



T.C.

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKUT İNME TANISI ALMIŞ HASTALARDA *TNFRSF11B* GEN
POLİMORFİZMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Pınar ÇOĞAŞ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans

Danışman

Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ

TOKAT, 2015

AKUT İNME TANISI ALMIŞ HASTALARDA TNFRSF11B GEN POLİMORFİZMİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Tezin Kabul Ediliş Tarihi : 09.07.2015

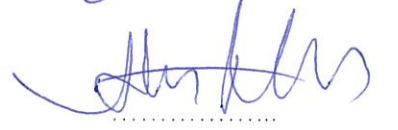
Jüri Üyeleri (Ünvanı, Adı, Soyadı)

İmzası

Başkan : Doç.Dr.Nevin KARAKUŞ



Üye : Yrd.Doç.Dr.Akın TEKCAN



Üye : Yrd.Doç.Dr.Serbülent YİĞİT



Bu tez, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
...../...../2015 tarih ve sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü : Doç.Dr.Hacı Ömer ATEŞ

Mühür

İmza

T.C.

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(23/06/2015)

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı ve Soyadı

Pınar ÇOĞAŞ

İmzası

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ile ilgili edindiğim bilgilerin çoğunu bana öğreten ve tez çalışmalarım sırasında bana her türlü destek ve yardımı veren danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ'a, tez çalışmalarım sırasında büyük bir özveriyle araştırılacak hasta grubunun oluşturulmasını sağlayan Acil Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Nurşah BAŞOL'a, çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Hacı Ömer ATEŞ'e, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU'na ve laboratuvar çalışmalarıyla ilgili bilgi ve becerilerimin gelişmesine yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Serbülent YİĞİT'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm Anabilim Dalımız Araş. Gör. Nihan BOZKURT'a, Araş. Gör. Saime SEZER'e ve Araş. Gör. Emel ENSARİ ÖZSOY'a teşekkür ederim.

Ayrıca benden yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Tugba CEVİZ'e teşekkür ederim.

Yüksek Lisans çalışmalarım sırasında gösterdikleri sabır ve desteklerinden dolayı annem Necla ÇOĞAŞ'a, babam Ahmet ÇOĞAŞ'a ve kardeşim Tolga ÇOĞAŞ' a teşekkür ederim.

Son olarak bu çalışmayı destekleyen Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma Fonu'na (2014\104 Nolu proje) desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

ÖZET

**AKUT İNME TANISI ALMIŞ HASTALARDA *TNFRSF11B* GEN
POLİMORFİZMİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Pınar ÇOĞAŞ, Yüksek Lisans Tezi

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tokat, 2015

İnme, dünya genelinde insanlarda ölüme sebep olan hastalıklar arasında 3. sırada yer alan önemli bir hastalıktır. İnsanlarda osteoporoz ve vasküler hastalıkların birlikte gözlenmesi ve yapılan klinik çalışmalarda bu hastalarda serum tümör nekrozis faktör reseptör süper ailesi üyesi 11b (*TNFRSF11B*) düzeylerinin yüksek bulunmasından dolayı, *TNFRSF11B*'nin ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür.

Çalışmamızda akut inme ile *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için 107 akut inme geçirmiş hasta ve 100 sağlıklı kontrol DNA'ları polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmiyle (RFLP) analiz edildi.

Hasta ve kontrollerin genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla $p=0,476$ ve $p=0,622$). Akut inme geçirmiş hastaların demografik ve klinik özellikleri ile *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi karşılaştırıldığında da herhangi bir ilişkiye rastlanmadı ($p>0,05$). Sonuç olarak, bulgularımız, akut inme ile *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte hasta grubu ve kontrol grubu sayısı artıldığında olasılık oranının negatif veya pozitif yönde değişmesi olasılığı vardır.

Anahtar Kelimeler: *TNFRSF11B*, inme, polimorfizm

SUMMARY

EVALUATION OF *TNFRSF11B* GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS DIAGNOSIS WITH ACUTE STROKE

Pınar ÇOĞAŞ, MsC Thesis

Gaziosmanpasa University, 2015

Stroke is an important disease that is placed in the third position among the diseases that cause death in humans worldwide. Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (*TNFRSF11B*) has been suggested to be a risk factor for atherosclerosis and cardiovascular diseases because of the observation of osteoporosis and vascular diseases together in humans, and the high levels of serum *TNFRSF11B* in these patients in clinical trials.

The DNAs of 107 acute stroke patients and 100 healthy controls have been analysed by polimerase chain reaction (PCR) and restriction fragment lenght polymorphism (RFLP) to evaluate the relation between *TNFRSF11B* gene 1181G>C polymorphism and acute stroke in our study.

When we compared the genotype and allele frequencies of patients and controls, any statistically significant differences was not found between them ($p=0,476$ ve $p=0,622$, respectively). Any association also was not observed when demographical and clinical characteristics of patients was compared with *TNFRSF11B* gene 1181G>C polymorphism ($p>0,05$). As a result, our findings showed that there was no assocation between *TNFRSF11B* gene 1181G>C polymorphism and acute stroke. However, there is a possibility that the odds ratio could change either positively or negatively if the sizes of the patient and the control groups are increased.

Key words: *TNFRSF11B*, stroke, polymorphism

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET	iii
SUMMARY.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLOLAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.TANIM	4
2.2.İNME İNSİDANSI	5
2.3.İNME PREVALANSI	6
2.3.1.İNme Sınıflandırılması	6
2.3.1.1.İskemik İnme	7
2.3.1.2.İNmede Risk Faktörleri	12
2.3.2. <i>TNFRSF11B</i>	18
2.3.3.RANKL	19
2.3.4.RANK	21
2.3.5. <i>TNFRSF11B</i> Proteinin Yolaklarla Bağlantısı	22
3.MATERYAL VE METOD	27
3.1.ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER.....	29
3.1.1.Alet ve Cihazlar	29

3.1.2.Kimyasal Maddeler.....	29
3.1.3.Çözeltiler.....	30
3.2.YÖNTEM	31
3.2.1.DNA izolasyon	31
3.3.POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON (PZR) TEKNİĞİ.....	32
3.4.RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP) ANALİZİ.....	33
3.5.ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ	33
3.5.1. <i>TNFRSF11B</i> geni 1181G>C polimorfizmi.....	34
3.5.2 <i>TNFRSF11B</i> geninde RFLP analizi.....	37
3.6.İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	38
4.BULGULAR.....	39
5.TARTIŞMA.....	45
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
7.KAYNAKLAR	49
8.ÖZGEÇMİŞ	58

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1 Hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin araştırmaya dahil edilip, dahil edilmeme kriterleri.....	28
Tablo 3.5.1.1 <i>TNFRSF11B</i> geninin 1181G>C bölgesindeki polimorfizminin analizinde kullanılan primerler.....	34
Tablo 3.5.1.2: <i>TNFRSF11B</i> geninde 1181G>C bölgesindeki polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı	36
Tablo 3.5.1.3 <i>TNFRSF11B</i> geni 1181G>C polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR programı	36
Tablo.3.5.2.1 <i>TNFRSF11B</i> geni 1181G>C bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan enzim kesimi koşulları	37
Tablo 3.5.2.2: <i>TNFRSF11B</i> geni 1181G>C polimorfizmi için yapılan RFLP sonucunda oluşan bantların boyutları	38
Tablo 4.1: Çalışmaya dahil edilen Akut İnme hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin cinsiyet ve yaş ortalamalarına ait istatistik bulgular.....	39
Tablo 4.2: Akut İnme hasta grubu ve kontrol grubunun <i>TNFRSF11B</i> geni 1181G >C polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı	41
Tablo 4.3: Çalışmaya dahil edilen Akut İnme hastalarının demografik ve klinik özelliklerin <i>TNFRSF11B</i> geni 1181G>C polimorfizmine göre değerlendirilmesi	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.3.2.1: <i>TNFRSF11B</i> geninin kromozom 8 üzerindeki yerleşiminin gösterimi	19
Şekil 2.3.2.2: <i>TNFRSF11B</i> geninin ekzon bölgelerinin gösterimi	19
Şekil 2.3.3.1: <i>TNFRSF11B</i> , RANK ve RANKL' nin osteoklastojenezdeki rolleri ve hücre içi sinyal iletimi	21
Şekil 2.3.5.1: <i>TNFRSF11B</i> protein yapısı	24
Şekil 2.1.5.2: <i>TNFRSF11B</i> , RANKL ve RANK' ların öncül osteoklastın olgun osteoklasta farklılaşmasındaki rolü.....	24
Şekil 3.5.1.1: <i>TNFRSF11B</i> geni 1181G>C değişiminde polimorfik bölgelerin gösterilmesi	35
Şekil 4.1: <i>TNFRSF11B</i> geni 1181G>C polimorfik bölgesinin Spe1 restriksiyon endonükleazı ile belirlenen RFPL sonuçları	40
Şekil 4.2: Akut İnmeli hastalar ve Kontrollerde Genotip Frekanslarının Karşılaştırılması	42
Şekil 4.3: Akut İnmeli Hastalar ve Kontrollerde Allel Frekanslarının Karşılaştırılması	42

SİMGELER VE KISALTMALARI

AF: Atriyal firilasyon

bFGF-2: Temel fibroblast büyüme faktörü 2

bSKA: Bölgesel serebral kan akımı

bSPB: Bölgesel perfüzyon basıncı

bSVR: Bölgesel serebrovasküler rezistans

BT: Bilgisayarlı tomografi

CADASIL: Subkortikal enfarkt ve lökoensefalopati ile giden otozomal dominant serebral arteriyopati

CD40: Farklılaşma kümesi 40

CD40/FAS: Farklılaşma kümesi 40/fas ligandı

EKG: Elektrokardiografi

FGF: Fibroblast büyüme hormonu

GİA: Geçici İskemik Atak

IGF: İnsulin benzeri büyüme hormnu

IL: İnterlökin

LPS: Lipopolisakkarit

MR: Manyetik rezonans

NINDS: Nörolojik bozukluklar ve inme ulusal enstitüsü

NF- κb: Nükleer faktör κb

NSR: Normal sinüs ritmi

OR: Olasılıklar oranı

OCIF: Osteoklastojenezisi inhibe edici faktör

OPG: Osteoprotegerin

PGE2: Prostoglandin E2

PKB: Portein kinaz B

- PTH: Paratiroid Hormon
- PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
- RANK: Reseptör aktivatör nükleer kapa B
- RANKL: Reseptör aktivatör nükleer kapa B ligandı
- RFLP: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
- SSS: Santral sinir sistemi
- ST: Segment Elevasyonu
- TGF-a: Dönüştürücü büyüme faktörü α
- TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü β
- TNF: Tümör nekroz faktör
- TNFR: Tümör nekroz faktör reseptörü
- TNFRSF11B: Tümör nekroz faktör reseptörü süper aile üyesi 11B
- TOAST: Akut inme tedavisinde kullanılan sınıflandırma yöntemi
- TRAF: Tümör nekrozis faktör reseptör ilişkili faktör
- TRANCE: TNF ile ilişkili aktivasyonla indüklenmiş sitokin
- TRAIL: TNF ile ilişkili apoptozisi indükleyen ligand

1-GİRİŞ ve AMAÇ

İnme, ani gelişen, anormal kasılma, kuvvet kaybı ve konuşma bozukluğu olarak tanımlanmış olup beynin belli bir bölgesine kan akımı sağlayan damarın tıkanması veya kopması sonucu oluşmaktadır (Allan, 2005). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 yılında yayınladığı rapora göre, inme ve diğer serebrovasküler hastalıklar, koroner kalp hastalıklarından sonra dünyadaki 2. ölüm nedenidir (WHO, 2008). Amerikan Kalp Derneği'nin 2010 yılında yayınladığı istatistik raporuna göre, her yıl 795.000 insan inme geçirmektedir. Bunların 610.000 tanesi ilk atak, 185.000 tanesi ise tekrarlayan inmedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her 40 saniyede bir kişi inme geçirmektedir (Roger ve ark, 2010). İnme vakalarının %80-85'i iskemik, %15-20'i hemorajik kökenlidir (Silverman ve ark, 2009).

İnme olgularının %80-85'ini oluşturan iskemik inmelerin en sık üç nedeni damar embolizm, aterotromboz ve kanlanmanın azalmasıdır (Ayala ve ark, 2002). İskemik inmenin diğer nedenlerinden bazıları kan damarlarının iltihaplanması, damar duvarının içine kanamanın olması ve toplardamar içerisinde pıhtı oluşmasıdır. Kardiyoembolik inmelerin nedenlerin yaklaşık yarısını ritim bozukluğu (AF) oluşturur. İnme için bilinen risk faktörlerinden en sık rastlananları hipertansiyon, diyabet ve kolesterol yüksekliğidir (Adams ve ark, 1993).

Osteoprotegerin (OPG), osteoklastojenezisi inhibe edici faktör (OCIF) ya da tümör nekroz faktörü reseptörü süper aile üyesi 11 B (*TNFRSF11B*) olarak bilinir ve insanda *TNFRSF11B* geni tarafından kodlanır. *TNFRSF11B* geni insanda 8. kromozomun uzun kolu üzerinde 8q24' te yerleşiktir. 401 aminoasitlik bir polipeptid sentezler. Bu polipeptidin 21 aminoasitlik propeptid kısmı ayrıldıktan sonra 380 aminoasitlik olgun protein kısmını oluşturarak post translasyonel değişime neden

oluyor. 120 kDa'luk disülfid bağı içeren aynı iki polipeptit ve 60 kDa'luk tek bir polipeptit zincir yapısında hücre dışına çözünür bir glikoprotein olarak salgılanır. TNFR süper ailesinin diğer reseptörlerinden farklı olarak transmembran ve sitoplazmik kısımlar içermez. *TNFRSF11B* yedi yapısal bölgeden oluşur (Schoppet, 2002).

TNFRSF11B, osteoklastogenez inhibisyonuyla kemik döngüsünün merkezinde bulunur. Osteoporoz ve vasküler kalsifikasyonun; *RANKL/TNFRSF11B* sistemi aracılığıyla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Sonuçta, kemikten mobilize olan kalsiyumun damar duvarına yerleşmesine neden olur. Bununla birlikte, bazı hayvan çalışmalarında *TNFRSF11B*'nin aterosklerotik lezyonun progresyonuna karşı koruyucu bir faktör olabileceğini düşündüren sonuçlar da elde edilmiştir (Esen, 2011).

İnsanlarda vasküler hastalıklar ve osteoporozun sıkça beraber gözlenmesi, hedefi olan vasküler hücreler ve *TNFRSF11B*'nin kaynağı olan osteoklastlar, iskelet ve vasküler sisteme yakın hücreler arasında bağlantı olduğu düşünülmektedir. İnsanlar üzerindeki son klinik araştırmalarda yükselmiş serum *TNFRSF11B* düzeylerinin ilerleyen ateroskleroz ve kardiovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir. Serum *TNFRSF11B* düzeyinin, koroner arter hastalığıyla yakın ilişkili olduğu, dolayısıyla bu sitokinin koroner arter hastalığı için bir belirteç olduğu düşünülmektedir (Esen, 2011).

TNFRSF11B geninin çok sayıda polimorfizme sahip olduğu tespit edilmiştir: *TNFRSF11B* proteinin plazma seviyesi ve fonksiyonel aktivitesi, bu gen varyantlarından etkilenmektedir. İnternal karotis arter darlığı olan hastalarda yüksek olan *TNFRSF11B* protein seviyesi 245T>G, 950T>C ve 1181G>C polimorfizmleri ile ilişkilendirilmiştir. İtalyan populasyonunda yapılan bu çalışmada iskemik inme 364

diabet hastası ile iskemik inme geçirmemiş 492 diabetik hastası incelenmiş ve iskemik inme ile *TNFRSF11B* gen polimorfizmleri arasında ilişki bulunmuştur (Biscetti, 2013).

Bir hastalık için risk faktörlerinin bilinmesi etiyolojinin aydınlatılıp, proflaktik yaklaşımlar sunabileceğinden önem taşır. Genetik çalışmalar, etiyolojiyi saptamak, olası riskli hasta grubunu belirlemek açısından pek çok hastalıkta olduğu gibi inmede de elzemdir. Bu amaçla planladığımız bu çalışmada; Türk populasyonunda *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi ile akut inme arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.TANIM

Serebrovasküler hastalıklar beyin damarlarından geçmekte olan kanın yapısında oluşan bozulmalar sonucu damarların tıkanması ya da kan damarlarının kanamasıyla oluşan merkezi sinir sistemi hastalığıdır ve dünyada kalp hastalığı ve kanserden sonra üçüncü ölüm nedenleri arasında olup, beynin en sık görülen hastalıklarındadır. Hastaneye başvuran hastaların büyük çoğunluğunu oluşturan önemli serebrovasküler hastalıklar ölümcül olabildiği gibi bireylerde çeşitli bedensel işlevsizliğe yol açtığı için hastalığın iyileştirilmesine yönelik bakım gerektiren, ekonomik ve sosyal sorunlara da yol açabilmektedir (Adams, 1997; Kumral, 1993).

Nörolojik Bozukluklar ve İnme Ulusal Enstitüsü (NINDS), serebrovasküler hastalıklar arasında yer alan inmeyi beyne giden kan akımının ani bir rahatsızlık nedeniyle engellenmesine bağlı olarak gelişen beyin fonksiyonlarındaki bozukluk olarak tanımlar (<http://www.ninds.nih.gov/disorders/stroke/stroke.htm>). Akut inmenin %80-85'ini oluşturan iskemik inmelerin en sık üç nedeni aterotromboz, atardamarlarda, embolizm ve kanlanmanın azalmasıdır (Ayala ve ark, 1998). İskemik inmenin diğer nedenlerinden bazıları kan damarlarının iltihaplanması, damar duvarının içine kanamanın olması ve toplardamar içerisinde pıhtı oluşmasıdır. Kardiyembolik inmelerin nedenleri arasında yaklaşık yarısını ritim bozukluğu (AF) oluşturur. İnme için bilinen risk faktörlerinden en sık rastlananları hipertansiyon, diyabet ve kolesterol yüksekliğidir (Adams ve ark, 1993).

2.2. İNME İNSİDANSI

Belirli bir zaman periyodunda bir populasyonda ortaya çıkan verilerin serebrovasküler olaylar açısından epidemiyolojisini incelemeye en geçerli yoldur. Malmgren ve ark. (1987), insidans çalışmalarında ideal kriterleri; inmenin tanımı iyi yapılmalı, *GİA* (Geçici istemik atak) dışlanmalı, populasyon da sınırlama yapılmaksızın incelenmeli, inmelerin kayıtları iyi tutulmalı, ilk atak olmalı ve yaşlara göre insidansı incelenmeli şeklinde söylemişlerdir (Balkan, 2002).

ABD 'de yılda 600000 yeni ya da tekrarlayan inme meydana gelmektedir. Yıllara ve ülkelere göre değişmekle beraber, genel bir fikir vermesi açısından bazı insidans değerlerinden söz edilecek olursa; inme erkeklerde 174/100000; kadınlarda 122/100000 oranlarında bildirilmiştir. İnme insidansı siyah ırkta 233/100000, beyaz ırkta 93/100000'tur (Kürşad, 2004).

Yapılan yıllık çalışmalarda yaşlara göre dağılımı: 55-64 yaş arası yıllık inme insidansı binde 1.7-3.6 kişi, 65-74 yaş arası binde 4.9-8.9 kişi, 75 yaştan sonra binde 13.5-17.9 kişidir. Ortalama yaşları 60 olan kadınların inme insidansları erkeklere oranla 2-3 kat daha azdır ve 85 yaşa doğru bu oran azalmaktadır (Güneş, 2005). 45 yaş öncesi inme insidansını, tüm olguların 4/100'ünü oluşturdukları için tahmin etmek zordur. 15-45 yaş arası inme insidansını Nencini ve ark.'ları 1/1000 olarak belirtmişlerdir (Nencini, 1988).

2.3.İNME PREVALANSI

Populasyonda belirli bir zamandaki olguların total sayısına inme prevalansı denir, yaşayan hastalara ve inmesi olan olguların insidansına bağlıdır. Prevalans yaşla birlikte artmakta ve coğrafi faktörlerden etkilenmektedir. Batı ülkelerinde inme prevalansı binde 8 iken Japonya'da binde 20'dir ve ülkemizde ise bu konuda yapılmış sağlıklı çalışmalar yoktur (Kumral, 2004). Batı ülkelerinde son on yılda yapılan çalışmalarda inmeye bağlı ölüm oranının azaldığı vurgulanmaktadır. Ortalama yaşam sürelerinin uzaması, inme sebepli ölümlerin ve inme insidansının azalmasıyla bağlantılıdır (Kuller, 1989). 1988 yılında Bogousslavsky ve ark.'larının yaptıkları çalışmaya göre de, inmelerin %89'u iskemiktir; bunun da %42'si aterosklerotik nedenli inmelerdir (Bogousslavsky ve ark, 1998). Ülkemizde Ege üniversitesinde yapılan çalışmaya göre ise inmelerin yüzde 76'sı iskemiktir, bunun da yüzde 36'sı ateroskleroza bağlı inmelerdir. İskemik inmelerde ortalama yaş 63 ± 12 , hemorajik inmede ortalama yaş 59 ± 12 'dir (Balkan,2002).

2.3.1.İnmenin Sınıflandırılması

İnme etiyojisine göre ilk sınıflandırmalar, lezyonun patolojisine göre yapılmış ve tüm inmeler %85 iskemik, %15 hemorajik olarak gruplandırılmıştır (Balkan, 2002). İlki olan iskemik inmede yetersiz kan akışı bir serebral infarktüs alanına neden olurken, ikincisi hemorajik olanda ise beyin parenkiması veya subaraknoid mesafeye olan kanama beyin dokusunu hasara uğramasına sebep olmaktadır (Emre, 2007).

2.3.1.1. İskemik İnme

Beyin vücut ağırlığının %2'sini oluşturmasına rağmen metabolik olarak en aktif organlardan biridir. Bu aktiviteyi sağlayabilmek için zengin kan akımına gereksinim duymaktadır. Erişkinlerde kalp debisinin normalde %15-17 kadarı beyine gitmektedir. Bu sayede akciğerler tarafından tutulan oksijenin %20'si kullanılır. Beyin genel olarak dakikada 750-800 ml kan kullanıp 46 ml kadar da oksijen tüketimi yapmaktadır. Beyin dokusunun 100 gramına dakikada 50 ml kan gelir (Balkan, 2002). Bu olaya bölgesel serebral kan akımı (bSKA) denir. bSKA; bölgesel perfüzyon basıncının (bSPB) bölgesel serebrovasküler rezistansa (bSVR) oranıyla belirlenir. Normal şartlarda sabit olmasına karşın bSPB kanı serebral döngüye yollayan arteryal basınçla geri dönen venöz basınç arasındaki farktan elde edilir. bSKA'daki bu değişiklikler genel olarak bSVR'deki değişimlere bağlıdır (Kumral, 2004). Fizyolojik şartların sabitlendiği ortamlarda beyin kan akımı sistemik kan basıncı değişikliklerinden etkilenmez. Sistemik ortalama arter basıncı 70-160 mmHg arasında bir değer aldığı sürece beyin kan akımının sabit kalmasını sağlayan mekanizmaya otopregülasyon adı verilmektedir. Prekapiller damarlardaki direnç değişikliği ile otopregülasyon sağlanır (Kırış, 2004). Serebral kan akımının 8-23 ml/dak/100 g olduğu durumlarda morfolojik değişiklikler oluşur. Yoğun iskemik merkez ve bu bölgenin etrafında kollateral akım olduğunda elektriksel nöronal fonksiyonunun bozulduğu fakat yaşayan nöronların bulunduğu bir halka vardır ki buna iskemik penumbra adı verilir. Bu kan akımı sayesinde Elektroensefalografi (EEG)'de yavaşlama görülür. Bu düzeyin altına düştüğünde iskemik dokunun enerji ihtiyacı alt seviyededir ve nörolojik belirtiler ortaya çıkmaya başlar. Serebral kan akımının 8 ml/dak/100 g altına düşmesi doku nekrozuna neden olur (Kırış, 2004; Adams, 1993).

Beyin kan akımının saniyeler içinde tamamen durması, nöron kaynaklı elektriksel iletimin kesilmesine, enerjinin birkaç dakika içinde azalmaya başlamasına ve kan içi dengenin ise bozulmasına sebep olmaktadır (Adams, 1993). Bu durumda yüksek enerjili fosfatların tükenmesiyle membran iyon pompası iflas eder. Potasyum hücre dışına çıkarken, sodyum, klor ve su hücre içine girerek membran depolarizasyonun oluşmasını sağlarlar. ATP ve fosfokreatinin kaybı, sodyum-potasyum transport sisteminin iflası geri dönüşümlü olduğu için geri dönüşümsüz yıkım ortaya çıkmayabilir. Beyin hücreleri ATP kaybını tam iskemide bir saat kadar idare edebilir. İskemik hücrede ATP oksijensiz olarak, düşük olan glikoz ve glikojen depolarından üretilemez. Laktat ve hidrojen iyonlarının birikmesiyle laktik asidoz oluşur. Hidrojen iyonları demire bağlanıp serbest radikallerin oluşmasını başlatır ve astroglial zedelenmenin artmasına neden olur. İyon pompasının işlevini yapmaması anoksik depolarizasyona yol açar. Sonuç olarak potasyum hücre dışına, sodyum, klor ve kalsiyum hücre içine girer. Bunlara glutamat ve aspartat gibi eksitator aminoasitlerin salınımı da eşlik eder. Kalsiyumun hücre içine girmesi iskemik nöron da hasarı arttırır. Kalsiyum fosfolipazı aktif hale getirerek membrana bağlı gliserofosfolipidlerin serbest yağ asitlerine ayrışmasına ve sonuçta diğer membran lipidlerinin serbest radikal peroksidasyonuna sebep olur. Bir de kalsiyum proteaz enzimlerinin aktif hale gelmesine sebep olarak proteinlerin lizisine ve nitrik oksit sentetazın aktif hale gelmesine, serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olur. Tüm bunların sonucunda da geri dönüşümsüz hücre hasarı oluşur ve hücre ölümü gerçekleşir (Gilroy ve ark, 2000).

Akut iskemiden dakikalar veya saatler sonrasında sitotoksik ödem gelişir. İskemik ödem ise inmeden 1-3 saat sonra giderek artar ve 5. gün civarında maksimum seviyeye ulaşır. Global veya fokal serebral iskemi sonrası parenkimal dokunun hasarı

iskemi anındaki kan miktarı ve iskeminin süresine bağlıdır. İskemiye uğrayan dokuda belirli bir süre sonra yeniden kanlanma olduğunda dokular normal fonksiyonlarını yapabilir. Fakat hasarlı doku ile kan karşı karşıya geldiğinde yeni hasarlar veya nekroz bölgesi gelişebilir. Kan akımı normalleşmesi sırasında olan hasarlanmaya ‘‘reperfüzyon hasarı’’ adı verilir. Reperfüzyon ilerleyen zamanda nöron kaynaklı hasarlara yol açarak hastalığın seyrinde kötüleşmeye sebep olabilir (Adams, 1993; Gilroyve ark, 2000).

Etiyolojisine göre serebral infarktlarda sınıflandırma, akut iskeminin tedavisi ve hastalığın seyrinin yanı sıra, ikincil koruma açısından da önemlidir. Bamford ve ark.’ları 1991 yılında klinik verilere öncelik vererek aşağıdaki sınıflandırmayı yapmışlardır (Bamford ve ark, 1991).

- 1- Total anterior sirkülasyon infarktları (TACI)
- 2- Parsiyel anterior sirkülasyon infarktları (PACI)
- 3- Posterior sirkülasyon infarktları (POCI)
- 4- Laküner infarktlar (LACI)

1993 yılında ise akut inme tedavisi (*TOAST*) çalışmasında kullanılan sınıflandırma klinik verilerine ilaveten etiyolojiye de yer vermiştir (Adams ve ark, 1993).

- 1- Geniş arter ateroskleroza (Tromboz veya Emboli)
- 2- Kardiyoembolizm
- 3- Küçük damar oklüzyonu (Lakün)
- 4- Diğer belirlenen nedenlere bağlı iskemik inme
- 5- Nedeni belirlenemeyen iskemik inme

TOAST çalışmasında kullanılan sınıflandırmaya göre:

Geniş arter ateroskerozu:

Tüm iskemik inmelerin %50' si geniş arter ateroskerozuna bağlıdır. Bu grup sıklıkla ekstra kranial ve daha nadir olmak üzere intrakranial damarlarda ve bunların ikidala ayrılan bölgelerinde oluşan aterom plaklarının kopmasıyla bunu takip eden tromboza bağlı olarak gelişir. Bu sistemde proksimal arterin %70 - 80 ve üzerindeki darlıkları söz konusudur.

İnmenin geniş arter ateroskerozuna bağlı olduğunu söyleyebilmek için kranial BT ve kranial MR'da bir arter alanına uyan nekroz bölgesinin çapının 1,5 cm'den büyük olması, dopler ultasonografi ve anjiyografide belirtiden sorumlu damarda, %50'den fazla stenoz veya oklüzyon tespit edilmesi gerekmektedir (Balkan, 2002).

Kardiyoembolizm

Bu gruptaki tüm iskemik inmelerin %20'sinin oluşmasını sağlayan neden kalpten kaynaklanan embolilerdir ve ani gelişen, bazen bilinç kaybının eşlik ettiği inmelerdir. Başlangıçta epileptik nöbetler çoğunlukla inmeye eşlik ederken, istisna olarak bazı vakalarda ise, ilerleyen saatlerde nörolojik gerilemelerde hızla düzelmeler gözlenebilir.

Kranial BT veya MR'da geniş arter ateroskerozunda olduğu gibi, bir arter alanına uyan geniş kortikal nekroz bölgeleri görülmektedir ve değişik vasküler alanlarda çok sayıda lezyonun varlığı tanılamada belirteçtir (Balkan, 2002).

Küçük Damar Oklüzyonu (Lakiin) :

Genel olarak yaşlı hastalarda, tüm iskemik inmelerin %25'ini oluşturan bu gruptaki hastalardan hipertansiyon veya diabeti olanlarda ortaya çıkar. Laküner infarkt tanısı için, bu gruba özgü klinik belirteçlerin varlığı (pür sensoryal, sensori motor inme ve ataksik hemiparazi) ile birlikte, krainal BT veya MR'da saptanan doku nekroz çapının 1,5 cm' den küçük olması ve belirgin doku nekrozlarının gözlenmesi tanılamada önemlidir (Balkan, 2002).

Diğer belirlenen etyolojiler:

Bu grupta, SSS'nin primer ve sekonder damar iltihapları, CADASIL ve serebral amiloid anjiopati gibi nadir görülen küçük damar hastalıkları, konjenital damar hastalıkları, mitokondriyal hastalıklar, çarpma ve küçük doku parçaları ile kan hastalıkları yer alır ve tüm iskemik inmelerin %5'inden az yer tutarlar. Anjiyografi, leptomaningeal biyopsi ve ayrıntılı hematolojik, mikrobiyolojik ve biyokimyasal testler uygulanarak teşhis konur. Potansiyel kardioembolizm ve geniş arter aterosklerozu saf dışı bırakılmalıdır (Balkan, 2002).

Sebebi belirlenemeyenler:

Ayrıntılı incelemelere rağmen etyolojisi bulunamayan beyin dokusu harabiyetleriyle, yeterli tetkik edilemeyen vakalar bulunmaktadır. Bir de yapılan tetkiklerde birden fazla etyolojik neden bulunan vakalar da bu grupta değerlendirilir (Adams, 1993).

2.3.1.2. İnmede Risk Faktörleri

Çevresel veya bireysel bazı özellikler ve şartlar, iskemik inme riskini artırabilir. Risk faktörleri değişik yollarla inme oluşumunu neden olabileceğinden birden fazla risk faktörü olan kişilerde inmeye yakalanma riski daha yüksektir. İleri yaş ya da genetik yatkınlık gibi önlenemez durumlar görmezden gelinirse, bu risklerin tanınması, inme için öneminin belirlenmesi ve giderilmesi, akut inme sonucu oluşan beyin hasarını minimum seviyeye indirme girişimlerinden doğal olarak daha etkilidir (Kutluk, 2004). İskemik inmenin oluşumuna sebep olabilecek risk faktörlerinin saptanması tedavi ve koruyucu hekimlik açısından büyük bir öneme sahiptir.

İskemik İnme Risk Faktörlerinin Sınıflandırılması:

1-Değiştirilemeyen risk faktörleri

- Yaş
- Cinsiyet
- Irk
- Genetik

2- Değiştirilebilen risk faktörleri

2.1- Kesinleşmiş faktörler

- Hipertansiyon
- Diyabetes mellitus (hiperinsülinemi, glukoz intoleransı)
- Kalp hastalıkları
- Hiperlipidemi
- Sigara
- Asemptomatik Karotissistenozu
- Orak hücreli anemi

2.2.Kesinleşmemiş faktörler

- Alkol kullanımı
- Obezite
- Beslenme alışanlıkları
- Fiziksel inaktivite
- Hiperhomosistenemi
- Madde kullanımı ve bağımlılığı
- Oral Konraseptif Kullanımı
- Hiper koagülabilité
- İnflamasyon
- Migren

Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

Yaş: İnme genel olarak yaşlı popülasyonunda görülen bir hastalık olarak bilinmektedir ve inmeye yakalanma riski elli beş yaşından sonra her on yılda 2 kat artar.

Cinsiyet: Kadınlara göre erkeklerde daha fazla görülmesine rağmen kadın hastalarda ölümle sonuçlanma oranı daha yüksektir.

İrk: Çinlilerde, Zencilerde ve Japonlarda inmeye yakalanma oranı daha yüksektir.

Aile öyküsü: Kalıtsal özelliklerin anne ve babadan çocuğa geçmesi üzerine yapılan çalışmalarından elde edilen verilere göre monozigot ikizlerde inme riski, dizigot ikizlerdekinden beş kat daha yüksektir. Baba veya annede inme öyküsü varsa, inme riski artar (Kutluk, 2000).

Yapılan genetik çalışmalar, inme eşitleri ile haplotip tipleri arasında ilişkinin olabileceğini ortaya koymaktadır ama patojenik faktör oluşturabilecek bir mutasyon henüz bulunmamıştır (Goldestein ve ark, 2006).

Değiştirilebilen risk faktörleri

Kesinleşmiş risk faktörleri

Hipertansiyon: Hem hemorajik, hem de iskemik inme için major risk faktörü arasında yer almaktadır. Yapılan sayısız çalışmalarda ve klinik araştırmalarda sistolik kan basıncının 120-140 mmHg, diastolik kan basıncının ise 80-90 mmHg üzerinde olması kalp hastalıkları ve inme riskini yaşa bağlı olarak arttırmaktadır. Kan basıncının düşmesi ise inme riskini azaltıcı etki sağlamaktadır (Kutluk, 2004). Kan basıncının kontrol altına alınması, böbrek ve konjestif kalp yetmezliği olan hastalarda organların daha fazla zarar görmemesinin yanında inme riskini de azaltmaktadır (Vasan ve ark, 2002).

Kalp Hastalıkları: Tüm iskemik inmelerin %20'si ve gençlerde sebebi bilinmeyen inmelerin %40'ında potansiyel kardiyak emboli kaynağı bulunmaktadır (Benjamin ve ark, 1998). Romatizmal kalp hastalığı ile birlikte mitral stenoz ve atrial fibrilasyon kardiyak hastalıklara zemin hazırlayan faktörlerdendir (Idredavik ve ark, 1991). Romatizmal kaynaklı olmayan kronik ritim bozuklukları ise önceki çalışmalarda zararsız olduğu görüşüne varılmasına karşın yüksek inme riski taşıdığı ortaya konmuştur ve yaşın artmasıyla birlikte bu risk de artmaktadır. Kalp yetmezliği, kalp hastalığı, protez kalp kapak hastalığı, hasta sinüs sendromu gibi faktörlerde inme riski yüksektir. Kardiyak fonksiyon bozuklukları ve koroner kalp hastalıklarının tedavisi sağlanırsa inme insidansı belirgin oranda azalmaktadır (elik ve ark, 2002; David ve ark, 1998).

Diabetes mellitus: Şeker hastalarında yüksek kan basıncının artmasıyla birlikte hipertansiyona bağlı olarak inme riski de artmaktadır. Diyabet hastalarında makrovasküler hastalıklar başlıca ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (Bell, 1994). Shao ve ark'ları (2010) özellikle diabetes mellitus tip 2 hastalarında artmış vasküler kalsifikasyonlardan etkilenen ek bir nüfus tespit etmiştir. Ehara ve ark'ları (2004), dünyada diyabet hastalarının artması ve metabolik sendromlar göz önüne alındığında, vasküler kalsifikasyonu ve artmış kardiyovasküler hastalıkların önümüzdeki yıllarda artacağını vurgulamıştır.

Hiperlipidemi: Kan lipidleri arasında total kolesterol ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) yüksekliğinin ateroskleroz ile ilişkili olduğu bilinmektedir, fakat yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyinin düşük oluşu koroner kalp hastalıkları ile ilişkiliyken, serebrovasküler hastalıklar ile ilişkisi tam bilinmemektedir. ABD'de Honolulu şehrinde yapılan kalp program çalışmasında, kolesterol düzeyindeki artışın tromboembolik ve koroner arter hastalıklarının inme riskini artırdığı gösterilmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarda lipid düşürücü ilaç grubu olan statinlerin kullanılmasının iskemik inme riskini %32-50 azalttığı belirtilmiştir (Plehn ve ark, 1999; Balkan, 2002).

Sigara: Yapılan çalışmalarda sigara içmeyenlere oranla sigara içenlerde inme riskine yakalanma oranı yüksektir. Aynı zamanda sigara dumanına maruz kalan kişilerde inme riskine yakalanma riski bulunmuştur (Robert ve ark, 1986). Sigara içenler sigarayı bıraktıktan 5 yıl sonra içmeyenlerin düzeyine ineceğinden inme geçirme riski de aynı oranda azalacaktır (Balkan, 2002). Sigaranın; çapı daralmış damarın iç yüzeyini kan ögeleri tıkanmasıyla akut, ateroskleroz riskini arttırıcı olarak da kronik etkisi bulunmaktadır (Burns, 2003). İçilen tek bir sigaranın bile kalp atım hızını ve ortalama

arter basıncını arttırıcı etkisi olduğu, aktif ve pasif sigara içiminin ateroskleroz gelişmesi ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Silvestrini ve ark, 1996).

Asemptomatik karotis stenozu: 65 yaş üzerindeki kişiler içerisinde %4-5 oranında %50 stenoz saptanmıştır ve bu kişilerde inme riski %1-2 olup inme stenozun derecesiyle değişkenlik göstermektedir. Plak oluşumu, karotis arter hastalığı patofizyolojisinde önemli bir yer tutar. Ekolüsen yani fibroz yağlı plaklar ve heterojen plaklar arteriel emboli için yüksek risk faktörleri arasındadır. İnme insidansı fiziki muayenede karotis üfürümü duyulan kişilerde %1-2 arasındadır (Killer, 1989; Bilver ve ark, 2000).

Orak Hücreli Anemi: Otozomal resesif geçişli bir hastalıktır ve dünyada en sık rastlanan hemoglobinopatilerden biridir. β -globin zincirinin 6. pozisyonunda glutamik asitin valinle yer değiştirmesi sonucunda HbS oluşması ile karakterizedir. Yapılan araştırmalarda homozigot hastalarda inmeye yakalanma oranının daha yüksek olduğu ve 20 yaşına kadarki inme prevelansının %11 olduğu tespit edilmiştir (Adams, 1994).

Kesinleşmemiş Risk Faktörleri:

Alkol Kullanımı: Alınan alkol miktarına bağlı olarak inme riskinin artmasıyla ölüm oranları da buna bağlı olarak artmaktadır. Fazla alkol tüketimi, trigliserid düzeylerini, kan basıncını ve kardiyomiyopatiyi de artırmaktadır. Az miktarda alınan alkol inme için risk faktörü oluşturmamaktadır. Yapılan araştırmalarda alkol tüketiminde günde 5 kadehden fazla alınmasının inme riskin %69 oranında arttırdığı saptanmıştır ve bu oranın artmasında içilen alkol türünün de etkisi vardır (Gronbaek, 1995).

Obezite: Obezite, kardiyovasküler hastalıklar ve diabet hastaları için risk faktörü olduğundan dolayı, inme için de risk faktörüdür. Abdominal obezite, bel-kalça oranı ya da bel çevresi ölçümü kullanılarak yapılan değerlendirilmedir ve erkeklerde bel çevresi >102 cm (40 inç), kadınlarda >88 cm (35 inç)'in üzerinde olması ile karakterize

edilmiştir. Yapılan klinik çalışmalarda kilo artışı ve abdominal yağ dokusu artışı inme riskinde artmaya yol açarken, kilo vermenin inme riskini azaltıcı etkisinin olduğunu, kilo vermekle birlikte kan basıncının da azaldığı gösterilmiştir (Novak, 1998).

Beslenme Alışkanlığı: İnsan diyetindeki yağ miktarı ve çeşidi ile koroner arter hastalıkları arasında ilişki bulunmaktadır, fakat inme ile ilişkisi hala çelişkilidir (Balkan, 2002).

Fiziksel İnaktivite: Düzenli fiziksel aktiviteler kardiyovasküler hastalıkların oluşumunu geciktirdiğinden dolayı inme riskini de azaltmaktadır ve bunların tam tersi de inme riskini arttırabilir. Fiziksel aktivitenin her gün en az 30 dk sürmesi, diyet alışkanlıkları, kilo verme ve sigarayı bırakma gibi olumlu gelişmeler inmeye yakalanma riskini azaltmaktadır (Abbatt ve ark, 1994; Marsa ve ark, 1998).

Hiperhomosisteinemi: Yapılan çalışmalar homosistein düzeyinin yüksekliğinin aterosklerotik ve tromboembolik olaylar için bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Standardize edilmemiş plazma homosistein düzeyi ortalama olarak 5-15 $\mu\text{mol/L}$ normal olarak kabul edilmekte ve $\geq 16 \mu\text{mol/L}$ değerleri hiperhomosisteinemi olarak tanımlanmaktadır. Orta derecede yükseltilmiş homosistein düzeyleri folik asit veya B12 vitamini desteği ile normal seviyeye getirilebilir (Sarkon ve ark, 2001).

Madde Kullanımı ve Bağımlılığı: Amfetamin, eroin, kokain ve psikotinülan ilaçlar hem hemorajik hemde iskemik inmeye sebep olmaktadır. Bu maddeler kan basıncında değişime yol açmakta, kalbin iç zarının ve kapaklarının intihaplanma riskini arttırarak buna bağlı embolilere neden olmaktadır (Sloan ve ark, 1998).

Oral Kontraseptif Kullanımı: Östrojen içerikli oral kontraseptif kullanan kişilerde inme riski yüksektir. 35 yaş üzeri bayanlarda genellikle hipertansiyonu olan ve sigara kullanan kişilerde daha belirgin olduğu saptanmıştır (Pletti ve ark, 1996).

Hiperkoagülabilité: Hiperkoagülabilitéye neden olan trombofililer, öncelikle venöz tromboza yol açarak iskemik inmeye neden olmaktadır. Çocuklar ve genç erişkinlerde genellikle tekrarlayıcı inmelere neden olan bir diğér hastalık ise fosfolipid plazma proteinlerine karşı oluşmuş antikor sendromudur (Adams ve ark, 2006).

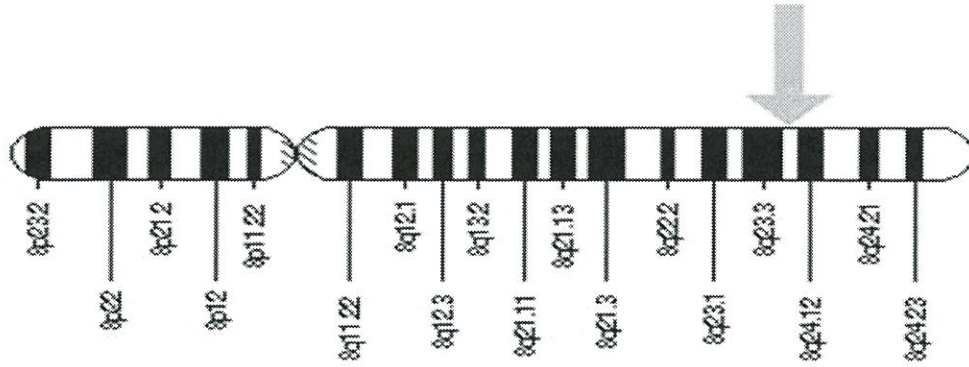
Migren: Araştırmalarda migren ve migrene bağılı inme tanı kriterlerinin tam konulamamasından dolayı migren inme ilişkisi hakkında belirsizlikler vardır. İnme hastalarının yaklaşık %10'unda migren anamnezi vardır (Kurşad, 2004).

İnflamasyon: İskemik inmenin en büyük nedeni ateroskleroz olduğu ve kronik iltihaplı hastalık olduğu düşünölmektedir.

İntersellöler adezyon moleküllerinin aterosklerozlu bölgede, endotel tarafından hızlandırılması ve endarterektomi preparatlarında T lenfositleri ve makrofajların bulunması, akut inflamatuvar cevabın plak istikrarsızlığına ve semptomların ortaya çıkışını hızlandırdığı düşünölmektedir (Balkan, 2005).

2.3.2. Tümör Nekroz Faktör Reseptörü Süper Aile Üyesi 11B (*TNFRSF11B*)

TNFRSF11B, OPG olarak bilinir ve insanda *TNFRSF11B* (Gen ID:4982) geni tarafından kodlanır. Salgılanan bir glikoprotein olduğu için serumdaki düzeyine bakılacağı zaman OPG olarak adlandırılır. *TNFRSF11B* geni insanda 8. kromozomun uzun kolu üzerinde 8q24 yerleşiktir (Biscettive ark, 2013) (Şekil 2.3.2.1). 5 ekzon, 4 intron içerir ve 29 kb uzunluğundadır (Şekil 2.3.2.2).



Şekil 2.3.2.1: *TNFRSF11B* geninin kromozom 8 üzerindeki yerleşiminin gösterimi

(<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TNFRSF11B>)



Şekil 2.3.2.2: *TNFRSF11B* geninin ekzon bölgelerinin gösterimi

(<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/TNFRSF11BID42610ch8q24.html>)

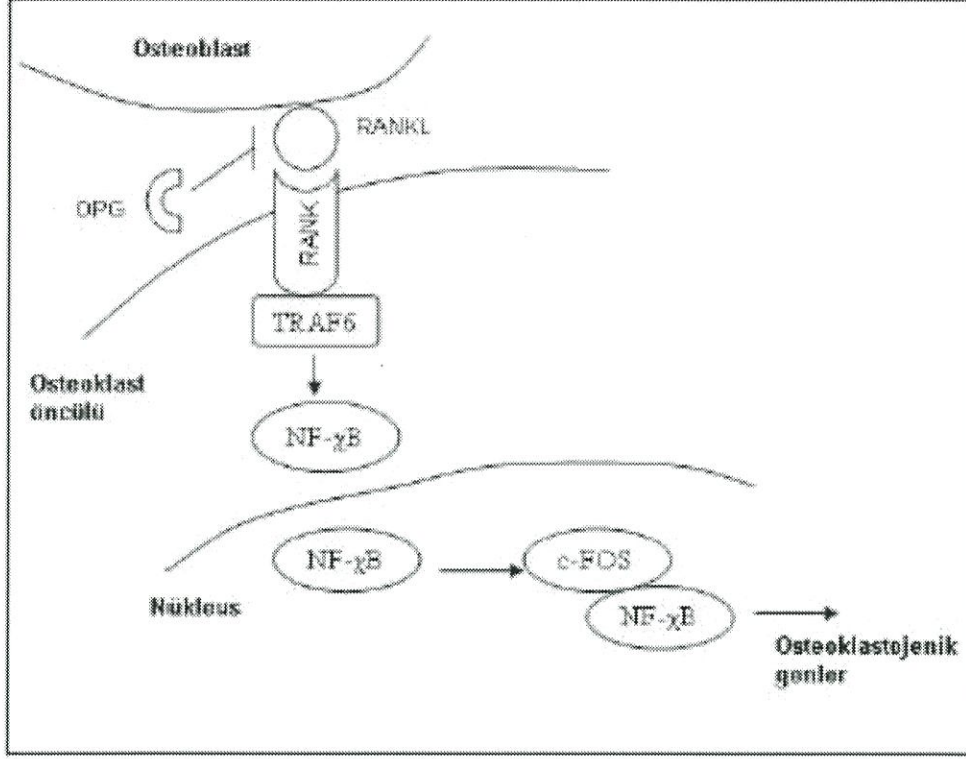
2.3.3.RANKL

TNF, ligand ailesinin bir üyesidir ve osteoklast farklılaşma faktörü, osteoprotegerin ligandı, TNF ilişkili aktivasyonca indüklenmiş sitokin (TRANCE) olarak da isimlendirilir (Suda,1999; Kong, 1999). RANKL, kalsiterol (Vit.D), paratroid hormon (PTH), glukokortikoidler, PGE2, sitokinler (IL-1, IL-6, IL-11, TNF α) tiroid hormonu, LPS, bakteriyel CpGp- DNA, viral çift iplikli DNA, histamin, bFGF-2, IGF ve düşük yer çekimi gibi çeşitli sinyallere cevap olarak osteoblastlar ve stromal hücrelerce üretilen bir moleküldür. Lenf nodlarında, timusta ve akciğerde yüksek oranlarda eksprese edilen RANKL, dalak ve kemik iliği gibi diğer dokularca daha düşük seviyelerde sentezlenmektedir.

RANKL homotrimerik bir proteindir, osteoblastik membran üzerinde bulunur ve T hücreleri aracılığıyla aktive edilir. RANK'ın uyarılması c-jun, NF- κ B ve

serin/treonin kinaz Akt/protein kinaz B (PKB) yollarını içeren hücre içi sinyal iletim kaskadını başlatır (Fogin ve ark, 1994; Fouque Aubert ve ark, 2008) (Şekil 2.3.3.1.). Bu yolların uyarılması öncül osteoklastların olgun osteoklastlara farklılaşmasını, aktive olmasını ve canlılıklarını devam ettirmesini sağlar. RANKL'ın kemikteki esas görevi, osteoklast oluşumunu, apoptozun engellenmesini sağlayarak kemik yıkımı ve kaybını arttırmaktadır. OPG/RANKL oranının kemik kütleini belirleyen ana faktör olduğu vurgulanmıştır. Genel olarak RANKL seviyesindeki artma OPG seviyesindeki azalma ile eş güdümlüdür. OPG/RANKL miktarını azaltan glukokortikoidler, fibroblast büyüme faktörü (FGF)-2, PTH OPG sentezini inhibe eder ve RANKL sentezini artırır (Blain ve ark, 2007; Blender ve ark, 2007). IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-11, IL-17 ve TNF- α gibi sitokinler de RANKL sentezini artırır. RANKL aracılı kemik yıkımı ve osteoklastogenez, osteoklastlar üzerinde eksprese edilen RANK reseptörüyle etkileşim yaparak gerçekleşir (Şekil 2.3.3.1) (Khoslo, 2008).

Tiroid hormonlarının RANKL-RANK üzerindeki etkisi çok iyi çözümlenememiş olmakla birlikte; T3'ün RANKL'ın mRNA ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir (Kurban ve 2007).



Şekil 2.3.3.1: *TNFRSF11B*, RANK ve RANKL'nin osteoklastojenezdeki rolleri ve hücre içi sinyal iletimi

2.3.4.RANK

Preosteoklastlara RANKL'ın bağlanması sağlayan tek reseptör RANK'dır. Kalsiyum metabolizmasını ve osteoklastogenezini kontrol eden bu reseptörün; meme dokusu, epitel hücreleri, kondrositler, trofoblastlar, dendritik hücreler, makrofaj/monositik hücreler, T ve B lenfositleri, öncül ve olgun osteoklastların yüzeyinde bulunduğu belirtilmiştir. Yapısal olarak RANK, heterotrimer protein yapıda bir TNF reseptörüdür. Bir trimerik RANK 2 formda ifade edilir; hücre yüzeyinde membrana bağlı bir molekül olarak veya enzimatik ayrılma yoluyla, çözünebilir bir molekül olarak salgılanır (Fate ve ark, 2000; Kim ve ark, 2006; Chen ve ark, 2006). RANK protein sentezi meme bezi ve primer dokudan ayrılan kanser hücresinin kemiğe yerleşme ihtimali yüksek iki kanser türü olarak bilinen meme ve prostat kanserini de

içeren bazı kanser hücrelerinde de görülmüştür (Chen ve ark, 2006). Günümüzde, insanlarda RANKL geninde doğuştan hastalığa sebep olan veya RANK geninde delesyonuna yol açan mutasyonlar belirlenememiştir. Ancak RANK'ın aktivasyonu veya OPG'nin yolu engellenmesi ile RANK sinyalinin artmasıyla sonuçlanan RANK ve OPG genindeki mutasyonlar kalıtsal ekspansil osteoliz (Hunghes ve ark, 2000) ve ailesel Paget hastalığında görülmüştür (Whyte ve ark, 2002). Ayrıca, ailesel Paget hastalığı bulunan bazı hastalarda RANK geninde aktive edici mutasyon saptanması ve bunun RANK vasıtasıyla NF- κ B sinyalinde artışa ve neticede osteolize yol açması bu sistemin insanlarda da önemini göstermektedir. RANKL'ın RANK' a bağlanması ile en az yedi hücre içi sinyal yolağı uyarılmaktadır (Hunghes ve ark, 2000). Bunlardan dört tanesi (NF- κ B inhibitörü/NF κ B, c-jun aminoterminalkinaz/aktivatör protein-1, c-myc ve kalsinörin/uyarılmış T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT) c1) doğrudan osteoklastogeneze aracılık ederken, diğer üçü de osteoklast canlılığını (src ve MKK6/p38/MITF) ve aktivasyonunu sürdürmesine (src ve hücre dışı sinyal düzenleyici-kinaz) aracılık eder. TRAF2, TRAF5 ve TRAF6 hepsi RANK'a bağlanmasına karşın, bunlardan sadece osteoklast için önemli olanının TRAF6 olduğu anlaşılmıştır (Hunghes ve ark, 2000; Giusti ve ark, 2007).

2.3.5. TNFRSF11B Proteinin Yolaklarla Bağlantısı

TNFRSF11B geni, TNFR süper ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak sitoplazmik kısım ve transmembran içermez (Biscettive ark, 2013). İlk olarak 401 amino asit olarak sentezlenir, daha sonra 21 amino asitlik propeptid kısmı kesilir ve 380 amino asitlik olgun protein oluşur. *TNFRSF11B* geninin yapısı Şekil 2.3.5.1 gösterilmiştir. *TNFRSF11B* geni; hücre dışına 120 kDa'luk disülfid bağı içeren

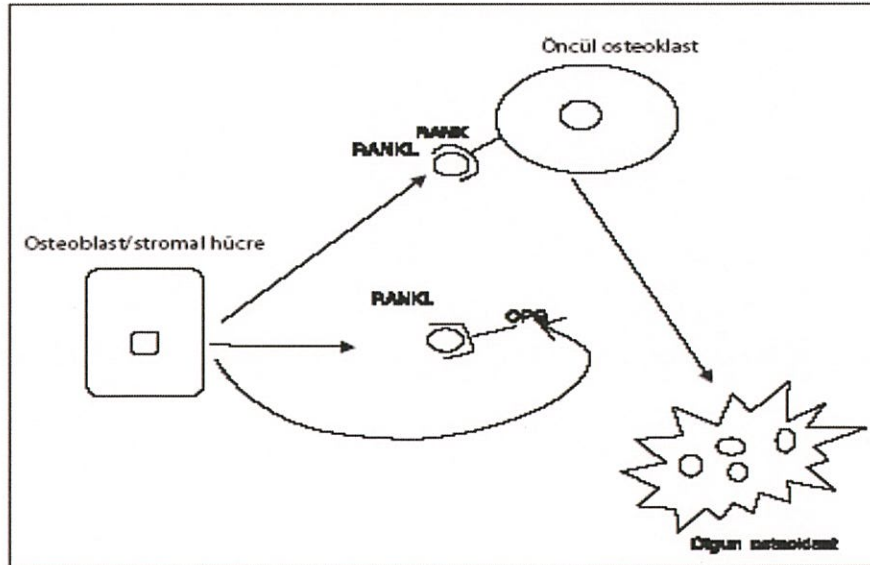
homodimerik ve 60 kDa'luk monomerik, çözünebilen bir glikoprotein olarak salgılanır ve yedi yapısal bölgeden oluşur. N-terminalinde CD40 ve TNFR-2 ile yakından ilişkili olan ve diğer TNFR ailesinin reseptörlerinin hücre dışındaki kısımlarının özelliklerine benzerlik gösteren dört adet sisteinden zengin bölge bulunmaktadır. *TNFRSF11B*'nin 1. ve 4. bölgeleri osteoklastojenezi inhibe edici aktiviteye sahiptir. Proteinin 5. ve 6. bölgelerine lokalize olmuş C-terminalinde ölüm bölgeleri yer almaktadır ve bunlar TNFR-1, CD95/Fas ve TNF ilişkili apoptozisi engelleyen ligand (TRAIL) gibi apoptozis mediyatörlerinin sitoplazmik bölgesinde de yer almaktadır. *TNFRSF11B*'nin 4., 5. ve 6. bölgelerinin apoptotik sinyalin iletimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. *TNFRSF11B*'nin TRAIL'e bağlanarak TRAIL'le indüklenen apoptozisi engelleyeceği vurgulanmıştır. *TRAIL*, *TNFRSF11B*'nin osteoklastojenezis üzerine olan inhibitor etkisini durdurabilir. Heparin bağlayan kısım, proteinin 7. bölgesinde yer almaktadır. *TNFRSF11B* bir transmembran proteoglikanı olan sindekan-1'e heparin bağlayan bölgesi vasıtasıyla heparin sülfat yan zincirleri ile bağlanarak hücre içine alınmasıyla bir kısmı lizozomlar aracılığı ile yıkılır. *TNFRSF11B*'nin heparin bağlayan bölgesi, RANKL bağlayan bölgesinden uzakta olmasından dolayı RANKL bağlanması veya kemik yıkımını inhibe edici etkisi ile bağlantılı değildir. RANKL/*TNFRSF11B* kompleksinin yıkımının da sindekan-1'e bağlanması aracılığıyla olabileceği vurgulanmıştır (Kostenuik ve ark, 2001; Hafba ve ark,1999; Bloin ve ark, 2007; Khasla, 2001 ; Schoppet ve ark, 2002). Hipokalsemik ve antirezorptif etkili olduğundan dolayı kemik dokusundaki biyolojik etkileri RANK/RANKL'ın etkisi ile zıttır. *TNFRSF11B*, *RANKL*'a bağlanarak bir tuzak reseptör gibi işlev görür ve RANKL'ın RANK'a bağlanmasını engeller (Şekil 2.3.5.2.). Neticede osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu

engellenir ve *RANKL* kemik emilimini oluşturmaz (Biscetti ve ark, 2013). Genetik mutasyonlar *TNFRSF11B*'nin Pagets hastalığında da rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 2.3.5.1: *TNFRSF11B* protein yapısı

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=101138.2011>)



Şekil 2.3.5.2: *TNFRSF11B*, *RANKL* ve *RANK*'ların öncül osteoklastın olgun osteoklasta farklılaşmasındaki rolü

TNFRSF11B ek olarak beyin, karaciğer, dalak, böbrek ve kemik iliği gibi pek çok immün hücrelerden salgılanır ve sitokin, peptid, ilaç ve hormonlar aracılığıyla salgılanması düzenlenir. TGF- α , TGF- β , IL-1 α , IL-18, kemik morfogenetik proteinleri ve *TNFRSF11B* mRNA seviyelerini arttıran 17 β -östradiol bunlardan bir tanesidir. Glukokortikoidlerin kemik yıkımını arttırdığı bilinmektedir, osteoporoz ve vasküler hastalık oluşturma potansiyeli olan siklosporin A, PGE2, PTH ve fibroblast büyüme faktörü-2 ise *TNFRSF11B* sentezini engeller. *TNFRSF11B*'nin sentezi ayrıca osteoblastlarda osteoblastik kemik oluşumunu da düzenleyen Wnt/ β -katenin sinyali ile de sağlanmaktadır (Brendan ve ark, 2003; Drugarin ve ark, 2003).

OPG'nin esas fonksiyonunun osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunun engellenmesi olarak bilindiğinden diğer dokularda sentezlenen *TNFRSF11B*'nin rolü tam olarak bilinmemektedir. Büyük arterlerin medyasında ve koroner arter düz kası ve endotel hücreleri gibi farklı damar hücre tiplerinde *TNFRSF11B*'nin sentezinin gösterilmiş olması, vasküler yatakta işlevi olduğunu göstermektedir (Schoppet, 2002). Yapılan bir çalışmada çok sayıda kardiyovasküler risk faktörü olan osteoporotik kadınlarda, serum OPG düzeyleri ile sistemik vasküler rezistans arasında pozitif ilişki, büyük arter elastisite indeksi ile negatif ilişki bulunmuştur (Luckish ve ark,2008).

Kalp hastalarında 10 yıllık incelemeler sonucunda OPG serum seviyesinin, sigara, sistemik inflamasyon belirteçleri, kronik infeksiyon, diabetes mellitus, kardiyovasküler risk faktörlerinin çoğuyla güçlü ilişkili olduğu gösterilmiştir. Artmış OPG serum seviyesinin ise kardiyovasküler hastalıklara yakanlanma sıklığı ve vasküler ölümler ile ilişkisi bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Bunun nedeninin ise

ateroskleroza koruyucu etkilerinden dolayı plazma seviyelerinin yükselmesine bağlı olabileceği vurgulanmıştır (Crisafulli ve ark, 2003).

Kafkasya'da yapılan bir çalışma da, *TNFRSF11B* geninin promotor bölgesinde 149T>C, 163A>G, 209G>A, 245T>G, 950T>C, intron 4' de 6890A>C ve ekzon 1'de 1181G>C polimorfizmlerinin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilerini araştırmıştır. 950T>C ve 1181G>C polimorfizmlerinin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu ve OPG'nin varlığı aterosklerotik lezyonlarla belgelenmiştir (Soufi ve ark, 2004).

3.MATERYAL VE METOD

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Acil Tıp Servisi'ne gelen hastalardan akut iskemik inme teşhisi konulan, yaşları 23 ile 96 arasında değişen toplam 107 akut inmeli hasta ve hasta grubuyla aynı yaş aralığında bulunan ve kendisinde veya ailesinde Akut İnme öyküsü bulunmayan toplam 100 sağlıklı kontrolden EDTA'lı tüplere 5'er ml kan alındı. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerden çalışmamıza dahil edildiklerine dair izinleri alındı. Akut İnme hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin çalışmaya dahil edilip edilmeme kriterleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Bu çalışma için, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonun 01.08.2014 tarihli toplantısında 14-KAEK-179 kayıt numarası ile onay alınmıştır. Çalışmanın tamamı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda yapıldı. DNA'lar kit yöntemiyle saflaştırılarak PZR' ları yapıldı. PZR ürünleri restriksiyon enzimi SpeI ile kesilerek 1181G>C polimorfizmi değerlendirildi. Çalışmalarımız Gaziosmanpaşa etik kurulu yönergeleri doğrultusunda yapıldı.

Tablo 3.1:Hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin araştırmaya dahil edilip, dahil edilmeme kriterleri

Dahil Edilme Kriterleri	Araştırmanın Hasta Grubu İçin Dahil Etme Ölçütleri; 1.Akut İnme tanısı konulmuş olması 2.Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamış olması 3. 18 yaşından büyük olması
	Araştırmanın Kontrol Grubu İçin Dahil Etme Ölçütleri; 1. Akut İnme tanısı almamış olması 2. Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamış olması 3. 45 yaşından büyük olması
Dahil Edilmeme Kriterleri	Araştırmanın Hasta Grubu İçin Dahil Etmeme Ölçütleri; 1. Akut İnme tanısı almamış olması 2. Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamamış olması 3. 18 yaşından küçük olması
	Araştırmanın Kontrol Grubu İçin Dahil Etmeme Ölçütleri; 1. Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamamış olması 2.45 yaşından küçük olması 3.Akut İnme tanısı almış olması

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.1. Aletler ve Cihazlar

1. PZR Cihazı (Termal Cycler) (Techne, TC 4000, TC 412)
2. Elektroforez Tankı (Clever Scientific, MSCHOİCE)
3. Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo Scientific, EC 300 x L)
4. Jel Görüntüleme Sistemi (QUANTUM-ST4, 1000/20M- 09200806)
5. Bilgisayar (Exper, İntelcore2)
6. Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica,F20520162)
7. Mikrodalga Fırın (Arçelik İntellowave, MD 554)
8. Hassas Terazı (Kern, ABJ 220-4M)
9. Mikrosantrifüj (Mikro120, Hettich Zentrifugen D- 78 532n)
10. Vorteks (Velp Scientifica; F20220176)
11. Mikropipet Seti (Gilson)
12. Etüv (Memmert, Beschickung-Loading 100- 800)
13. Otoklav (HMC Hirayama, HV-25L)
14. Buzdolabı (Vestel,BZP-L3302W)
15. pH metre (İHANNA, 507702)
16. Su banyosu (MEMMERT)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

1. Taq DNA polimeraz (Termo)
2. Spe I (Restriksiyon Enzimi) (Fermantas)
3. Primerler

4. Agaroz (Biomax)
5. Nusieve Agaroz (Biomax)
6. pUC 19 mix marker (Femantas)
7. Loading dye (Vivantis)
8. 100 mM dNTP set (Fermentas)
9. Trisma Base (Amresco)
10. Borik Asit (Amresco)
11. EDTA (Amresco)
12. Ethidium Bromide (Serva)
13. NaOH (Sodyum Hidroksit) (Riedel-de Haen)
14. DNA İzolasyon Kiti (invitrogen)

3.1.3. Çözeltiler

EDTA Solüsyonu (0,5 M) Hazırlanışı

18,16 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 80 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve 2,0 g NaOH karışıma çözülmenin oluşabilmesi için eklendi (pH: 8,0 olacak). Daha sonra pH ayarlaması HCl ile yapıldı ve 100ml'ye tamamlandı (distile su ile). Hazırlanan EDTA solüsyonu, otoklavlanıp oda sıcaklığında saklandı.

5XTBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu

54 g Trisma Base, 27,5 g Borik Asit ve 20 ml EDTA (0,5 M) 500 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcıyla homojenizasyon sağlanınca kadar karıştırıldı. 1 litre distile su ile tamamlanarak çözüldü ve çözelti oda ısısında saklandı.

Etidyum Bromid Solüsyonu (10mg/ml)

10ml distile su içerisinde 0,1 g Etidyum Bromid ilave edildi ve bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Kullanılacak tüpler alüminyum folyo ile kaplanarak solüsyonların ilave edilmesiyle +4 °C'de saklandı.

Elektroforez Yürütme Tamponu

5XTBE tamponundan distile su ile seyreltilerek 1XTBE hazırlandı.

%3'lük Agaroz Jel (100ml)

3 g agaroz ve 100 ml 1XTBE erlenmayer içerisinde eklendi ve mikrodalga fırında 1,5 dakika homojen olana kadar ısıtıldı. Sıcaklığın yaklaşık 65°C düşmesi beklenildikten sonra 3µl Etidyum bromid (10mg/ml) eklenip hızlı bir şekilde iyice karıştırıldı ve yükleme yapılacak tarafları hazırlanmış olan kasete döküldü.

3.2. YÖNTEM**3.2.1. DNA İzolasyonu**

Çalışma grubumuzun kan örnekleri, EDTA içeren vakumlu tüplere 5'er ml olarak alındı. Kandan DNA izolasyonu yönteminde İnvitrogen marka DNA izalasyon kitinden yararlanıldı.

1.Kanlar vortekslendi.

2. Ependorf tüpünün içine (1,5ml) 200 µl kan, 20 µl protein kinaz, 20 µl RNAazA eklendi.

3.1-2 sn vortekslendi.

4.Üzerine 400 µl lizis solüsyonu ilave edildi ve 1-2 sn vortekslendi.

5.10 dk 55°C' de su banyosunda bekletildi.

6.Üzerine 200 µl etanol eklendi ve 1-2 sn vortekslendi.

- 7.Vokteksleme işlemleri tamamlanan tüplerdeki karışımlar filitreli ependorflara alındı.
- 8.11000 rpm' de 1dk santifüjleme yapıldı.
- 9.Ependorf kısmı atıldı ve filitreli kısım alınarak, başka bir ependorf tüpüne yerleştirildi.
- 10.Üzerine 500 µl Wash buffer 1 eklendi ve 11000 rpm'de 1 dk santifüj edildi.
- 11.Ependorf atıldı ve filitre kısmı başka bir ependorfa alındı.
- 12.Üzerine 500 µl Wash Buffer 2 solüsyonu ilave edilerek 13000 rpm'de 3 dk santifüj edildi.
- 13.Ependorf atıldı ve filitre kısmı başka bir ependorf tüpüne alındı.
14. Üzerine 200 µl elution buffer eklendi.
- 15.Son işlem olarak 1300 rpm' de 1 dk santifüj edildi.
16. DNA artık dipe çökmüştür ve tüplerin üzerine etiketleme yapılarak stok DNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

3.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON (PZR) TEKNİĞİ

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), nükleik asitlerin in vitro olarak, uygun koşullar altında istenilen sayıda tekrarlanabilen döngüler ile çoğaltılmasına esasına dayanan bir yöntemdir. PZR döngüsündeki üç aşama sırasıyla, DNA çift zincirinin ısıyla birbirinden ayrılması (94°C Denatürasyon), oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (Hibridasyon 55-60°C) ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzamasından (Polimerizasyon 72°C) oluşmaktadır (Saiki ve ark, 1998). Kalıp DNA, dH₂O, tampon, MgCl₂, dNTP'ler (serbest nükleotidler), primerler ve Taq polimeraz PZR karışımı için gerekli olan malzemelerdir. Kalıp DNA olarak; PZR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler kullanılabilir (Ergin, 2004).

3.4.RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP) ANALİZİ:

Bir kromozomun aynı bölgesi, aynı türün farklı bireylerinde veya kromozomlarında polimorf olarak tanımlanan iki farklı DNA dizilişine sahiptir ve genetik polimorfizmi gösterdiği söylenebilir. Genetik polimorfizme mutasyonlar neden olur. Diploid bireyler içerisinde örneğin, belirli tek kopya genin iki alleli sadece bir nükleotit yönünden bile farklılık gösterebilir ve dolayısıyla gen polimorfik olarak tanımlanabilir. Mutasyon olaylarının genetik polimorfizme neden olması tek nükleotit polimorfizmleri (SNP'ler) meydana getirir. SNP'ler, restriksiyon enzimlerince teşhis edilebilen kısa diziler içinde oluşur (Restriksiyon endonükleazlar, DNA'yı tanımlanmış ve üretilebilir fragmentlere kesen bakteriyel enzimlerdir). Böylelikle, bir restriksiyon enzimi tarafından DNA molekülünün kesilmesi ile elde edilen fragmentin uzunluğu her bir allel için farklı, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) olarak bilinir. Genetik bir hastalığa neden olan aleli belirleyen özel bir RFLP, klinik teşhiste markır olarak kullanılabilir. Restriksiyon fragmentleri veya PZR ürünleri gibi aynı uzunluktaki DNA parçalarında bulunan SNP'lerin belirlenmesinde jel elektroforezini kullanmak mümkündür (Turner ve ark, 2004).

3.5.ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ

Sulu bir çözelti içinde çözülmüş küçük elektrik yüklü taneciklerin, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile ayrılma sürecine elektroforez denir. Agaroz, deniz yosunundan üretilen bir polisakkarittir ve %0,5-2 arasındaki yoğunluklarda sulu çözeltilerle çözüldüğünde katı bir jel oluşturur. Elektroforez için kullanılan agaroz,

bakteriyel kültür plakları yapmada kullanılan agarın saflaştırılmış formudur (Kaya, 2002).

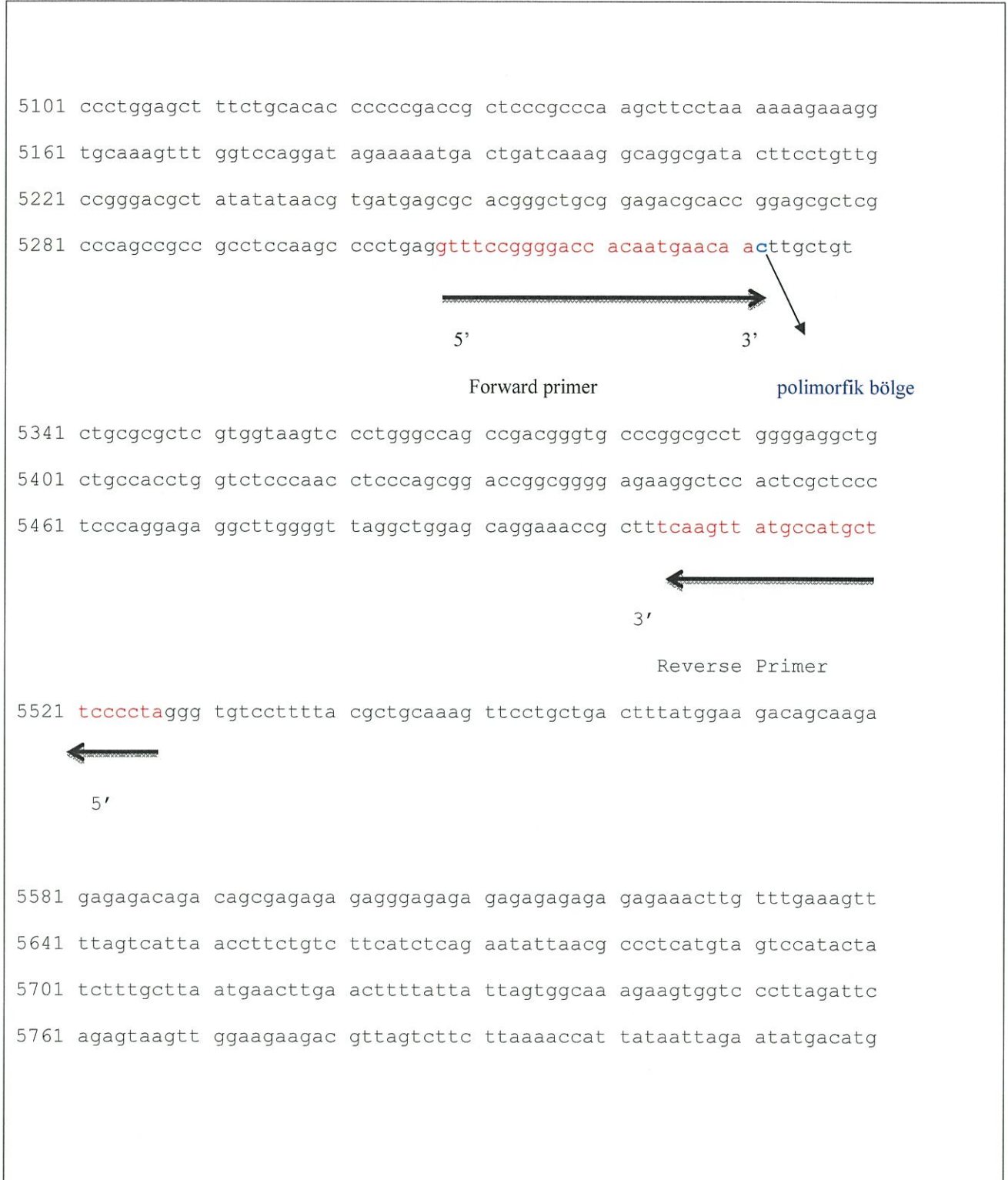
3.5.1. *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi

TNFRSF11B geninin 1181G>C (rs2073618) polimorfizmini belirlemek için yapılan PZR'lerde, hedef gen bölgelerine özgün olarak kullanılan primerler, PZR karışımları ve çoğalma sıcakları sırasıyla Tablo 3.5.1.1, Tablo 3.5.1.3. ve Tablo 3.5.1.4.'te gösterilmektedir.

Tablo 3.5.1.1. *TNFRSF11B* geninin 1181G>C polimorfizminin analizinde kullanılan primerler

Bölge	Primerler
1181G>C	F: 5'- GTT TCC GGG GAC CAC AAT GAA CTA -3' R: 5'- TAG GGG AAG CAT GGC ATA ACT TGA -3'

TNFRSF11B genine ait baz dizisi içerisinde bulunan; 1181G>C değişimini içeren polimorfik bölge ve primer bağlanma bölgeleri Şekil 3.5.1.2.'te verilmiştir.



Şekil 3.5.1.1: TNFRSF11B geni 1181G>C değişiminde polimorfik bölgelerin gösterilmesi

(www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_012202.1?from=5001&to=33588&report=genbank)

Tablo 3.5.1.2. *TNFRSF11B* geninde 1181G>C polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı.

	PZR Bileşeni Stok	25 µl Karışımdaki Miktar	Final konsantrasyon
1	Steril bidistile Su	17,7µl	-
2	PZR buffer(10×)	2,5 µl	1×
3	MgCl ₂ (25mM)	2 µl	2 Mm
4	dNTP Mix (25mM)	0,2 µl	200 µM
5	Primer forward (100 pmol/ µl)	0,2 µl	20 pmol
6	Primer reverse (100pmol/ µl)	0,2 µl	20 pmol
7	Taq Polimeraz (5 u/µl)	0,2 µl	1 u
8	Genomik DNA	2 µl	-
	Toplam	25 µl	

Tablo 3.5.1.3. *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR programı

Program Türü	Derece	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94 °C	4dk.	-
Denatürasyon	94 °C	45sn.	30
Bağlanma	62 °C	40sn.	
Uzama	72 °C	45sn.	
Final uzama	72 °C	5dk	

TNFRSF11B geni 1181G>C polimorfizmini restriksiyon enzim analizi yöntemi ile belirlemek amacıyla Tablo 3.5.1.3.'te verilen 1181G>C bölgesinin çoğaltımında kullanılan, örnek başına olan PZR karışımına göre; her bir PZR tüpünde bulunan 23'er µl'lik karışımın içerisine 2 µl DNA ilave edilerek toplam hacim 25 µl yapıldı. Tablo 3.6.1.4.'teki *TNFRSF11B* geni 1181G>C bölgesinin polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR programına göre çoğaltılması sağlanarak 220 bç'lik PZR ürünü elde edildi.

3.5.2. *TNFRSF11B* geninde RFLP analizi:

Bu çalışmada, *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi için PZR programı ile çoğaltılmış polimorfik noktasını içeren PZR ürünleri restriksiyon enzim kesimi Tablo 3.5.2.1'de gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo.3.5.2.1: *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan enzim kesimi koşulları

	RFPL Bileşeni (Stok)	15 µl Karışımdaki Miktar
1	Fast Digest Green Buffer (10×)	1,5 µl
2	<i>SpeI</i> enzimi (10u/µl) 5'-.....A↓CTAGT.....-3' 3'-.....TGATC↑A.....-5'	0,3 µl
3	dH2O	3,2 µl
4	PZR ürünü	10 µl
	Toplam	15 µl

TNFRSF11B geni 1181G>C polimorfizmini belirlemek için Tablo 3.5.2.1' de belirtilen oranda restriksiyon enzim karışımı hazırlandı ve Spe I restriksiyon enzimi ile 37 °C'de 2 saat kesime bırakıldı. Kesim sonuçları Tablo 3.5.2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5.2.2: *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi için yapılan RFLP sonucunda oluşan bantların boyutları

	Bant Boyutları
Homozigot (CC)	196bç, 24bç
Homozigot(GG)	220bç
Heterozigot (GC)	220bç, 196bç, 24bç

3.6. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İstatistiksel analizleri belirlemek için IBM SPSS İstatistik Paket Program Versiyon 20.0 ve Openepi 3.01 (www.openepi.com) yazılım programları kullanıldı. Sonuçlar ortalama (\pm) ve standart sapma şeklinde verildi. 1181G>C polimorfizmi ile klinik ve demografik özellikler arası ilişki ki-kare, Fisher exact veya varyans analizi (ANOVA testleri) kullanılarak yapıldı. Risk faktörlerinin bulunması için Olasılıklar Oranı (OR) ve %95 Güven Aralığı (CI) kullanıldı. Bütün p değerleri iki uçluydu ve p değeri 0.05'ten düşük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tespit edilen genotip sıklıkları için Hardy-Weinberg dengesinden sapma olup olmadığı Ki-kare (χ^2) testi ile belirlendi.

4.BULGULAR

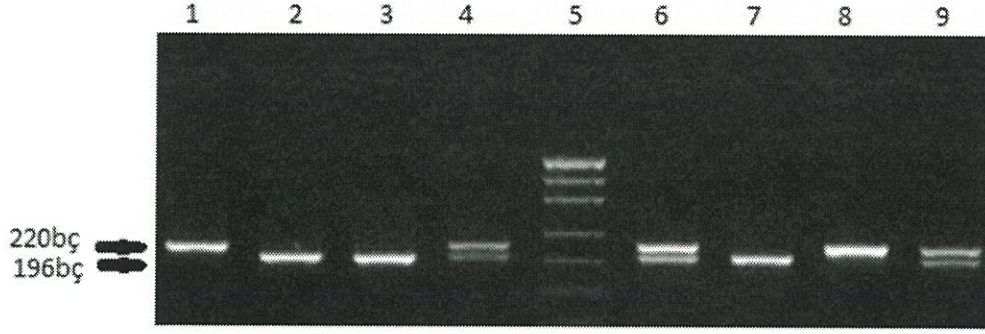
Bu çalışmada *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi ile akut inme arasındaki ilişkiyi belirlemek için yaş ortalaması 67.10 ± 12.833 (en düşük 23, en yüksek 96) olan 107 akut inmeli hasta ile yaş ortalaması 64.03 ± 9.414 (en düşük 45, en yüksek 82) olan 100 akut inme geçirmemiş kontrol DNA'ları analiz edildi. Tokat ve çevresinden Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalına gelen Akut İnme hastalarının ailesel olan ve olmayan her iki grubu da çalışmaya dahil edildi. Hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyetleri birbiri ile uyumlu idi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Çalışmaya dahil edilen Akut İnme hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin cinsiyet ve yaş ortalamalarına ait istatistik bulgular

	Akut İnme Hasta Grubu (n=107)	Kontrol Grubu (n=100)	p değeri
Cinsiyet			0,056
Kadın	39 (%36,4)	49 (%49,0)	
Erkek	68 (%63,6)	51 (% 51,0)	
Yaş Ortalaması	$67,10 \pm 12,833$	$64,08 \pm 9,414$	0,092

Akut İnme teşhisi konmuş hasta ve kontrol grubu DNA'larına uygulanan PZR şartları ve programı tamamen bizim tarafımızdan optimize edilerek başarılı PZR ürünleri elde edildi PZR sonucunda 220 bç'lik bölge çoğaltılıp elde edilen ürünler görüntülendi.

PZR ürünlerinin SpeI restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda homozigot dominant GG, heterozigot GC ve homozigot resesif CC olmak üzere üç farklı genotip belirlendi. Belirlenen genotiplerin görüntüleri kayıt edildi (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1: *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfik bölgesinin SpeI restriksiyon endonükleazı ile belirlenen RFPL sonuçları. Örneklerden 1, 8 homozigot dominant (G/G); 2, 3, 7 homozigot resesif (C/C); 4, 6, 9, heterozigot (G/C); 5 pUC19 DNA/MspI (HpaII) marker

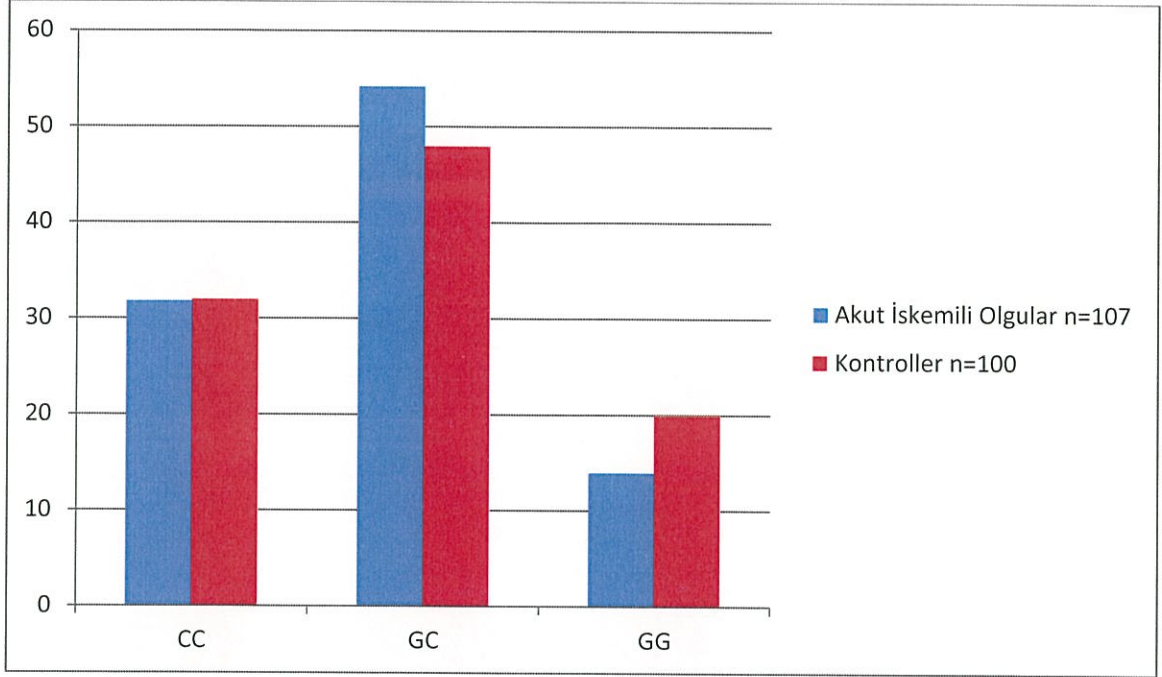
Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz genotip sonuçları şu şekildeydi: Toplam 107 akut inmeli hastanın 34'ü (%31,8) homozigot resesif CC, 58'i (%54,2) heterozigot GC ve 15'i (%14,0) homozigot dominant GG; toplamda 100 kontrolden de 32'si (%32,0) homozigot resesif CC, 48'i (%48,0) heterozigot GC ve 20'si (%20,0) homozigot dominant GG. Allel frekanslarına baktığımızda hastalarda toplam 214 allelden 126'sı (%58,9) C alleli, 88'i (%41,1) G alleli ve kontrollerde toplam 200 allelden 112'si (%56,0) C, 88'i (%44,0) G aleli şeklindeydi. Hastaların ve kontrollerin genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamadı (sırasıyla $p=0,476$, $p=0,622$). Hasta ve kontrol genotipleri GG+GC'ye

karşı CC ve GG'ye karşı GC+CC şeklinde karşılaştırdığımızda da istatistiksel olarak herhangi bir fark çıkmadı (sırasıyla $p=0,909$, $p=0,622$) (Tablo 4.2).

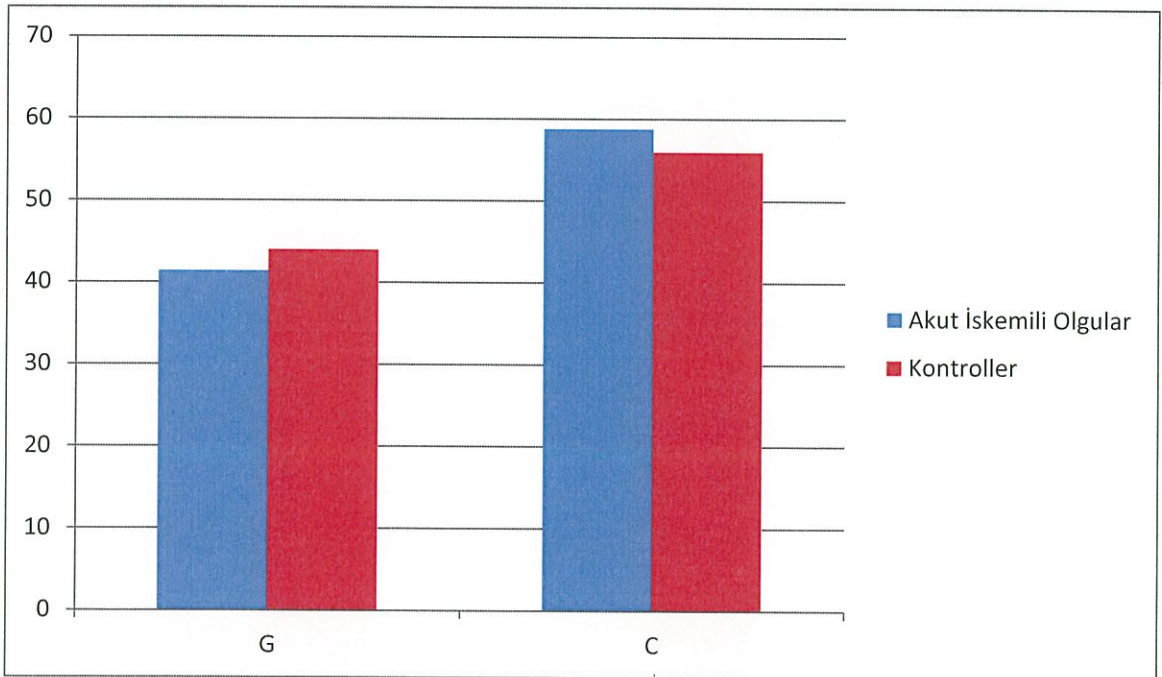
Hasta ve kontrol grubundaki CC, GC, GG genotip sıklıkları ve G ve C allel sıklıkları arasındaki farklar bir histogram ile gösterilerek daha anlaşılır hale getirildi (Şekil 4.2) (Şekil 4.3).

Tablo 4.2. Akut İnme hasta grubu ve kontrol grubunun *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi için genotip ve allel dağılımı.

	Akut İnme Hasta Grubu, n=107 (%)	Kontrol Grubu n=100 (%)	p	OR (%95CI)
Genotip				
GG	15 (14,0)	20 (20,0)	0,476	
GC	58 (54,2)	48 (48,0)		
CC	34 (31,8)	32 (32,0)		
GG+GC : CC	15 (14,0) : 92 (86,0)	68 (68,0) : 32 (32,0)	0,909	0,99 (0,55-1,78)
GG : GC+CC	15 (14,0) : 92 (86,0)	20 (20,0) : 80 (80,0)	0,336	1,53 (0,73-3,24)
Allel				
G	88 (41)	88 (44)	0,622	1,12 (0,76-1,66)
C	126 (58)	112 (56)		



Şekil 4.2: Akut İnmeli hastalar ve Kontrollerde Genotip Frekanslarının Karşılaştırılması



Şekil 4.3: Akut İnmeli Hastalar ve Kontrollerde Allel Frekanslarının Karşılaştırılması

Çalışmaya dahil edilen Akut İnme hastalarının demografik ve klinik özelliklerin *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmine göre değerlendirilmesi tablo 4.5’de verilmiştir. Yapılan kıkare ve varyans analizleri sonucunda hastalara ait yaş, sistolik tansiyon, diastolik tansiyon, nabız, ateş, solunum sayısı, cinsiyet, hipertansiyon ve diabet varlığı, kronik böbrek ve kalp yetmezliği, bilinç durumu, EKG sonucu, son durum ve nörolojik bulgu varlığı verileri ile *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanmadı (Tablo 4.5). Yalnızca istatistiksel olarak anlamlı olmasa da nörolojik bulgusu bulunan akut inme hastalarının CC genotip sıklığı bulunmayanların yarısı kadardı (%55,0’a karşılık %26,8). Hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılım Hardy-Weinberg dengesi ile uyum içerindeydi.

Tablo 4.5: Çalışmaya dahil edilen Akut İnme hastalarının demografik ve klinik özelliklerin *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmine göre değerlendirilmesi

Karakter	Toplam	<i>TNFRSF11B</i> 1181G>C			
		GG	GC	CC	P
Yaş (yıl)	67,10±12,83 3	65,53±13,917	68,02±13,640	66,24±11,048	0,718
Sistolik Tansiyon (mmHg)	144,11±26,7 97	143,33±20,151	141,73±26,325	148,39±29,899	0,551
Diastolik Tansiyon (mmHg)	85,55±13,06 5	89,17±9,962	84,17±12,958	86,45±14,271	0,444
Nabız	87,83±23,77 8	85,82±16,666	89,32±25,114	86,43±24,699	0,849
Ateş (°C)	36,40±0,373	36,32±0,311	36,42±0,367	36,42±0,414	0,736
Solunum sayısı	20,65±4,125	21,36±3,075	20,45±4,968	20,55±3,419	0,819
Cinsiyet					0,826
Kadın	39 (36,4)	6 (40,0)	22 (37,6)	11 (32,4)	
Erkek	68 (63,6)	9 (60,0)	36 (62,1)	23 (67,6)	
Hipertansiyon, n (%)					0,274
Var	66 (75,9)	8 (72,7)	38 (82,6)	20 (66,7)	
Yok	21 (24,1)	3 (27,3)	8 (17,4)	10 (33,3)	
Diabet, n (%)					0,541
Var	32 (37,6)	4 (36,4)	20 (42,6)	8 (29,6)	
Yok	53 (62,4)	7 (63,6)	27 (57,4)	19 (70,4)	
Kronik Böbrek Yetmezliği n(%)					0,796
Var	3 (3,8)	0	2 (4,4)	1 (4,2)	
Yok	76 (96,2)	10 (100)	43 (95,6)	23 (95,8)	
Kronik Kalp Yetmezliği n(%)					0,612
Var	15 (18,8)	1 (10,0)	10 (22,2)	4 (16,0)	
Yok	65 (81,3)	9 (90,0)	35 (77,8)	21 (84,0)	
Bilinç durumu, n (%)					0,374
Açık	72 (75,0)	11 (84,6)	35 (70,0)	26 (78,8)	
Uykuya meyilli	17 (17,7)	0	11 (22,0)	6 (18,2)	
Stupor	3 (3,1)	1 (7,7)	1 (2,0)	1 (3,0)	
Koma	4 (4,2)	1 (7,7)	3 (6,0)	0	
EKG sonucu, n (%)					0,625
NSR	51 (51,5)	8 (61,5)	27 (50,0)	16 (50,0)	
AF	35 (35,4)	4 (30,8)	21 (38,9)	10 (31,3)	
ST anormalliği	5 (5,1)	1 (7,7)	1 (1,9)	3 (9,4)	
Diğer	8 (8,1)	0	5 (9,3)	3 (9,4)	
Son Durum, n (%)					0,289
Nörolojiye yatış	86 (81,1)	14 (93,3)	42 (73,7)	30 (88,2)	
Taburcu	12 (11,3)	1 (6,7)	9 (15,8)	2 (5,9)	
Başka servise yatış	8 (7,5)	0	6 (10,5)	2 (5,9)	
Nörolojik Bulgu, n (%)					0,054
Var	82 (80,4)	12 (14,6)	48 (58,5)	22 (26,8)	
Yok	20 (19,6)	2 (10,0)	7 (35,0)	11 (55,0)	

Veriler kıkare ve varyans analizleriyle değerlendirildi. Yaş, sistolik tansiyon, diastolik tansiyon, nabız, ateş ve saolunum sayısı için ortalama ± standart sapma değerleri verildi.

5.TARTIŞMA

Bu çalışma, *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi ile akut inme hastaları arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapıldı.

TNFRSF11B, tümör nekroz faktörü ailesinden olup, reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B ve kappa B ligand'ın keşfi ve rollerinin belirlenmesi kemik biyolojisinin yapısının öğrenilmesine katkı sağlamıştır. Farelerle yapılan çalışmalarda, OPG eksikliği olan farelerde osteoporoz görüldüğü gibi aort ve renal arterlerde vasküler kalsifikasyon da saptanmıştır. *TNFRSF11B* geni ile ilgili yapılan son çalışmalarda genin hedefi olan vasküler hücreler ve kaynağı olan osteoklastlar birlikte düşünüldüğünde, vasküler sistem ve iskelet sistemi arasında parakrin bağlantı olduğu ve artmış serum OPG seviyelerinin ilerleyen ateroskleroz ve kardiovasküler hastalıklar için bağımsız risk faktörü olduğunu düşündürmüştür. Soufi ve ark.'ları (2004), OPG geninin promotör bölgesinde ekzon 1' de 1181G>C polimorfizminin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğunu bulmuştur.

İnme genel olarak yaşlı popülasyonuna ait bir hastalık olarak bilinir ve inme için önemli risk faktörlerinden biride yaştır. İnme insidansının 55 yaşından sonra 2 kat arttığı ve yaşın inme için değiştirilemeyen risk faktörleri arasında yer aldığı bilinmektedir. Erkeklerin kadınlara göre bu hastalığa daha çok yakalandığı da bilinmektedir. Lind, ise yaşın fonksiyonel iyileşme üzerinde etkisinin olmadığını savunmakta ve hastanın fonksiyonel tedaviye başlamadan önceki durumunun iyileşmede rol oynadığını söylemektedir (Lind, 1982). Bizim yaptığımız çalışmada inmeli 107 hastadan, 68 (%63,6)'i erkek hasta ve 39 (%36,4)'ü kadın hastadır. İnmeli hasta grubunun ortalama yaşı 67'dir. İnmeye 55 yaş üzerindeki erkeklerin bayanlara oranla daha çok yakalandığı

bilinmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada da 55 yaş üzeri erkek hastaların sayısının bayan hastalara oranla daha fazla olmasına karşın bu faktörler ile inme arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

İtalyan popülasyonunda 364 inme geçirmiş diabetik hasta ile inme geçirmemiş 492 diabetli hasta grubu arasında bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada *TNFRSF11B* geni 245T>G, 950T>C ve 1181G>C polimorfizmlerinin inme hastalığı ile ilişkisi incelenmiştir. *TNFRSF11B* geni 118G>C polimorfizminin bu çalışmadaki verilerine baktığımızda: Ortalama yaşları 72 olan, inme geçirmiş diabetli hastaların genotip sıklığı 96 (%26,4) tanesinde CC, 188 (%51,6) tanesinde GC, 80 (%22,0) tanesinde GG; ortalama yaşları 71 olan inme geçirmemiş diabetli hastalarda ise genotip sıklığı 57 (%11,6) tanesinde CC, 196 (%39,8) tanesinde GC, 239 (%48,6) tanesinde GG şeklinde gözlemlenmiştir. Sonuç olarak *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi ile iskemik inmenin alakalı olduğu bulunmuştur ($p<0.0001$). Ayrıca bu polimorfizmin serebrovasküler hastalıklar için de belirteç olabileceği öne sürülmüştür (Mrozikiewicz ve ark, 2011). Bizim çalışmamızda ise ortalama yaşları 67 olan akut inmeli hastalar ile ortalama yaşları 64 olan kontrol grubu çalışıldı. Çalıştığımız toplam 107 akut inmeli hasta ile 100 akut inme geçirmemiş kontrol DNA'larının RFLP analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi ile akut inme arasında istatistiksel olarak bir ilişki bulunamadı. Akut inmeli diabet hastalarından 8 kişide (%29,6) CC, 20 kişide (%42,6) GC ve 4 kişide (%36,4) GG genotipine; akut inme geçirmiş diabet hastası olmayanlardan 19 kişide (%70,4) CC, 27 kişide (%57,4) GC ve 7 kişide (%63,6) GG genotip sonuçları elde edilmiştir. İtalyan popülasyonunda yapılan çalışmada ve bizim yapmış olduğumuz çalışmada hasta ve kontrol gruplarında GC genotip sıklığı GG ve CC genotip sıklığına oranla daha fazla gözlenmiştir. Fakat

İtalyan popülasyonundaki çalışmada inme ile *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuşken bizim yaptığımız çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

İtalyada yapılan başka bir araştırmada karotis arteroskleroz hastalığı olan 177 hasta ile 303 kontrol grubunda *TNFRSF11B* geni 245T>G, 950T>C ve 1181G>C polimorfizmlerine bakılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre hasta grubunda CC genotipi 36 kişide (%20,3), GC genotipi 75 kişide (%42,4), GG genotipi 66 kişide (37,3) gözlemlenirken, kontrol grubunda ise CC genotipi 33 kişide (%10,9), GC genotipi 122 kişide (%40,3), GG genotipi 148 kişide (%48,8) gözlemlenmiştir. Karotis arteroskleroz ve kontrol grubu arasındaki demografik ve klinik değerler incelenmiş. Bayanlara oranla erkeklerin bu hastalığa daha çok yakalandıkları, hipertansiyon, diyabet, koroner arter hastalığı, iskemik inme ve tıkaçıcı periferik arter hastalıkları ile *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak bağımsız bir risk faktörü olan *TNFRSF11B* geni ve genotip varyantlarının karotis arteroskleroz patogenezinde katkıda bulunabileceği vurgulanmıştır (Straface, 2011). Karotis arterosklerozun inmeye neden olduğu bilinmektedir ve hastanın yaşı, hipertansiyon, diyabet, kroner arter hastalığı inme için risk faktörleri arasında yer almaktadır. Bizim çalışmamızda *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi ile akut inme arasında ilişki bulunmamıştır. Bu durum *TNFRSF11B* geninin vasküler rolünün çok yönlü olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Bizim çalışmamız, *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi ile akut inme arasındaki ilişkiye yönelik yapılan bir çalışmadır. Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgulara göre *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi ile akut inme arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmaya Gaziosmanpaşa Üniversitesi Acil Tıp Anabilim Dalına başvuran akut inme geçirmiş hasta grubu ile akut inme geçirmemiş kontrol grubu hastaları dahil edildi. Yaş ortalaması $67,10 \pm 12,83$ olan akut inmeli hastalar ile yaş ortalaması $64,08 \pm 9,41$ olan kontrol grubu *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi açısından karşılaştırıldı. Akut inme ile *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanmadı.

Serebrovasküler hastalıklar arasında en fazla ölüme neden hastalıklardan biri olan inmenin etiyojisi ne kadar iyi bilinirse hastalığa yakalanma oranının düşeceği gibi yeni tedavi yöntemleri de artacaktır.

Akut inmeye sebep olabilecek risk faktörlerinin önceden belirlenmesi ve gereken tedbirlerin alınması bu hastalığa yakalanmayı geçiktirecektir.

Sonuç olarak farklı populasyonlarda yapılan çalışmalar, *TNFRSF11B* geni 1181G>C polimorfizminin inme gibi serebrovasküler hastalıkların belirlenmesinde belirteç görevi gördüğünü göstermektedir. Türk populasyonunda da bu tür çalışmaların artırılmasının akut inme ile *TNFRSF11B* gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi daha net ortaya koyacağı kanaatindeyiz.

7.KAYNAKLAR

- Abbott RD, Rodriguez BL, Burchfield CM, 1994. Physical activity in older middle aged Men and reduced risk of stroke: The Honolulu Heart Program. *Am J Epidemiol.* 139:881 – 893.
- Adams RD, Victor M, Ropper AH.1997.Principles of Neurology . 6th ed. USA: McGraw Hill Co; ch. 34:777-873.
- Adams Jr HP, Bendixen BH, Kapelle J, Biller J, Love BB, Gordon DL,Marsh EE,1993. The TOAST investigators. Classification of subtypes of acute ischemic stroke. Definition for use in multicenter clinical trial. *Stroke* ; 24: 35 – 41:526
- Allan H. Ropper RHB.2005. Adams and Victor's Principles of Neurology. 8th edition: McGraw-Hill Medical Publishing division; 660.
- Ayala C, Croft JB, Greenlund KJ, ve ark. 2002. Sex differences in US mortality rates for stroke and stroke subtypes by race/ethnicity and age,1995-1998. *Stroke*, 33(5), 1197- 201
- Balkan S., 2005. Serebrovasküler Hastalıklar. Güneş Kitab evi,2baskı,İstanbul:39-53
- Bamford J, Sandercock P. Dennis M. Burn J. Warlow C. 1991.Classification and natural history of clinical subtypes of cerebral infarction. *Lancet*; 337: 1521
- Bell DSH.1994. Stroke in the diabetic patient. *Diabetes Care*;17:213-219
- Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D.1998. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation*;98(10):946-52.
- Blair JM, Zheng Y, Dunstan CR. 2007.RANK ligand. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 1077-

81.

- Biler J, Love BB,2000: Vascular Disease of the Nervous System . In; BradleyWG, Daroff R Fenichel GM Marsden CD (eds). Neurology in ClinicalPractice. 3 th ed. Vol 2. USA: Butterworth-Heinemann, : ch 57,
- Biscetti F, Straface G, Giovannini S, ve ark.2013. Association between *TNFRSF11B* gene polymorphisms and history of ischemic stroke in Italian diabetic patients. 132(1):49-55.
- Bougusslavsky J.,Van Mele G. , Regli F.1998. The Lausanne stroke registry. Analysis of 1000 consecutive patients with first stroke. Stroke ; 19: 1083 –1092.
- Brendan FB and Lianping X.2007. Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. Arthritis Research & Therapy ; 9: 1- 7.
- Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA.2006. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. Cancer ;107:289-98
- Crisafulli A, Micari A, Altavilla D, Saporito F, Sardella A, Passaniti M et al.2005. Serum levels of osteoprotegerin and RANKL in patients with ST elevation acute myocardial infarction ;109:389-95
- Çelik Y, Balcı K, Utku U, Varol G.2002. İntraserebral hematom genişlemesini etkileyen olası faktörler. Türk Beyin Damar Hastalıkları Dergisi, 8:2;95-99
- Davis BR, Vogt T, Frost PH, Burlando A, Cohen J, Wilson A, Brass LM, Frishman W, Price T, Stamler J.1998. Risk factors for stroke and type of stroke in persons with isolated systolic hypertension. Stroke:1333-1340
- Drugarin D, Drugarin M, Negru S, Cioaca R.2003. RANKL-RANK/OPG molecular complex-control factors in bone remodeling ; 53:297-302

- Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y 2004. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 119:3424-3429.
- Emre M.,2007.The netter collection of medical illustration cilt1 sinir sistemi kısım 2nörölojik ve nöromüsküler hastalıklar. Gübeş Tıp Kitapevi.194-200
- Ergin, M., 2004. Moleküler Patoloji.Aegean Patology Jurnal, Temizkan, G. ve Arda N., İstanbul Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGE). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler Kitabı. Genişletilmiş 2. Baskı. Nobel Kitap Evi. İstanbul. 1:103-107.
- Esen B, Daşdemir B, Birsu Çiçin Z, Özdemircan A, Çakmakoğlu B.2011. Diyabet Hastalığına *Osteoprotegerin (OPG) Proteini 950T>C* Gen Polimorfizminin İncelenmesi. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü dergisi*;1:40-41.
- Fagin J.A.1994. Molecular pathogenesis of human thyroid neoplasms.*Thyroid Today*; 17: 1-7.
- Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA et al.2000. The Osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* ;103:41–50.
- Flex A., 2011.Assessment of the Genetic Effects of Polymorphisms in the Osteoprotegerin Levels and Carotid Plaque Vulnerability;*42:3022-3028*
- Fouque-Aubert A, Chapurlat R.2008. Influence of RANKL inhibition on immune system in the treatment of bone diseases. *Joint Bone Spine*; 75: 5- 10.
- Gilroy J.2000.Cerebrovascular Disease. In *Basic Neurology* . 3rd ed. USA: Mc Graw Hill Co; ch: 225-277.

- Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, et al. 2006. Primary Prevention of Ischemic Stroke: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: Cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke* ; 37:1583-1633
- Giusti M, Cecoli F, Fazzuoli L, De Franchis V, Ceresola E, Ferone D, Musap M, Minuto F. 2007. Serum osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand levels in patients with a history of differentiated thyroid carcinoma: a case-controlled cohort study. *Metabolism Clinical and Experimental*; 56: 699- 707
- Hofbauer LC, Kluger S, Kuhne CA, Dunstan CR, Burchert A, Schoppet M, Zielke A, Heufelder AE 2002. Detection and characterization of RANK ligand and Osteoprotegerin. In the thyroid. *J Cell Biochem* ; 86:642- 50.
- Hofbauer LC. 1999. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 141: 195–210
- Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG et al. 2000. Mutation in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet* ;24:45–8
- Idredavik B, Bakke F, Solberg R, Rokseth R, Haehim LL, Holme I. 1991. Benefit of a stroke unit: Randomized Controlled Trial. *Stroke*;22:1026-1031.
- Kaya, A., 2002. Elektroforez Yöntemleri. *Dicle Tıp Dergisi (Journal of Medical*

School), C:29, S:3

Khosla S. 2001. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 142: 5050-5.

Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y et al. 2006. Receptor activator of NF kappa B ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol* ;26:1002–13. *Journal of Biochemistry* 2007; 32(4): 178- 84.

Kong YY 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397:315–323.

Kostenuik PJ, Shalhoub V. 2001. Osteoprotegerin: A Physiological and Pharmacological Inhibitor of Bone Resorption. *Curr Pharm Des.* 7: 613-35

Kırış T. 2004. Sinir Sistemi Hastalıkları. İ.Ü. İstanbul Tıp Fak. Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları ;19:183.

Kuller LH. 1989. incidence rates of stroke in the 80s. The end of the decline in stroke ;20:84-843

Kumral K, Kumral E: Santral Sinir Sisteminin Damarsal Hastalıkları. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları No:72, Yücesahil 4-446

Kurban S, Mehmetoğlu Đ. 2007.: Osteoprotegerin, RANK ve RANK ligandı Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry Turk J Biochem) ; 32 (4) ; 178–184

Kutluk, K. 2004: İskemik inme. Nobel tıp kitapevi. İstanbul: 37-45

Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelly MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy F, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. 1998. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that

regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 93: 165–176

Luckish A, Cernes R, Boaz M, Gavish D, Matas Z, Fux A et al. 2008. Effect of long-term treatment with risedronate on arterial compliance in osteoporotic patients with cardiovascular risk factors. *Bone* ;43:279–83.

Manson JE, Stampfer MJ, Willet WC, et al, 1995. Physical activity and incidence of coronary heart disease and stroke in women. *Circulation*;91(suppl)5abstract

Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, Ozasa A, Nakao K. 2002. A Novel Interaction between thyroid hormones and 1,25 (OH)₂ in osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun*; 291: 987-94

Nencini P, et al. 1988. Incidence of Stroke in young adults in Florence, Italy *Stroke* ; 19:977-981.

Petiti DB, Sidney S, Bernstein A, 1996. Stroke in users of low-dose oral contraceptives. *N Eng J Med* ; 334: 8 – 15

Plehn JF, Davis BR, Sacks FM, et al. 1999. Reduction of stroke incidence after myocardial infarction with pravastatin the cholesterol and recurrent events study. *Circulation* ; 99: 216 – 223

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487-91

Sarkar PK, Lambert LA. 2001. Etiology and treatment of hyper homocysteinemia causing ischemic stroke. *Int J. Clin. Pract*; 55(4):262 – 8.

Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. 2002. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22: 549

- Sloan MA, Kittner SJ, et al.1998. Illicit drug associated ischemic stroke in Baltimore – Washington Young Stroke Study. *Neurology*;50:1688 – 1693
- Seremek-Mrozikiewicz A., Barlik M., Drews K., Boagaz A., Tatusko J., Piotrowska A., Spaczynski M., Grzeskowiak E., M. Mrozikiewicz p., 2011.The genetic variants of RANKL\RANK\OPG signal trial in postmenopausal women with osteopenia and osteoporosis.*Archives of Perinatal Medicine* 17(2), 72-8
- Shao JS, ChengSL, Sadhu J, Towler DA 2010. Inflammation and the osteogenic Regulation of vascularcalcification: a review and perspective. *Hypertension* 55:579- 592.
- Silverman MR.2009. Ischemic Stroke : An Atlas of Investigation and Treatment: Atlas Medical Publishing Ltd.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS,Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, ShimamotoG, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL,Trail G,Sullivan J, Davey E,Bucay N, Renshaw- Gregg L, Hughes TM,Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ. (1997): Osteoprotegerin:a novel secreted protein involved in the regulation of bonedensity. *Cell* 89: 309–319.
- Straface G.,biscetti F., Pitoco D., Bertoletti G., Misuraca M., Vincenzoni C., Snider F., Arena V., Stigliano E., Angelini F., Luliano L., Boccia S., Waure C., Giacchi F.,Ghirlanda G., Flex a.,2011.Assessment of the genetic effects of polymorphism in the osteoprotegerin gene,TNFRSF11B,on serum osteoprotegerin levels and carotid plaque vulnerability.*Stroke*:24;3022-3028
- Suda T 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the newmembers of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.*20:345–357.

- Robert D. Abbott, Ph.D., Yin Yin, M.A., Dwayne M. Reed, M.D., Ph.D., and Katsuhiko Yano, M.D. *N Engl J Med* 1986; Risk of Stroke in Male Cigarette Smokers 315:717-720, 1986 DOI: 10.1056/NEJM198609183151201
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, ve ark. 2011. Heart Disease and Stroke Statistics Update : A Report From the American Heart Association. *Circulation*; 121:e46-e215.
- Tanaka S, Nakamura K, Takahashi N, Suda T. 2005. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutic targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunological Reviews*; 208: 30- 49.
- The top 10 causes of death World Health Organization. www.who.int/mediacentre [2008].
- Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. 1997: Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 234: 137–42.
- Turner, PC, MacLennan, A.G., Bates A.D. ve White, M.R.H., 2004. *Moleküler Biyoloji Önemli Notlar*. Editör : Konuk, M. Nobel Yayın Dağıtım, 64-65. Ankara.
- Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, et al. 2002. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: the Framingham Heart Study. ; 287: 1003–1010
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to *trance/rankl*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 3597–602

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM 2006. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease Trends in Molecular Medicine 12: 17-25

Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH et al. 2002. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. N Engl J Med; 347:175–84

Whyte MP 2006. pagets disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. Ann NY Acad Sci 1068:143-164

World Health Organization Stroke 1989, Recommendation on stroke prevention, diagnosis and therapy. Stroke; 20: 1407 – 1431

www.who.int/mediacentre, 2008

www.ninds.nih.gov/disorders/stroke/stroke.htm

<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/TNFRSF11BID42610ch8q24.html>

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NG_012202.1?from=5001&to=33588&report=genbank

8.ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Pınar ÇOĞAŞ

Doğum Yeri: Milas

Doğum Tarihi: 19.07.1989

Medeni Durum: Bekar

Yabancı Dil:İngilizce

E-Mail:pınar.bdrm@gmail.com

Eğitim Durumu:

Lise: 2002-2006 Milas YDA Lisesi

Ön Lisans :2010-2012 Eskişehir Anadolu Üniversitesi Laborant ve Veteriner Sağlık

Lisans:2008-2012 Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü

Yüksek Lisans: 2013-2015 Gaziosmanpaşa Üniversite Sağlık Bilimleri Ens.Tıbbi Biyoloji A.B. D.

Yüksek Lisans Tez Konusu: Akut İnme Tanısı Almış Hastalarda *TNFRSF11B* Gen Polimorfizmi Değerlendirilmesi