukluğu ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, T alleli bipolar duygudurum bozukluğu ile ilişkili olduğu belirlendi [108]. Esas olarak diyabetik retinopati (DR) ve diyabetik nefropati (DN) de dahil olmak üzere diyabetik mikrovasküler komplikasyonlar (DMI), dünyada sürekli olarak artmaktadır.

2015 yılında Zhang, Z. ve arkadaşları MMP-9 -1562 C/T polimorfizmin diyabetik nefropati (DN) ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, T allel varyantının DN riski için genetik bir marker olabileceğini gösterdiler [109].

2015 yılında Rahimi, Z. ve arkadaşları Batı İranda MMP-9 -1562 C/T polimorfizminin meme kanseri ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, T allelinin varlığı meme kanseri riski ile ilişkili olduğu saptandı [110]. 1999 yılında Zhang, B.ve arkadaşları MMP-9 -1562 C/T polimorfizmin koroner ateroskleroz şiddeti ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, T alelini taşıyan bireylerde koroner ateroskleroz şiddetinin artışı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [111]. 2008 yılında Tang, Y. ve arkadaşları Güneydoğu Çin Popülasyonunda MMP-9 -1562 C/T polimorfizmin lenf nodu metastazı ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, T alelin lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğunu saptadılar [112]. 2008 yılında Benesova, Y. ve arkadaşları MMP-9 -1562 C/T polimorfizmin multipl skleroz (MS) ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, T alel taşıyıcılarının MS'ye daha az duyarlı olduğunu gösterdiler [113]. 2009 yılında Rybakowski, J. K. ve arkadaşları MMP-9 -1562 C/T polimorfizmin şizofreni ile ilişkisini inceledikleri çalışmada, şizofreni hastalarında T allelinin azalmış sıklığı ve CC genotipin ve C alelinin anlamlı bir üstünlüğü olduğu saptandı [114].

MMP-9 promotor bölgesi -1562 pozisyonunda C/T olarak bilinen polimorfizm, C nükleotidin T nükleotidi ile yer değiştirmesiyle meydana gelir. MMP9 promotor bölgesi -1562 pozisyonunda C/T polimorfizmi C allelinde transkripsiyonel bir baskılayıcı protein için bir bağlanma bölgesi yaratır. MMP-9 -1562 C/T polimorfizmi ile ilgili olarak, C aleli Sp1 nükleer proteini ile ilişkiliyken, T aleli Sp1 nükleer protein bölgesinden yoksun olması ile ilişkilidir ve T alelinin transkripsiyon aktivitesinin artmasına sebep olur [85, 96].

Bizim çalışmamızda; MMP-9 -1562 genotip dağılımında, C/C varyantı OSA grubunda %69,4, kontrol grubunda %76,3 görüldü. CT varyantı OSA grubunda %28,2'sinde, kontrol grubunda ise %19,6'sında gözlemlenmiştir. T/T varyantı OSA ve kontrol grubunda sırasıyla %2,4 ve %4,1 olarak gözlemlendi. Hasta ve kontrol grubu arasında varyant dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (p=0,340).

MMP-9 -1562 allel dağılımında, C alleli OSA grubunda %83,5, kontrol grubunda %86,00 görüldü. T alleli OSA grubunda %16,5, kontrol grubunda ise %14,00 gözlemlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında allel dağılımı istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı ($p=0,190^*$).

Sonuç olarak MMP-1 -1607 G/2G, MMP-3 -1612 (-1171) 5A/6A ve MMP-9 -1562 C/T nükleotid değişimlerinin obstrüktif uyku apnesi ile ilişkisi olup olmadığına dair yaptığımız bu tez çalışmasında MMP1-1607 SNP'nin hasta grubundaki GG varyantı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı yüksek bulundu. Ayrıca kontrol grubundaki G2G varyantı hasta grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı yüksek bulundu. 2G2G varyantı ise hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. Bu çalışmada G/G varyantı OSA sendromuyla ilişkili olabileceği, G/2G varyantı OSA sendromuna karşı koruyucu olabileceği saptandı. MMP-3 -1612 (-1171) 5A/6A değişiminde 6A6A, 5A6A ve 5A5A varyantları hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. MMP-9 -1562 C/T nükleotid değişiminde CC, CT ve TT varyantları hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlılık bulunmadı. Çalışma Obstrüktif uyku apne sendromu hasta sayısı artırılarak genişletilebilir. Ayrıca Obstrüktif uyku apne sendromu multifaktöriyel bir hastalık olduğu için çalışma solunum yolunda yer alan kasların MMP ekspresyon seviyesine bakılarak genişletilebilir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Naim, A., Pan, Q., Baig, M.S., "Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Liver Diseases", *J Clin Exp Hepatol*, 7(4), 367-372, (2017).
- [2] Sagi, I.veGaffney, J., *Matrix metalloproteinase biology*. 2015: John Wiley & Sons.
- [3] Nagase, H., Visse, R., Murphy, G.J.C.r., "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs", 69(3), 562-573, (2006).
- [4] Yamamoto, K., Murphy, G., Troeberg, L., "Extracellular regulation of metalloproteinases", *Matrix Biol*, 44-46, 255-63, (2015).
- [5] Liu, J.veKhalil, R.A., "Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigational and Therapeutic Tools in Unrestrained Tissue Remodeling and Pathological Disorders", *Prog Mol Biol Transl Sci*, 148, 355-420, (2017).
- [6] Kucukguven, A.veKhalil, R.A., "Matrix metalloproteinases as potential targets in the venous dilation associated with varicose veins", *Curr Drug Targets*, 14(3), 287-324, (2013).
- [7] Cui, N., Hu, M., Khalil, R.A., "Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases", *Prog Mol Biol Transl Sci*, 147, 1-73, (2017).
- [8] Kapoor, C., et al., "Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs)", 12(1), 28, (2016).
- [9] Mittal, R., et al., "Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions", *J Cell Physiol*, 231(12), 2599-621, (2016).
- [10] Verma, R.P.veHansch, C., "Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs", *Bioorg Med Chem*, 15(6), 2223-68, (2007).
- [11] Verma, R.P.veHansch, C., "Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q) SARs", *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(6), 2223-2268, (2007).
- [12] Gross, J.veLapierre, C.M., "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48, 1014-22, (1962).

- [13] Eisen, A.Z., Jeffrey, J.J., Gross, J., "Human skin collagenase. Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule", *Biochim Biophys Acta*, 151(3), 637-45, (1968).
- [14] Bronisz, E.veKurkowska-Jastrzębska, I., "Matrix Metalloproteinase 9 in Epilepsy: The Role of Neuroinflammation in Seizure Development", *Mediators Inflamm*, 2016, 7369020, (2016).
- [15] Zitka, O., et al., "Matrix metalloproteinases", *Current medicinal chemistry*, 17(31), 3751-3768, (2010).
- [16] Murphy, G.veNagase, H., "Progress in matrix metalloproteinase research", *Molecular aspects of medicine*, 29(5), 290-308, (2008).
- [17] Nagase, H., Visse, R., Murphy, G., "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs", *Cardiovasc Res*, 69(3), 562-73, (2006).
- [18] Visse, R.veNagase, H., "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry", *Circ Res*, 92(8), 827-39, (2003).
- [19] Velasco, G., et al., "Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members", *J Biol Chem*, 274(8), 4570-6, (1999).
- [20] Lohi, J., Wilson, C.L., Roby, J.D., Parks, W.C., "Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury", *J Biol Chem*, 276(13), 10134-44, (2001).
- [21] Yip, C., Foidart, P., Noel, A., Sounni, N.E., "MT4-MMP: The GPI-Anchored Membrane-Type Matrix Metalloprotease with Multiple Functions in Diseases", *Int J Mol Sci*, 20(2)(2019).
- [22] Zitka, O., et al., "Matrix metalloproteinases", *Curr Med Chem*, 17(31), 3751-68, (2010).
- [23] Huang, H., "Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances", *Sensors (Basel)*, 18(10)(2018).
- [24] Patterson, M.L., Atkinson, S.J., Knauper, V., Murphy, G., "Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain", *FEBS Lett*, 503(2-3), 158-62, (2001).

- [25] Kapoor, C., Vaidya, S., Wadhwan, V., Kaur, G., Pathak, A., "Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs)", *Journal of cancer research and therapeutics*, 12(1), 28, (2016).
- [26] Jaoude, J.veKoh, Y., "Matrix metalloproteinases in exercise and obesity", *Vasc Health Risk Manag*, 12, 287-95, (2016).
- [27] Chung, L., et al., "Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis", *Embo j*, 23(15), 3020-30, (2004).
- [28] Nagase, H.veFushimi, K., "Elucidating the function of non catalytic domains of collagenases and aggrecanases", *Connect Tissue Res*, 49(3), 169-74, (2008).
- [29] Qorri, B., et al., "Agonist-Biased Signaling via Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Extracellular Matrix Remodeling", *Cells*, 7(9)(2018).
- [30] Pei, D.veWeiss, S.J., "Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen", *Nature*, 375(6528), 244-7, (1995).
- [31] Sohail, A., et al., "MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer", *Cancer Metastasis Rev*, 27(2), 289-302, (2008).
- [32] Kapoor, C., Vaidya, S., Wadhwan, V., Kaur, G., Pathak, A., "Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs)", *J Cancer Res Ther*, 12(1), 28-35, (2016).
- [33] Tomlinson, M.L., Garcia-Morales, C., Abu-Elmagd, M., Wheeler, G.N., "Three matrix metalloproteinases are required in vivo for macrophage migration during embryonic development", *Mech Dev*, 125(11-12), 1059-70, (2008).
- [34] Amar, S., Smith, L., Fields, G.B., "Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease", *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864(11 Pt A), 1940-1951, (2017).
- [35] Gearing, A.J., et al., "Selective cleavage of human IgG by the matrix metalloproteinases, matrilysin and stromelysin", *Immunol Lett*, 81(1), 41-8, (2002).
- [36] Berg, G., Barchuk, M., Miksztowicz, V., "Behavior of Metalloproteinases in Adipose Tissue, Liver and Arterial Wall: An Update of Extracellular Matrix Remodeling", *Cells*, 8(2)(2019).

- [37] Zhou, Z., Ma, X., Wang, F., Sun, L., Zhang, G., "A Matrix Metalloproteinase-1 Polymorphism, MMP1-1607 (1G>2G), Is Associated with Increased Cancer Risk: A Meta-Analysis Including 21,327 Patients", *Dis Markers*, 2018, 7565834, (2018).
- [38] Craig, V.J., Zhang, L., Hagood, J.S., Owen, C.A., "Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis", *Am J Respir Cell Mol Biol*, 53(5), 585-600, (2015).
- [39] English, W.R., Holtz, B., Vogt, G., Knauper, V., Murphy, G., "Characterization of the role of the "MT-loop": an eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases", *J Biol Chem*, 276(45), 42018-26, (2001).
- [40] Beaudoux, J.L., Giral, P., Bruckert, E., Foglietti, M.J., Chapman, M.J., "Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives", *Clin Chem Lab Med*, 42(2), 121-31, (2004).
- [41] Dollery Clare, M., McEwan Jean, R., Henney Adriano, M., "Matrix Metalloproteinases and Cardiovascular Disease", *Circulation Research*, 77(5), 863-868, (1995).
- [42] Baker, A.H., Edwards, D.R., Murphy, G., "Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities", *J Cell Sci*, 115(Pt 19), 3719-27, (2002).
- [43] Strickland, D.K., et al., "Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor", *J Biol Chem*, 265(29), 17401-4, (1990).
- [44] Hu, W., et al., "Association of matrix metalloprotease 1, 3, and 12 polymorphisms with rheumatic heart disease in a Chinese Han population", *BMC Med Genet*, 19(1), 27, (2018).
- [45] Tokito, A.veJougasaki, M., "Matrix Metalloproteinases in Non-Neoplastic Disorders", *Int J Mol Sci*, 17(7)(2016).
- [46] Przybyła, L.M., Theunissen, T.W., Jaenisch, R., Voldman, J., "Matrix remodeling maintains embryonic stem cell self-renewal by activating Stat3", *Stem Cells*, 31(6), 1097-106, (2013).

- [47] Tetlow, L.C., Lees, M., Woolley, D.E., "Comparative studies of collagenase and stromelysin-1 expression by rheumatoid synoviocytes in vitro", *Virchows Arch*, 425(6), 569-76, (1995).
- [48] Sethi, C.S., Bailey, T.A., Luthert, P.J., Chong, N.H., "Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders", *Br J Ophthalmol*, 84(6), 654-66, (2000).
- [49] Gopal, S.K., Greening, D.W., Zhu, H.J., Simpson, R.J., Mathias, R.A., "Transformed MDCK cells secrete elevated MMP1 that generates LAMA5 fragments promoting endothelial cell angiogenesis", *Sci Rep*, 6, 28321, (2016).
- [50] Li, H., Liang, X., Qin, X., Cai, S., Yu, S., "Association of matrix metalloproteinase family gene polymorphisms with lung cancer risk: logistic regression and generalized odds of published data", *Sci Rep*, 5, 10056, (2015).
- [51] Shen, C.J., Kuo, Y.L., Chen, C.C., Chen, M.J., Cheng, Y.M., "MMP1 expression is activated by Slug and enhances multi-drug resistance (MDR) in breast cancer", *PLoS One*, 12(3), e0174487, (2017).
- [52] Liu, H., et al., "Influence of single nucleotide polymorphisms in the MMP1 promoter region on cutaneous melanoma progression", *Melanoma Res*, 22(2), 169-75, (2012).
- [53] Hettiaratchi, A., et al., "The collagenase-1 (MMP-1) gene promoter polymorphism - 1607/2G is associated with favourable prognosis in patients with colorectal cancer", *Br J Cancer*, 96(5), 783-92, (2007).
- [54] Nam, S.I., et al., "A polymorphism at -1607 2G in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) increased risk of sudden deafness in Korean population but not at -519A/G in MMP-1", *Laryngoscope*, 121(1), 171-5, (2011).
- [55] Boumiza, S., et al., "Role of MMP-1 (-519A/G, -1607 1G/2G), MMP-3 (Lys45Glu), MMP-7 (-181A/G), and MMP-12 (-82A/G) Variants and Plasma MMP Levels on Obesity-Related Phenotypes and Microvascular Reactivity in a Tunisian Population", *Dis Markers*, 2017, 6198526, (2017).
- [56] Rutter, J.L., et al., "A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription", *Cancer Res*, 58(23), 5321-5, (1998).

- [57] Dörr, S., et al., "Association of a specific haplotype across the genes MMP1 and MMP3 with radiographic joint destruction in rheumatoid arthritis", *Arthritis Res Ther*, 6(3), R199-207, (2004).
- [58] Song, Y.Q., et al., "Association between promoter -1607 polymorphism of MMP1 and lumbar disc disease in Southern Chinese", *BMC Med Genet*, 9, 38, (2008).
- [59] Suzuki, K., Enghild, J.J., Morodomi, T., Salvesen, G., Nagase, H., "Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin)", *Biochemistry*, 29(44), 10261-70, (1990).
- [60] Evans, J.D., Ghaneh, P., Kawesha, A., Neoptolemos, J.P., "Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer", *Digestion*, 58(6), 520-8, (1997).
- [61] Morosova, E.B., Chukhlovin, A.B., Kulagina, N.V., Kipich, N.V., Totolian, A.A., "Functional gene polymorphism of matrix metalloproteinase-1 is associated with benign hyperplasia of myo- and endometrium in the Russian population", *Genet Test Mol Biomarkers*, 16(9), 1032-7, (2012).
- [62] Souslova, V., et al., "Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-3 gene by transcription factor NFkappaB", *PLoS One*, 5(3), e9902, (2010).
- [63] Ye, S., et al., "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*, 271(22), 13055-60, (1996).
- [64] Farina, A.R.veMackay, A.R., "Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression", *Cancers (Basel)*, 6(1), 240-96, (2014).
- [65] Appleby, T.C., et al., "Biochemical characterization and structure determination of a potent, selective antibody inhibitor of human MMP9", *J Biol Chem*, 292(16), 6810-6820, (2017).
- [66] Prasetyo, E., Asadul Islam, A., Hatta, M., Widodo, D., Pattelongi, I., "The Profile of MMP-9, MMP-9 mRNA Expression, -1562 C/T Polymorphism and Outcome in High-risk Traumatic Brain Injury: The Effect of Therapeutic Mild Hypothermia", *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 57(11), 612-619, (2017).
- [67] Crawford, H.C.veMatrisian, L.M., "Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells", *Enzyme Protein*, 49(1-3), 20-37, (1996).

- [68] Buraczynska, K., Kurzepa, J., Ksiazek, A., Buraczynska, M., Rejdak, K., "Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Gene Polymorphism in Stroke Patients", *Neuromolecular Med*, 17(4), 385-90, (2015).
- [69] Ye, S., "Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases", *Matrix Biol*, 19(7), 623-9, (2000).
- [70] M, K.P.veLatreille, V., "Sleep Disorders", *Am J Med*, 132(3), 292-299, (2019).
- [71] Chung, F.veElsaid, H., "Screening for obstructive sleep apnea before surgery: why is it important?", *Current Opinion in Anesthesiology*, 22(3), 405-411, (2009).
- [72] Heinzer, R., et al., "Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study", *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(4), 310-318, (2015).
- [73] Arnardottir, E.S., Bjornsdottir, E., Olafsdottir, K.A., Benediktsdottir, B., Gislason, T., "Obstructive sleep apnoea in the general population: highly prevalent but minimal symptoms", *European respiratory journal*, 47(1), 194-202, (2016).
- [74] Maeder, M.T., Schoch, O.D., Rickli, H., "A clinical approach to obstructive sleep apnea as a risk factor for cardiovascular disease", *Vascular health and risk management*, 12, 85, (2016).
- [75] Punjabi, N.M., "The epidemiology of adult obstructive sleep apnea", *Proc Am Thorac Soc*, 5(2), 136-43, (2008).
- [76] Kapur, V.K., Resnick, H.E., Gottlieb, D.J., "Sleep disordered breathing and hypertension: does self-reported sleepiness modify the association?", *Sleep*, 31(8), 1127-32, (2008).
- [77] Walia, H.K., et al., "Association of severe obstructive sleep apnea and elevated blood pressure despite antihypertensive medication use", *J Clin Sleep Med*, 10(8), 835-43, (2014).
- [78] Carberry, J.C., Amatory, J., Eckert, D.J., "Personalized Management Approach for OSA", *Chest*, 153(3), 744-755, (2018).
- [79] Osman, A.M., Carter, S.G., Carberry, J.C., Eckert, D.J., "Obstructive sleep apnea: current perspectives", *Nat Sci Sleep*, 10, 21-34, (2018).

- [80] Dempsey, J.A., Xie, A., Patz, D.S., Wang, D., "Physiology in medicine: obstructive sleep apnea pathogenesis and treatment--considerations beyond airway anatomy", *J Appl Physiol (1985)*, 116(1), 3-12, (2014).
- [81] Eckert, D.J., "Phenotypic approaches to obstructive sleep apnoea - New pathways for targeted therapy", *Sleep Med Rev*, 37, 45-59, (2018).
- [82] Eckert, D.J., White, D.P., Jordan, A.S., Malhotra, A., Wellman, A., "Defining phenotypic causes of obstructive sleep apnea. Identification of novel therapeutic targets", *Am J Respir Crit Care Med*, 188(8), 996-1004, (2013).
- [83] Kubin, L., "Neural Control of the Upper Airway: Respiratory and State-Dependent Mechanisms", *Compr Physiol*, 6(4), 1801-1850, (2016).
- [84] Horner, R.L., Hughes, S.W., Malhotra, A., "State-dependent and reflex drives to the upper airway: basic physiology with clinical implications", *J Appl Physiol (1985)*, 116(3), 325-36, (2014).
- [85] Padala, C., et al., "Synergistic effect of collagenase-1 (MMP1), stromelysin-1 (MMP3) and gelatinase-B (MMP9) gene polymorphisms in breast cancer", *PLoS One*, 12(9), e0184448, (2017).
- [86] Beeghly-Fadiel, A., et al., "No association between matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, and MMP-7 SNPs and endometrial cancer risk", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(6), 1925-8, (2009).
- [87] Brinckerhoff, C.E., Rutter, J.L., Benbow, U., "Interstitial collagenases as markers of tumor progression", *Clin Cancer Res*, 6(12), 4823-30, (2000).
- [88] Fanjul-Fernández, M., Folgueras, A.R., Cabrera, S., López-Otín, C., "Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(1), 3-19, (2010).
- [89] Yan, C.veBoyd, D.D., "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression", *Journal of cellular physiology*, 211(1), 19-26, (2007).
- [90] Kong, Q., et al., "Examining the association of MMP-1 gene -1607 (2G/1G) and -519 (A/G) polymorphisms with the risk of osteomyelitis: A case-control study", *Medicine (Baltimore)*, 96(42), e4969, (2017).
- [91] Abd-Allah, S.H., Shalaby, S.M., Pasha, H.F., El-Shal, A.S., Abou El-Saoud, A.M., "Variation of matrix metalloproteinase 1 and 3 haplotypes and their serum levels in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis", *Genet Test Mol Biomarkers*, 16(1), 15-20, (2012).

- [92] Ghilardi, G., et al., "Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness", *Clin Cancer Res*, 7(8), 2344-6, (2001).
- [93] Liu, L., et al., "A functional polymorphism (-1607 1G-->2G) in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with development and progression of lung cancer", *Cancer*, 117(22), 5172-81, (2011).
- [94] Malik, N., et al., "Association of matrix metalloproteinase-1 gene polymorphism with glioblastoma multiforme in a northern Indian population", *J Neurooncol*, 102(3), 347-52, (2011).
- [95] Huang, C.D., et al., "Matrix metalloproteinase-1 polymorphism is associated with persistent airway obstruction in asthma in the Taiwanese population", *J Asthma*, 46(1), 41-6, (2009).
- [96] Guan, X., et al., "Matrix metalloproteinase 1, 3, and 9 polymorphisms and esophageal squamous cell carcinoma risk", *Med Sci Monit*, 20, 2269-74, (2014).
- [97] Ding, C., et al., "Matrix Metalloproteinase-3 -1171 5A/6A Polymorphism (rs35068180) is Associated with Risk of Periodontitis", *Sci Rep*, 5, 11667, (2015).
- [98] Sakowicz, A., Fendler, W., Lelonek, M., Sakowicz, B., Pietrucha, T., "Genetic polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients under 45 years of age", *Biochem Genet*, 51(3-4), 230-42, (2013).
- [99] Zhou, X., et al., "Haplotype analysis of the matrix metalloproteinase 3 gene and myocardial infarction in a Chinese Han population. The Beijing atherosclerosis study", *Thromb Haemost*, 92(4), 867-73, (2004).
- [100] Beyzade, S., et al., "Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction", *J Am Coll Cardiol*, 41(12), 2130-7, (2003).
- [101] Rech, T.F., et al., "Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and susceptibility to systemic sclerosis", *Genet Mol Res*, 15(4)(2016).
- [102] Dey, S., et al., "Matrix metalloproteinase3 gene promoter polymorphisms and their haplotypes are associated with gastric cancer risk in eastern Indian population", *Mol Carcinog*, 51 Suppl 1, E42-53, (2012).

- [103] Li, X.P., Wan, G.Z., Wang, G.J., Li, J.F., "MMP3 -1171 5A/6A Promoter Genotype Influences Serum MMP3 Levels and Is Associated with Deep Venous Thrombosis", *Ann Vasc Surg*, 34, 261-7, (2016).
- [104] Teplyakov, A.T., et al., "[Assessment of the role of matrix metalloproteinase-3 gene polymorphism in the development of chronic heart failure]", *Ter Arkh*, 87(4), 8-12, (2015).
- [105] Liu, D., Duan, W., Guo, H., Xu, X., Bai, Y., "Meta-analysis of associations between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases and the risk of colorectal cancer", *Int J Colorectal Dis*, 26(9), 1099-105, (2011).
- [106] Fallah, S., Seifi, M., Samadikuchaksaraei, A., "Risk of coronary artery stenosis in Iranian type 2 diabetics: is there a role for matrix metalloproteinase-3 gene (-1612 5A/6A) polymorphism?", *J Physiol Biochem*, 66(4), 359-64, (2010).
- [107] Chen, L., et al., "Matrix metalloproteinase-9 -1562C/T promoter polymorphism confers risk for COPD: a meta-analysis", *PLoS One*, 8(3), e60523, (2013).
- [108] Rybakowski, J.K., Skibinska, M., Leszczynska-Rodziewicz, A., Kaczmarek, L., Hauser, J., "Matrix metalloproteinase-9 gene and bipolar mood disorder", *Neuromolecular Med*, 11(2), 128-32, (2009).
- [109] Zhang, Z., et al., "Matrix Metalloproteinase 9 Gene Promoter (rs 3918242) Mutation Reduces the Risk of Diabetic Microvascular Complications", *Int J Environ Res Public Health*, 12(7), 8023-33, (2015).
- [110] Rahimi, Z., Yari, K., Rahimi, Z., "Matrix metalloproteinase-9 -1562T allele and its combination with MMP-2 -735 C allele are risk factors for breast cancer", *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(3), 1175-9, (2015).
- [111] Zhang, B., et al., "Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis", *Circulation*, 99(14), 1788-94, (1999).
- [112] Tang, Y., et al., "Associations of matrix metalloproteinase-9 protein polymorphisms with lymph node metastasis but not invasion of gastric cancer", *Clin Cancer Res*, 14(9), 2870-7, (2008).

- [113] Benesova, Y., et al., "Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms in multiple sclerosis", *J Neuroimmunol*, 205(1-2), 105-9, (2008).
- [114] Rybakowski, J.K., Skibinska, M., Kapelski, P., Kaczmarek, L., Hauser, J., "Functional polymorphism of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene in schizophrenia", *Schizophr Res*, 109(1-3), 90-3, (2009).

EKLER

6. EKLER


EK A: Etik Kurul İzni

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Uyku apne sendromunda matriksmetaloproteinazların promotör polimorfizminin araştırılması (mmp1 mmp3 mmp9)"
-----------------------	---

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ	Çağrı Yarıtkası Uyak Yolu Çizisi, 10145 BALIKESİR
	TELEFON	266 612 14 61-6707
	FAKS	
	E-POSTA	etik_kurulu@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Ayla AVCIKURT			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	BALIKESİR			
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alınlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>				
Diger ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkan Yardımcısı
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Gülten ERKEN
İmza: 

Not: Etik kurul başkanı, imzastan son almışığı her sayfaya imza atmaktadır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Uyku apne sendromunda matriksmetaloproteinazların promotör polimorfizminin araştırılması (mmp1 mmp3 mmp9)"
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ				Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>					
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
Diğer:	<input type="checkbox"/>						
KARAR BELGELERİ	Karar No:2018/187	Tarih: 21.11.2018					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırılması/çalışılması gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak maddemizi ve uygun bulmamız olup araştırılması/çalışılması başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden izin alınması şartıyla gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına taplatmaya karar etik kurul üye tam sayısının oybirliği ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İy Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Fuat EREL	Göğüs Hastalıkları AD	BAÜN Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Gülten ERKEN	Fizyoloji Ad	BAÜN Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üyesi Elif AKSÖZ	Tıbbi Farmakoloji AD	BAÜN Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üyesi Akın USTA	Kadın Hastalıkları ve Doğum AD	BAÜN Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üyesi Eyüp AVCI	Kardiyoloji AD	BAÜN Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Mehmet ÇALIŞKAN	Halk Sağlığı AD	Balikesir KEAS Organize Sanayi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Av.Erman ARDA	Avukat	Serbest	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hüsnü KUNDAKÇI	Eczacı	Balikesir Sağlık Uygulama ve Arş.Hast.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Serhat ALDEMİR	Emekli		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Fuat EREL ✓

İmza: Doç. Dr. Gülten Erken

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

