



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KORONER ARTER HASTALARINDA
MMP-2 VE MMP-9 DÜZEYLERİ İLE
TİYOL/DİSÜLFİD DENGESİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

Esmâ Nur ŞEKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN

TRABZON-2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KORONER ARTER HASTALARINDA
MMP-2 VE MMP-9 DÜZEYLERİ İLE
TİYOL/DİSÜLFİD DENGESİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

Esmâ Nur ŞEKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN

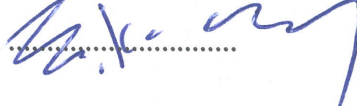
TRABZON-2018

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

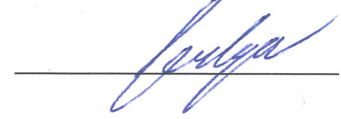
Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



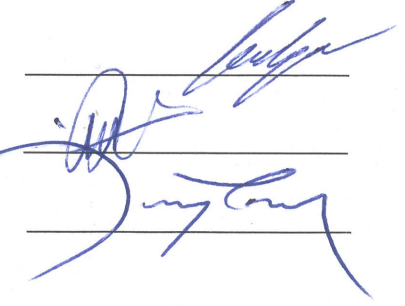
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Esmâ Nur ŞEKER'in hazırladığı "Koroner Arter Hastalarında MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ile Tiyo/Disülfid Dengesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Dr. Öğr. Üyesi Fulya B. YÜCESAN



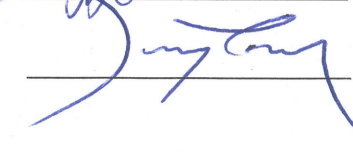
Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Fulya B. YÜCESAN



Prof. Dr. Birgül KURAL

Doç. Dr. İbrahim TURAN



Tarih: 05/11/2018

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ersan KALAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 05/11/2018

Esma Nur ŞEKER

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, bu günlere gelmemi en çok isteyen rahmetli babama ve benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili abim Engin TAŞKIN'a ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tez çalışmam süresince her aşamada göstermiş olduğu hoşgörü, inanç ve desteğinden dolayı değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN'a,

Yüksek lisans eğitimimde büyük emekleri olan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Birgül V. KURAL, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye,

Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Cihan ÖREM'e ve Arş. Gör. Dr. Lütfullah CANDAN'a,

Çalışmam sırasında yardımlarını benden esirgemeyen, destek ve katkıları ile her zaman yanımda olan Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN ve Öğr. Gör. Nihal TÜRKMEN'e,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm araştırma görevlisi, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Tüm aşamalarda varlıklarını hissettiğim her daim yanımda olan sevgili aileme en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Esma Nur ŞEKER

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenmiştir. Proje numarası: TYL-2018-7322.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Koroner Arter Hastalığı	5
4.2. Ateroskleroz, Risk Faktörleri ve Oksidatif Stres	5
4.3. Tiyol/Disülfid Dengesi ve Koroner Arter Hastalığı	7
4.4. Matriks Metalloproteinazlar	8
4.4.1. Koroner Arter Hastalığı ile MMP-2 ve MMP-9 Arasındaki İlişki	11
4.4.2. MMP'ler ve Tiyol/Disülfid Dengesi	12
5. GEREÇ ve YÖNTEM	13
5.1. Gereç	13
5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	13
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	13
5.2. Yöntem	14
5.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	14
5.2.2. Glukoz ve Lipid Parametrelerinin Ölçümü	14
5.2.3. Tiyol ve Disülfid Düzeylerinin Belirlenmesi	14
5.2.4. MMP-2 Düzeylerinin Belirlenmesi	17
5.2.5. MMP-9 Düzeylerinin Belirlenmesi	18
5.2.6. Kullanılan İstatistik Yöntemleri	19
6. BULGULAR	20
6.1. Çalışma Grubunun Temel Özellikleri	20

6.2.	Çalışma Grubunun Tiyol, Disülfid, MMP-9 ve MMP-2 Değerleri	20
7.	TARTIŞMA ve SONUÇ	23
8.	KAYNAKLAR	26
9.	ETİK KURUL ONAYI	33
10.	ONAM FORMU	35
11.	ÖZGEÇMİŞ	37



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler	13
Tablo 2.	Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar	13
Tablo 3.	Toplam tiyol ölçümü için uygulanan metod	16
Tablo 4.	Doğal tiyol ölçümü için uygulanan metod	17
Tablo 5.	Kontrol ve hasta gruplarının temel özellikleri	20
Tablo 6.	Kontrol ve hasta gruplarına ait tiyol, disülfid, MMP-9 ve MMP-2 değerleri	21
Tablo 7.	Kontrol ve hasta gruplarına ait korelasyon bulguları	22

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	MMP'lerin yapısı ve sınıflandırılması	9
Şekil 2.	MMP proenzim aktivasyonu ve proteolitik aktivite inhibisyonu	10
Şekil 3.	Toplam tiyol standart grafiği	16
Şekil 4.	Doğal tiyol standart grafiği	17
Şekil 5.	MMP-2 standart grafiği	18
Şekil 6.	MMP-9 standart grafiği	18
Şekil 7.	Kontrol ve hasta gruplarında toplam tiyol, doğal tiyol ve disülfid seviyelerinin dağılımı	21
Şekil 8.	Kontrol ve hasta gruplarında MMP-9 seviyelerinin dağılımı	22

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

Apo A-I	Apolipoprotein A-I
BMI	Vücut kütle indeksi
DKB	Diastolik kan basıncı
D-TH	Doğal tiyol
DTNB	5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Epitel büyüme faktörü
EC	Epitel hücre
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GSH-px	Glutasyon peroksidaz
GSH	Redükte glutasyon
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HDL-K	Yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol
H₂O₂	Hidrojen peroksit
γ-GluCys	Gama glutamin sistein
IL-1	İnterlökin-1
ICAM-1	Hücreler arası adezyon molekülü-1
KAH	Koroner arter hastalığı
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LDL-K	Düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol
MMP	Matriks metalloproteinaz
MPO	Miyeloperoksidaz
MT-MMP	Membran tip matriks metalloproteinaz
NaBH₄	Sodyum borhidrür
NaCl	Sodyum klorür
NO	Nitrik oksit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
ox-LDL	Okside düşük yoğunluklu lipoprotein
O⁻²	Süperoksit

OH	Hidroksil radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
pro-MMP	Zimojen formda konumlanmış matriks metalloproteinaz
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PGE2	Prostoglandin E2
RCT	Ters yönde kolesterol taşınması
ROS	Reaktif oksijen türleri
SKB	Sistolik kan basıncı
SMC	Düz kas hücreleri
SNP	Tek nükleotit polimorfizim
SOD	Süperoksit dizmutaz
TIMP	Doku matriks metalloproteinaz inhibitörü
T-SH	Toplam tiyol
TG	Trigliserid
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü- beta
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-alfa
TK	Total kolesterol
TRIS-HCl	(Hidroksimetil) aminometan hidroklorid
uPA	Ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VSMC	Vasküler düz kas hücreleri

1. ÖZET

Koroner Arter Hastalarında MMP-2 ve MMP-9 Düzeyleri ile Tiyol/Disülfid Dengesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Tiyol/disülfid dengesi organizmanın oksidan-antioksidan durumunu değerlendirmek için kullanılmaktadır. Koroner arter hastalığı (KAH), diyabet, kanser gibi çeşitli hastalıklarda tiyol/disülfid dengesinin bozulduğu tespit edilmiştir. Matriks metalloproteinazlardan MMP-2'nin ve MMP-9'un koroner arter hastalarında proteolitik biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir. Oksidatif stres MMP'lerin aktivitesini etkileyen faktörlerdendir. Planladığımız çalışmada MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ile tiyol/disülfid dengesi arasındaki ilişki KAH'da incelendi. Çalışma grubu 50 akut koroner sendrom hastası ve anjiyografisi normal 30 kontrol olmak üzere toplam 80 kişiden oluştu. Tiyol ve disülfid düzeyleri kolorimetrik yöntemle, MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Hasta grubuna ait toplam tiyol ve doğal tiyol düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlenirken ($p=0.001$, $p=0.003$), MMP-9 düzeylerinin ise arttığı tespit edildi ($p=0.041$). Hasta ve kontrol grubunun doğal tiyol/disülfid oranı, disülfid ve MMP-2 düzeyleri arasında fark bulunmadı ($p=0.211$, $p=0.707$, $p=0.437$). Kontrol ve hasta grubunda, toplam tiyol ile doğal tiyol, toplam tiyol ile disülfid düzeyleri arasında pozitif ilişki bulundu ($p=0.001$, $p=0.001$). Disülfid düzeyleri kontrol grubunda HDL-K ile negatif korelasyon gösterdi ($p=0.031$). Ayrıca hasta grubunda MMP-2 düzeyleri ile doğal tiyol düzeyleri arasında anlamlı negatif ilişki gözlenirken ($p=0.020$) MMP-9 düzeyleri ile ilişki bulunamadı. Sonuç olarak, toplam tiyol ve doğal tiyol düzeylerinin azalması ve MMP-9 düzeylerinin artmasına rağmen, koroner arter hastalarında MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ile tiyol/disülfid dengesi arasında ilişki bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Ateroskleroz, Kardiyovasküler Hastalıklar, Matriks Metalloproteinazlar, Oksidatif Stres, Sülfidril Bileşikleri

2. SUMMARY

Investigation of The Relationship Between Thiol/Disulfide Homeostasis and Levels of MMP-2 and MMP-9 in Coronary Artery Disease

The thiol/disulfide homeostasis is used to assess the oxidant-antioxidant status of the organism. It has been found that thiol/disulfide homeostasis has been impaired in various diseases like coronary artery disease (CAD), diabetes mellitus and cancer. It is suggested that MMP-2 and MMP-9 from matrix metalloproteinases can be used as proteolytic biomarkers in coronary artery disease. Oxidative stress is a factor affecting the activity of MMPs. The relationship between MMP-2 and MMP-9 levels and thiol/disulfide homeostasis in coronary artery disease was investigated in the planned study. The study group consisted of a total of 80 subjects, 50 acute coronary syndrome patients and 30 control which has normal angiography. While thiol and disulfide levels determined by colorimetric method, MMP-2 and MMP-9 levels determined by ELISA. While the total thiol and native thiol levels of the patient group decreased ($p=0.001$, $p=0.003$), MMP-9 levels increased ($p=0.041$) according to the control group. There was no difference between native thiol/disulphide ratio, disulphide and MMP-2 levels of both patient and control group ($p=0.211$, $p=0.707$, $p=0.437$). Positive correlation was found between total thiol and natural thiol, and between total thiol and disulfide levels in control and patient group ($p=0.001$, $p=0.001$). Disulfide levels were negatively correlated with HDL-C in the control group ($p=0.031$). Moreover, significant negative correlation was observed between MMP-2 levels and native thiol levels in the patient group ($p=0.020$) but there was no correlation with MMP-9 levels. In conclusion, although total thiol and native thiol levels decreased and MMP-9 levels increased, relationship could not found between MMP-2 and MMP-9 levels and thiol/disulfide balance in coronary artery disease.

Key Words: Atherosclerosis, Cardiovascular Diseases, Matrix Metalloproteinases, Oxidative Stress, Sulfhydryl Compounds

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kardiyovasküler hastalıklar tüm dünyada en önemli sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Ülkemizde de durum farklı olmayıp, kardiyovasküler hastalıklar ölüm sebeplerinin başında yer almaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu 2016 yılı istatistiklerine göre ölüm sebeplerinin %39.8'ini oluşturan dolaşım sistemi hastalıkları ilk sırada bulunmaktadır (1). Kardiyovasküler hastalıkların altında yatan başlıca sebep aterosklerozdur. Ateroskleroz orta ve büyük arterlerin intima tabakasında gelişen, “aterom” denilen fibröz-yağlı plak oluşumu ile karakterize, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Genetik yatkınlık, hipertansiyon, dislipidemi, diyabet, obezite, sigara, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar ve oksidatif stres ateroskleroza neden olan başlıca risk faktörleridir (2, 3). Oksidatif stres aterosklerozun başlangıcında ve gelişiminde önemli bir role sahiptir (3).

Süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), lipid peroksit, peroksinitrit ($ONOO^-$) ve ozon (O_3) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) aracılığı ile düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidatif modifikasyonu sonucu meydana gelen okside LDL (oxLDL) aterosklerozun başlangıç ve ilerleme safhasında anahtar rol oynamaktadır (2). Organizmayı ROS'un zararlı etkilerine karşı korumak için, çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan mekanizmalar devreye girer. Tiyoller bu antioksidan mekanizmalarda rolü olan moleküllerdendir (4). Hücrelerde oksidatif stresin önlenmesinde kritik rol oynayan tiyoller, bir kükürt atomu ve bir hidrojen atomuna sahip sülfidril grubu (-SH) içeren organik bileşiklerdir. Plazma tiyol havuzu çoğunlukla albumin, sistein (Cys), sisteinil glisin, glutatyon, homosistein ve γ -glutamil sistein (γ -GluCys) gibi düşük molekül ağırlıklı tiyollerden oluşmaktadır (5, 6). Tiyoller, oksidanlar varlığında oksidasyon reaksiyonuna girerek disülfid bağı oluşturabilir. Oksidatif stres durumunda, Cys kalıntılarının oksidasyonu, proteinin tiyol grupları ve düşük molekül ağırlıklı tiyoller arasında disülfidlerin geri dönüşümlü oluşumuna neden olabilir. Oluşan disülfid bağları tekrar tiyol gruplarına indirgenebilir, böylece dinamik tiyol/disülfid dengesi korunmuş olur (6). Dinamik tiyol/disülfid dengesi antioksidan korumada, detoksifikasyonda, sinyal iletiminde, apoptozda, enzimatik aktivitenin düzenlenmesinde, transkripsiyon faktörlerinde ve hücresel sinyal mekanizmalarında kritik rollere sahiptir. Diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, romatoid artrit,

kronik böbrek hastalığı gibi çeşitli hastalıklarda tiyol/disülfid dengesinin bozulduğu tespit edilmiştir (7-9).

Aterosklerozun başlangıç ve gelişim sürecinde ekstraselüler matriksin (ECM) sentez ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması anahtar rol oynamaktadır. Bu dengenin bozulmasında proteolitik enzimler olan matriks metalloproteinazlar (MMP) yer alır. MMP'ler ECM ile bazal membran komponentlerini parçalayan ve aktif bölgesinde çinko bulunan, kalsiyuma bağımlı enzimlerdir (10). Oksidatif stres MMP'lerin aktivitesini etkileyen faktörlerdendir. Oksidanların varlığı MMP'leri doğrudan veya dolaylı olarak aktive eder. MMP'ler özellikle akut miyokard enfarktüsüne yol açan plak bozukluğu süreci ile ilişkili aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkların (KVH) patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadırlar (11). Özellikle MMP-2 ve MMP-9 koroner arter hastalarında (KAH) proteolitik biyobelirteç olarak düşünülmektedir. MMP-2, kalp kası hücrelerinde spesifik hücre içi proteinleri hidroliz eden ve böylece kasılma fonksiyonunu azaltabilen önemli bir proteazdır (12, 13). KAH ve hipertansiyonda MMP-9 seviyelerinin dolaşımda arttığı ve kardiyovasküler olaylarla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (11). ROS, tiyol gruplarıyla reaksiyona girerek MMP-2 ve MMP-9 da dahil olmak üzere birçok farklı MMP'yi aktive eder. MMP-2 ve MMP-9 köpük hücrelerinin radikal ajanlar üretmesi sonucu ECM'de aktifleşirler. Böylece oksidatif stres MMP zimojenlerinin uyarılmasını artırarak bölgesel metalloproteinaz etkinliğinin artmasına ve arteriyel duvarın yeniden şekillenmesine katkıda bulunur (14). Bununla birlikte, glutatyon, N-asetilsistein (NAC) ve lipoik asit (LA) gibi antioksidanlar ROS ile indüklenen MMP aktivasyonuna karşı koruma sağlar (15). Planlanan bu çalışmanın amacı koroner arter hastalarında MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ile tiyol/disülfid dengesi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Koroner Arter Hastalığı

Koroner arter hastalığı (KAH), immün hücrelerin subendotelyal alana göçünün aterosklerotik plakların oluşumuna ve/veya ilerlemesine ve arter duvarlarının kalınlaşmasına sebep olan inflamasyon ile karakterize bir hastalıktır. KAH gelişmiş ülkelerde önde gelen mortalite nedenlerinden biridir. Ülkemizde de bu durum aynı olup, ölüm nedenleri arasında KAH ilk sırayı almaktadır (1, 16). Kardiyovasküler hastalıkların altında yatan başlıca sebep aterosklerozdur (2).

4.2. Ateroskleroz, Risk Faktörleri ve Oksidatif Stres

Ateroskleroz orta ve büyük arterlerin intima tabakasında gelişen, “aterom” denilen fibröz-yaglı plak oluşumu ile karakterize, kronik inflamatuvar bir hastalıktır (16).

Gelişmiş canlılarda, arter üç histolojik tabakadan oluşmaktadır. Bunlar, tunika intima, tunika media ve tunika adventisyadır. Tunika intima, lümene en yakın katmandır ve vasküler duvarın en ince tabakası olup, membrana bağlı tek sıra endotel hücrelerden oluşur. Kollajen ve elastinden oluşan ince bir subendotelyal ECM içermektedir. Endotel sadece kanı çevresindeki dokudan ayırmak için fiziksel bir bariyer görevi yapmakla kalmaz aynı zamanda koagülasyon, inflamasyon ve damar tonusunun düzenlenmesine de katılır. İntima tabakasının kalınlaşması aterosklerozun en erken evrelerinden biridir. Tunika medya ise; damar yapısının orta katmanıdır. Yapısal glikoproteinler, hiyalüronik asit ve dekorin gibi proteoglikanlar ve kollajence zengin bir ECM'ye gömülü vasküler düz kas hücre (VSMC) katmanlarından oluşur. Bu kas tabakası, kan akışının ayarlanmasından ve vasküler tonusun korunmasından sorumludur. Tunika medyanın kalınlığı arter çapı ile koreledir. Tunika adventisya, kollajen ve fibroblastlarca zengin damarın dış tabakasıdır (17, 18).

Ateroskleroz gelişiminde meydana gelen patolojik olaylar; endotel disfonksiyonu ve aktivasyonu, monosit/makrofaj adezyonu, aktivasyon ve göçü, oksidatif stres, lipid birikimi, ECM sentezi, SCM göçü ve proliferasyonu, plağın yeniden damarlanmasıdır. (19, 20).

Ateroskleroz oluşumuna neden olan risk faktörlerini; genetik yatkınlık, hipertansiyon, obezite, diyabet, sigara kullanımı, hiperlipidemi, oksidatif stres, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyesinin azalması ve lipid oksidasyonuna bağlı köpük hücre oluşumu olarak sayabiliriz. (21, 22-24).

Oksidatif stres, serbest oksijen radikallerinin aşırı miktarda üretilmesi ve antioksidan savunma sistemlerinin oksidan radikalleri ile karşılaştırıldığında, yetersiz olması sonucunda ortaya çıkar. Oksidatif stres, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere diğer birçok kronik hastalığın gelişiminde rol oynamaktadır. Organizmada gerçekleşen metabolik reaksiyonlar sonucu nitrik oksit (NO), O_2^- , $ONOO^-$ veya hidroksil (OH) radikali gibi ROS'lar üretilmektedir. Hücrelerdeki ROS'un başlıca kaynağı mitokondrideki elektron kaçaklarıdır. Normal şartlarda bunlar enzimatik veya enzimatik olmayan sistemler tarafından temizlenmektedirler. Fakat ROS üretimi arttığında metabolizmadaki oksidan-antioksidan denge oksidanlar tarafına kayar. Bu durum aterosklerozun da yer aldığı çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynar (25, 26).

Mitokondride üretilen ROS'lar, aterosklerotik sürecin hızlanmasında etkili olan $ONOO^-$ 'i oluşturur. Oluşan $ONOO^-$ mitokondrial DNA (mtDNA) kusurlarını, enflamasyonu ve hücre yaşlanmasını artırarak mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olur. Buna göre mtDNA hasarının kardiyovasküler hastalıkların başlamasında ve gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (27, 28). ROS'lar DNA oksidasyonu dışında lipidlerin ve proteinlerin oksidasyonuna da yol açmaktadır. Lipid oksidasyonu sonucu HDL ve LDL'nin yapısı bozulur. HDL, apolipoprotein A-1 (apoA-1) aracılığıyla periferik dokulardan karaciğere kolesterol taşınımını gerçekleştirerek plazma kolesterol dengesini düzenler. Oksidasyona bağlı gelişen HDL'nin alt tabakasındaki değişiklikler sonucu apoA-1'in etkinliğini kaybetmesiyle HDL-C plazma düzeyi azalır (13, 29, 30).

Düşük yoğunluklu lipoproteininin intima içinde O_2^- ile oksitlenmesi sonucu oxLDL meydana gelir. oxLDL'nin varlığı pro-inflamatuvar genlerin ekspresyonunu başlatarak intima içine monosit alımına yol açar. oxLDL'ye yanıt olarak intima içerisinde çoğalan monositler makrofajlara farklılaşır. Kemokinler tarafından üretilen kimyasal sinyaller vasıtasıyla monosit/makrofajlar inflamasyon alanlarına yönelirler. Makrofajlar bu

alandaki bulunan oxLDL'yi alarak köpük hücrelerine dönüştürler ve aterosklerozun ilk lezyonu olan yağsı çizgiyi oluştururlar. Böylece sitokinler, fibrojenik araçlar ve büyüme faktörlerinin ekspresyonu başlatılmış olur. Salgılanan bu moleküller VSMC'lerin proliferasyonuna ve göçüne neden olur. VSMC'nin göçü ve çoğalması ile ekstrasellüler matriksin yapılanması sonucu aterosklerozun ileri lezyonu olan “aterom plak” yapısı oluşur. Oluşan bu lezyon hidrolitik enzimler tarafından parçalanır. Bunu takiben vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonu başlatılarak tromboz gelişir. Gelişen bu tromboz damar tıkanıklılığına neden olur (31-32).

4.3. Tiyol/Disülfid Dengesi ve Koroner Arter Hastalığı

ROS'lar oksidatif hasardan sorumlu birincil moleküllerdir. Oksidatif hasara karşı korunmada; ekzojen kaynaklı E vitamini, C vitamini ve fenolik bileşikler gibi antioksidanlar ile endojen kaynaklı süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve diğer tiyol grubu içeren antioksidanlar etkilidir (4, 33). ROS'ların birincil hedefi sitozolde tiyol grubu içeren proteinlerdir. ROS'ların ilgili proteinlerle etkileşimini engellemek için ortamda tiyolleri içeren antioksidanlar, ROS'larla disülfid bağı oluştururlar (34).

Merkaptanlar olarak da adlandırılan tiyoller, sülfidril grubu (-SH) içeren bileşiklerdir. Tiyoller metabolizmada serbest formda veya proteinlere bağlı şekilde bulunarak plazma tiyol havuzunu oluştururlar. Plazma tiyol havuzu; albümin, sistein, homosistein, sisteinilglisin, redükte glutatyon (GSH) ve γ -GluCys'den oluşmaktadır. Tiyoller, organizmada yer alan toplam antioksidanların büyük kısmını oluşturarak ROS'a karşı savunmada önemli bir rol oynamaktadırlar. Antioksidan tiyol gruplarından olan GSH, peroksit ve diğer oksidanlarla reaksiyona girerek geri dönüşümlü yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşür. Daha sonra oluşan GSSG tekrar GSH'a indirgenerek tiyol/disülfid dengesi korunmuş olur. Bu dengenin önemi, antioksidan korumada, detoksifikasyonda, sinyal iletiminde, apoptozda, enzimatik aktivitenin düzenlenmesinde, transkripsiyonel olaylarda ve hücrel sinyal mekanizmalarında önemli rollere sahiptir. Tiyol/disülfid dengesi kardiyovasküler hastalıkları da içine alan diğer pek çok hastalığın gelişiminde etkilidir (8, 33, 35).

Antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu, lipid peroksidasyonunu ve KAH etkeni olan ateroskleroz gelişimini inhibe eder. Oksidatif stres altında, oksidanlarla tiyol

gruplarının etkilişime girmesi sonucu tiyol grubu yükseltgenir. Metabolizmadaki ROS düzeyine bağlı olarak yükseltgenmiş tiyol grupları tekrar indirgenebilir. Böylece tiyol/disülfid dengesi korunmuş olur. Plazma disülfid düzeyinin artmasıyla bozulan tiyol/disülfid dengesi, intima tabakasında ateroskleroz lezyon oluşumunu tetikleyerek KAH'a neden olur (9, 36).

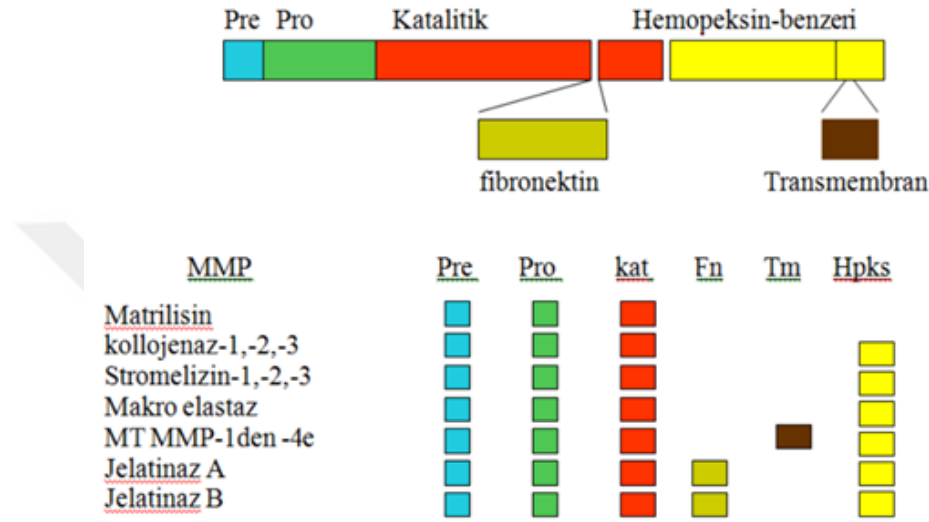
4.4. Matriks Metalloproteinazlar

Matriksinler olarak da adlandırılan MMP'ler; ECM ile bazal membran komponentlerini yıkıma uğratan, aktif bölgesinde Zn^{++} ve Ca^{++} taşıyan endopeptidaz ailesindendir. MMP'ler, ilk kez 1949 yılında parçalayıcı enzimler olarak tanımlanmıştır. Takip eden yıllarda, aktifleşmiş MMP'lerin tümör ve tümör benzeri yapıların gelişiminde stroma ve damar oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmüştür. 1960'lı yılların sonlarına doğru omurgalı canlılardan MMP'ler izole edilirken, aynı yıllarda çeşitli memelilerden MMP'ler kısmen saflaştırılmıştır. Seksenli yılların sonlarına doğru ilgili enzimlerin yapısal benzerlikleri incelenmiştir. Günümüzde de MMP'lerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri üzerine çalışmalar devam etmektedir (10, 13, 14, 37).

Matriks metalloproteinazlar ECM yapısını düzenleyerek matriksteki moleküler sinyallerin kontrolünde, hücre çoğalmasında, hücre farklılaşmasında ve hücre ölümünde temel rol oynamaktadır. MMP'ler morfogenez, anjiyogenez, doku onarımı ve ECM'nin yeniden yapılanması gibi birçok fizyolojik fonksiyon için hayati önem taşımaktadır. Bununla birlikte koroner arter hastalığı, kanser, artrit, nefrit ve kronik ülser gibi çeşitli patolojik durumlarda MMP'lerin aşırı veya düzensiz aktivitesi söz konusudur (38, 39).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda 24 farklı gen tarafından kodlanan 28 tane MMP enzimi olduğu belirtilmiştir. MMP'lerin yapısı ve sınıflandırılması Şekil 1'de verilmiştir. Yapısal olarak; pre-domain, pro-domain ve katalitik bölge bütün MMP'lerde ortak olup, MMP-7 ve MMP-26 hariç tüm MMP'lerde hemopeksin benzeri bölgeler mevcuttur. MMP'ler N-terminalde propeptid kısım 80 aminoasitten oluşurken katalitik bölgede 180 aminoasitten oluşmaktadır. Pre-domain bölge MMP'lerin hücreden salınımını düzenlemektedir. Pro-domain bölge, sistein aminoasitinde bulunan sülfidril grubuyla ve katalitik bölgedeki çinko ile etkileşerek MMP'lerin inaktif halde konumlanmasını sağlamaktadır. Bu etkileşim de "Sistein switch" anahtar modeli olarak adlandırılmaktadır. Pro-domain ve katalitik bölge arasındaki disülfid bağının

kırılmasıyla inaktif MMP'ler aktif hale geçmektedir. Hemopeksin benzeri bölge ise substrat ve doku matriks metalloproteinaz inhibitörlerinin (TIMP) bağlandığı bölgedir. MMP'ler yapılarına ve substrat özgünlüklerine göre, endotel hücreler, makrofajlar, fibroblastlar, SMC, lenfositler, trombositler, kondrositler, keratinositler, mezenşimal hücreler, nötrofiller, trofoblastlar ve osteoblastlar gibi çok çeşitli hücre tipleri tarafından üretilmektedir (40-45).

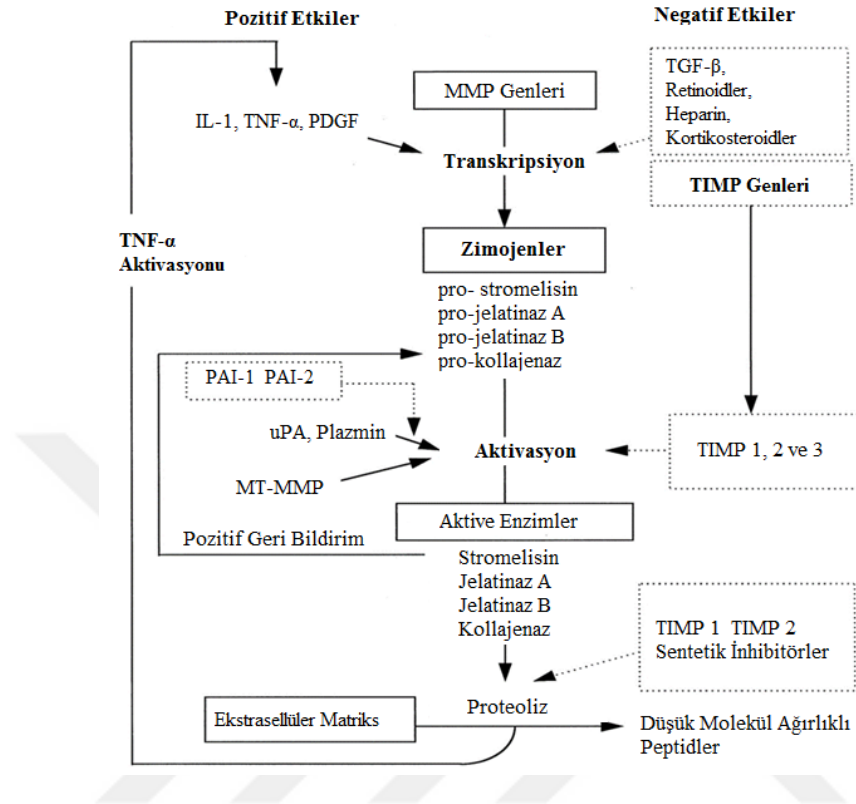


Şekil 1. MMP'lerin yapısı ve sınıflandırılması (Öztürk'den, 40)

Matriks metalloproteinazlar, substrat özgünlüğü, sekans benzerliği ve domain içeriğine göre altı gruba ayrılırlar. Bunlar, Kollajenazlar, Jelatinazlar, Stromelisinler, Matrilizinler, Membran tipi MMP'ler, Makrofaj Elastazı ve diğer MMP'lerdir. Jelatinazlar grubunda yer alan MMP-2 (jelatinaz A) ve MMP-9'un (jelatinaz B) katalitik bölgesinde bulunan fibronectin kısmı ilgili jelatinazların kollajene, elastine ve jelatine yüksek ilgi ile bağlanmalarını sağlayarak proteolitik etkinliklerini artırır. MMP-9 elastin ve tip IV, V, XI kollajenlerini parçalarken, MMP-2 Tip I, II, III kollajeni ve interstisyel kollajenazların başlattığı kollajen yıkımını tamamlar (46-48, 49).

Matriks metalloproteinazlar inaktif halde sentezlendikten sonra zimojen formlarının uyarılması, hücre içinde olabileceği gibi hücre yüzeyinde de olabilir. Hücre yüzeyinde gerçekleşen enzim aktifleşmesi, membran tip matriks metalloproteinazlar (MT-MMP) vasıtasıyla olabileceği gibi zimojen form uyarılması proteazlar veya daha önceden aktifleşmiş MMP'ler yoluyla da olabilir. Zimojen uyarılmasını takiben

MMP'nin propeptit bölgesindeki sistein kompleksinden bir çinko iyonu serbestleşerek disülfid bağın kırılmasıyla MMP aktivasyonu gerçekleşir (49-53).



Şekil 2. MMP proenzim aktivasyonu ve proteolitik aktivite inhibisyonu (Dollery'den, 54)

Matriks metaloproteinaz etkililiğinin düzenlenmesi Şekil 2'de gösterildiği gibi transkripsiyon, pro-enzim etkinleşmesi ve TIMP şeklinde üç basamakta gerçekleşmektedir. MMP gen ekspresyonu, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α), interlökin-6 (IL-6), IL-1, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü ve hormonlar tarafından uyarılmaktadır. Heparin, kortikosteroidler, retinoidler ve prostoglandin E2 (PGE2) MMP'lerin gen transkripsiyonunu baskılamaktadır. Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β), MMP-2 ve MMP-9'un gen ekspresyonunu uyarırken, MMP-1 ve MMP-3'ün gen ekspresyonunu baskılamaktadır. Pro-MMP'lerin monosit/makrofaj, SMC'ler veya ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü (uPA) aracılığıyla aktifleşmektedir. Aktifleşen enzim diğer proenzimlerin de aktifleşmesini sağlar. Ateroskleroz gelişiminde VSMC proliferasyonunun uPA ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Sonuç olarak uPA aracılığıyla aktif hale gelen MMP'lerden özellikle MMP-2 ve MMP-9'un aktifleşmesi,

aterosklerotik plak oluşumu sırasında ECM'nin yeniden modellenmesini de içine alan diğer birçok aterosklerotik aşamada etkili olduğu belirlenmiştir. uPA, inaktif formdaki plazminojenin aktif plazmin forma dönüşümünü katalizler. Plazmin pro formdaki MMP-1'i, MMP-3'ü ve MMP-9'u aktif formlarına dönüştürür. MMP-3'ün, pro-MMP-1'i aktive edilmesinde de görüldüğü üzere, MMP'ler kendi aralarında etkileşerek birbirlerini aktive edebilirler. Aktif formdaki MMP-1, pro-MMP-9'u, MT-MMP'ler de diğer MMP'leri aktive eder. Ayrıca oksidatif stres koşulları altında makrofajların köpük hücrelerine dönüşümü ile artan ROS'lar MMP-2 ve MMP-9'u aktif hale geçirirler. Aktif hale geçen MMP'lerin aktivasyonunu engellemek için doku matriks metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP) devreye girer. TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olarak bilinen dört protein tanımlanmıştır. TIMP'lerin, MMP'in Zn^{++} içeren aktif bölgesine bağlanmasıyla MMP'nin aktivitesinin kaybolması sonucu MMP'lerin substratına bağlanması engellenmiş olur. TIMP-1, MMP-9 ile bir kompleks oluştururken, TIMP-2 tercihen MMP-2 ile bir kompleks oluşturmaktadır (52, 54, 55).

Organizmada üretilen ROS'lar aracılığıyla MMP-2 ve MMP-9'un sistein- Zn^{+2} etkileşimi bozulmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, sadece süperoksit ve NO'nun değil, ONOO⁻'in de MMP aktivasyonuna katıldığı gösterilmiştir. Güçlü bir oksidatif reaktif olarak, protein, lipid ve DNA oksidasyonuna neden olan ONOO⁻'nin MMP-9 aktivasyonunu da tetikleyebileceği düşünülmektedir (56-58).

4.4.1. Koroner Arter Hastalığı ile MMP-2 ve MMP-9 Arasındaki İlişki

Matriks metalloproteinazların kardiyovasküler hastalık ve plak oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. Koroner arter hastalığında monositler, ROS'lar ve enflamatuvar moleküller MMP'leri aktive ederler. Aktif MMP'ler, aterosklerotik plak oluşumu, restenoz ve aort anevrizması gibi birçok patolojik olguya neden olurken, plak oluşumunda SMC'lerin göçünü artırır. Devamında ortamda monosit/makrofaj birikimi artmaya başlar. Makrofajların köpük hücrelere dönüşümüyle fibröz-yaglı plakta lipid çekirdek oluşumu başlar. Yanıt olarak Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) salgılanır ve MMP-9 aktivasyonunu uyarır. MMP-9, makrofajlar tarafından oluşturulan fibröz-yaglı plağı parçalayarak, tromboz oluşumuna ya da MI'a yol açar. MMP-2'nin proteolitik aktivasyonu ise akut MI'ın oluşumunda etkilidir (17, 38, 59).

4.4.2. MMP'ler ve Tiyo/Disülfid Dengesi

ROS'ların antioksidanlar ya da antioksidan enzimler tarafından etkisiz hale getirildiği bilinmektedir. Bu antioksidanlar arasında yer alan tiyoller, ROS'lar ile etkileşime girerek zararlı etkilerini ortadan kaldırırılar. Tiyol grup konsantrasyonu ortamdaki ROS seviyesiyle ters orantılı olarak değışir. Ortamda ROS seviyesinin artmasına bağlı olarak plazma tiyol konsantrasyonu azalır ve tiyo/disülfid dengesi bozulmuş olur. Bu dengenin bozulması ortamda oksitativ stresin daha da artmasına yol açar. Oksitativ stresle artan ROS üretimi MMP'lerin aktivasyonunu artırır (60).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve malzemeleri üretici firmaları ile birlikte Tablo1’de listelenmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler

Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	Üretici Firmalar
Vorteks	Nüve, NM 110
Mikropleyt	Greiner Bio-one
Santrifüj	Eppendorf 5804
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Çeşitli hacimlerde otomatik pipet	Eppendorf
Saf su cihazı	Aquatron 4 AD
Hassas analitik terazi	Metler Toledo AB 204-S
Mikropleyt okuyucu	Molecular DevicesVERSA max
Çalkalayıcı	Nüve SL 350
Mikropleyt yıkayıcısı	Biotek
Deney tüpleri	SH&GLASS
Derin dondurucu -80 °C	Thermo
pH metre	Hanna Instruments, HI 9321

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları hakkında bilgi Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici Firma
Redükte glutasyon (GSH)	SIGMA G4251
5-5’ Ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB)	SIGMA 67H1095
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	SIGMA E6758
Sodyum borhidrür (NaBH ₄)	MERCK S5139573
Sodyum klorür (NaCl)	SIGMA SZBE1470V
Tris-HCl	SIGMA SLBL6398V
Formaldehid	MERCK 818708
Metanol	MERCK 113351
İnsan MMP-2 ELISA Kiti	R&D SYSTEM
İnsan MMP-9 ELISA Kiti	R&D SYSTEM

5.2. Yöntem

Bu proje KTÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Kardiyoloji Anabilim Dalı işbirliği ile gerçekleştirilmiştir. Projemiz KTÜ Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 25.09.2017 tarihli ve 6 numaralı karar ile onaylanmış (Bkz. Etik Kurul Onay Belgesi) ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi BAP06-Lisansüstü Tez Projesi desteği almıştır (Proje numarası: TYL-2018-7322).

5.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Çalışma grubu Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalında klinik endikasyon dahilinde koroner anjiyografi yapılmış 50 akut koroner sendrom hastası ve koroner arterlerinde lezyon bulunmayan anjiyografisi normal 30 kontrol olmak üzere toplam 80 kişiden oluştu. Hasta ve kontrol gruplarından koroner anjiyografi öncesinde ayrıntılı öykü alınarak vücut kütle indeksi (BMI), bel çevresi, nabız, sistolik kan basıncı (SKB) ve diastolik kan basıncı (DKB) ölçümleri yapıldı. Buna ek olarak hipertansiyon, sigara, aile öyküsü, diabetes mellitus ve hiperlipidemi gibi KAH risk faktörleri belirlendi. Malign neoplazmi, sistemik enfeksiyonu, ciddi karaciğer veya böbrek hastalığı olanlar ve 18 yaş altı hastalar ile gebeler çalışma grubuna dahil edilmedi. Çalışma grubunda yer alan bireylerden antikoagülsiz ve antikoagülan olarak EDTA içeren vakumlu tüplere kan örnekleri alındı, 3000 rpm’de 15 dk santrifüj edildikten sonra serum ve plazma kısımları saklama tüplerine alınarak -80 °C’de muhafaza edildi.

5.2.2. Glukoz ve Lipid Parametrelerinin Ölçümü

Glukoz, total kolesterol (TK), trigliserid (TG), LDL-K ve HDL-K ölçümleri KTÜ Farabi Hastanesi Rutin Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu parametrelerin ölçümleri Beckman Coulter AU5800 otoanalizöründe orjinal kitleri kullanılarak yapıldı.

5.2.3. Tiyol ve Disülfid Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum tiyol ve disülfid düzeyleri Erel ve Neşelioğlu (6) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak belirlendi. Yöntemin prensibi Ellman reaktifi ile 415 nm’de spektrofotometrik ölçüme dayanmaktadır. Bu yöntemle göre numunedeki toplam tiyol (T-SH) ve doğal tiyol (D-SH) düzeyleri belirlendi. Numunenin toplam tiyol içeriği

sodyum borhidrür (NaBH_4) ile modifiye edilmiş Ellman reaktifi [5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)] kullanılarak ölçüldü. NaBH_4 serumdaki disülfid bağlarını (-S-S-) tiyol gruplarına (-SH) indirger, reaksiyon karışımındaki kullanılmayan fazla NaBH_4 formaldehit ile uzaklaştırılır. Böylece D-SH ve NaBH_4 ile indirgenmiş disülfid bağlarının toplamından oluşan T-SH belirlenmiş olur. Numunedeki D-SH düzeyi ise klasik Ellman reaktifi ile belirlendi. T-SH miktarından D-SH miktarı çıkarılıp ikiye bölünerek numunedeki disülfid miktarı bulundu.

Kullanılan Çözeltiler:

Reaktif 1A (10 mM NaBH_4 , % 50 v/v): 3.78 mg NaBH_4 , 5 mL metanol ve 5 mL distile su çözeltisinde çözerek toplamda 10 mL'lik çözelti hazırlandı.

Reaktif 1B (10 mM NaCl, % 50 v/v): 58.5 mg NaCl, 50 mL metanol ve 50 mL distile su çözeltisinde çözerek toplamda 100 mL'lik çözelti hazırlandı.

Reaktif 2 (6.715 mM formaldehit, 10 mM EDTA): 0.5 mL formaldehit ve 3.8 g EDTA 1000 mL 100 mM pH 8.2 Tris tamponunda çözüldü.

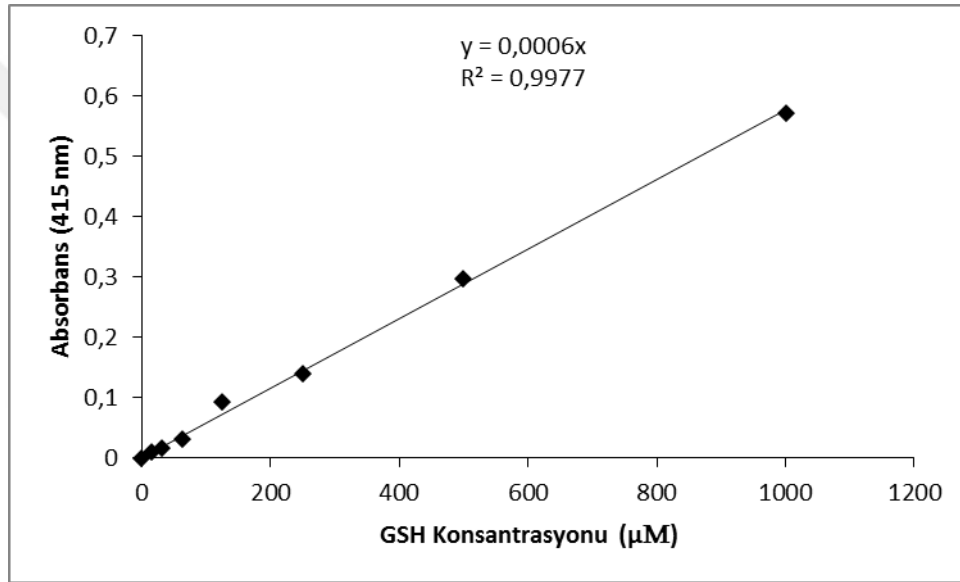
Reaktif 3 (10 mM DTNB): 39.63 mg DTNB 10 mL metanolde çözüldü.

Standart: GSH standart olarak kullanıldı. 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 μM 'lık standartlar hazırlandı. Kör olarak saf su kullanıldı. 3.0732 mg GSH bir miktar saf suda çözülüp son hacmi 10 mL'ye tamamlanarak 1000 μM 'lık standart hazırlandı. Seri dilüsyon yapılarak diğer standartlar hazırlandı.

Toplam Tiyol Ölçümü (T-SH): Reaktif 1A, 2 ve 3 ölçüm için kullanıldı. Toplam tiyol ölçümü için takip edilen aşamalar Tablo 3'te verildi. İkinci absorbans değerinden ilk absorbans değeri çıkarılarak delta absorbans bulundu, hesaplamalarda delta absorbans değerleri kullanıldı. Konsantrasyon hesabı Şekil 3'te verilen standart grafik kullanılarak yapıldı. Toplam tiyol ölçümü için intra-assay % CV değeri 8.11 olarak bulundu.

Tablo 3. Toplam tiyol ölçüm aşamaları

	Kör (µL)	Serum (µL)	Standart (µL)
Kör	10	-	-
Serum	-	10	-
Standart	-	-	10
Reaktif 1A	10	10	10
Reaktif 2	110	110	110
415 nm’de ilk absorbans okundu.			
Reaktif 3	10	10	10
Oda sıcaklığında 5 dk bekledikten sonra 415 nm’de ikinci absorbans okundu.			



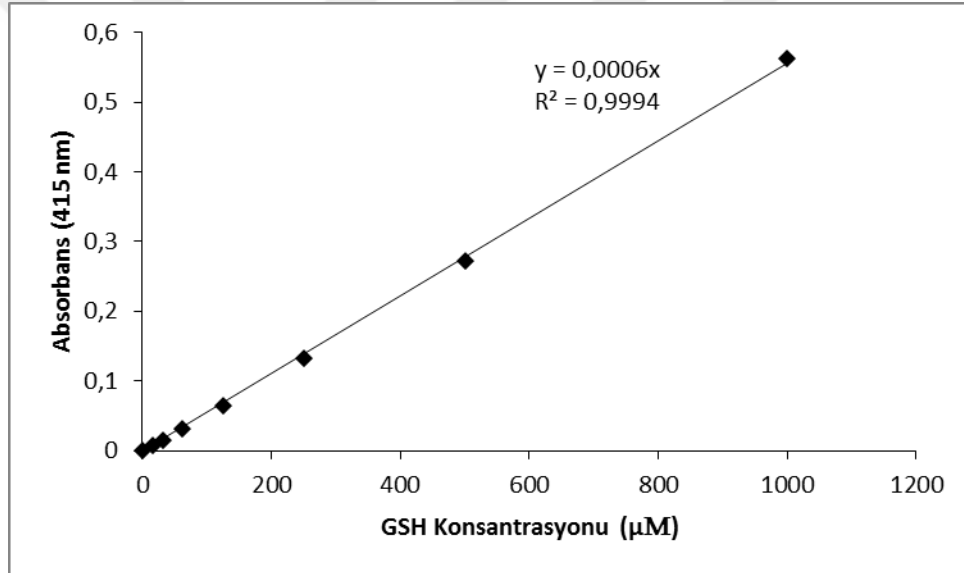
Şekil 3. Toplam tiyol standart grafiği

Doğal Tiyol Ölçümü (D-SH): Reaktif 1B, 2 ve 3 ölçüm için kullanıldı. Doğal tiyol ölçümü için takip edilen aşamalar Tablo 4’te verildi. İkinci absorbans değerinden ilk absorbans değeri çıkarılarak delta absorbans bulundu, hesaplamalarda delta absorbans değerleri kullanıldı. Konsantrasyon hesabı, Şekil 4’te verilen standart grafik kullanılarak yapıldı. Doğal tiyol ölçümü için intra-assay % CV değeri 8.06 olarak bulundu.

Tablo 4. Doğal tiyol ölçümü aşamaları

	Kör (µL)	Serum (µL)	Standart (µL)
Kör	10	-	-
Serum	-	10	-
Standart	-	-	10
Reaktif 1B	10	10	10
Reaktif 2	110	110	110
415 nm’de ilk absorbans okundu.			
Reaktif 3	10	10	10
Oda sıcaklığında 5 dk bekledikten sonra 415 nm’de ikinci absorbans okundu.			

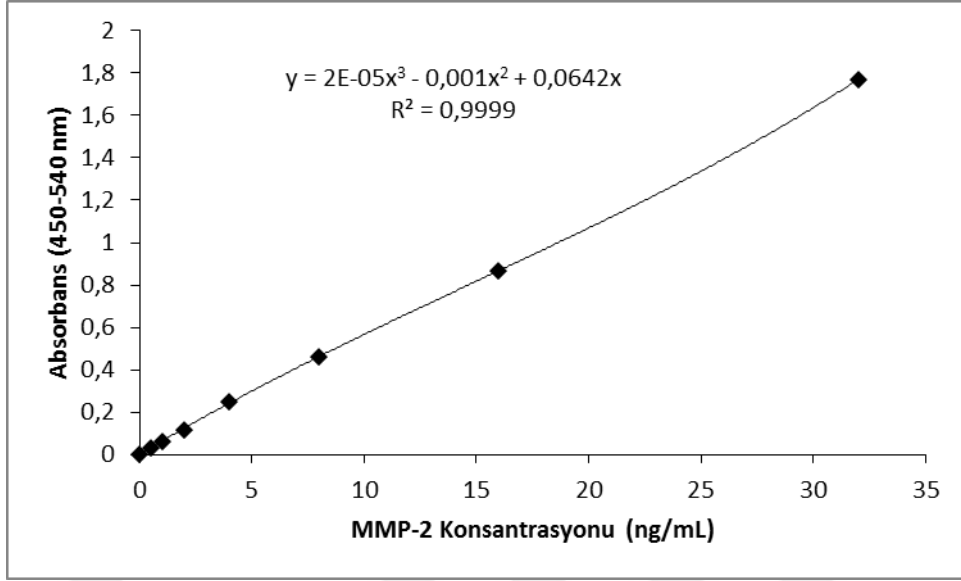
Disülfid Miktarının Hesaplanması: T-SH miktarından D-SH miktarı çıkarılıp ikiye bölünerek numunedeki disülfid miktarı bulundu.



Şekil 4. Doğal tiyol standart grafiği

5.2.4. MMP-2 Düzeylerinin Belirlenmesi

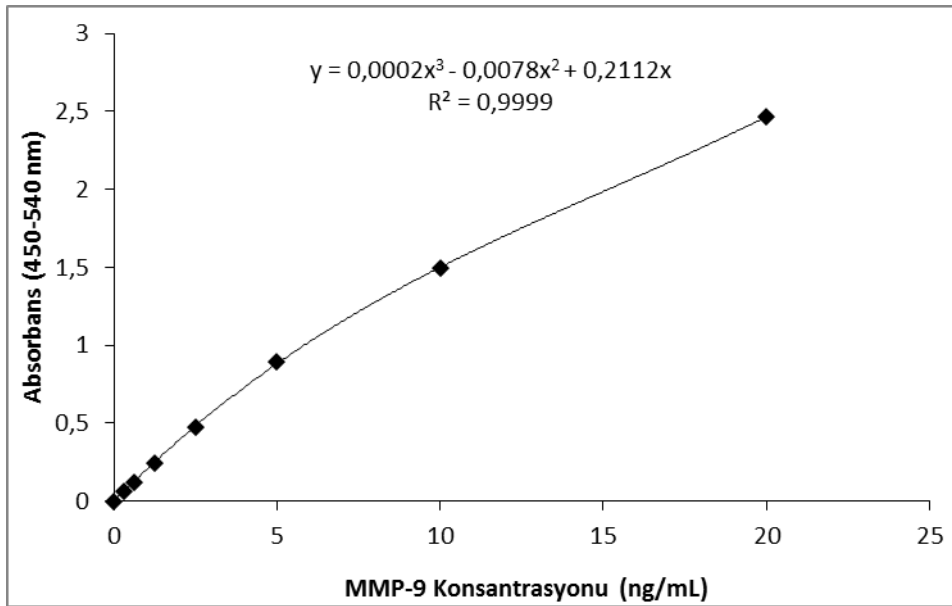
Serum MMP-2 miktarı sandviç ELISA yöntemi ile MMP-2 kiti (R&D Systems Quantikine Human MMP-2 Immunoassay, Lot: P164097, Katalog No: MMP200) kullanılarak belirlendi. Kit protokolüne uygun olarak MMP-2 ölçümü yapıldı. Şekil 5 teki standart grafik kullanılarak MMP-2 konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ng/mL olarak verildi.



Şekil 5. MMP-2 standart grafiği

5.2.5. MMP-9 Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum MMP-9 miktarı sandviç ELISA yöntemi ile MMP-9 kiti (R&D Systems Quantikine Human MMP-9 Immunoassay, Lot: P162217, Katalog No: DMP900) kullanılarak belirlendi. Kit protokolüne uygun olarak MMP-9 ölçümü yapıldı. Şekil 6 daki standart grafik kullanılarak MMP-9 konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ng/mL olarak verildi.



Şekil 6. MMP-9 standart grafiği

5.2.6. Kullanılan İstatistik Yöntemleri

Çalışmada elde edilen veriler, normal dağılıma uyan parametreler için aritmetik ortalama ve standart sapma, normal dağılıma uymayan parametreler için ortanca ve çeyrekler arası oran ile ifade edildi. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu "Kolmogorov-Smirnov" testi yapılarak belirlendi. Normal dağılıma uyan parametrelerde hasta ve kontrol grubu karşılaştırması "Student t-test" yapılarak, normal dağılıma uymayan parametrelerde hasta ve kontrol grubu karşılaştırması "Mann-Whitney U" testi yapılarak değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubu risk faktörleri yüzde olarak verildi ve iki grubun karşılaştırması "ki-kare" testi ile yapıldı. Parametreler arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için "Pearson" veya "Spearman" korelasyon analizi yapıldı. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Çalışma Grubunun Temel Özellikleri

Kontrol ve hasta gruplarının temel özellikleri Tablo 5'te sunuldu. Çalışmaya katılan hasta grubunun yaş ortalaması kontrol grubuna göre yüksekti. BMI, bel çevresi, SKB, DKB, nabız, TK, TG, HDL-K ve LDL-K düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Gruplar risk faktörleri bakımından karşılaştırıldığında hipertansiyon ve diabetes mellitus öyküsü hasta grubunda anlamlı olarak yüksekti.

Tablo 5. Kontrol ve hasta gruplarının temel özellikleri

	Kontrol n = 30	Hasta n = 50	p
Yaş (yıl)	56.8 ± 15.6	65.2 ± 10.7	0.013
Min-Max	24 – 85	37 - 82	-
Erkek, n (%)	16 (53)	36 (72)	0.090
BMI (kg/m²)	28.2 ± 4.4	28.7 ± 4.1	0.700
Bel çevresi (cm)	98.5 ± 10.7	99.4 ± 12.02	0.700
SKB (mmHg)	124 ± 14	127 ± 15.2	0.430
DKB (mmHg)	80 (75-81.25)	70 (75-80)	0.060*
Nabız (vuruş/dk.)	73.8 ± 8.05	73.5 ± 11.3	0.900
TK (mg/dL)	167 ± 35.12	178 ± 37.95	0.280
TG (mg/dL)	106 (75-180)	129 (75-177)	0.210*
HDL-K (mg/dL)	39.9 ± 10.6	36.4 ± 8.6	0.110
LDL-K (mg/dL)	121 ± 29.4	131 ± 31.5	0.150
Glukoz (mg/dL)	95 (84-114)	106 (87-143)	0.061*
Risk faktörleri (%)			
Hipertansiyon	30	64	0.003**
Sigara	7	20	0.106**
Aile öyküsü	46	32	0.206**
Diabetes Mellitus	7	26	0.032**
Hiperlipidemi	17	32	0.131**

* p değeri "Mann Whitney U testi" ne göre verildi. Değerler ortanca (çeyrekler arası oran) ile ifade edildi. ** p değeri "Ki-kare testi" ne göre verildi.

6.2. Çalışma Grubunun Tiyol, Disülfid, MMP-9 ve MMP-2 Değerleri

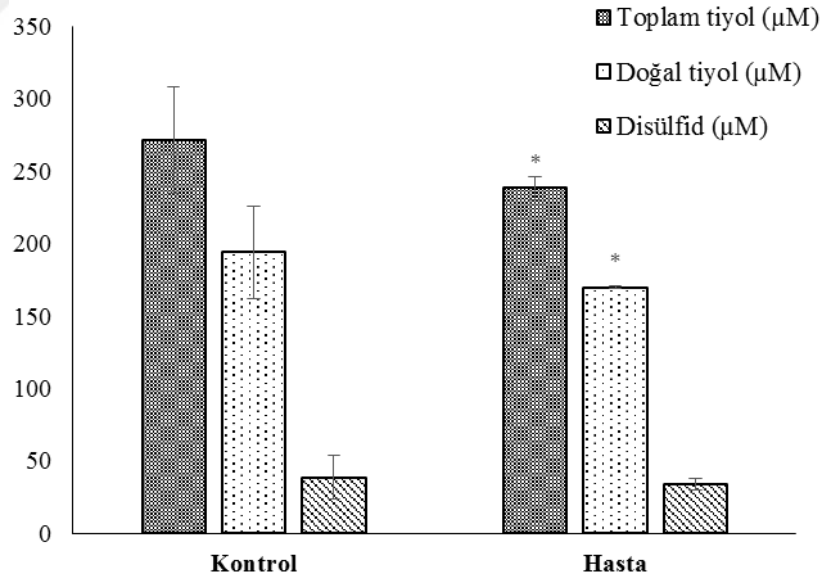
Çalışmaya katılan kontrol ve hasta gruplarına ait tiyol, disülfid, doğal tiyol/disülfid oranı, MMP-9 ve MMP-2 değerleri Tablo 6'da verildi. Hasta grubuna ait

toplam tiyol ve doğal tiyol düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi (Şekil 7). Fakat hasta ve kontrol grubunun disülfid düzeyleri ve doğal tiyol/disülfid oranları arasında fark bulunmadı. Bunun yanında hasta grubunda MMP-9 düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı tespit edilirken (Şekil 8), hasta ve kontrol grubunun MMP-2 düzeyleri arasında fark bulunmadı.

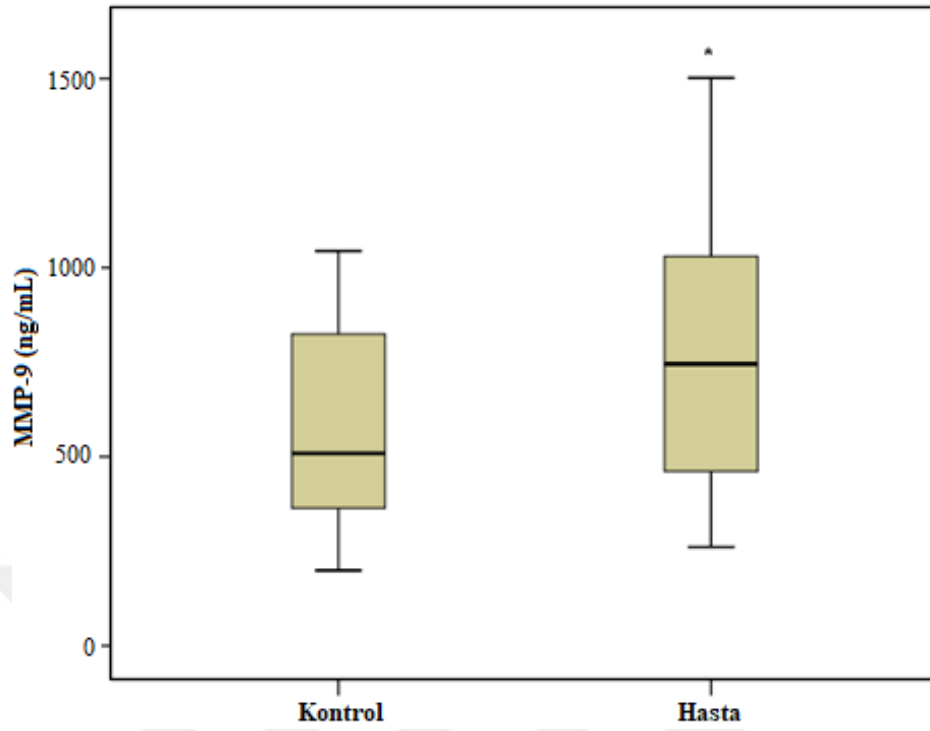
Tablo 6. Kontrol ve hasta gruplarına ait tiyol, disülfid, MMP-9 ve MMP-2 değerleri

	Kontrol n= 30	Hasta n= 50	P
Toplam tiyol (µM)	271 ± 37.8	238 ± 34.7	0.001
Doğal tiyol (µM)	194 ± 32.01	170 ± 32.7	0.003
Disülfid (µM)	38.8 ± 15.4	34.2 ± 15.15	0.211
Doğal tiyol/disülfid oranı	4.76 (3.5-6.4)	4.97 (4-8.5)	0.706*
MMP-9 (ng/mL)	508 (360-829)	745 (461-1031)	0.041*
MMP-2 (ng/mL)	248 ± 66.1	235 ± 73.3	0.437

* p değeri "Mann Whitney U testi" ne göre verildi. Değerler ortanca (çeyrekler arası oran) ile ifade edildi.



Şekil 7. Kontrol ve hasta gruplarında toplam tiyol, doğal tiyol ve disülfid seviyelerinin dağılımı. *Toplam tiyol ve doğal tiyol değerleri kontrole göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlıdır.



Şekil 8. Kontrol ve hasta gruplarında MMP-9 seviyelerinin dağılımı. * $p < 0.05$ düzeyinde anlamlıdır.

Kontrol ve hasta gruplarına ait korelasyon bulguları Tablo 7’de verildi. Hem kontrol hem de hasta grubunda toplam tiyol ile doğal tiyol, toplam tiyol ile disülfid düzeyleri arasında pozitif ilişki bulundu. Disülfid düzeyleri her iki grupta da HDL-K ile negatif korelasyon gösterirken, bu ilişki kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kontrol ve hasta grubunda toplam tiyolün yaş artışı ile beraber anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi. Hasta grubunda MMP-2 düzeyleri ile doğal tiyol düzeyleri ve doğal tiyol düzeyleri ile yaş arasında anlamlı negatif ilişki gözlenirken, kontrol grubunda bu iki değişken arasında ilişki bulunamadı.

Tablo 7. Kontrol ve hasta gruplarına ait korelasyon bulguları

Değişkenler	Kontrol		Hasta	
	r	p	r	p
Toplam tiyol – Doğal tiyol	0.625	0.001	0.597	0.001
Toplam tiyol – Disülfid	0.581	0.001	0.501	0.001
Disülfid – HDL-K	-0.417	0.031	-0.224	0.135
Doğal tiyol – MMP-2	-	-	-0.343	0.020
Toplam tiyol – Yaş	-0.518	0.006	-0.328	0.026
Doğal tiyol – Yaş	-	-	-0.359	0.014

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Koroner arter hastalarında organizmanın oksidan-antioksidan durumunu değerlendirmek için kullanılan tiyol/disülfid dengesi ile MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı amaçladığımız çalışmamızda hasta grubuna ait toplam tiyol ve doğal tiyol düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı, disülfid düzeylerinin ve doğal tiyol/disülfid oranının değişmediği gözlemlendi. Çalışmamızla paralel olarak Altıparmak ve ark. (61) koroner arter hastalarında toplam tiyol ve doğal tiyol düzeylerinin azaldığını ve bu azalışın koroner arter hastalık ciddiyeti ile ilişkili olduğunu tespit ettiler. Bunun yanında disülfid/doğal tiyol oranının değişmediğini gözlemllediler. Aynı şekilde Kundi ve ark. (5) akut miyokard infarktüs geçiren hastaların toplam tiyol ve doğal tiyol düzeylerini kontrol grubuna göre daha düşük bulurken, disülfid düzeyini hasta grubunda daha düşük bulmalarına rağmen, disülfid/doğal tiyol oranını hasta grubunda anlamlı yüksek buldular. Ateş ve ark. (4) tarafından yapılan primer hipertansiyonu olan hastalarda ve Kızıltunç ve ark. (9) tarafından yapılan başka bir çalışmada koroner arter ektazi hastalarında toplam ve doğal tiyol düzeylerinin hasta grubunda azaldığı, disülfid düzeyinin arttığı, doğal tiyol/disülfid oranının azaldığı tespit edildi. Çalışmamızda ve yukarıda sözü edilen çalışmalarda serum tiyol ve disülfid düzeyleri Erel ve Neşelioğlu (6) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak belirlendi. Bu yöntemle göre numunedeki toplam tiyol (T-SH) ve doğal tiyol (D-SH) düzeyleri belirlendi. Disülfid bağı iki kükürt atomunu birleştiren tek bağ olduğu için T-SH miktarından D-SH miktarı çıkarılıp ikiye bölünerek numunedeki disülfid miktarı bulundu. Yöntemin prensibi temelde Ellman reaktifi ile spektrofotometrik ölçüme dayanmaktadır. Toplam tiyol serumda bulunan indirgenebilir disülfid bağları sodyum borhidrür ile indirgendikten sonra Ellman reaktifi kullanılarak ölçüldü. Serumda bulunan doğal tiyol düzeyi ise indirgeyici ajan kullanılmadan klasik Ellman reaktifi ile belirlendi. Serum tiyol içeren moleküller yönünden incelendiğinde serum tiyol havuzu büyük oranda albümin ve protein tiyollerinin yanında daha az oranda sistein, glutatyon, homosistein gibi düşük molekül ağırlıklı tiyol bileşiklerinden oluşmaktadır. Bu moleküllerde bulunan tiyol grupları ROS'lar tarafından oksidasyona uğrar ve disülfid bağları oluşur. Oluşan disülfid bağları antioksidanlar tarafından tekrar tiyol gruplarına indirgenir ve böylece tiyol/disülfid dengesi korunmuş olur. Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda bu dengenin korunmuş olduğunu görmekteyiz.

Aslında koroner arter hastalığının altında yatan başlıca sebep olan ateroskleroz gelişiminde rolü olduğu bilinen artan oksidatif stres ile sonuçlanan oksidan-antioksidan dengenin bozularak tiyol/disülfid dengesinin disülfid yönüne kaymasını ve bu oranın azalmasını beklemekteydik. Hasta grubunda tiyol düzeylerinin azalmasına rağmen disülfid düzeyinin değişmeden kalması mevcut antioksidan mekanizmaların oluşan disülfidlerin bertaraf edilmesi konusunda yeterli olduğunu düşündürebilir.

Koroner arter hastalığının progresyonunda rolü olan ECM sentez ve yıkımı arasındaki dengenin bozulmasında proteolitik enzimler olan MMP'ler yer alır. Oksidatif stres MMP'lerin aktivitesini etkileyen faktörlerdendir. Koroner arter hastalarında proteolitik biyobelirteç olarak düşünülen MMP-2 ve MMP-9 düzeylerini de belirlediğimiz çalışmamızda hasta grubunda MMP-9 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek iken MMP-2 düzeylerinde değişim gözlenmedi. Literatürde elde ettiğimiz bu sonuç ile uyum gösteren araştırmalar mevcuttur. Wu ve ark. (62) MMP-9 düzeylerinin KAH grubunda kontrol grubuna göre arttığını belirlediler. Ferroni ve ark. (63) yapmış oldukları çalışmalarında akut miyokard enfaktüs geçiren hastaların MMP-9 düzeylerini anlamlı derecede yüksek bulurken, MMP-2 düzeylerinde bir farklılık bulamadılar. Tan ve ark. (64) karotid ateroskleroz ciddiyeti ile serum MMP-9 düzeylerinin arttığını gözlemlediler. MMP'lerin transkripsiyonunu ve aktivasyonunu başlatan etkenlerden birtanesi de oksidatif strestir. Organizmadaki ROS düzeyinin artışı MMP'lerin gen ekspresyonunda artışa ve bunun sonucunda MMP-2 ve MMP-9 seviyelerinin artışına neden olabilir. Dolayısıyla artan oksidatif stres koşulları altında MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinde artış gözlenebilir (65). Ortamda ROS'un artması ve endojen kaynaklı antioksidanların azalması sonucu MMP-2 ve MMP-9 aktive olarak kollajen yıkımını artırır. Böylece miyokardın yeniden yapılanması ve patofizyolojisinde önemli rol oynar (66). ROS artışı ile aktifleşen MMP-9 aterom plağın fibroz tabakasını parçalayarak tromboz oluşumuyla kararsız anjina veya MI'a yol açabilir (38). Ayrıca makrofajlar tarafından salınan MMP-9 ECM'nin yapısını bozarak SMC'lerin intima tabakasına göçünü kolaylaştırarak ateroskleroz lezyonunun oluşumuna katkı sağlar. Bunun yanında tiyol bileşiklerinin MMP aktivitelerini değiştirdiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bogani ve ark. (60) endotel hücre kültüründe yaptıkları çalışmada N-asetilsistein, glutatyon ve lipoik asit gibi tiyol bileşiklerinin ROS ile indüklenen MMP-2 ve MMP-9 aktiviteleri üzerinde farklı

düzeyde artış veya azalışa neden olduklarını belirlediler. Tiyollerin MMP'ler üzerinde etkilerinin farklı olmasını tiyol grupları taşıyan antioksidanların yapısal farklılıkları (N-asetilsistein ile GSH'nin monotiyol ve lipoik asitin ditiyol gruplarına sahip olması) sebebi ile MMP'nin katalitik bölgesine farklı etki edebileceklerini ve organizmadaki tiyol konsantrasyonunun da MMP'lerin aktivitesini etkileyebileceğini öne sürdüler (60).

Çalışmamızda tiyol ve disülfid düzeyleri ile MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, hem kontrol hem de hasta grubunda toplam tiyol ile doğal tiyol, toplam tiyol ile disülfid düzeyleri arasında pozitif ilişki bulundu. Analiz yöntemi göz önüne alındığında bu beklenen bir ilişkidir. Ashfaq ve ark. (35) sub-klinik ateroskleroz ile plazma glutatyon redoks potansiyeli (E_h GSH/GSSG) arasındaki ilişkiyi ortaya koydukları çalışmalarında geleneksel risk faktörlerinden bağımsız olarak glutatyon redoks potansiyelinin sağlıklı bireylerde erken ateroskleroz gelişimini belirlemede faydalı bir oksidatif stres biyobelirteci olabileceğini ileri sürdüler. Çalışmamızda hasta grubunda MMP-2 düzeyleri ile sadece doğal tiyol düzeyleri arasında anlamlı negatif ilişki gözlenirken, MMP-9 ile parametreler arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

Artan oksidatif stres hipertansiyon, diyabet, hiperlipidemi gibi standart KAH risk faktörlerinin oluşumuna neden olabilir ya da tam tersi söz konusu olabilir. Artan oksidatif stres de MMP-2 ve MMP-9 proteinazların direk yada indirek aktivasyonuna ve MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinde artışa neden olabilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular sonucunda koroner arter hastalarında toplam tiyol ve doğal tiyol düzeylerinin azalması ve MMP-9 düzeylerinin artmasına rağmen, oksidatif stress durumunu değerlendirmek için kullandığımız tiyol/disülfid dengesi ile MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri arasında ilişki bulunamamıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Türkiye İstatistik Kurumu haber bülteni (2017). Available from: <http://www.tuik.gov.tr>. [Erişim tarihi, 27 Nisan 2017].
2. Greaves DR, Channon KM (2002). Inflammation and immune responses in atherosclerosis. *Trends Immunol* 23(11): 535-541.
3. Scott J (2004). Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Curr Opin Genet Dev* 14: 271-279.
4. Ates İ, Ozkayar N, Inan B, Meric Yilmaz F, Topcuoglu C, Neselioglu S, Erel O, Dede F, Yilmaz N (2016). Dynamic thiol/disulphide homeostasis in patients with newly diagnosed primary hypertension. *J Am Soc Hypertens* 10(2):159–166.
5. Kundi H, Ates I, Kiziltunc E, Cetin M, Cicekcioglu H, Neselioglu S, Erel O, Ornek E (2015). A novel oxidative stress marker in acute myocardial infarction; thiol/disulphide homeostasis. *Am J Emerg Med* 33: 1567–1571.
6. Erel O, Neselioglu S (2014). A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem* 47: 326–332.
7. Dirican N, Dirican A, Sen O, Aynali A, Atalay S, Bircan HA, Oztürk O, Erdogan S, Cakir M, Akkaya A (2017). Thiol/disulfide homeostasis: A prognostic biomarker for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Redox Rep* 21: 197-203.
8. Topuz M, Kaplan M, Akkus O, Sen O, Yunsel HD, Allahverdiyev S, Erel O, Koc M, Gur M (2016). The prognostic importance of thiol/disulfide homeostasis in patients with acute pulmonary thromboembolism. *Am J Emerg Med* 34: 2315–2319.
9. Kızıltunç E, Gök M, Kundi H, Çetin M, Topçuoglu C, Gülkan B, Çiçekçioglu H, Örnek E (2016). Plasma thiols and thiol-disulfide homeostasis in patients with isolated coronary artery ectasia. *Atherosclerosis* 253: 209-213.
10. Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R, Kizek R (2010). Matrix Metalloproteinases. *Curr Med Chem* 17: 3751-3768.
11. Opstad TB, Pettersen R, Weiss TW, Akra S, Arnesen RH, Seljeflot I (2012). Genetic variation, gene-expression and circulating levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with stable coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 413: 113–120.

12. Inoue N, Takeshita S, Gao D, Ishida T, Kawashima S, Akita H, Tawa R, Sakurai H, Yokoyama M (2001). Lysophosphatidylcholine increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH: NADPH oxidase in cultured aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 155: 45–52.
13. Castro MM, Kandasamy AD, Youssef N, Schulz R (2011). Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines. Therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Pharmacol Res* 64: 551– 560.
14. Pustovrh MC, Jawerbaum A, Capobianco E, White V, Martínez M, López-Costa JJ, González E (2005). Oxidative stress promotes the increase of matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in the fetoplacental unit of diabetic rats. *Free Radic Res* 39: 1285–1293.
15. O'Sullivan S, Medina C, Ledwidge M, Radomski MW, Gilmer JF (2014). Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: Biological and pharmacological significance NO and MMP-9 interactions. *Biochim Biophys Acta* 1843: 603–617.
16. Demirtaş AO (2014). Akut iskemide iskemi modifiye albümün düzeylerinin koroner arter hastalığı yaygınlığı ile ilişkisi. *Uzmanlık Tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak*.
17. Liu P, Sun M, Sader S (2006). Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 22: 25-30.
18. Brown BA, Williams H, George SJ (2017). Evidence for the involvement of matrix-degrading metalloproteinases (MMPs) in atherosclerosis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 147: 1-41.
19. Butoi E, Gan AM, Tucureanua MM, Stan D, Macarie RD, Constantinescu C, Calina M, Simionescu M, Manduteanua I (2016). Cross-talk between macrophages and smooth muscle cells impairs collagen and metalloprotease synthesis and promotes angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1863: 1568–1578.
20. Camaré C, Pucelle M, Nègre-Salvayre A, Salvayre R (2017). Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biol* 12: 18–34.
21. Wang T, Palucci D, Law K, Yanagawa B, Yam J, Butany J (2012). Atherosclerosis: pathogenesis and pathology. *Cardiovasc Pathol* 18: 461-467.

22. Xu RX, Li S, Li XL, Zhang Y, Guo YL, Zhu CG, Wu NQ, Qing P, Sun J, Dong Q, Li JJ (2015). High-density lipoprotein subfractions in relation with the severity of coronary artery disease: A Gensini score assessment. *J Clin Lipidol* 9: 26–34.
23. Falk E (2006). Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 47: 1-6.
24. Costacoua T, Zgibora JC, Evansa RW, Tyurinab YY, Kaganb VK, Orcharda TJ (2006). Antioxidants and coronary artery disease among individuals with type 1 diabetes: Findings from the pittsburgh epidemiology of diabetes complications study. *J Diabetes Complications* 20: 387–394.
25. Gheddouchi S, Mokhtari-Soulimane N, Merzouk H, Bekhti F, Soulimane F, Guermouche B, Tani AM, Narce M (2015). Low SOD activity is associated with overproduction of peroxynitrite and nitric oxide in patients with acute coronary syndrome. *Nitric Oxide* 49: 40-46.
26. Vassalle C, Pratali L, Boni C, Mercuri A, Ndreu R (2008). An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 41: 1162–1167.
27. Liu LP, Cheng K, Ning MA, Li HH, Wang HC, Li F, Chen SY, Qu FL, Guo WY (2017). Association between peripheral blood cells mitochondrial DNA content and severity of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 261: 1-6.
28. Serdar Z, Aslan K, Dirican M, Sarandöl E, Yeşilbursa D, Serdar A (2012). Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clin Biochem* 39: 794–803.
29. Arora S, Patra SK, Saini R (2016). HDL-A molecule with a multi-faceted role in coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 452: 66–81.
30. Perez-Mendez O, Pacheco HG, Martinez-Sanchez C, Franco M (2014). HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: Function or structure. *Clin Chim Acta* 429: 111–122.
31. Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C (2009). The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol* 50: 402-409.
32. Weinbrenner T, Cladellas M, Covas MI, Fito M, Toma's M, Senti M, Bruguera J, Marrugat J (2003). The SOLOS study investigators: High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis* 168: 99-106.

33. Koninga AM, Meijers WC, Pasch A, Leuvenink HGD, Frenay ARS, Dekkera MM, Feelische M, Boerc RA, Goor HV (2016). Serum free thiols in chronic heart failure. *Pharmacol Res* 111: 452–458.
34. Topcuoglua C, Bakirhan A, Yilmaz FM, Neselioglu S, Erel O, Sahiner SY (2017). Thiol/disulfide homeostasis in untreated schizophrenia patients. *Psychiatr Res* 251: 212–216.
35. Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, Hooper WC, Vaccarino V, Harrison DG, Quyyumi AA (2006). The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. *J Am Coll Cardio* 47: 1-7.
36. Yardim Akaydin S, Özkana Y, Özkan E, Toruna M, Şimşek B (2003). The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta* 338(1-2): 99–105.
37. Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK (2014). Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers* 27: 1298-1327.
38. Mittal B, Mishra A, Srivastava A, Kumar S, Garg N (2014). Matrix Metalloproteinases in Coronary Artery Disease. *Adv Clin Chem* 64: 1-72.
39. O'Toole TE, Zheng YT, Hellmann J, Conklin DJ, Barski O, Bhatnagar A (2009). Acrolein activates matrix metalloproteinases by increasing reactive oxygen species in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 236: 194–201.
40. Öztürk ÖG (2013). Matrix metalloproteinase enzyme family. *Med Rev J* 22: 209-220.
41. Raffetto JD, Khalil RA (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 75: 346-359.
42. Eo SH, Choi SY, Kim SJ (2016). PEP-1-SIRT2-induced matrix metalloproteinase-1 and 13 modulates type II collagen expression via ERK signaling in rabbit articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 348: 1-8.
43. Nagase H, Visse R, Murphy G (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69: 562–573.

44. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM (2010). Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* 1803: 39–54.
45. Silvestre JS, Mallat Z, Tamarat R, Duriez M, Tedgui A, Levy BI (2001). Regulation of matrix metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10 role in ischemia-induced angiogenesis. *Circ Res* 89: 259-264.
46. Nagase, Hideaki. Substrate specificity of MMPs (2001). Part of the Cancer Drug Discovery and Development book series (CDD&D). Media: <https://link.springer.com/chapter/10.1007>.
47. Kerkela E, Saarialho-Kere U (2003). Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 12: 109–125.
48. Liang HPH, Xu J, Xue M, Jackson CJ (2016). Matrix metalloproteinases in bone development and pathology: current knowledge and potential clinical utility. *Metalloproteinases Med* 3: 93–102.
49. Liu J, Khalil RA (2017). Matrix metalloproteinase inhibitors as investigational and therapeutic tools in unrestrained tissue remodeling and pathological disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci* 148: 355-410.
50. Paiva KBS, Granjeiro JM (2017). Matrix metalloproteinases in bone resorption, remodeling and repair. *Prog Mol Biol Transl Sci* 148: 203-303.
51. Parrish AR (2017). Matrix metalloproteinases in kidney disease: Role in pathogenesis and potential as a therapeutic target. *Prog Mol Biol Transl Sci* 148: 31-65.
52. Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E, Sagi I (2015). Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol* 44(46): 191-199.
53. Meisel JE, Chang M (2017). Selective small-molecule inhibitors as chemical tools to define the roles of matrix metalloproteinases in disease. *BBA-Mol Cell Res* 1864: 2001–2014.
54. Dollery CM, McEwan CR, Henney AM (1995). Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circul Res* 77: 863-868.

55. Stefanoa MED, Herrero MT (2017). The multifaceted role of metalloproteinases in physiological and pathological conditions in embryonic and adult brains. *Prog Neurobiol* 155: 36–56.
56. Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez AJ (2010). Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol* 174: 299–306.
57. Jacob-Ferreira AL, Schulz R (2013). Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen–nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart. *Arch Biochem Biophys* 540: 82–93.
58. Ding R, Feng L, He L, Chen Y, Wen P, Fu Z, Lin C, Yang S, Deng X, Zeng J, Sun G (2015). Peroxynitrite decomposition catalyst prevents matrix metalloproteinase-9 activation and neurovascular injury after hemoglobin injection into the caudate nucleus of rats. *Neurosci* 297: 182–193.
59. Dollery CM, Libby P (2006). Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res* 69: 625–635.
60. Bogani P, Canavesi M, Hagen TM, Visioli F, Bellosta S (2007). Thiol supplementation inhibits metalloproteinase activity independent of glutathione status. *Biochem Biol Res Commun* 363(3): 651–655.
61. Altiparmak IE, Erkuş ME, Sezen H, Demirbag R, Gunebakmaz O, Kaya Z, Sezen Y, Asoglu R, Dedeoglu IH, Neselioglu S, Erel O (2016). The relation of serum thiol levels and thiol/disulphide homeostasis with the severity of coronary artery disease. *Kardiol Pol* 74(11): 1346–1353.
62. Wu HD, Bai X, Chen DM, Cao HY, Qin L (2013). Association of genetic polymorphisms in matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease in the chinese han population: A case–control study. *Genet Test Mol Biomarkers* 17: 707–712.
63. Ferroni P, Basili S, Martini F, Cardarello CM, Ceci F, Di Franco M, Bertazzoni G, Gazzaniga PP, Alessandri C (2003). Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *J Investig Med* 51(5): 295–300.

64. Tan C, Liu Y, Li W, Deng F, Liu X, Wang X, Gui Y, Qin L, Hu C, Chen L (2014). Associations of matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 concentrations with carotid atherosclerosis, based on measurements of plaque and intima-media thickness. *Atherosclerosis* 232(1): 199-203.
65. Yongxin S, Wenjun D, Qiang W, Yunqing S, Liming Z, Chunsheng W (2012). Heavy smoking before coronary surgical procedures affects the native matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 gene expression in saphenous vein conduits. *Ann Thorac Surg* 95(1): 55-61.
66. Słwik DA, Pagano PJ, Colucci WS (2001). Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(1): 53–60.

9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI

Sayı : 24237859-533
Konu: Etik Kurul onay belgesi

02/10/2017

Sayın; Y.Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN
Tıbbi Biyokimya ABD.

"Koroner Arter Hastalarında MMP-2 ve MMP-9 Düzeyleri ile Tiyo/Disülfid Dengesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi" başlıklı etik kurul 2017/149 protokol numaralı tez çalışması raporör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.

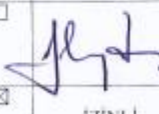
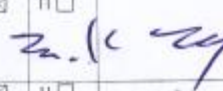
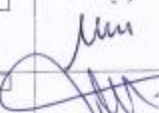
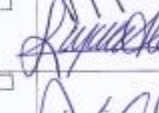
Prof.Dr.Faruk AYDIN
Etik kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 6	Tarih: 25/09/2017
	Y.Doç.Dr.Fulya BALABAN YÜCESAN'ın sorumluluğunda yürütülmesi planlanan Yük.Lis.Öğr.Esma Nur ŞEKER'e ait "Koroner Arter Hastalarında MMP-2 ve MMP-9 Düzeyleri ile Tiyo/Disülfid Dengesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi" başlıklı 2017/149 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen <u>araştırma</u> /tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLI
Prof.Dr.S.Caner KARAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raporör:	Tıbbi Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekonstr. ve Estetik Cer.	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Tıbbi Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Y.Doç.Dr.Deniz SAĞLAM AYKUT Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

10. ONAM FORMU

	ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ	
---	--	---

Ben Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesinde yürütülmekte olan “Koroner Arter Hastalarında MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ile Tiyo/Disülfid Dengesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi” adlı araştırmaya denek olarak katılmayı gönüllülükle kabul ediyorum.

Bana, tarafından araştırmanın amacı anlatıldı. Yapılacak olan bu çalışmada benden bir kereliğine mahsus olmak üzere 2 tüp kan alınacağı, konu ile ilgili biyokimyasal analizler yapılacağı ve ilgili sonuçların tarafıma bildirileceği anlatıldı. Araştırmadan tıbbi olarak bir yarar sağlanması söz konusu olmadığı, ancak bu çalışmadan çıkarılan sonuçların gelecekte başka insanların yararına kullanılabileceği ve doğrudan yarar görmeyi ya da tedavinin seyrinin değiştirilmesini beklememek gerektiği tarafıma bildirildi.

Araştırmaya katılımın isteğe bağlı olduğu ve istediğim zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkımı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebileceğimi veya araştırmadan çekilebileceğimi ve araştırmanın sağlığımla üzerine herhangi bir tehlikesinin olmadığını biliyorum.

Araştırma süresince kendimle ilgili bir olumsuzluk hissettiğimde (Dr.Cihan ÖREM) ve (Fulya B.YÜCESAN’a) 0 533 2374615 nolu telefonda 24 saat ulaşabileceğimi biliyorum.

Araştırma sonuçlarının, eğitim ya da bilimsel amaçlarla kullanılması sırasında benim mahremiyetime saygı gösterileceğine inanıyorum. Araştırma sırasında araştırma ile doğrudan yada dolaylı olarak ilişkisi olan herhangi bir sağlık sorunu olduğunda bu sorunun giderileceği güvencesi verildi. Gönüllü olarak katılmaya karar verdiğim araştırmanın ekonomik sorumluluğunun bana ait olmadığı ve araştırma için öngörülen sürenin 6 ay olduğu söylendi.

Bu açıklamaları anladım ve gönüllülükle bu onamı verdim. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Hasta/Deneğin:

Adı Soyadı:

İmzası:

Adresi Telefon:

Tanık/Vekil:

Adı Soyadı:

İmzası:

Adresi Telefon:

Aydınlatan Hekim Adı Soyadı ve İmzası:

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Soyadı, Adı : ŞEKER, Esmâ Nur
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 30.10.1986 - Rize
Medeni hali : Bekar
E-Posta : nurseker-86@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya AbD	2018
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
1. Stajer	Başbakanlığa Bağlı Adli Tıp	10.06.2010-10.07.2010
2. Stajer	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya	01.07.2011-01.08.2011
3. Stajer	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji	05.08.2011-29.08.2011

YABANCI DİL

İngilizce