

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PSÖDOEKSFOLİYASYON SENDROMU VE GLOKOMU İLE BAĞ DOKUSU
BÜYÜME FAKTÖRÜ (CTGF) GENETİK POLİMORFİZMLERİ VE CTGF
GÖZYAŞI VE AKÖZ SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Canan KOÇAN

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

NİSAN, 2018

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığımı onaylarım.

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Anabilimdalı Başkanı

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 151711019 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Canan KOÇAN**'ın ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**PSÖDOEKSFOLİASYON SENDROMU VE GLOKOMU İLE BAĞ DOKUSU BÜYÜME FAKTÖRÜ (CTGF) GENETİK POLİMORFİZMLERİ VE CTGF GÖZYAŞI VE AKÖZ SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**” başlıklı tezi **03.04.2018** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Orhan ADALI (Başkan)**
Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet MUTLU
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Canan KOÇAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PSÖDOEKSFOLİASYON SENDROMU VE GLOKOMU İLE BAĞ DOKUSU BÜYÜME FAKTÖRÜ (CTGF) GENETİK POLİMORFİZMLERİ VE CTGF GÖZYAŞI VE AKÖZ SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

Canan KOÇAN

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

Tarih: Nisan 2018

Psödoeksfoliyasyon sendromu (PES) göz dokularında anormal fibriler materyallerin üretilmesi ve birikmesi ile karakterize bir hücre dışı matriks hastalığıdır. Bazı durumlarda psödoeksfoliyatif materyal birikmesi sonucu aköz humor sıvısının drenajını sağlayan kanalların tıkanarak göz içi basıncının artıp optik sinire zarar vermesine ve glokom (PEG) oluşmasına neden olur. PEG görme alanında daralmaya ve sonunda tam görme kaybına neden olabilir ve bu durumun tedavisi yoktur. PES'in patofizyolojisinde elastik mikrofibrillerin fazla üretilmesi önemli yer tutmaktadır. Bu nedenle büyüme faktörlerinin patofizyolojide rolü olabileceği düşünülmüştür. PES'de TGF- β 1'in normalden yüksek seviyelerde ifade edildiği görülmüştür ve CTGF ifadesi TGF β tarafından indüklendiği için PES patofizyolojisinde CTGF'nin rolü olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle CTGF ifade seviyelerini etkilediği düşünülen rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs9402373C/G, rs12526196T/C polimorfizmlerinin ve gözyaşı ile aközdeki CTGF konsantrasyonlarının çalışılması, bunların hem birbirleri ile hem de PEG ve PES ile ilişkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. 213 PEG, 214 PES ve 215 kontrolün kan örnekleri ve bu kişilerin bir kısmının gözyaşı ve aköz örnekleri

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göz Hastalıkları ABD (Ankara) tarafından toplanmıştır. Genotipleme analizlerinde rs6918698G/C ve rs9399005C/T için PCR-RFLP, rs9402373C/G ve rs12526196T/C için eş zamanlı PCR yöntemleri kullanılmıştır. Gözyaşı ve aközdeki total protein konsantrasyonları Bradford assay yöntemi ile, CTGF konsantrasyonları ise ELISA metodu ile belirlenmiştir. Yapılan lojistik regresyon analizine göre PEG ile erkek olmak 1.8 kat ilişkili çıkmıştır. Çalışmadaki polimorfizmlerin genotiplerinin tEK 2aşlarına PEG ya da PES ile anlamlı bir ilişkisi bulunmamıştır. Ancak dört polimorfizmin her biri için genotipleme çalışmaları Türk toplumunda ilk kez yapılmış ve alel frekansları belirtilmiştir. İkili ve üçlü SNP genotip kombinasyonlarının PEG, PES ve kontrol gruplarında görülme frekanslarına göre yapılan analizlerin sonucunda bazı genotip kombinasyonlarının PES ve PEG için riskli ya da koruyucu etkiye sahip olabilecekleri görülmüştür. Gözyaşı ve aközdeki total protein konsantrasyonları PEG grubunda, PES ve kontrollere göre anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur. Gözyaşı CTGF konsantrasyonunun PEG ve PES hastalarında kontrollerden anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Gözyaşı ve aközdeki CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı ile SNP bölgeleri arasında korelasyon görülmemiştir. Aynı zamanda bu parametreler için gözyaşı ve aköz arasında da bir korelasyon görülmemiştir. CTGF rs6918698G/C, rs12526196T/C, rs9402373C/G polimorfizmleri ve gözyaşında CTGF konsantrasyonunun PES ve PEG ile ilişkisi ilk kez bu çalışmada ele alınmıştır ve bundan sonra yapılacak çalışmaları yönlendirebilecek öneme sahiptir. Bu çalışmada dünyada ya da Türkiye’de ilk kez çalışılmış ilişkiler yer almaktadır ve bunlardan elde edilmiş veriler biyoinformatik alanında değere sahiptir. Aynı zamanda çalışmada bulunan ilişkilerden yola çıkılarak PES ve PEG teşhisi için kullanılacak biyobelirteçler bulunabilir, bunlara yönelik tanı laboratuvarlarında kullanılmak üzere cihazlar geliştirilebilir. Bu çalışma bu yönleriyle biyomedikal mühendisliğine katkı sağlamış bir proje niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: Psödoeksfolyasyon, Glokom, Bağ doku büyüme faktörü, CTGF, Genetik, Polimorfizm, rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs9402373C/G, rs12526196T/C

ABSTRACT

Master of Science

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN GENETIC
POLYMORPHISMS OF CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR (CTGF)
AND ITS TEAR AND AQUEOUS HUMOR LEVELS IN
PSEUDOEXFOLIATION SYNDROME AND GLAUCOMA

Canan KOÇAN

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering Science Programme

Supervisor: Assoc. Prof. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

Date: April 2018

Pseudoexfoliation syndrome (PES) is an extracellular matrix disease characterized by the production and accumulation of abnormal fibrillary materials in ocular tissues. As a result of the accumulation of pseudoexfoliative material, channels for the drainage of aqueous humor fluid is blocked. This causes intraocular pressure to increase, damages the optic nerve and causes glaucoma (PEG) to appear. PEG can cause complete loss of vision, and this condition has no treatment. The over production of elastic micro fibrils is thought to be an important part of the pathophysiology of PES. For this reason, it is thought that growth factors may have an important role in pathophysiology. It has been shown that TGF- β 1 is expressed at higher levels in PES than controls and since CTGF expression is induced by TGF β , it was thought that CTGF may play a role in PES pathophysiology. Therefore, it was aimed to examine the CTGF polymorphisms rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs9402373C/G, rs12526196T/C, which are thought to be affecting expression levels of CTGF.

Moreover to measure the CTGF concentrations in tear and aqueous humor to investigate the relations with polymorphisms, and to be able to differentiate PEG and PES was another purpose. Blood samples from 213 PEG, 214 PES and 215 controls, also tear and aqueous humor samples of some of these people were collected by University of Health Sciences, Gülhane Training and Research Hospital, Ophthalmology Unit, Ankara, Turkey. PCR-RFLP method was used for genotyping of rs6918698G/C and rs9399005C/T while real-time PCR method was used for rs9402373C/G and rs12526196T/C. Total protein concentrations were determined by Bradford assay and CTGF concentrations by ELISA method in tear and aqueous humor samples. According to the logistic regression analysis, being male was 1.8 times related to PEG. The genotypes of the studied polymorphisms did not have a significant association with PEG or PES alone. However, genotyping studies for each of the four polymorphisms were made for the first time in Turkish population and the allele frequencies were determined. As a result of analysis of the combinations of double and triple SNP genotypes according to the frequencies seen in PEG, PES and control groups, it has been seen that some genotype combinations may have risky or protective effect for PES or PEG. Total protein concentrations in the tear and aqueous solution were significantly higher in the PEG group than in the PES and controls. The tear CTGF concentration in PEG and PES patients was found to be significantly higher than the controls. There was no correlation between genetic polymorphisms and tear or aqueous humor CTGF concentrations, total protein concentrations, and CTGF ratio in total protein. There was also no correlation between tear and aqueous humor for these parameters. In this study, many parameters investigated in relation to PES and PEG, such as rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs9402373C/G and CTGF concentration in tear, have been dealt with for the first time and the outputs can guide the future studies. In this study, there were relationships investigated for the first time in the world or Turkey, and the data obtained has a value in bioinformatics. At the same time, biomarkers that could be used for PES and PEG diagnosis can be found and devices can be developed for use in diagnostic laboratories directed to these biomarkers. This project contributes to biomedical engineering with these aspects.

Keywords: Pseudoexfoliation, Glaucoma, Connective tissue growth factor, Genetic, Polymorphism, rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs9402373C/G, rs12526196T/C

TEŞEKKÜR

Bu çalışma bir çok kişinin desteği ve yardımları ile bu hale gelebilmiştir. Öncelikle bana kendi grubunda yer vererek bu fırsatı sağlayan ve birlikte çalışmaya başladığımız günden beri değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Birsen Can Demirdöğen'e çok teşekkür ederim. Tecrübeleri, bilgisi, sabrı ve bilime bakış açısı ile akademik çalışma hayatını benimsememdeki etkisi büyüktür.

Çalışma için gönüllü bulma ve numunelerin toplanması konusunda yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Tarkan Mumcuoğlu'na ve Dr. Öğretim Üyesi Gökhan Özge'ye, Güzel bir laboratuvar ve ortamda çalışma imkanı sunarak ve burs vererek beni destekleyen değerli TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi ailesine,

Sayın tez savunma jüri üyelerim Prof. Dr. Orhan Adalı ve Prof. Dr. Mehmet Mutlu'ya, Çalıştığım projeye (115S360) ve yüksek lisans öğrenimim sırasında bana sağladığı maddi destek için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Teşekkürlerimin en büyüğünü hem arkadaşım hem laboratuvar partnerim olan bu projenin içinde bulunmama ön ayak olarak bana düşündüğümünden çok farklı bir geleceğin kapısını aralayan, çalışmalar esnasında hem fiziksel hem de manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Sinem Demirkaya Budak'a gönderiyorum.

Araştırma hayatımın zorluklarını katlanılabilir kılan, uzakta olsalar da kriz anlarında sakinleşip kafamı toparlamamı ve devam edebilmemi sağlayan, maddi manevi desteklerini ve iyi dileklerini her zaman yanımda hissettiğim ve bana olan güvenlerini her daim gösteren biricik annem ve babama, fikirleri ile değişik bakış açıları kazanmamı sağlayan kardeşim Umut'a her şey için teşekkür ederim. Yaşadığım tüm sıkıntıları her daim yanımda olarak benimle birlikte sırtlayan sevgili Selçuk'a en özel teşekkürlerimi sunuyorum. Bana olan inancı ve gözlerindeki ısrıltı kendimi her daim bir adım ileri taşımamda en büyük motivasyon kaynağım oldu.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
TABLO LİSTESİ	xvii
KISALTMALAR	xxiii
SEMBOL LİSTESİ	xxv
1 GİRİŞ	1
1.1 Psödoeksfoliasyon Sendromu ve Psödoeksfoliyatif Glokom.....	1
1.1.1 PES'in patofizyolojisi	6
1.2 Bağ Dokusu Büyüme Faktörü (Connective Tissue Growth Factor; CTGF)....	9
1.2.1 Genetik polimorfizm ve CTGF proteinini kodlayan gen	11
1.3 Gözyaşı.....	14
1.4 Aköz	18
1.5 Çalışmanın Amacı	18
2 MATERYAL VE METOT	21
2.1 Materyaller	21
2.1.1 Çalışma grubunun oluşturulması ve örneklerin toplanması.....	21
2.1.2 Kullanılan cihazlar	23
2.1.3 Kullanılan malzemeler	23
2.1.4 Primerler.....	24
2.1.5 Eş zamanlı PCR kitleri	24
2.1.6 Kullanılan çözeltiler	25
2.1.6.1 Manuel DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler	25
2.1.6.2 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözelti	25
2.1.6.3 Gözyaşı striplerinden protein ekstraksiyonu için kullanılan çözelti	25
2.2 Genotipleme İçin Kullanılan Metotlar	26
2.2.1 Genomik DNA örneklerinin genotipleme için hazırlanması	26
2.2.1.1 Tam kan örneklerinden insan genomik DNA izolasyonu	26
2.2.1.2 Genomik DNA örneklerinin spektrofotometre ölçümü ile konsantrasyonunun belirlenmesi	28
2.2.1.3 Genomik DNA örneklerinin spektrofotometre ölçümü ile kalitesinin kontrolü	28
2.2.1.4 Genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile kalitesinin kontrolü	29
2.2.2 CTGF rs6918698G/C ve rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmlerinin restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi metodu ile genotiplenmesi.....	30
2.2.2.1 rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizminin genotiplenmesi	32
2.2.2.2 rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizminin genotiplenmesi	36

2.2.3	CTGF rs12526196T/C ve rs9402373C/G tek nükleotit polimorfizmlerinin eş zamanlı PCR metodu ile genotiplenmesi	42
2.2.3.1	rs12526196T/C tek nükleotit polimorfizminin eş zamanlı PCR metodu ile genotiplenmesi	46
2.2.3.2	rs9402373C/G tek nükleotit polimorfizminin eş zamanlı PCR metodu ile genotiplenmesi	48
2.3	Aközde Total Protein ve CTGF Miktar Tayini İçin Kullanılan Metotlar	49
2.3.1	Aközde total protein miktar tayini	49
2.3.2	Aközde CTGF miktar tayini.....	51
2.4	Gözyaşında Total Protein ve CTGF Miktar Tayini İçin Kullanılan Metotlar	54
2.4.1	Gözyaşı striplerinden protein ekstraksiyonu	54
2.4.2	Gözyaşında total protein miktar tayini	55
2.4.3	Gözyaşında CTGF miktar tayini	55
2.5	İstatistiksel analiz	56
3	BULGULAR	59
3.1	Çalışma Grubu.....	59
3.2	Genotiplerin belirlenmesi ve genotip tabloları	60
3.2.1	CTGF rs6918698G/C polimorfizminin genotiplenmesi	60
3.2.2	CTGF rs9399005C/T polimorfizminin genotiplenmesi	63
3.2.3	CTGF rs12526196T/C polimorfizminin genotiplenmesi.....	66
3.2.4	CTGF rs9402373C/G polimorfizminin genotiplenmesi	68
3.2.5	Genotip kombinasyonlarına göre analizler	69
3.3	Gözyaşı ile yapılan analizler	73
3.3.1	Gözyaşında total protein konsantrasyonu	73
3.3.2	Gözyaşında CTGF konsantrasyonu.....	84
3.3.3	Total protein içindeki CTGF oranı (%)	88
3.4	Aköz ile yapılan analizler.....	92
3.4.1	Aközde total protein konsantrasyonu.....	93
3.4.2	Aközde CTGF konsantrasyonu	99
3.4.3	Total protein içindeki CTGF oranı (%).....	105
3.5	Korelasyon analizleri.....	115
3.5.1	Gözyaşında CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu	115
3.5.2	Aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu	121
3.5.3	Gözyaşı ve aközdeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu.....	122
3.6	Lojistik regresyon analizleri	127
3.6.1	Model 1 – Tüm popülasyon-Resesif Genetik Model	128
3.6.1.1	Model 1.1 PES-Kontrol.....	129
3.6.1.2	Model 1.2 PEG-Kontrol	129
3.6.2	Model 2 – Tüm popülasyon-Dominant Genetik Model	130
3.6.2.1	Model 2.1 PES-Kontrol.....	130
3.6.2.2	Model 2.2 PEG-Kontrol	130
3.6.3	Model 3 – Gözyaşı-Resesif Genetik Model	131
3.6.3.1	Model 3.1 PES-Kontrol.....	131
3.6.3.2	Model 3.2 PEG-Kontrol	131
3.6.4	Model 4 – Gözyaşı-Dominant Genetik Model.....	132
3.6.4.1	Model 4.1 PES-Kontrol.....	132
3.6.4.2	Model 4.2 PEG-Kontrol	133
4	TARTIŞMA	136

4.1 Demografik özellikler	136
4.2 Genotip analizleri	139
4.2.1 CTGF rs6918698G/C	140
4.2.2 CTGF rs9399005C/T	141
4.2.3 CTGF rs12526196T/C	142
4.2.4 CTGF rs9402373C/G	143
4.2.5 Genotip kombinasyonları	144
4.3 Gözyaşı örnekleri ile yapılan analizler	145
4.4 Aköz örnekleri ile yapılan analizler	149
5 SONUÇ ve ÖNERİLER.....	154
KAYNAKLAR	158
EKLER.....	172
ÖZGEÇMİŞ.....	196



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 :	Lens üzerinde psödoeksfolyasyon görünümü..... 2
Şekil 1.2 :	Sağlıklı bir gözde aköz üretimi ve hareketi..... 3
Şekil 1.3 :	Sağlıklı ve glokomlu gözdeki aköz sıvısı hareketleri..... 3
Şekil 1.4 :	a. İnsan CTGF proteininin aminoasit dizisi. b. CTGF proteininin 3 boyutlu yapısı..... 9
Şekil 1.5 :	CCN protein ailesinin yapısal olarak şematik temsili gösterimi..... 10
Şekil 1.6 :	CTGF domainleri, aktive edici faktörler, bağlandığı moleküller ve hücrese etkileri..... 12
Şekil 1.7 :	İnsan 6. kromozomunun diyagramı ve CTGF geninin lokasyonu..... 12
Şekil 1.8 :	CTGF geninin temsili yapısı..... 13
Şekil 2.1 :	İzole edilmiş DNA örneklerinin %0.5'lik agaroz jelde görüntülenmesi..... 31
Şekil 2.2 :	CTGF geninin rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgesinin sekansı..... 32
Şekil 2.3 :	CTGF rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü..... 35
Şekil 2.4 :	CTGF rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmi için RFLP ile homozigot yabancı tip (GG) genotipe sahip olduğuna karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürününün sekans görüntüsü..... 38
Şekil 2.5 :	CTGF rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmi için RFLP ile homozigot polimorfik (CC) genotipe sahip olduğuna karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürününün sekans görüntüsü..... 39
Şekil 2.6 :	CTGF geninin rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgesinin sekansı..... 37
Şekil 2.7 :	CTGF rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü..... 41
Şekil 2.8 :	CTGF rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmi için RFLP ile homozigot yabancı tip (CC) genotipe sahip olduğuna karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürününün sekans görüntüsü..... 43
Şekil 2.9 :	CTGF rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmi için RFLP ile homozigot polimorfik tip (TT) genotipe sahip olduğuna

	karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürününün sekans görüntüsü.....	44
Şekil 2.10 :	Applied Biosystems, StepOnePlus Real-Time PCR Sistemleri ve cihaza uygun 96 kuyucuklu plaka.....	45
Şekil 2.11 :	TaqMan problemlerin ve ileri/geri primerlerin genomik DNA'ya bağlanması ve amplifikasyon sırasında boyanın ayrılıp ışığa vermesi.....	46
Şekil 2.12 :	a. FAM boyalı proba uygun alel olduğundaki eğri. b. Her iki boyanın da olduğu problemlere uygun alellere olduğundaki eğri. c. VIC boyalı proba uygun alel olduğundaki eğri.....	47
Şekil 2.13 :	Bradford kiti kullanılarak hazırlanan plaka ve konsantrasyonlara göre renk değişimi.....	50
Şekil 2.14 :	Aköz örneklerinde total protein ölçümü için kullanılan Bradford yöntemi sonucu elde edilen standart eğri ve bu eğri üzerinde örneklerin gösterimi.....	51
Şekil 2.15 :	a. ELISA plakasında substrat ile inkübe edilmiş standart ve örneklerin görüntüsü. b. a'daki kuyucukların üzerine stop solüsyonu eklendiğinde görülen renk değişimi.....	53
Şekil 2.16 :	Aköz örneklerinde CTGF konsantrasyonu ölçümü için kullanılan ELISA yöntemi sonucu elde edilen standart eğri ve bu eğri üzerinde örneklerin gösterimi.....	54
Şekil 2.17 :	Gözyaşı örneklerinde CTGF konsantrasyonu ölçümü için kullanılan ELISA yöntemi sonucu elde edilen standart eğri ve bu eğri üzerinde örneklerin gösterimi.....	56
Şekil 3.1 :	CTGF rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgenin optimize edilmiş koşullarda elde edilen PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	61
Şekil 3.2 :	CTGF rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon endonükleaz reaksiyonu sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	62
Şekil 3.3 :	CTGF rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgenin optimize edilmiş koşullarda elde edilen PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	64
Şekil 3.4 :	CTGF rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon endonükleaz reaksiyonu sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	65
Şekil 3.5 :	CTGF rs12526196T/C bölgesine ait bir alelik ayırma grafiğinde örneklerin genotiplerine göre gösterimi.....	67
Şekil 3.6 :	CTGF rs9402373C/G bölgesine ait bir alelik ayırma grafiğinde örneklerin genotiplerine göre gösterimi.....	68
Şekil 3.7 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu.....	78
Şekil 3.8 :	CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde total protein konsantrasyonu.....	82
Şekil 3.9 :	PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre total protein konsantrasyonu.....	83

Şekil 3.10 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.....	85
Şekil 3.11 :	CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde CTGF konsantrasyonu.....	89
Şekil 3.12 :	PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre CTGF konsantrasyonu.....	90
Şekil 3.13 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerinde CTGF'nin total proteine oranı.....	91
Şekil 3.14 :	CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı.....	95
Şekil 3.15 :	PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre total protein içindeki CTGF oranı.....	96
Şekil 3.16 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu.....	97
Şekil 3.17 :	CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz örneklerinde total protein konsantrasyonu.....	102
Şekil 3.18 :	PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre total protein konsantrasyonu.....	103
Şekil 3.19 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.....	104
Şekil 3.20 :	CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz humor örneklerinde CTGF konsantrasyonu.....	108
Şekil 3.21 :	PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz humor örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre CTGF konsantrasyonu.....	109
Şekil 3.22 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerinde CTGF'nin total proteine oranı.....	110
Şekil 3.23 :	CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz humor örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı.....	114
Şekil 3.24 :	PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz humor örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre total protein içindeki CTGF oranı.....	115

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 :	CTGF rs6918698G/C ve rs9399005C/T SNP'lerini içeren bölgelerin çoğaltılmasında kullanılacak olan ileri ve geri primer dizileri..... 24
Tablo 2.2 :	TaqMan SNP genotipleme kitlerinin TaqMan assay numaraları. 24
Tablo 2.3 :	CTGF geninde çalışılan polimorfizmler, amplifikasyon bölgeleri, PCR ürün boyutları ve restriksiyon endonükleazları. 31
Tablo 2.4 :	rs6918698G/C bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR karışımı..... 33
Tablo 2.5 :	rs6918698G/C SNP bölgesinin PCR'ında kullanılan termal döngü programı. 33
Tablo 2.6 :	rs6918698G/C polimorfizmi için restriksiyon endonükleaz reaksiyonu karışımı bileşenleri. 35
Tablo 2.7 :	rs9399005C/T bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR karışımı..... 37
Tablo 2.8 :	rs9399005C/T SNP bölgesinin PCR'ında kullanılan termal döngü programı. 40
Tablo 2.9 :	rs9399005C/T polimorfizmi için restriksiyon endonükleaz reaksiyonu karışımı bileşenleri. 41
Tablo 2.10 :	Çalışılan SNP bölgelerine göre FAM ve VIC boyaalarının temsil ettiği aleller..... 45
Tablo 2.11 :	Eş zamanlı PCR için reaksiyon karışımı içerikleri. 48
Tablo 2.12 :	rs12526196T/C bölgesinin eş zamanlı PCR döngüsü..... 48
Tablo 2.13 :	Eş zamanlı PCR için reaksiyon karışımı içerikleri. 49
Tablo 2.14 :	rs9402373C/G bölgesinin eş zamanlı PCR döngüsü. 49
Tablo 3.1 :	PES hastası, PEG hastası ve kontrol bireylerin demografik bilgileri..... 59
Tablo 3.2 :	PEG hastaları, PES hastaları ve kontrol bireylerin CTGF rs6918698G/C için genotip ve alel frekansları. 63
Tablo 3.3 :	PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin CTGF rs9399005C/T genotip ve alel frekansları. 66
Tablo 3.4 :	PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin CTGF rs12526196T/C genotip ve alel frekansları..... 67
Tablo 3.5 :	PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin CTGF rs9402373C/G genotip ve alel frekansları. 69
Tablo 3.6 :	İkişerli SNP bölgesi genotiplerinin birbiri ile kombinasyonuna göre genotip frekansları. 70

Tablo 3.7 :	CTGF rs6918698, rs9399005 ve rs12526196 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler. ...	74
Tablo 3.8 :	CTGF rs6918698, rs9399005 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler. ...	75
Tablo 3.9 :	CTGF rs6918698, rs12526196 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler. ...	76
Tablo 3.10 :	CTGF rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler. ...	77
Tablo 3.11 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu.	78
Tablo 3.12 :	Çalışma grubunun gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonunun farklı CTGF genotiplerine göre karşılaştırılması.	79
Tablo 3.13 :	CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu.	80
Tablo 3.14 :	rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu. ...	80
Tablo 3.15 :	CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu.	81
Tablo 3.16 :	CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu.	81
Tablo 3.17 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.	84
Tablo 3.18 :	Çalışma grubunun gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonunun farklı CTGF genotiplerine göre karşılaştırılması.	85
Tablo 3.19 :	CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.	86
Tablo 3.20 :	CTGF rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.	86
Tablo 3.21 :	CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.	87
Tablo 3.22 :	CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.	88
Tablo 3.23 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerinde CTGF'nin total proteine oranı	88
Tablo 3.24 :	Çalışma grubunun gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranlarının farklı CTGF genotiplerine göre karşılaştırılması.	92
Tablo 3.25 :	CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı	93

Tablo 3.26 :	CTGF rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı.....	93
Tablo 3.27 :	CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı.....	94
Tablo 3.28 :	CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı.....	94
Tablo 3.29 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu.....	95
Tablo 3.30 :	Çalışma grubunun aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonunun farklı CTGF genotiplerine göre karşılaştırılması.....	96
Tablo 3.31 :	CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu.....	99
Tablo 3.32 :	CTGF rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu.....	99
Tablo 3.33 :	CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu.....	100
Tablo 3.34 :	CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu.....	100
Tablo 3.35 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.....	103
Tablo 3.36 :	Çalışma grubunun aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonunun farklı CTGF genotiplerine göre karşılaştırılması.....	104
Tablo 3.37 :	CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.....	105
Tablo 3.38 :	CTGF rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.....	105
Tablo 3.39 :	CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.....	106
Tablo 3.40 :	CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.....	106
Tablo 3.41 :	PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerinde CTGF'nin total proteine oranı.....	107
Tablo 3.42 :	Çalışma grubunun aköz örneklerinde total protein içindeki CTGF oranlarının genotiplere göre karşılaştırılması.....	110

Tablo 3.43 :	CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı	111
Tablo 3.44 :	CTGF rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı.	111
Tablo 3.45 :	CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı.	112
Tablo 3.46 :	CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı Error! Bookmark not defined.	112
Tablo 3.47 :	Gözyaşında CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu	117
Tablo 3.48 :	PEG hastalarının gözyaşında CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.....	118
Tablo 3.49 :	PES hastalarının gözyaşında CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.....	119
Tablo 3.50 :	Kontrol grubunun gözyaşında CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.....	120
Tablo 3.51 :	Aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.	123
Tablo 3.52 :	PEG hastalarının aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.....	124
Tablo 3.53 :	PES hastalarının aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.....	125
Tablo 3.54 :	Kontrol grubunun aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.....	126
Tablo 3.55 :	Gözyaşı ve aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu.	127
Tablo 3.56 :	MODEL 1.2 - 213 PEG ile 215 kontrolden oluşan grupta cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı, inme, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklenerek oluşturulan resesif genetik modele göre yapılan analizler ...	129
Tablo 3.57 :	MODEL 2.2 - 213 PEG ile 215 kontrolden oluşan grupta cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı, inme, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklenerek oluşturulan dominant genetik modele göre yapılan analizler	131

Tablo 3.58 :	MODEL 3.2 - 77 PEG ile 76 kontrolden oluşan grupta total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı, inme, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklenerek oluşturulan resesif genetik modele göre yapılan analizler.....	132
Tablo 3.59 :	MODEL 4.1 - 77 PES ile 76 kontrolden oluşan grupta total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı, inme, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklenerek oluşturulan dominant genetik modele göre yapılan analizler.....	133
Tablo 3.60 :	MODEL 4.2 - 77 PEG ile 76 kontrolden oluşan grupta total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı, inme, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklenerek oluşturulan dominant genetik modele göre yapılan analizler.....	134
Tablo 4.1 :	Bazı ülkelerde yaş gruplarına göre PES görülme sıklığı.	137
Tablo 4.2 :	Türkiye’de yaş gruplarına göre PES görülme sıklığı.....	138
Tablo 4.3 :	Farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda CTGF rs6918698G/C polimorfik alel C frekansları.....	141
Tablo 4.4 :	Farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda CTGF rs9399005C/T polimorfik alel T frekansları.....	142
Tablo 4.5 :	Farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda CTGF rs12526196T/C polimorfik alel frekansları.....	143
Tablo 4.6 :	Farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda CTGF rs9402373 polimorfik alel frekansları.....	144
Tablo EK 2 :	213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri.....	176
Tablo EK 3.1 :	PEG hastalarının gözyaşı ve aközlerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu	193
Tablo EK 3.2 :	PES hastalarının gözyaşı ve aközlerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu	194
Tablo EK 3.3 :	Kontrollerin gözyaşı ve aközlerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu	194

KISALTMALAR

PES	: Psödoeksfoliasyon Sendromu
PEG	: Psödoeksfoliyatif Glokom
CTGF	: Bağ Doku Büyüme Faktörü (Connective Tissue Growth Factor)
LOXL	: Lizil Oksidaz-benzeri (Lysyl Oxidase-like)
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)
Cyr61	: Sisteince zengin protein 61 (Cystein Rich Protein)
NOV	: Aşırı nefroblastom ifade edilen gen (Nephroblastoma Overexpressed Gene)
CCN	: <u>C</u> yr61, <u>C</u> TFG, <u>N</u> OV
IGFBP	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlama Proteini (Insulin-like Growth Factor Binding Protein)
VWC	: Von Willebrand Faktörü Tip C
TSP	: Thrombospondin
CT Domain	: Karboksi Terminal Domaini
LRP	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör İlişkili Protein (Low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein)
FGFR2	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (Fibroblast Growth Factor Receptor 2)
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
gMAF	: Global Minör Alel Frekansı
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
Ig	: İmmüoglobulin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RT PCR	: Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction)
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asidik Asit
UV	: Ultraviyole
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
EtBr	: Etidyum Bromür
Taq	: Thermus aquaticus
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
MgCl₂	: Magnezyum Klorür

SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler Açıklama

°C	Santigrat derece
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
pg	Pikogram
L	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
pmol	Pikomol
%	Yüzde
‰	Binde
±	Artı eksi

1 GİRİŞ

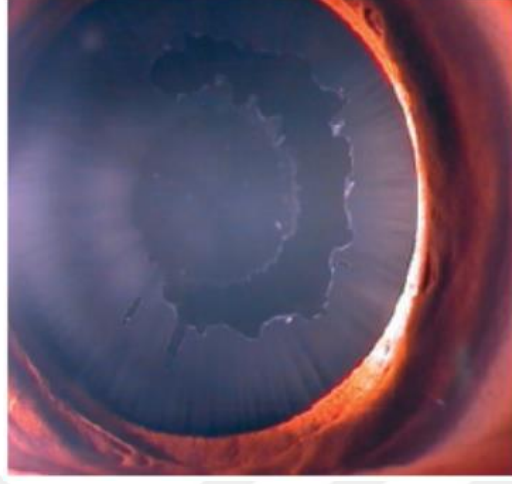
1.1 Psödoeksfoliasyon Sendromu ve Psödoeksfolyatif Glokom

Psödoeksfoliasyon Sendromu (PES) körlüğe neden olabilecek, yaşa bağlı olarak gelişen oldukça ciddi bir hastalıktır. Bu hastalıkta göz dokularının hücre dışı matriksinde lifsi materyallerin birikimi gerçekleşir. Psödoeksfoliasyon birikiminin gözün ön segmentindeki tüm dokuları tutmasının yanında lens epiteli, trabeküler ağ, iris, silier proses, konjonktiva ve perioküler dokuların da bu lifsi materyali içerdiği gösterilmiştir (Richardson ve diğ., 1981; Schlotzer ve diğ., 1991). PES sistemik bir hastalıktır çünkü göz dokularında gerçekleşen madde birikimi deri, aort, beyin, kalp, böbrek gibi birçok dokuda da gözlenmektedir (Schlötzer-Schrehardt ve diğ., 1992; Streeten ve diğ., 1992). Epidemiyolojik çalışmalara göre PES; koroner damar hastalıkları (Andrikopoulos ve diğ., 2009; Citirik ve diğ., 2007; Demir ve diğ., 2011; Mitchell ve diğ., 1997; Wang ve diğ., 2014), hipertansiyon (Katsi ve diğ., 2013), serebrovasküler hastalıklar (Repo ve diğ., 1995; Ritland ve diğ., 2004; Yuksel ve diğ., 2006), abdominal aortik anevrizma (Djordjevic-Jocic ve diğ., 2012; Schumacher ve diğ., 2001), periferel vasküler hastalıklar (Praveen ve diğ., 2011), renal arter stenozu (Gönen ve diğ., 2013), erektil fonksiyon bozuklukları (Gökçe ve Gökçe, 2015), Alzheimer benzeri demans (Linner ve diğ., 2001; Cumurcu ve diğ., 2013), sensorinöral duyma kaybı (Cahill ve diğ., 2002; Yazdani ve diğ., 2008) ve pelvik organ prolapsusu (Wiostko ve diğ., 2016) gibi hastalıkların riskini de artırmaktadır.

Psödoeksfoliasyon birikimi görme kaybı başlayana dek birey tarafından farkedilemez, ancak uzman bir göz hekimi tarafından biyomikroskop ile muayene edilirse tespit edilebilir. Lens üzerinde ve pupil kenarında depolanan beyaz-gri renkli psödoeksfoliasyon materyalinin görülmesi en önemli tanı kriteridir (Şekil 1.1). Bireyin görüş alanında daralma hissettirecek şekilde ilerlemiş olan birikimin tedavisi yoktur.

Klinik olarak kullanılmaya başlanmış olmasa da yakın zamanda Güngör ve ekibi tarafından tek gözü PES'li tek gözü sağlıklı bireylerde yapılan araştırmada, sağlıklı

gözde alt açıda pigmentasyon ve Sampaolesi çizgisi görülmesi PES ile ilişkili erken bulgular olarak saptanmıştır (Güngör, 2017).



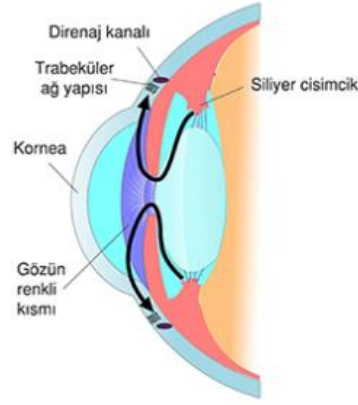
Şekil 1.1 : Lens üzerinde psödoeksfoliyasyon görünümü (Yüksel, 2015).

PES ilk olarak 1917 yılında Lindberg tarafından tanımlanmıştır ve şu an tüm dünyada yaygın bir göz hastalığıdır. Yapılan çalışmalar sonucu psödoeksfoliyatif materyal birikiminin ve toplumda PES görülme sıklığının yaşa bağlı olarak arttığı görülmüştür (Mitchell ve diğ., 1999). Ancak farklı topluluklarda değişik sıklıklarda görüldüğü belirlenmiştir (Ringvold ve diğ., 1999). Bu hastalığın görülme sıklığı coğrafik, etnik ve ırksal varyasyon göstermektedir. Eskimolar ve Hintliler arasında, Almanya, İngiltere, Avusturya, Japonya, Danimarka ve İsviçre’de PES görülme sıklığı 70 yaş üstü kişilerde %6’nın altında kalacak kadar düşüktür. Öte yandan İzlanda, Finlandiya, Rusya, Tunus, Suudi Arabistan, İsveç, Norveç, Yunanistan ve Türkiye’de PES görülme sıklığı genellikle %15’in üstündedir (Forsius, 1988; Ringvold, 1999).

Türkiye’de PES görülme oranı 40 yaş üzerinde %11.3 (İskeleli, 1978), 50 yaş üzerinde %18.2 (Örgen, 1949), Ankara’da 40 yaş üzerinde %12.8 (İrkeç, 1979), Karadeniz bölgesinde %16.5 (Arıtürk ve diğ., 2005), Orta Karadeniz’de %12.2 (Cumurcu ve diğ., 2010), Doğu Akdeniz bölgesinde 60 yaş üstünde %11.2 (Yalaz ve diğ., 1992), İstanbul’da %11 (Alpay ve diğ., 1989) olarak tespit edilmiştir.

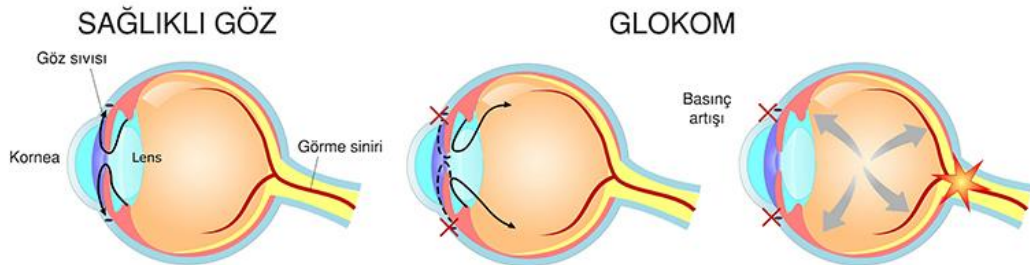
Göz, ön ve arka segment olarak iki bölümden oluşur (Şekil 1.2). Bu iki bölümü birbirinden ayıran ise lenstir. Ön segment de yine iki bölümden oluşur; bunlar ön ve arka kamaradır. Bu iki bölümü iris dediğimiz gözün renkli tabakası ayırır. Ön

kamaranın önünde kornea bulunur. Bu bölüm aköz denilen su gibi bir sıvı ile doludur. Aköz sıvısı olarak bilinen göz içi sıvısı lensin bağlantı noktalarının yakınındaki silier cisimden salgılanır, lensin ön yüzeyinden akarak ön kamaraya gelir. Burada lens ve korneanın beslenmesinde görev alır. Ayrıca gözün şeklini oluşturacak basıncın oluşmasında da rolü vardır. Bu basınca göz içi basıncı denir. Bu basıncın belli sınırlar içinde korunması sağlıklı görmenin devam ettirilebilmesi için şarttır (Yalvaç ve Önal, 2001).



Şekil 1.2 : Sağlıklı bir gözde aköz üretimi ve hareketi (Url-1).

Üretilen göz içi sıvısı göz bebeğinden ön tarafa gelip iris ile korneanın birleşim yerindeki açıda trabeküler ağ denilen yapıdan süzülür. Devamlı bir sıvı döngüsü vardır. Bu döngü, göz bebeğinden geçiş esnasında ya da trabeküler ağ ve sonrasında engellenecek olursa göz içi basıncı yükselmeye başlar. Bu duruma glokom adı verilir. Artan basınç görme sinirinin göze giriş yerine baskı yaparak sinirleri öldürür (Yalvaç ve Önal, 2001) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 : Sağlıklı ve glokomlu gözdeki aköz sıvısı hareketleri (Url-1).

Optik sinir denilen görme sinirinin içinde ortalama 800 bin ile 1.2 milyon arası tel lif bulunmaktadır (Yalvaç ve Önal, 2001). Görmemizi sağlayan mesajlar beyne bu lifler tarafından iletilmektedir. Glokom bu liflere zarar vererek görme alanımızda kör noktaların oluşmasına neden olmaktadır. İnsanlar bu kör noktaları çok ileri seviyelere ulaşana dek fark etmemektedir. Tüm sinir hasar görünce körlük meydana gelir.

Aköz hümör sıvısı göz içinde sürekli devridaim halindedir. Ancak psödoeksfoliasyon birikimi aközün boşaltılmasını sağlayan Schlemm kanallarını tıkayarak göz içi basıncının artmasına neden olmaktadır. Böylelikle glokom ortaya çıkabilir (Ritch ve Schlötzer-Schrehardt, 2001). Göz içindeki basınç 10-20 mm Hg arasında normal kabul edilir. 20 mm Hg ve üzerindeki değerler glokom şüphesi olarak değerlendirilir. Göz içi basıncı yüksek bulunan her hastada glokom hastalığı gelişmez. Bazı insanlar yüksek göz içi basıncını daha iyi tolere edebilirler. Belirli bir göz içi basıncı bir kişi için yüksek iken aynı derecede yükseklik bir diğeri için normal olabilir. Glokom hastalığının gelişip gelişmeyeceği optik sinirin zarar görmeden tolere edebileceği göz içi basıncının derecesine bağlıdır. Bu sınır değer herkes için farklıdır. Bu bireysel farklılıklara da ileriki bölümlerde anlatılacak olan tek nükleotit polimorfizmleri sebep oluyor olabilir.

Psödoeksfoliasyon tüm dünyada glokomun en sık görülen nedenlerinden biridir ve bu tip glokoma psödoeksfolyatif glokom (PEG) adı verilir. Glokom halk arasında göz tansiyonu adıyla bilinir ve milyonlarca insanı etkileyen yaygın bir göz hastalığıdır. Önlem alınmazsa görme kaybına neden olabilmektedir çünkü göz içinde basıncın yükselmesi göz siniri hücrelerinin beslenmesini etkileyerek bu hücrelerin hasar görüp ölmesine neden olmaktadır. Hücreler öldükçe çevreden merkeze doğru bir görme kaybı başlar ve hücrelerin tümü öldüğü zaman kalıcı tam görme kaybı oluşur.

Glokom gelişme riski psödoeksfoliasyon bulunan gözlerde oldukça yüksektir (Mitchell ve diğ., 1999). Gözlerden birinde glokom, diğeri ise sadece PES olduğu durumlarda, PES'li gözde beş yıl içinde glokom gelişme riski %50'dir (Yalvaç ve Önal, 2001). Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre kataraktan sonra körlüğe neden olan ikinci sebep glokomdur (Resnikoff ve diğ., 2004). Geri döndürülemez körlüğün ise ana nedeni glokomdur. 2010 yılında glokomun tüm dünya çapındaki körlük nedenlerinin %8'ini oluşturduğu tespit edilmiştir (King ve diğ., 2013). Dünya 6.6 milyon kişi glokom nedeniyle görme yetisini kaybetmiştir. Yapılan araştırmalara göre

2020 yılında tüm dünyada yaklaşık 80 milyon insanı etkileyecektir. PEG, tüm glokomların yaklaşık %25'ini oluşturur (Schlötzer-Schrehardt ve diğ., 2002). Türkiye'de PES olan hastalarda glokom görülme sıklığı %34.3, glokom hastalarında PES sıklığı ise %46.9 olarak saptanmıştır (Yalaz ve diğ., 1992).

PES klinik olarak tespit edilebilir aşamaya geldiğinde epey ilerlemiş psödoeksfoliasyon birikimi bulunmaktadır. Bu nedenle bir PES hastası, ileri derecede glokom gelişip görme kaybı başlayana kadar hastalığını fark etmeyebilir. Hastalığın başlangıcında görme duyusunda bir kayıp hissedilmediği için hastalık fark edilmez, ancak hastalığın ilerlemesi ile öncelikle çevredeki görme alanı daralır ve zamanla tüm görüş açısı kaybedilmeye başlanır. ABD'de yapılan bir araştırmaya göre ABD'de 2.2 milyon glokom hastası vardır; ancak bunların yalnızca yarısı glokom olduğunu bilmektedir (The Eye Diseases Prevalence Research Group, 2004). Glokomlu hastalarda görme kaybı meydana geldikten sonra geriye dönük tedavi mümkün değildir. Ancak tanı konulduktan sonra ilerlemesi durdurulabilir.

Psödoeksfoliasyon hastalarının rutin kontrollerinin sık ve düzenli bir şekilde yapılması göz içi basıncının kontrol altında tutulması ve görme kaybının önüne geçilebilmesi açısından çok önemlidir. Bu hastalarda gün içindeki göz içi basıncı da düzensizdir. Kontroller arası sürede bile hastaların göz içi basıncı birkaç kez 20 mmHg'nın üstüne çıkmış olabilir. Tüm PES hastalarında glokom gelişmemektedir ancak glokom yatkınlığı olan PES hastalarının erken teşhisinde kullanılan bir parametre de bulunmamaktadır. Bu nedenle PES hastalarından PEG oluşturmaya yatkın olanların tespit edilmesini sağlayacak objektif parametrelerin bulunması gerekliliği doğmuştur. Bu sayede glokom yatkınlığı olan kişilerde göz içi basıncı göz sinirine zarar vermeden önce tedbir alınabilir; rutin kontroller sıklaştırılabilir ve glokom tedavisine daha erken başlanabilir. Glokoma yatkın kişilerde piyasada bulunan gün içinde sürekli göz tansiyonu ölçümü yapan ve bu verileri kablosuz olarak takip sistemine aktaran lensler kullanılarak daha etkin bir kontrol sağlanabilir. Çünkü göz içi basıncı bir çok faktörden etkilenecek gün içinde bile artış ve düşüş gösterebilir (Url-2).

Psödoeksfoliasyon sendromunun kesin tedavisi henüz yoktur. Psödoeksfoliasyon materyalinin emilerek temizlenmesini sağlayan operasyonlar sonrasında aynı patolojik birikimlerin yeniden oluştuğu gözlenmiştir (Jacobi ve diğ., 1999). Glokom durumunda ise görme kaybı veya sinirlerin aldığı hasar geri döndürülememektedir, tedavi olarak

sadece gözdeki basıncın düşürülmesi hedeflenmektedir. Glokomda tedavi yöntemleri arasında göz damlaları ve ilaç tedavisi, lazer tedavileri ve cerrahi yöntemler bulunmaktadır. Damlaların aksatılmadan doktor tavsiyesine uygun olarak düzenli kullanılması şarttır, buna rağmen basıncı dengelemede yetersiz kalabilirler. Lazer tedavisinde drenaj kanalları gerilerek biriken sıvının boşaltılması hedeflenir ancak bunun da etki süresi en fazla 2-3 yıldır. Cerrahi operasyonlarda ise trabeküler ağın bir kısmı alınarak sıvının akışı kolaylaştırılır ancak katarakt oluşumuna neden olma riski vardır. Bazı durumlarda lazer tedavisi veya cerrahi operasyon sonrası bile düzenli ilaç kullanımına devam etmek gerekmektedir. Bu yöntemler başarılı olsa bile en fazla hastalığın ilerlemesini durdurabilirler, hastanın kaybedilmiş görme kaybı geri kazandırılmaz (Bhat, 2010). Bunlara ek olarak, psödoeksfoliasyon materyali yalnızca oküler dokularda değil, kalp, akciğer, karaciğer, safra kesesi, atardamarlar gibi hemen hemen tüm organ ve dokularda birikim yaparak zarar verir (Schlötzer-Schrehardt ve diğ., 1992; Streeten ve diğ., 1992). Örneğin aort damarında birikim yaparak anevrizmaya, kulakta ise işitme kaybına neden olabilmektedir (Samarai ve diğ., 2012). Yapılan çalışmalar ilerleyen yaşın glokom için büyük bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (Giangiacomo ve Coleman, 2009). Gelişen bilim ve teknoloji ile toplumların yaş ortalamasının gittikçe arttığı göz önüne alındığında, PES ve PEG'in gelecekte daha sık görülmesi beklenebilir.

Bunlara ek olarak, PES'in neden olduğu tek hastalık glokom değildir, aynı zamanda sekonder katarakta da sebep olabilmektedir (Kuchle ve diğ., 1997). PES'in karakteristik özelliği olan patolojik birikimler fakodonezis, melanin dispersiyonu, yetersiz midriyazis, kan aköz bariyeri disfonksiyonu gibi birçok göz içi komplikasyona zemin hazırlamaktadır. Bu birikimler PES hastalarının göz içi operasyonu ile ilişkili olarak ortaya çıkan lens zonüllerinde kopma, arka kapsül rüptürü ile vitreus kaybı, iris kaynaklı göz içi kanaması, kornea endotel yetmezliği, postoperatif enflamasyon ve göz içi basınç yükselmeleri ve intraoküler lensin lüksasyonu gibi birçok komplikasyonun da nedenidir (Naumann ve diğ., 1998; Schlötzer-Schrehardt ve Naumann, 2006).

1.1.1 PES'in patofizyolojisi

Psödoeksfolyatif birikim hücre dışı matriksteki elastik lifsi materyalleri içermesi ile karakterizedir. Bu durum bu materyallerin ya çok fazla üretilmesi, ya yetersiz yıkıma

uğraması ya da her ikisinin birden gerçekleşmesi ile ortaya çıkar. PES patogeneğinde elastik mikrofibril teorisi immünohistokimyasal, biyokimyasal ve moleküler biyolojik veriler ile desteklenmektedir (Streeten ve diğ., 1986). Bu birikimin içinde elastin, tropoelastin, vitronektin, fibrillin-1, fibulin-2, sindekan, versikan gibi moleküllerin yanı sıra, çapraz bağlayıcı enzim lizil oksidaz-benzeri (LOXL) ve ekstrasellüler şaperon clusterin de bulunmaktadır (Ritch, 2008).

Genetik ve çevresel faktörler psödoeksfolyasyon sendromunun patofizyolojisinde rol almaktadır. Genetik faktörler, hücre dışı matriksin yapımı ve yıkımından sorumlu bazı proteinlerin genlerindeki bozukluklarla ilgili olabilir. Bu konseptte düşünüldüğünde büyüme faktörleri, oksidatif stresi düzenleyici proteinler, proteinlerin doğru katlanmasından sorumlu şaperonlar ve bunların etkileştiği proteinler akla gelmektedir.

LOXL enzimleri kolajen ile elastini çapraz bağlayarak elastik liflerin oluşumu, stabilizasyonu, yeniden modellenmesi ve dokuların esnekliklerinin yaşa bağlı olarak azalmasının önlenmesi gibi önemli fonksiyonlardan sorumlu bir enzim ailesidir. Bu ailenin bir üyesi olan LOXL1 enzimini kodlayan gendeki polimorfizmler İzlandalılar, İsveçliler (Thorleifsson ve diğ., 2007), Amerikalı beyazlar (Challa ve diğ., 2008), Amerika ve Avrupalılar (Aragon-Martin ve diğ., 2008; Yang ve diğ., 2007), Hintliler (Ramprasad ve diğ., 2008), Avustralyalılar (Hewitt ve diğ., 2008), Almanlar, İtalyanlar (Pasutto ve diğ., 2008), Japonlar (Hayashi ve diğ., 2008; Ozaki ve diğ., 2008), Çinliler (Chen ve diğ., 2009), Güney Afrikalılar (Williams ve diğ., 2010) ve Türkler (Tuncay ve diğ., 2016; Yılmaz ve diğ., 2016) gibi birçok farklı popülasyonda PES ve/veya PEG ile ilişkili bulunmuştur. Ancak daha önce bahsedildiği gibi PES hastalarının glokom yatkınlığının belirlenmesi oldukça önemlidir ve LOXL1 genetik polimorfizmleri ile bu ayırım yapılamamaktadır (Anastasopoulos ve diğ., 2014).

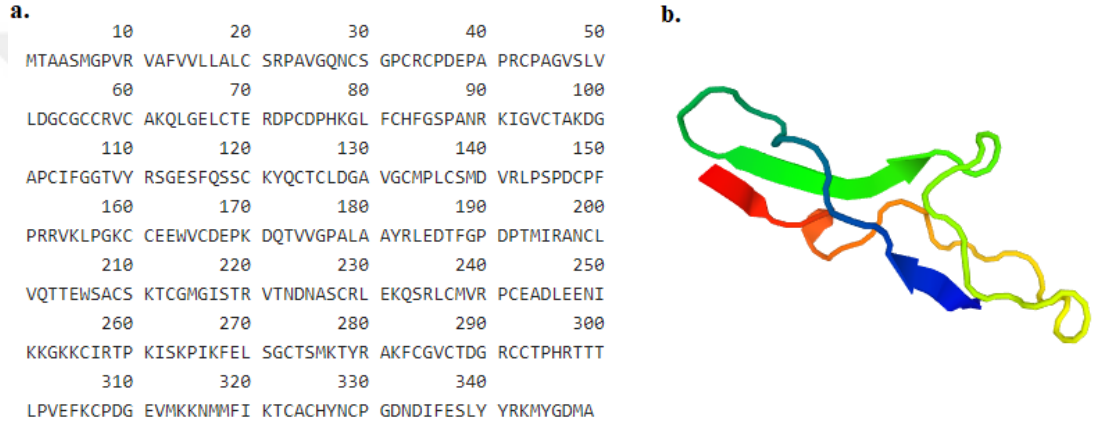
PES'e sebep olan diğer faktörler arasında ultraviyole ışığa maruziyet, bulaşıcı ajanlar, beslenme, travma ve inflamasyon yer almaktadır (Schlötzer-Schrehardt, 2012). Yapılan araştırmalara göre matriks metalloproteinazları ile bunların doku inhibitörü arasındaki dengedeki lokal değişiklik, interlökin-6 gibi pro-fibrotik sitokinler, büyüme faktörleri, özellikle transforme edici büyüme faktörü (TGF- β 1), yükselmiş hücresel ve oksidatif stres de bu patogeneşte rol oynuyor olabilir (Gartaganis ve diğ., 2002; Schlötzer-Schrehardt ve Naumann, 2006; Gartaganis ve diğ., 2007; Schlötzer-Schrehardt, 2009). PES'in patofizyolojisinde elastik mikrofibrillerin fazla üretilmesi

önemli bir yer tuttuğu için büyüme faktörlerinin patofizyolojide önemli yeri olabileceği düşünülmüştür. Çünkü hem TGF- β 1 hem de TGF- β 2'nin elastik mikrofibrillerin üretilmesi dahil olmak üzere hücre dışı matriks bileşenlerinin ifadesinde rolü olduğu bilinmektedir (Gayathri ve diğ., 2016). Gözün ön kamarasında aköz humorde CTGF'nin bulunduğu gösterilmiştir (van Setten ve diğ., 2002). Aynı bölümde TGF- β 1'in de bulunduğu ve PES'de TGF- β 1 ifadesinin normalden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Koliakos ve diğ., 2001). CTGF ifadesinin TGF- β tarafından indüklendiği bilinmektedir ve bu iki protein birbirleriyle etkileşerek proliferasyon, migrasyon ve hücre dışı matriks yapımı gibi fonksiyonları yerine getirirler (Kothapalli ve diğ., 2000, Weston ve diğ., 2003). CTGF'nin fibrillin proteininin ifadesini arttırarak etki ettiği düşünülmektedir. Browne ve grubunun çalışmasında hücre kültüründe büyütülen trabeküler ağ hücreleri rekombinant CTGF'ye maruz bırakılmış, sonuçta bu hücrelerde fibrillin ifadesinin arttığı gözlenmiştir (Browne ve diğ., 2011). PES'de de hücre dışı matrikste fibrillin içeren liflerin miktarı artmaktadır ve psödoeksfolyasyon materyalinin içindeki elastik mikrofibrillerde fibrillin bulunduğu gösterilmiştir (Schlotzer-Schrehardt ve diğ., 1997). Bütün bu bulgulara dayanarak PES'in patofizyolojisinde CTGF'nin rol oynadığı düşünülmüş ve aközde CTGF seviyesini ölçen iki çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların her ikisinin de sonucunda CTGF seviyelerinin PEG hastalarında PES hastalarından anlamlı bir şekilde yüksek olduğu rapor edilmiştir (Ho ve diğ., 2005; Browne ve diğ., 2011).

PES patofizyolojisinde etkisi olabilecek birçok faktör vardır. Bu zamana kadarki bulgulardan yararlanarak PES'in, hücre dışı matriks proteinlerinin başlangıçta fazla CTGF nedeniyle yüksek miktarda salgılandığı, bunların oksidatif strese bağlı olarak üç boyutlu yapılarını kaybettiği ve hücre dışı şaperon ifadesi az olduğu için yanlış katlanmış proteinlerin birikerek karakteristik psödoeksfolyatif birikimleri meydana getirmesi ile geliştiği düşünülebilir. Başlangıçta belirtildiği gibi bu tez bir TÜBİTAK 1001 (115S360) projesinin bir kısmı çalışılarak oluşturulmuştur. Bu proje tasarlanırken clusterin ve CTGF'nin birlikte çalışılması planlanmıştır ve proje kapsamında her ikisi de çalışılmıştır ancak bu tez çalışmasında sadece CTGF ile PES ve PEG arasındaki ilişki araştırılmıştır.

1.2 Bağ Dokusu Büyüme Faktörü (Connective Tissue Growth Factor; CTGF)

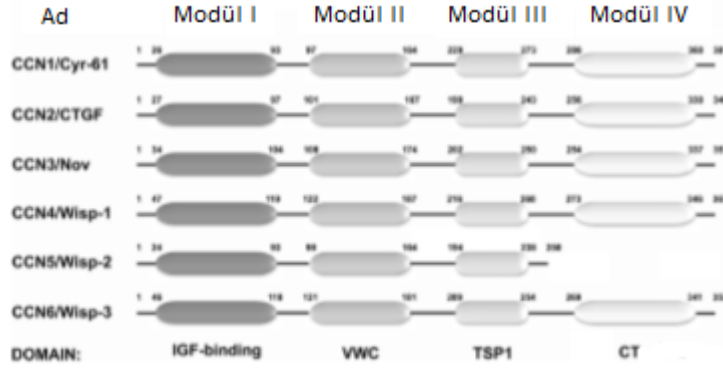
Bağ dokusu büyüme faktörü (Connective Tissue Growth Factor; CTGF), 1991 yılında Bradham tarafından keşfedilmiştir (Bradham ve diğ., 1991). CTGF, korunmuş ve modüler proteinler ailesi olan CCN ailesinin bir üyesidir. CCN kısaltması, ailenin keşfedilen ilk üç üyesinden ismini almıştır; Cyr61 (cysteine-rich protein 61), CTGF ve NOV (nephroblastoma overexpressed gene) (Bork, 1993). Bu nedenle CTGF CCN2 olarak da adlandırılır. 349 amino aside sahip CTGF (Şekil 1.4), translasyon sonrası uğradığı glikozilasyona göre 36-38 kDa arası bir büyüklüğe sahip olabilir (Aguiar ve diğ., 2014).



Şekil 1.4 : a. İnsan CTGF proteininin aminoasit dizisi (Url-3). B. CTGF proteininin 3 boyutlu yapısı (Url-4).

CCN protein ailesi N terminalindeki salgı sinyalini takip eden 4 domainden oluşan çok modüllü bir yapıyı paylaşırlar. Şekil 1.5'te gösterildiği gibi bu domainlerden birincisi insülin benzeri büyüme faktörü bağlama proteini (Modül I IGFBP), ikincisi von willebrand faktörü tip C tekrarları (Modül II VWC), üçüncüsü trombospondin tip I tekrarları (Modül III TSP) ve dördüncüsü de sistin düğümü içeren karboksi-terminal domainidir (Modül IV CT) (Aguiar ve diğ., 2014).

Sisteince zengindir ve fibroblastlar, endotel hücreleri, nöronlar ve epitel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinde ifade edilen bir proteindir (Browne ve diğ., 2011). CTGF, matriks ilişkili bir protein olup, hücre dışı matriks üretimini teşvik eden fibroblast mitojenidir. Mitojenler hücre bölünmesini uyaran ajanlardır ve bir fibroblast mitojeni olarak CTGF, bağ dokusu hücreleri olan fibroblastların bölünmesini tetikler.



Şekil 1.5 : CCN protein ailesinin yapısal olarak şematik temsili gösterimi.

CTGF'nin çeşitli hücre tiplerinde proliferasyon, migrasyon, adezyon, hayatta kalma, farklılaşma ve hücre dışı matriks proteinlerinin sentezi dahil olmak üzere çeşitli hücresel fonksiyonları düzenlediği gösterilmiştir. Aynı zamanda anjiyogenez, kondrogenez, osteogenez, yara iyileşmesi, fibroz ve tümör oluşumu gibi daha karmaşık biyolojik süreçlerde de rol oynamaktadır (Arnott ve diğ., 2011). Mitozu, fibroblastların çoğalmasını, hücre bağlanmasını ve göçünü, kolajen sentezini, hücre dışı matriks sentezini ve fibrozu düzenlediği düşünülmektedir (Oemar ve Lüscher, 1997). Kalp fibrozu, glomeruloskleroz, sistemik skleroz gibi birçok fibrotik süreçte rol almaktadır (Takehara ve diğ., 2000; Chen ve diğ., 2000; Gupta ve diğ., 2000; Shi-Wen ve diğ., 2000). CTGF'nin çeşitli biyolojik aktiviteleri modüler yapısı ile tutarlıdır. Son yıllardaki araştırmalar, bireysel modüllerin farklı hücresel fonksiyonları düzenleyebildiğini, bazı modüllerin birbirine bağımlı olarak hareket edebileceğini ve diğer büyüme faktörlerinin varlığının veya yokluğunun hedef hücrenin biyolojik tepkisini etkileyebileceğini göstermiştir (Brigstock, 2003; Cicha ve Goppelt-Struebe, 2009; Grotendorst ve Duncan, 2005; Grotendorst ve diğ., 2004). Örneğin, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) tarafından üretimi indüklenir (Chambers ve Leoni, 2000). Fibrotik karaciğerde CTGF ifadesinin arttığı, serum CTGF seviyelerinin fibrozun derecesi ile ilişkili olduğu, kronik karaciğer hastalarında serum CTGF seviyelerinin kontrollerden yüksek olduğu bulunmuş ve serum CTGF seviyelerinin karaciğer fibrozunun tanısı için biyobelirteç olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Kovalenko ve diğ., 2009).

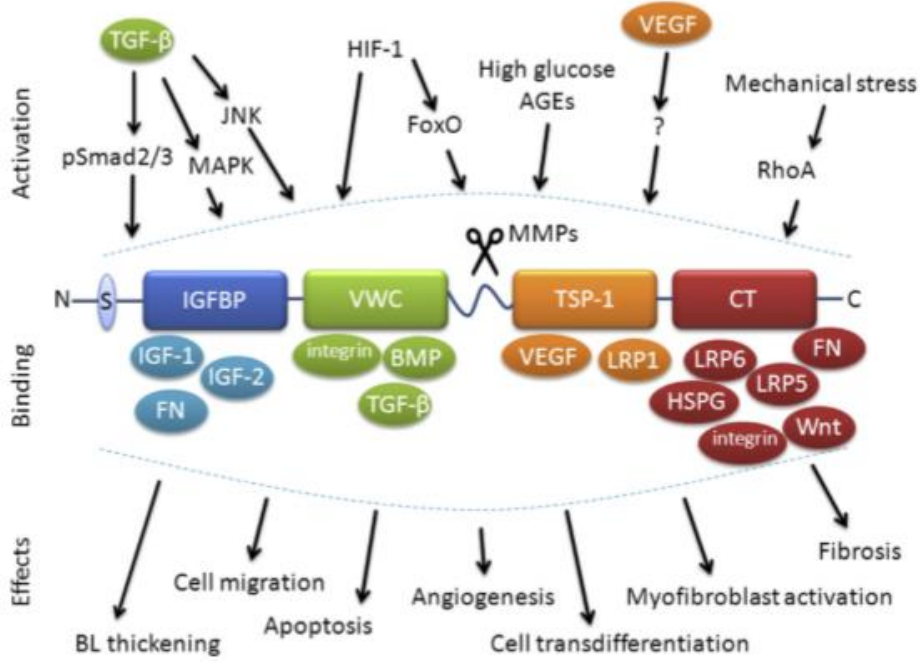
CTGF'nin bu fonksiyonları nasıl yerine getirdiği bir çok araştırmaya konu olmuştur, özellikle tüm fonksiyonlarında bağlandığı spesifik bir reseptör olup olmadığı

araştırılmıştır; fakat henüz böyle bir reseptör tanımlanamamıştır (Aguilar ve diğ., 2014). Buna karşılık her hücre tipinde her farklı görev için etkileşim kurduğu farklı proteinler ve reseptörler bulunmaktadır. Örneğin, hücre adezyonunda VWC domaini aracılığı ile TGF- β 'ya bağlanarak bu yolla TGF- β reseptörüne bağlandığı ve reseptörün sinyalizasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Abreu ve diğ., 2002, Khankan ve diğ., 2011). Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein (low density lipoprotein receptor-related protein-LRP), kemik iliği stromal hücrelerinde, hepatik stellat hücrelerinde (yağ depolayıcı hücreler) ve fibroblastlarda CTGF için bir reseptör olarak tanımlanmıştır, ancak CTGF bağlanmasına tepki olarak bu reseptör tarafından direkt olarak oluşturulan bir sinyal tespit edilememiştir (Segarini ve diğ., 2001; Gao ve Brigstock, 2003; Yang ve diğ., 2004). *Xenopus* embriyolarında Wnt koreseptörü olan LRP-6'ya bağlanarak WNT sinyalini inhibe ettiği gösterilmiştir (Mercurio ve diğ., 2004). CTGF prob olarak kullanılarak bir takım protein dizisi taranmış ve CTGF'nin FGFR2 (fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2) 'ye bağlandığı doğrulanmıştır ve bunun osteoblastik hücrelerdeki farklılaşmayı etkilediği gösterilmiştir (Aoyama ve diğ., 2012). CTGF proteininin şematik yapısı, aktive olmasını sağlayan faktörler, her domainin spesifik olarak bağlandığı proteinler ve bu etkileşimler sonucu görev aldığı olaylar Şekil 1.6'da gösterilmiştir (Klaassen ve diğ., 2015).

1.2.1 Genetik polimorfizm ve CTGF proteinini kodlayan gen

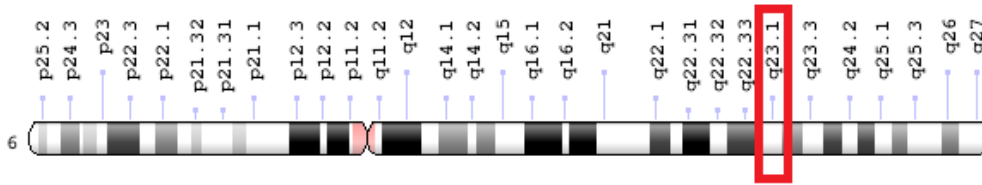
Bir özelliğin 2 ya da daha fazla fenotipe sahip olduğu durumlara polimorfizm denir. Kan grupları polimorfizme örnek olarak verilebilir. Bu fenotipler genetik olarak belirleniyorsa buna genetik polimorfizm denir (Brittanica Ansiklopedisi Editörleri, 1998). Polimorfizmin mutasyondan farkı görülme sıklığının %1'den fazla olmasıdır. Bireyler arasındaki bu genetik farklılık gen üzerindeki tek bir nükleotitin farklı olmasından kaynaklanıyorsa tek nükleotit polimorfizmi (SNP-Single Nucleotide Polymorphism) denir. Mutasyonlar hastalık nedeni olabilir. Polimorfizmler hastalık nedeni değildir, ancak hastalığa yatkınlık nedeni olabilirler. En sık görülen polimorfizm tek nükleotit polimorfizmidir. SNP'ler kodlayan ya da kodlamayan bölgede bulunabilir. Kodlayan bölgede bulunan SNP'ler aminoasit dizisini değiştirerek protein yapısını ve fonksiyonunu etkileyebilir. Kodlamayan bölgede bulunan SNP'ler ise etkisiz olabilir ya da gen ifadesinin regüle edildiği bölgede bulunarak regülasyonu etkileyebilirler. Kişilerin DNA'sında bulunan SNP'lere göre

hastalıklara yatkınlıkları ve ilaç metabolizmaları farklılık gösterebilir. Bu durumun keşfi kişiye özel tedavilerin geliştirilmesinde önem taşımaktadır.



Şekil 1.6 : CTGF domainleri, aktive edici faktörler, bağlandığı moleküller ve hüresel etkileri.

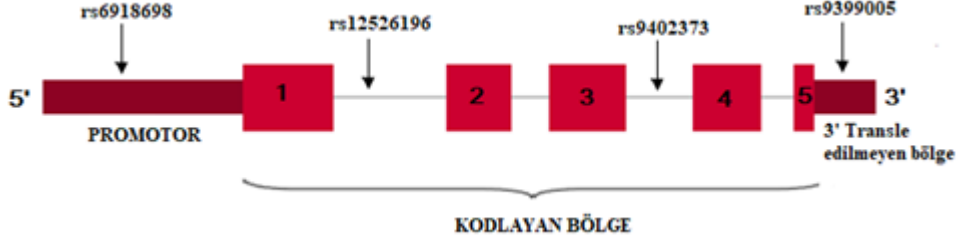
CTGF proteinini kodlayan gen 6. kromozom üzerinde, 6q23.1 lokasyonunda bulunmaktadır (Şekil 1.7). 5 ekson, 4 intron içermektedir ve 4.2 kbp uzunluğundadır (Kovalenko ve diğ., 2009). NCBI veri tabanına göre CTGF geni, şempanze, köpek, inek, fare, sıçan, tavuk, zebra balığı ve kurbağada korunmakta iken (Url-6), 215 organizmanın da insan CTGF geni ile ortologları bulunmaktadır (Url-7).



Şekil 1.7 : İnsan 6. kromozomunun diyagramı ve CTGF geninin lokasyonu (Url-5).

İnsan CTGF geninde yaklaşık 350 tane SNP vardır bunların 70 kadarı kodlayan bölgede bulunur. Ancak bu SNP'lerin minör alel frekansları oldukça düşüktür; gMAF değeri tespit edilmiş olanlarda frekans 0.0002-0.0018 civarındadır (dbSNP). Bunlar dışında promotor bölgede, intronlarda ve 3' transle edilmeyen bölgede de SNP'ler

bulunmaktadır. Bu SNP'ler amino asit dizisini etkilemese de transkripsiyonun regülasyonunu etkileyebilirler. Şekil 1.8'de CTGF geninin temsili yapısı ve bu çalışmada yer alan SNP'lerin konumları gösterilmiştir.



Şekil 1.8 : CTGF geninin temsili yapısı. Numaralı kutucuklar eksonları, bu kutuları birbirine bağlayan kısımlar ise intronları temsil etmektedir. Bu çalışmada incelenen SNP'lerin konumları da gösterilmiştir.

CTGF geninin promotor bölgesinde, -945. pozisyonunda bulunan rs6918698G/C polimorfizmi için C alelinin varlığı, transkripsiyonel düzenleyici Sp3'ün yüksek afinite ile bu bölgeye bağlanmasına ve genin transkripsiyonel baskılanmaya uğramasına yol açmaktadır; bu durum CTGF üretiminin azalması ile sonuçlanabilmektedir (Fonseca ve diğ., 2007). Şimdiye dek yapılan birçok çalışmada rs6918698G/C sistemik skleroz ile ilişkili bulunmuştur (Fonseca ve diğ., 2007; Kawaguchi ve diğ., 2008; Rueda ve diğ., 2009). Ancak, bu ilişki diğer çalışmalarda teyit edilmemiştir (Gourh ve diğ., 2008; Rueda ve diğ., 2009; Louthrenoo ve diğ., 2011). Bu varyasyonun gMAF değeri C=0.496 olarak verilmektedir. Polimorfik alel frekansının farklı toplumlarda sıfır ile 1 arasında değiştiği görülmektedir (dbSNP).

CTGF rs9399005C/T polimorfizmi 3' transle edilmeyen bölgede bulunmaktadır ve sistemik skleroz (Granel ve diğ., 2010) ve hepatik fibroz hastalığı (Dessein ve diğ., 2009) ile ilişkili bulunmuştur. Granel ve diğ. (2010) tarafından yapılan çalışmada CTGF rs9399005TT genotipine sistemik skleroz hastalarında kontrollerden önemli derecede daha az rastlanmıştır. Bu çalışma kapsamında fonksiyonel inceleme de yapılmış ve T alelini taşıyan DNA'nın nüklear faktörleri C aleline göre daha iyi bağladığı görülmüştür. Bilgisayar programı ile yapılan hesaplamalar sonucunda bu polimorfizmin CTGF mRNA'sının ikincil yapısını, dolayısı ile de transkriptin stabilitesini etkileyebileceği bulunmuştur (Granel ve diğ., 2010). Aynı polimorfizm

Schistosoma japonicum ile enfekte olan Çinli balıkçılarda hepatik fibroz hastalığı ile ilişkili bulunmuştur (OR=2.2, $P=0.02$) (Dessein ve diğ., 2009). Bu polimorfizme ait gMAF değeri $T=0.278$ olarak verilmektedir. Polimorfik alel frekansının farklı toplumlarda sıfır ile 0.500 arasında değiştiği görülmektedir (dbSNP).

Bu iki önemli tek nükleotit polimorfizmi dışında CTGF ifade edilme seviyesini etkileyebilecek SNP'ler rs9402373C/G ve rs12526196T/C'dir. Her iki SNP de intronda bulunmaktadır ve Dessein ve diğ.'nin çalışmasında hepatik fibroz ile en güçlü ilişkisi olan SNP'ler olarak öne çıkmıştır. Bu polimorfizmlerin nükleer faktörlerin bağlanmasını etkileyerek gen transkripsiyonunu veya transkriptin stabilitesini etkileyebilecekleri düşünülmektedir (Dessein ve diğ., 2009). Bu iki SNP'nin gMAF değerleri rs9402373C/G için $G=0.2386$ ve rs12526196T/C için $C=0.1490$ olarak verilmektedir (dbSNP).

2015 yılında Suh ve diğ. tarafından bu çalışmada incelenen rs9399005C/T de dahil olmak üzere CTGF genindeki 12 SNP psödoeksfolyasyon sendromu ve glokomu ile ilişkili olarak çalışılmıştır. Bunun dışında CTGF genetik polimorfizmleri ile glokomlu ve/veya glokomsuz psödoeksfolyasyon arasındaki ilişkiye dair çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında CTGF genetik polimorfizmlerinden rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G'nin PES ve PEG hastalarında ve kontrol bireylerde incelenmesine karar verilmiştir. Eldeki verilere göre bu polimorfizmler proteinin ifade edilme seviyesini etkilemektedir. Bu çalışma kapsamında aköz ve gözyaşı örneklerinde tespit edilen CTGF protein seviyeleri ile genetik polimorfizmler arasındaki ilişki de incelenmiştir.

1.3 Gözyaşı

Gözyaşı, göz epitelinin üstünü örten ve oküler yüzeyin sağlıklı kalmasını sağlayan hücre dışı sıvıdır. Bu sıvı, lakrimal bez, yardımcı bezler, meibomian bezi, kornea ve konjonktiva epitel hücreleri tarafından üretilen salgıların bir karışımıdır. Gözyaşı proteinler, peptitler, lipitler, elektrolitler ve küçük metabolitleri içeren oldukça karmaşık bir biyolojik sıvıdır (Zhou ve diğ., 2006). Işığın kırılabilmesi için düzgün bir yüzey sağlanması, korneanın beslenmesi, göz kapaklarının ıslatılması, zararlı maddelerin uzaklaştırılması ve dış ortamdaki patojenlere karşı gözün korunması gibi

işlevler gözyaşının görevleri arasındadır (Zhou ve Beuerman, 2012). Gözyaşı bu görevleri içeriğindeki maddeler sayesinde gerçekleştirebilmektedir. Örneğin, içeriğinde bulunan lizozim ve laktoferrin proteinleri antimikrobiyal özellik kazandırmaktadır (Zhou ve Beuerman, 2012).

2006 yılında de Souza ve diğ. gözyaşında ilk kapsamlı proteomiks çalışmasını gerçekleştirmiş ve 491 tane farklı protein bulduklarını rapor etmişlerdir. 2012 yılında yapılan farklı bir gözyaşı proteomu çalışmasında ise sağlıklı bir insanın gözyaşında 1543 farklı protein tespit edilmiştir (Zhou ve diğ.). Bu iki çalışma karşılaştırıldığında tespit edilen proteinlerin 239 tanesinin her ikisinde de ortak olduğu görülmüştür. Bu durumda bu iki proteomiks çalışmanın sonuçları toplandığında gözyaşında 1800'e yakın farklı protein bulunduğu sonucuna ulaşılabılır. Temel gözyaşı proteinleri 2 gruba ayrılabilir: 1. grupta lizozim, laktoferrin, epidermal büyüme faktörü (EGF), lipokalin ve IgA bulunmaktadır. 2. grupta ise serum proteinlerinden albumin, transferin, IgG, IgM gibi proteinler yer almaktadır. Bu ikinci gruptaki proteinler konjonktivadaki damarlardan gözyaşına sızmaktadır (Ohashi ve diğ., 2006).

Son yıllarda insan gözyaşı sıvısının protein içeriğinin tespit edilmesi klinik tıpta önem kazanmıştır. Bunun en önemli sebebi gözyaşındaki proteinlerin farklı dağılımlarının oküler hastalıkların patofizyolojisi hakkında fikir verebileceğinin düşünülmesidir. Ayrıca, gözyaşında bulunan bazı proteinler oküler ve sistemik hastalıkların teşhisinde biyomarker olarak da kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Bunların yanında, gözyaşı sıvısının cerrahi olmayan invaziv bir yöntemle hastaya rahatsızlık vermeden alınabilmesi de araştırmacılara cazip gelen bir özelliğidir.

Gözyaşı sıvısının içeriği ve miktarı, büyük ölçüde oküler yüzeylerden ve lakrimal bezin fonksiyonundan etkilenmektedir. Gözyaşı, oküler hastalıkların oluştuğu bölgede bulunması nedeniyle altta yatan patolojinin anlaşılmasında büyük önem taşımaktadır. Buradan yola çıkılarak bazı hastalıkların biyobelirteçlerinin keşfedilmesi için biyolojik numune kaynağı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, göz kuruluğu (Grus ve diğ., 2005; Zhou ve diğ., 2009; McKown ve diğ., 2009; Versura ve diğ., 2010; Tong ve diğ., 2011), mikrobiyal enfeksiyonlar (Ananthi ve diğ., 2008), blefarit (Koo ve diğ., 2005; McKown ve diğ., 2009), alerjik göz hastalıkları (Nomura ve Takamura, 1998), keratokonus (Lema ve diğ., 2010; Pannebaker ve diğ., 2010) ve Sjogren

sendromunun tanısında (Tomosugi ve diğ., 2005) gözyaşını inceleyen çalışmalar yapılmıştır ve bazılarında belirteç olabilecek maddeler bulunmuştur.

Oküler hastalıklar dışında, diyabet (Stolwijk ve diğ., 1994; Kawai ve diğ., 2002; Baca ve diğ., 2007; Park ve diğ., 2008; Chen ve diğ., 2011; Csósz ve diğ., 2012), tiroid göz hastalığı (Khalil ve diğ., 1989; Baker ve diğ., 2006; Okrojek ve diğ., 2009; Yoon ve diğ., 2010), kanser (Evans ve diğ., 2001; Lebrecht ve diğ., 2009; Bohm ve diğ., 2012) ve multipl skleroz (Salvisberg ve diğ., 2014) gibi bir takım sistemik hastalıklarda da gözyaşındaki bazı proteinlerin ifadesinde değişimler gözlenmiştir. Diyabetik retinopatisi olan hastalarda bazı temel gözyaşı proteinlerinde değişiklikler görülmüştür (Stolwijk ve diğ., 1994; Csósz ve diğ., 2012) ve bu parametrelerin biyobelirteç olarak kullanılabilmesi önerisi getirilmiştir (Csósz ve diğ., 2012). Diyabetik retinopatisi olan hastaların gözyaşında Apolipoprotein A1 (Kawai ve diğ., 2002) ve sinir büyüme faktörü seviyeleri (Park ve diğ., 2008) yüksek bulunmuştur. Tiroide bağlı göz hastalığı (Graves oftalmopati) olan kişilerde gözyaşında IgA/lizozim oranının (Khalil ve diğ., 1989) ve çinko-alfa2 glikoprotein, laktoferrin (Baker ve diğ., 2006) ve sinir büyüme faktörü (Yoon ve diğ., 2010) seviyelerinin yükseldiği gözlenmiştir. Gözyaşı proteomu kanser ile, özellikle meme kanseri ile, ilişkili bulunmuştur (Evans ve diğ., 2001; Lebrecht ve diğ., 2009). Multipl skleroz hastalarının gözyaşı örneklerinde alfa-1 anti-kimotripsin seviyesinin kontrollerden önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiş ve bu proteinin multipl skleroz tanısında umut verici bir biyobelirteç olduğu belirtilmiştir (Salvisberg ve diğ., 2014).

Gözyaşı alımı cerrahi invaziv bir yöntem olmaması bakımından diğer bazı biyolojik numunelere göre öne çıkmaktadır. Hasta tercihlerini sorgulayan bir çalışmada hastaların %74'ü kan yerine gözyaşı örneği vermeyi tercih etmiştir (Quah ve diğ., 2014). Hatta aynı çalışmada hastaların %69'u invaziv olmayan bir biyolojik numune olan idrar yerine gözyaşı numunesi vermeyi tercih etmişlerdir (Quah ve diğ., 2014).

Gözyaşı örneği alma metotlarından biri Schirmer striplerin (Schirmer tear test; STT) kullanımınıdır (Stuchell ve diğ., 1984; Choy ve diğ., 2001; Li ve diğ., 2008; Chong ve diğ., 2010; Kramann ve diğ., 2011; VanDerMeid ve diğ., 2011; Wong ve diğ., 2011; Denisin ve diğ., 2012; Zhou ve diğ., 2012; Funke ve diğ., 2012; Farias ve diğ., 2013). Schirmer stripleri oftalmolojide rutin olarak kuru göz tanısında kullanılan filtre kâğıtlarıdır. Bu kâğıt striplerin kullanılması hem doktor, hem de hasta açısından

kolaylık ve avantaj sağlamaktadır. Bir diğer metot ise mikrokapiller tüp kullanımınıdır (van Setten, 1990; de Souza ve diğ., 2006; Csösz ve diğ., 2012). Gözyaşı örneğinin alınmasında Schirmer stripleri ve mikrokapiller tüp kullanımını karşılaştıran bir çalışmada (Posa ve diğ., 2013) belirtilen Schirmer strip kullanımının avantajları şunlardır: Schirmer stripi hastanın gözüne yerleştirdikten sonra hekim 5 dk.'lık bekleme süresinde serbesttir; öte yandan mikrokapiller tüp yönteminde uygulayıcının tüpü tüm işlem boyunca yerinde tutması gerekmektedir, bu da yorucu olabilmektedir. Mikrokapiller tüp ile gözyaşı örneği almak belli bir tecrübe ve beceri gerektirmektedir; gözyaşı alımı sıklıkla hastanın gözünü kırpması nedeniyle kesintiye uğramaktadır, ancak kâğıt stripler ile gözyaşı alımı beceri gerektirmeyen basit bir yöntemdir. Ayrıca hastalar esnek filtre kâğıdından yapılmış Schirmer stripleri ile karşılaştırıldığında sert kapiller tüp ile göz yaşı örneği alınmasına karşı daha tereddütlü yaklaşmışlardır. Sonuç olarak, Schirmer stripleri, gözle ya da diğer hastalıklarla ilişkili olabilecek gözyaşındaki biyokimyasal parametrelerin büyük popülasyonlarda çalışılabilmesi için hastalar tarafından da kabul gören bir araçtır.

Schirmer striplerine emdirilmiş gözyaşının protein bileşimini çalışmak için, kâğıt üzerine emilmiş proteinleri ortaya çıkarmaya (proteinlerin kağıttan ekstraksiyonuna) yönelik birkaç farklı yöntem vardır. Bunlar, kağıttaki proteinlerin başka bir sıvıya difüzyonuna (Stuchell ve diğ., 1984; Choy ve diğ., 2001; Li ve diğ., 2008; Chong ve diğ., 2010; Kramann ve diğ., 2011; VanDerMeid ve diğ., 2011; Wong ve diğ., 2011; Denisin ve diğ., 2012; Zhou ve diğ., 2012; Farias ve diğ., 2013), santrifüj yapılarak elde edilmesine (Li ve diğ., 2010a; Li ve diğ., 2010b; Remington ve diğ., 2009) ve aseton ile çöktürülmesine (Green-Church ve diğ., 2008) dayalı tekniklerdir. Materyal metot bölümünde anlatıldığı üzere bu yöntemlerden çalışmanın amacına uygun birkaç yöntem denenerek denemeler yapılmış ve en uygun olanı araştırmada kullanılmıştır.

Gözyaşında CTGF'yi inceleyen tek çalışmada sağlıklı kontrol grubunda, uyarılmış gözden alınan gözyaşı örneklerinin %80'inde CTGF tespit limitinin üzerinde bulunmuş ve 70 örneğin 7 tanesinde tespit edilmiştir (van Setten ve diğ., 2003). Bu araştırmada da gönüllü numuneleri ile ölçümlere başlamadan önce bu veriler dikkate alınarak deneme çalışmaları yapılması planlanmıştır.

PES hastalarının PEG'e yatkınlığını gösteren biyobelirteçlerin bulunması erken teşhis koyulabilmesini sağlayacaktır. Böylece glokom yatkınlığı olanlar için rutin kontroller

artırılıp gerekirse glokom tedavisine erken başlanarak glokom kaynaklı görme kayıpları önlenebilecektir. Bu çalışmada gözyaşı örneklerinde CTGF seviyelerinin belirlenmesi ve PES ve/veya PEG tanısında kullanılabilme potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

1.4 Aköz

Daha önce de anlatıldığı gibi psödoeksfoliyatif materyal birikimi sonucu aköz sıvısının boşaltılmasını sağlayan kanallar tıkanarak bu sıvının göz içinde birikmesine yol açar. Bu da göz içi basıncını artırarak glokoma neden olur. Aköz humor sıvısı göz dokularında üretilen ve PES ve PEG ile yakından ilgili bir biyolojik materyal olduğu için protein içeriği daha önce de incelenmiştir. PEG, katarakt ve kontrol gruplarında aközdeki total protein miktarına bakılan bir çalışmada; aköz hümor sıvısındaki total protein konsantrasyonu PEG hastalarında en yüksek, katarakt hastalarında en düşük bulunmuştur. PES hastalarında ise katarakt hastalarından yüksek, PEG hastalarından düşük olduğu gözlenmiştir (Zenkel ve diğ., 2006). Ancak aköz sıvısı sadece cerrahi operasyon ile alınabilen bir materyal olduğundan erken tanı için kullanmak uygun değildir. Gözyaşı ile yapılan ölçümler ile aközdeki ölçümler arasında bir paralellik olup olmadığının incelenmesi de bu çalışmanın kapsamındadır. Eğer paralellik bulunabilirse aköz yerine gözyaşından ölçümler yapmak tanı ve tedavi sürecini kolaylaştıracaktır.

1.5 Çalışmanın Amacı

PES yaşa bağlı olarak gelişen ve sessizce ilerleyen ancak sonuçta körlüğe neden olabilecek kadar ciddi ve tüm dünyada yaygın olan bir göz hastalığıdır. Psödoeksfoliasyon birikimi hemen görme kaybına neden olmadığı için birey tarafından başlarda farkedilemez ve klinik olarak tespit edilebilir aşamaya geldiğinde de oldukça ilerlemiş psödoeksfoliasyon birikimi bulunmaktadır. Bu birikim aköz hümor sıvısının boşaltılmasını sağlayan kanalları tıkayarak bu sıvının gözde birikmesinden kaynaklı göz içi basıncının artmasına neden olmaktadır. Bu basınç artışı görme sinirine zarar vererek PEG gelişimine neden olabilir. Psödoeksfoliyatif materyalin temizlenmesini amaçlayan operasyonlar sonrasında aynı birikimler yeniden oluştuğu için PES'in kesin tedavisi henüz yoktur. PEG durumunda ise sadece

geçici yöntemler ile gözdeki basınç düşürülebilmektedir ancak görme kaybı veya sinirlerin aldığı hasar geri döndürülememektedir. Bu nedenle, uzun vadede, psödoeksfoliasyon materyalinin oluşumuna neden olan faktörlerin tespit edilmesi ve bu sayede PES'in ortaya çıkmasının önlenmesi büyük önem taşımaktadır.

CTGF birçok farklı hücrede çeşitli fonksiyonları bulunan bir proteindir. Görevlerinden biri de fibriler maddelerin üretiminde yer alarak bağ doku oluşumunda rol oynamaktır. Psödoeksfoliyatif birikim içerisinde de fibriler moleküllere büyük oranda rastlandığı için CTGF proteininin bu hastalıkların patofizyolojisinde rolü olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada incelenen CTGF proteini PES ile ilgili bulunursa, tamamlayıcı çalışmalar ardından ileriki yıllarda tanı ve tedavi için yeni imkânlar yaratabilir. Ortalama yaş ömrü artan toplumlarda hayat kalitesinin korunması da oldukça önemlidir. Görme kaybı ya da eksikliği yaşamak günlük faaliyetlere ket vurarak bireylerin hayat kalitesinde ciddi düşüşe neden olacağı için bu hastalıkların erken teşhisi, ilerlemesinin durdurulabilmesi ve tedavi edilebilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Türk popülasyonunda PES ve PEG'e yatkınlığın belirlenmesinde CTGF genetik polimorfizmlerinin biyolojik belirteç olarak yararlılığını saptamaktır. Aynı zamanda gözyaşı ve aközdeki CTGF seviyeleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve gözyaşı sıvısının bir tanı aracı olarak kullanılabilirliği hakkında fikir sahibi olmaktır. Bu amaca ulaşmak için, bu çalışmada aşağıdaki adımlar izlenecektir:

-PES ve PEG hastaları ile kontrol grubu bireylerden tam kan, gözyaşı ve aköz numunelerinin toplanması,

-Tam kan örneklerinden genomik DNA izole edilmesi,

-Bu DNA'lar kullanılarak her birey için CTGF genindeki 2 SNP (rs6918698 ve rs9399005)'nin bulunduğu bölgenin PCR yöntemi ile çoğaltılması,

-rs6918698 ve rs9399005 tek nükleotid polimorfizmleri için bu PCR ürünlerinin uygun restriksiyon endonükleazlarla sindirimi ve bireylerin genotiplerinin belirlenmesi,

-Aynı grubun DNA'ları kullanılarak bireylerin genotiplerinin CTGF genindeki 2 SNP (rs12526196 ve rs9402373) için eş zamanlı PCR yöntemi ile belirlenmesi,

-PES, PEG ve kontrol grupları için tek nükleotid polimorfizmlerinin genotip ve alel frekanslarının belirlenmesi,

-Gözyaşı striplerinden gözyaşlarının etkin bir biçimde geri kazanılması,

-Geri kazanılan gözyaşı örneklerinde total protein ve CTGF konsantrasyonlarının tespit edilmesi; bu total protein içinde CTGF oranının hesaplanması,

-Aköz hüümör sıvılarında total protein ve CTGF konsantrasyonlarının tespit edilmesi; bu total protein içinde CTGF oranının hesaplanması,

-İstatistik yöntemlerini kullanarak;

- SNP'lerdeki alel farklılıklarının hastalıklar için risk faktörü olup olmadığının tespit edilmesi,
- Aköz ve gözyaşı CTGF konsantrasyonunun PES, PEG ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gösterip göstermediğinin tespit edilmesi,
- Aköz ve gözyaşı total protein konsantrasyonunun PES, PEG ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gösterip göstermediğinin tespit edilmesi,
- Aköz ve gözyaşı CTGF konsantrasyonunun total proteindeki yüzdesinin PES, PEG ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gösterip göstermediğinin tespit edilmesi,
- SNP'ler ile gözyaşında CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu ve total protein içinde CTGF oranı arasındaki ilişkinin incelenmesi,
- SNP'ler ile aközde CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu ve total protein içinde CTGF oranı arasındaki ilişkinin incelenmesi,
- CTGF gözyaşı ve aköz seviyelerinin birbiri ile korele olup olmadığının tespit edilmesi,
- Aköz ve gözyaşı CTGF konsantrasyonunun PES ve/veya PEG için risk faktörü olup olmadığının tespit edilmesidir.

2 MATERYAL VE METOT

2.1 Materyaller

2.1.1 Çalışma grubunun oluşturulması ve örneklerin toplanması

Bu çalışma 115S360 nolu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında Helsinki Bildirgesi'nin prensiplerine göre (EK 1) yürütülmüş olup, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Tüm katılımcılara çalışma hakkında bilgi verilmiş ve bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatılmıştır.

Çalışmada kullanılacak örnekler PES ve PEG hastaları ile kontrol grubundan Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı tarafından 2015-2017 yılları arasında Ankara ilinde toplanmıştır. PES tanısı, tam oftalmolojik muayene sırasında psödoeksfoliasyon materyalinin biyomikroskopik inceleme ile direk gözlenebilmesi sayesinde konulmuştur. PEG tanısı için psödoeksfoliasyonu olanlarda glokom olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bunun için bütün hastalar rutin tam göz muayenesinden geçirilerek, görmeler, ön segment yapıları, arka segment yapıları ve optik disk muayenesi, gonyoskopik muayene hasta dosyasına not edilmiştir. Hastaların göz içi basıncı öncelikle nonkontakt tonometre ile ölçülmüş, gerek duyulan olgularda aplanasyon tonometre ile ölçülmüştür. Göz içi basıncı yüksek olanlar ve/veya optik sinir muayenesinde glokomdan şüphelenilen durumlarda hastaya; görme alanı testi, optik kohorens tomografi (radyasyon yayılımı yapmaz) ile retina sinir lifi kalınlığı ölçümü ve gereken olgularda tarayıcı laser oftalmoskopi ile optik sinir ileri değerlendirmesi yapılmıştır. Yukarıda sayılan muayene yöntemleri ile psödoeksfoliasyon saptanmayan ve refraksiyon kusuru ve katarakt dışında göz hastalıkları ile ilgili hastalığı bulunmadığı tespit edilen hastalar arasından gönüllü olur formunu imzalayanlardan kontrol grubu oluşturulmuştur. Bu çalışmaya 213 PEG ve 214 PES hastası ile 215 kontrol birey katılmıştır. Çalışmaya alınan kontrol bireylerin

yaşlarının PES ve PEG hastalarının yaşına yakın olmasına dikkat edilmiş olup kadın-erkek her iki cinsiyet de çalışmaya dâhil edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında yukarıda anlatıldığı gibi teşhis edilmiş, bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamış, çalışmaya katılmayı kabul etmiş PES ve PEG hastaları ile kontrol bireylerden Na-EDTA'lı tüplere periferik tam kan alınmıştır. Kan alınan bireylerin bir kısmından, 80 PEG hastası, 80 PES hastası ve 85 kontrolden gözyaşı örneği de alınmıştır. Aköz ise sadece tıbbi olarak gereklilik olduğundan dolayı katarakt cerrahisi planlanan hastalardan çalışmamıza katılmayı kabul edenlerden alınabilmektedir. Bu nedenle aköz örneği alınabilen kişi sayısı 10 PEG, 17 PES ve 23 kontroldür. Alınan örnekler Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda zaman kaybetmeksizin -20°C derin dondurucuya konulmuş daha sonra en geç 5 gün içinde oradan alınarak buz kutusu içinde TOBB-ETÜ Teknoloji Merkezi'ndeki laboratuvarımıza getirilmiş ve analiz edileceği zamana kadar saklanmak üzere -86°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

Aköz alma prosedürü

Çalışma kapsamına alınmayı kabul eden PEG ve PES hastalarından, çalışmadan bağımsız olarak tıbbi olarak gereklilik olduğundan dolayı katarakt cerrahisi planlananların aközü alınabilmektedir. Rutin cerrahi sırasında zaten ön kamaradan dışarı çıkan aköz, ucuna künt kanül takılarak enjektör içerisine alınmıştır. Alınabilen aköz hümor sıvısı miktarı 150 μl civarındadır. Alınan aköz vakit kaybetmeksizin polipropilen tüplere transfer edilerek önce -20°C 'ye koyulmuş, kısa bir süre sonra -86°C 'ye transfer edilerek analiz yapılana kadar muhafaza edilmiştir.

Gözyaşı alma prosedürü

Hasta ve kontrollerin gözlerinden "Schirmer kâğıdı" olarak bilinen Whatman filtre kâğıdı şeritleri kullanılarak gözyaşı örneği alınmıştır. Bu yöntemde kâğıt ucundan 5 mm kıvrılarak, loş bir odada oturtulmuş olan hastanın alt forniksine 1/3 dış ve 1/3 orta kısmın arasına topikal anestezi yapmadan yerleştirilir. Gözler açık kalır ve hasta yukarı baktırılır. Bu çalışma kapsamında Schirmer striplerin 35 mm çizgisine kadar ıslanması beklenmiştir. 35 mm çizgisine kadar ıslanmayanlarda ıslak kısım ölçülerek not edilmiştir. Stripler 5 ml'lik steril polipropilen tüplerin içine konarak -20°C 'ye

kaldırılmış, kısa bir süre sonra -86°C'ye transfer edilerek analiz yapılana kadar muhafaza edilmiştir.

2.1.2 Kullanılan cihazlar

+4°C Buzdolabı (Liebherr-Almanya)
-20°C Buzdolabı (Liebherr-Almanya)
-86°C Buzdolabı (Panasonic-Japonya)
Minispin (Eppendorf-Almanya)
Kuru blok ısıtıcı (Biosan-Letonya)
Soğutmalı santrifuj (Hettich-Almanya)
UV-görünür bölge spektrofotometre (Hitachi-Japonya)
pH metre (VWR-ABD)
PCR cihazı (Eppendorf-Almanya)
Yatay elektroforez sistemi (Thermo Fisher Scientific-ABD)
UV görüntüleme sistemi (Vilber Loumart-Fransa)
Eş zamanlı PCR cihazı (Applied Biosystems-ABD)
Çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Scientific-ABD)
Su banyosu (VWR-ABD)
Plaka okuyucu spektrofotometre (MultiSkan, Thermo Fisher Scientific-ABD)

2.1.3 Kullanılan malzemeler

Trizma bazı (moleküler biyoloji için, 252859), triton X-100 (T8787), sodyum dodesil sülfat (SDS, moleküler biyoloji için, L3771), sodyum klorür (31434), etilendiamin tetra asetik asit (EDTA, A5134), magnezyum klorür (M8266), borik asit (moleküler biyoloji için, B6768), Tween® 20 (P1379), fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS-P4417), DMSO (moleküler biyoloji için, D9170), hidroklorik asit (07102), sodyum hidroksit (06203) ve etanol (absolute, 32221) Sigma-Aldrich, Almanya firmasından temin edildi. Potasyum klorür (SC-203207) Santa Cruz Biyoteknoloji, ABD firmasından temin edildi. Bradford analiz kiti (23200), etidyum bromür (15585011), agaroz (16500500), dNTP karışımı (R0192), 50 bp GeneRuler™ DNA markör (SM0372), amplifikasyon bufferı ve MgCl₂ ile birlikte rekombinant Taq Polymerase enzimi (EP0402) Thermo Fischer Scientific, ABD firmasından temin edildi. Uygun tampon çözeltileri ile birlikte *BseRI* (R0581) ve *MscI* (R0534) isimli restriksiyon enzimleri

New England Biolabs (NEB), ABD firmasından temin edildi. İnsan CTGF ELISA kiti (EH0702) Finetest, Çin firmasından temin edildi. DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Blood Mini Kit-51106) Qiagen, Almanya firmasından temin edildi.

2.1.4 Primerler

Iontek firmasından RFLP ile incelenecek olan polimorfik nükleotitleri içeren bölgeleri çoğaltmak amacıyla 2 çift primer satın alındı. Primerler liyofilize halde temin edildi, kullanma kılavuzuna uygun şekilde çözülerek 100 pmol/ml konsantrasyonunda primer çözeltileri elde edildi. Bu çözeltiler seyreltme uygulanarak 10 pmol/ml konsantrasyona getirildi ve alikotlanarak -20°C’de kullanım zamanına kadar saklandı.

Primer dizileri Tablo 2.1’de verilen kaynaklardan elde edilmiş, sonrasında da Primer-Blast (Url-8) programından ve NCBI-SNP veritabanından elde edilen FASTA dizisi üzerinden kontrolleri yapılmıştır.

Tablo 2.1 : CTGF rs6918698G/C ve rs9399005C/T SNP’lerini içeren bölgelerin çoğaltılmasında kullanılacak olan ileri ve geri primer dizileri.

SNP	İleri ve Geri Primerler	Kaynak
rs6918698G/C	5’ GAG AAC AAA GAC GCG TGT GA 3’ 5’ AGC CCC TAC CTA CCC AAC AC 3’	Mingirulli, 2009 Primer-Blast programından kontrol edildi
rs9399005C/T	5’ TTG TGA TGT GAA GGG TTG GA 3’ 5’GCA GGC ATA CAC ACC ACA TT 3’	Mingirulli, 2009 Primer-Blast programından kontrol edildi

2.1.5 Eş zamanlı PCR kitleri

Fonksiyonel olarak test edilmiş TaqMan genotipleme kitleri ve genotiplemde kullanılan mastermiks Applied Biosystems, ABD firmasından alınmıştır. TaqMan kitlerin assay numaraları Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2 : TaqMan SNP genotipleme kitlerinin TaqMan assay numaraları.

Gen	SNP	TaqMan Assay Numarası (ID)
CTGF	rs12526196T/C	C__1764938_10 (fonksiyonel olarak test edilmiş)
	rs9402373C/G	C__30110249_10 (fonksiyonel olarak test edilmiş)

PCR işleminde kullanılması gereken kit konsantrasyonu 20X olmasına rağmen alınan kitler 40X konsantrasyondaydı. Bu nedenle kitler steril 1X TE tamponu ile seyreltildi ve sonrasında alikotlanarak -20°C’de karanlıkta kullanım zamanına kadar saklandı.

2.1.6 Kullanılan çözeltiler

2.1.6.1 Manuel DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

TKM tamponu (pH 7.6)

10 mM Trizma bazı (pH 7.6)

10 mM KCl

2 mM EDTA.H₂O

4 mM MgCl₂

%10 SDS solüsyonu

Doymuş NaCl çözeltisi

TE tamponu (pH 8.0)

100 mM Tris-HCl

500 mM EDTA

Tris-HCl (pH 8.0, 100 mM)

2.1.6.2 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözelti

Tris-Borat-EDTA tamponu (5X TBE tamponu, pH 8.3)

450 mM Trizma bazı

450 mM Borik asit

10 mM EDTA.H₂O

2.1.6.3 Gözyaşı striplerinden protein ekstraksiyonu için kullanılan çözelti

Ekstraksiyon tamponu (pH 7.4)

PBS tamponu (0.01M Fosfat tamponu, 2.7 mM KCl)

500 mM NaCl

0.5% Tween® 20

2.2 Genotipleme İçin Kullanılan Metotlar

4 SNP bölgesinin genotiplemesi için 2 farklı metot kullanıldı. CTGF rs6918698G/C ve rs9399005C/T bölgelerinin genotiplemesi PCR-RFLP metodu ile, rs12526196T/C ve rs9402373C/G bölgelerinin genotiplemesi ise gerçek zamanlı PCR yöntemi ile gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR yöntemi uygulaması kolay ve hızlı sonuç veren etkili bir genotipleme yöntemidir; ancak genotiplemenin doğru yapılabilmesi için polimorfik alelin bulunduğu bölgeye spesifik tasarlanmış ve valide edilmiş Taq-man problemlerinin bulunması önem taşımaktadır. Bu çalışmadaki iki bölge için uygun Taq-man problemleri içeren assay kitleri piyasada satılmakta olduğu için bunların genotiplemesi bu yöntemle yapıldı. Diğer iki bölge için ise daha önceki çalışmalarda kullanılmış olan primer sekansları ve restriksiyon endonukleaz enzimleri kontrol edilerek bu çalışmada da kullanıldı ve genotipleme PCR-RFLP metodu ile yapıldı. Bu metotta da sadece polimorfik alelin bulunduğu bölgeyi çoğaltmayı sağlayacak olan primerlerin tasarlanması ve o bölgeye uygun kesim enziminin var olması metodun kullanılabilirlik kriteridir.

2.2.1 Genomik DNA örneklerinin genotipleme için hazırlanması

2.2.1.1 Tam kan örneklerinden insan genomik DNA izolasyonu

Tüm tam kan örnekleri Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde pıhtılaşmayı önlemek amacıyla Na-EDTA içeren tüplere toplandı. Na-EDTA'lı tüplerdeki periferik tam kanlardan genomik DNA izole etmek için 2 farklı yöntem kullanıldı;

a) Manuel DNA izolasyonu : Lahiri ve Schnabel (1993) tarafından tarif edilen tuz-çöktürmeye dayanan yöntemin modifiye edilmiş hali kullanıldı.

Prosedür

2 ml'lik mikrosantrifuj tüpüne 750 µl tam kan koyuldu ve üzerine 750 µl TKM tamponu eklendi. Tüpe 20 µl Triton X-100 eklendi ve hücre zarını parçalayarak hücresel elemanları dışarı çıkartmak amacıyla birkaç kez tüp alt üst edildi. Hücresel elemanları farklı katmanlar olarak ayırabilmek amacıyla minispinde (Eppendorf, Almanya) oda sıcaklığında ve 1000g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifujden sonra tüpte DNA içeren pelet ve diğer elemanların bulunduğu supernatant olarak iki katman gözlemlendi. Supernatant seyreltilmiş çamaşır suyuna boşaltıldı. Peletin üstüne tekrar 750

µl TKM tamponu eklenerek homojen görüntü elde edildi ve tekrar santrifüjlendi. Bu işlem DNA haricindeki tüm maddeleri elimine edebilmek için beyaz berrak pelet elde edene kadar tekrarlandı. Berrak pelet elde edildikten sonra üzerine 200 µl TKM tamponu eklendi ve homojen görüntü elde edildi. 10 µl %10'luk SDS eklenerek birkaç kez alt üst edildi ve tüpler kuru blok ısıtıcıda (Biosan, Letonya) 58°C de 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 75 µl soğuk doymuş NaCl çözeltisinden eklendi ve tüp birkaç kez ters düz edildi. Soğuk tuz çözeltisi proteinlerin çökmesini sağladı ve karışım 4°C ve 14000g'de 10 dk santrifüj edilerek DNA ile proteinlerin ayrışması sağlandı. Çöken proteinler dipteki pelette kaldı ve DNA içeren supernatant hacmi hesaplanarak (~300 µl) temiz 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Supernatant hacminin yaklaşık iki katı kadar (~600 µl) -20°C'den alınmış saf etanol DNA'yı çöktürmek için tüpe eklendi. Tüp birkaç kez alt üst edilerek ipliksi DNA gözlemlendikten sonra -20°C'de 30 dk bekletildi. Çözeltideki tüm DNA'yı elde edebilmek için 4°C'de ve 10000g'de 10 dk santrifüj uygulandı. Supernatant döküldü ve tüm etanol uzaklaşana kadar pelet kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelet 100 µl TE tamponunda çözülerek 37°C'de en az 3-4 saat inkübe edildi. Uzun süreli saklama için DNA mikrotüpleri numaralandırılarak -20°C'ye kaldırıldı.

b) Kit ile DNA izolasyonu : Qiagen, Almanya firmasından alınan "QIAamp DNA Blood Mini Kit" adlı tam kandan DNA izolasyonu yapılmasını sağlayan kit kullanıldı. Prosedür için kitin kullanma kılavuzundaki talimatlar takip edildi.

Prosedür

1.5 ml'lik mikrotüpe 20 µl proteaz koyuldu ve üzerine 200 µl kan eklendi. 200 µl AL tamponu tüpe ilave edildi ve örneği homojenize etmek için 15 saniye boyunca kısa aralıklarla vortekslendi. 56°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı ve inkübasyondan sonra kısa süreli santrifuj uygulandı. Örneğin üzerine 200 µl etanol (%96-100) eklendi, 15 saniye boyunca vortekslendi ve kısa süreli santrifuj uygulandı. Karışım dikkatlice kitin içinden çıkan 2 ml toplama tüpü içerisinde bulundan mini spin kolonuna kenarlara değmeyecek şekilde aktarıldı. Kapağı kapatılarak 8000 rpm'de 2 dk santrifuj edildi ve mini spin kolonunun toplama tüpü değiştirilerek eskisi çöpe atıldı. Kolonun kenarlarına değdirmeden 500 µl AW1 tamponu eklendikten sonra kapağı kapatılarak 8000 rpm'de 2 dk santrifuj edildi ve mini spin kolonunun toplama tüpü değiştirilerek eskisi çöpe atıldı. Kolonun kenarlarına değdirmeden 500 µl AW2 tamponu eklendikten

sonra kapağı kapatılarak 15000 rpm’de 3 dk santrifuj edildi ve mini spin kolonunun toplama tüpü değiştirilerek eskisi çöpe atıldı. 15000 rpm’de 2 dk santrifuj edildi ve mini spin kolonu temiz 1.5 ml’lik mikrotüpe konularak eski toplama tüpü çöpe atıldı. Kolonun kenarlarına değdirmeden 100 µl AE tamponu eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 8000 rpm’de 2 dk santrifuj edildikten sonra DNA 1.5 ml’lik mikrotüpe geçmiş oldu ve mini spin kolonu çöpe atılarak DNA içeren tüpler numaralandırılarak -20°C’ye kaldırıldı.

2.2.1.2 Genomik DNA örneklerinin spektrofotometre ölçümü ile konsantrasyonunun belirlenmesi

İzole edilen genomik DNAların konsantrasyonu laboratuvarımızdaki UV-görünür bölge spektrofotometre cihazı kullanılarak tespit edildi. Bu cihazda izole edilmiş olan DNA’ların 260 nm ve 280 nm’deki absorbansları 500 µl hacimli kuvars küvet kullanılarak ölçüldü ve daha sonra aşağıda verilen formül kullanılarak konsantrasyonları hesaplandı. Ölçümler alınırken DNA örneklerine 30 kat seyreltme uygulandı bu nedenle hesaplamalar yapılırken seyreltme faktörü olarak 30 kullanıldı.

Teorik olarak, 1 µl solüsyondaki 50 ng genomik DNA’nın 260 nm’deki absorbansı 1.0’dır. Buna göre genomik DNA örneklerinin konsantrasyonu aşağıdaki 2.1 nolu formüle göre hesaplanabilir.

$$\text{Konsantrasyon (ng/µl)} = A_{260\text{nm}} \times 50 \text{ (ng/µl)} \times \text{Seyreltme Faktörü} \quad (2.1)$$

2.2.1.3 Genomik DNA örneklerinin spektrofotometre ölçümü ile kalitesinin kontrolü

DNA 260 nm’de maksimum absorbans verirken, proteinler ise 280 nm’de maksimum absorbans vermektedir. Kalitatif analiz (kalite belirleme) için izole edilen DNA örneğinin spektrofotometrede 260 ve 280 nm için absorbansları okundu ve oranlandı.

A_{260}/A_{280} oranı; 1.8 ise DNA saftır denebilir, 1.8’den büyük ise RNA kontaminasyonu düşünülür, 1.8’den küçük ise protein kontaminasyonu düşünülür. Buna göre tüm DNA örneklerinin kalite kontrolü yapılarak genotiplemede kullanılıp kullanılmayacağına karar verildi.

2.2.1.4 Genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile kalitesinin kontrolü

DNA örneklerinin kalitesi agaroz jel elektroforezi ile de kontrol edilebilir. Bu yöntem ile DNA'nın parçalanmamış tek parça halinde olup olmadığı gözlemlenebilir. Tek bir bant görülürse DNA sağlam ve bozulmamış demektir (Şekil 2.1). Eğer birden fazla bant ya da sürüntü halinde bir görüntü olursa bu DNA'nın bozulmuş olabileceğine bir işaretir ve izolasyonun tekrarlanması gerekir. Bu amaçla %0.5'lik agaroz jel hazırlandı ve genomik DNA örnekleri bu jelde yürütülerek kalite kontrolleri yapıldı.

Prosedür

%0.5 (ağ / hac)'lik agaroz jel, 15 mg agaroz tozu, pH 8.3 olan 30 ml 0.5X TBE tamponunda (stok solüsyonundan on kez seyreltilmiş) eritilerek hazırlandı. Süspansiyon, mikrodalga fırında, agaroz tozu tamamen eriyene ve renksiz görünüme sahip olana dek ısıtıldı.

Solüsyon, homojen bir karışım elde etmek için sürekli bir karıştırma ile dış ortamda soğutuldu. Yaklaşık olarak 60°C'ye soğutulduğunda 1.5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) çözeltiye ilave edildi ve karıştırıldı.

Jel tepsisi hazırlandı ve taraklar jel tepsisindeki uygun olan yerlere yerleştirildi. Sıcak jel çözeltisi, jel tepsisine döküldü ve pipet ucu yardımı ile hava kabarcıkları dikkatle çıkarıldı. Jel oda sıcaklığında yaklaşık 20-30 dk bekletilerek sertleşmesi sağlandı.

Jel sertleştikten sonra tepsisi ile birlikte 0.5X TBE tamponu ile doldurulmuş jel tankına yerleştirildi. Her bir DNA örneğinin 5 µL'si, temiz bir parafilm parçası üzerinde 2 µl yükleme boyası ile mikropipet kullanılarak karıştırıldı. (Yükleme boyası, içeriğindeki gliserol sayesinde DNA'nın kuyucuk içerisine çökerek tampona karışmasını önlerken boyalar sayesinde de örneğe renk vererek hem kuyucuklara daha rahat yükleme yapılmasını hem de yürüme işleminin takip edilmesini sağlar.) Karışımlar kuyucuklara yüklendi. Bir kuyucuk için de DNA örneği yerine, 250-10000 bç arasında bantlar veren bir DNA belirteci (1 kb'lik DNA ladder) kullanılarak yükleme yapıldı ve tankın kapağı elektrotlar doğru eşleşecek ve tam kapatılacak şekilde yerleştirildi.

Jel tankları, negatif yüklü DNA'nın pozitif kutup (anot) yönünde hareket etmesini sağlayacak bir elektrik akımı oluşturmak için elektrikli teller (elektrot) ile çevrilidir.

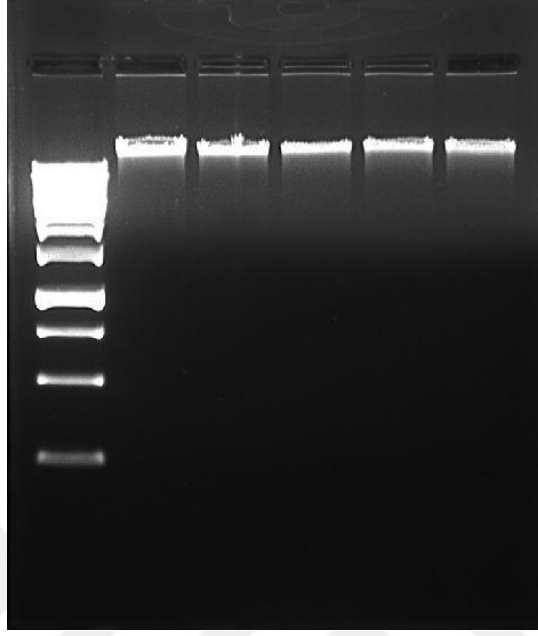
DNA içeren kuyucuklar negatif kutup (katot) tarafında bulunurlar. Jel tankının kapağına bağlı bulunan elektrotlar güç kaynağına doğru şekilde yerleştirildi ve sisteme 90 volt verilmesi için güç kaynağı ayarlandı. Jel bromofenol mavisi jelin altına ulaşmaya kadar yaklaşık bir saat boyunca çalıştırıldı.

Jelin resmi, Vilber Lourmat Jel Görüntüleme Sistemi'ne entegre Vision capture (Sürüm 16.09) programı kullanılarak çekildi (Şekil 2.1). İlk olarak jel, görünür ışığın altına yerleştirildi ve jelin konumu ile netliği ayarlandı. Daha sonra etidyum bromürün ışınmasını görebilmek için 360 nm dalga boyunda UV ışığına maruz bırakıldı. Etidyum bromür, DNA'nın büyük oluşuna yerleşerek bağlanır ve yalnızca DNA ile etkileşimde olduğu durumda UV ışığı yansıtan interkalatör bir ajandır. Saf genomik DNA örnekleri tek bant varlığı ile tanımlanırken, RNA kontaminasyonunda ikinci bandın ve parçalanmış DNA olduğu durumlarda ise dağılmış bir görüntü olarak gözlemlenmesi bekleniyordu. Şekil 2.1'de ilk kuyucukta 1 kb'lık bir DNA belirteci bulunmaktadır. Diğer kuyucuklarda ise laboratuvarımızda izole edilmiş olan DNA'lar görülmektedir. Genomik DNA çok büyük bir molekül olduğu için belirtecin en büyük bandından bile geride kalmıştır. DNA yüklü kuyucuklardaki bantlara baktığımızda bütünlüğü bozulmamış ve yoğunluğu yeterince kuvvetli bantlar gözlemlenmektedir. Bu da bize izole edilen DNA'ların parçalanmamış ve RNA kontaminasyonuna uğramamış olduğunu göstermektedir. Deneilerin diğer aşamalarında kullanılacak kalitede genomik DNA'lar elde edilmiştir.

2.2.2 CTGF rs6918698G/C ve rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmlerinin restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi metodu ile genotiplenmesi

Standart restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) belirleme yönteminde öncelikle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile polimorfik nükleotidi içeren bölgeler çoğaltılır. Bu işlem sırasında bölgeye uygun dizayn edilmiş primerler, amplifikasyon tamponu, Taq DNA polimeraz gibi kimyasallar kullanılır. Daha sonra PCR ürünlerinin kalitesi ve doğru büyüklükte olup olmadıkları agaroz jel yöntemi ile kontrol edilir. Doğru büyüklükte PCR ürünleri elde edildikten sonra bu ürünler bölgeye özel restriksiyon endonükleaz enzimleri ile inkübasyona bırakılır. Her restriksiyon endonükleazının tanıdığı, genellikle bir heksamer veya bir tetramer olan belirli bir nükleotit dizisi vardır. Bu dizideki herhangi bir değişiklik enzimin DNA'yı

kesememesi ile sonuçlanır. Tek nükleotit polimorfizmlerine neden olan nükleotit değişimleri de bu olaya neden olur. Sonuç olarak, bu tekniği kullanarak bir popülasyonun genotiplerini belirlemek mümkündür.



Şekil 2.1 : İzole edilmiş DNA örneklerinin %0.5'lik agaroz jelde görüntülenmesi.

Bu iki polimorfizmin genotiplenmesi, standart RFLP yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada genotiplenmesi yapılan CTGF genindeki polimorfizmler, amplifikasyon bölgeleri, PCR ürün boyutları ve restriksiyon endonükleazları Tablo 2.3'te verilmektedir.

Tablo 2.3 : CTGF geninde çalışılan polimorfizmler, amplifikasyon bölgeleri, PCR ürün boyutları ve restriksiyon endonükleazları.

Polimorfizm Adları	Buldukları bölge	PCR Ürün Boyutları	Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri	Kırılma ürünlerinin uzunluğu
rs6918698G/C	Promotor, -945	194 bç	<i>BseRI</i>	GG = 127, 67 bç GC = 194, 127, 67 bç CC = 194 bç
rs9399005C/T	3' transle edilmeyen bölge	191 bç	<i>MscI</i>	CC = 191 bç CT = 191, 155, 36 bç TT = 155, 36 bç

PCR reaksiyonu için Eppendorf Mastercycler, kesim sırasında örnekleri inkübe etmek için ise Biosan kuru blok ısıtıcı kullanılmıştır.

2.2.2.1 rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizminin genotiplemesi

rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizminin polimeraz zincir reaksiyonu

rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmi CTGF geninin promotor bölgesinde -945 pozisyonunda bulunur. Bu polimorfizmi içeren bölgeyi çoğaltmak için bölgeye uygun tasarlanmış bir çift primer kullanıldı. Primer dizileri Tablo 2.1’de gösterilmiştir. Diğer PCR malzemeleri şu şekildedir;

1. Taq DNA Polimeraz (10 U/μl), Taq DNA Polimeraz ile birlikte satılan PCR Amplifikasyon Tamponu (10X) ve MgCl₂ Solüsyonu (25 mM)
2. dNTP Karışımı (Her nükleotitten 10 mM)
3. İleri ve Geri Primerler (10 pmol/μl)
4. DMSO

Prosedür

CTGF rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı nükleotitler ve restriksiyon enziminin tanıdığı nükleotitler Şekil 2.2’de gösterilmektedir.

```
TTGAGGTAACGGTTTTGGGACAAGAAAAGAGAACAAGACGCGTGTGACTCAGGATGCAGTCT
CCTGGGGCAGATTTCCAAAACCTCTTGCTTAGTTTTCTCTTAATATATAGTAGGAGTTTATAT
AGGCAAGGACAAGGGAAGAGTGGCCATCAATGTTTCCAGAAAAAGGGATCCATTGTTCTATC
AGAGCAAATGATTCCTGTGTTGGGTAGGTAGGGGCTCTGGGTGTCAGGGTGGGAACACTGGGA
TGCAAAGGGGGTT
```

Şekil 2.2 : CTGF geninin rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgesinin sekansı (Url-9). İleri ve geri primerlerin tanıdığı bölgeler mavi renkli kutucuğun içinde, BseRI restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge kırmızı renkli kutucuğun içinde ve polimorfik nükleotit de kırmızı renkli olarak belirtilmektedir.

Standart polimeraz zincir reaksiyon protokolü, hedef SNP'yi içeren tek bir spesifik ürün elde edebilmek amacıyla optimize edildi. Farklı MgCl₂ konsantrasyonları (2.5 mM, 2.25 mM, 2 mM, 1.5 mM ve 1.25 mM) , kalıp DNA miktarları (400 ng, 300 ng ve 200 ng), primer konsantrasyonları (20 pmol, 30 pmol ve 40 pmol) ve DMSO

kullanımı ile en iyi sonuca ulaşmak için denemeler yapıldı. Optimize edilmiş PCR karışım içeriği Tablo 2.4'te listelenmektedir.

Tablo 2.4 : rs6918698G/C bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR karışımı.

İçerik	1 tüp için eklenen hacim	Stok konsantrasyonu	50 µl reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon
Steril Apirojen H ₂ O	değişken		
Amplifikasyon Tamponu	5 µl	10X	1X
MgCl ₂	5 µl	25 mM	2.5 mM
dNTP Karışımı	1 µl	10 mM	200 µM
DMSO	2.5 µl	100%	5%
İleri Primer	2 µl	10 pmol/µl	20 pmol (400 nM)
Geri Primer	2 µl	10 pmol/µl	20 pmol (400 nM)
Kalıp DNA	değişken	değişken	200 ng
Taq DNA Polimeraz	0.25 µl	5 U/µl	1.25 U

Bölgeyi çoğaltmak için kullanılan optimize edilmiş termal döngü programı Tablo 2.5'te gösterilmektedir. Bu optimize koşulları elde edebilmek amacıyla gradient PCR tekniği kullanıldı ve primer bağlanması aşaması için farklı sıcaklıklar ile deneme yapıldı.

Tablo 2.5 : rs6918698G/C SNP bölgesinin PCR'ında kullanılan termal döngü programı.

İlk denatürasyon	94°C	3 dk.	} 40 döngü
Denatürasyon	95°C	30 sn.	
Primer bağlanması (Annealing)	61°C	20 sn.	
Sentez	72°C	50 sn.	
Son uzama	72°C	10 dk	

PCR sonucunda elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelendi. Bunun için, PCR ürünlerinin büyüklüğünün görülmesini sağlayacak yoğunlukta %2'lik bir agaroz jel; 2 g agaroz tozu, pH 8.3 olan 100 ml 0.5X TBE tamponunda (stok solüsyonundan on kez seyreltilmiş) eritilerek hazırlandı. Mikrodalga fırında, agaroz tozu tamamen eriyene ve renksiz görünüme sahip olana dek ısıtılan solüsyon, homojen bir karışım elde etmek için sürekli bir karıştırma ile dış ortamda soğutuldu. Yaklaşık olarak 60°C'ye soğutulduğunda 5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) çözeltiye ilave edildi

ve karıştırıldı. Jel hazırlama prosedürüne 2.2.1.4 nolu bölümde anlatıldığı gibi devam edildi.

PCR ürününün 12 µl'si, 2 µl bromofenol mavisi içeren bir yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Aynı zamanda 50-1000 bç arasında bantlar veren bir DNA belirteci (50 bç'lik DNA ladder) de jele yüklenerek elde edilen bandın büyüklüğü tahmin edilebildi.

rs6918698G/C bölgesine ait PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimi ile kırılması

rs6918698G/C genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 2.3'te açıklanmıştır. PCR ürünleri *BseRI* enzimi ile inkübe edilir; çünkü *BseRI* enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:

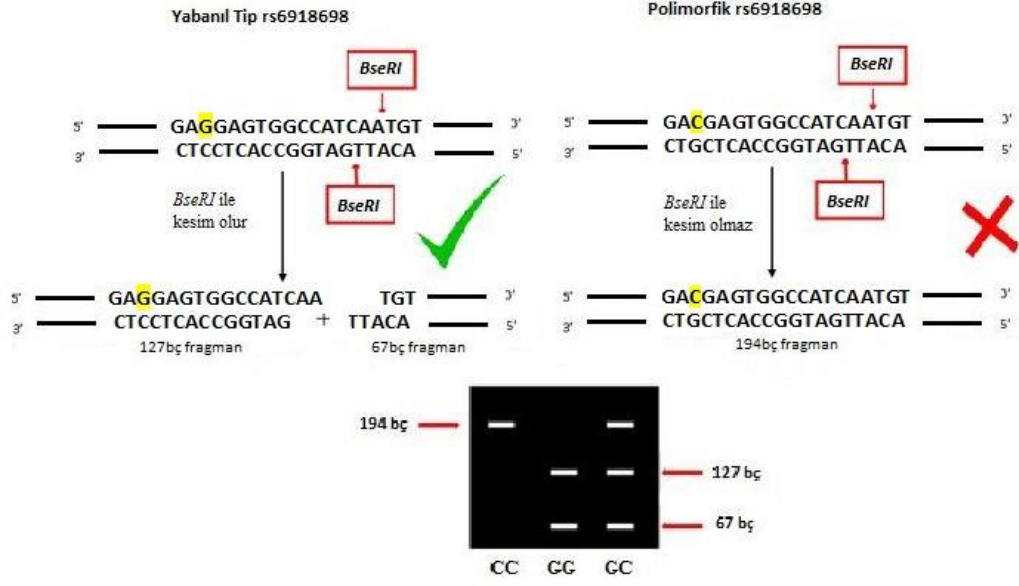


Bu dizide N ile gösterim 4 nükleoitten herhangi biri olabileceği anlamına gelmektedir. (N)₁₀ gösterimi o diziden sonra 10 nükleotit daha olduğunu gösterir.

rs6918698G/C polimorfizminde yabancı genotipteki (G) bir DNA'dan üretilen PCR ürününde bu bölge vardır ve PCR ürünü *BseRI* ile bekletildiğinde 194 bç'lik PCR ürününün 127 bç ve 67 bç'lik iki parçaya ayrılması beklenir ve kırılma reaksiyonu ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelendiğinde 127 bç ve 67 bç boyutlarında iki ayrı bant şeklinde görünmelidir. Polimorfik (C) genotipteki bir DNA'dan üretilen PCR ürününde ise bu bölgenin dizisi değişmiştir ve *BseRI* enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmaz, 194 bç'lik PCR ürünü kesilmesi beklenmez ve kırılma reaksiyonu ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelendiğinde 194 bç boyutunda tek bant şeklinde görünmelidir. Bu durumda kırılma ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda 194 bç boyunda tek bant görülüyorsa bu DNA'ya sahip bireyin bu bölge için polimorfik homozigot genotipte (CC) olduğu söylenebilir. Eğer 127 bç ve 67 bç boyutunda 2 bant görülüyorsa yabancı homozigot (GG) olduğu söylenebilir. Eğer 194, 127 ve 67 bç boyutlarında 3 bant görülüyorsa o zaman bu birey heterozigottur (GC) denilebilir.

Kimyasallar

BseRI restriksiyon endonükleaz enzimi, Tampon çözelti



Şekil 2.3 : CTGF rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Prosedür

Bu enzim fast-digest bir enzimdir ve inkübasyon süresi 15 dk olarak önerilmektedir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda rs6918698G/C bölgesinin PCR ürünlerinin *BseRI* ile kesilmesinde en iyi sonuçların Tablo 2.6'daki içerik ile 37°C'de 45dk inkübe edilmesi ile elde edildiği belirlendi.

Tablo 2.6 : rs6918698G/C polimorfizmi için restriksiyon endonükleaz reaksiyonu karışımı bileşenleri.

İçerik	Stok konsantrasyonu	1 tüp için eklenen hacim	30 µl reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon
Reaksiyon Tamponu	10X	3 µl	1X
<i>BseRI</i>	5000 U/mL	1 µl	5 U
Apirojen distile H ₂ O		11 µl	
PCR ürünü	değişken	15 µl	değişken

İnkübasyonun sonunda restriksiyon ürünlerinin uzunluğunu analiz etmek için %2.5'lük bir agaroz jel; 2.5 g agaroz tozu, pH 8.3 olan 100 ml 0.5X TBE tamponunda (stok solüsyonundan on kez seyreltilmiş) eritilerek hazırlandı. Mikrodalga fırında, agaroz tozu tamamen eriyene ve renksiz görünümüne sahip olana dek ısıtılan solüsyon, homojen bir karışım elde etmek için sürekli bir karıştırma ile dış ortamda soğutuldu. Yaklaşık olarak 60°C'ye soğutulduğunda 5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) çözeltiyeye

ilave edildi ve karıştırıldı. Jel hazırlama prosedürüne 2.2.1.4 nolu bölümde anlatıldığı gibi devam edildi.

15 µl restriksiyon ürünü, 2 µl yükleme boyası ile karıştırıldı ve jele yüklendi; ürünlerin uzunluğunu belirlemek için 50 bp DNA belirteci de yüklendi. Jel yaklaşık 90 dakika 120 voltta çalıştırıldı.

Bu polimorfizm için RFLP yönteminin genotipleri doğru belirleyip belirlemediğini test etmek amacıyla, genotipi PCR/RFLP-agaroz jel yöntemi ile belirlenmiş olan, homozigot yabancı tip (GG) ve homozigot polimorfik genotipe (CC) sahip iki kişinin PCR ürünü seçilerek sekanslamaya yollandı. Sekanslama işlemi Applied Biosystems 310 DNA dizi analizi cihazında Ref-Gen firmasına yaptırıldı. Şekil 2.4'te de görülebileceği gibi RFLP ile homozigot yabancı tip (GG) genotipe sahip olduğuna karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürünüde beklenildiği gibi *BseRI* için kesim bölgesi olarak tanınan GAGGAGTGGCCATCAA dizisi görüldü. Şekil 2.5'te ise RFLP ile homozigot polimorfik genotipe (CC) sahip olduğuna karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürünüde beklenildiği gibi *BseRI* için kesim bölgesi olarak tanınmayan GACGAGTGGCCATCAA dizisi görüldü. Bu sonuçlara göre RFLP sonucunda karar verilen genotiplerin doğruluğu teyit edildi.

2.2.2.2 rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizminin genotiplemesi

rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizminin polimeraz zincir reaksiyonu

rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmi CTGF geninin 3' transle edilmeyen bölgesinde bulunur. Bu polimorfizmi içeren bölgeyi çoğaltmak için bölgeye uygun tasarlanmış bir çift primer kullanıldı. Primer dizileri Tablo 2.1'de gösterilmiştir. Diğer PCR malzemeleri şu şekildedir;

1. Taq DNA Polimeraz (10 U/µl), Taq DNA Polimeraz ile birlikte satılan PCR Amplifikasyon Tamponu (10X) ve MgCl₂ Solüsyonu (25 mM)
2. dNTP Karışımı (Her nükleotitten 10 mM)
3. İleri ve Geri Primerler (10 pmol/µl)
4. DMSO

Prosedür

CTGF rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı nükleotitler ve restriksiyon enziminin tanıdığı nükleotitler Şekil 2.6'da gösterilmektedir.

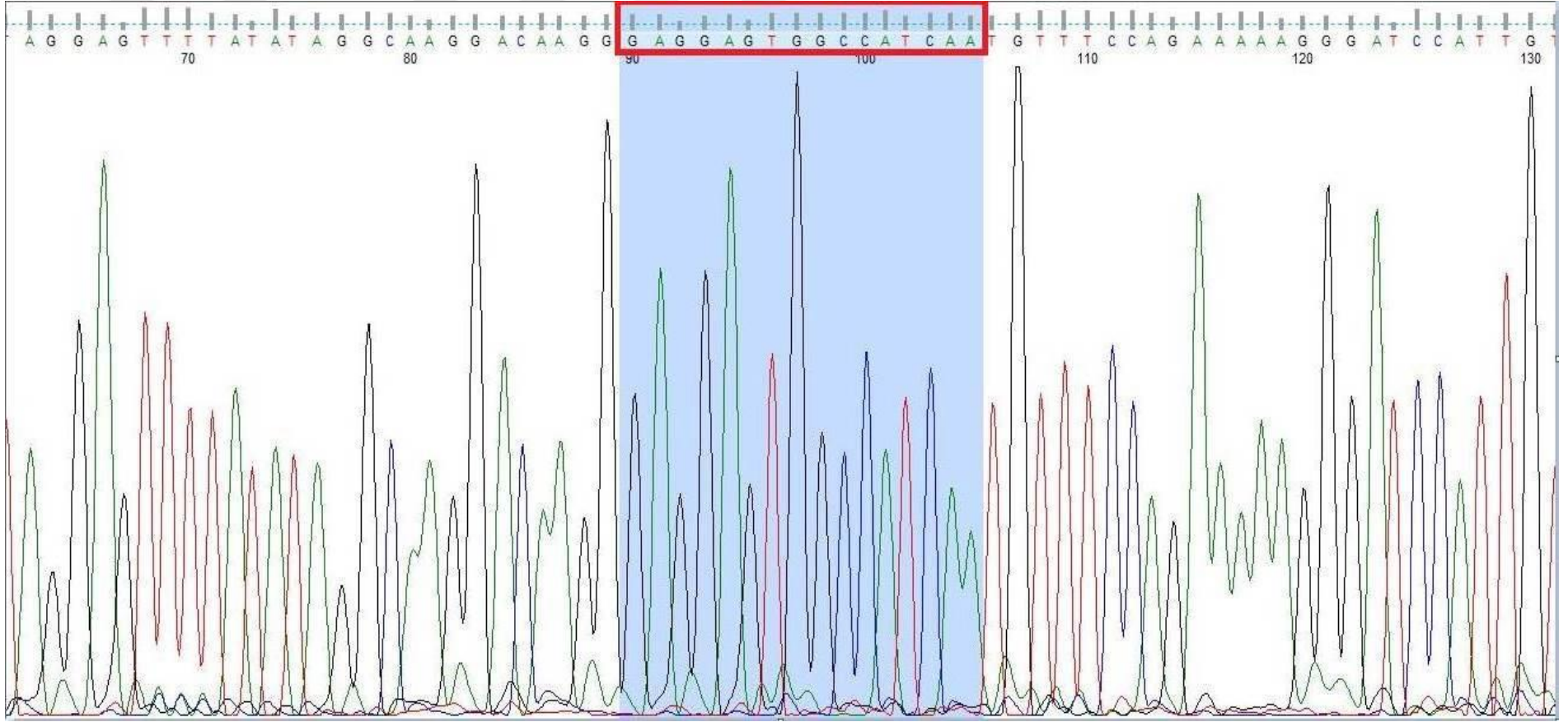
```
AAACATTTTCCACGTGCAAGGCACATAGACTAGT TTGTGATGTGAAGGGTTGGAA ACTAACC  
TATAA GGCCA GAGAGGTACAAATGCCAAAAGGACCAAGTGTAAATACAACAGGGTTAATGGA  
GACTGAAGTAATCTAGAGAGAATTGAATTTAAAGTGTCTATAAAGTTCTGTGAAGATAACAA  
AAAAAATGGCTGTATAGTCAATGTGGTGTGTATGCCTGCAAGTCTGTGATACTTGATTGAGT
```

Şekil 2.4 : CTGF geninin rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgesinin sekansı (Url-10). İleri ve geri primerlerin tanıdığı bölgeler mavi renkli kutucuğun içinde, MscI restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge kırmızı renkli kutucuğun içinde ve polimorfik nükleotit de kırmızı renkli olarak belirtilmektedir.

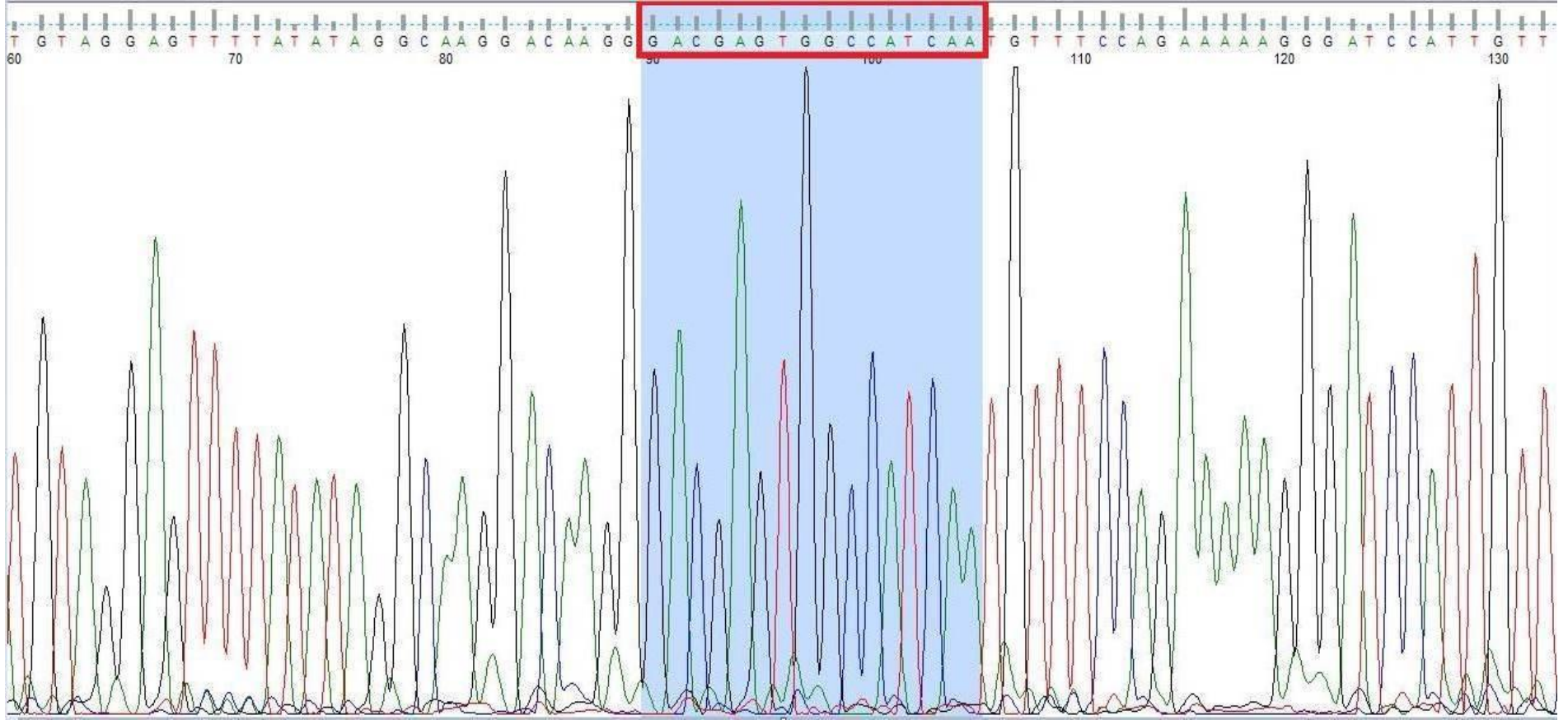
Standart polimeraz zincir reaksiyon protokolü, hedef SNP'yi içeren tek bir spesifik ürün elde edebilmek amacıyla optimize edildi. Farklı MgCl₂ konsantrasyonları (2.5 mM, 2.25 mM, 2 mM, 1.5 mM ve 1.25 mM), kalıp DNA miktarları (400 ng, 300 ng ve 200 ng), primer konsantrasyonları (20 pmol, 30 pmol ve 40 pmol) ve DMSO kullanımı ile en iyi sonuca ulaşmak için denemeler yapıldı. Optimize edilmiş PCR karışım içeriği Tablo 2.7'de listelenmektedir. Bölgeyi çoğaltmak için kullanılan optimize edilmiş termal döngü programı Tablo 2.8'de gösterilmektedir. Bu optimize koşulları elde edebilmek amacıyla gradient PCR tekniği kullanıldı ve primer bağlanması aşaması için farklı sıcaklıklar ile deneme yapıldı.

Tablo 2.7 : rs9399005C/T bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR karışımı.

İçerik	1 tüp için eklenen hacim	Stok konsantrasyonu	50 µl reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon
Steril Apirojen H ₂ O	değişken		
Amplifikasyon Tamponu	5 µl	10X	1X
MgCl ₂	5 µl	25 mM	2.5 mM
dNTP Karışımı	1 µl	10 mM	200 µM
DMSO	2.5 µl	100%	5%
İleri Primer	2 µl	10 pmol/µl	20 pmol (400 nM)
Geri Primer	2 µl	10 pmol/µl	20 pmol (400 nM)
Kalıp DNA	değişken	değişken	200 ng
Taq DNA Polimeraz	0.25 µl	5 U/µl	1.25 U



Şekil 2.5 : CTGF rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmi için RFLP ile homozigot yabancı tip (GG) genotipe sahip olduğuna karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürününün sekans görüntüsü.



Şekil 2.6 : CTGF rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmi için RFLP ile homozigot polimorfik (CC) genotipe sahip olduğuna karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürününün sekans görüntüsü.

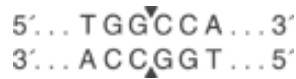
Tablo 2.8 : rs9399005C/T SNP bölgesinin PCR'ında kullanılan termal döngü programı.

İlk denatürasyon	94°C	3 dk.	} 40 döngü
Denatürasyon	95°C	30 sn.	
Primer bağlanması (Annealing)	57°C	20 sn.	
Sentez	72°C	50 sn.	
Son uzama	72°C	10 dk	

PCR sonucunda elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelendi. Bunun için, PCR ürünlerinin büyüklüğünün görülmesini sağlayacak yoğunlukta %2'lik bir agaroz jel 2.2.2.1 nolu bölümde anlatıldığı gibi hazırlandı. PCR ürününün 12 µl'si, 2 µl bromofenol mavisi içeren bir yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Aynı zamanda 50-1000 bç arasında bantlar veren bir DNA belirteci (50 bç'lik DNA ladder) de jele yüklenerek elde edilen bandın büyüklüğü tahmin edilebildi.

rs9399005C/T bölgesine ait PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimi ile kırılması

rs9399005C/T genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 2.7'de açıklanmıştır. PCR ürünleri *MscI* enzimi ile inkübe edilir; çünkü *MscI* enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:



rs9399005C/T polimorfizminde yabancı genotipteki (C) bir DNA'dan üretilen PCR ürününde bu bölge yoktur ve PCR ürünü *MscI* ile bekletildiğinde 191 bç'lik PCR ürününün kesilmesi beklenmez ve kırılma reaksiyonu ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelendiğinde 191 bç boyutunda tek bant şeklinde görünmelidir. Polimorfik genotipteki (T) bir DNA'dan üretilen PCR ürününde ise bu bölgenin dizisi değişmiştir ve *MscI* enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunur. 191 bç'lik PCR ürünü *MscI* ile bekletildiğinde PCR ürününün 155 bç ve 36 bç'lik iki parçaya ayrılması beklenir ve kırılma reaksiyonu ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelendiğinde 155 bç ve 36 bç boyutlarında iki ayrı bant şeklinde görünmelidir. Bu durumda kırılma ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda 191 bç boyunda tek bant görülüyorsa bu DNA'ya sahip bireyin bu bölge için yabancı homozigot genotipte (CC) olduğu

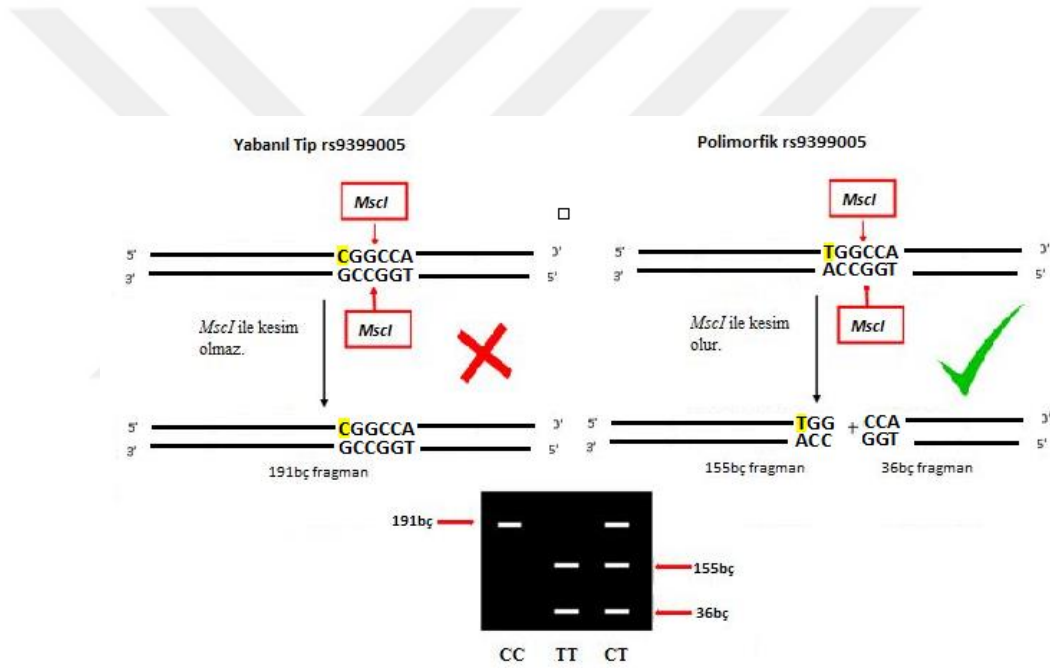
söylenbilir. Eğer 155 bç ve 36 bç boyutunda 2 bant görülüyorsa polimorfik homozigot (TT) olduğu söylenbilir. Eğer 191, 155 ve 36 bç boyutlarında 3 bant görülüyorsa o zaman bu birey heterozigottur (CT) denilebilir.

Kimyasallar

MscI restriksiyon endonükleaz enzimi, Tampon çözelti

Prosedür

Bu enzim fast-digest bir enzimdir ve inkübasyon süresi 15 dk olarak önerilmektedir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda rs9399005C/T bölgesinin PCR ürünlerinin *MscI* ile kesilmesinde en iyi sonuçların Tablo 2.9'daki içerik ile 37°C'de 45dk inkübe edilmesi ile elde edildiği belirlendi.



Şekil 2.7 : CTGF rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Tablo 2.9 : rs9399005C/T polimorfizmi için restriksiyon endonükleaz reaksiyonu karışımı bileşenleri.

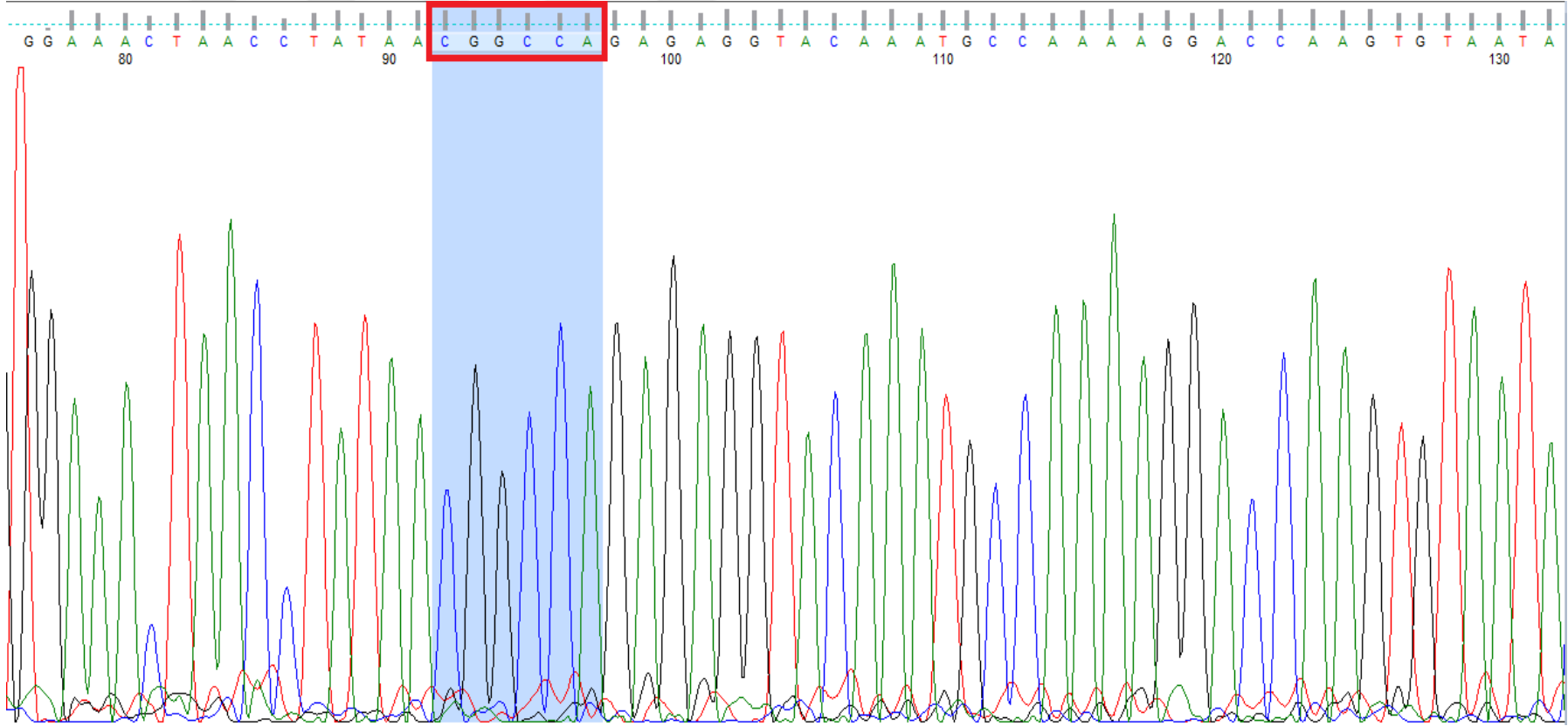
İçerik	Stok konsantrasyonu	1 tüp için eklenen hacim	30 µl reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon
Reaksiyon Tamponu	10X	3 µl	1X
<i>MscI</i>	5000 U/mL	1 µl	5 U
Apirojen distile H ₂ O		11 µl	
PCR ürünü	değişken	15 µl	değişken

İnkübasyonun sonunda restriksiyon ürünlerinin uzunluğunu analiz etmek için %2.5'lük agaroz jel 2.2.2.1 nolu bölümde anlatıldığı gibi hazırlandı. 50 bç DNA belirteci ve 15 µl restriksiyon ürünü jele yüklendi. Jel yaklaşık 90 dakika 120 voltta çalıştırıldı. Bu polimorfizm için de genotipi PCR/RFLP-agaroz jel yöntemi ile belirlenmiş olan, homozigot yabancı tip (CC) ve homozigot polimorfik genotipe (TT) sahip iki kişinin PCR ürünü seçilerek sekanslamaya yollandı. Sekanslama işlemi Applied Biosystems 310 DNA dizi analizi cihazında Ref-Gen firmasına yaptırıldı. Şekil 2.8'de de görülebileceği gibi RFLP ile homozigot yabancı tip (CC) genotipe sahip olduğuna karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürünüde beklenildiği gibi *MscI* için kesim bölgesi olarak tanınmayan CGGCCA dizisi görüldü. Şekil 2.9'da ise RFLP ile homozigot polimorfik genotipe (TT) sahip olduğuna karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürünüde beklenildiği gibi *MscI* için kesim bölgesi olarak tanınan TGGCCA dizisi görüldü. Bu sonuçlara göre RFLP sonucunda karar verilen genotiplerin doğruluğu teyit edildi.

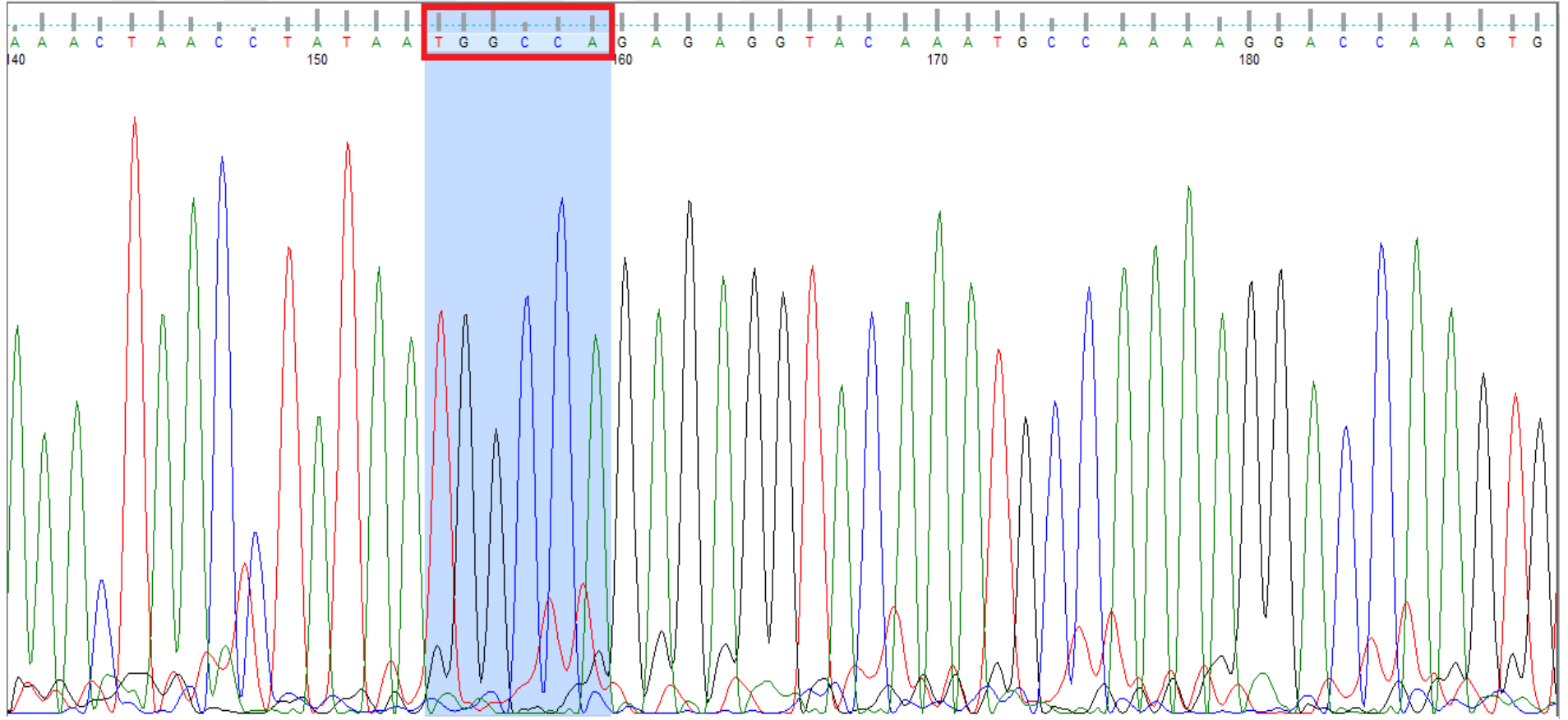
2.2.3 CTGF rs12526196T/C ve rs9402373C/G tek nükleotit polimorfizmlerinin eş zamanlı PCR metodu ile genotiplenmesi

CTGF genindeki rs12526196T/C ve rs9402373C/G SNP'lerinin genotiplenmesi eş zamanlı (real-time) PCR cihazında floresan işaretli alel spesifik TaqMan problemleri kullanılarak yapılmıştır. Bu SNP'ler için fonksiyonel olarak test edilmiş genotiplenme kiti piyasada mevcuttur ve Tablo 2.2'de TaqMan Assay numaraları verilmiştir. Bu genotiplenme çalışmaları Applied Biosystems, StepOnePlus Real-Time PCR Sistemleri cihazı kullanılarak yapıldı (Şekil 2.10). Bu yöntemde genotiplenme mastermiksi, genotiplenme kiti ve kit ile izole edilmiş genomik DNA'lar kullanıldı.

Mastermiksin içeriğinde AmpliTaq Gold® DNA Polimeraz, deoksiniükleotit trifosfatlar (dNTPs), pasif referans boyası olarak ROX™ ve tampon özellikleri sağlayacak maddeler bulunmaktadır. ROX boyası analiz sırasında reporter boyanın sinyalinin normalize edilmesini sağlar. Mastermiks için piyasada hem universal mastermiks hem de genotiplenme çalışmaları için kullanılan genotiplenme mastermiks alternatifleri bulunmaktadır. Bu çalışmada her ikisi ile de deneme yapıldı ancak sonrasında genotiplenme mastermiksinin kullanılmasına karar verildi.



Şekil 2.8 : CTGF rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmi için RFLP ile homozigot yabancı tip (CC) genotipe sahip olduğuna karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürününün sekans görüntüsü.



Şekil 2.9 : CTGF rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmi için RFLP ile homozigot polimorfik tip (TT) genotipe sahip olduğuna karar verilen kişinin DNA'sından elde edilen PCR ürününün sekans görüntüsü.



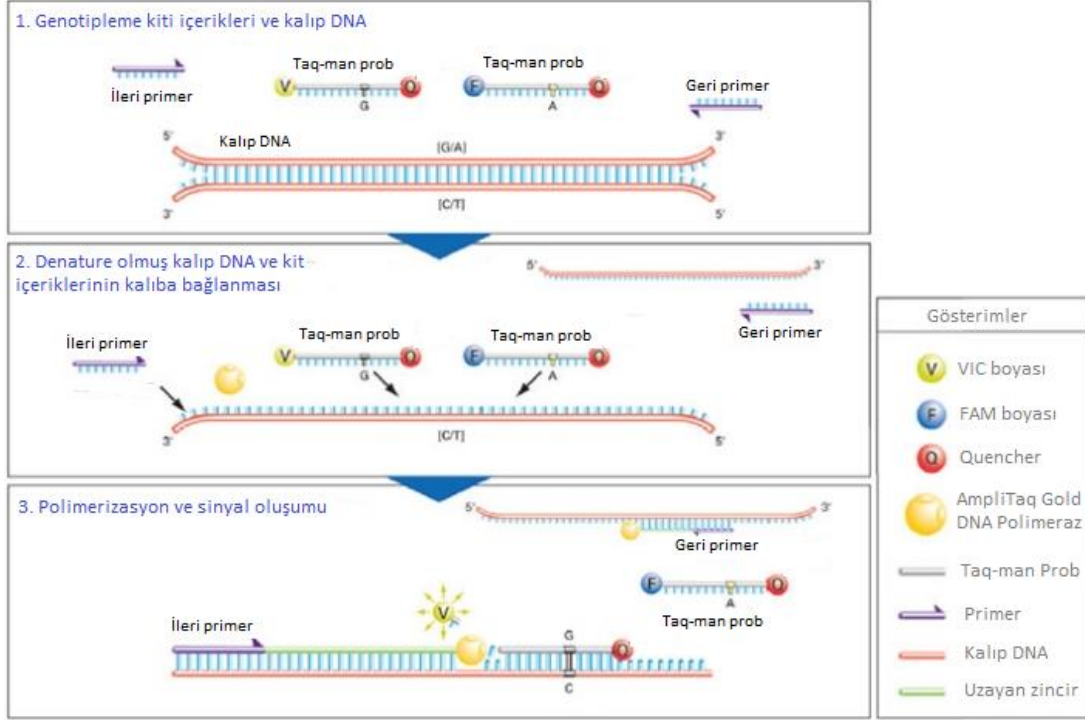
Şekil 2.10 : Applied Biosystems, StepOnePlus Real-Time PCR Sistemleri ve cihaza uygun 96 kuyucuklu plaka.

Genotipleme kitleri polimorfik bölgelere özel olarak üretilir. Bu kitlerin herbirinin içerisinde polimorfik bölgeyi içeren dizinin sınırlarını belirleyen ileri ve geri primerler vardır. Bunlar PCR işlemi sırasında bu bölgenin çoğaltılabilmesini sağlar. Aynı zamanda her analiz kitinin içerisinde ait olduğu polimorfik bölgeye özel 2 tip floresan işaretli TaqMan prob bulunmaktadır. Bu problemlerden biri polimorfik nükleotidin olduğu bölgeyi tanıyıp bağlanır, diğeri ise yabancı tip in olduğu bölgeyi tanıyıp bağlanır. Bu problemlerin 5' ucuna bağlı reporter boya bulunmaktadır ve bu boyalar iki prob için birbirinden farklı boyalardır (Şekil 2.11). Bu çalışmada kullanılan kitlerde FAM ve VIC boyaları bulunmaktadır ve her biri her kit için farklı bir aleli temsil eder. Bu çalışmada FAM ve VIC boyalarının temsil ettiği aleller Tablo 2.10'daki gibidir.

Tablo 2.10 : Çalışılan SNP bölgelerine göre FAM ve VIC boyalarının temsil ettiği aleller.

Polimorfizm adları	Buldukları bölge	FAM	VIC
rs12526196T/C	1. intron	T	C
rs9402373C/G	3. intron	G	C

Bu boyalar serbest haldeyken ışığa verir ancak proba bağlı iken, probun diğer ucunda bağlı olan quencher bu boyayı baskılar ve ışığa vermesini engeller. PCR işlemi sırasında amplifikasyon gerçekleşirken Taq polimeraz enzimi reporterın bağlı olduğu bölgeye geldiğinde endonükleaz aktivitesi ile reporter boyayı bağlı olduğu yerden koparıp serbest bırakır. Serbest kalan reporter boya da ışığa yapar (Şekil 2.11).



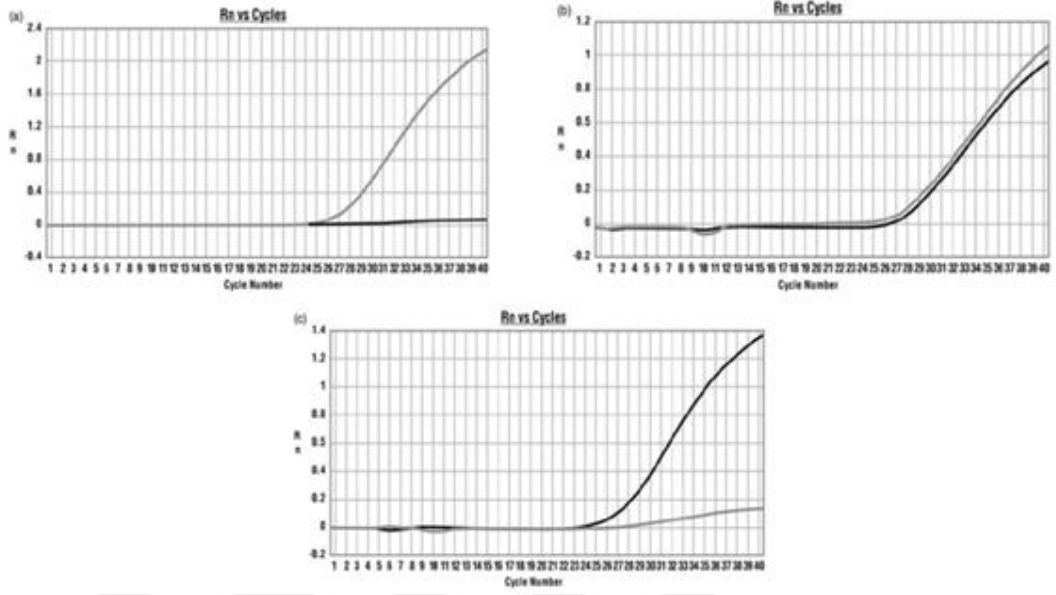
Şekil 2.11 : TaqMan problemlerinin ve ileri/geri primerlerin genomik DNA'ya bağlanması ve amplifikasyon sırasında boyanın ayrılıp ışımaya vermesi.

Bu ışımalar PCR işlemi sırasında eş zamanlı olarak yazılım programı tarafından kaydedilir ve takip etmemize olanak sağlar. Yazılım programı hem PCR döngüsünü hem de sonuçları anlık görüntülemeye olanak sağlar. Reaksiyon sonucunda da amplifikasyon eğrilerine göre örneklerin genotiplerini belirler ve bu genotiplere göre alelik ayırma grafiği oluşturarak tüm örnekleri tek bir grafikte görüntülememizi sağlar. Şekil 2.12'de gösterildiği gibi amplifikasyon eğrisinden genotipler şu şekilde belirlenir; eğer örneğin genotipinde FAM boyasının bağlı olduğu probun sekansına uyan alel homozigot olarak varsa sadece FAM boyası peak verir; eğer VIC boyasının bağlı olduğu probun sekansına uyan alel homozigot olarak varsa sadece VIC boyası peak verir; eğer heterozigot birey ise ikisi birden peak verir.

2.2.3.1 rs12526196T/C tek nükleotit polimorfizminin eş zamanlı PCR metodu ile genotiplenmesi

Bu bölgenin genotiplemesinde kullanılan kitin numarası Tablo 2.2'de ve boyaların hangi aleli temsil ettiği Tablo 2.10'da belirtilmiştir. Bu malzemeler ile öncelikle aynı DNA'lar için 25 µl ve 10 µl'lik reaksiyon karışımları hazırlanarak reaksiyon gerçekleştirildi ve sonuçlar karşılaştırılarak hangisinde daha iyi sonuç alındığı

değerlendirildi. Deneme sonucunda 10 µl karışım ile iyi sonuçlar alınabildiği görüldüğü için çalışmalara bu şekilde devam edildi.



Şekil 2.12 : a. FAM boyalı proba uygun alel olduğundaki eğri. b. Her iki boyanın da olduğu problara uygun alellere olduğundaki eğri. c. VIC boyalı proba uygun alel olduğundaki eğri.

Malzemeler

Mastermiks, Floresan işaretli alel spesifik genotipleme kiti, Genomik DNA

Prosedür

Tablo 2.11 baz alınarak mastermiks ile genotipleme kiti örnek sayısına uygun hesaplamalar yapılarak karıştırıldı ve cihaza uygun 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına eşit miktarda dağıtıldı. Daha sonra uygun konsantrasyonda hazırlanan genomik DNA'lar duplike olarak kuyucuklara eklendi ve 2 kuyucuğa da negatif kontrol olarak içerisinde DNA olmayan saf su eklendi. Genomik DNA'lar, Qiagen DNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilen DNA'lardan seyreltme yapılarak hazırlandı. Plakanın üzeri bu amaca uygun alınmış olan yapışkan ile düzgünce kapatıldı. Plaka 1000 rpm'de 2 dk süreyle santrifuj edildi ve sonrasında cihazın içerisine yerleştirildi. StepOne Software v2.3 yazılım programına Tablo 2.12'deki PCR döngüsü yazılarak reaksiyon başlatıldı. StepOne Software v2.3 programı okumaları yapıp grafikleri çizerek örneklerin genotiplerini belirledi. Program

tarafından otomatik belirlenemeyen genotipler grafikler incelenerek manuel olarak belirlendi.

Tablo 2.11 : Eş zamanlı PCR için reaksiyon karışımı içerikleri.

İçerik	Stok konsantrasyonu	1 tüp için eklenen hacim	10 µl reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon
Mastermiks	2X	5 µl	1X
Genotipleme kiti	20X	0.5 µl	1X
Genomik DNA	değişken	4.5 µl	0.8 ng/µl

Tablo 2.12 : rs12526196T/C bölgesinin eş zamanlı PCR döngüsü.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü
PCR öncesi okuma (Pre-PCR reading)	60°C	30 saniye	Bekleme
AmpliTaQ Gold®, UP, enzim aktivasyonu	95°C	10 dakika	Bekleme
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40 döngü
Yapışma ve uzama	60°C	1 dakika	
PCR sonrası okuma (Post-PCR reading)	60°C	30 saniye	Bekleme

2.2.3.2 rs9402373C/G tek nükleotit polimorfizminin eş zamanlı PCR metodu ile genotiplenmesi

Bu bölgenin genotiplenmesinde kullanılan kitin numarası Tablo 2.2’de ve boyaların hangi aleli temsil ettiği Tablo 2.10’da belirtilmiştir. Bu malzemeler ile öncelikle aynı DNA’lar için 25 µl ve 10 µl’lik reaksiyon karışımları hazırlanarak reaksiyon gerçekleştirildi ve sonuçlar karşılaştırılarak hangisinde daha iyi sonuç alındığı değerlendirildi. Deneme sonucunda 10 µl karışım ile iyi sonuçlar alınabildiği görüldüğü için çalışmalara bu şekilde devam edildi.

Malzemeler

Mastermiks, Floresan işaretli alel spesifik genotipleme kiti, Genomik DNA

Prosedür

Tablo 2.13 baz alınarak mastermiks ile genotipleme kiti örnek sayısına uygun hesaplamalar yapılarak karıştırıldı ve cihaza uygun 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına eşit miktarda dağıtıldı. Daha sonra uygun konsantrasyonda hazırlanan genomik DNA’lar duplike olarak kuyucuklara eklendi ve 2 kuyucuğa da negatif kontrol olarak içerisinde DNA olmayan saf su eklendi. Genomik DNAlar, Qiagen

DNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilen DNA'lardan seyreltme yapılarak hazırlandı. Plakanın üzeri bu amaca uygun alınmış olan yapışkan ile düzgünce kapatıldı. Plaka 1000 rpm'de 2 dk süreyle santrifuj edildi. Plaka cihazın içerisine yerleştirildi ve StepOne Software v2.3 yazılım programına Tablo 2.14'teki PCR döngüsü yazılarak reaksiyon başlatıldı. StepOne Software v2.3 programı okumaları yapıp grafikleri çizerek örneklerin genotiplerini belirledi. Program tarafından otomatik belirlenemeyen genotipler grafikler incelenerek manuel olarak belirlendi.

Tablo 2.13 : Eş zamanlı PCR için reaksiyon karışımı içerikleri.

İçerik	Stok konsantrasyonu	1 tüp için eklenen hacim	10 µl reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon
Mastermiks	2X	5 µl	1X
Genotipleme kiti	20X	0.5 µl	1X
Genomik DNA	değişken	4.5 µl	0.8 ng/µl

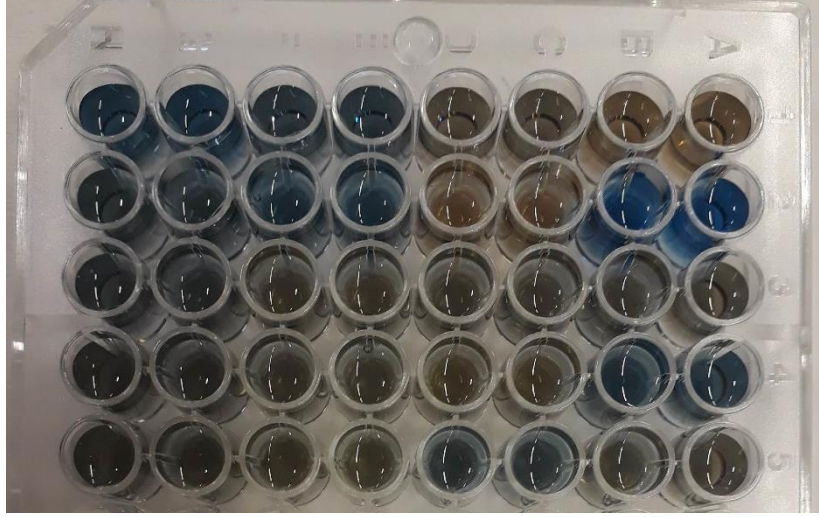
Tablo 2.14 : rs9402373C/G bölgesinin eş zamanlı PCR döngüsü.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü
PCR öncesi okuma (Pre-PCR reading)	60°C	30 saniye	Bekleme
AmpliTaQ Gold [®] , UP, enzim aktivasyonu	95°C	10 dakika	Bekleme
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40 döngü
Yapışma ve uzama	60°C	1 dakika	
PCR sonrası okuma (Post-PCR reading)	60°C	30 saniye	Bekleme

2.3 Aközde Total Protein ve CTGF Miktar Tayini İçin Kullanılan Metotlar

2.3.1 Aközde total protein miktar tayini

Gönüllülerden alınmış olan aköz örneklerinde total protein tespiti yapılarak CTGF proteininin aközde hangi oranda bulunduğunu tespit etmek bu çalışmanın amaçlarından biri idi. Total protein tespit etme yöntemleri arasından pratik uygulanabilirliği olan ve güvenilir sonuçlar verdiği düşünülen Bradford yöntemi kullanıldı. Düşük konsantrasyonlarda oldukça duyarlı olan bu yöntemde esas olan organik boyalar ile proteinlerin asidik ve bazik gruplarının etkileşerek renk oluşturmasıdır. Proteinlerdeki aminoasitler boya ile etkileştiğinde mavi renk oluşturur ve 595 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon verir (Şekil 2.13)



Şekil 2.13 : Bradford kiti kullanılarak hazırlanan plaka ve konsantrasyonlara göre renk değişimi.

Çalışmaya başlamadan önce bir literatür araştırması yapılarak aközde ölçülmüş olan total protein miktarları karşılaştırıldı. Bu verilere göre en düşük total protein konsantrasyonu 20 $\mu\text{g/ml}$, en yüksek total protein konsantrasyonu ise 1370 $\mu\text{g/ml}$ 'di. Kullanılan Bradford kitinin çalışma aralığı 100-1500 $\mu\text{g/ml}$ 'di. Hasta ve kontrollerin total protein konsantrasyonu ölçümlerinin ilk grubunda aköz örnekleri 2 kat seyreltilerek kullanıldı. Örneklere uygulanan seyreltme ve literatür araştırması verileri dikkate alınarak kitin standartlarında da buna uygun aralıklar seçildi. Ancak bazı örnekler bu limitin altında kalarak sonuç vermedi bu nedenle diğer örneklerde seyreltme yapılmadan kullanılmasına karar verildi.

Prosedür

Bradford kitinin standardı olarak kullanılan BSA solüsyonunun konsantrasyonu 2 ng/ml idi. Bu stoktan uygun seyreltmeler yapılarak aşağıdaki standartlar hazırlandı.

Bu standartların konsantrasyonları aşağıdaki gibiydi;

ST1: 12.5 $\mu\text{g/ml}$

ST2: 125 $\mu\text{g/ml}$

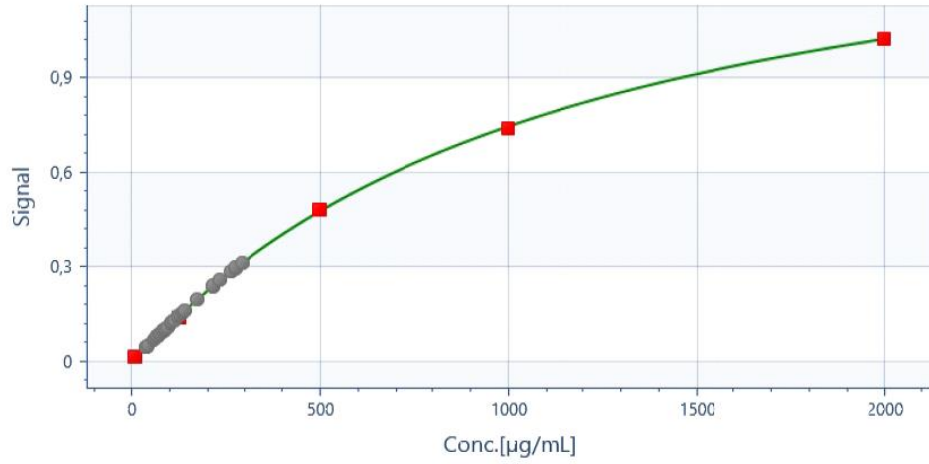
ST3: 500 $\mu\text{g/ml}$

ST4: 1000 $\mu\text{g/ml}$

ST5: 2000 $\mu\text{g/ml}$

Aköz örnekleri -80°C dolabından çıkartılarak oda sıcaklığına getirildi ve daha sonra seyreltme uygulanacak olanlara 2 kat seyreltme uygulanarak kullanıma hazır hale getirildi. Seyreltme yapılmayanlar direkt kullanıldı. Ölçümler plaka okuyucuda yapılacağından buna uygun 96 kuyucuklu bir plaka kullanıldı. Her standart ve örnekten 2'şer kuyucuğa 5'er µl koyuldu. Yapılabilecek olan bireysel hataların sonucu etkilememesi için duplike olarak çalışıldı. Daha sonra standart ve örneklerin üzerine 250 µl Coomassie mavisi solüsyonu koyularak hızlıca plaka okuyucuda 595 nm'de ölçümleri alındı.

Ölçümleri yapmak için MultiSkan Thermo Fisher Scientific cihazı kullanıldı. Cihaz içindeki SkanIt programı ile alınan ölçümler sonucu standart eğri çizildi ve örneklerin konsantrasyonları hesaplandı (Şekil 2.14).



$$y = 1,56152 + ((0,00217396 - 1,56152) / (1 + (x/1087,23)^1,05982))$$

R²: 1

Şekil 2.14: Aköz örneklerinde total protein ölçümü için kullanılan Bradford yöntemi sonucu elde edilen standart eğri ve bu eğri üzerinde örneklerin gösterimi.

2.3.2 Aközde CTGF miktar tayini

Aköz örneklerinde CTGF miktarını ölçmek için ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde prensip olarak öncelikle analizi yapılmak istenen proteine özgü bir antikor plakaya sabitlenir. Bu antikorun analiz edilecek proteine olan spesifitesi oldukça önemlidir. Hedef protein dışındaki proteinlerle bir bağ kurmamalıdır (Bu çalışmada kullanılan kitin plakası, üretici firma tarafından önceden antikorunu sabitlenerek hazırlanmış, insan CTGF proteinine özgü bir plakaydı). Sabitlenen antikor üzerine hedef proteinin olduğu analiz edilecek örnek

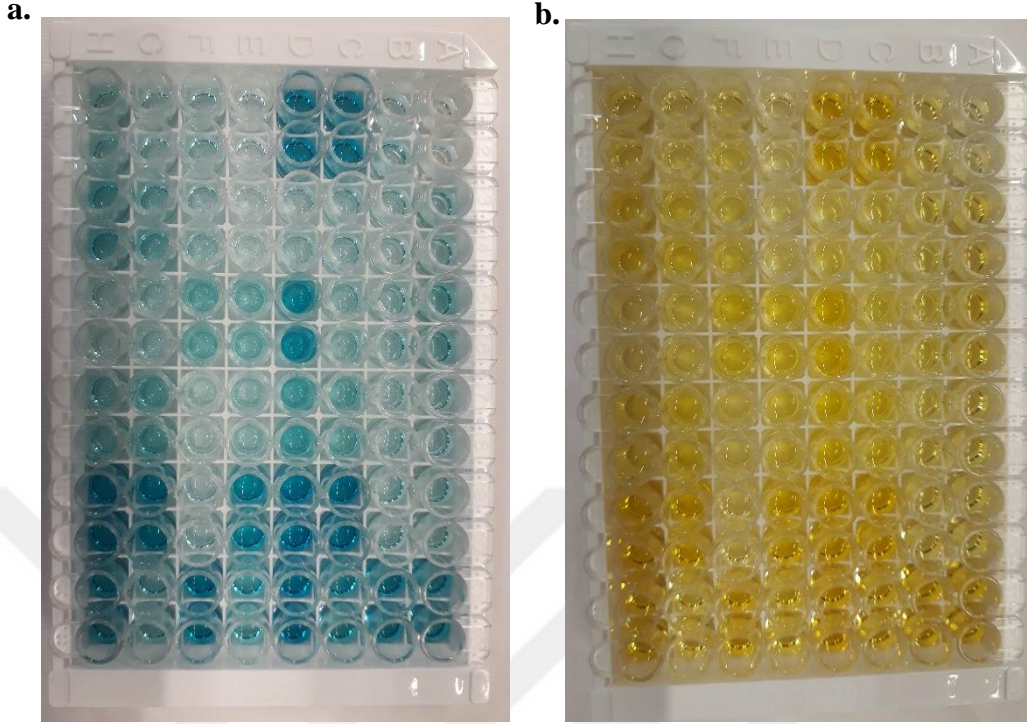
gönderilerek inkübasyon yapılır ve antikor ile protein arasında bağ kurulması sağlanır. Daha sonra yıkama yapılarak bağlanmayan proteinlerden ve ortamdaki diğer maddelerden kurtulunur. Plakada sadece antikor ve bağlandığı hedef proteinlerin kalması için bu aşamada yıkama oldukça önemlidir. Eğer istenmeyen moleküller ve proteinler yeterince temizlenemezse sonuçlarda hata olur. Yıkama tamamlandıktan sonra yine hedef proteini tanıyan bir antikor çözeltisi ile inkübasyon yapılır. Bu aşamada antikorlar plakada bağlı kalmış olan proteinlere bağlanır. İnkübasyon bitince tekrar yıkama yapılarak bağlanmamış antikorlar ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra HRP (horse radish peroxidase)-Streptavidin bulunan bir çözelti ile inkübasyon yapılır. Bu molekül streptavidin sayesinde ikincil antikor ile bağ kurar. İnkübasyondan sonra yıkama yapılır ve substrat solüsyonu ile inkübasyon yapılır. Bu aşamada gönderilen substrat peroksidaz enzimi (HRP) tarafından renkli (mavi) bir ürüne dönüştürülür. Işığa duyarlı olduğu için bu reaksiyonun karanlıkta gerçekleşmesi gereklidir. Kuyucuklardaki hedef protein miktarına göre oluşan renk yoğunluğu değişkenlik gösterir. Yeterli inkübasyon sağlandıktan sonra reaksiyonu durdurmak için stop solüsyonu eklenir ve kuyucuklardaki renk (maviden sarıya) değişir (Şekil 2.15). Daha sonra uygun dalga boyunda okumaları yapılır. Her plaka için konsantrasyonları bilinen standartların da ölçümü alınarak bir standart eğri oluşturulur ve bilinmeyen örneklerin konsantrasyonu da bu eğriye göre hesaplanır.

Bunun için öncelikle aközdeki CTGF miktarı ile ilgili literatür araştırması yapıldı. Ayrıca alınabilen aköz örneklerinin miktarları da kişiler arasında değişkenlik gösteriyordu ve farklı seyreltmeler uygulamak gerekliydi. Bu durumlar göz önünde bulundurularak uygun olabilecek bir insan CTGF ELISA kiti seçildi. Alınan kitin içindeki ELISA plakası CTGF'ye özel önceden hazırlanmış bir plakaydı. CTGF'ye spesifik olarak bağlanan ilk antikor, üretici firma tarafından plakanın kuyucuklarına sabitlenmişti. Daha sonraki basamaklar kitin alındığı firmanın önerdiği prosedüre uygun olarak gerçekleştirildi ve ölçümler yapıldı.

Prosedür

Aköz örnekleri -80°C dolabından çıkartılarak oda sıcaklığına getirildi ve daha sonra 4-16 kat arası seyreltme uygulanarak ölçüme hazırlandı. ELISA kiti de 4°C dolabından

çıkartılarak oda sıcaklığına getirildi ve solüsyonları kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde hazırlandı.



Şekil 2.15 : a. ELISA plakasında substrat ile inkübe edilmiş standart ve örneklerin görüntüsü. b. a'daki kuyucukların üzerine stop solüsyonu eklendiğinde görülen renk değişimi.

Kitin içerisindeki liyofilize standartlardan biri kitin içinde bulunan 1ml örnek tamponu ile çözüldü. Daha sonra kullanılacak standartların konsantrasyonlarına göre seyreltildi. Kitin en düşük sınırı 62.5 pg/ml, en yüksek sınır ise 4000 pg/ml'di. Buna göre;

ST1: 62.5 pg/ml

ST2: 250 pg/ml

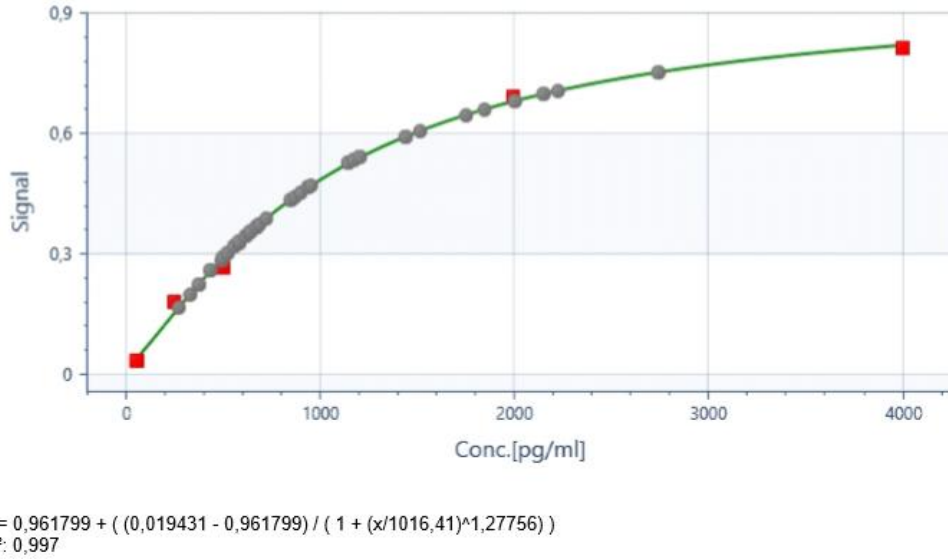
ST3: 500 pg/ml

ST4: 2000 pg/ml

ST5: 4000 pg/ml = Stok standart

Kör olarak örnek tamponu kullanıldı. Standartlar, kör ve örnekler duplike olacak şekilde ELISA plakasının kuyucuklarına 100'er µl eklendi ve plakanın üstü yapışkan ile kapatılarak 37°C 50 rpm'de 90 dk inkübe edildi. İnkübasyon bitince plakanın içindekiler dökülerek boşaltıldı ve 2 kez yıkama yapıldı. Yıkanmış kuyucuklara kılavuza uygun olarak hazırlanmış antikor solüsyonundan 100'er µl eklendi ve plakanın üstü yapışkan ile kapatılarak 37°C 50 rpm'de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon

bitince plakanın içindekiler dökülerek boşaltıldı ve 3 kez yıkama yapıldı. Yıkamış kuyucuklara kılavuza uygun olarak hazırlanmış HRP-streptavidin konjugat solüsyonundan 100'er µl eklendi ve plakanın üstü yapışkan ile kapatılarak 37°C 50 rpm'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon bitince plakanın içindekiler dökülerek boşaltıldı ve her yıkama arasında 2-3 dk beklenerek 5 kez yıkama yapıldı. Yıkamış kuyucuklara TMB substrat solüsyonundan 90'ar µl eklendi ve plakanın üstü yapışkan ile kapatılarak ve alüminyum folyo ile kaplanarak 37°C 50 rpm'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon bitince reaksiyonu durdurup ölçüm yapabilmek için kuyucuklara 50'şer µl stop solüsyonu eklendi ve 1-2 dakika içinde MultiSkan cihazında 450 nm'de ölçümleri alındı. Cihaz içindeki SkanIt programı ile alınan ölçümler sonucu standart eğri çizildi ve örneklerin konsantrasyonları hesaplandı (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 : Aköz örneklerinde CTGF konsantrasyonu ölçümü için kullanılan ELISA yöntemi sonucu elde edilen standart eğri ve bu eğri üzerinde örneklerin gösterimi.

2.4 Gözyaşında Total Protein ve CTGF Miktar Tayini İçin Kullanılan Metotlar

2.4.1 Gözyaşı striplerinden protein ekstraksiyonu

Gönüllülerden gözyaşı örnekleri Schirmer stripleri kullanılarak alındı. Bunların analizini yapabilmek için öncelikle proteinleri Schirmer kâğıtlarından geri kazanmak önemliydi. Bunun için literatür araştırması yapılarak farklı yöntemler bulundu (Denisin ve diğ., 2012; Shoji ve diğ., 2003; Paulett ve diğ., 2008) ve birkaç tanesi

kullanılarak denemeler yapıldı. Bu denemeler sonucu tek bir yöntem yerine birkaç yöntemin modifiye edilmiş halinin uygulanmasına karar verildi. Bu denemeler sırasında striplere bilinen miktarda CTGF proteini emdirilerek daha sonra ekstrakte edilip ELISA ile miktar tayini yapıldı. Kullanılmaya karar verilen modifiye yöntemde bulunan konsantrasyon, stripe emdirilen sıvının konsantrasyonuna en yakın değeri.

Prosedür

Gözyaşı örnekleri -80°C dolabından çıkartılarak oda sıcaklığına getirildi. Ekstraksiyon tamponu (PBS, NaCl, Tween® 20, pH 7.4) da +4°C dolabında saklandığı için onun da oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Gözyaşı stripleri kesilerek 2 ml'lik mikrotüplere koyuldu ve üzerine ekstraksiyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 50 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 5 dk santrifuj edildi ve -20°C'ye kaldırıldı. Ertesi sabah tekrar 5 dk santrifuj edildi ve örnek olarak kullanıldı.

2.4.2 Gözyaşında total protein miktar tayini

Gözyaşı striplerinden ekstraksiyon yapıp örnekler hazırlandıktan sonra öncelikle total protein analizi yapıldı. Bunun için aközde anlatılan Bradford yöntemi kullanıldı. Gözyaşındaki total protein ile ilgili yapılan literatür araştırması sonucu kullanılacak standartların konsantrasyonlarına karar verildi.

Gözyaşı örneklerinin 3 kat seyreltilerek kullanılması denemeler sonucu uygun bulundu. Bu nedenle gözyaşı örneklerinden 5 µl alınıp 3 kat seyreltme yapıldı. Daha sonra Bradford yöntemi ile ölçümleri yapıldı ve total protein konsantrasyonları belirlendi.

2.4.3 Gözyaşında CTGF miktar tayini

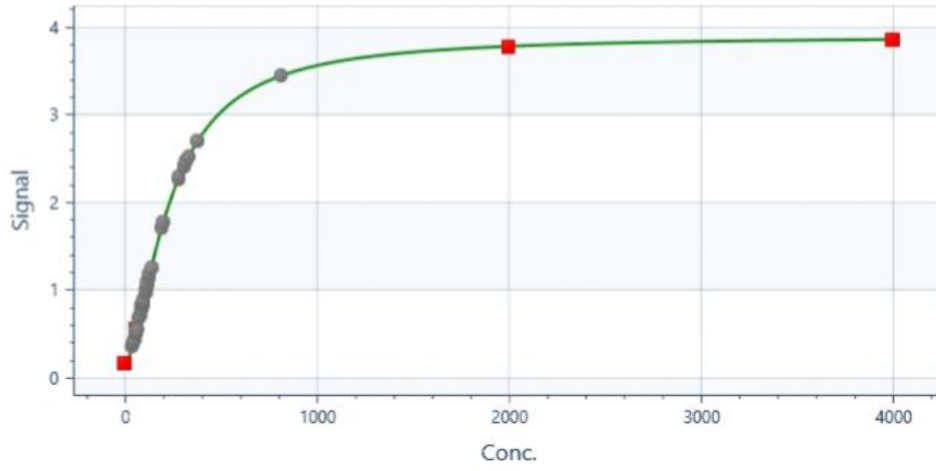
Gözyaşındaki CTGF konsantrasyonunu belirlemek için de ELISA yöntemi kullanıldı. Ekstre edilmiş gözyaşı örnekleri oda sıcaklığına getirildi ve seyreltme uygulanmadan ölçümlerde direkt kullanıldı. ELISA kiti de 4°C dolabından çıkartılarak oda sıcaklığına getirildi ve solüsyonları kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde hazırlandı. Kitin içerisindeki liyofilize standartlardan biri kitin içinde bulunan 1 ml örnek tamponu ile çözüldü. Daha sonra kullanılacak standartların konsantrasyonlarına göre seyreltildi. Kitin en düşük sınırı 62.5 pg/ml, en yüksek sınır ise 4000 pg/ml'di. Buna göre;

ST1: 62.5 pg/ml

ST2: 2000 pg/ml

ST3: 4000 pg/ml = Stok standart

Kör olarak örnek tamponu kullanıldı. Standartlar, kör ve örnekler duplike olacak şekilde ELISA plakasının kuyucuklarına 100'er µl eklendi ve prosedürün devamına 2.3.2 nolu bölümde anlatıldığı gibi devam edildi. Cihaz içindeki SkanIt programı ile alınan ölçümler sonucu standart eğri çizildi ve örneklerin konsantrasyonları hesaplandı (Şekil 2.17).



$$y = 3,9067 + ((0,176 - 3,9067) / (1 + (x/237,705)^{1,60725}))$$

R²: 1

Şekil 2.17 : Gözyaşı örneklerinde CTGF konsantrasyonu ölçümü için kullanılan ELISA yöntemi sonucu elde edilen standart eğri ve bu eğri üzerinde örneklerin gösterimi.

2.5 İstatistiksel analiz

Sürekli değişkenler (yaş, aközde ve gözyaşında total protein ve CTGF konsantrasyonları) ortalama±SD (standart deviation) ve medyan (InterQuartile Range-IQR) olarak verildi. Sürekli değişkenlerin normal dağılım gösterip göstermediğini incelemek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Burada significance değeri (P value) 0.05'ten büyük olanların normal dağıldığı, 0.05'ten küçük olanların ise normal dağılmadığı kabul edildi. Normal dağılan parametrelerin karşılaştırılmasında ANOVA testi, normal dağılmayanlar için ise Kruskal-Wallis H testi uygulandı. Analizler sonucunda da P değeri 0.05'ten küçük olanlar anlamlı farka sahip olarak değerlendirildi. ANOVA testi istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç

verdiğinde post-hoc testi uygulandı, bunun için Games-Howell ya da Bonferroni testi seçildi. Kruskal-Wallis testi anlamlı sonuç verdiğinde ise ikili gruplar arasındaki fark hesabı için Conover (1980) formülü kullanıldı.

Kategorik değişkenler (cinsiyet, genotip ve alel frekansları) yüzde veya oran şeklinde ifade edildi. Hasta-kontroller arasında genotip ve alel frekansı karşılaştırması yapmadan önce gözlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyup uymadığına χ^2 testi ile bakıldı. Ardından hasta ve kontrollerin genotip ve alel frekanslarındaki farklılıklar χ^2 testi ile belirlendi. χ^2 testi ile OR (Odds Ratio) değerleri hesaplandı ve anlamlı fark çıkan sonuçlar bu değere göre yorumlandı. Odds bir durumun olma olasılığı ile olmama olasılığı arasındaki ilişkiyi gösterir. Odds hesaplamak için bir durumun olma olasılığı, olmama olasılığına bölünür. Eğer 2 ayrı odds değeri birbirine oranlanırsa odds oranı (odds ratio, OR) elde edilir. OR değeri etki büyüklüğünün bir ölçüsüdür ve aldığı değere göre yorumlaması şöyle yapılabilir;

- OR = 1 olduğunda söz konusu etkenin (referansa göre) araştırılan durumun olasılığını artırıcı veya azaltıcı bir etkisi yok denilebilir.
- OR < 1 olduğunda söz konusu etkenin (referansa göre) araştırılan durumun olasılığını azaltıcı bir etkisi vardır.
- OR > 1 olduğunda söz konusu etkenin (referansa göre) araştırılan durumun olasılığını artırıcı bir etkisi vardır (Bland ve Altman, 2000).

Yukarıda bahsedilen analizler dışında gözyaşı ve aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu, ve total protein içindeki CTGF oranının SNP bölgeleri ile korelasyon analizi yapıldı. Ayrıca gözyaşı ve aközdeki CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu, ve total protein içindeki CTGF oranının birbiri ile korelasyonu da değerlendirildi. Tüm çalışma grubu ve gözyaşı grubu için PEG ve PES için risk faktörü olabilecek parametreler ile birkaç farklı model oluşturularak ikili lojistik (binary logistics) ile lojistik regresyon analizi yapıldı. Her modeldeki eş değişkenlerin eş lineerlikleri regresyon uygulamadan önce kontrol edildi, modellerde eş lineerlik görülmedi.

P değeri 0.05'ten küçük olduğunda bulgular istatistiksel olarak anlamlı sayıldı. Bahsedilen bu istatistiksel analizler için SPSS 15.0 paket programı kullanıldı.



3 BULGULAR

3.1 Çalışma Grubu

Bu çalışma kapsamında bugüne kadar Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Servisi'nce 213 PEG hastası, 214 PES hastası ve 215 kontrol bireyin tam kan örnekleri toplandı ve TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Teknoloji Merkezi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'ndeki 202 no'lu laboratuvarımıza getirildi. Bu grubun demografik bilgileri aşağıdaki Tablo 3.1'de verilmektedir. Tüm çalışma grubu bilgileri EK 2'de listelenmektedir.

Tablo 3.1 : PES hastası, PEG hastası ve kontrol bireylerin demografik bilgileri.

	PEG hastası (n=213)	PES hastası (n=214)	Kontrol (n=215)	P
Yaş	72.01±7.40	73.41±8.05	72.06±8.30	0.056
Cinsiyet				0.019 ^a
erkek/kadın	126/87	114/100	98/117	0.005 ^b
erkek %	59.15	53.27	45.58	0.111 ^c
				0.220 ^d
Diyabet, n (%)	54 (25.35)	59 (27.57)	56 (26.05)	0.868 ^a
				0.869 ^b
				0.721 ^c
				0.603 ^d
Kalp hastalığı, n (%)	56 (26.29)	65 (30.37)	65 (30.23)	0.573 ^a
				0.365 ^b
				1.000 ^c
				0.349 ^d
Hipertansiyon, n (%)	105 (49.30)	104 (48.60)	103 (47.91)	0.960 ^a
				0.774 ^b
				0.886 ^c
				0.885 ^d
Sigara, n (%)	30 (14.08)	31 (14.49)	39 (18.14)	0.443 ^a
				0.254 ^b
				0.305 ^c
				1.000 ^d
İnme, n (%)	3 (1.41)	3 (1.40)	10 (4.65)	0.087 ^b
				0.087 ^c
				1.000 ^d

Yaş karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile, inme karşılaştırması Fisher exact test ile, diğer karşılaştırmalar χ^2 testi ile yapılmıştır. a: 3 grubun karşılaştırması, b: PEG vs. Kontrol, c: PES vs. Kontrol, d: PEG vs. PES

Yaş ortalaması PEG hastalarında 72.01 ± 7.40 , PES hastalarında 73.41 ± 8.05 ve kontrollerde 72.06 ± 8.30 olarak belirlendi ($P=0.056$). PEG grubundaki erkeklerin kadınlara oranı kontrol grubuna göre anlamlı seviyede yüksek bulundu ($P=0.005$). Diğer gruplar arasında ise cinsiyet dağılımı açısından anlamlı bir fark görülmedi. Çalışma grubunun diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme gibi diğer demografik bilgilerinde gruplar arasında anlamlı sayılabilecek bir fark gözlemlenmedi.

Projenin diğer bölümleri için PES hastası, PEG hastası ve kontrol grubundan bazı bireylerden gözyaşı ve aköz örnekleri de Güllhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Servisi tarafından alındı ve TOBB ETÜ Teknoloji Merkezi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'ndeki 202 no'lu laboratuvarımıza getirildi. Burada işlem yapılacağı zamana kadar -86°C buzdolabında depolandı. 80 PEG hastası, 80 PES hastası ve 85 kontrolden gözyaşı örneği alındı. Aköz örnekleri sadece operasyon geçiren hastalardan alınarak 1.5 ml'lik test tüplerine koyuldu. 10 PEG hastası, 17 PES hastası ve 23 kontrolden ise aköz örneği alındı. Tüm alınan örneklerin genotipleme ve konsantrasyon belirleme çalışmaları laboratuvarımızda yapıldı.

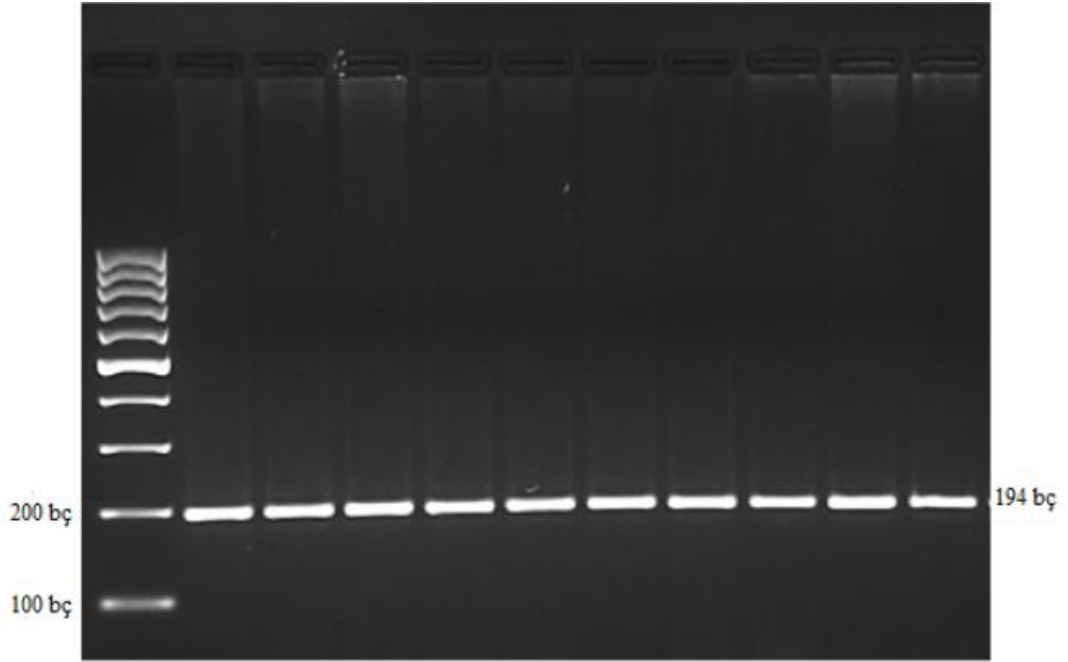
3.2 Genotiplerin belirlenmesi ve genotip tabloları

CTGF genindeki rs6918698G/C ve rs9399005C/T polimorfizmlerinin genotipleme PCR-RFLP yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu yöntem ayrıntılı olarak 2.2.2 bölümünde anlatılmaktadır. CTGF rs12526196T/C ve rs9402373C/G bölgelerinin genotipleme ise RT-PCR tekniği kullanılarak yapıldı. Bu yöntem ayrıntılı olarak 2.2.3 bölümünde anlatılmaktadır.

3.2.1 CTGF rs6918698G/C polimorfizminin genotiplenmesi

CTGF rs6918698G/C polimorfizminin genotiplenmesi için öncelikle bu bölge 2.2.2.1 numaralı bölümde anlatıldığı şekilde PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Şekil 3.1, %2'lik agaroz jelde rs6918698G/C bölgesinin PCR ürünlerinin görüntülenmesini göstermektedir. İlk sırada görülen 100 bç'lik DNA belirteçidir. Yüklenen örneklerin yaklaşık kaç bç olduğunun anlaşılmasını sağlar. Diğer sıralardakiler ise PCR ürünleridir. PCR ürünlerinin olması gereken boyutu 194 bç'dir ve görüntüye bakarak doğru boyutta ürün elde edilip edilemediği değerlendirilebilir. Ayrıca örnek

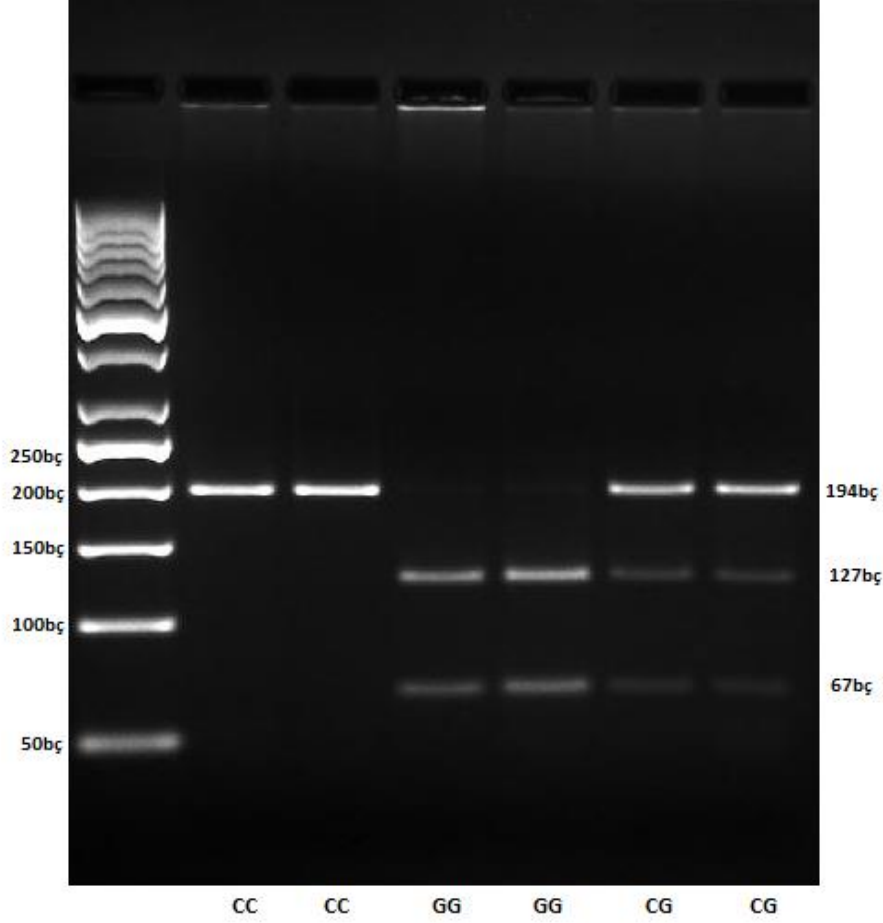
kuyucuklarının hizasında tek bir bant olması da PCR işleminin düzgün gerçekleştiğinin, istenmeyen bölgelerde çoğalmalar olmadığına göstergesidir. Bu kısıtlara göre PCR ürünleri incelenip yeterli kalitede olduğuna karar verildikten sonra restriksiyon endonükleaz reaksiyonuna geçilebilir. Bu çalışmada da tüm PCR ürünleri agaroz jelde yürütülüp, kalitesi ve konsantrasyonu uygun görüldükten sonra restriksiyon işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 3.1 : CTGF rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgenin optimize edilmiş koşullarda elde edilen PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Daha sonra bu SNP'ye uygun bir restriksiyon endonükleaz ile muamele edilerek, PCR ürününün kesilip kesilmediği kontrol edilerek genotip belirlenmesi yapıldı. Restriksiyon endonükleaz reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra bu ürünler de %2.5'lik agaroz jelde analiz edildi. Bu bölgenin genotiplenmesinde *BseRI* endonükleaz enzimi kullanıldı. Enzimin PCR ürünlerini hangi durumlarda kestiği ve genotiplerin ne şekilde belirlendiği 2.2.2.1 numaralı bölümde ayrıntılı olarak anlatılmaktadır. Bu bölgeye ait kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 3.2'de gösterilmektedir. Şekilde gösterildiği gibi 194 bp'lik tek bant olarak gözlenen örnekler polimorfik homozigot (CC), 127 bp ve 67 bp'lik 2 bant olarak gözlenenler yabanıl homozigot (GG), 3 bant olarak gözlenenler ise heterozigot (GC) olarak genotiplendi. RFLP yönteminin genotipleri doğru belirleyip belirlemediğini test etmek amacıyla, genotipi PCR/RFLP-agaroz jel yöntemi ile belirlenmiş olan, yabanıl homozigot (GG) ve polimorfik

homozigot (CC) genotipe sahip iki kişinin PCR ürünü seçilerek sekanslamaya yollanarak genotipler doğrulandı. Bu işlemler 2.2.2.1 numaralı bölümde anlatılmaktadır.



Şekil 3.2 : CTGF rs6918698G/C tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon endonükleaz reaksiyonu sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.

CTGF rs6918698G/C polimorfizmi için 213 PEG hastası, 214 PES hastası ve 215 kontrol bireyin genotip ve alel frekansları Tablo 3.2’de verilmektedir. Polimorfik C alelinin frekansı PEG hastalarında 0.444, PES hastalarında 0.446, kontrollerde 0.449 olarak hesaplanmıştır ve aralarında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur (PES-kontrol P=1.000. PEG-kontrol P=1.000. PEG-PES P=1.000).

Polimorfik genotip CC’nin frekansı PEG hastalarında %23.0. PES hastalarında %16.4 ve kontrollerde %20.5 olarak gözlenmiştir. CC genotipine sahip kişi sayısı, GC+GG genotipi taşıyanlar ile karşılaştırıldığında OR değeri PES-Kontrol için 0.760 (0.465-1.242, P=0.272), PEG-Kontrol için 1.161 (0.733-1.839, P=0.524), PEG-PES için

1.528 (0.943-2.476, P=0.084) olarak hesaplanmıştır. CC+GC genotiplerine karşı GG genotipleri düşünüldüğünde ise PES-Kontrol için OR=1.191 (0.784-1.810, P=0.412), PEG-Kontrol için OR=0.849 (0.567-1.274, P=0.430), PEG-PES için OR=0.713 (0.472-1.078, P=0.108) olarak bulunmuştur. Gözlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.2 : PEG hastaları, PES hastaları ve kontrol bireylerin CTGF rs6918698G/C için genotip ve alel frekansları.

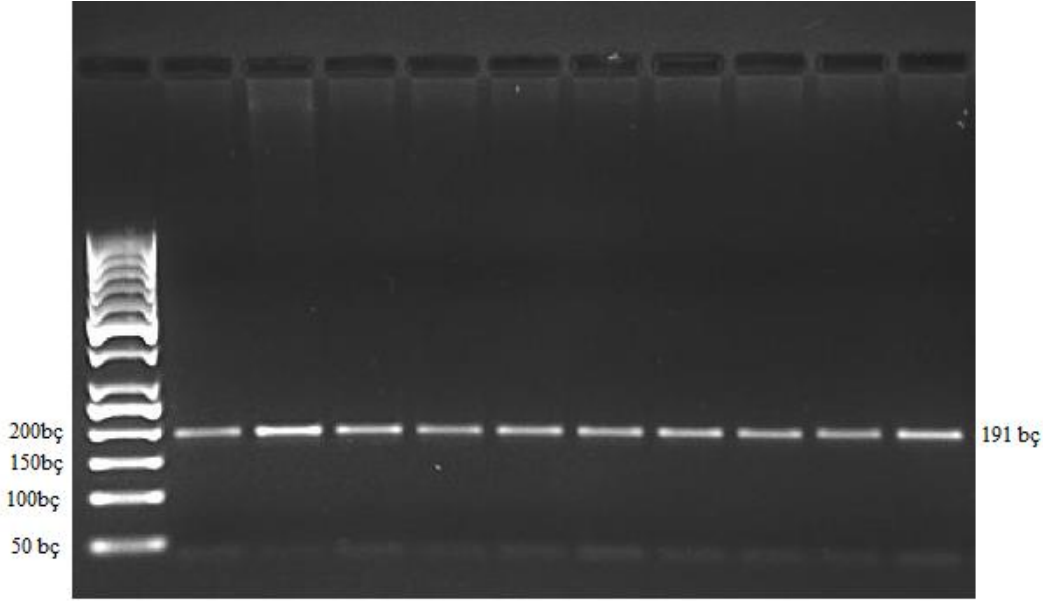
	PEG (n=213)	PES (n=214)	Kontrol (n=215)	<u>PES vs. Kontrol</u>		<u>PEG vs. Kontrol</u>		<u>PEG vs. PES</u>	
				OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Genotip, n(%)									
GG	73 (34.3)	58 (27.1)	66 (30.7)	0.760 ^a (0.465- 1.242)	0.272	1.161 ^a (0.733- 1.839)	0.524	1.528 ^a (0.943- 2.476)	0.084
GC	91 (42.7)	121 (56.5)	105 (48.8)	1.191 ^b (0.784- 1.810)	0.412	0.849 ^b (0.567- 1.274)	0.430	0.713 ^b (0.472- 1.078)	0.108
CC	49 (23.0)	35 (16.4)	44 (20.5)						
Alel frekansı									
G	0.556	0.554	0.551	0.990 ^c (0.756- 1.295)	1.000	0.979 ^c (0.748- 1.282)	1.000	0.990 ^c (0.755- 1.296)	1.000
C	0.444	0.446	0.449						

a. CC vs. GC+TT, χ^2 testi kullanılmıştır, b. CC+GC vs. TT, χ^2 testi kullanılmıştır, c. C vs. G, χ^2 testi kullanılmıştır

3.2.2 CTGF rs9399005C/T polimorfizminin genotiplenmesi

CTGF rs9399005C/T polimorfizminin genotiplenmesi için öncelikle bu bölge 2.2.2.2 numaralı bölümde anlatıldığı şekilde PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Şekil 3.3, %2'lik agaroz jelde rs9399005C/T bölgesinin PCR ürünlerinin görüntülenmesini göstermektedir. İlk sırada görülen 50 bç'lik DNA belirteçidir. Yüklenen örneklerin yaklaşık kaç bç olduğunun anlaşılmasını sağlar. Diğer sıralardakiler ise PCR ürünleridir. PCR ürünlerinin olması gereken boyutu 191 bç'dir ve görüntüye bakarak doğru boyutta ürün elde edilip edilemediği değerlendirilebilir. Ayrıca örnek kuyucuklarının hizasında tek bir bant olması da PCR işleminin düzgün gerçekleştiğinin, istenmeyen bölgelerde çoğalmalar olmadığını göstergesidir. Bu kıstaslara göre PCR ürünleri incelenip yeterli kalitede olduğuna karar verildikten sonra restriksiyon endonükleaz reaksiyonuna geçilebilir. Bu çalışmada da tüm PCR ürünleri

agaroz jelde yürütülüp, kalitesi ve konsantrasyonu uygun görüldükten sonra restriksiyon işlemi gerçekleştirildi.

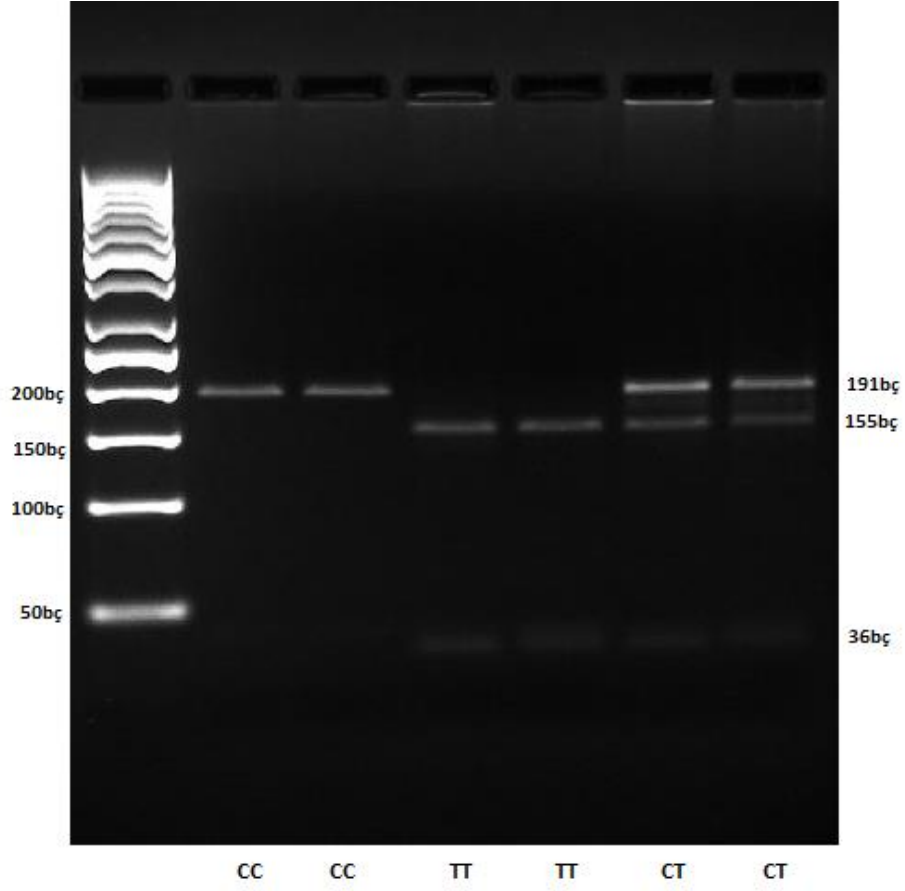


Şekil 3.3 : CTGF rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgenin optimize edilmiş koşullarda elde edilen PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Daha sonra bu SNP'ye uygun bir restriksiyon endonükleaz ile muamele edilerek, PCR ürününün kesilip kesilmediği kontrol edilerek genotip belirlenmesi yapıldı. Restriksiyon endonükleaz reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra bu ürünler de agaroz jelde analiz edildi. Bu bölgenin genotiplenmesinde *MscI* endonükleaz enzimi kullanıldı. Enzimin PCR ürünlerini hangi durumlarda kestiği ve genotiplerin ne şekilde belirlendiği 2.2.2.2 numaralı bölümde ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Bu bölgeye ait kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü olan Şekil 3.4'te gösterildiği gibi 191 bç'lik tek bant olarak gözlenen örnekler yabancıl homozigot (CC), 155 bç ve 36 bç'lik 2 bant olarak gözlenenler polimorfik homozigot (TT), 3 bant olarak gözlenenler ise heterozigot (CT) olarak genotiplendi. RFLP yönteminin genotipleri doğru belirleyip belirlemediğini test etmek amacıyla, genotipi PCR/RFLP-agaroz jel yöntemi ile belirlenmiş olan, yabancıl homozigot (CC) ve polimorfik homozigot (TT) genotipe sahip iki kişinin PCR ürünü seçilerek sekanslamaya yollanarak genotipler doğrulandı. Bu işlemler 2.2.2.2 numaralı bölümde anlatılmaktadır.

CTGF rs9399005C/T polimorfizmi için 213 PEG hastası, 214 PES hastası ve 215 kontrol bireyin genotip ve alel frekansları Tablo 3.3'te verilmektedir. Polimorfik T alelinin frekansı PEG hastalarında 0.296, PES hastalarında 0.290. kontrollerde 0.286

olarak hesaplanmıştır ve aralarında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur (PES-kontrol P=1.000. PEG-kontrol P=0.754, PEG-PES P=0.846).



Şekil 3.4 : CTGF rs9399005C/T tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon endonükleaz reaksiyonu sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Polimorfik genotip TT'nin frekansı PEG hastalarında %10.8, PES hastalarında %8.4 ve kontrollerde %7.5 olarak gözlenmiştir. TT genotipine sahip kişi sayısı, CT+CC genotipi taşıyanlar ile karşılaştırıldığında OR değeri PES-Kontrol için 1.142 (0.566-2.304, P=0.710), PEG-Kontrol için 1.506 (0.772-2.937, P=0.228), PEG-PES için 1.318 (0.689-2.521, P=0.403) olarak hesaplanmıştır. TT+CT genotiplerine karşı CC genotipleri düşünüldüğünde ise PES-Kontrol için OR=0.991 (0.678-1.446, P=1.000), PEG-Kontrol için OR=0.945 (0.647-1.381, P=0.770), PEG-PES için OR=0.954 (0.653-1.394, P=0.808) olarak bulunmuştur. Gözlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.3 : PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin CTGF rs9399005C/T genotip ve alel frekansları.

	PEG (n=213)	PES (n=214)	Kontrol (n=215)	<u>PES vs. Kontrol</u>		<u>PEG vs. Kontrol</u>		<u>PEG vs. PES</u>	
				OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Genotip, n(%) CC	110 (51.6)	108 (50.5)	108 (50.2)	1.142 ^a (0.566- 2.304)	0.710	1.506 ^a (0.772- 2.937)	0.228	1.318 ^a (0.689- 2.521)	0.403
CT	80 (37.6)	88 (41.1)	91 (42.3)	0.991 ^b (0.678- 1.446)	1.000	0.945 ^b (0.647- 1.381)	0.770	0.954 ^b (0.653- 1.394)	0.808
TT	23 (10.8)	18 (8.4)	16 (7.5)						
Alel frekansı									
C	0.704	0.710	0.714	1.018 ^c (0.758- 1.368)	1.000	1.048 ^c (0.780- 1.408)	0.754	1.030 ^c (0.767- 1.383)	0.846
T	0.296	0.290	0.286						

a. TT vs. CT+CC, χ^2 testi kullanılmıştır, b. TT+CT vs. CC, χ^2 testi kullanılmıştır, c. T vs. C, χ^2 testi kullanılmıştır

3.2.3 CTGF rs12526196T/C polimorfizminin genotiplenmesi

CTGF rs12526196T/C bölgesinin genotiplenmesi 2.2.3 numaralı bölümde anlatıldığı gibi floresan işaretli alel spesifik TaqMan problemleri kullanılarak yapıldı. StepOnePlus yazılım programı hem PCR döngüsünü hem de sonuçları anlık görüntülemeye olanak sağladı. Reaksiyon sonucunda da amplifikasyon eğrilerine göre örneklerin genotiplerini belirledi ve bu genotiplere göre Şekil 3.5'teki gibi bir alelik ayırma grafiği (allelic discrimination plot) oluşturarak tüm örneklerin genotiplerine göre dağılımını tek bir grafikte görüntülememizi sağladı.

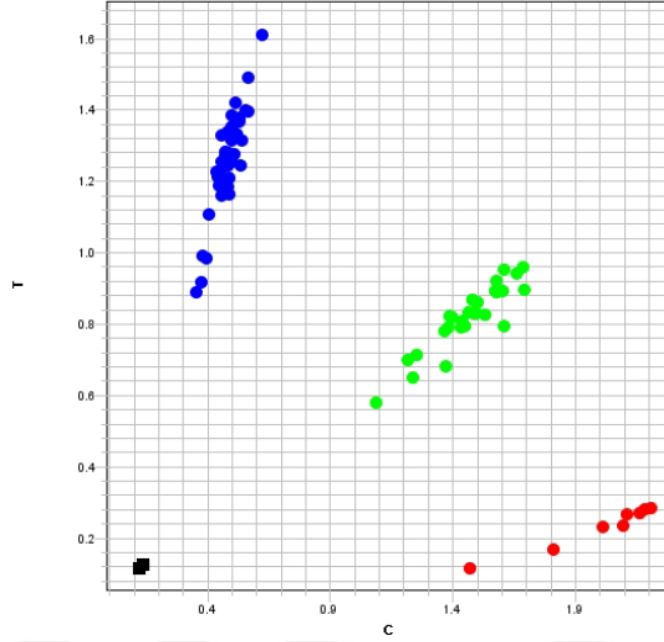
CTGF rs12526196T/C polimorfizmi için 213 PEG hastası, 214 PES hastası ve 215 kontrol bireyin genotip ve alel frekansları Tablo 3.4'te verilmektedir. Polimorfik C alelinin frekansı PEG hastalarında 0.230, PES hastalarında 0.234, kontrollerde 0.223 olarak hesaplanmıştır ve aralarında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur (PES-kontrol P=0.717, PEG-kontrol P=0.812, PEG-PES P=1.000).

Polimorfik genotip CC'nin frekansı PEG hastalarında %5.6, PES hastalarında %5.1 ve kontrollerde %4.7 olarak gözlenmiştir. CC genotipine sahip kişi sayısı, TC+TT genotipi taşıyanlar ile karşılaştırıldığında OR değeri PES-Kontrol için 1.111 (0.462-2.673, P=0.814), PEG-Kontrol için 1.224 (0.517-2.896, P=0.645), PEG-PES için 1.102 (0.475-2.555, P=0.821) olarak hesaplanmıştır. CC+TC genotiplerine karşı TT

genotipleri düşünülürken ise PES-Kontrol için OR=1.068 (0.727-1.570, P=0.738), PEG-Kontrol için OR=1.016 (0.690-1.495, P=1.000), PEG-PES için OR=0.951 (0.647-1.399, P=0.799) olarak bulunmuştur. Gözlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Allelic Discrimination Plot

Allelic Discrimination Plot (SNP Assay: C__1764938_10)



Şekil 3.5 : CTGF rs12526196T/C bölgesine ait bir alelik ayırma grafiğinde örneklerin genotiplerine göre gösterimi.

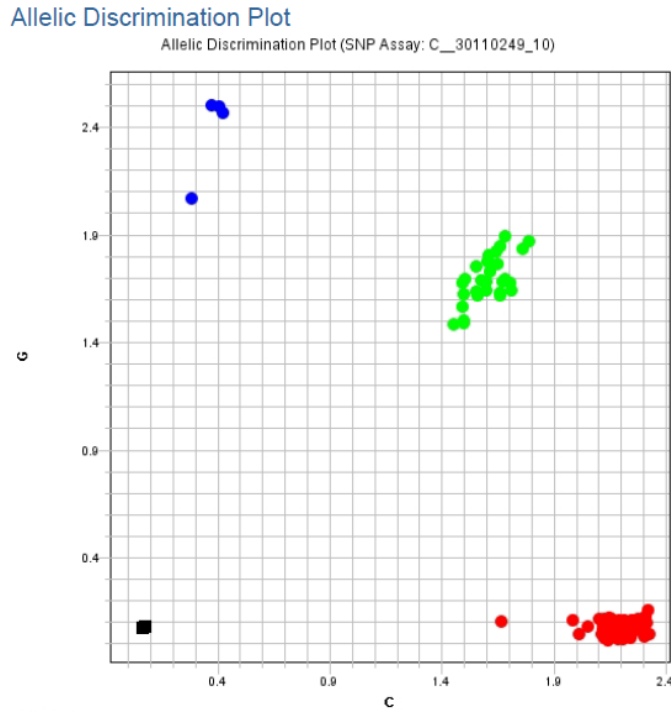
Tablo 3.4 : PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin CTGF rs12526196T/C genotip ve alel frekansları.

	PEG (n=213)	PES (n=214)	Kontrol (n=215)	<u>PES vs. Kontrol</u>		<u>PEG vs. Kontrol</u>		<u>PEG vs. PES</u>	
				OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Genotip, n(%)									
TT	127 (59.6)	125 (58.4)	129 (60.0)	1.111 ^a (0.462- 2.673)	0.814	1.224 ^a (0.517- 2.896)	0.645	1.102 ^a (0.475- 2.555)	0.821
TC	74 (34.8)	78 (36.5)	76 (35.3)	1.068 ^b (0.727- 1.570)	0.738	1.016 ^b (0.690- 1.495)	1.000	0.951 ^b (0.647- 1.399)	0.799
CC	12 (5.6)	11 (5.1)	10 (4.7)						
Alel frekansı									
T	0.770	0.766	0.777	1.061 ^c (0.771- 1.459)	0.717	1.040 ^c (0.755- 1.432)	0.812	0.980 ^c (0.713- 1.347)	1.000
C	0.230	0.234	0.223						

a. CC vs. TC+TT, χ^2 testi kullanılmıştır, b. CC+TC vs. TT, χ^2 testi kullanılmıştır, c. C vs. T, χ^2 testi kullanılmıştır

3.2.4 CTGF rs9402373C/G polimorfizminin genotiplenmesi

CTGF rs9402373C/G bölgesinin genotiplenmesi 2.2.3 numaralı bölümde anlatıldığı gibi floresan işaretli alel spesifik TaqMan problemleri kullanılarak yapıldı. StepOnePlus yazılım programı hem PCR döngüsünü hem de sonuçları anlık görüntülemeye olanak sağladı. Reaksiyon sonucunda da amplifikasyon eğrilerine göre örneklerin genotiplerini belirledi ve bu genotiplere göre Şekil 3.6'daki gibi bir alelik ayırma grafiği (allelic discrimination plot) oluşturarak tüm örneklerin genotiplerine göre dağılımını tek bir grafikte görüntülememizi sağladı.



Şekil 3.6 : CTGF rs9402373C/G bölgesine ait bir alelik ayırma grafiğinde örneklerin genotiplerine göre gösterimi.

CTGF rs9402373C/G polimorfizmi için 213 PEG hastası, 214 PES hastası ve 215 kontrol bireyin genotip ve alel frekansları Tablo 3.5'te verilmektedir. Polimorfik G alelinin frekansı PEG hastalarında 0.160, PES hastalarında 0.185, kontrollerde 0.181 olarak hesaplanmıştır ve aralarında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur (PES-kontrol $P=1.000$, PEG-kontrol $P=0.397$, PEG-PES $P=0.334$).

Polimorfik genotip GG'nin frekansı PEG hastalarında %5.6, PES hastalarında %5.1 ve kontrollerde %4.7 olarak gözlenmiştir. GG genotipine sahip kişi sayısı, CG+CC genotipi taşıyanlar ile karşılaştırıldığında OR değeri PES-Kontrol için 0.833 (0.250-

2.773, P=0.766), PEG-Kontrol için 1.010 (0.320-3.182, P=1.000), PEG-PES için 1.212 (0.364-4.032, P=0.754) olarak hesaplanmıştır. GG+CG genotiplerine karşı CC genotipleri düşünüldüğünde ise PES-Kontrol için OR=1.022 (0.723-1.444, P=1.000), PEG-Kontrol için OR=0.857 (0.600-1.225, P=0.397), PEG-PES için OR=0.839 (0.588-1.198, P=0.334) olarak bulunmuştur. Gözlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.5 : PES hastaları, PEG hastaları ve kontrol bireylerin CTGF rs9402373C/G genotip ve alel frekansları.

Genotip, n(%)	PEG (n=213)	PES (n=214)	Kontrol (n=215)	PES vs. Kontrol		PEG vs. Kontrol		PEG vs. PES	
				OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
CC	151 (59.6)	140 (58.4)	143 (60.0)	0.833 ^a (0.250- 2.773)	0.766	1.010 ^a (0.320- 3.182)	1.000	1.212 ^a (0.364- 4.032)	0.754
CG	56 (34.8)	69 (36.5)	66 (35.3)	1.050 ^b (0.704- 1.565)	0.812	0.815 ^b (0.542- 1.228)	0.329	0.777 ^b (0.516- 1.169)	0.225
GG	6 (5.6)	5 (5.1)	6 (4.7)						
Alel frekansı									
C	0.840	0.815	0.819	1.022 ^c (0.723- 1.444)	1.000	0.857 ^c (0.600- 1.225)	0.397	0.839 ^c (0.588- 1.198)	0.334
G	0.160	0.185	0.181						

a. GG vs. CG+CC, χ^2 testi kullanılmıştır, b. GG+CG vs. CC, χ^2 testi kullanılmıştır, c. G vs. C, χ^2 testi kullanılmıştır

3.2.5 Genotip kombinasyonlarına göre analizler

Her SNP bölgesinin genotiplerinin PEG, PES ve kontrol grubu ile karşılaştırmaları bir önceki bölümde yapıldı. Bu bölümde ise 4 bölgenin genotiplerinin farklı kombinasyonları ile PEG, PES ve kontrol ile ilişkilerine bakıldı. Öncelikli olarak ikişer SNP bölgesinin genotiplerinin birbiri ile kombinasyonu analiz edildi (Tablo 3.6). Analizler için ki kare testi kullanıldı, ancak gruplardaki kişi sayılarının 5'ten küçük olduğu durumlarda Fisher exact test uygulandı.

CTGF rs6918698 ve rs9399005 genotiplerinin kombinasyonunda CCCT genotipi PES hastalarında PEG (OR=2.231, P=0.039) ve kontrollere (OR=0.430, P=0.028) göre daha az görüldü ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

Tablo 3.6 : İkişerli SNP bölgesi genotiplerinin birbiri ile kombinasyonuna göre genotip frekansları.

2'li kombineler		PEG (n=213)	PES (n=214)	Kontrol (n=215)	PEG vs. Kontrol		PES vs. Kontrol		PEG vs. PES	
					OR	P	OR	P	OR	P
rs6918698 ve rs9399005	GGCC	73 (34.27)	54 (25.23)	65 (30.23)	0.800	0.371	1.337	0.248	1.545	0.041
	GGCT	-	4 (1.87)	1 (0.47)	-	1.000 ^a	0.819	0.366 ^a	-	1.000 ^a
	GGTT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GCCC	32 (15.02)	47 (21.96)	37 (17.21)	0.851	0.539	1.354	0.215	0.628	0.065
	GCCT	59 (27.70)	74 (34.58)	68 (31.63)	0.828	0.374	1.143	0.516	0.725	0.125
	GCTT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCCC	5 (2.35)	7 (3.27)	6 (2.79)	0.837	0.772	1.178	0.772	0.711	0.564
	CCCT	21 (9.86)	10 (4.67)	22 (10.23)	0.960	1.000	0.430	0.028*	2.231	0.039*
	CCTT	23 (10.80)	18 (8.41)	16 (7.44)	1.506	0.228	1.142	0.710	1.318	0.403
rs6918698 ve rs12526196	GGTT	24 (11.27)	20 (9.35)	34 (15.81)	0.676	0.169	0.549	0.043*	1.232	0.514
	GGTC	37 (17.37)	28 (13.08)	24 (11.16)	1.673	0.066	1.198	0.542	1.397	0.218
	GGCC	12 (5.63)	10 (4.67)	8 (3.72)	1.545	0.349	1.258	0.623	1.218	0.653
	GCTT	58 (27.23)	74 (34.58)	57 (26.51)	1.037	0.867	1.465	0.070	0.708	0.100
	GCTC	33 (15.49)	46 (21.50)	47 (21.86)	0.655	0.091	0.979	1.000	0.670	0.110
	GCCC	-	1 (0.47)	1 (0.47)	-	1.000 ^a	-	1.000 ^a	-	1.000 ^a
	CCTT	45 (21.13)	31 (14.49)	38 (17.67)	1.248	0.366	0.793	0.380	1.573	0.076
	CCTC	4 (1.88)	4 (1.87)	5 (2.33)	-	0.250 ^a	-	0.249 ^a	-	0.276 ^a
	CCCC	-	-	1 (0.47)	-	1.000 ^a	-	1.000 ^a	-	-
rs6918698 ve rs9402373	GGCC	71 (33.33)	57 (26.64)	64 (29.77)	1.180	0.427	0.857	0.471	1.377	0.131
	GGCG	2 (0.94)	1 (0.47)	2 (0.93)	-	0.377 ^a	-	0.377 ^a	-	0.375 ^a
	GGGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GCCC	63 (29.58)	69 (32.24)	59 (27.44)	1.111	0.625	1.258	0.277	0.883	0.551
	GCCG	28 (13.15)	52 (24.30)	46 (21.40)	0.556	0.024*	1.179	0.474	0.472	0.003*
	GCGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCCC	17 (7.98)	14 (6.54)	20 (9.30)	0.846	0.627	0.683	0.290	1.239	0.567
	CCCG	26 (12.21)	16 (7.48)	18 (8.37)	1.522	0.192	0.885	0.731	1.721	0.101
	CCGG	6 (2.82)	5 (2.34)	6 (2.79)	1.010	1.000	0.833	0.766	1.212	0.754

a: Fisher exact test ile analiz edilmiştir. * χ^2 testi ile yapılan analize göre anlamlı sonuç vermiştir

Tablo 3.6 (devamı) : İkişerli SNP bölgesi genotiplerinin birbiri ile kombinasyonuna göre genotip frekansları.

2'li kombineler		PEG (n=213)	PES (n=214)	Kontrol (n=215)	PEG vs. Kontrol		PES vs. Kontrol		PEG vs. PES	
					OR	P	OR	OR	P	OR
rs9399005 ve rs12526196	CCTT	51 (23.94)	38 (17.76)	57 (26.51)	0.873	0.540	0.598	0.029*	1.458	0.116
	CCTC	47 (22.07)	59 (27.57)	41 (19.07)	1.202	0.443	1.615	0.037*	0.744	0.188
	CCCC	12 (5.63)	11 (5.14)	10 (4.65)	1.224	0.645	1.111	0.814	1.102	0.821
	CTTT	54 (25.35)	70 (32.71)	58 (26.98)	0.919	0.702	1.316	0.194	0.699	0.094
	CTTC	26 (12.21)	18 (8.41)	33 (15.35)	0.767	0.346	0.506	0.026*	1.514	0.197
	CTCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TTTT	22 (10.33)	17 (7.94)	14 (6.51)	1.654	0.155	1.239	0.567	1.335	0.392
	TTTC	1 (0.47)	1 (0.47)	2 (0.93)	-	0.378 ^a	-	0.377 ^a	-	0.501 ^a
	TTCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs9399005 ve rs9402373	CCCC	107 (50.23)	100 (46.73)	103 (47.91)	1.098	0.630	0.954	0.807	1.151	0.469
	CCCG	3 (1.41)	8 (3.74)	7 (3.26)	-	0.119 ^a	1.154	0.786	-	0.080 ^a
	CCGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CTCC	41 (19.25)	35 (16.36)	37 (17.21)	1.147	0.585	0.941	0.813	1.219	0.434
	CTCG	39 (18.31)	52 (24.30)	52 (24.19)	0.703	0.137	1.006	1.000	0.698	0.131
	CTGG	-	2 (0.93)	2 (0.93)	-	0.252 ^a	-	0.377 ^a	-	0.251 ^a
	TTCC	3 (1.41)	6 (2.80)	5 (2.33)	-	0.222 ^a	1.212	0.754	-	0.165 ^a
	TTCG	14 (6.57)	9 (4.21)	7 (3.26)	2.090	0.112	1.305	0.604	1.602	0.279
	TTGG	6 (2.82)	3 (1.40)	4 (1.86)	-	0.205 ^a	-	0.276 ^a	-	0.163 ^a
rs12526196 ve rs9402373	TTCC	80 (37.56)	68 (31.78)	80 (37.21)	1.015	1.000	0.786	0.237	1.291	0.209
	TTCG	42 (19.72)	52 (24.30)	46 (21.40)	0.902	0.668	1.179	0.474	0.765	0.253
	TTGG	5 (2.35)	5 (2.34)	3 (1.40)	-	0.218 ^a	-	0.219 ^a	0.995	1.000
	TCCC	59 (27.70)	61 (28.50)	54 (25.12)	1.142	0.544	1.189	0.428	0.961	0.853
	TCCG	14 (6.57)	17 (7.94)	19 (8.84)	0.726	0.380	0.890	0.739	0.815	0.585
	TCGG	1 (0.47)	-	3 (1.40)	-	0.252 ^a	-	0.125 ^a	-	0.499 ^a
	CCCC	12 (5.63)	11 (5.14)	9 (4.19)	1.367	0.488	1.240	0.639	1.102	0.821
	CCCG	-	-	1 (0.47)	-	1.000 ^a	-	1.000 ^a	-	-

a: Fisher exact test ile analiz edilmiştir. * χ^2 testi ile yapılan analize göre anlamlı sonuç vermiştir.

rs6918698 ve rs12526196 genotiplerinin kombinasyonunda GGTT genotipi için PES grubu ile kontrol arasında (OR=0.549, P=0.043) anlamlı fark bulundu, PES hastalarında bu genotipe kontrol grubuna göre daha az rastlandı. rs6918698 ve rs9402373 genotiplerinin kombinasyonunda GCCG genotipi için PEG grubu ile PES arasında (OR=0.472, P=0.003) ve kontrol arasında (OR=0.556, P=0.024) gözlenen fark istatistiksel olarak anlamlıydı, PES ve kontrol grubunda GCCG genotipine sahip birey sayısı daha fazlaydı. rs9399005 ve rs12526196 genotiplerinin kombinasyonunda PES grubu ile kontrol arasında CCTT (OR=0.598, P=0.029), CCTC (OR=1.615, P=0.037) ve CTTC (OR=0.506, P=0.026) genotipleri için anlamlı fark bulundu. CCTT ve CTTC genotipleri PES hastalarında kontrollere göre daha az görülürken, CCTC genotipi ise PES grubunda daha fazla görüldü. Diğer genotipler için gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

Daha sonra tüm SNP'lerin genotiplerinin birbiri ile üçlü kombinasyonu analiz edildi. CTGF rs6918698, rs9399005 ve rs12526196 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler Tablo 3.7'de verilmektedir. GGCCTT genotipi için PES hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı seviyede daha az görüldü (OR=0.430, P=0.007). GGCCTC genotipi ise PEG grubunda anlamlı seviyede kontrollerden daha fazla görüldü (OR=1.755, P=0.047). GCCCTC genotipine PEG hastalarında PES hastalarından daha az rastlandı (OR=0.293, P=0.001). GCCTTT genotipi ise tüm gruplar arasında en çok PES hastalarında bulunmaktaydı (PES vs. Kontrol OR:1.651 P=0.033, PEG vs. PES OR:0.555 P=0.014). Diğer genotipler için gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

CTGF rs6918698, rs9399005 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler Tablo 3.8'de verilmektedir. GCCTCG genotipi PES grubunda PEG grubuna göre anlamlı seviyede daha fazla görüldü (OR=0.516, P=0.011). Diğer genotipler için gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

CTGF rs6918698, rs12526196 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler Tablo 3.9'da verilmektedir. GGTTCC genotipi için PES ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulundu (OR=0.519, P=0.029), PES hastalarında kontrollere göre daha az görüldü. GCTTCG genotipi ise PEG ve PES arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdi (OR=0.389, P=0.002),

PES hastalarında PEG hastalarına göre daha fazla görüldü. Diğer genotipler için gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

CTGF rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler Tablo 3.10'da verilmektedir. CCTTCC genotipi için PES ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulundu (OR=0.598, P=0.033). CTTCCC genotipi için de PES ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulundu (OR=0.385, P=0.045). Her iki genotipe de PES hastalarında kontrollere göre daha az rastlandı. Diğer genotipler için gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

3.3 Gözyaşı ile yapılan analizler

Hasta ve kontrollerden Schirmer stripleri ile alınan gözyaşı örnekleri laboratuvarımızda -86°C buzdolabında analiz yapılana dek muhafaza edildi. Daha sonra striplerden protein ekstraksiyonu yapılarak gerekli analizler yapıldı. Kullanılan yöntemler ayrıntılı olarak 2.4 numaralı bölümde anlatılmaktadır.

3.3.1 Gözyaşında total protein konsantrasyonu

80 PEG hastası, 80 PES hastası ve 85 kontrolün total protein konsantrasyonu ölçümleri yapılmıştır. 7 kontrol, 3 PES ve 2 PEG örneğinin CTGF konsantrasyonları bulunmadığı için hesaplamaya alınmamıştır. Bu nedenle 78 PEG, 77 PES ve 78 kontrole göre yapılan karşılaştırmanın sonuçları Tablo 3.11 ve Şekil 3.7'de verilmektedir.

PEG hastaları için total protein konsantrasyonu 18.91 ± 8.91 mg/ml, PES hastaları için 16.47 ± 8.94 mg/ml, kontroller için ise 16.34 ± 10.29 mg/ml olarak bulundu (P=0.011). Hangi gruplar arasında anlamlı fark olduğunu tespit etmek amacıyla Conover (1980) formülü uygulandı. PEG grubundaki total protein konsantrasyonunun PES grubuna (P=0.026) ve kontrol grubuna (P=0.004) göre anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edildi.

Tablo 3.7 : CTGF rs6918698, rs9399005 ve rs12526196 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler.

rs6918698, rs12526196	rs9399005,	PEG (n=213)	PES (n=214)	Kontrol (n=215)	PEG vs. Kontrol		PES vs. Kontrol		PEG vs. PES	
					OR	P	OR	P	OR	P
GGCCTT		24 (11.27)	16 (7.48)	34 (15.81)	0.676	0.169	0.430	0.007*	1.571	0.179
GGCCTC		37 (17.37)	28 (13.08)	23 (10.70)	1.755	0.047*	1.257	0.445	1.397	0.218
GGCCCC		12 (5.63)	10 (4.67)	8 (3.72)	1.545	0.349	1.268	0.622	1.218	0.653
GGCTTT		-	4 (1.87)	-	-	-	-	0.061 ^a	-	0.062 ^a
GGCTTC		-	-	1 (0.47)	-	0.502 ^a	-	0.501 ^a	-	-
GGCTCC		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GGTTTT		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GGTTTC		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GGTTCC		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCCCTT		23 (10.80)	18 (8.41)	19 (8.84)	1.249	0.495	0.947	0.875	1.318	0.403
GCCCTC		9 (4.23)	28 (13.08)	17 (7.91)	0.514	0.111	1.753	0.080	0.293	0.001*
GCCCCC		-	1 (0.47)	1 (0.47)	-	0.502 ^a	-	0.501 ^a	-	0.501 ^a
GCCTTT		35 (16.43)	56 (26.17)	38 (17.67)	0.916	0.733	1.651	0.033*	0.555	0.014*
GCCTTC		24 (11.27)	18 (8.41)	30 (13.95)	0.783	0.403	0.566	0.069	1.383	0.322
GCCTCC		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCTTTT		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCTTTC		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCTTCC		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCCCTT		4 (1.88)	4 (1.87)	4 (1.90)	-	0.276 ^a	-	0.276 ^a	-	0.276 ^a
CCCCTC		1 (0.47)	3 (1.40)	1 (0.47)	-	0.501 ^a	-	0.249 ^a	-	0.251 ^a
CCCCCC		-	-	1 (0.47)	-	0.502 ^a	-	0.501 ^a	-	-
CCCTTT		19 (8.92)	10 (4.67)	20 (9.30)	0.955	1.000	0.478	0.060	1.998	0.081
CCCTTC		2 (0.94)	-	2 (0.93)	-	0.377 ^a	-	0.251 ^a	-	0.248 ^a
CCCTCC		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCTTTT		22 (10.33)	17 (7.94)	14 (6.51)	1.654	0.155	1.239	0.567	1.335	0.392
CCTTTC		1 (0.47)	1 (0.47)	2 (0.93)	-	0.378 ^a	-	0.377 ^a	-	0.501 ^a
CCTTCC		-	-	-	-	-	-	-	-	-

a: Fisher exact test ile analiz edilmiştir. * χ^2 testi ile yapılan analize göre anlamlı sonuç vermiştir.

Tablo 3.8 : CTGF rs6918698, rs9399005 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler.

rs6918698, rs9402373	rs9399005,	PEG (n=213)	PES (n=214)	Kontrol (n=215)	PEG vs. Kontrol		PES vs. Kontrol		PEG vs. PES	
					OR	P	OR	P	OR	P
GGCCCC		71 (33.33)	53 (24.77)	63 (29.30)	1.206	0.369	0.749	0.290	1.519	0.051
GGCCCG		2 (0.94)	1 (0.47)	2 (0.93)	-	0.377 ^a	-	0.377 ^a	-	0.375 ^a
GGCCGG		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GGCTCC		-	4 (1.87)	1 (0.47)	-	0.502 ^a	-	0.154 ^a	-	0.062 ^a
GGCTCG		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GGCTGG		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GGTTCC		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GGTTCCG		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GGTTGG		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCCCCC		31 (14.55)	42 (19.63)	32 (14.88)	0.974	1.000	1.396	0.194	0.698	0.164
GCCCCG		1 (0.47)	5 (2.34)	5 (2.33)	-	0.094	1.005	1.000	-	0.094 ^a
GCCCGG		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCCTCC		32 (15.02)	27 (12.62)	27 (12.56)	1.231	0.460	1.005	1.000	1.224	0.471
GCCTCG		27 (12.68)	47 (21.96)	41 (19.07)	0.616	0.070	1.194	0.458	0.516	0.011*
GCCTGG		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCTTCC		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCTTCG		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCTTGG		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCCCCC		5 (2.35)	5 (2.34)	6 (2.8)	0.837	0.772	0.833	0.766	1.005	1.000
CCCCCG		-	2 (0.93)	-	-	-	-	0.248 ^a	-	0.251 ^a
CCCCGG		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCCTCC		9 (4.23)	3 (1.40)	9 (4.2)	1.010	1.000	-	0.053 ^a	-	0.051 ^a
CCCTCG		12 (5.63)	5 (2.34)	11 (5.1)	1.107	0.812	0.444	0.129	2.496	0.081
CCCTGG		-	2 (0.93)	2 (0.93)	-	0.252 ^a	-	0.377 ^a	-	0.251 ^a
CCTTCC		3 (1.41)	6 (2.80)	5 (2.33)	-	0.222 ^a	1.212	0.754	-	0.165 ^a
CCTTCG		14 (6.57)	9 (4.21)	7 (3.3)	2.090	0.112	1.305	0.604	1.602	0.279
CCTTGG		6 (2.82)	3 (1.40)	4 (1.9)	-	0.205 ^a	-	0.276	-	0.163 ^a

a: Fisher exact test ile analiz edilmiştir. * χ^2 testi ile yapılan analize göre anlamlı sonuç vermiştir.

Tablo 3.9 : CTGF rs6918698, rs12526196 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler.

rs6918698, rs12526196, rs9402373	PEG (n=213)	PES (n=214)	Kontrol (n=215)	PEG vs. Kontrol		PES vs. Kontrol		PEG vs. PES	
				OR	P	OR	P	OR	P
GGTTCC	23 (10.80)	19 (8.88)	34 (15.81)	0.644	0.127	0.519	0.029*	1.242	0.505
GGTTCCG	1 (0.47)	1 (0.47)	-	-	0.498 ^a	-	0.499 ^a	-	0.501 ^a
GGTTGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GGTCCC	36 (16.90)	28 (13.08)	23 (10.70)	1.698	0.062	1.257	0.445	1.351	0.269
GGTCCG	1 (0.47)	-	1 (0.47)	-	0.501 ^a	-	0.501 ^a	-	0.501 ^a
GGTCGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GGCCCC	12 (5.63)	10 (4.67)	7 (3.26)	1.774	0.232	1.457	0.452	1.218	0.653
GGCCCCG	-	-	1 (0.47)	-	0.502 ^a	-	0.501 ^a	-	-
GGCCGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCTTCC	42 (19.72)	37 (17.29)	29 (13.49)	1.575	0.083	1.341	0.275	1.175	0.518
GCTTCG	16 (7.51)	37 (17.29)	28 (13.02)	0.542	0.060	1.396	0.218	0.389	0.002*
GCTTGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCTCCC	21 (9.86)	31 (14.49)	29 (13.49)	0.702	0.243	1.086	0.766	0.646	0.144
GCTCCG	12 (5.63)	15 (7.01)	18 (8.37)	0.653	0.267	0.825	0.596	0.792	0.559
GCTCGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCCCCC	-	1 (0.47)	1 (0.47)	-	0.502 ^a	-	0.501 ^a	-	0.501 ^a
GCCCCG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GCCCGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCTTCC	15 (7.04)	12 (5.61)	17 (7.91)	0.882	0.733	0.692	0.343	1.275	0.542
CCTTCG	25 (11.74)	14 (6.54)	18 (8.37)	1.455	0.247	0.766	0.471	1.900	0.062
CCTTGG	5 (2.35)	5 (2.34)	3 (1.40)	-	0.218	-	0.219	1.005	1.000
CCTCCC	2 (0.94)	2 (0.93)	2 (0.93)	-	0.377 ^a	-	0.377 ^a	-	0.377 ^a
CCTCCG	1 (0.47)	2 (0.93)	-	-	0.498 ^a	-	0.247 ^a	-	0.377 ^a
CCTCGG	1 (0.47)	-	3 (1.40)	-	0.252	-	0.125 ^a	-	0.501 ^a
CCCCCC	-	-	1 (0.47)	-	0.502 ^a	-	0.501 ^a	-	-
CCCCCG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCCCGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a: Fisher exact test ile analiz edilmiştir. * χ^2 testi ile yapılan analize göre anlamlı sonuç vermiştir.

Tablo 3.10 : CTGF rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin kombinasyonlarına göre yapılan analizler.

rs9399005, rs12526196, rs9402373	PEG (n=213)	PES (n=214)	Kontrol (n=215)	PEG vs. Kontrol		PES vs. Kontrol		PEG vs. PES	
				OR	P	OR	P	OR	P
CCTTC	50 (23.47)	35 (16.36)	53 (24.65)	0.938	0.776	0.598	0.033*	1.569	0.065
CCTTCG	1 (0.47)	3 (1.40)	4 (1.90)	-	0.158 ^a	-	0.276 ^a	-	0.251 ^a
CCTTGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCTCCC	45 (21.13)	54 (25.23)	39 (18.14)	1.209	0.605	1.523	0.075	0.794	0.315
CCTCCG	2 (0.94)	5 (2.34)	2 (0.93)	-	0.377 ^a	-	0.163 ^a	-	0.165 ^a
CCTCGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCCCC	12 (5.63)	11 (5.14)	9 (4.19)	1.367	0.488	1.240	0.639	1.102	0.821
CCCCG	-	-	1 (0.47)	-	0.502 ^a	-	0.501 ^a	-	-
CCCCGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTTTC	27 (12.68)	28 (13.08)	23 (10.70)	1.212	0.524	1.257	0.445	0.964	1.000
CTTTCG	27 (12.68)	40 (18.69)	35 (16.28)	0.747	0.289	1.182	0.511	0.631	0.087
CTTTGG	-	2 (0.93)	-	-	-	-	0.248 ^a	-	0.251 ^a
CTTCCC	14 (6.57)	6 (2.80)	15 (6.98)	0.938	0.868	0.385	0.045*	2.439	0.065
CTTCCG	12 (5.63)	12 (5.61)	17 (7.91)	0.985	1.000	0.980	1.000	1.005	1.000
CTTCGG	-	-	2 (0.93)	-	0.252 ^a	-	0.252 ^a	-	-
CTCCCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTCCCG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTCCGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TTTTTC	3 (1.41)	5 (2.34)	4 (1.90)	-	0.277 ^a	-	0.248 ^a	-	0.221 ^a
TTTTTCG	14 (6.57)	9 (4.21)	7 (3.26)	2.090	0.112	1.305	0.604	1.602	0.279
TTTTTGG	5 (2.35)	3 (1.40)	3 (1.40)	-	0.218	-	0.315 ^a	-	0.219 ^a
TTTTCCC	-	1 (0.47)	1 (0.47)	-	0.502 ^a	-	0.501 ^a	-	0.501 ^a
TTTTCCG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TTTTCGG	1 (0.47)	-	1 (0.47)	-	0.501 ^a	-	0.501 ^a	-	0.501 ^a
TTCCCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TTCCCG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TTCCGG	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a: Fisher exact test ile analiz edilmiştir. * χ^2 testi ile yapılan analize göre anlamlı sonuç vermiştir.

Tablo 3.11 : PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu.

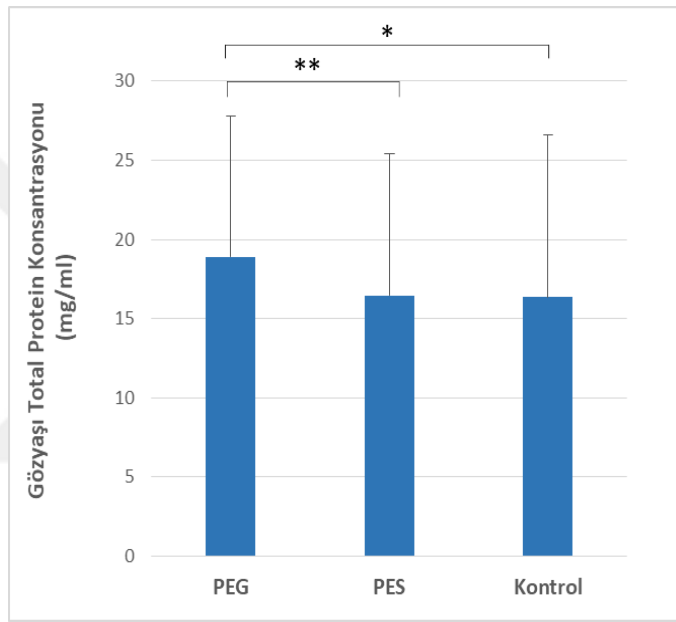
	PEG (n=78)	PES (n=77)	Kontrol (n=78)	P
Total Protein (mg/ml)				
Ortalama±SD*	18.91 ± 8.91	16.47 ± 8.94	16.34 ± 10.29	0.011
Medyan (IQR**)	16.29 (10.40)	14.27 (8.93)	13.33 (10.11)	

Kruskal-Wallis ile hesaplanmıştır.

PES vs. Kontrol, P=0.499; PEG vs. PES, P=0.026; PEG vs. Kontrol, P=0.004; Conover formülü (Conover, 1980) ile hesaplanmıştır.

*SD: Standard deviation – Standart sapma

**IQR: Interquartile range – Çeyrekler açıklığı, %25 ile %75 arası dilim



Şekil 3.7 : PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu. (PEG-PES-Kontrol P=0.011, *PEG vs. Kontrol P=0.004, **PEG vs. PES P=0.026).

Bu çalışmada polimorfizmler ile protein seviyelerinin birlikte çalışılmasının amaçlarından biri de aralarında ilişki olup olmadığını belirlemektir. Bu nedenle hastalık durumu gözlemlenmeden 4 SNP bölgesinin 3 farklı genotipine göre total protein seviyeleri karşılaştırıldı. Bu analizler için hem genotip hem total protein konsantrasyonu sonucu olan 77 PEG, 77 PES ve 76 Kontrol örneğinin sonuçları kullanıldı (Tablo 3.12).

CTGF rs6918698G/C genotiplerine bakıldığında GG genotipi için total protein konsantrasyonu 19.49±11.50 mg/ml, GC genotipi için 16.09±7.51 mg/ml, CC genotipi için ise 16.09±7.51 mg/ml olarak bulundu (P=0.267). CTGF rs9399005C/T genotiplerine bakıldığında CC genotipi için total protein konsantrasyonu 18.60±11.02

mg/ml, CT genotipi için 16.00 ± 7.58 mg/ml, TT genotipi için ise 16.70 ± 7.75 mg/ml olarak bulundu ($P=0.412$). CTGF rs12526196T/C genotiplerine bakıldığında TT genotipi için total protein konsantrasyonu 17.68 ± 10.47 mg/ml, TC genotipi için 16.89 ± 8.20 mg/ml, CC genotipi için ise 16.18 ± 4.95 mg/ml olarak bulundu ($P=0.949$). CTGF rs9402373C/G genotiplerine bakıldığında CC genotipi için total protein konsantrasyonu 18.13 ± 10.42 mg/ml, CG genotipi için 15.68 ± 7.18 mg/ml, GG genotipi için ise 16.75 ± 7.08 mg/ml olarak bulundu ($P=0.414$).

Tablo 3.12 : Çalışma grubunun gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonunun farklı CTGF genotiplerine göre karşılaştırılması (mg/ml).

Total Protein (mg/ml)	Yabanıl homozigot	Heterozigot	Polimorfik homozigot	P
<u>rs6918698</u>	<u>GG (n=68)</u> 19.49 ± 11.50	<u>GC (n=112)</u> 16.09 ± 7.51	<u>CC (n=50)</u> 17.14 ± 10.05	0.267
<u>rs9399005</u>	<u>CC (n=112)</u> 18.60 ± 11.02	<u>CT (n=100)</u> 16.00 ± 7.58	<u>TT (n=18)</u> 16.70 ± 7.75	0.412
<u>rs12526196</u>	<u>TT (n=134)</u> 17.68 ± 10.47	<u>TC (n=86)</u> 16.89 ± 8.20	<u>CC (n=10)</u> 16.18 ± 4.95	0.949
<u>rs9402373</u>	<u>CC (n=151)</u> 18.13 ± 10.42	<u>CG (n=72)</u> 15.68 ± 7.18	<u>GG (n=7)</u> 16.75 ± 7.08	0.414

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

CTGF rs6918698G/C bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.13'te gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

CTGF rs9399005C/T bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.14'te gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

CTGF rs12526196T/C bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.15'te gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

CTGF rs9402373C/G bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.16'da gösterilmektedir. CC

genotipinde olan bireylerde çalışma grupları arasındaki total protein seviyeleri arasında anlamlı fark görüldü (P=0.030). Bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Conover (1980) formülü kullanıldı, PEG’li bireylerdeki total protein seviyesinin kontrollere göre anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edildi (P=0.015). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

Tablo 3.13 : CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu (mg/ml).

rs6918698	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
GG (PEG n=27, PES n=20, Kontrol n=21)	21.27 ± 10.93	17.28 ± 9.55	18.98 ± 13.44	0.262
GC (PEG n=35, PES n=41, Kontrol n=36)	17.71 ± 6.79	14.97 ± 6.39	15.50 ± 8.54	0.057
CC (PEG n=15, PES n=16, Kontrol n=19)	17.28 ± 8.99	18.75 ± 12.37	15.19 ± 8.52	0.550
P	0.359	0.692	0.662	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Tablo 3.14 : CTGF rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu (mg/ml).

rs9399005	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
CC (PEG n=40, PES n=38, Kontrol n=34)	20.33 ± 10.10	17.79 ± 10.95	16.94 ± 11.46	0.057
CT (PEG n=31, PES n=34, Kontrol n=35)	17.81 ± 7.22	14.08 ± 4.92	16.12 ± 9.11	0.110
TT (PEG n=6, PES n=5, Kontrol n=7)	14.20 ± 6.11	20.66 ± 8.85	14.43 ± 7.38	0.249
P	0.201	0.262	0.912	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Tablo 3.15 : CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu (mg/ml).

rs12526196	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
TT (PEG n=40, PES n=49, Kontrol n=45)	18.80 ± 9.53	16.76 ± 9.34	16.98 ± 11.75	0.135
TC (PEG n=33, PES n=26, Kontrol n=27)	19.14 ± 8.50	15.95 ± 8.19	15.21 ± 7.19	0.066
CC (PEG n=4, PES n=2, Kontrol n=4)	16.89 ± 5.33	12.59 ± 0.33	17.26 ± 5.86	0.574
P	0.863	0.891	0.705	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

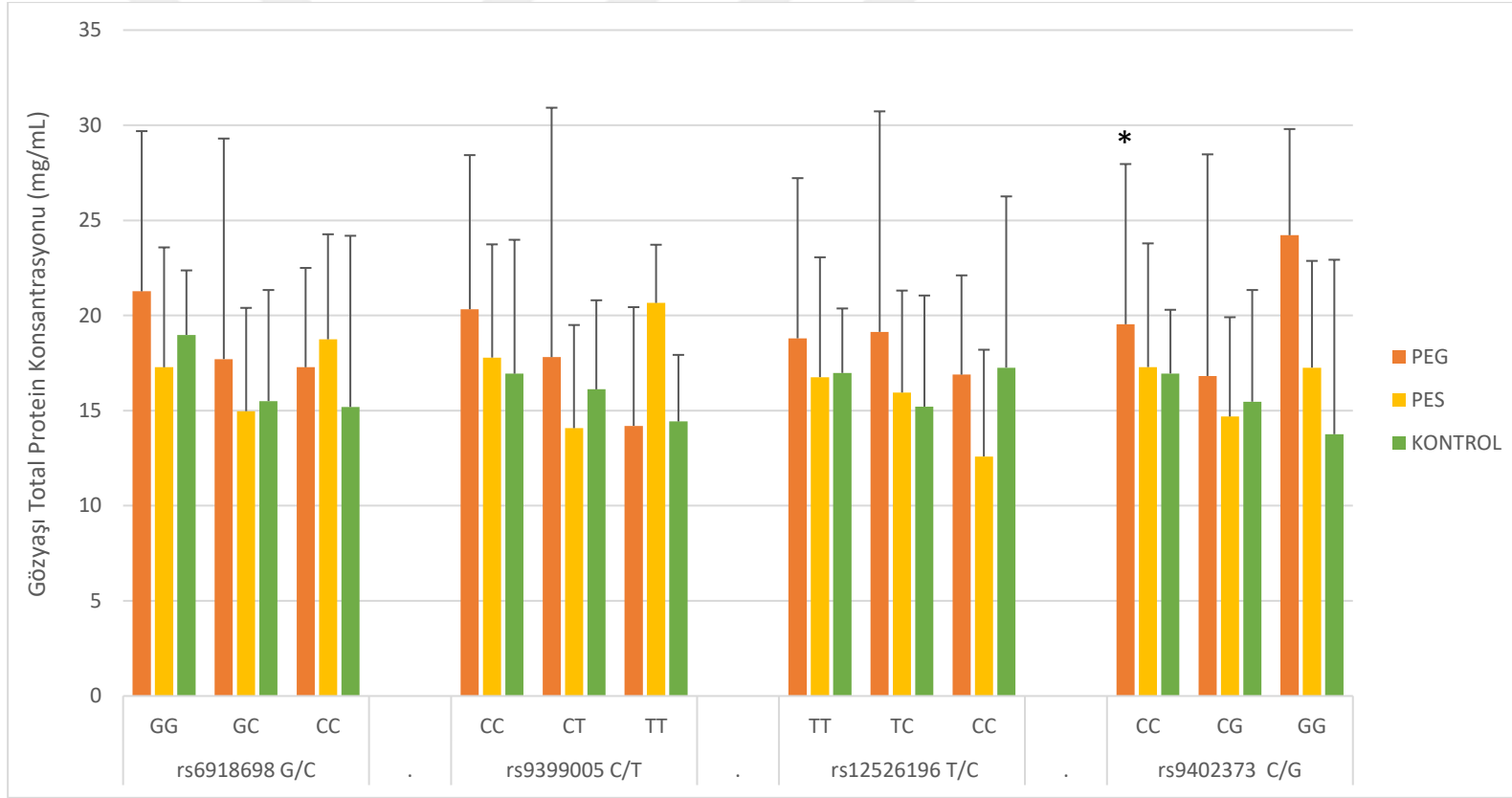
Tablo 3.16 : CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki total protein konsantrasyonu (mg/ml).

rs9402373	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
CC (PEG n=54, PES n=48, Kontrol n=49)	19.54 ± 9.40	17.29 ± 10.41	16.95 ± 10.98	0.030 ^a
CG (PEG n=22, PES n=26, Kontrol n=24)	16.82 ± 7.35	14.69 ± 5.10	15.47 ± 8.47	0.559
GG (PEG n=1, PES n=3, Kontrol n=3)	24.22	17.26 ± 7.63	13.76 ± 7.10	0.592
P	0.226	0.792	0.934	

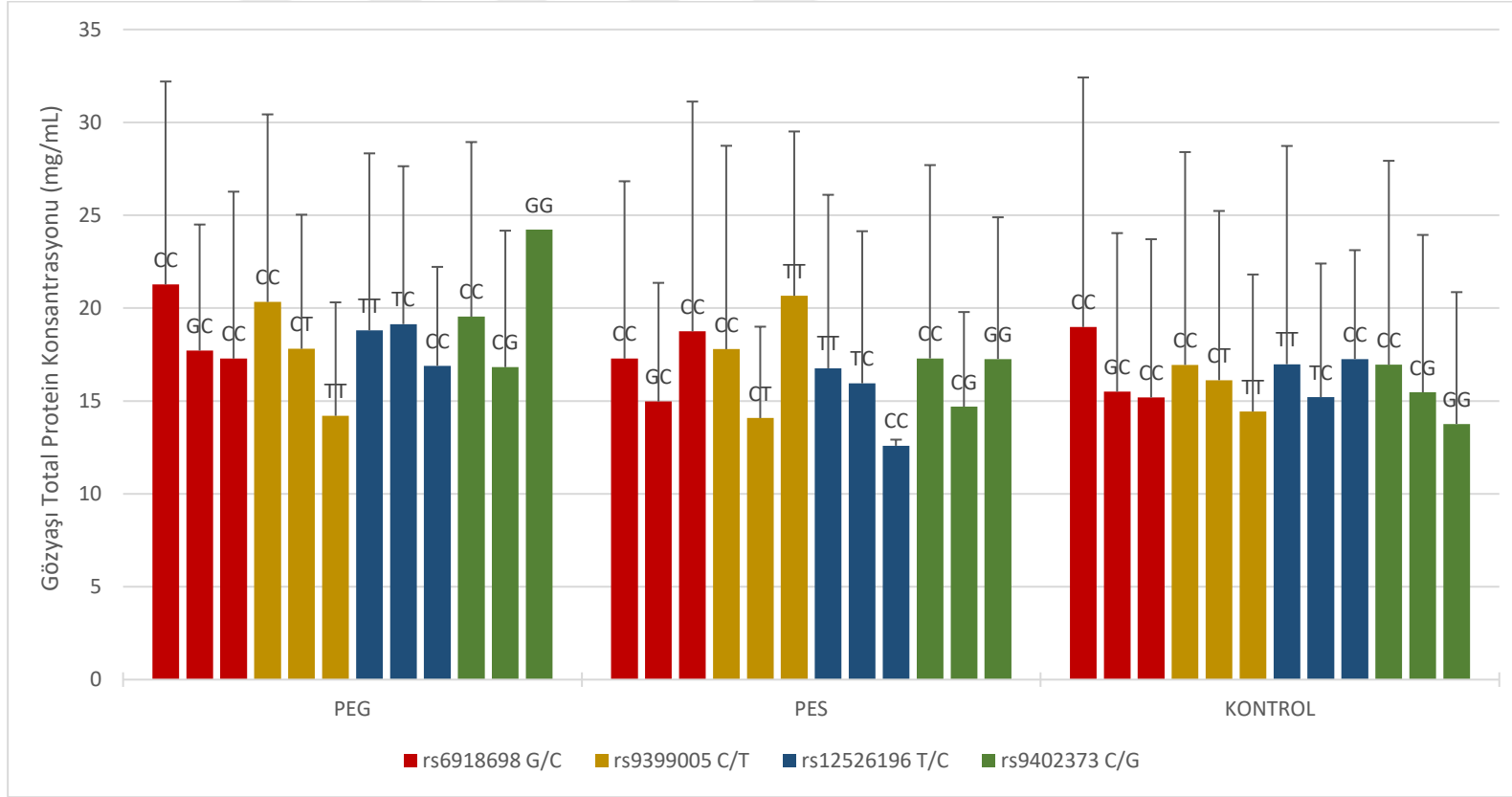
Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

a: PES vs. Kontrol, P=0.752; PEG vs. PES, P=0.873; PEG vs. Kontrol, P=0.015; Conover formülü (Conover, 1980) ile hesaplanmıştır.

Gözyaşında total protein konsantrasyonlarının, CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine ve hastalık durumuna göre karşılaştırmalarının grafiksel gösterimleri Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.8 : CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde total protein konsantrasyonu. *PEG-PES-Kontrol $P=0.030$, PEG vs. Kontrol $P=0.015$.



Şekil 3.9 : PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre total protein konsantrasyonu.

3.3.2 Gözyaşında CTGF konsantrasyonu

80 PEG hastası, 80 PES hastası ve 85 kontrolün CTGF konsantrasyonu ölçümleri yapılmıştır ancak 7 kontrol, 3 PES ve 2 PEG örneğinin absorbans değeri en büyük standardın absorbansının da çok üstünde kaldığı için (kullanılan kitin tespit sınırının üstünde kaldığı için) konsantrasyonu hesaplanamamıştır. Bu nedenle 78 PEG, 77 PES ve 78 kontrolün sayısal sonuçları elde edilmiştir ve yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.17 ve Şekil 3.10'da verilmektedir.

PEG hastaları için CTGF konsantrasyonu 12.15 ± 15.69 ng/ml, PES hastaları için 10.08 ± 12.11 ng/ml, kontroller için ise 11.91 ± 26.59 ng/ml olarak bulundu ($P=0.004$). Hangi gruplar arasında anlamlı fark olduğunu tespit etmek amacıyla Conover (1980) formülü uygulandı. Kontrol grubunda PEG grubuna göre düşük ($P=0.001$), PES grubuna göre ise yüksek ($P=0.025$) konsantrasyonda CTGF bulunduğu tespit edildi.

Tablo 3.17 : PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.

	PEG (n=78)	PES (n=77)	Kontrol (n=78)	P
CTGF konsantrasyonu (ng/ml)				
Ortalama\pmSD*	12.15 \pm 15.69	10.08 \pm 12.11	11.91 \pm 26.59	0.004
Medyan (IQR**)	5.98 (8.04)	5.44 (8.10)	3.61 (7.34)	

Kruskal-Wallis ile hesaplanmıştır.

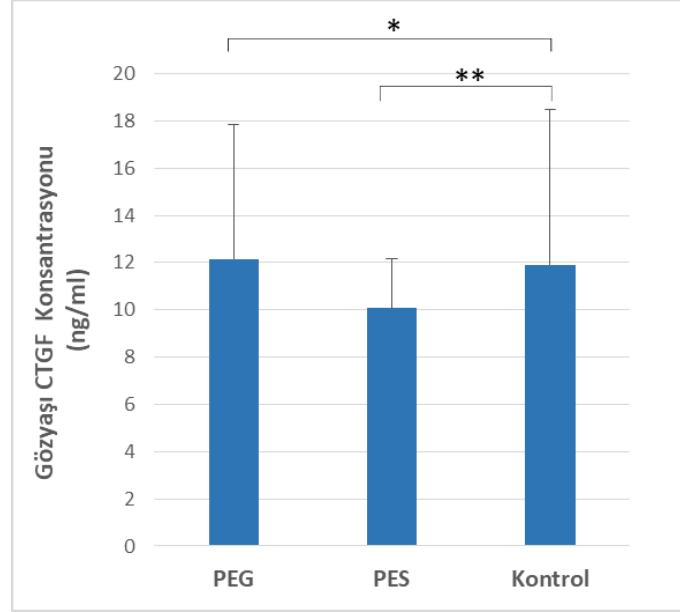
PES vs. Kontrol, $P=0.025$; PEG vs. PES, $P=0.299$; PEG vs. Kontrol, $P=0.001$; Conover formülü (Conover, 1980) ile hesaplanmıştır.

*SD: Standard deviation – Standart sapma

**IQR: Interquartile range – Çeyrekler açıklığı, %25 ile %75 arası dilim

Çalışmanın amacına uygun olarak her SNP bölgesinin 3 farklı genotipine göre de bazı karşılaştırmalar yapıldı. Bu analizler için hem genotip hem CTGF konsantrasyonu sonucu olan 77 PEG, 77 PES ve 76 Kontrol örneğinin sonuçları kullanıldı. Öncelikle hastalık durumu gözlemlenmeden sadece genotiplere göre CTGF konsantrasyonu seviyeleri karşılaştırıldı (Tablo 3.18). Daha sonra ise hem genotip hem de hastalık durumları birlikte değerlendirilerek karşılaştırmalar yapıldı.

CTGF rs6918698G/C bölgesi için hem genotiplere ve hastalık durumuna göre yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.19'da gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.



Şekil 3.10 : PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu. (PEG-PES-Kontrol P=0.014, *PEG vs. Kontrol P=0.001, **PES vs. Kontrol P=0.025).

Tablo 3.18 : Çalışma grubunun gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonunun (ng/ml) farklı CTGF genotiplerine göre karşılaştırılması.

<i>CTGF (ng/ml)</i>	Yabancıl homozigot	Heterozigot	Polimorfik homozigot	<i>P</i>
<u>rs6918698</u>	<u>GG (n=68)</u> 12.90 ± 26.13	<u>GC (n=112)</u> 10.81 ± 15.98	<u>CC (n=50)</u> 11.06 ± 14.48	0.595
<u>rs9399005</u>	<u>CC (n=112)</u> 12.15 ± 22.86	<u>CT (n=100)</u> 11.65 ± 15.91	<u>TT (n=18)</u> 6.35 ± 7.46	0.210
<u>rs12526196</u>	<u>TT (n=134)</u> 11.13 ± 19.94	<u>TC (n=86)</u> 12.51 ± 19.12	<u>CC (n=10)</u> 7.27 ± 6.13	0.839
<u>rs9402373</u>	<u>CC (n=151)</u> 11.86 ± 21.25	<u>CG (n=72)</u> 10.48 ± 14.45	<u>GG (n=7)</u> 13.58 ± 17.66	0.787

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

CTGF rs9399005C/T bölgesi için genotiplere ve hastalık durumuna göre yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.20’de gösterilmektedir. CC genotipinde olan bireylerde çalışma grupları arasındaki CTGF seviyeleri arasında anlamlı fark vardır (P=0.018). Bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Conover (1980) formülü kullanıldı, PEG’li bireylerdeki CTGF seviyesinin kontrollere göre anlamlı seviyede

düşük olduğu tespit edildi (P=0.004). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

Tablo 3.19 : CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu (ng/ml).

rs6918698	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
GG (PEG n=27, PES n=20, Kontrol n=21)	11.25 ± 12.22	7.94 ± 6.05	19.73 ± 44.52	0.232
GC (PEG n=35, PES n=41, Kontrol n=36)	12.94 ± 18.15	10.63 ± 14.10	8.93 ± 15.95	0.053
CC (PEG n=15, PES n=16, Kontrol n=19)	12.47 ± 16.38	11.36 ± 12.57	9.68 ± 15.05	0.222
P	0.710	0.581	0.864	

Sonuçlar ortalama ±standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-al-Wallis testi ile yapılmıştır.

Tablo 3.20 : CTGF rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu (ng/ml).

rs9399005	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
CC (PEG n=40, PES n=38, Kontrol n=34)	14.08 ± 18.13	8.04 ± 7.49	14.47 ± 35.74	0.018^a
CT (PEG n=31, PES n=34, Kontrol n=35)	11.09 ± 13.41	12.22 ± 15.88	11.60 ± 18.26	0.322
TT (PEG n=6, PES n=5, Kontrol n=7)	6.19 ± 7.50	11.05 ± 10.31	3.14 ± 3.09	0.279
P	0.218	0.886	0.217	

Sonuçlar ortalama ±standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal--Walli testi ile yapılmıştır. a: PES vs. Kontrol, P=0.136; PEG vs. PES, P=0.153; PEG vs. Kontrol, P=0.004 Conover formülü (Conover, 1980) ile hesaplanmıştır.

CTGF rs12526196T/C bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.21’de gösterilmektedir. TC genotipinde olan bireylerde çalışma grupları arasındaki CTGF seviyeleri arasında

anlamli fark vardir (P=0.013). Bu farkin hangi gruplar arasinda oldugunu belirlemek icin Conover (1980) formulu kullanildi. Kontrollerdeki CTGF seviyesinin PES'li bireylere gore anlamlı seviyede yuksek (P=0.032), PEG'li bireylere gore ise anlamlı seviyede dusuk (P=0.004) oldugu tespit edildi. Diğer gruplar arasinda anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

Tablo 3.21 : CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu (ng/ml).

rs12526196	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
TT (PEG n=40, PES n=49, Kontrol n=45)	10.01 ± 10.65	10.63 ± 14.05	12.67 ± 29.70	0.328
TC (PEG n=33, PES n=26, Kontrol n=27)	15.41 ± 20.83	9.36 ± 7.89	12.00 ± 24.08	0.013^a
CC (PEG n=4, PES n=2, Kontrol n=4)	8.79 ± 1.60	5.90 ± 6.79	6.43 ± 9.47	0.646
P	0.346	0.750	0.577	

Sonuçlar ortalama ±standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal--Walli testi ile yapılmıştır.

a: PES vs. Kontrol, P=0.032; PEG vs. PES, P=0.500; PEG vs. Kontrol, P=0.004; Conover formülü (Conover, 1980) ile hesaplanmıştır.

CTGF rs9402373C/G bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.22'de gösterilmektedir. CC genotipinde olan bireylerde üç grup arasındaki CTGF seviyeleri arasında anlamlı fark vardır (P=0.015). Bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Conover (1980) formülü kullanıldı, PEG'li bireylerdeki CTGF seviyesinin kontrollere göre anlamlı seviyede düşük olduğu tespit edildi (P=0.004). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

Gözyaşında CTGF konsantrasyonlarının, CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine ve hastalık durumuna göre karşılaştırmalarının grafiksel gösterimleri Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de verilmiştir.

Tablo 3.22 : CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu (ng/ml).

rs9402373	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
CC (PEG n=54, PES n=48, Kontrol n=49)	12.90 ± 16.29	8.69 ± 9.60	13.81 ± 31.83	0.015 ^a
CG (PEG n=22, PES n=26, Kontrol n=24)	10.28 ± 14.86	11.50 ± 14.08	9.57 ± 15.02	0.302
GG (PEG n=1, PES n=3, Kontrol n=3)	21.01	20.06 ± 26.55	4.62 ± 4.46	0.275
P	0.164	0.792	0.931	

Sonuçlar ortalama ±standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

a: PES vs. Kontrol, P=0.171; PEG vs. PES, P=0.127; PEG vs. Kontrol, P=0.004; Conover formülü (Conover, 1980) ile hesaplanmıştır.

3.3.3 Total protein içindeki CTGF oranı (%)

78 PEG, 77 PES ve 78 kontrolün hem total protein hem de CTGF konsantrasyonları bilindiğinden bu örneklerde total protein içindeki CTGF oranı analizleri yapılmıştır ve sonuçları Tablo 3.23 ve Şekil 3.13'te verilmektedir.

Tablo 3.23 : PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerinde CTGF'nin total proteine oranı (%).

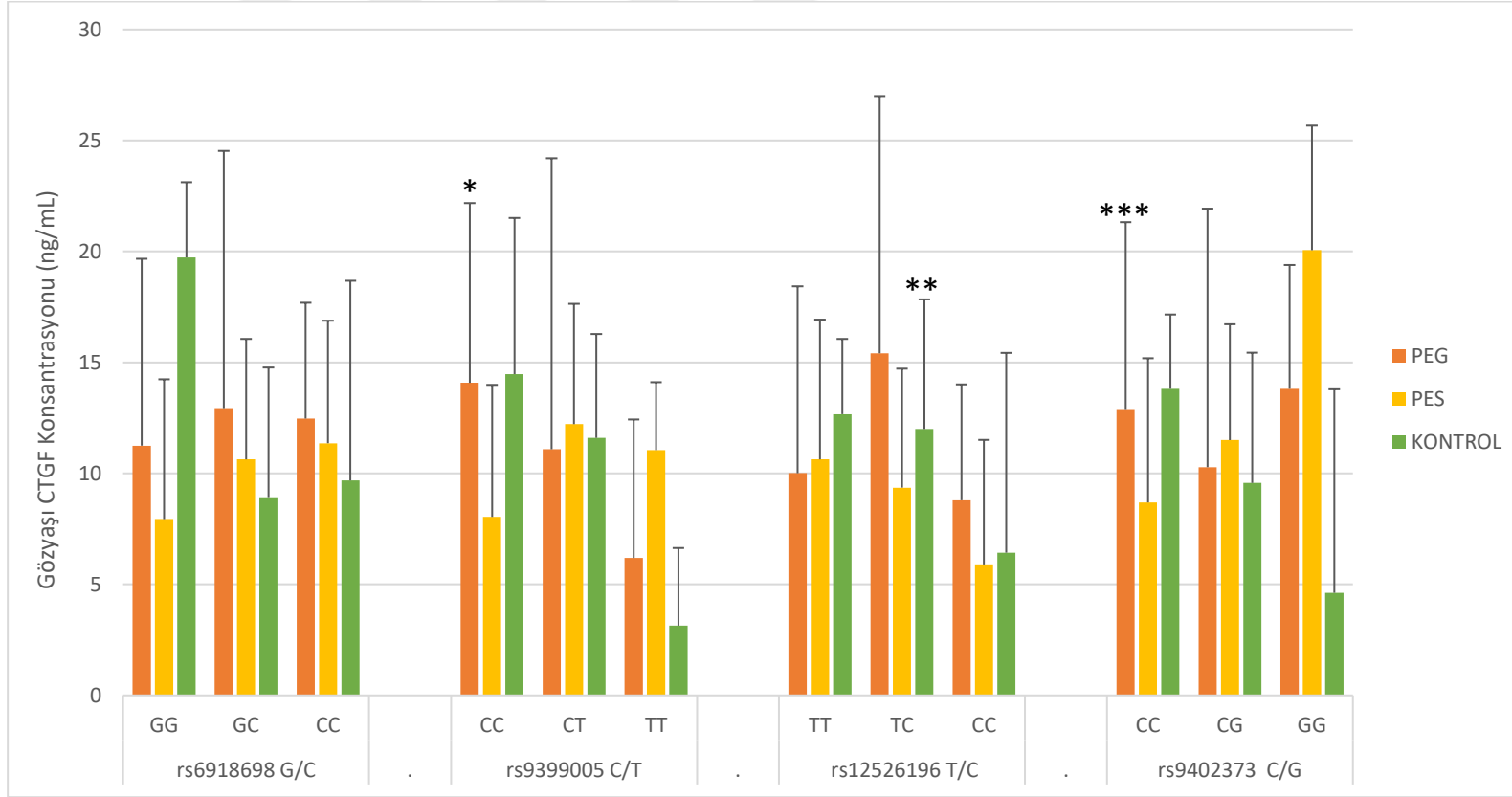
	PEG (n=78)	PES (n=77)	Kontrol (n=78)	P
Total protein içindeki CTGF oranı (%)				
Ortalama±SD*	0.00063 ± 0.00078	0.00068 ± 0.00084	0.00061 ± 0.00096	0.060
Medyan (IQR**)	0.00036 (0.00049)	0.00030 (0.00070)	0.00024 (0.00034)	

Üç grubun karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

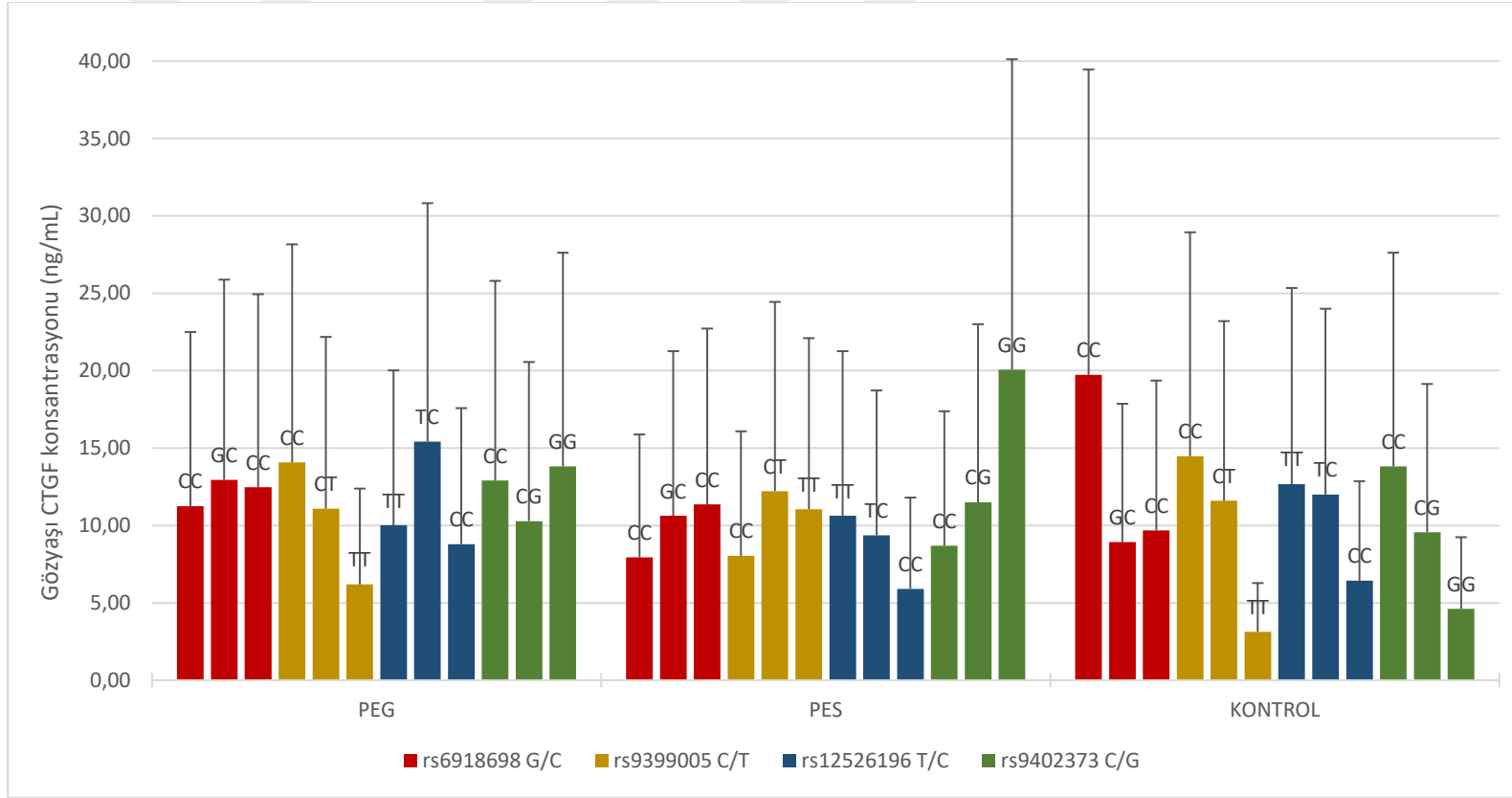
*SD: Standard deviation – Standart sapma

**IQR: Interquartile range – Çeyrekler açıklığı, %25 ile %75 arası dilim

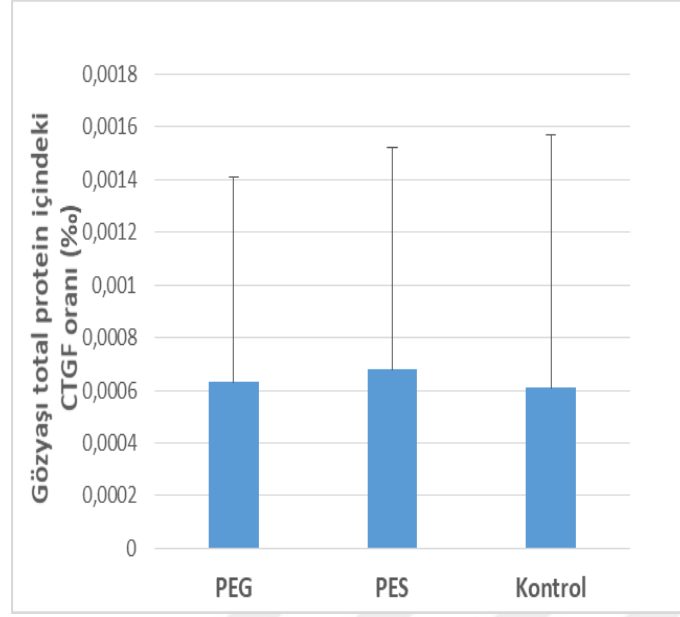
PEG hastaları için CTGF oranı %0.00063±0.00078, PES hastaları için %0.00068±0.00084, kontroller için ise %0.00061±0.00096 olarak bulundu (P=0.060). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 3.11 : CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde CTGF konsantrasyonu. *PEG-PES-Kontrol P=0.018, PEG vs. Kontrol P=0.004, ** PEG-PES-Kontrol P=0.013, PEG vs. Kontrol P=0.004, PES vs. Kontrol P=0.032, *** PEG-PES-Kontrol P=0.015, PEG vs Kontrol P=0.004.



Şekil 3.12 : PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre CTGF konsantrasyonu.



Şekil 3.13 : PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin gözyaşı örneklerinde CTGF'nin total proteine oranı (‰).

CTGF konsantrasyonu sonuçlarında olduğu gibi total protein içindeki CTGF oranları için de her SNP bölgesinin 3 farklı genotipine göre bazı karşılaştırmalar yapıldı. Bu analizler için hem genotip hem CTGF konsantrasyonu sonucu olan 77 PEG, 77 PES ve 76 Kontrol örneğinin sonuçları kullanıldı. Öncelikle hastalık durumu gözlemlenmeden sadece genotiplere göre total protein içindeki CTGF oranları karşılaştırıldı. Daha sonra ise hem genotip hem de hastalık durumları birlikte değerlendirilerek karşılaştırmalar yapıldı. Tablo 3.24'te 4 SNP bölgesinin farklı genotiplerine göre yapılan karşılaştırmaların sonuçları gösterilmektedir. CTGF rs6918698G/C genotiplerine bakıldığında GG genotipi için total protein içindeki CTGF oranı $\%0.00055 \pm 0.00064$, GC genotipi için $\%0.00070 \pm 0.00101$, CC genotipi için ise $\%0.00063 \pm 0.00079$ olarak bulundu (P=0.690). CTGF rs9399005C/T genotiplerine bakıldığında CC genotipi için total protein içindeki CTGF oranı $\%0.00060 \pm 0.00079$, CT genotipi için $\%0.00075 \pm 0.00100$. TT genotipi için ise $\%0.00032 \pm 0.00030$ olarak bulundu (P=0.131). CTGF rs12526196T/C genotiplerine bakıldığında TT genotipi için total protein içindeki CTGF oranı $\%0.00062 \pm 0.00084$, TC genotipi için $\%0.00070 \pm 0.00096$, CC genotipi için ise $\%0.00043 \pm 0.00031$ olarak bulundu (P=0.612). CTGF rs9402373C/G genotiplerine bakıldığında CC genotipi için total protein içindeki CTGF oranı $\%0.00063 \pm 0.00087$, CG genotipi için

$\%0.00065 \pm 0.00087$, GG genotipi için ise $\%0.00078 \pm 0.00103$ olarak bulundu (P=0.856).

Tablo 3.24 : Çalışma grubunun gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranlarının farklı CTGF genotiplerine göre karşılaştırılması (%).

Total protein içindeki CTGF oranları (%)	Yabanıl homozigot	Heterozigot	Polimorfik homozigot	P
<u>rs6918698</u>	<u>GG (n=68)</u> 0.00055 ± 0.00064	<u>GC (n=112)</u> 0.00070 ± 0.00101	<u>CC (n=50)</u> 0.00063 ± 0.00079	0.690
<u>rs9399005</u>	<u>CC (n=112)</u> 0.00060 ± 0.00079	<u>CT (n=100)</u> 0.00075 ± 0.00100	<u>TT (n=18)</u> 0.00032 ± 0.00030	0.131
<u>rs12526196</u>	<u>TT (n=134)</u> 0.00062 ± 0.00084	<u>TC (n=86)</u> 0.00070 ± 0.00096	<u>CC (n=10)</u> 0.00043 ± 0.00031	0.612
<u>rs9402373</u>	<u>CC (n=151)</u> 0.00063 ± 0.00087	<u>CG (n=72)</u> 0.00065 ± 0.00087	<u>GG (n=7)</u> 0.00078 ± 0.00103	0.856

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G bölgelerinde için genotiplere ve hastalık durumuna göre yapılan analizlerde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Tablo 3.25, 26, 27 ve 28). Gözyaşında total protein içindeki CTGF oranlarının, CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine ve hastalık durumuna göre karşılaştırmalarının grafiksel gösterimleri Şekil 3.14 ve Şekil 3.15'te verilmiştir.

3.4 Aköz ile yapılan analizler

Cerrahi müdahale gerekliliği olan hasta ve kontrollerden alınan aköz örnekleri laboratuvarımızda uygun koşullarda analiz yapılana kadar -86 °C'de muhafaza edildi. Daha sonra gerekli analizler yapıldı. Kullanılan yöntemler ayrıntılı olarak 2.3 numaralı bölümde anlatılmaktadır.

Tablo 3.25 : CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı (%).

rs6918698	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
GG (PEG n=27, PES n=20, Kontrol n=21)	0.00049 ± 0.00030	0.00050 ± 0.00036	0.00068 ± 0.00106	0.563
GC (PEG n=35, PES n=41, Kontrol n=36)	0.00075 ± 0.00102	0.00077 ± 0.00104	0.00058 ± 0.00099	0.143
CC (PEG n=15, PES n=16, Kontrol n=19)	0.00064 ± 0.00076	0.00064 ± 0.00072	0.00060 ± 0.00089	0.251
P	0.964	0.762	0.803	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Tablo 3.26 : CTGF rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı (%).

rs9399005	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
CC (PEG n=40, PES n=38, Kontrol n=34)	0.00068 ± 0.00088	0.00053 ± 0.00055	0.00059 ± 0.00091	0.123
CT (PEG n=31, PES n=34, Kontrol n=35)	0.00064 ± 0.00072	0.00087 ± 0.00110	0.00072 ± 0.00111	0.479
TT (PEG n=6, PES n=5, Kontrol n=7)	0.00036 ± 0.00028	0.00046 ± 0.00045	0.00020 ± 0.00013	0.279
P	0.582	0.512	0.271	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

3.4.1 Aközde total protein konsantrasyonu

10 PEG hastası, 17 PES hastası ve 23 kontrolün aköz örneklerinde total protein konsantrasyonu ölçümleri yapılmıştır. 2 PEG örneğinin CTGF konsantrasyonları bulunmadığı için hesaplamaya alınmamıştır. Bu nedenle 8 PEG, 17 PES ve 23 kontrole göre yapılan karşılaştırmanın sonuçları Tablo 3.29 ve Şekil 3.16'da verilmektedir. PEG hastaları için total protein konsantrasyonu 388.65±161.52 µg/ml, PES hastaları için 270.17±199.12 µg/ml, kontroller için ise 196.85±91.63 µg/ml olarak bulundu (P=0.012). Hangi gruplar arasında anlamlı fark olduğunu tespit etmek amacıyla

Conover (1980) formülü uygulandı. PEG grubundaki total protein konsantrasyonunun PES grubuna (P=0.012) ve kontrol grubuna (P=0.003) göre anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edildi.

Tablo 3.27 : CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı (%).

rs12526196	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
TT (PEG n=40, PES n=49, Kontrol n=45)	0.00051 ± 0.00052	0.00072 ± 0.00101	0.00061 ± 0.00087	0.587
TC (PEG n=33, PES n=26, Kontrol n=27)	0.00080 ± 0.00104	0.00061 ± 0.00045	0.00067 ± 0.00120	0.125
CC (PEG n=4, PES n=2, Kontrol n=4)	0.00055 ± 0.00015	0.00046 ± 0.00052	0.00029 ± 0.00037	0.646
P	0.365	0.584	0.375	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Tablo 3.28 : CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı (%).

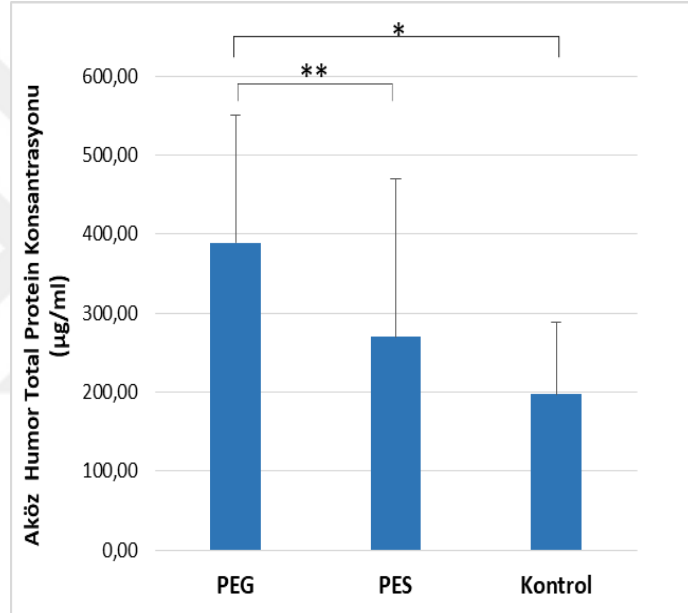
rs9402373	PEG (n=77)	PES (n=77)	Kontrol (n=76)	P
CC (PEG n=54, PES n=48, Kontrol n=49)	0.00068 ± 0.00088	0.00056 ± 0.00062	0.00065 ± 0.00106	0.094
CG (PEG n=22, PES n=26, Kontrol n=24)	0.00051 ± 0.00053	0.00083 ± 0.00107	0.00058 ± 0.00087	0.458
GG (PEG n=1, PES n=3, Kontrol n=3)	0.00087	0.00124 ± 0.00157	0.00028 ± 0.00017	0.403
P	0.453	0.512	0.947	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Tablo 3.29 : PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu.

	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=23)	P
Total Protein (µg/ml)				
Ortalama±SD*	388.65±161.52	270.17±199.12	196.85±91.63	0.012
Medyan (IQR**)	352.50 (316.35)	171.50 (209.06)	175.40 (82.00)	

Kruskal-Wallis ile hesaplanmıştır. *SD: Standard deviation – Standart sapma, **IQR: Interquartile range – Çeyrekler açıklığı, %25 ile %75 arası dilim
PES vs. Kontrol, P=0.562; PEG vs. PES, P=0.012; PEG vs. Kontrol, P=0.003; Conover formülü (Conover, 1980) ile hesaplanmıştır.



Şekil 3.14 : PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu (PEG-PES-Kontrol P=0.012, *PEG vs. Kontrol P=0.003, **PEG vs. PES P=0.012).

Her SNP bölgesinin 3 farklı genotipine göre hastalık durumu gözlemlenmeden total protein seviyeleri karşılaştırıldı. Bu analizler için hem genotip hem total protein sonucu olan 8 PEG, 17 PES ve 21 Kontrol örneğin sonuçları kullanıldı. Tablo 3.30'da 4 SNP bölgesinin farklı genotiplerine göre yapılan karşılaştırmaların sonuçları görülmektedir. CTGF rs6918698G/C genotiplerine bakıldığında GG genotipi için total protein konsantrasyonu 265.69±203.46 µg/ml, GC genotipi için 268.87±154.29 µg/ml, CC genotipi için ise 206.89±142.81 µg/ml olarak bulundu (P=0.391). CTGF rs9399005C/T genotiplerine bakıldığında CC genotipi için total protein

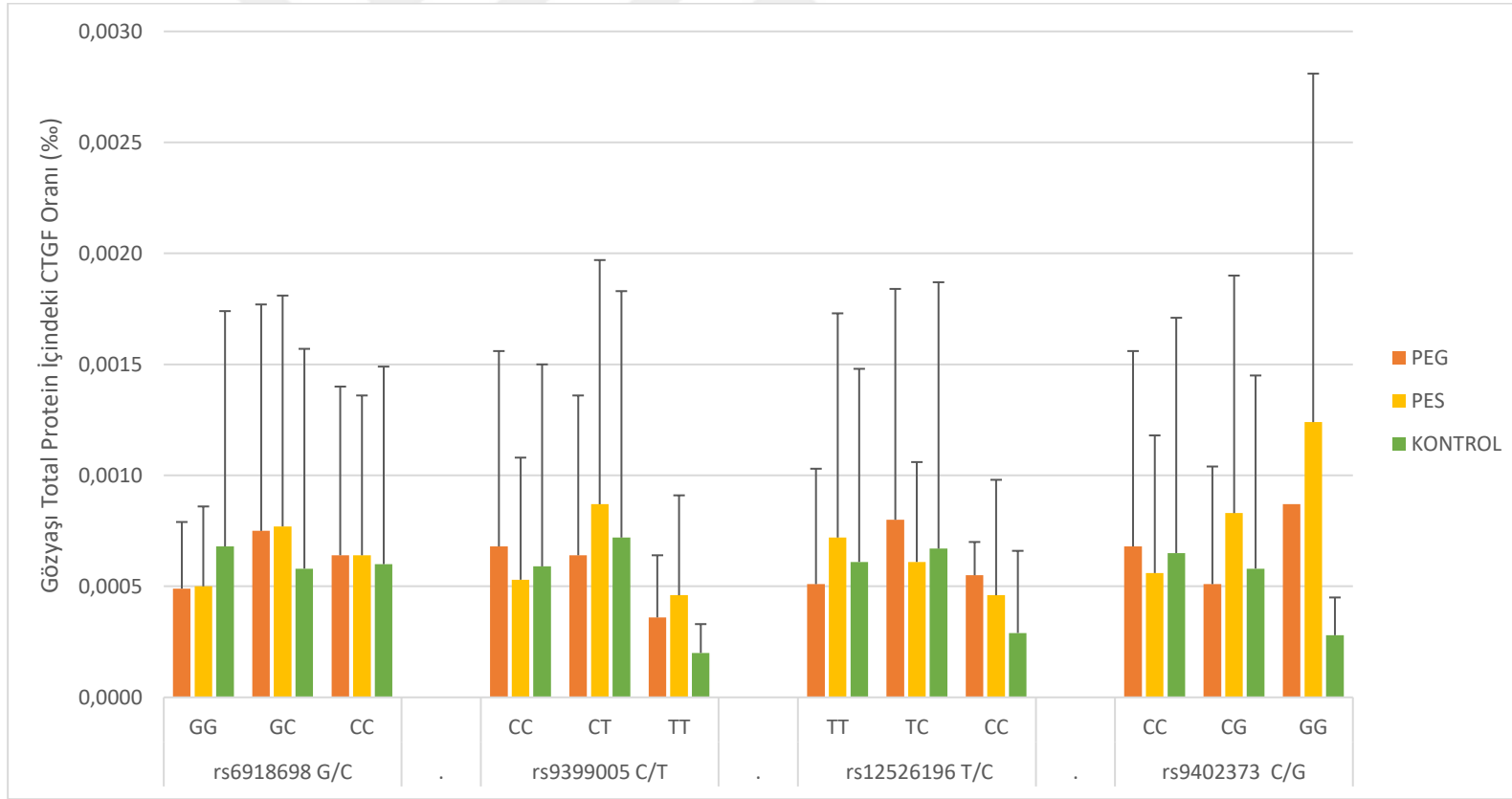
konsantrasyonu 293.66 ± 190.35 $\mu\text{g/ml}$, CT genotipi için 234.09 ± 138.28 $\mu\text{g/ml}$, TT genotipi için ise 152.57 ± 25.16 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulundu ($P=0.320$). CTGF rs12526196T/C genotiplerine bakıldığında TT genotipi için total protein konsantrasyonu 259.78 ± 156.86 $\mu\text{g/ml}$, TC genotipi için 266.85 ± 190.09 $\mu\text{g/ml}$, CC genotipi için ise 183.43 ± 95.19 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulundu ($P=0.877$). CTGF rs9402373C/G genotiplerine bakıldığında CC genotipi için total protein konsantrasyonu 264.42 ± 178.45 $\mu\text{g/ml}$, CG genotipi için 252.04 ± 143.50 $\mu\text{g/ml}$, sadece 1 örnek olan GG genotipi için ise 133.18 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulundu ($P=0.850$).

Tablo 3.30 : Çalışma grubunun aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonunun farklı CTGF genotiplerine göre karşılaştırılması ($\mu\text{g/ml}$).

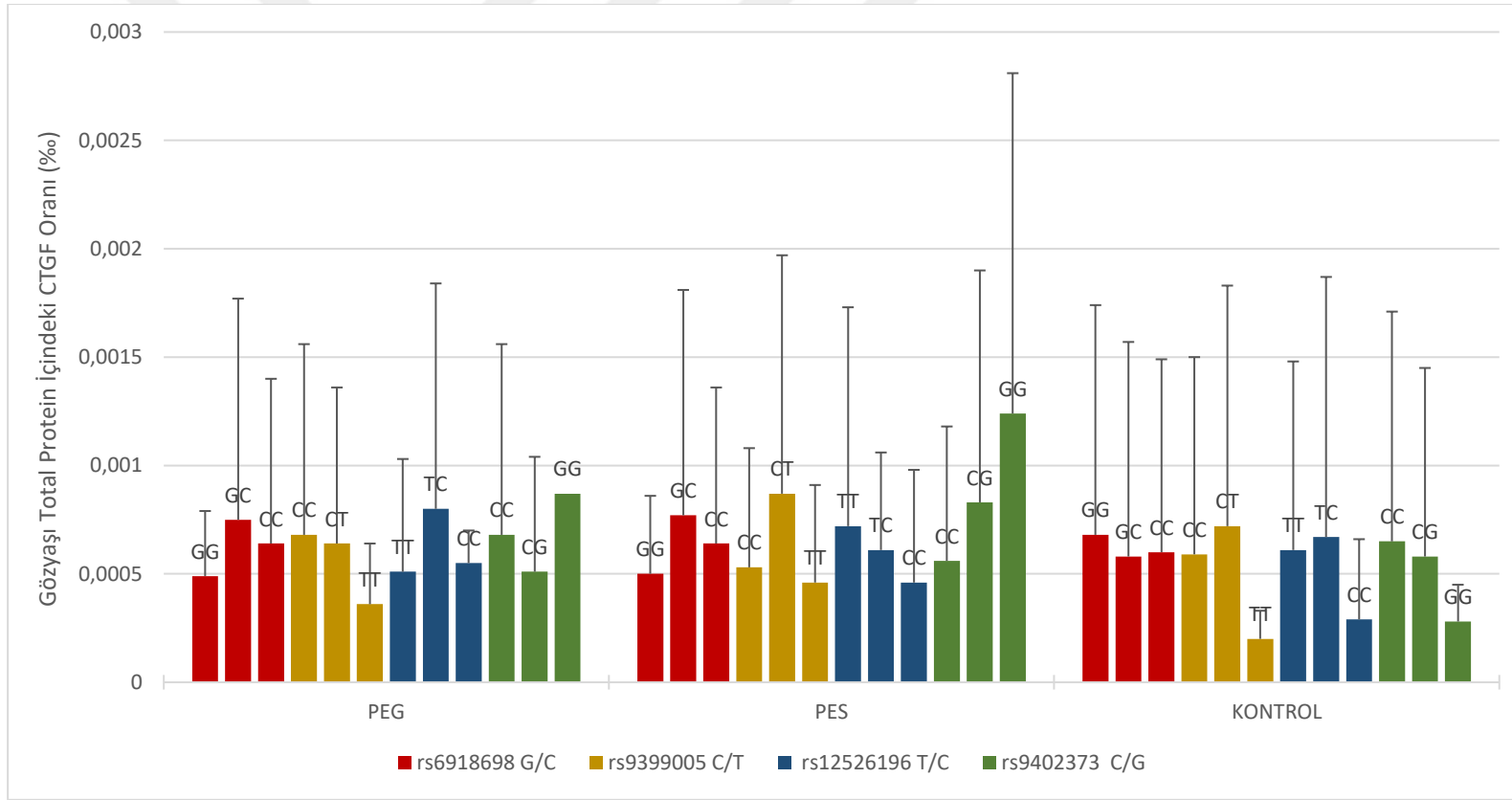
Total Protein ($\mu\text{g/ml}$)	Yabancıl homozigot	Heterozigot	Polimorfik homozigot	P
<u>rs6918698</u>	<u>GG (n=12)</u> 265.69 ± 203.46	<u>GC (n=26)</u> 268.87 ± 154.29	<u>CC (n=8)</u> 206.89 ± 142.81	0.391
<u>rs9399005</u>	<u>CC (n=22)</u> 293.66 ± 190.35	<u>CT (n=21)</u> 234.09 ± 138.28	<u>TT (n=3)</u> 152.57 ± 25.16	0.320
<u>rs12526196</u>	<u>TT (n=27)</u> 259.78 ± 156.86	<u>TC (n=16)</u> 266.85 ± 190.09	<u>CC (n=3)</u> 183.43 ± 95.19	0.877
<u>rs9402373</u>	<u>CC (n=29)</u> 264.42 ± 178.45	<u>CG (n=16)</u> 252.04 ± 143.50	<u>GG (n=1)</u> 133.18	0.850

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T ve rs9402373C/G bölgeleri için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.31, 3.32 ve 3.34'te gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi. CTGF rs12526196T/C bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.33'te gösterilmektedir. TT genotipinde olan bireylerde PEG, PES ve kontrol grupları arasında anlamlı fark vardır ($P=0.042$). PEG'li bireylerdeki total protein seviyesinin PES ($P=0.011$) ve kontrollere ($P=0.043$) göre anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edildi. TC genotipinde olan bireylerde de çalışma grupları arasında anlamlı fark vardır ($P=0.004$). Kontrol bireylerdeki total protein seviyesinin PES ($P=0.000$) ve PEG'e ($P=0.003$) göre anlamlı seviyede düşük olduğu tespit edildi.



Şekil 3.15 : CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı.



Şekil 3.16 : PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre total protein içindeki CTGF oranı.

Tablo 3.31 : CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$).

rs6918698	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
GG (PEG n=1, PES n=2, Kontrol n=9)	590.40	408.54 \pm 449.66	197.86 \pm 90.47	1.000
GC (PEG n=6, PES n=11, Kontrol n=9)	327.70 \pm 136.19	290.62 \pm 180.60	203.08 \pm 117.95	0.265
CC (PEG n=1, PES n=4, Kontrol n=3)	552.60	144.74 \pm 8.70	174.53 \pm 47.05	0.257
P	0.184	0.217	0.989	

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Tablo 3.32 : CTGF rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$).

rs9399005	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
CC (PEG n=12, PES n=7, Kontrol n=3)	410.20 \pm 191.22	383.87 \pm 243.78	211.91 \pm 118.03	0.141
CT (PEG n=5, PES n=8, Kontrol n=8)	375.72 \pm 163.75	203.64 \pm 129.35	176.02 \pm 57.79	0.093
TT (PEG n=0, PES n=2, Kontrol n=1)	-	138.35 \pm 7.31	181.00	-
P	0.795	0.053	0.758	

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Aközde total protein konsantrasyonlarının CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine ve hastalık durumuna göre karşılaştırmalarının grafiksel gösterimleri Şekil 3.17 ve Şekil 3.18’de verilmiştir.

Tablo 3.33 : CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$).

rs12526196	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
TT (PEG n=4, PES n=13, Kontrol n=10)	451.45 \pm 136.06	221.18 \pm 154.11	233.31 \pm 118.27	0.042 ^a
TC (PEG n=4, PES n=3, Kontrol n=9)	325.85 \pm 178.44	542.33 \pm 178.50	148.80 \pm 44.34	0.004 ^b
CC (PEG n=0, PES n=1, Kontrol n=2)	-	90.58	229.85 \pm 72.05	-
P	0.881	0.026 ^c	0.137	

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

a: Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır. PES vs. Kontrol, P=0.540; PEG vs. PES, P=0.011; PEG vs. Kontrol, P=0.043; Conover formülü ile hesaplanmıştır.

b: Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır. PES vs. Kontrol, P=0,000; PEG vs. PES, P=0.227; PEG vs. Kontrol, P=0.003; Conover formülü ile hesaplanmıştır.

c: TT vs. TC, P=0.026; Mann-Whitney ile hesaplanmıştır.

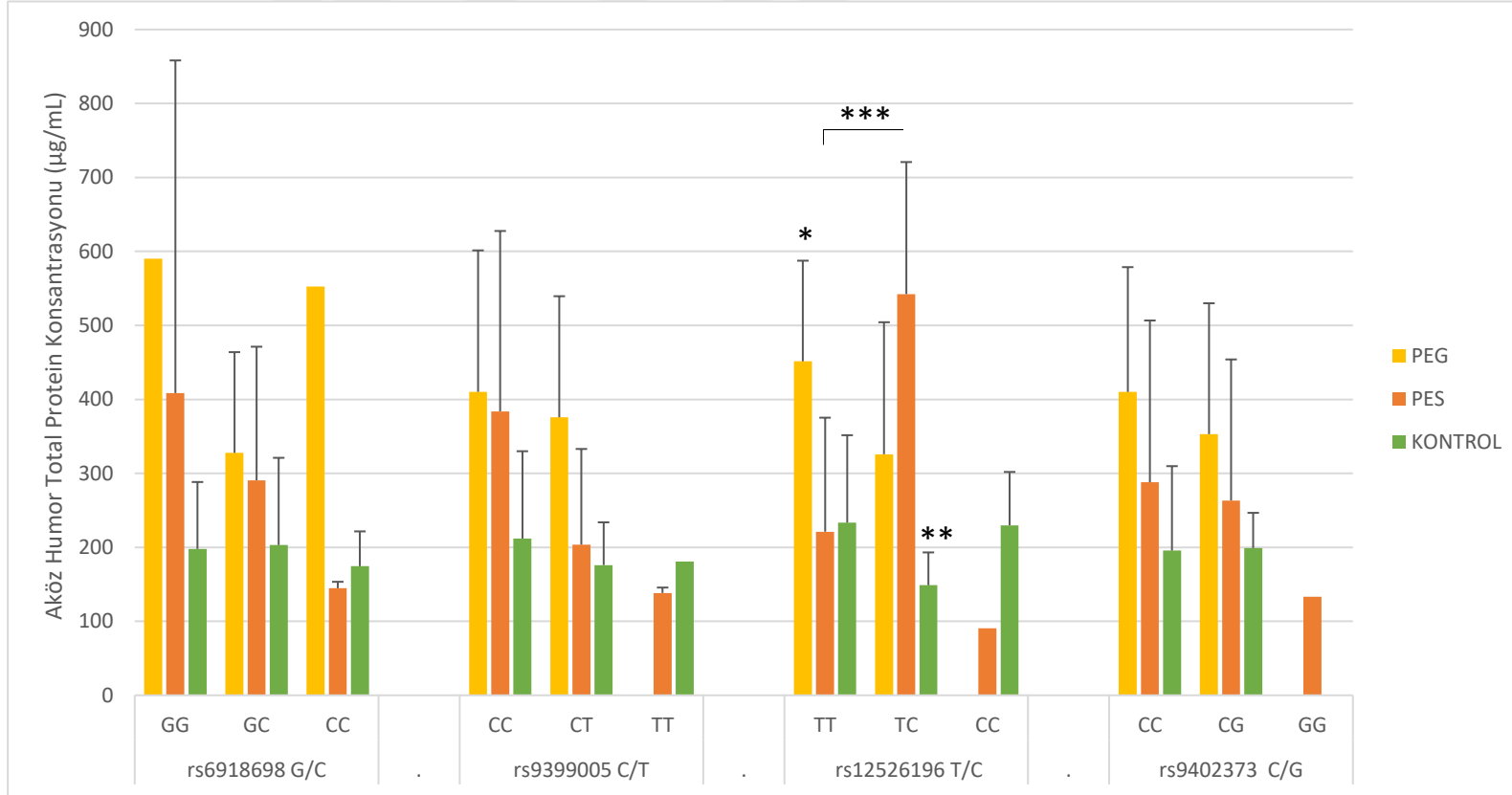
Tablo 3.34 : CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki total protein konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$).

rs9402373	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
CC (PEG n=5, PES n=10, Kontrol n=14)	410.04 \pm 168.75	287.93 \pm 218.72	195.62 \pm 114.15	0.054
CG (PEG n=3, PES n=6, Kontrol n=7)	353.00 \pm 176.92	263.40 \pm 190.62	199.04 \pm 47.62	0.202
GG (PEG n=0, PES n=1, Kontrol n=0)	-	133.18	-	-
P	0.665	0.664	0.296	

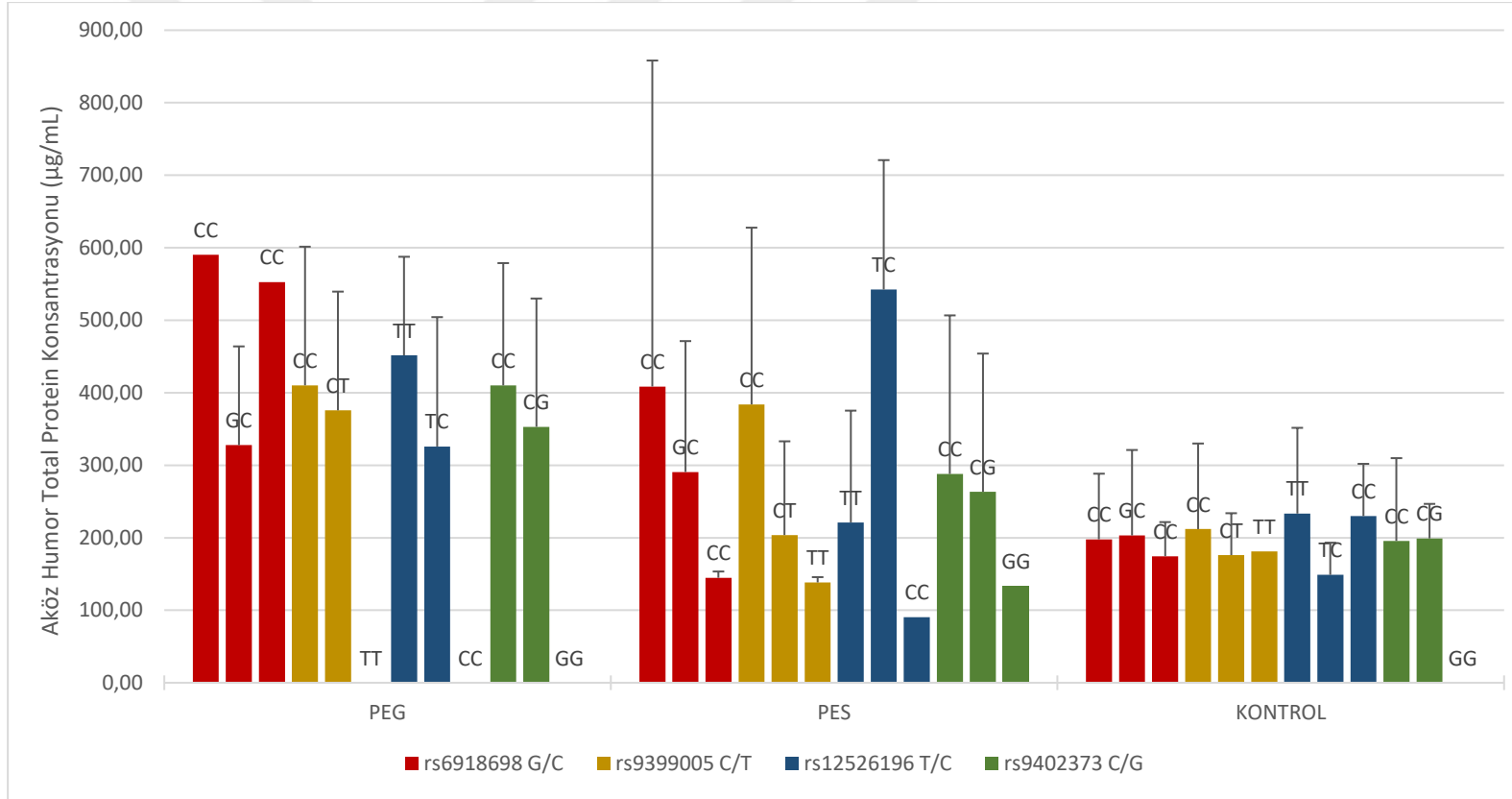
Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

3.4.2 Aközde CTGF konsantrasyonu

8 PEG hastası, 17 PES hastası ve 23 kontrolün CTGF konsantrasyonu ölçümleri yapılmıştır ve sonuçlar Tablo 3.35 ve Şekil 3.19'da verilmektedir.



Şekil 3.17 : CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz örneklerinde total protein konsantrasyonu. *PEG-PES-Kontrol P=0.042, PEG vs. PES P=0.011, PEG vs. Kontrol P=0.043 **PEG-PES-Kontrol P=0.004, PEG vs. Kontrol P=0.003, PES vs. Kontrol P=0.000 ***PES için TT vs. TC P=0.026.



Şekil 3.18 : PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre total protein konsantrasyonu.

PEG hastaları için CTGF konsantrasyonu 5.40 ± 2.87 ng/ml, PES hastaları için 3.62 ± 2.16 ng/ml, kontroller için ise 4.10 ± 2.90 ng/ml olarak bulundu ($P=0.190$). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

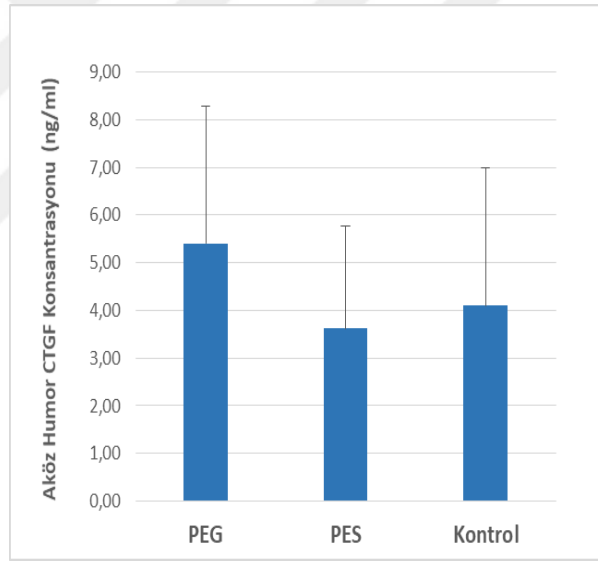
Tablo 3.35 : PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.

	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=23)	P
CTGF konsantrasyonu (ng/ml)				
Ortalama\pmSD*	5.40 \pm 2.87	3.62 \pm 2.16	4.10 \pm 2.90	0.190
Medyan (IQR**)	4.35 (4.29)	2.89 (2.24)	2.84 (3.32)	

Üç grubun karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

*SD: Standard deviation – Standart sapma

**IQR: Interquartile range – Çeyrekler açıklığı, %25 ile %75 arası dilim



Şekil 3.19 : PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu.

Her SNP bölgesinin 3 farklı genotipine göre bazı karşılaştırmalar yapıldı. Bu analizler için hem genotip hem CTGF konsantrasyonu sonucu olan 8 PEG, 17 PES ve 21 Kontrol örneğin sonuçları kullanıldı. Öncelikle hastalık durumu gözlemlenmeden sadece genotiplere göre CTGF konsantrasyonu seviyeleri karşılaştırıldı (Tablo 3.36). Daha sonra ise hem genotip hem de hastalık durumları birlikte değerlendirilerek karşılaştırmalar yapıldı. CTGF rs6918698G/C genotiplerine bakıldığında GG

genotipi için CTGF konsantrasyonu 3.74 ± 2.89 ng/ml, GC genotipi için 4.55 ± 2.69 ng/ml, CC genotipi için ise 4.06 ± 2.44 ng/ml olarak bulundu ($P=0.514$). CTGF rs9399005C/T genotiplerine bakıldığında CC genotipi için CTGF konsantrasyonu 4.09 ± 2.74 ng/ml, CT genotipi için 4.30 ± 2.64 ng/ml, TT genotipi için ise 5.08 ± 3.17 ng/ml olarak bulundu ($P=0.780$). CTGF rs12526196T/C genotiplerine bakıldığında TT genotipi için CTGF konsantrasyonu 4.30 ± 2.70 ng/ml, TC genotipi için 4.48 ± 2.84 ng/ml, CC genotipi için ise 2.63 ± 0.77 ng/ml olarak bulundu ($P=0.422$). CTGF rs9402373C/G genotiplerine bakıldığında CC genotipi için CTGF konsantrasyonu 3.93 ± 2.48 ng/ml, CG genotipi için 4.94 ± 3.00 ng/ml, sadece 1 örnek olan GG genotipi için ise 2.49 ng/ml olarak bulundu ($P=0.361$).

Tablo 3.36 : Çalışma grubunun aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonunun farklı CTGF genotiplerine göre karşılaştırılması (ng/ml).

<i>CTGF (ng/ml)</i>	Yabancıl homozigot	Heterozigot	Polimorfik homozigot	<i>P</i>
<u>rs6918698</u>	<u>GG (n=12)</u> 3.74 ± 2.89	<u>GC (n=26)</u> 4.55 ± 2.69	<u>CC (n=8)</u> 4.06 ± 2.44	0.514
<u>rs9399005</u>	<u>CC (n=22)</u> 4.09 ± 2.74	<u>CT (n=21)</u> 4.30 ± 2.64	<u>TT (n=3)</u> 5.08 ± 3.17	0.780
<u>rs12526196</u>	<u>TT (n=27)</u> 4.30 ± 2.70	<u>TC (n=16)</u> 4.48 ± 2.84	<u>CC (n=3)</u> 2.63 ± 0.77	0.422
<u>rs9402373</u>	<u>CC (n=29)</u> 3.93 ± 2.48	<u>CG (n=16)</u> 4.94 ± 3.00	<u>GG (n=1)</u> 2.49	0.361

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T ve rs9402373C/G bölgeleri için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerde gruplar arasında anlamlı fark görülmedi (Tablo 3.37, 3.38 ve 3.40). CTGF rs12526196T/C bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlere göre kontrollerde genotip gruplarındaki CTGF seviyeleri arasında anlamlı fark vardır ($P=0.018$). TT genotipindeki kontrol bireylerdeki CTGF seviyesinin CC genotipindeki kontrol bireylere göre anlamlı seviyede yüksek ($P=0.023$) olduğu tespit edildi. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Tablo 3.39).

Tablo 3.37 : CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu (ng/ml).

rs6918698	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
GG (PEG n=1, PES n=2, Kontrol n=9)	3.97	3.00 ± 0.69	3.87 ± 3.36	0.814
GC (PEG n=6, PES n=11, Kontrol n=9)	5.37 ± 3.26	4.02 ± 2.58	4.65 ± 2.61	0.629
CC (PEG n=1, PES n=4, Kontrol n=3)	7.01	2.83 ± 0.98	4.72 ± 3.38	0.480
P	0.562	0.614	0.652	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Tablo 3.38 : CTGF rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu (ng/ml).

rs9399005	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
CC (PEG n=12, PES n=7, Kontrol n=3)	4.71 ± 2.41	4.60 ± 2.86	3.64 ± 2.90	0.401
CT (PEG n=5, PES n=8, Kontrol n=8)	5.81 ± 3.32	2.84 ± 1.35	4.82 ± 2.73	0.322
TT (PEG n=0, PES n=2, Kontrol n=1)	-	3.32 ± 1.17	8.62	-
P	0.638	0.300	0.440	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

3.4.3 Total protein içindeki CTGF oranı (%)

8 PEG, 17 PES ve 23 kontrolün hem total protein hem de CTGF konsantrasyonları bilindiğinden bu örneklerde total protein içindeki CTGF oranı analizleri yapılmıştır ve sonuçları Tablo 3.41 ve Şekil 3.22'de verilmektedir.

PEG hastaları için CTGF oranı %0.0017± 0.0013, PES hastaları için %0.0020± 0.0014, kontroller için ise %0.0022± 0.0013 olarak bulundu (P=0.506). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 3.39 : CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu (ng/ml).

rs12526196	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
TT (PEG n=4, PES n=13, Kontrol n=10)	4.56 ± 1.82	3.00 ± 1.27	5.90 ± 3.53	0.077 ^a
TC (PEG n=4, PES n=3, Kontrol n=9)	6.23 ± 3.76	6.41 ± 3.68	3.05 ± 1.11	0.255 ^a
CC (PEG n=0, PES n=1, Kontrol n=2)	-	3.48	2.21 ± 0.33	-
P	0.454 ^a	0.247 ^a	0.018^b	

sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

a: Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

b: Üçlü grupların karşılaştırması ANOVA ile hesaplanmıştır; CC vs. TC, P=0.199; CC vs. TT, P=0.023; TT vs. TC, P=0.081; Games-Howell formülü ile hesaplanmıştır.

Tablo 3.40: CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu (ng/ml).

rs9402373	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
CC (PEG n=5, PES n=10, Kontrol n=14)	4.98 ± 2.09	3.60 ± 2.38	3.80 ± 2.73	0.199
CG (PEG n=3, PES n=6, Kontrol n=7)	6.09 ± 4.37	3.84 ± 2.12	5.39 ± 3.22	0.302
GG (PEG n=0, PES n=1, Kontrol n=0)	-	2.49	-	-
P	0.634	0.515	0.551	

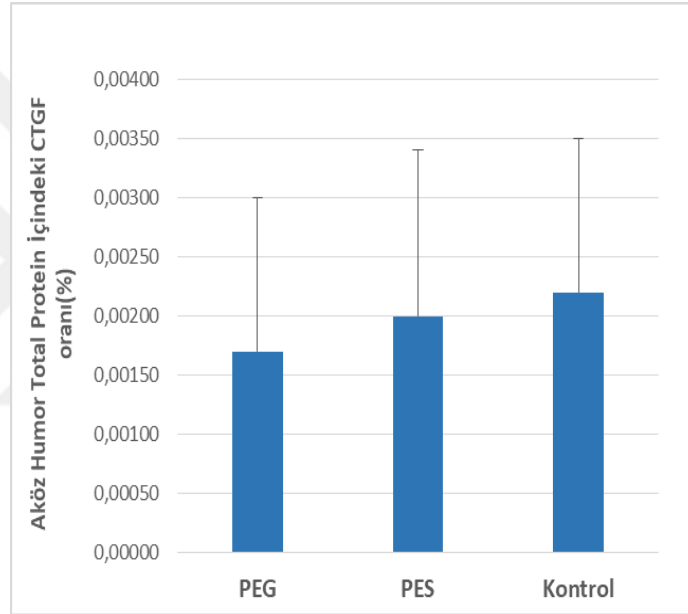
Sonuçlar ortalama ±standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Total protein ve CTGF konsantrasyonu sonuçlarında olduğu gibi total protein içindeki CTGF oranları için de her SNP bölgesinin 3 farklı genotipine göre bazı karşılaştırmalar yapıldı. Bu analizler için hem genotip hem CTGF konsantrasyonu sonucu olan 8 PEG, 17 PES ve 21 Kontrol örneğin sonuçları kullanıldı.

Tablo 3.41: PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerinde CTGF'nin total proteine oranı.

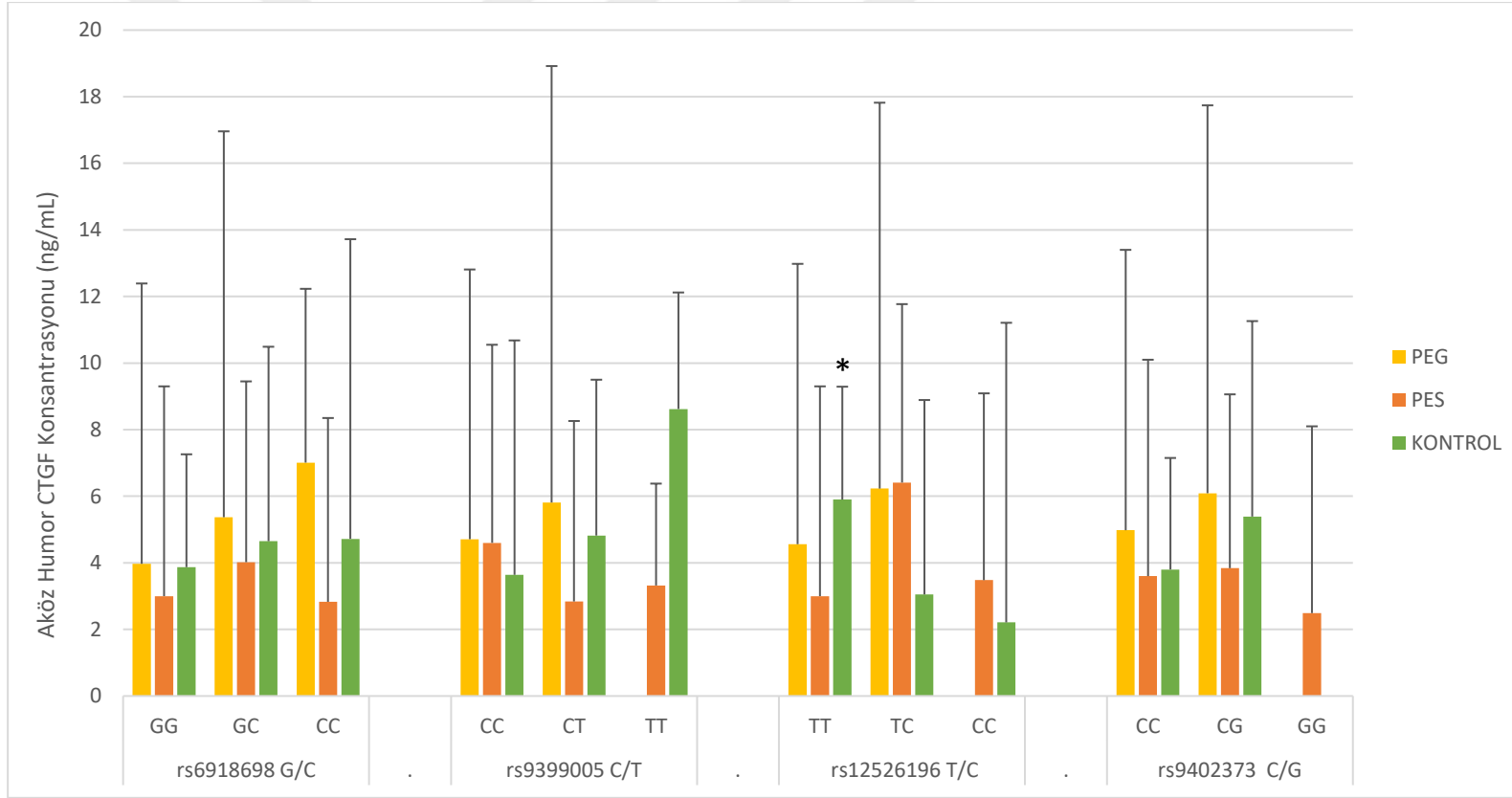
	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=23)	P
Total protein içindeki CTGF oranı (%)				
Ortalama±SD*	0.0017 ± 0.0013	0.0020 ± 0.0014	0.0022 ± 0.0013	0.506
Medyan (IQR**)	0.0012 (0.0023)	0.0019 (0.0025)	0.0021 (0.0020)	

Üç grubun karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

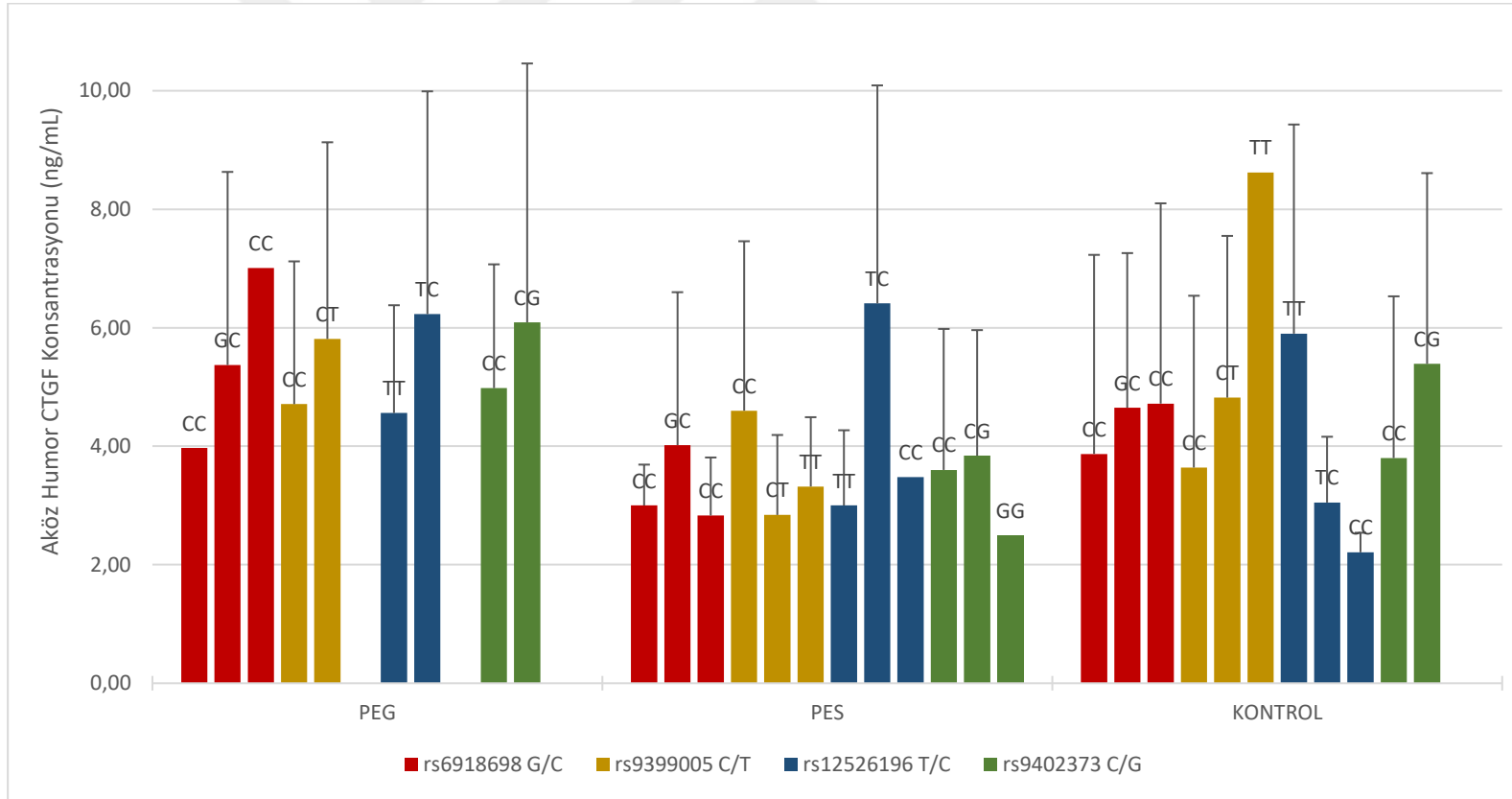


Şekil 3.20 : PEG hastası, PES hastası ve kontrollerin aköz örneklerinde CTGF'nin total proteine oranı (%).

Öncelikle hastalık durumu gözlemlenmeden sadece genotiplere göre total protein içindeki CTGF oranları karşılaştırıldı. Daha sonra ise hem genotip hem de hastalık durumları birlikte değerlendirilerek karşılaştırmalar yapıldı. Tablo 3.42'de 4 SNP bölgesinin farklı genotiplerine göre yapılan karşılaştırmaların sonuçları görülmektedir.



Şekil 3.21 : CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz humör örneklerinde CTGF konsantrasyonu. *Kontrol için TT-TC-CC P=0.018, TT vs. CC P=0.023.



Şekil 3.22 : PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz humor örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre CTGF konsantrasyonu.

CTGF rs6918698G/C genotiplerine bakıldığında GG genotipi için total protein içindeki CTGF oranı 0.0019 ± 0.0011 , GC genotipi için 0.0022 ± 0.0014 , CC genotipi için ise 0.0022 ± 0.0012 olarak bulundu (P=0.751). CTGF rs9399005C/T genotiplerine bakıldığında CC genotipi için total protein içindeki CTGF oranı 0.0018 ± 0.0011 , CT genotipi için 0.0022 ± 0.0014 , TT genotipi için ise 0.0032 ± 0.0015 olarak bulundu (P=0.194). CTGF rs12526196T/C genotiplerine bakıldığında TT genotipi için total protein içindeki CTGF oranı 0.0021 ± 0.0014 , TC genotipi için 0.0021 ± 0.0012 , CC genotipi için ise 0.0020 ± 0.0017 olarak bulundu (P=0.985). CTGF rs9402373C/G genotiplerine bakıldığında CC genotipi için total protein içindeki CTGF oranı 0.0020 ± 0.0012 , CG genotipi için 0.0024 ± 0.0015 , sadece 1 örnek olan GG genotipi için ise 0.0019 olarak bulundu (P=0.361).

Tablo 3.42 : Çalışma grubunun aköz örneklerinde total protein içindeki CTGF oranlarının genotiplere göre karşılaştırılması (%).

<i>Total protein içindeki CTGF oranları (%)</i>	Yabancıl homozigot	Heterozigot	Polimorfik homozigot	P
rs6918698	<u>GG (n=12)</u> 0.0019 ± 0.0011	<u>GC (n=26)</u> 0.0022 ± 0.0014	<u>CC (n=8)</u> 0.0022 ± 0.0012	0.751
rs9399005	<u>CC (n=22)</u> 0.0018 ± 0.0011	<u>CT (n=21)</u> 0.00223 ± 0.00141	<u>TT (n=3)</u> 0.0032 ± 0.0015	0.194
rs12526196	<u>TT (n=27)</u> 0.0021 ± 0.0014	<u>TC (n=16)</u> 0.0021 ± 0.0012	<u>CC (n=3)</u> 0.0020 ± 0.0017	0.985
rs9402373	<u>CC (n=29)</u> 0.0020 ± 0.0012	<u>CG (n=16)</u> 0.0024 ± 0.0015	<u>GG (n=1)</u> 0.0019	0.361

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

CTGF rs6918698G/C bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.43'te gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

CTGF rs9399005C/T bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.44'te gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

Tablo 3.43 : CTGF rs6918698G/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı (%).

rs6918698	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
GG (PEG n=1, PES n=2, Kontrol n=9)	0.0007	0.0021 ± 0.0025	0.0019 ± 0.0009	0.940
GC (PEG n=6, PES n=11, Kontrol n=9)	0.0019 ± 0.0015	0.0019 ± 0.0015	0.0027 ± 0.0013	0.455
CC (PEG n=1, PES n=4, Kontrol n=3)	0.0013	0.0020 ± 0.0007	0.0027 ± 0.0018	0.575
P	0.710	0.989	0.373	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Tablo 3.44 : CTGF rs9399005C/T bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı (%).

rs9399005	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
CC (PEG n=12, PES n=7, Kontrol n=3)	0.0016 ± 0.0017	0.0017 ± 0.0013	0.0019 ± 0.0010	0.891
CT (PEG n=5, PES n=8, Kontrol n=8)	0.0017 ± 0.0013	0.0020 ± 0.0017	0.0027 ± 0.0012	0.387
TT (PEG n=0, PES n=2, Kontrol n=1)	-	0.0024 ± 0.0007	0.0048	-
P	0.297	0.832	0.114	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

CTGF rs12526196T/C bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.45'te gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

CTGF rs9402373C/G bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.46'da gösterilmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

Tablo 3.45 : CTGF rs12526196T/C bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre gözyaşı örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı (%).

rs12526196	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
TT (PEG n=4, PES n=13, Kontrol n=10)	0.0010 ± 0.0004	0.0019 ± 0.0014	0.0028 ± 0.0014	0.089
TC (PEG n=4, PES n=3, Kontrol n=9)	0.0023 ± 0.0017	0.0014 ± 0.0012	0.0022 ± 0.0009	0.559
CC (PEG n=0, PES n=1, Kontrol n=2)	-	0.0038	0.0010 ± 0.0005	-
P	0.222	0.581	0.175	

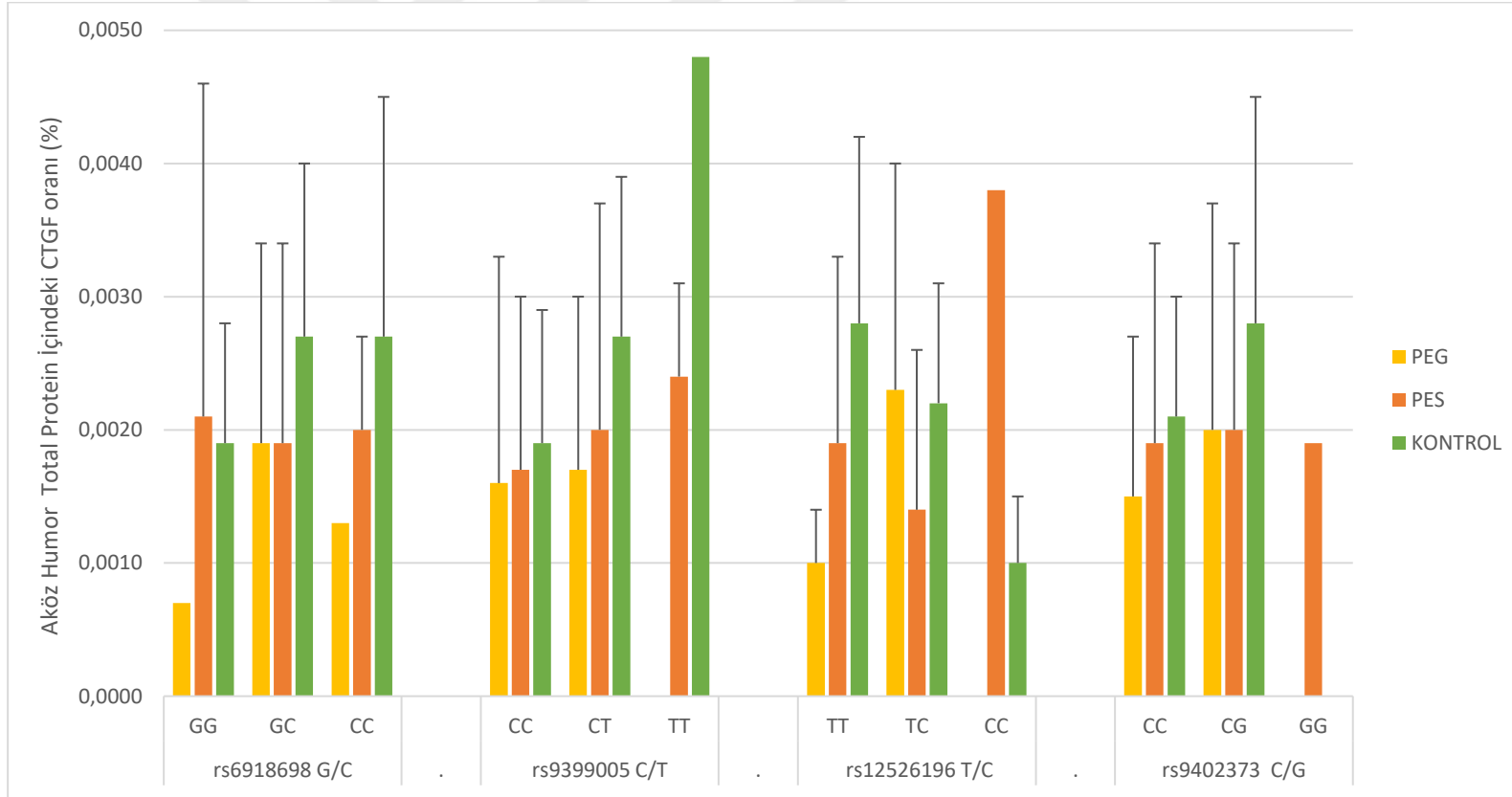
Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Tablo 3.46 : CTGF rs9402373C/G bölgesi genotipleri ve hastalık durumlarına göre aköz örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı (%).

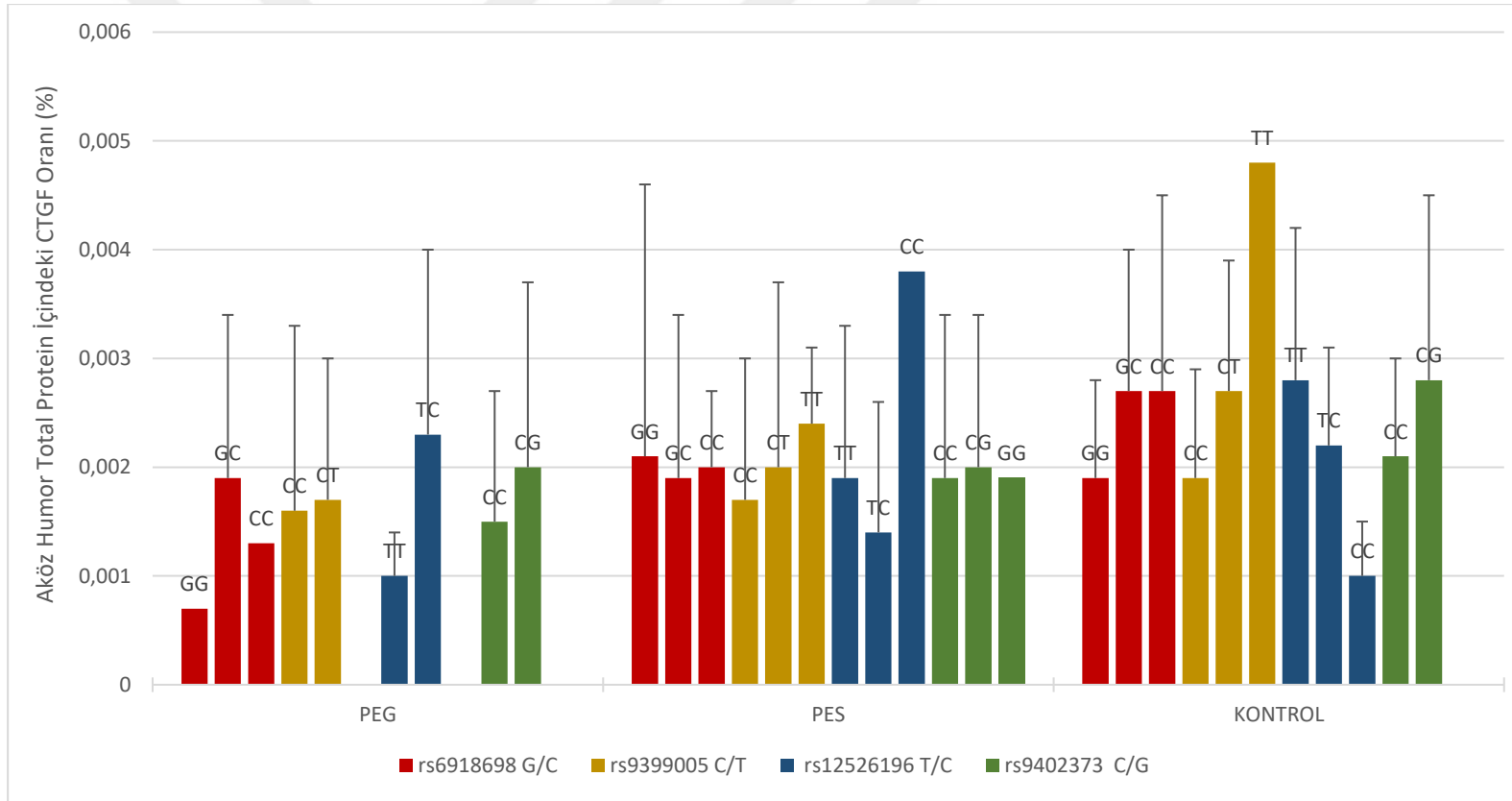
rs9402373	PEG (n=8)	PES (n=17)	Kontrol (n=21)	P
CC (PEG n=5, PES n=10, Kontrol n=14)	0.0015 ± 0.0012	0.0019 ± 0.0015	0.0021 ± 0.0009	0.594
CG (PEG n=3, PES n=6, Kontrol n=7)	0.0020 ± 0.0017	0.0020 ± 0.0014	0.0028 ± 0.0017	0.614
GG (PEG n=0, PES n=1, Kontrol n=0)	-	0.0019	-	-
P	0.648	0.896	0.345	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üçlü grupların karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Aköz humorda total protein içindeki CTGF oranlarının CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine ve hastalık durumuna göre karşılaştırmalarının grafiksel gösterimleri Şekil 3.23 ve Şekil 3.24'te verilmiştir



Şekil 3.23 : CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz humor örneklerinde total protein içindeki CTGF oranı.



Şekil 3.24 : PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz humor örneklerinde CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C ve rs9402373C/G genotiplerine göre total protein içindeki CTGF oranı.

3.5 Korelasyon analizleri

3.5.1 Gözyaşında CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu

Gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu 77 PEG hastası, 77 PES hastası ve 76 kontrol için bir arada (Tablo 3.47) ve PEG hastaları için (Tablo 3.48), PES hastaları için (Tablo 3.49) ve kontroller için (Tablo 3.50) ayrı ayrı analiz edildi. PEG hastası, PES hastası ve kontroller bir arada yapılan analizde CTGF konsantrasyonu, total protein ($r=0.354$, $P=0.000$) ve CTGF oranı ($r=0.835$, $P=0.000$) ile yüksek korelasyon gösterdi, ancak CTGF genotiplerinin herhangi biri ile korelasyon göstermedi (Tablo 3.47). 4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonuna bakıldığında ise tüm genotiplerin birbiri ile anlamlı bir korelasyon gösterdiği görüldü. CTGF rs6918698 genotipleri, rs9399005 genotipleri ($r=0.654$, $P=0.000$) ve rs9402373 genotipleri ile ($r=0.447$, $P=0.000$) pozitif korelasyon gösterirken, rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.372$, $P=0.000$) negatif korelasyon gösterdi.

CTGF rs9399005 genotipleri rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.330$, $P=0.000$) negatif, rs9402373 genotipleri ile ($r=0.584$, $P=0.000$) pozitif korelasyon gösterdi. CTGF rs12526196 genotipleri de rs9402373 genotipleri ile ($r=-0.138$, $P=0.032$) negatif korelasyon gösterdi (Tablo 3.47). Gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu için PEG hastaları grubunda yapılan korelasyon analizinde CTGF konsantrasyonu, total protein ($r=0.401$, $P=0.000$) ve CTGF oranı ($r=0.876$, $P=0.000$) ile yüksek korelasyon gösterdi, ancak CTGF genotiplerinin herhangi biri ile korelasyon göstermedi. Total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotipleri arasında da anlamlı bir korelasyon görülmedi (Tablo 3.48)

4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonuna bakıldığında ise birçok korelasyon görüldü. CTGF rs6918698 genotipleri, rs9399005 genotipleri ($r=0.722$, $P=0.000$) ve rs9402373 genotipleri ile ($r=0.498$, $P=0.000$) pozitif korelasyon gösterirken, rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.443$, $P=0.000$) negatif korelasyon gösterdi. CTGF rs9399005 genotipleri rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.333$, $P=0.000$) negatif, rs9402373

genotipleri ile ($r=0.603$, $P=0.000$) pozitif korelasyon gösterdi. CTGF rs12526196 genotipleri ile rs9402373 genotipleri arasında korelasyon görülmedi (Tablo 3.48).

Gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu için PES hastaları grubunda yapılan korelasyon analizinde, CTGF konsantrasyonu CTGF oranı ($r=0.931$, $P=0.000$) ile yüksek korelasyon gösterdi, ancak CTGF genotiplerinin herhangi biri ile korelasyon göstermedi. Total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotipleri arasında da anlamlı bir korelasyon görülmedi (Tablo 3.49). 4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonuna bakıldığında ise tüm genotiplerin birbiri ile anlamlı bir korelasyon gösterdiği görüldü. CTGF rs6918698 genotipleri, rs9399005 genotipleri ($r=0.620$, $P=0.000$) ve rs9402373 genotipleri ile ($r=0.505$, $P=0.000$) pozitif korelasyon gösterirken, rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.456$, $P=0.000$) negatif korelasyon gösterdi. CTGF rs9399005 genotipleri rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.417$, $P=0.000$) negatif, rs9402373 genotipleri ile ($r=0.672$, $P=0.000$) pozitif korelasyon gösterdi. CTGF rs12526196 genotipleri de rs9402373 genotipleri ile ($r=-0.296$, $P=0.008$) negatif korelasyon gösterdi (Tablo 3.49).

Gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu için kontrol grubunda yapılan korelasyon analizinde, CTGF konsantrasyonu total protein ($r=0.455$, $P=0.000$) ve CTGF oranı ($r=0.837$, $P=0.000$) ile yüksek korelasyon gösterdi, ancak CTGF genotiplerinin herhangi biri ile korelasyon göstermedi. Total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotipleri arasında da anlamlı bir korelasyon görülmedi (Tablo 3.50).

4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonuna bakıldığında ise birçok korelasyon görüldü. CTGF rs6918698 genotipleri, rs9399005 genotipleri ($r=0.619$, $P=0.000$) ve rs9402373 genotipleri ile ($r=0.344$, $P=0.001$) pozitif korelasyon gösterirken, rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.223$, $P=0.043$) negatif korelasyon gösterdi. CTGF rs9399005 genotipleri rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.253$, $P=0.021$) negatif, rs9402373 genotipleri ile ($r=0.487$, $P=0.000$) pozitif korelasyon gösterdi. CTGF rs12526196 genotipleri ile rs9402373 genotipleri arasında korelasyon görülmedi (Tablo 3.50).

Tablo 3.47 : Gözyaşında CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.

		CTGF	Total protein	CTGF oranı	rs6918698	rs9399005	rs12526196	rs9402373
CTGF	Pearson Correlation	1	0.354**	0.835**	0.037	0.060	-0.002	0.018
	<i>P</i>		0.000	0.000	0.572	0.365	0.979	0.790
Total protein	Pearson Correlation	0.354**	1	0.043	0.102	0.113	0.036	0.106
	<i>P</i>	0.000		0.512	0.112	0.079	0.573	0.099
CTGF oranı	Pearson Correlation	0.835**	0.043	1	-0.037	0.007	-0.009	-0.023
	<i>P</i>	0.000	0.512		0.577	0.921	0.896	0.731
rs6918698	Pearson Correlation	0.037	0.102	-0.037	1	0.654**	-0.372**	0.447**
	<i>P</i>	0.572	0.112	0.577		0.000	0.000	0.000
rs9399005	Pearson Correlation	0.060	0.113	0.007	0.654**	1	-0.330**	0.584**
	<i>P</i>	0.365	0.079	0.921	0.000		0.000	0.000
rs12526196	Pearson Correlation	-0.002	0.036	-0.009	-0.372**	-0.330**	1	-0.138*
	<i>P</i>	0.979	0.573	0.896	0.000	0.000		0.032
rs9402373	Pearson Correlation	0.018	0.106	-0.023	0.447**	0.584**	-0.138*	1
	<i>P</i>	0.790	0.099	0.731	0.000	0.000	0.032	

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).,

* Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Tablo 3.48 : PEG hastalarının gözyaşında CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.

		CTGF	Total protein	CTGF oranı	rs6918698	rs9399005	rs12526196	rs9402373
CTGF	Pearson Correlation	1	0.401**	0.876**	-0.035	0.143	-0.106	0.044
	<i>P</i>		0.000	0.000	0.764	0.216	0.358	0.704
Total protein	Pearson Correlation	0.401**	1	0.023	0.179	0.202	0.014	0.100
	<i>P</i>	0.000		0.845	0.114	0.074	0.901	0.383
CTGF oranı	Pearson Correlation	0.876**	0.023	1	-0.092	0.086	-0.132	0.077
	<i>P</i>	0.000	0.845		0.425	0.456	0.251	0.503
rs6918698	Pearson Correlation	-0.035	0.179	-0.092	1	0.722**	-0.443**	0.498**
	<i>P</i>	0.764	0.114	0.425		0.000	0.000	0.000
rs9399005	Pearson Correlation	0.143	0.202	0.086	0.722**	1	-0.333**	0.603**
	<i>P</i>	0.216	0.074	0.456	0.000		0.003	0.000
rs12526196	Pearson Correlation	-0.106	0.014	-0.132	-0.443**	-0.333**	1	-0.108
	<i>P</i>	0.358	0.901	0.251	0.000	0.003		0.344
rs9402373	Pearson Correlation	0.044	0.100	0.077	0.498**	0.603**	-0.108	1
	<i>P</i>	0.704	0.383	0.503	0.000	0.000	0.344	

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Tablo 3.49 : PES hastalarının gözyaşında CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.

		CTGF	Total protein	CTGF oranı	rs6918698	rs9399005	rs12526196	rs9402373
CTGF	Pearson Correlation	1	0.097	0.931**	-0.100	-0.145	0.071	-0.185
	<i>P</i>		0.401	0.000	0.386	0.207	0.539	0.108
Total protein	Pearson Correlation	0.097	1	-0.139	-0.044	0.067	0.071	0.106
	<i>P</i>	0.401		0.228	0.696	0.557	0.530	0.349
CTGF oranı	Pearson Correlation	0.931**	-0.139	1	-0.067	-0.115	0.073	-0.204
	<i>P</i>	0.000	0.228		0.563	0.318	0.527	0.075
rs6918698	Pearson Correlation	-0.100	-0.044	-0.067	1	0.620**	-0.456**	0.505**
	<i>P</i>	0.386	0.696	0.563		0.000	0.000	0.000
rs9399005	Pearson Correlation	-0.145	0.067	-0.115	0.620**	1	-0.417**	0.672**
	<i>P</i>	0.207	0.557	0.318	0.000		0.000	0.000
rs12526196	Pearson Correlation	0.071	0.071	0.073	-0.456**	-0.417**	1	-0.296**
	<i>P</i>	0.539	0.530	0.527	0.000	0.000		0.008
rs9402373	Pearson Correlation	-0.185	0.106	-0.204	0.505**	0.672**	-0.296**	1
	<i>P</i>	0.108	0.349	0.075	0.000	0.000	0.008	

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Tablo 3.50 : Kontrol grubunun gözyaşında CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.

		CTGF	Total protein	CTGF oranı	rs6918698	rs9399005	rs12526196	rs9402373
CTGF	Pearson Correlation	1	0.455**	0.837**	0.140	0.110	0.040	0.092
	<i>P</i>		0.000	0.000	0.228	0.346	0.732	0.427
Total protein	Pearson Correlation	0.455**	1	0.198	0.137	0.068	0.055	0.085
	<i>P</i>	0.000		0.086	0.217	0.542	0.619	0.446
CTGF oranı	Pearson Correlation	0.837**	0.198	1	0.032	0.041	0.022	0.067
	<i>P</i>	0.000	0.086		0.784	0.725	0.847	0.563
rs6918698	Pearson Correlation	0.140	0.137	0.032	1	0.619**	-0.223*	0.344**
	<i>P</i>	0.228	0.217	0.784		0.000	0.043	0.001
rs9399005	Pearson Correlation	0.110	0.068	0.041	0.619**	1	-0.253*	0.487**
	<i>P</i>	0.346	0.542	0.725	0.000		0.021	0.000
rs12526196	Pearson Correlation	0.040	0.055	0.022	-0.223*	-0.253*	1	-0.004
	<i>P</i>	0.732	0.619	0.847	0.043	0.021		0.971
rs9402373	Pearson Correlation	0.092	0.085	0.067	0.344**	0.487**	-0.004	1
	<i>P</i>	0.427	0.446	0.563	0.001	0.000	0.971	

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü). * Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

3.5.2 Aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu

Aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu 8 PEG hastası, 17 PES hastası ve 21 kontrol için bir arada (Tablo 3.51) ve PEG hastaları için (Tablo 3.52), PES hastaları için (Tablo 3.53) ve kontroller için (Tablo 3.54) ayrı ayrı analiz edildi. PEG hastası, PES hastası ve kontroller bir arada yapılan analizde CTGF oranı, CTGF konsantrasyonu ($r=0.575$, $P=0.000$) ile pozitif, total protein ($r=-0.544$, $P=0.000$) ile negatif korelasyon gösterdi, ancak CTGF genotiplerinin herhangi biri ile korelasyon göstermedi. Total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotipleri arasında da anlamlı bir korelasyon görülmedi (Tablo 3.51).

4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonuna bakıldığında ise birçok korelasyon görüldü. CTGF rs6918698 genotipleri, rs9399005 genotipleri ile ($r=0.509$, $P=0.000$) pozitif korelasyon gösterirken, rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.490$, $P=0.001$) negatif korelasyon gösterdi.

CTGF rs9399005 genotipleri rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.399$, $P=0.006$) negatif korelasyon gösterirken, rs9402373 genotipleri ile ($r=0.633$, $P=0.000$) pozitif korelasyon gösterdi. CTGF rs12526196 genotipleri ile rs9402373 genotipleri arasında korelasyon görülmedi (Tablo 3.51).

Aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu için PEG hastaları grubunda yapılan korelasyon analizinde, CTGF konsantrasyonu, CTGF oranı ile yüksek korelasyon gösterdi ($r=0.858$, $P=0.000$), ancak CTGF genotiplerinin herhangi biri ile korelasyon göstermedi. Total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotipleri arasında da anlamlı bir korelasyon görülmedi. 4 SNP bölgesi ise birbiri ile korelasyon göstermedi (Tablo 3.52).

Aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu için PES hastaları grubunda yapılan korelasyon analizinde, total protein, CTGF oranı ile ($r=-0.636$, $P=0.006$) negatif korelasyon gösterdi. CTGF genotiplerinden ise sadece rs9399005 genotipleri ile ($r=0.485$,

P=0.049) korelasyon gösterdi. CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotipleri arasında anlamlı bir korelasyon görülmedi (Tablo 3.53).

4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonuna bakıldığında ise birçok korelasyon görüldü. CTGF rs6918698 genotipleri, rs9399005 genotipleri ile ($r=0.545$, $P=0.024$) pozitif korelasyon gösterirken, rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.636$, $P=0.006$) negatif korelasyon gösterdi. CTGF rs9399005 genotipleri rs12526196 genotipleri ile ($r=-0.547$, $P=0.023$) negatif, rs9402373 genotipleri ile ($r=0.635$, $P=0.006$) pozitif korelasyon gösterdi. CTGF rs12526196 genotipleri ile rs9402373 genotipleri arasında ise korelasyon görülmedi (Tablo 3.53).

Aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu için kontrol grubunda yapılan korelasyon analizinde, CTGF konsantrasyonu CTGF oranı ile ($r=0.684$, $P=0.001$) ve rs12526196 genotipleri ile ($r=0.511$, $P=0.018$) pozitif korelasyon gösterdi. Total protein içindeki CTGF oranı da rs9399005 genotipleri ile ($r=-0.526$, $P=0.014$) negatif korelasyon gösterdi. Total protein konsantrasyonu ile diğer parametreler arasında ise anlamlı bir korelasyon görülmedi (Tablo 3.54).

4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonuna bakıldığında ise sadece 2 grup arasında korelasyon görüldü. CTGF rs6918698 genotipleri, sadece rs9399005 genotipleri ile ($r=0.447$, $P=0.042$) pozitif korelasyon gösterirken, rs9399005 genotipleri ise sadece rs9402373 genotipleri ile ($r=0.631$, $P=0.002$) yüksek korelasyon gösterdi. CTGF rs12526196 genotipleri ile rs9402373 genotipleri arasında ise korelasyon görülmedi (Tablo 3.54).

3.5.3 Gözyaşı ve aközdeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu

Gözyaşı ve aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu 7 PEG hastası, 10 PES hastası ve 12 kontrol için bir arada (Tablo 3.55) ve PEG hastaları, PES hastaları ve kontroller için (EK 3) ayrı ayrı analiz edildi.

Tablo 3.51 : Aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.

		CTGF	Total protein	CTGF oranı	rs6918698	rs9399005	rs12526196	rs9402373
CTGF	Pearson Correlation	1	0.175	0.575**	-0.059	-0.081	0.082	-0.116
	<i>P</i>		0.245	0.000	0.698	0.592	0.588	0.442
Total protein	Pearson Correlation	0.175	1	-0.544**	0.103	0.244	0.063	0.083
	<i>P</i>	0.245		0.000	0.496	0.102	0.679	0.581
CTGF oranı	Pearson Correlation	0.575**	-0.544**	1	-0.092	-0.259	0.016	-0.124
	<i>P</i>	0.000	0.000		0.542	0.082	0.914	0.412
rs6918698	Pearson Correlation	-0.059	0.103	-0.092	1	0.509**	-0.490**	0.286
	<i>P</i>	0.698	0.496	0.542		0.000	0.001	0.054
rs9399005	Pearson Correlation	-0.081	0.244	-0.259	0.509**	1	-0.399**	0.633**
	<i>P</i>	0.592	0.102	0.082	0.000		0.006	0.000
rs12526196	Pearson Correlation	0.082	0.063	0.016	-0.490**	-0.399**	1	-0.107
	<i>P</i>	0.588	0.679	0.914	0.001	0.006		0.479
rs9402373	Pearson Correlation	-0.116	0.083	-0.124	0.286	0.633**	-0.107	1
	<i>P</i>	0.442	0.581	0.412	0.054	0.000	0.479	

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Tablo 3.52 : PEG hastalarının aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.

		CTGF	Total protein	CTGF oranı	rs6918698	rs9399005	rs12526196	rs9402373
CTGF	Pearson Correlation	1	-0.183	0.858**	-0.283	-0.198	-0.311	-0.200
	<i>P</i>		0.664	0.006	0.498	0.638	0.454	0.634
Total protein	Pearson Correlation	-0.183	1	-0.624	0.063	0.110	0.416	0.183
	<i>P</i>	0.664		0.098	0.883	0.795	0.306	0.665
CTGF oranı	Pearson Correlation	0.858**	-0.624	1	-0.122	-0.047	-0.524	-0.192
	<i>P</i>	0.006	0.098		0.774	0.913	0.183	0.648
rs6918698	Pearson Correlation	-0.283	0.063	-0.122	1	0.516	-0.500	0.000
	<i>P</i>	0.498	0.883	0.774		0.190	0.207	1.000
rs9399005	Pearson Correlation	-0.198	0.110	-0.047	0.516	1	-0.258	0.600
	<i>P</i>	0.638	0.795	0.913	0.190		0.537	0.116
rs12526196	Pearson Correlation	-0.311	0.416	-0.524	-0.500	-0.258	1	0.258
	<i>P</i>	0.454	0.306	0.183	0.207	0.537		0.537
rs9402373	Pearson Correlation	-0.200	0.183	-0.192	0.000	0.600	0.258	1
	<i>P</i>	0.634	0.665	0.648	1.000	0.116	0.537	

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Tablo 3.53 : PES hastalarının aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.

		CTGF	Total protein	CTGF oranı	rs6918698	rs9399005	rs12526196	rs9402373
CTGF	Pearson Correlation	1	0.134	0.414	0.092	0.315	-0.397	0.043
	<i>P</i>		0.607	0.099	0.727	0.218	0.115	0.869
Total protein	Pearson Correlation	0.134	1	-0.636**	0.407	0.485*	-0.244	0.158
	<i>P</i>	0.607		0.006	0.105	0.049	0.345	0.544
CTGF oranı	Pearson Correlation	0.414	-0.636**	1	0.017	-0.161	-0.170	-0.018
	<i>P</i>	0.099	0.006		0.947	0.537	0.514	0.945
rs6918698	Pearson Correlation	0.092	0.407	0.017	1	0.545*	-0.636**	0.343
	<i>P</i>	0.727	0.105	0.947		0.024	0.006	0.177
rs9399005	Pearson Correlation	0.315	0.485*	-0.161	0.545*	1	-0.547*	0.635**
	<i>P</i>	0.218	0.049	0.537	0.024		0.023	0.006
rs12526196	Pearson Correlation	-0.397	-0.244	-0.170	-0.636**	-0.547*	1	-0.230
	<i>P</i>	0.115	0.345	0.514	0.006	0.023		0.374
rs9402373	Pearson Correlation	0.043	0.158	-0.018	0.343	0.635**	-0.230	1
	<i>P</i>	0.869	0.544	0.945	0.177	0.006	0.374	

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

* Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Tablo 3.54 : Kontrol grubunun aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranı ile CTGF genotiplerinin korelasyonu.

		CTGF	Total protein	CTGF oranı	rs6918698	rs9399005	rs12526196	rs9402373
CTGF	Pearson Correlation	1	0.386	0.684**	-0.125	-0.357	0.511*	-0.263
	<i>P</i>		0.084	0.001	0.588	0.112	0.018	0.249
Total protein	Pearson Correlation	0.386	1	-0.295	0.056	0.172	0.234	-0.017
	<i>P</i>	0.084		0.193	0.810	0.457	0.308	0.941
CTGF oranı	Pearson Correlation	0.684**	-0.295	1	-0.291	-0.526*	0.402	-0.270
	<i>P</i>	0.001	0.193		0.200	0.014	0.071	0.237
rs6918698	Pearson Correlation	-0.125	0.056	-0.291	1	0.447*	-0.342	0.289
	<i>P</i>	0.588	0.810	0.200		0.042	0.129	0.204
rs9399005	Pearson Correlation	-0.357	0.172	-0.526*	0.447*	1	-0.272	0.631**
	<i>P</i>	0.112	0.457	0.014	0.042		0.233	0.002
rs12526196	Pearson Correlation	0.511*	0.234	0.402	-0.342	-0.272	1	-0.052
	<i>P</i>	0.018	0.308	0.071	0.129	0.233		0.824
rs9402373	Pearson Correlation	-0.263	-0.017	-0.270	0.289	0.631**	-0.052	1
	<i>P</i>	0.249	0.941	0.237	0.204	0.002	0.824	

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

* Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Tablo 3.55 : Gözyaşı ve aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu.

		Aköz CTGF	Aköz total protein	Aköz CTGF oranı	Gözyaşı CTGF	Gözyaşı total protein	Gözyaşı CTGF oranı
Aköz CTGF	Pearson Correlation	1	0.175	0.575**	-0.102	0.148	-0.114
	<i>P</i>		0.245	0.000	0.614	0.426	0.571
Aköz total protein	Pearson Correlation	0.175	1	-0.544**	-0.249	0.175	-0.248
	<i>P</i>	0.245		0.000	0.211	0.348	0.212
Aköz CTGF oranı	Pearson Correlation	0.575**	-0.544**	1	0.002	0.025	0.000
	<i>P</i>	0.000	0.000		0.992	0.896	0.999
Gözyaşı CTGF	Pearson Correlation	-0.102	-0.249	0.002	1	0.128	0.929**
	<i>P</i>	0.614	0.211	0.992		0.524	0.000
Gözyaşı total protein	Pearson Correlation	0.148	0.175	0.025	0.128	1	-0.100
	<i>P</i>	0.426	0.348	0.896	0.524		0.620
Gözyaşı CTGF oranı	Pearson Correlation	-0.114	-0.248	0.000	0.929**	-0.100	1
	<i>P</i>	0.571	0.212	0.999	0.000	0.620	

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü)

Aköz ve gözyaşı içindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranları birbiri ile korelasyon göstermedi. Aköz CTGF konsantrasyonu, aköz CTGF oranı ile pozitif korelasyon gösterirken ($r=0.575$, $P=0.000$), aköz total protein konsantrasyonu ise aköz CTGF oranı ile negatif korelasyon gösterdi ($r=-0.544$, $P=0.000$). Gözyaşı CTGF konsantrasyonu, gözyaşı CTGF oranı ile pozitif korelasyon gösterdi ($r=0.929$, $P=0.000$) (Tablo 3.55).

Gözyaşı ve aközde CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonunun PEG hastaları, PES hastaları ve kontroller için ayrı ayrı yapıldığı analizlerin hiçbirinde aköz verileri ile gözyaşı verileri arasında korelasyon görülmedi. Bu analizlerin tabloları EK 3'te verilmiştir.

3.6 Lojistik regresyon analizleri

Bu çalışmada incelenen birbirinden bağımsız bir çok durum olduğu için bunların PEG ve PES hastası olma ile ilişkilerini bir arada incelemek için lojistik regresyon analizi kullanıldı. Genotipler, gözyaşı total protein ve CTGF seviyeleri, total protein içindeki

CTGF oranı, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme verileri eş değişkenler olarak modellere farklı kombinasyonlar ile eklendi. Gözyaşı verileri olan çalışma grubu ile genotip verileri olan çalışma grubu sayı olarak birbirinden farklı olduğu için bu gruplar ayrı ayrı modellenerek analiz edildi. Oluşturulan her modele göre eş değişken olarak atanan parametreler için lojistik regresyon analizinden önce eş lineerlik istatistiği (collinearity statistics) yapıldı ve kullanılan modellerde eş değişkenler arasında herhangi bir eş lineerlik görülmediği için hepsi bir arada modele eklenerek lojistik regresyon analizi yapıldı. Analizler ikili lojistik regresyon (binary logistic regression)'da geriye doğru seçim (Backward: LR) yöntemi kullanılarak yapıldı.

Analiz için 4 model oluşturuldu. 213 PEG hastası, 214 PES hastası ve 215 kontrol bireyden oluşan tüm popülasyon (tüm çalışma grubu) için lojistik regresyon analizi Model 1 ve Model 2 başlığı altında yapıldı. Model 1 resesif genetik modele, Model 2 ise dominant genetik modele göre oluşturuldu. Resesif modelde minör alelin resesif karakterde olduğu varsayıldı ve homozigot olma durumunun hastalık ile ilişkisine bakıldı. Dominant modelde ise minör alelin dominant olduğu varsayıldı ve minör alelin homozigot ve heterozigot olma durumunun hastalık ile ilişkisine bakıldı. 77 PEG hastası, 77 PES hastası ve 76 kontrol bireyden oluşan gözyaşı örnekleri popülasyonu için lojistik regresyon analizi ise Model 3 ve Model 4 başlığı altında yapıldı. Model 3 ve 4'te, Model 1 ve 2'den farklı olarak gözyaşındaki CTGF ve total protein konsantrasyonu ile total protein içindeki CTGF oranı datası da analize dahil edildi. Model 3 resesif genetik modele, Model 4 ise dominant genetik modele göre oluşturuldu. Tüm modeller için PES hastalığı ve kontroller (Model 1.1, 2.1, 3.1 ve 4.1) ile PEG hastalığı ve kontroller (Model 1.2, 2.2, 3.2 ve 4.2) arasındaki ilişki ayrı ayrı ele alındı.

3.6.1 Model 1 – Tüm popülasyon-Resesif Genetik Model

Bu modelde 213 PES, 214 PEG ve 215 kontrolden oluşan tüm çalışma grubunda 4 SNP bölgesinin genotipleri ile cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme verileri birlikte incelendi. Her polimorfizm bölgesi için 3 farklı genotip olduğu için bunları 2 gruba indirmek amacıyla polimorfik homozigot genotipler bir gruba (riskli), yabancı homozigot genotipler ile heterozigot genotipler diğer gruba gruba alındı. Bu popülasyondaki PES hastalığı ile kontroller arasında

analizler Model 1.1 altında yapılırken ve PEG hastalığı ile kontroller arasındaki analizler Model 1.2 altında yapılmıştır.

3.6.1.1 Model 1.1 PES-Kontrol

Modele cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme, sigara kullanımı, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklendi ve 214 PES ile 215 kontrol karşılaştırıldı. CTGF rs6918698CC, rs9399005TT, rs12526196CC ve rs9402373GG genotipleri riskli olarak atandı. Değişkenlerin hiçbiri PES olma durumu ile ilişkili bulunmadı. Model, vakaların %51.5'ini doğru bir şekilde tahmin etmiş ve Hosmer–Lemeshow goodness of fit testi modelin kalibrasyonunun lojistik regresyon için uygun olduğunu göstermiştir ($\chi^2=9.652$, 8 df, $P=0.290$).

3.6.1.2 Model 1.2 PEG-Kontrol

Modele cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı, inme, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklendi ve 213 PEG ile 215 kontrol karşılaştırıldı. CTGF rs6918698CC, rs9399005TT, rs12526196CC ve rs9402373GG genotipleri riskli olarak atandı. Tablo 3.56'da gösterildiği gibi cinsiyetin PEG riskinde belirleyici faktör olduğu tespit edildi. PEG olma riskine göre değerlendirildiğinde erkek olmanın kadın olmaya göre 1.8 kat daha riskli olduğu bulundu (OR=1.761, 95% CI=1.198-2.589, $P=0.004$). Bu model, vakaların %57.7'sini doğru bir şekilde tahmin etmiş ve Hosmer–Lemeshow goodness of fit testi modelin kalibrasyonunun lojistik regresyon için uygun olduğunu göstermiştir ($\chi^2=13.113$, 8 df, $P=0.108$).

Tablo 3.56 : MODEL 1.2 - 213 PEG ile 215 kontrolden oluşan grupta cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı, inme, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklenerek oluşturulan resesif genetik modele göre yapılan analizler.

Değişkenler	OR	95% CI	P
Cinsiyet (erkek)	1.761	1.198-2.589	0.004

Diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme, sigara kullanımı, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri de regresyona dahil edildi ancak anlamlı sonuç vermediği için tabloda gösterilmedi.

3.6.2 Model 2 – Tüm popülasyon-Dominant Genetik Model

Bu modelde 213 PES, 214 PEG ve 215 kontrolden oluşan tüm çalışma grubunda 4 SNP bölgesinin genotipleri ile cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme verileri birlikte incelendi. Her polimorfizm bölgesi için 3 farklı genotip olduğu için bunları 2 gruba indirmek amacıyla polimorfik homozigot genotipler ile heterozigot genotipler bir gruba (riskli), yabancı homozigot olanlar ise diğer gruba alındı. Bu popülasyondaki PES hastalığı ile kontroller arasında analizler Model 2.1 altında yapılırken ve PEG hastalığı ile kontroller arasındaki analizler Model 2.2 altında yapılmıştır.

3.6.2.1 Model 2.1 PES-Kontrol

Modele cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme, sigara kullanımı, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklendi ve 214 PES ile 215 kontrol karşılaştırıldı. Bu modelde Model 1'den farklı olarak CTGF rs6918698 CC+GC, rs9399005 TT+CT, rs12526196 CC+TC ve rs9402373 GG+CG genotipleri riskli olarak atandı. Değişkenlerin hiçbiri PES olma durumu ile ilişkili bulunmadı. Model, vakaların %51.5'ini doğru bir şekilde tahmin etmiş ve Hosmer–Lemeshow goodness of fit testi modelin kalibrasyonunun lojistik regresyon için uygun olduğunu göstermiştir ($\chi^2=5.816$, 8 df, $P=0.668$).

3.6.2.2 Model 2.2 PEG-Kontrol

Modele cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme, sigara kullanımı, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklendi ve 213 PEG ile 215 kontrol karşılaştırıldı. CTGF rs6918698 CC+GC, rs9399005 TT+CT, rs12526196 CC+TC ve rs9402373 GG+CG genotipleri riskli olarak atandı. Tablo 3.57'de gösterildiği gibi cinsiyetin PEG riskinde belirleyici faktör olduğu tespit edildi. PEG olma riskine göre değerlendirildiğinde erkek olmanın kadın olmaya göre 1.8 kat daha riskli olduğu bulundu ($OR=1.761$, 95% $CI=1.198-2.589$, $P=0.004$). Bu model, vakaların %57.7'sini doğru bir şekilde tahmin etmiş ve Hosmer–Lemeshow goodness of fit testi modelin kalibrasyonunun lojistik regresyon için uygun olduğunu göstermiştir ($\chi^2=15.358$, 8 df, $P=0.053$).

Tablo 3.57 : MODEL 2.2 - 213 PEG ile 215 kontrolden oluşan grupta cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı, inme, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklenerek oluşturulan dominant genetik modele göre yapılan analizler.

Değişkenler	OR	95% CI	P
Cinsiyet (erkek)	1.761	1.198-2.589	0.004

Diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme, sigara kullanımı, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri de regresyona dahil edildi ancak anlamlı sonuç vermediği için tabloda gösterilmedi.

3.6.3 Model 3 – Gözyaşı-Resesif Genetik Model

Bu modelde 77 PES, 77 PEG ve 76 kontrolden oluşan gözyaşı çalışma grubunda 4 SNP bölgesinin genotipleri ile gözyaşındaki total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme verileri birlikte incelendi. Her polimorfizm bölgesi için 3 farklı genotip olduğu için bunları 2 gruba indirmek amacıyla polimorfik homozigot genotipler bir gruba (riskli), yabancı homozigot genotipler ile heterozigot genotipler diğer gruba alındı. Bu popülasyondaki PES hastalığı ile kontroller arasında analizler Model 3.1 altında yapılırken ve PEG hastalığı ile kontroller arasındaki analizler Model 3.2 altında yapılmıştır.

3.6.3.1 Model 3.1 PES-Kontrol

Modele gözyaşındaki total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, 4 SNP bölgesinin genotipleri, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme durumu kovaryant olarak eklendi ve gözyaşı sonuçları olan örnekler arasından 77 PES ile 76 kontrol karşılaştırıldı. CTGF rs6918698CC, rs9399005TT, rs12526196CC ve rs9402373GG genotipleri riskli olarak atandı. Değişkenlerin hiçbiri PES olma durumu ile ilişkili bulunmadı. Bu model, vakaların %59.5'ini doğru bir şekilde tahmin etmiş ve Hosmer–Lemeshow goodness of fit testi modelin kalibrasyonunun lojistik regresyon için uygun olduğunu göstermiştir (10.113, 8 df, P=0.257).

3.6.3.2 Model 3.2 PEG-Kontrol

Modele gözyaşındaki total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, 4 SNP bölgesinin genotipleri, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı,

hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme durumu kovaryant olarak eklendi ve gözyaşı sonuçları olan örnekler arasından 77 PEG ile 76 kontrol karşılaştırıldı. CTGF rs6918698CC, rs9399005TT, rs12526196CC ve rs9402373GG genotipleri riskli olarak atandı. Tablo 3.58’de gösterildiği gibi cinsiyetin PEG riskinde belirleyici faktör olduğu tespit edildi. PEG olma riskine göre değerlendirildiğinde erkek olmanın kadın olmaya göre 2 kat (OR=2.041, 95% CI=1.072-3.887, P=0.030) daha riskli olduğu bulundu. Bu model, vakaların %58.8’ini doğru bir şekilde tahmin etmiş ve Hosmer–Lemeshow goodness of fit testi modelin kalibrasyonunun lojistik regresyon için uygun olduğunu göstermiştir ($\chi^2=6.297$, 8 df, P=0.614).

Tablo 3.58 : MODEL 3.2 - 77 PEG ile 76 kontrolden oluşan grupta total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı, inme, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklenerek oluşturulan resesif genetik modele göre yapılan analizler.

Değişkenler	OR	95% CI	P
Cinsiyet (erkek)	2.041	1.072-3.887	0.030

Gözyaşındaki total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme faktörleri de regresyona dahil edildi ancak anlamlı sonuç vermediği için tabloda gösterilmedi.

3.6.4 Model 4 – Gözyaşı-Dominant Genetik Model

Bu modelde 77 PES, 77 PEG ve 76 kontrolden oluşan gözyaşı çalışma grubunda 4 SNP bölgesinin genotipleri ile gözyaşındaki total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme verileri birlikte incelendi. Her polimorfizm bölgesi için 3 farklı genotip olduğu için bunları 2 gruba indirmek amacıyla polimorfik homozigot genotipler ile heterozigot genotipler bir gruba (riskli), yabancı homozigot olanlar ise diğer gruba alındı. Bu popülasyondaki PES hastalığı ile kontroller arasında analizler Model 4.1 altında yapılırken ve PEG hastalığı ile kontroller arasındaki analizler Model 4.2 altında yapılmıştır.

3.6.4.1 Model 4.1 PES-Kontrol

Modele gözyaşındaki total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, 4 SNP bölgesinin genotipleri, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı,

hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme durumu kovaryant olarak eklendi ve gözyaşı sonuçları olan örnekler arasından 77 PES ile 76 kontrol karşılaştırıldı. Bu modelde Model 3'ten farklı olarak CTGF CTGF rs6918698 CC+GC, rs9399005 TT+CT, rs12526196 CC+TC ve rs9402373 GG+CG genotipleri riskli olarak atandı. Tablo 3.59'da gösterildiği gibi cinsiyetin PES riskinde belirleyici faktör olduğu tespit edildi.

Tablo 3.59 : MODEL 4.1 - 77 PES ile 76 kontrolden oluşan grupta total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı, inme, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklenerek oluşturulan dominant genetik modele göre yapılan analizler.

Değişkenler	OR	95% CI	P
Cinsiyet (erkek)	2.024	1.021-4.013	0.043

Gözyaşındaki total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme faktörleri de regresyona dahil edildi ancak anlamlı sonuç vermediği için tabloda gösterilmedi.

PES olma riskine göre değerlendirildiğinde erkek olmanın kadın olmaya göre 2 kat daha riskli olduğu bulundu (OR=2.024, 95% CI=1.021-4.013, P=0.043). Bu model, vakaların %64.1'ini doğru bir şekilde tahmin etmiş ve Hosmer–Lemeshow goodness of fit testi modelin kalibrasyonunun lojistik regresyon için uygun olduğunu göstermiştir ($\chi^2=4.839$, 8 df, P=0.775).

3.6.4.2 Model 4.2 PEG-Kontrol

Modele gözyaşındaki total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, 4 SNP bölgesinin genotipleri, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme durumu kovaryant olarak eklendi ve gözyaşı sonuçları olan örnekler arasından 77 PEG ile 76 kontrol karşılaştırıldı. CTGF CTGF rs6918698 CC+GC, rs9399005 TT+CT, rs12526196 CC+TC ve rs9402373 GG+CG genotipleri riskli olarak atandı. Tablo 3.60'ta gösterildiği gibi cinsiyetin PEG riskinde belirleyici faktör olduğu tespit edildi. PEG olma riskine göre değerlendirildiğinde erkek olmanın kadın olmaya göre 2.2 kat daha riskli olduğu bulundu (OR=2.231, 95% CI=1.153-4.316, P=0.017). Bu model, vakaların %61.4'ünü doğru bir şekilde tahmin etmiş ve Hosmer–Lemeshow goodness of fit testi modelin kalibrasyonunun lojistik regresyon için uygun olduğunu göstermiştir ($\chi^2=5.796$, 8 df, P=0.670)

Tablo 3.60 : MODEL 4.2 - 77 PEG ile 76 kontrolden oluşan grupta total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı, inme, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri kovaryant olarak eklenerek oluşturulan dominant genetik modele göre yapılan analizler.

Değişkenler	OR	95% CI	P
Cinsiyet (erkek)	2.231	1.153-4.316	0.017

Gözyaşındaki total protein, CTGF konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı, CTGF rs6918698, rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 genotipleri, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme ve sigara kullanımı faktörleri de regresyona dahil edildi ancak anlamlı sonuç vermediği için tabloda gösterilmedi.



4 TARTIŞMA

Psödoeksfoliyasyon sendromu (PES) ilerleyen yaş ile ortaya çıkan ciddi bir göz hastalığıdır. Hücre dışı matrikste fibriler materyallerin gereğinden fazla üretilmesi ve bunların gerektiği gibi regüle edilememesi neticesinde birikmesi sonucu oluşan bir durumdur. Bu birikimler göz dokuları dışında farklı dokularda da görülmüş olduğundan sistemik bir hastalık olarak değerlendirilir. Bazen de bu biriken psödoeksfoliyatif materyal aköz humor sıvısının boşaltılmasını sağlayan kanalları tıkayarak göz içi basıncının artmasına neden olur. Bu da psödoeksfoliyatif glokom (PEG) oluşmasına ve görme sinirine zarar vererek görme alanında hasar oluşmasına, sonunda da tam görme kaybına neden olabilir. Bu durum bireyin hayat kalitesini önemli oranda etkilemektedir. Sağlık ve teknoloji alanındaki gelişmeler ve çalışmalar sayesinde insan ömrü giderek uzamaya başlamıştır. Bu çalışmadaki söz konusu hastalıklar da ilerleyen yaşlarda görülen rahatsızlıklar olduğu için bu hastalıkların erken tanısı ve tedavi edilebilmesi oldukça önem taşımaktadır ancak henüz erken teşhis sağlayabilecek parametreler belirlenmemiştir. Bu araştırmanın amacı PES ya da PEG tanısında kullanabilecek objektif parametreleri sorgulamak ve bunlar üzerine uygulanabilecek tedavilerin geliştirilebilmesi için keşif yapmaktır. Bu nedenle çalışmamızda psödoeksfoliyatif materyal birikimi ile ilgili olabileceği düşünülen CTGF proteininin genindeki 4 adet SNP üzerinde durulmuştur. Bu SNPLer kodlayan bölgede değil promotor ya da intronik bölgede bulunmaktadır ve bu sebeple protein ifadesini etkileyebilirler. Proteinin ifade seviyesinin etkilenmesi de psödoeksfoliyatif materyal oluşumu ve birikimi ile bağlantılı olabilir. Tüm bunları değerlendirebilmek amacıyla çalışma grubunun gözyaşı ve aköz sıvılarındaki CTGF konsantrasyonları da ölçülmüş ve genotipler ile ilişkileri incelenmiştir.

4.1 Demografik özellikler

Daha önce de bahsedildiği gibi PEG ve PES ilerleyen yaşlarda ortaya çıkar ve coğrafik ya da etnik farklılıklara göre toplumlar arasında görülme sıklığı değişir. PES ile ilgili

yapılan bazı çalışmalar sonucu farklı ülkelerde yaş gruplarına göre PES görülme sıklığı Tablo 4.1’de verilmektedir, ortalama 40 yaş üzerinde sık görülen bir rahatsızlıktır. PEG ise PES hastalarında daha sonradan gelişen bir glokom türü olduğundan PEG hastalarının yaş ortalaması daha da yüksektir. Bu araştırmadaki çalışma grubunun genel yaş ortalaması yaklaşık olarak 72’dir. Ancak sonuçların analizi açısından, klinik tarafından hasta ve kontrol grupları belirlenirken yaş ortalaması benzer tutulmaya çalışılmıştır, bu nedenle gruplar arasında anlamlı bir yaş farkı yoktur (Tablo 3.1). Ülkemizde farklı bölgelerde yapılan araştırma sonuçlarına göre yaş gruplarına göre PES görülme sıklığı ise Tablo 4.2’de verilmektedir.

Tablo 4.1 Bazı ülkelerde yaş gruplarına göre PES görülme sıklığı.

Ülkeler	Yaş (Yıl)	Görülme sıklığı (%)	Yayın
Avustralya (Orta Avustralya)	≥61	16.3	Taylor ve diğ., 1977
Avustralya (Blue Mountains)	≥49	2.3	Mitchell ve diğ., 1999
Avustralya (Victoria)	≥40	0.98	McCarty ve diğ., 2000
Çin Halk Cumhuriyeti	≥50	2.38	You ve diğ., 2013
Finlandiya	≥70	22.1	Hirvela ve diğ., 1995
Fransa	>50	5.5	Colin ve diğ., 1988
Yunanistan (Epirus)	≥50	24.3	Stefaniotou ve diğ., 1990
Yunanistan (Crete)	≥40	16.1	Kozobolis ve diğ., 1997
Grönland	≥70	4.5	Ostenfeld-Akerblom, 1988
Norveç	>65	16.9	Ringvold ve diğ., 1987
İzlanda	≥50	10.7	Arnarsson ve diğ., 2007
Hindistan (Güney Hindistan)	≥40	3.8	Arvind ve diğ., 2003
Hindistan (Tamil Nadu)	≥40	6	Krishnadas ve diğ., 2003
Hindistan (Andhra Pradesh)	≥40	3.01	Thomas ve diğ., 2005
İran	≥50	13.1	Nouri-Mahdavi ve diğ., 1999
Japonya	≥50	3.4	Miyazaki ve diğ., 2005

Tablo 4.2 Türkiye’de yaş gruplarına göre PES görülme sıklığı.

Bölge	Yaş (yıl)	Görülme sıklığı (%)	Yayın
Türkiye (Hepsi)	>40	11.3	İskeleli, 1978
Türkiye (Hepsi)	≥50	18.2	Örgen, 1949
Doğu Akdeniz	≥60	11.2	Yalaz ve diğ., 1992
Karadeniz	≥60	16.5	Arıttürk ve diğ., 2005
Orta Karadeniz	≥60	12.2	Cumurcu ve diğ., 2010
Ankara	>40	12.8	İrkeç, 1979
İstanbul	≥60	11	Alpay ve diğ., 1989

PES ve PEG üzerinde cinsiyetin etkisini araştıran bazı çalışmalara göre kadınlarda PES görülme sıklığının daha fazla olduğu söylenirken (Tarkkanen, 1962; Aasved, 1969), diğer araştırmalarda erkekler ve kadınlar arasında belirgin bir fark bulunmamıştır (Moreno-Montanis ve diğ., 1989). Diğer bir çalışmada ise ultraviyole maruziyeti olan Yugoslavlar, Avustralyalı aborjinler, Peru Hintlileri ve Asya Hintlileri gibi popülasyonlarda PES erkeklerde daha yaygındır (Forsius, 1988).

Bazı çalışmalara göre PES’ten PEG geliştirme olasılığı erkeklerde daha fazladır (Madden ve Crowley, 1982; Sziklai ve Suiveges, 1988; Gillies ve Brooks, 1988). Kozart ve Yanoff 100 PES hastası ile yaptıkları çalışmada kadınlar ile erkekler arasında 3 kat fark bulmuşlardır ancak 25 erkekten 10’unda yüksek göz içi basıncı görürken, 75 kadından ancak 17’sinde yüksek göz içi basıncı ölçmüşlerdir (Kozart ve Yanoff, 1982). Birçok araştırma PEG ile cinsiyet ilişkisi bulmamış olsa da, Moreno Montanis ve diğ. yaptıkları çalışmada PEG’in erkeklerde daha erken ve daha yüksek bir göz içi basıncı ile ortaya çıktığını ve görme alanı kusurlarının erkeklerde daha çok olduğunu ortaya koymuşlardır (Moreno Montanis ve diğ., 1990).

Bu çalışmada ise PEG grubundaki erkeklerin kadınlara oranı kontrol grubuna göre anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur ancak diğer gruplar arasındaki fark anlamlı değildir (Tablo 3.1). Ayrıca tüm çalışma popülasyonunda 4 CTGF SNP’sinin genotipleri, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme ve sigara kullanma durumu gibi risk faktörleri lojistik regresyon analizi ile incelenmiştir. Regresyon analizi için farklı değişkenleri bir araya getiren birbirinden farklı modeller oluşturulmuş ve bu modellerin ayrıntıları 3.7.1 ve 3.7.2 numaralı bölümlerde açıklanmıştır. Genel olarak bu grupta yapılan regresyon analizine göre PEG ile erkek

olmak 1.8 kat ilişkili çıkmıştır (Tablo 3.56 ve 57). PES için ise risk faktörlerinden hiç biri ile ilişki saptanmamıştır.

Çalışma grubunun diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara kullanımı ve inme gibi diğer demografik bilgilerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek bir fark gözlemlenmemiştir (Tablo 3.1).

4.2 Genotip analizleri

4 farklı SNP bölgesinin genotiplerinin PEG hastası, PES hastası ve kontrollerde görülme sıklıkları analiz edilmiş ve belirli bir genotipin ya da alelin PEG ya da PES riskinde rol alıp almadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bir SNP bölgesinin genotiplerinin tek başlarına PEG ya da PES ile anlamlı bir ilişkisi bulunmamıştır (Tablo 3.2, 3, 4 ve 5). Ancak bu 4 SNP için de genotipleme çalışmaları Türk toplumunda ilk kez yapıldığı için kontrol grubunda alel frekanslarının belirlenmiş olması açısından oldukça önemlidir. Ayrıca CTGF rs6918698, rs12526196 ve rs9402373 SNPLeri PES ve PEG için ilk kez bu çalışmada araştırılmış ve hem hasta hem kontrol grupları için genotip ile alel frekansları tespit edilmiştir. Her bölge için daha önceki literatür bilgileri ile bu çalışmanın sonuçlarının karşılaştırmaları aşağıdaki bölümlerde ayrıntılı olarak verilmektedir.

Bu çalışmadaki söz konusu polimorfizmler kodlayan bölgede yer almadığı için etkilerini gen ifade seviyesini ya da mRNA stabilitesini etkileyerek gösterdikleri düşünülmektedir. CTGF geninin promotor bölgesinde, -945. pozisyonunda bulunan rs6918698G/C polimorfizmi için C alelinin varlığı, transkripsiyonel düzenleyici Sp3'ün yüksek afinite ile bu bölgeye bağlanmasına ve genin transkripsiyonel baskılanmaya uğramasına yol açmaktadır; bu durum CTGF üretiminin azalması ile sonuçlanabilmektedir (Fonseca ve diğ., 2007). CTGF rs9399005C/T polimorfizmi 3' transle edilmeyen bölgede bulunmaktadır. Granel ve diğ. tarafından yapılan çalışmada bu SNP için fonksiyonel inceleme yapılmış ve T alelini taşıyan DNA'nın nükleer faktörleri C aleline göre daha iyi bağladığı görülmüştür. Bilgisayar programı ile yapılan hesaplamalar sonucunda bu polimorfizmin CTGF mRNA'sının ikincil yapısını, dolayısı ile de transkriptin stabilitesini etkileyebileceği bulunmuştur (Granel ve diğ., 2010). CTGF rs9402373C/G ve rs12526196T/C SNP'leri de CTGF ifade

edilme seviyesini etkileyebilirler. Her iki SNP de intronda bulunmaktadır ve bu polimorfizmlerin nükleer faktörlerin bağlanmasını etkileyerek gen transkripsiyonunu veya transkriptin stabilitesini etkileyebilecekleri düşünülmektedir. Dessein ve diğ.'nin çalışmasında bu polimorfizmler ile ilgili öncelikle bilgisayar simülasyonu ile analizler yapılmış ve rs9402373 C ve G allelerin farklı nükleer faktörler için yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği tahmin edilmiştir. CTGF rs12526196 C alelinin spesifik olarak yüksek afinite ile bağlandığı bir nükleer faktör tespit edilemediği halde, T alelinin spesifik olarak bağlandığı nükleer faktörler tespit edilmiştir. Daha sonra bu simülasyondaki bağlantıları teyit etmek amacıyla EMSA (electrophoretic mobility shift assay) deneyleri yapılmış ve 2 polimorfizm için de farklı alellerin farklı nükleer faktörlere bağlandığı tespit edilmiştir (Dessein ve diğ., 2009). Bu çalışmada farklı genotip kombinasyonları bir araya getirilerek, çalışma grupları arasında görülme sıklıkları karşılaştırılmıştır. İkili ve üçlü SNP genotip kombinasyonlarının PEG, PES ve kontrol gruplarında görülme frekanslarına göre yapılan analizlerin sonucunda bazı genotip kombinasyonlarının PES ve PEG için riskli ya da koruyucu etki gösterdikleri tespit edildi. Bunların ayrıntılı açıklamaları da 4.2.5 nolu bölümde verilmektedir.

4.2.1 CTGF rs6918698G/C

CTGF rs6918698G/C bölgesinin genotiplenme çalışmasında PES grubunda polimorfik C aleli frekansı 0.446, PEG grubunda 0.444, kontrol grubunda ise 0.449 olarak tespit edilmiştir ve aralarında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu polimorfizme PES ve/veya PEG'de bakan başka bir çalışma literatürde bulunmamaktadır ve bu polimorfizm daha önce bizim toplumumuzda hiç çalışılmamıştır. Tablo 4.3'te CTGF rs6918698G/C polimorfizmi ile ilgili bu çalışma dahil olmak üzere farklı toplumlarda yapılmış olan araştırmalara göre hasta ve kontrol gruplarında polimorfik alel (C) frekansları verilmiştir. Tablo 4.3'te de gösterildiği gibi daha önceki çalışmalarda Japonya'da sistemik skleroz ile ilişkili bulunurken (Kawaguchi ve diğ., 2008), Fransa'da yapılan çalışmada sistemik skleroz ile ilişkisi bulunmamıştır (Granel ve diğ., 2009). Bir diğer çalışmada kronik karaciğer hastalığı ile ilişkili bulunmuştur (Miyoshi ve diğ., 2014). Bu çalışmada kontrol grubunda bulunan polimorfik alele ait frekansın (0.449), Japonya'da gözlenen frekansa (0.490) benzediği (Miyoshi ve diğ., 2014), diğer toplumlardakinden ise farklı olduğu söylenebilir. CTGF rs6918698G/C C aleli frekansı Japonlarda yapılan farklı bir çalışmada 0.550 (Kawaguchi ve diğ., 2008),

Fransızlarda 0.275 (Granel ve diğ., 2009), İrlandalılarda 0.507 ve 0.545 (Burke ve diğ., 2013) ve İsveçlilerde 0.585 (Ahmad ve diğ., 2014) olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.3 : Farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda CTGF rs6918698G/C polimorfik alel C frekansları.

Yayın	Hastalık		Popülasyon	C allel frekansı		P
				Hasta	Kontrol	
Bu çalışma	PES		Türkiye	0.446	0.449	0.990
	PEG		Türkiye	0.444	0.449	0.979
Granel ve diğ., 2009	Sistemik skleroz		Fransa	0.214	0.275	0.060
Ahmad ve diğ., 2014	Kolon kanseri		İsveç	0.500	0.585	0.072
Kawaguchi ve diğ., 2008	Sistemik skleroz		Japonya	0.450	0.550	0.001
Burke ve diğ., 2013	Crohn's hastalığı	Klinik	İrlanda	0.547	0.507	0.501
		Cerrahi		0.468	0.545	0.281
Miyoshi ve diğ., 2014	Kronik karaciğer hastalığı		Japonya	0.550	0.490	0.040

4.2.2 CTGF rs9399005C/T

CTGF rs9399005C/T bölgesinin genotipleme çalışmasında PES grubunda polimorfik T aleli frekansı 0.290, PEG grubunda 0.296, kontrol grubunda ise 0.286 olarak tespit edilmiştir ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu polimorfizm ile ilgili Türk toplumunda daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Kore'de yapılan bir çalışmada T alel frekansının PES'de 0.451, PEG'de 0.446, kontrollerde 0.474 olduğu görülmüştür (Suh ve diğ., 2015). Tablo 4.4'te CTGF rs9399005C/T polimorfizmi ile ilgili bu çalışma dahil olmak üzere farklı toplumlarda yapılmış olan araştırmalara göre hasta ve kontrol gruplarında polimorfik alel (T) frekansları verilmiştir. Tablo 4.4'te de gösterildiği gibi Fransa'da yapılan çalışmada sistemik skleroz ile ilişkili bulunmuştur (Granel ve diğ., 2009). Bu çalışmada kontrol grubunda bulunan polimorfik alele ait frekansın (0.286), Çinliler'de (0.263) (Dessein ve diğ., 2009) ve İrlandalı'larda (0.297) (Burke ve diğ., 2013) gözlenen frekansa benzediği, diğer toplumlardakinden ise farklı olduğu söylenebilir. CTGF rs9399005C/T T aleli frekansı Koreliler'de 0.474 (Suh ve diğ., 2015), Fransızlar'da 0.478 (Granel ve diğ., 2009), İsveçliler'de 0.493 (Ahmad ve diğ., 2014) olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.4 : Farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda CTGF rs9399005C/T polimorfik alel T frekansları.

Yayın	Hastalık	Popülasyon	T allel frekansı		P	
			Hasta	Kontrol		
Bu çalışma	PES	Türkiye	0.290	0.286	1.000	
	PEG	Türkiye	0.296	0.286	0.754	
Suh ve diğ., 2015	PES	Kore	0.451	0.474	0.730	
	PEG	Kore	0.446	0.474	0.623	
Granel ve diğ., 2010	Sistemik skleroz	Fransa	0.517	0.478	0.001	
Ahmad ve diğ., 2014	Kolon kanseri	İsveç	0.276	0.493	0.352	
Dessein ve diğ., 2009	Hepatik fibroz	Çin	0.172	0.263	0.623	
Burke ve diğ., 2013	Crohn's hastalığı	Klinik	İrlanda	0.333	0.297	0.509
		Cerrahi		0.313	0.317	1.000

4.2.3 CTGF rs12526196T/C

CTGF rs12526196T/C bölgesinin genotipleme çalışmasında PES grubunda polimorfik C aleli frekansı 0.234, PEG grubunda 0.230, kontrollerde 0.223 olarak tespit edilmiştir ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu polimorfizme PES ve/veya PEG'de bakan başka bir çalışma literatürde bulunmamaktadır ve bu polimorfizm daha önce bizim toplumumuzda hiç çalışılmamıştır. Tablo 4.5'te CTGF rs12526196T/C polimorfizmi ile ilgili bu çalışma dahil olmak üzere farklı toplumlarda yapılmış olan araştırmalara göre hasta ve kontrol gruplarında polimorfik alel (C) frekansları verilmiştir. Tablo 4.5'te de gösterildiği gibi Çinli balıkçı ve çiftçilerde yapılan çalışmalarda hepatik fibroz ile ilişkili bulunurken, Sudan popülasyonunda hepatik fibroz ile ilişkisi bulunmamıştır (Dessein ve diğ., 2009). Bu çalışmada kontrol grubunda bulunan polimorfik alele ait frekansın (0.223) diğer toplumlardakinden farklı olduğu söylenebilir. CTGF rs12526196T/C polimorfizmi için C aleli frekansı Çin'de balıkçılar ile yapılan bir çalışmada kontrollerde 0.321, çiftçiler ile yapılan çalışmada ise 0.384 (Dessein ve diğ., 2009) olarak belirlenmiştir. Bunun dışında yine aynı çalışmada Sudan popülasyonunda kontrollerde C aleli frekansı 0.098 (Dessein ve diğ., 2009) bulunurken, İsveç toplumunda yapılan farklı bir çalışmada kontrol grubunda C alel frekansı 0.080 olarak tespit edilmiştir (Ahmad ve diğ., 2014).

Tablo 4.5 : Farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda CTGF rs12526196T/C polimorfik alel frekansları.

Yayın	Hastalık	Popülasyon	C alel frekansı		P
			Hasta	Kontrol	
Bu çalışma	PES	Türkiye	0.234	0.223	0.717
	PEG	Türkiye	0.230	0.223	0.812
Dessein ve diğ., 2009	Hepatik fibroz	Çin (balıkçı)	0.175	0.321	0.020
Dessein ve diğ., 2009	Hepatik fibroz	Çin (çiftçi)	0.282	0.384	0.020
Dessein ve diğ., 2009	Hepatik fibroz	Sudan	0.016	0.098	0.066
Ahmad ve diğ., 2014	Kolorektal kanser	İsveç	0.134	0.080	0.067

4.2.4 CTGF rs9402373C/G

CTGF rs9402373C/G bölgesinin genotipleme çalışmasında PES grubunda polimorfik G aleli frekansı 0.185, PEG grubunda 0.160, kontrollerde 0.181 olarak tespit edilmiştir ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu polimorfizme PES ve/veya PEG’de bakan başka bir çalışma literatürde bulunmamaktadır ve bu polimorfizm daha önce bizim toplumumuzda hiç çalışılmamıştır. Tablo 4.6’da CTGF rs9402373C/G polimorfizmi ile ilgili bu çalışma da dahil olmak üzere farklı toplumlarda yapılmış olan araştırmalara göre hasta ve kontrol gruplarında polimorfik alel (G) frekansları verilmiştir. Tablo 4.6’da da gösterildiği gibi Çinli balıkçı ve çiftçilerde ve Sudan popülasyonunda yapılan çalışmalarda hepatik fibroz ile ilişkili bulunmuştur (Dessein ve diğ., 2009). Bu çalışmada kontrol grubunda bulunan polimorfik alele ait frekansın (0.181), Sudan’da gözlenen frekansa (0.219) benzediği (Dessein ve diğ., 2009), diğer toplumlardakinden ise oldukça farklı olduğu söylenebilir. CTGF rs9402373C/G G aleli frekansı Çin’de balıkçılar yapılan bir çalışmada kontrollerde 0.497, çiftçilerle yapılan çalışmada 0.748 (Dessein ve diğ., 2009) olarak tespit edilmiştir. İrlanda’da yapılan bir çalışmadan ise klinik kontrol örneklerinde G alel frekansı 0.014 iken cerrahi kontrol örneklerinde ise 0.044 (Burke ve diğ., 2013) olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.6 : Farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda CTGF rs9402373 polimorfik alel frekansları.

Yayın	Hastalık	Popülasyon	G allel frekansı		P	
			Hasta	Kontrol		
Bu çalışma	PES	Türkiye	0.185	0.181	1.000	
	PEG	Türkiye	0.160	0.181	0.397	
Dessein ve diğ., 2009	Hepatik fibroz	Çin (balıkçı)	0.394	0.497	0.015	
Dessein ve diğ., 2009	Hepatik fibroz	Çin (çiftçi)	0.569	0.748	0.003	
Dessein ve diğ., 2009	Hepatik fibroz	Sudan	0.051	0.219	0.008	
Burke ve diğ., 2013	Crohn's Hastalığı	Klinik	İrlanda	0.081	0.014	0.572
		Cerrahi		0.063	0.044	0.258

4.2.5 Genotip kombinasyonları

İkili ve üçlü SNP genotiplerinin kombinasyon sonuçlarına göre bazı genotiplerin PEG, PES ve kontrol grupları arasında görülme frekansları arasında anlamlı seviyede ($P < 0.05$) fark tespit edilmiştir (Tablo 3.6, 7, 8, 9 ve 10). CTGF rs6918698 ve rs9399005 genotiplerinin kombinasyonunda CCCT genotipi PES hastalarında kontrollere göre 2.3 kat daha az görülmüştür. PEG hastalarında ise PES hastalarına göre 2.2 kat daha fazla görülmüştür. CTGF rs6918698 ve rs12526196 genotiplerinin kombinasyonunda GGTT genotipi PES grubunda kontrol grubuna göre 1.8 kat daha az görülmüştür. CTGF rs6918698 ve rs9402373 genotiplerinin kombinasyonunda GCCG genotipi PEG hastalarında PES hastalarına göre 2.1 kat ve kontrollere göre 1.8 kat daha az görülmüştür. CTGF rs9399005 ve rs12526196 genotiplerinin kombinasyonunda ise CCTT ve CTTC genotipleri PES hastalarında kontrollere göre sırasıyla 1.7 ve 2 kat daha az görülmüştür. CCTC genotipi ise PES grubunda kontrollere göre 1.6 kat daha fazla görülmüştür (Tablo 3.6).

CTGF rs6918698, rs9399005 ve rs12526196 bölgelerinin genotiplerinin üçlü kombinasyonlarında GGCCTT genotipi PES hastalarında kontrol grubuna göre 2.3 kat daha az görülmüştür. GGCCTC genotipi ise PEG grubunda kontrollerden 1.8 kat daha fazla görülmüştür. GCCCTC genotipine PEG hastalarında PES grubundan 3.4 kat daha az rastlanmıştır. GCCTTT genotipinin ise PES hastalarında, PEG hastalarından 1.8 kat, kontrollerden 1.7 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.7). CTGF

rs6918698, rs9399005 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin üçlü kombinasyonlarında GCCTCG genotipi PES grubunda PEG grubuna göre 1.9 kat daha fazla görülmüştür (Tablo 3.8). CTGF rs6918698, rs12526196 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin üçlü kombinasyonlarında; GGTTC genotipi PES hastalarında kontrollere göre 1.9 kat daha az görülmüştür. GCTTCG genotipi de PES hastalarında PEG hastalarına göre 2.6 kat daha fazla görülmüştür (Tablo 3.9). CTGF rs9399005, rs12526196 ve rs9402373 bölgelerinin genotiplerinin üçlü kombinasyonlarında; CCTTC ve CTTCC genotiplerine PES hastalarında kontrollere göre sırasıyla 1.7 kat ve 2.7 kat daha az rastlanmıştır (Tablo 3.10). Diğer genotip kombinasyonları ise PES ya da PEG riskinde anlamlı bir sonuca işaret etmemiştir.

4.3 Gözyaşı örnekleri ile yapılan analizler

Gözyaşı proteinler, peptitler, lipitler, elektrolitler ve küçük metabolitleri içeren oldukça karmaşık bir biyolojik sıvıdır (Zhou ve diğ., 2006). 2006 yılında de Souza ve diğ. ile 2012 yılında Zhou ve diğ. yaptığı gözyaşı proteomu çalışmaları bir arada incelenerek gözyaşı sıvısında 1800'e yakın farklı protein bulunduğu sonucuna ulaşılabilir. Gözyaşında bulunan bazı proteinlerin oküler ve sistemik hastalıkların teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olması ve gözyaşı proteinlerinin farklı dağılımlarının göz hastalıklarının patofizyolojisi konusunda fikir verebileceğinin düşünülmesi neticesinde insan gözyaşı sıvısının protein içeriğinin tespit edilmesi klinik tıpta önem kazanmıştır. Gözyaşı sıvısının cerrahi olmayan invaziv bir yöntemle hastaya rahatsızlık vermeden alınabilmesi de araştırmacılara cazip gelen bir özelliktir. Çünkü hem klinik araştırma sırasında gönüllülerden örnek toplamayı kolaylaştırır, hem de sonrasında gözyaşı sıvısı içerisindeki maddeler biyobelirteç olarak valide edilebilirse hastalıkların erken teşhisinde zahmetsiz bir yöntem olarak yer alacaktır.

Bu çalışmadaki söz konusu hastalıklar da birer göz hastalığı olduğu için gözyaşı sıvısı ile de analizler yapılması gerekli görülmüştür. Şimdiye kadar gözyaşında doğrudan CTGF'yi inceleyen sadece 1 çalışma vardır (van Setten vd., 2003). Sağlıklı kontrol grubunda, uyarılmış gözden alınan gözyaşı ile yapılan bu çalışmada CTGF, gözyaşı örneklerinin %80'inde tespit limitinin üzerinde bulunmuştur ve 70 örneğin 7 tanesinde

tespit edilmiştir (van Setten vd., 2003). Ancak daha önce PES veya PEG hastalıklarında gözyaşında CTGF protein seviyeleri üzerine bir çalışma yürütülmemiştir.

Bu çalışmanın amaçlarından bazıları gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonunu ve total protein içindeki CTGF oranını belirlemek, dolayısıyla total protein konsantrasyonunu da belirlemek ve bu parametreleri PES, PEG ve kontrol gruplarında karşılaştırarak bu parametreler bakımından gruplar arasında fark olup olmadığını tespit etmektir. Çalışmada polimorfizmler ile protein konsantrasyonlarının da karşılaştırılmasının amacı ise, CTGF genindeki bu polimorfizmlerin protein ifadesinde nasıl etki ettiğini belirlemektir. Bu sebeple her bir SNP'nin farklı genotiplerine göre CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı analizleri de yapılmıştır.

Bu çalışmada 78 PEG hastası, 77 PES hastası ve 78 kontrol olmak üzere toplam 233 gözyaşı örneğinin CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu ve total protein içinde CTGF oranı belirlenmiştir. 7 kontrol, 3 PES ve 2 PEG örneğinin CTGF konsantrasyonları ise kullanılan kitin en üst limitinin de üzerinde kaldığı için hesaplamaya alınmamıştır. Bu örneklerden 77 PEG, 77 PES ve 76 kontrol için genotip analizleri de yapılmıştır. 1 PEG hastası ve 2 kontrol örneğinin kan numunesi alınmadığı için bunlar için genotip analizi yapılamamıştır. Gözyaşı çalışma grubunun tüm çalışma popülasyonuna göre daha az kişiden oluşmasının nedeni klinisyen proje araştırmacıları tarafından gözlemlenerek aktarıldığı üzere, çalışma grubunun oldukça yaşlı kişilerden oluşması ve bu kişilerden gözyaşı almanın oldukça güç olması ve alındığında da çok az miktarda gözyaşı gelmesidir.

PEG ve PES hastalarının gözyaşındaki CTGF konsantrasyonu kontrollerinkinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 3.17). Bu durum PES ve PEG patofizyolojisinde CTGF protein ifadesinin rolü olduğuna işaret ediyor olabilir. Gözyaşındaki total protein konsantrasyonları açısından değerlendirildiğinde ise PEG grubunda, PES grubuna ve kontrol grubuna göre anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edilmiştir ancak PES grubu ile kontroller arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 3.11). Bu da PEG gelişimi sırasında gözyaşı proteomunda belirgin değişimler olduğunu göstermektedir. CTGF ve total protein konsantrasyonundaki farklılıkların bireysel fenotip farklılıklarından

kaynaklanabileceği düşünülerek gözyaşındaki total protein içindeki CTGF oranları da hesaplanmış ve ayrı bir parametre olarak değerlendirilmiştir. Bu analiz sonucunda çalışma grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

CTGF geni üzerindeki CTGF rs6918698 G/C, rs9399005 C/T, rs12526196 T/C ve rs9402373 C/G polimorfizmlerinin CTGF protein ifadesi üzerindeki etkisini incelemek üzere bu 4 SNP'nin genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol gözyaşı örneklerinde CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı kıyaslaması yapılmıştır. CTGF rs6918698 G/C bölgesi için bakılan bu parametreler yönünden PEG, PES ve kontrol gruplarında CTGF rs6918698 G/C'nin farklı genotiplerine sahip bireyler arasında veya aynı genotipe sahip PEG-PES-kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Tablo 3.13, 19 ve 25). CTGF rs9399005 C/T bölgesi için hem genotip hem hastalık durumu göz önünde bulundurularak yapılan analizlerin sonuçlarına göre, CTGF konsantrasyonunun CC genotipine sahip PEG'li bireylerde, aynı genotipe sahip kontrollere göre anlamlı seviyede düşük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.20). CTGF rs12526196 T/C bölgesi için de CTGF seviyesi için anlamlı fark görülmüştür. TC genotip grubundaki kontrollerin gözyaşındaki CTGF konsantrasyonunun, PES hastalarınıninkine göre anlamlı seviyede yüksek, PEG hastalarınıninkine göre ise anlamlı seviyede düşük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.21). CTGF rs9402373 C/G bölgesi için yapılan analizlerde ise hem CTGF konsantrasyonu hem de total protein konsantrasyonu yönünden anlamlı fark tespit edilmiştir. CC genotipine sahip PEG'li bireylerdeki CTGF konsantrasyonunun aynı genotipe sahip kontrollere göre anlamlı seviyede düşük olduğu görülmüştür (Tablo 3.22). Yine CC genotipinde olan PEG'li bireylerdeki total protein seviyesinin ise aynı genotipe sahip kontrollere göre anlamlı seviyede yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.16).

Gözyaşı örneklerinde belirlenen CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı ve 4 CTGF polimorfizminin birbirleri ile korelasyonu tüm çalışma grubunda ve PEG hastaları, PES hastaları ve kontrollerde ayrı ayrı analiz edilmiştir (Tablo 3.47, 48, 49 ve 50). Tüm çalışma grubu bir arada yapılan analizde CTGF konsantrasyonu, total protein ve CTGF oranı ile yüksek korelasyon gösterirken, CTGF genotiplerinin herhangi biri ile korelasyon göstermemiştir. Yani genel popülasyona bakıldığında genotipler ile fenotipler arasında

bir ilişki gözlenmemektedir. 4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonuna bakıldığında ise tüm genotiplerin birbiri ile anlamlı bir korelasyon gösterdiği görülmektedir. CTGF rs6918698, rs9399005 ve rs9402373 genotipleri birbiri ile pozitif korelasyon gösterirken her üç genotip de rs12526196 genotipleri ile negatif korelasyon göstermiştir (Tablo 3.47).

PEG hastaları grubunda yapılan analizde, yine CTGF konsantrasyonu, total protein ve CTGF oranı ile yüksek korelasyon göstermiştir, ancak CTGF genotiplerinin herhangi biri ile korelasyon göstermemiştir. CTGF rs6918698, rs9399005 ve rs9402373 genotipleri birbiri ile pozitif korelasyon gösterirken, rs6918698 ve rs9399009 genotipleri, rs12526196 genotipleri ile negatif korelasyon göstermiştir (Tablo 3.48).

PES hastaları grubunda yapılan analizde, CTGF konsantrasyonu sadece total protein içindeki CTGF oranı ile yüksek korelasyon göstermiştir. 4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonunda ise CTGF rs6918698, rs9399005 ve rs9402373 genotipleri birbiri ile pozitif korelasyon gösterirken her üç genotip de rs12526196 genotipleri ile negatif korelasyon göstermiştir (Tablo 3.49).

Kontrol grubunda yapılan analizde, CTGF konsantrasyonu total protein ve CTGF oranı ile yüksek korelasyon göstermiştir. Ancak CTGF genotiplerinin herhangi biri ile korelasyon göstermemiştir. 4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonunda ise CTGF rs6918698, rs9399005 ve rs9402373 genotipleri birbiri ile pozitif korelasyon gösterirken, rs6918698 ve rs9399009 genotipleri, rs12526196 genotipleri ile negatif korelasyon göstermiştir (Tablo 3.50).

Gözyaşı örnekleri popülasyonunda CTGF ve total protein konsantrasyonu ile total protein içindeki CTGF oranı ile 4 CTGF SNP'sinin genotipleri, cinsiyet, diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, inme ve sigara kullanma durumu gibi risk faktörleri incelenmiştir. Regresyon analizi için farklı değişkenleri bir araya getiren birbirinden farklı modeller oluşturulmuş ve bu modellerin ayrıntıları 3.7.3 ve 3.7.4 numaralı bölümlerde açıklanmıştır. Genel olarak gözyaşı grubunda yapılan regresyon analizine göre PEG ile erkek olmak ~2 kat ilişkili çıkmıştır. Dominant genotip modeli ile yapılan lojistik regresyonda erkek olmak, PEG ile 2.2 kat ilişkili bulunurken (Tablo 3.60), resesif genotip modeli ile yapılan analizde ise 2 kat ilişkili bulunmuştur (Tablo 3.58). PES için ise risk faktörlerinden hiç biri ile ilişki saptanmamıştır.

4.4 Aköz örnekleri ile yapılan analizler

Aköz humor sıvısının proteomiks analizinden elde edilen sonuçlara göre bu sıvıda 676 tane farklı protein bulunmaktadır. PEG, PES ve katarakt hastaları grubunda aköz humor sıvısındaki total protein konsantrasyonu, PEG hastalarında en yüksek, katarakt hastalarında en düşük bulunurken, PES hastalarında ise katarakt hastalarından yüksek, PEG hastalarından düşük olduğu gözlenmiştir (Zenkel vd., 2006). Bu proteinler arasında CTGF de yer almaktadır (van Setten vd., 2002). Yapılmış olan bazı araştırmaların sonuçlarına göre, aközdeki CTGF konsantrasyonu yaklaşık minimum 400 pg/ml, maksimum 6000 pg/ml olarak tespit edilmiştir ancak bu çalışmalarda tespit limitinin altında ve üstünde kaldığı için konsantrasyonu belirlenemeyen bazı örnekler olduğu da bildirilmiştir (Hwang ve diğ., 2015; Ho ve diğ., 2005; Browne ve diğ., 2011; van Setten vd., 2002). Hwang ve diğ. ve van Setten'in çalışmalarında sadece katarakt hastaları ile çalışılmıştır (Hwang ve diğ., 2015; van Setten vd., 2002). Ho ve diğ. ile Brown ve diğ.'nin çalışma grupları ise PEG ve PES hastaları ile kontrol gruplarından oluşmaktadır ancak bu kontrol grupları da tamamen sağlıklı bireylerden değil PES ve PEG olmayan katarakt hastaları gibi cerrahi operasyon geçiren bireylerden oluşmaktadır çünkü aköz humor ancak göz ameliyatı olan kişilerden alınabilmektedir (Ho ve diğ., 2005; Browne ve diğ., 2011). Bu çalışmada aközde belirlenen minimum CTGF konsantrasyonu 800 pg/ml, maksimum ise 9820 pg/ml'dir. Çalışmaya dahil edilmiş olan 50 örneğin, 39'unun CTGF konsantrasyonları literatürdeki aralıkta kalırken 2 PEG, 2 PES, 3 kontrol toplam 7 örneğinki daha yüksek olarak tespit edilmiştir. 2 örneğinki ise kullanılan kitin üst limiti dışında kaldığı için analizlere dahil edilememiştir. Daha önce de bahsedildiği gibi şimdiye kadar yapılmış diğer çalışmalarda da tespit limitinin altında ve üstünde kalan örnekler olmuş ve bunlar hesaplamalara dahil edilememiştir (Hwang ve diğ., 2015; Ho ve diğ., 2005; Browne ve diğ., 2011; van Setten vd., 2002). Ayrıca Bu çalışma Türk toplumunda aköz sıvısında CTGF konsantrasyonu ölçen ilk çalışmadır. Şimdiye kadar PES ve PEG hastalarının aköz humor sıvısında CTGF seviyesinin ölçüldüğü iki çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda CTGF seviyelerinin PEG hastalarında PES hastalarından anlamlı bir şekilde yüksek olduğu rapor edilmiştir (Ho ve diğ., 2005; Browne ve diğ., 2011).

Bu çalışmada aköz örneklerinde CTGF konsantrasyonu yönünden yapılan analizlerde PEG, PES ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Tablo 3.35). Sonucun literatür ile uyumsuz olmasının nedeni aköz alınabilen gönüllü sayısının oldukça az olması ve PEG, PES ve kontrol grupları arasında birey sayısı olarak çok fark olması olabilir. Eğer çalışma genişletilerek tekrar analiz edilebilirse daha sağlıklı sonuçlar alınabilir. PEG grubundaki total protein konsantrasyonunun ise PES grubuna ve kontrol grubuna göre anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 3.29). Zenkel ve diğ. (2006)'nin çalışmasında da total protein PEG hastalarında PES hastalarından yüksek bulunmuştu; bu nedenle beklenen gibi bir sonuç bulunmuştur. Total protein içindeki CTGF oranı için ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Tablo 3.41).

CTGF geni üzerindeki CTGF rs6918698 G/C, rs9399005 C/T, rs12526196 T/C ve rs9402373 C/G polimorfizmlerinin CTGF protein ifadesi üzerindeki etkisini incelemek üzere bu 4 SNP'nin genotiplerine göre PEG ve PES hastaları ile kontrol aköz örneklerinde CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı karşılaştırmaları yapılmıştır. PEG, PES ve kontrol bireylerin aköz humor örneklerinde belirlenen total protein konsantrasyonlarının CTGF rs6918698 G/C, rs9399005 C/T ve rs9402373 C/G genotiplerine göre karşılaştırmalarında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Tablo 3.31, 32 ve 34). CTGF rs12526196 T/C için TT genotipinde olan PEG'li bireylerdeki total protein seviyesinin PES ve kontrollere göre anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edilmiştir. TC genotipinde olan kontrol bireylerdeki total protein seviyesinin PES ve PEG gruplarına göre anlamlı seviyede düşük olduğu tespit edilmiştir. TC genotipindeki PES hastalarının total protein seviyesinin ise TT genotipindeki PES hastalarınınkine göre anlamlı seviyede yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 3.33).

PEG, PES ve kontrol bireylerin aköz humor örneklerinde belirlenen CTGF konsantrasyonları ile CTGF rs6918698 G/C, rs9399005 C/T ve rs9402373 C/G genotipleri arasında yapılan karşılaştırmalarda gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Tablo 3.37, 38 ve 39). CTGF rs12526196 T/C bölgesi için ise TT genotipindeki kontrol bireylerdeki CTGF seviyesinin CC genotipindeki kontrol bireylere göre anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.39).

Total protein içindeki CTGF'nin oranı yönünden yapılan incelemede ise CTGF rs6918698 G/C, rs9399005 C/T, rs12526196 T/C ve rs9402373 C/G genotiplerinde PEG, PES ve kontrol grupları arasında veya aynı çalışma grubunda genotipler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Tablo 3.43, 44, 45 ve 46).

Aköz örnekleri için PEG hastası, PES hastası ve kontroller bir arada yapılan analizde CTGF oranı, CTGF konsantrasyonu ile pozitif, total protein ile negatif korelasyon göstermiştir ancak CTGF genotiplerinin herhangi biri ile korelasyon göstermemiştir. 4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonuna bakıldığında ise CTGF rs9399005 genotipleri rs6918698 genotipleri ve rs9402373 genotipleri ile pozitif korelasyon gösterirken; rs12526196 genotipleri, rs6918698 genotipleri ve rs9399005 genotipleri ile negatif korelasyon göstermiştir (Tablo 3.51).

PEG hastaları grubunda yapılan korelasyon analizinde, sadece CTGF konsantrasyonu ile CTGF oranı arasında yüksek korelasyon görülmüştür. Diğer parametreler arasında korelasyon yoktur (Tablo 3.52).

PES hastaları grubunda yapılan korelasyon analizinde, total protein CTGF oranı ve rs9399005 genotipleri ile korelasyon göstermiştir. 4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonuna bakıldığında ise CTGF rs9399005 genotipleri rs6918698 genotipleri ve rs9402373 genotipleri ile pozitif korelasyon gösterirken; rs12526196 genotipleri, rs6918698 genotipleri ve rs9399005 genotipleri ile negatif korelasyon göstermiştir (Tablo 3.53).

Kontrol grubunda yapılan korelasyon analizinde, CTGF konsantrasyonu CTGF oranı ve rs12526196 genotipleri ile pozitif korelasyon göstermiştir. Total protein içindeki CTGF oranı ise rs9399005 genotipleri ile negatif korelasyon gösterdi. 4 SNP bölgesinin birbiri ile korelasyonuna bakıldığında ise rs9399005 genotipleri, rs6918698 genotipleri ve rs9402373 genotipleri ile yüksek korelasyon göstermiştir (Tablo 3.54).

Literatürdeki sonuçlara göre PEG hastalarının aköz örneklerindeki CTGF konsantrasyonları PES hastalarınınkinden anlamlı derecede yüksektir (Ho ve diğ., 2005; Browne ve diğ., 2011). PES hastaları arasında aközündeki CTGF seviyesi yüksek olanların PEG geliştirmeye meyilli olduğu düşünülerek, kontrolleri sıklaştırılıp önlem alınabilir. Ancak aköz örneği sadece cerrahi müdahale gerekliliği olan hastalarda operasyon sırasında alınabilmektedir. Her PES hastasından alınması

mümkün değildir, bu nedenle pratikte daha kolay numune alınabilir bir biyolojik kaynak bulunması önem taşımaktadır. 1.3 numaralı bölümde de anlatıldığı gibi gözyaşı sıvısının içeriğinin göz hastalıkları ile çeşitli ilişkileri daha önceki çalışmalarda bulunmuştur ve buna dayanarak PES ya da PEG ile de ilişkisi bulunabileceği düşünülmüştür. Çalışmanın amaçlarından biri de gözyaşı ve aközdeki CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranlarının korelasyonunu incelemek ve eğer korelasyon bulunabilirse aköz yerine çok daha kolay uygulanabilir olan gözyaşı sıvısını erken tanıda kullanmayı önerebilmektir.

Bu nedenle bu çalışmada, hem aköz humor, hem de gözyaşı örneğinde CTGF ve total protein konsantrasyonu ile total protein içindeki CTGF oranı belirlenebilen kişiler için aköz ve gözyaşında bulunan parametreler arasındaki korelasyon tüm çalışma grubunda, PEG hastalarında, PES hastalarında ve kontrollerde ayrı ayrı incelenmiştir. Tüm çalışma grubunda yapılan korelasyon analizinde aköz ve gözyaşı içindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içinde CTGF oranları birbiri ile korelasyon göstermemiştir. Sadece aköz örneklerine göre yapılan analizde olduğu gibi, bu gruptaki analizde de aköz CTGF konsantrasyonu, aköz CTGF oranı ile pozitif korelasyon gösterirken, aköz total protein konsantrasyonu aköz CTGF oranı ile negatif korelasyon göstermiştir. Sadece gözyaşı örneklerine göre yapılan analizdekine benzer şekilde bu analizde de gözyaşı CTGF konsantrasyonu, gözyaşı CTGF oranı ile pozitif korelasyon göstermiştir (Tablo 3.55). Aynı analizler sadece PEG, sadece PES ve sadece kontrolleri içeren gruplar için de yapılmış ve hiçbirinde aköz ile gözyaşı arasında korelasyon görülmemiştir (EK 3). Aköz çalışma grubu popülasyon olarak çok küçük olduğundan bu grup için lojistik regresyon analizi yapılmamıştır.



5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF)'nün mitozu, fibroblastların çoğalmasını, hücre bağlanmasını ve göçünü, kolajen sentezini, hücre dışı matriks sentezini ve fibrozu düzenlediği düşünülmektedir (Oemar ve Lüscher, 1997). Kalp fibrozu, glomeruloskleroz, sistemik skleroz gibi birçok fibrotik süreçte rol almaktadır (Takehara ve diğ., 2000; Chen ve diğ., 2000; Gupta ve diğ., 2000; Shi-Wen ve diğ., 2000). PES patofizyolojisinde de fibriller materyallerin gereğinden fazla üretilerek birikmesi gerçekleşmektedir ve psödoeksfolyatif materyal içerisinde fibriller maddelere rastlanmaktadır (Ritch, 2008). Bu nedenle bu çalışmada PES ve PEG ile CTGF genindeki SNPlerin ilişkisi incelenmiştir. Bu SNPlerin gözyaşı ve aköz humordaki CTGF ve total protein konsantrasyonları üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Aynı zamanda gözyaşı ve aközdeki CTGF ve total protein konsantrasyonlarının PEG ya da PES durumunda ne kadar değiştiği, hastalığın tanısında kullanılabilecek kadar fark olup olmadığı gözlemlenmiştir.

CTGF rs6918698G/C, rs9399005C/T, rs12526196T/C, rs9402373C/G SNP'leri için genotipleme çalışması yapılmıştır. Genotiplemelerin yapıldığı çalışma grubu 213 PEG, 214 PES ve 215 kontrolden oluşmuştur ve aralarında anlamlı bir yaş farkı bulunmamaktadır. PEG grubundaki erkeklerin kadınlara oranı kontrol grubuna göre anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur ve yapılan lojistik regresyon analizine göre PEG ile erkek olmak 1.8 kat ilişkili çıkmıştır. Ancak PES ile cinsiyetin bir ilişkisi bulunmamıştır bu nedenle PES geliştirmiş erkek hastalarda PEG olma olasılığı daha yüksektir denebilir, bu nedenle erkek PES hastalarının göz muayenesine daha sık gitmesi PEG'in erken teşhis edilmesi amacı ile önerilebilir.

Çalışmadaki SNP'lerin genotiplerinin tek başlarına PEG ya da PES ile anlamlı bir ilişkisi bulunmamıştır, lojistik regresyon analizinde de genotipler riskli bulunmamıştır. Ancak bu 4 SNP için de genotipleme çalışmaları Türk toplumunda ilk kez yapıldığı için, kontrol grubunda alel frekanslarının belirlenmiş olması açısından oldukça

önemlidir. İkili ve üçlü SNP genotip kombinasyonlarının PEG, PES ve kontrol gruplarında görülme frekanslarına göre yapılan analizlerin sonucunda bazı genotip kombinasyonlarının PES ve PEG için riskli ya da koruyucu etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu genotiplerden ayrıntılı olarak 4.2.5 numaralı bölümde bahsedilmiştir. Burada kontrol grubunda görülme sıklığı daha yüksek olan genotipler için hastalığa karşı koruyucu denebilir. PEG ile PES arasında yapılan karşılaştırmada PEG grubunda daha çok görülen genotiplerin PES'ten PEG gelişmesi bakımından riskli, PES grubunda daha çok görülen genotiplerin ise PES'ten PEG gelişimine karşı koruyucu olduğu söylenebilir. PEG ile kontroller arasında yapılan karşılaştırmalara göre PEG grubunda daha fazla görülen genotiplerin PEG riskini artırdığı düşünülürken, kontrollerde daha çok görülen genotiplerin ise PEG'e karşı koruyuculuğu düşünülebilir. PES ile kontrol arasında yapılan karşılaştırmalarda ise PES grubunda daha fazla görülen genotiplere PES olma açısından riskli, kontrollerde daha çok görülen genotiplere ise PES'e karşı koruyucu denilebilir.

Hem gözyaşı hem de aközdeki total protein konsantrasyonunun PEG grubunda, PES ve kontrol grubuna göre anlamlı seviyede yüksek olması PEG gelişimi sırasında gözyaşı proteomunda belirgin değişimler olduğuna işaret ediyor olabilir. Bu nedenle bu hastalık ile ilgili proteomik çalışmalara devam edilmesi, hastalığın patofizyolojisi ile ilgili olabilecek proteinler üzerine çalışmalar yapılması, PEG tanısında ve tedavisinde kullanılacak parametreler bulunmasını sağlayabilir. CTGF konsantrasyonu açısından yapılan ölçümlere göre; PEG ve PES hastalarının gözyaşındaki CTGF konsantrasyonlarının kontrollerinkinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olması, PES ve PEG patofizyolojisinde CTGF protein ifadesinin rolü olduğuna işaret ediyor olabilir. Ancak aközde CTGF konsantrasyonu bakımından gruplar arasında bir fark görülmemiştir. Total protein içinde CTGF oranı için ise ne aközde ne de gözyaşında çalışma grupları arasında anlamlı bir farka rastlanmıştır.

Bu çalışma, gözyaşı örneklerindeki CTGF konsantrasyonunun PEG veya PES teşhisinde kullanılma olasılığı olduğunu, ancak PEG ile PES ayırımını yapamayacağını göstermiştir. Öte yandan, gözyaşı total protein konsantrasyonu parametresi PEG teşhisi için kullanılma potansiyeli taşımaktadır. Ancak bu konularda daha büyük

popülasyonlarda daha ileri araştırmalar yapılarak bu ilişkilerin teyit edilmesi gerekmektedir.

Tüm gözyaşı örneklerinde yapılan korelasyon analizlerinde gözyaşı CTGF konsantrasyonunun hem total protein konsantrasyonu hem de total protein içindeki CTGF oranı ile korelasyon gösterdiği görülmüştür. Bu durum, PES hastalarında gözyaşı total protein konsantrasyonu etkilenmezken CTGF konsantrasyonunun azalmış olmasını yansıtır ve PES hastalarında CTGF konsantrasyonunu etkileyen farklı bir mekanizma olabileceğini ve bu kişilerde diğer proteinlerin artarak total protein seviyesinin değişmemesine yol açmış olabileceğini gösteriyor olabilir.

Tüm aköz örnekleri, sadece PEG hastaları ve sadece kontrol grubunda yapılan korelasyon analizlerinde de CTGF konsantrasyonu CTGF oranı ile korelasyon gösterirken, PES hastalarında hiçbir parametre ile korelasyon göstermemiştir. Aköz örneklerinde de PES hastalarındaki bir patofizyolojiden dolayı CTGF konsantrasyonu ile CTGF oranı arasındaki korelasyon bozuluyor olabilir. Tüm aköz örneklerinde yapılan analizde total protein konsantrasyonu ile CTGF oranı arasında negatif korelasyon varken, PES hastalarında bu durum pozitif korelasyon olarak gözlenmektedir. PEG ve kontrol gruplarında ise total protein ile CTGF oranı arasında korelasyon görülmemiştir.

Gözyaşı ve aköz arasında CTGF konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu ve total protein içindeki CTGF oranı açısından bir korelasyon görülmemiştir. Lojistik regresyon analizi ile tüm çalışma verileri bir arada PES veya PEG riski bakımından değerlendirildiğinde de PEG ile yaş ilişkisi hariç herhangi bir risk faktörü bulunmamıştır.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre CTGF proteini PEG hastalarının gözyaşında daha fazla görüldüyorsa da bunun kendi genindeki 4 SNP ile ilişkisi bulunmamıştır. Protein seviyesini etkileyebilecek başka CTGF polimorfizmleri ile ya da TGF- β gibi CTGF ifadesini etkileyen proteinlerin genlerindeki polimorfizmler ile CTGF protein seviyelerini karşılaştıran çalışmalar yapılabilir. Aköz alışma grubunda ise literatürde PEG hastalarında CTGF oranı kontrollere göre daha yüksek bulunmuşken, bu çalışmada fark görülmemiştir. Bunun nedeni ise çalışma grubunda çok az kişinin aköz örneği olması ve bunların PEG, PES ve kontrol grupları arasında dağılımlarının eşit olmaması olabilir. Örnek sayıları çoğaltılarak gözyaşı ile korelasyon analizleri

tekrarlanarak gözyaşının aköz yerine tanı aracı olarak kullanılabilirliği değerlendirilebilir.

Gözyaşı sıvısının Schirmer stripleri ile alınıp, proteinlerin ekstre edilerek analiz edilmesi çok yaygın kullanılan bir yöntem değildir. Bu çalışmanın başında yapılan deneme çalışmaları ile stripteki proteinlerin büyük oranda geri kazanılmasını sağlayan bir yöntem optimize edilmiş ve çalışma süresince bu yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemin gelecekte gözyaşı ile yapılacak çalışmalarda da araştırmacılara kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada PES ve PEG ile ilişkisi araştırılan birçok parametre ilk kez ele alınmıştır ve bulgular ve yönlendirmeler bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır. İlk kez araştırılmış olan parametrelere ait veriler biyoinformatik alanında öneme sahiptir. Aynı zamanda bu çalışmada bulunan ilişkilerden yola çıkılarak PES ve PEG teşhisi için kullanılacak biyobelirteçler bulunabilir, bu biyobelirtece yönelik rutin tanı laboratuvarlarında kullanılmak üzere cihazlar geliştirilebilir. Daha sonraki aşamalarda ise hastalık takibi ya da tedavisi için kullanılacak lens gibi biyomedikal cihazların geliştirilmesi esnasından bu çalışmanın sonuçlarından faydalanılabilir. Bu çalışma bu yönleriyle biyomedikal mühendisliğine katkı sağlamış bir proje niteliğindedir.

KAYNAKLAR

- Aasved, H.** (1969). The geographical distribution of fibrilloglycogenosis epitheliocapsularis. *Acta Ophthalmol*, 47, 792-810.
- Abreu, J. G., Ketpura N. I., Reversade, B., De Robertis, E. M.** (2002). Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biology*, 4, 599-604.
- Aguiar, D. P., de Farias, G. C., de Sousa, E. B., de Mattos Coelho-Aguiar, J., Lobo, J. C., Casado, P. L., Abreu, J. G. R.** (2014). New strategy to control cell migration and metastasis regulated by CCN2/CTGF. *Cancer Cell International*, 14, 61.
- Ahmad, A., Askari, S., Befekadu, R., Hahn-Strömberg, V.** (2015). Investigating the association between polymorphisms in connective tissue growth factor and susceptibility to colon carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 11, 2493-2503.
- Alpay, H., Ersoy, G.** (1989). Psödoeksfoliasyon sendromu (İstatistiksel bir çalışma). *Türk Oftalmoloji Gazetesi*, 19, 63-66.
- Ananthi, S., Chitra, T., Bini, R., Prajna, N. V., Lalitha, P., Dharmalingam, K.** (2008). Comparative analysis of the tear protein profile in mycotic keratitis patients. *Molecular Vision*, 14, 500-7.
- Anastasopoulos, E., Coleman, A. L., Wilson, M. R., Sinsheimer, J. S., Yu, F., Katafigiotis, S., Founti, P., Salonikiou, A., Pappas, T., Koskosas, A., Katopodi, T., Lambropoulos, A., Topouzis, F.** (2014). Association of LOXL1 polymorphisms with pseudoexfoliation, glaucoma, intraocular pressure, and systemic diseases in a Greek population. The Thessaloniki eye study. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 55(7), 4238-4243.
- Andrikopoulos, G. K., Mela, E. K., Georgakopoulos, C. D., Papadopoulos, G. E., Damelou, A. N., Alexopoulos, D. K., Gartaganis, S. P.** (2009). Pseudoexfoliation syndrome prevalence in Greek patients with cataract and its association to glaucoma and coronary artery disease. *Eye (Lond)*, 23(2), 442-447.
- Aoyama, E., Kubota, S., Takigawa, M.** (2012). CCN2/CTGF binds to fibroblast growth factor receptor 2 and modulates its signaling. *FEBS Lett.*, 586, 4270-4275.
- Aragon-Martin, J. A., Ritch, R., Liebmann, J.** (2008). Evaluation of LOXL1 gene polymorphisms in exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma. *Mol. Vis.*, 14, 533.
- Aritürk, N., Oge, I., Yücel, O. E.** (2005). Exfoliation syndrome in middle east and black sea area of Turkey. *5th International Glaucoma Symposium- IGS Final Program and Book of Abstracts*, A72.

- Arnott, J. A., Lambi, A. G., Mundy, C., Hendesi, H., Pixley, R. A., Owen, T. A., Safadi, F. F., Popoff, S. N.** (2011). The role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in skeletogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, 21, 43–69.
- Baca, J. T., Finegold, D. N., Asher, S. A.** (2007). Tear glucose analysis for the noninvasive detection and monitoring of diabetes mellitus. *The Ocular Surface*, 5, 280-93.
- Baker, G. R., Morton, M., Rajapaska, R. S., Bullock, M., Gullu, S., Mazzi, B., Ludgate, M.** (2006). Altered tear composition in smokers and patients with graves ophthalmopathy. *Archives of Ophthalmology*, 124, 1451-6.
- Bhat, S.** (2010). Pseudoexfoliation syndrome: an identifiable cause of open angle glaucoma. *KJO*, 22(4), 330–335.
- Bland, J. M., Altman, D. G.** (2000). Statistics notes. The odds ratio. *BMJ*, 320(7247), 1468.
- Bohm, D., Keller, K., Pieter, J., Boehm, N., Wolters, D., Siggelkow, W., Lebrecht, A., Schmidt, M., Kolbl, H., Pfeiffer, N., Grus, F. H.** (2012). Comparison of tear protein levels in breast cancer patients and healthy controls using a de novo proteomic approach. *Oncology Reports*, 28, 429-38.
- Bork, P.** (1993). The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett.*, 327, 125–130.
- Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L., Grotendorst, G. R.** (1991). Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J. Cell. Biol.* 114, 1285-1294.
- Brigstock, D.R.** (2003). The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol.*, 178, 169–175.
- Brittanica Ansiklopedisi Editörleri.** (1998). *Encyclopædia Britannica*, Polymorphism.
- Browne, J. G., Ho, S. L., Kane, R., Oliver, N., Clark, A. F., O'Brien, C. J., Crean, J. K.** (2011). Connective tissue growth factor is increased in pseudoexfoliation glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(6), 3660-6.
- Cahill, M., Early, A., Stack, S., Blayney, A.W., Eustace, P.** (2002). Pseudoexfoliation and sensorineural hearing loss. *Eye (Lond)*, 16(3), 261-266.
- Challa, P., Schmidt, S., Liu, Y.** (2008). Analysis of LOXL1 polymorphisms in a United States population with pseudoexfoliation glaucoma. *Mol. Vis.*, 14, 146-149.
- Chambers, R. C., Leoni, P.** (2000). Thrombin Is a Potent Inducer of Connective Tissue Growth Factor. *The Journal Of Biological Chemistry*, 275, 35584– 86.
- Chen, L., Jia, L., Wang, N., et al.** (2009). Evaluation of LOXL1 polymorphisms in exfoliation syndrome in a Chinese population. *Mol. Vis.*, 15, 2349-2357.
- Chen, L., Zhou, L., Chan, E. C., Neo, J., Beuerman, R. W.** (2011). Characterization of the human tear metabolome by LC-MS/MS. *Journal of Proteome Research*, 10, 4876-82.

- Chen, M. M., Lam, A., Abraham, J. A., Schreiner, G. F., Joly, A.F.** (2000). CTGF expression is induced by TGF- β in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: A potential role in heart fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32, 1805-1819.
- Chong, R. S., Jiang, Y. Z., Boey, P. Y., Yu, S. J., Htoon, H. M., Aung, T., Khaw, P. T., Wong, T. T.** (2010). Tear cytokine profile in medicated glaucoma patients: effect of monocyte chemoattractant protein 1 on early posttrabeculectomy outcome. *Ophthalmology*, 117(12), 2353-8.
- Choy, C. K., Cho, P., Chung, W. Y., Benzie, I. F.** (2001). Water soluble antioxidants in human tears: effect of the collection method. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(13), 3130-4.
- Cicha, I., Goppelt-Struebe, M.** (2009). Connective tissue growth factor: context-dependent functions and mechanisms of regulation. *Biofactors*, 35, 200–208.
- Citirik, M., Acaroglu, G., Batman, C., Yildiran, L., Zilelioglu, O.** (2007). A possible link between the pseudoexfoliation syndrome and coronary artery disease. *Eye*, 21, 11-5.
- Csösz, É., Boross, P., Csutak, A., Berta, A., Tóth, F., Póliska, S., Török, Z., Tózsér, J.** (2012). Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy. *Journal of Proteomics*, 75(7), 2196-2204.
- Cumurcu, T., Dorak, F., Cumurcu, B.E., Erbay, L.G., Ozsoy, E.** (2013). Is there any relation between pseudoexfoliation syndrome and Alzheimer's type dementia? *Semin. Ophthalmol.*, 28(4), 224-229.
- Cumurcu, T., Kılıç, R., Yoloğlu, S.** (2010). The frequency of pseudoexfoliation syndrome in the middle Black Sea region of Turkey. *European Journal of Ophthalmology*, 20, 1007-1011.
- de Souza, G. A., Godoy, L. M., Mann, M.** (2006). Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biology*, 7(8), R72.
- Demir, N., Ulus, T., Yucel, O. E., Kumral, E. T., Singar, E., Tanboga, H. I.** (2011). Assessment of myocardial ischaemia using tissue Doppler imaging in pseudoexfoliation syndrome. *Eye (Lond)*, 25(9), 1177-1180.
- Demirdöğen, B. C., Ceylan, O. M., Işikoğlu, S., Mumcuoğlu, T., Erel, Ö.** (2014). Evaluation of Oxidative Stress and Paraoxonase Phenotypes in Pseudoexfoliation Syndrome and Pseudoexfoliation Glaucoma. *Clin. Lab.*, 60, 79-86.
- Denisin, A. K., Karns, K., Herr, A. E.** (2012). Post-collection processing of Schirmer strip-collected human tear fluid impacts protein content. *Analyst*, 137(21), 5088-5096.
- Dessein, A., Chevillard, C., Arnaud, V., Hou, X., Hamdoun, A. A., Dessein, H., He, H., Abdelmaboud, S. A., Luo, X., Li, J., Varoquaux, A., Mergani, A., Abdelwahed, M., Zhou, J., Monis, A., Pitta, M. G. R., Gasmelseed, N., Cabantous, S., Zhao, Y., Prata, A., Brandt, C., Elwali, N. E., Argiro, L., Li, Y.** (2009). Variants of CTGF are associated with hepatic fibrosis in Chinese, Sudanese and Brazilians infected with Schistosomes. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 2321-2328.

- Djordjevic-Jocic, J., Jovanovic, P., Bozic, M., Tasic, A., Rancic, Z.** (2012). Prevalence and early detection of abdominal aortic aneurysm in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Curr. Eye Res.*, 37(7), 617-623.
- Evans, V., Vockler, C., Friedlander, M., Walsh, B., Willcox, M. D.** (2001). Lacryglobin in human tears, a potential marker for cancer. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 29, 161-3.
- Farias, E., Yasunaga, K. L., Peixoto, R. V. R., Fonseca, M. P., Fontes, W., Galera, P. D.** (2013). Comparison of two methods of tear sampling for protein quantification by Bradford method. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 33(2), 261-264.
- Fonseca, C., Lindahl, G. E., Ponticos, M., Sestini, P., Renzoni, E. A., Holmes, A. M., Spagnolo, P., Pantelidis, P., Leoni, P., Mchugh, N., Stock, C. J., Shi-Wen, X., Denton, C. P., Black, C. M., Welsh, K. I., du Bois, R. M., Abraham, D. J.** (2007). A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 357, 1210-20.
- Forsius, H.** (1988). Exfoliation syndrome in various ethnic populations. *Acta Ophthalmologica*, 184, 71-85.
- Funke, S., Azimi, D., Wolters, D., Grus, F.H., Pfeiffer, N.** (2012). Longitudinal analysis of taurine induced effects on the tear proteome of contact lens wearers and dry eye patients using a RP-RP-Capillary-HPLC-MALDI TOF/TOF MS approach. *Journal of Proteomics*, 75, 3177-90.
- Gao, R., Brigstock, D. R.** (2003). Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a heparindependent adhesion receptor for connective tissue growth factor (CTGF) in rat activated hepatic stellate cells. *Hepatol Res.*, 27, 214-220.
- Gartaganis, S. P., Georgakopoulos, C. D., Mela, E. K., Exarchou, A., Ziouti, N., Assouti, M., Vynios, D. H.** (2002). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in exfoliation syndrome. *Ophthalmic Research*, 34, 165-171.
- Gartaganis, S. P., Patsoukis, N. E., Nikolopoulos, D. K., Georgiou, C. D.** (2007). Evidence for oxidative stress in lens epithelial cells in pseudoexfoliation syndrome. *Eye (London, England)*, 21, 1406-1411.
- Gayathri, R., Coral, K., Sharmila, F., Sriprya, S., Sriprya, K., Manish, P., Shantha, B., Ronnie, G., Vijaya, L., Narayanasamy, A.** (2016). Correlation of aqueous humor Lysyl oxidase activity with TGF- β levels and LOXL1 genotype in Pseudoexfoliation. *Curr Eye Res*, 41, 1331-1338.
- Giangiacomo, A., Coleman, A. L.** (2009). The epidemiology of glaucoma. *Essentials in Ophthalmology*, 13-21.
- Gillies, W. E., Brooks, A. M.** (1988). The presentation of acute glaucoma in pseudoexfoliation of the lens capsule. *Austral NZ J Ophthalmol*, 16, 101-106.
- Gokce, S. E., Gokce, M. I.** (2015). Relationship between pseudoexfoliation syndrome and erectile dysfunction: a possible cause of endothelial dysfunction for development of erectile dysfunction. *Int. Braz J. Urol.*, 41(3), 547-551.
- Gonen, K. A., Gonen, T., Gumus, B.** (2013). Renal artery stenosis and abdominal aorta aneurysm in patients with pseudoexfoliation syndrome. *Eye (Lond)*, 27(6), 735-741.

- Gourh, P., Mayes, M. D., Arnett, F. C.** (2008). CTGF polymorphism associated with systemic sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 358, 308–309.
- Granel, B., Argiro, L., Hachulla, E., Fajardy, I., Weiller, P. J., Durand, J. M., Frances, Y., Dombey, A. M., Marquet, S., Lesavre, N., Disdier, P., Bernard, F., Hatron, P. Y., Chevillard, C.** (2010). Association between a CTGF gene polymorphism and systemic sclerosis in a french population. *Journal of Rheumatology*, 37, 351-8.
- Green-Church, K. B., Nichols, K. K., Kleinholz, N. M., Zhang, L., Nichols, J. J.** (2008). Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Molecular Vision*, 14, 456-70.
- Grotendorst, G. R., Duncan, M.R.** (2005). Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *Faseb J.*, 19, 729–738.
- Grotendorst, G. R., Rahmanie, H., Duncan, M.R.** (2004). Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *Faseb J.*, 18, 469–479.
- Grus, F. H., Podust, V. N., Bruns, K., Lackner, K., Fu, S., Dalmaso, E. A., Wirthlin, A., Pfeiffer, N.** (2005). SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46, 863-76.
- Gupta, S., Clarkson, M. R., Duggan, J., Brady, H. R.** (2000). Connective Tissue Growth Factor: Potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney International*, 58, 1389-1399.
- Güngör, S. G., Bayer, A., Akman, A., Asena, L.** (2017). Early Clinical Features of Pseudoexfoliation Syndrome in Anterior Segment and Gonioscopy Examination. *Turkish Journal of Ophthalmology*, 47(1), 5–8.
- Hayashi, H., Gotoh, N., Ueda, Y., Nakanishi, H., Yoshimura, N.** (2008). Lysyl oxidaselike 1 polymorphisms and exfoliation syndrome in the Japanese population. *Am. J. Ophthalmol.* 145(3), 582-585.
- Hewitt, A. W., Sharma, S., Burdon, K. P., et al.** (2008). Ancestral LOXL1 variants are associated with pseudoexfoliation in Caucasian Australians but with markedly lower penetrance than in Nordic people. *Hum. Mol. Genet.*, 17(5), 710-716.
- Ho, S. L., Dogar, G. F., Wang, J., Crean, J., Wu, Q. D., Oliver, N., Weitz, S., Murray, A., Cleary, P. E., O'Brien, C.** (2005). Elevated aqueous humour tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome. *British Journal of Ophthalmology*, 89, 169-173.
- Hwang, H. B., Yim, H. B., Cho, Y. K., Choi, J. A.** (2015). The Association Between Aqueous Connective Tissue Growth Factor and the Severity of Age-related Cataracts as Graded by the Lens Opacities Classification System III. *Current Eye Research*, 41(3), 350-356.
- İRkeç, M.** (1979). Senil psödoeksfoliasyonunun epidemiyolojik özellikleri üzerine bir inceleme. *T Oft Gaz*, 263.
- İskeleli, G.** (1978). Psödoeksfoliasyon sıklığı. *XII. Ulusal Oftalmoloji Kongresi, Antalya*, 171.
- Jacobi, P. C., Dietlein, T. S., Krieglstein, G. K.** (1999). Comparative study of trabecular aspiration vs trabeculectomy in glaucoma triple procedure to

- treat pseudoexfoliation glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, 117(10), 1311-8.
- Katsi, V., Pavlidis, A.N., Kallistratos, M. S., et al.** (2013). Cardiovascular repercussions of the pseudoexfoliation syndrome. *N. Am. J. Med. Sci.*, 5(8), 454-459.
- Kawaguchi, Y., Ota, Y., Kawamoto, M., Ito, I., Tsuchiya, N., Sugiura, T., Katsumata, Y., Soejima, M., Sato, S., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Takehara, K., Kuwana, M., Yamanaka, H., Hara, M.** (2008). Association study of a polymorphism of the CTGF gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese population. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68, 1921-24.
- Kawai, S., Nakajima, T., Hokari, S., Komoda, T., Kawai, K.** (2002). Apolipoprotein A-I concentration in tears in diabetic retinopathy. *Annals of the Clinical Biochemistry*, 39, 56-61.
- Khalil, H. A., De Keizer, R. J., Bodelier, V. M., Kijlstra, A.** (1989). Secretory IgA and lysozyme in tears of patients with Graves ophthalmopathy. *Documenta Ophthalmologica*, 72, 329-34.
- Khankan, R., Oliver, N., He, S., Ryan, S.J., Hinton, D.R.** (2011). Regulation of fibronectin-EDA through CTGF domain-specific interactions with TGF {beta} 2 and its receptor TGF {beta} RII. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 5068–5078.
- King, A., Azuara-Blanco, A., Tuulonen, A.** (2013). Glaucoma. *British Medical Journal*, 346, f3518.
- Klaassen, I., van Geest, R. J., Kuiper, E. J., van Noorden, C. J. F., Schlingemann, R. O.** (2015). The role of CTGF in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*, 133, 37–48.
- Koliakos, G. G., Konstas, A. G. P., Schlotzer-Schrehardt, U., Bufidis, T., Georgiadis, N., Ringvold, A.** (2002). Ascorbic acid concentration is reduced in the aqueous humor of patients with exfoliation syndrome. *American Journal of Ophthalmology*, 134, 879–883.
- Koliakos, G. G., Schlotzer-Schrehardt, U., Konstas, A.G., Bufidis, T., Georgiadis, N., Dimitriadou, A.** (2001). Transforming and insulin-like growth factors in the aqueous humour of patients with exfoliation syndrome. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 239(7), 482-487.
- Koo, B. S., Lee, D. Y., Ha, H. S., Kim, J. C., Kim, C. W.** (2005). Comparative analysis of the tear protein expression in blepharitis patients using two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteome Research*, 4(3), 719–24.
- Kothapalli, D., Grotendorst, G. R.** (2000). CTGF modulates cell cycle progression in cAMP-arrested NRK fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 182(1), 119-26.
- Kovalenko, E., Tacke, F., Gressner, O. A., Zimmermann, H. W., Lahme, B., Janetzko, A, et al.** (2009). Validation of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) and its gene polymorphisms as noninvasive biomarkers for the assessment of liver fibrosis. *Journal of Viral Hepatitis*, 16(9), 612-20.
- Kozart, D. M., Yanoff, M.** (1982). Intraocular pressure status in 100 consecutive patients with exfoliation syndrome. *Ophthalmology*, 89, 214-218.

- Kramann, C., Boehm, N., Lorenz, K., Wehrwein, N., Stoffelns, B. M., Pfeiffer, N., Grus, F. H.** (2011). Effect of contact lenses on the protein composition in tear film: a ProteinChip study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 249(2), 233-43.
- Kuchle, M., Amberg, A., Martus, P., Nguyen, N., Naumann, G.** (1997). Pseudoexfoliation syndrome and secondary cataract. *British Journal of Ophthalmology*, 81(10), 862–866.
- Lahiri, D. K., Schnabel, B.** (1993). DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochemical genetics*, 31(7-8), 321-328.
- Lebrecht, A., Boehm, D., Schmidt, M., Koelbl, H., Schwirz, R. L., Grus, F. H.** (2009). Diagnosis of breast cancer by tear proteomic pattern. *Cancer Genomics and Proteomics*, 6, 177-82.
- Lema, I., Brea, D., Rodriguez-Gonzalez, R., Diez-Feijoo, E., Sobrino, T.** (2010). Proteomic analysis of the tear film in patients with keratoconus. *Molecular Vision*, 16, 2055–61.
- Li, K., Liu, X., Chen, Z., Huang, Q., Wu, K.** (2010b). Quantification of tear proteins and sPLA2IIa alteration in patients with allergic conjunctivitis. *Molecular Vision*, 16, 2084-91.
- Li, K., Chen, Z., Duan, F., Liang, J., Wu, K.** (2010a). Quantification of tear proteins by SDS-PAGE with an internal standard protein: a new method with special reference to small volume tears. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 248(6), 853-62.
- Li, S., Sack, R., Vijmasi, T., Sathe, S., Beaton, A., Quigley, D., Gallup, M., McNamara, N. A.** (2008). Antibody protein array analysis of the tear film cytokines. *Optometry and Vision Science*, 85(8), 653-60.
- Linner, E., Popovic, V., Gottfries, C. G., Jonsson, M., Sjogren, M., Wallin, A.** (2001). The exfoliation syndrome in cognitive impairment of cerebrovascular or Alzheimer's type. *Acta Ophthalmol. Scand.*, 79(3), 283-285.
- Louthrenoo, W., Kasitanon, N., Wichainun, R., Wangkaew, S., Sukitawut, W., Ohnogi, Y., Takeuchi, F.** (2011). Lack of CTGF -945C/G Dimorphism in Thai Patients with Systemic Sclerosis. *The Open Rheumatology Journal*, 5, 59–63.
- Madden, J. G., Crowley, M. J.** (1982). Factors in the exfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol*, 66, 432-437.
- McKown, R. L., Wang, N., Raab, R. W., Karnati, R., Zhang, Y., Williams, P. B., Laurie, G. W.** (2009). Lacritin and other new proteins of the lacrimal functional unit. *Exp Eye Res*, 88, 848-58.
- Mercurio, S., Latinkic, B., Itasaki, N., Krumlauf, R., Smith, J. C.** (2004). Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex. *Development (Cambridge, England)*, 131, 2137–2147.
- Mitchell, P., Wang, J. J., Hourihan, F.** (1999). The relationship between glaucoma and pseudoexfoliation: the Blue Mountains Eye Study. *Archives of Ophthalmology*, 117, 1319-24.
- Mitchell, P., Wang, J.J., Smith, W.** (1997). Association of pseudoexfoliation syndrome with increased vascular risk. *Am. J. Ophthalmol.*, 124(5), 685-687.

- Miyoshi, K., Ikebuchi, Y., Ishida, C., Okamoto, K., Murawaki, Y.** (2014). Association between gene polymorphisms of connective tissue growth factor and the progression of chronic liver disease associated with hepatitis C. *Intern Med.*, 53, 1461–1468.
- Moreno-Montanis, J., Alcolea-Paredes, A., Campos-Garcia, S.** (1989). Prevalence of pseudoexfoliation syndrome in the northwest of Spain. *Acta Ophthalmol*, 67, 383-385.
- Moreno-Montanis, J., Alvarez, A., Alcolea-Paredes, A., ve diğ.** (1990). Clinical factors related to the tension increase in the pseudoexfoliation syndrome. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 59, 421-427.
- Naumann, G. O., Schlötzer-Schrehardt, U., Kühle, M.** (1998). Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. Intraocular and systemic manifestations. *Ophthalmology*, 105(6), 951-68.
- Nomura, K., Takamura, E.** (1998). Tear IgE concentrations in allergic conjunctivitis. *Eye (London, England)*, 12, 296-8.
- Oemar, B. S., Lüscher, T. F.** (1997). Connective Tissue Growth Factor: Friend or Foe?. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17, 483-1489.
- Ohashi, Y., Dogru, M., Tsubota, K.** (2006). Laboratory findings in tear fluid analysis. *Clinica Chimica Acta*, 369(1), 17–28.
- Okrojek, R., Grus, F. H., Matheis, N., Kahaly, G. J.** 2009. Proteomics in autoimmune thyroid eye disease, *Hormone and Metabolic Research*, 41(6), 465–70.
- Ozaki, M., Lee, K. Y., Vithana, E. N., et al.** (2008). Association of LOXL1 gene polymorphisms with pseudoexfoliation in the Japanese. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 49(9), 3976-3980.
- Örgen, L.** (1949). Kapsüler eksfoliasyon. *Oto Nöro Oftalmoloji*, 4, 1.
- Pannebaker, C., Chandler, H. L., Nichols, J. J.** (2010). Tear proteomics in keratoconus. *Molecular Vision*, 16, 1949–57.
- Park, K. S., Kim, S. S., Kim, J. C., Kim, H. C., Im, Y. S., Ahn, C. W., Lee, H. K.** (2008). Serum and tear levels of nerve growth factor in diabetic retinopathy patients. *American Journal of Ophthalmology*, 145, 432-7.
- Pasutto, F., Krumbiegel, M., Mardin, C.Y., et al.** (2008). Association of LOXL1 common sequence variants in German and Italian patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 49(4), 1459-1463.
- Paulett, C., Chandler, H., Nichols, K.** (2008). Tear protein extraction from Schirmer Strips. *American Academy of Optometry*, 80022.
- Posa, A., Bräuer, L., Schicht, M., Garreis, F., Beileke, S., Paulsen, F.** (2013). Schirmer strip vs. capillary tube method: noninvasive methods of obtaining proteins from tear fluid. *Annals of Anatomy*, 195(2), 137-42.
- Praveen, M. R., Shah, S. K., Vasavada, A. R., et al.** (2011). Pseudoexfoliation as a risk factor for peripheral vascular disease: a case-control study. *Eye (Lond)*, 25(2), 174-179.
- Quah, J. H., Tong, L., Barbier, S.** (2014). Patient acceptability of tear collection in the primary healthcare setting. *Optometry and Visual Science*, 91(4), 452-8.

- Ramprasad, V. L., George, R., Soumitra, N., Sharmila, F., Vijaya, L., Kumaramanickavel, G.** (2008). Association of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the LOXL1 gene with pseudoexfoliation syndrome in India. *Mol. Vis.*, *14*, 318-322.
- Remington, S. G., Crow, J. M., Nelson, J. D.** (2009). Antibodies to endogenous tear protein in normal human tears. *Current Eye Research*, *34*(10), 819-23.
- Repo, L. P., Suhonen, M. T., Terasvirta, M. E., Koivisto, K. J.** (1995). Color Doppler imaging of the ophthalmic artery blood flow spectra of patients who have had a transient ischemic attack. Correlations with generalized iris translucence and pseudoexfoliation syndrome. *Ophthalmology*, *102*(8), 1199-1205.
- Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G. P., Mariotti, S. P.** (2004). Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*, *82*(11), 844–851.
- Richardson, T. M., Epstein, D. L.** (1981). Exfoliation glaucoma: a quantitative perfusion and ultrastructural study. *Ophthalmology*, *88*(9), 968–980.
- Ringvold, A.** (1999). Epidemiology of the pseudo-exfoliation syndrome. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, *77*, 371–375.
- Ritch, R.** (2008). The management of exfoliative glaucoma. *Prog. Brain Res.*, *173*, 211-224.
- Ritch, R., Schlotzer-Schrehardt, U.** (2001). Exfoliation syndrome. *Survey of Ophthalmology*, *45*(4), 265-315.
- Ritland, J. S., Egge, K., Lydersen, S., Juul, R., Semb, S. O.** (2004). Exfoliative glaucoma and primary open-angle glaucoma: associations with death causes and comorbidity. *Acta Ophthalmol. Scand.*, *82*(4), 401-404.
- Rueda, B., Simeon, C., Hesselstrand, R., Herrick, A., Worthington, J., Ortego-Centeno, N., Riemekasten, G., Fonollosa, V., Vonk, M. C., van den Hoogen, F. H., et al.** (2009). A large multicentre analysis of CTGF - 945 promoter polymorphism does not confirm association with systemic sclerosis susceptibility or phenotype. *Ann Rheum Dis.*, *68*, 1618–1620.
- Salvisberg, C., Tajouri, N., Hainard, A., Burkhard, P. R., Lalive, P. H., Turck, N.** (2014). Exploring the human tear fluid: discovery of new biomarkers in multiple sclerosis. *Proteomics: Clinical Applications*, *8*(3-4), 185-94.
- Samarai, V., Samarei, R., Haghghi, N., Jalili, E.** (2012). Sensory-neural hearing loss in pseudoexfoliation syndrome. *International Journal of Ophthalmology*, *5*(3), 393-396.
- Schlotzer-Schrehardt, U.** (2009). Molecular pathology of pseudoexfoliation syndrome/glaucoma—new insights from LOXL1 gene associations. *Exp. Eye Res.*, *88*, 776-785.
- Schlotzer-Schrehardt, U.** (2012). Pseudoexfoliation syndrome: the puzzle continues. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, *7*, 187-189.
- Schlotzer-Schrehardt, U., Koca, M., Naumann, G. O., Volkholz, H.** (1992). Pseudoexfoliation syndrome: ocular manifestation of a systemic disorder. *Archives of Ophthalmology*, *110*, 1752–6.

- Schlotzer-Schrehardt, U., Kuchle, M., Naumann, G. O.** (1991). Electron-microscopic identification of pseudoexfoliation material in extrabulbar tissue. *Archives of Ophthalmology*, 109(4), 565–570.
- Schlotzer-Schrehardt, U., Kuchle, M., Jünemann, A., Naumann, G. O.** (2002). Relevance of the pseudoexfoliation syndrome for the glaucomas. *Ophthalmologie*, 99, 683-90.
- Schlotzer-Schrehardt, U., Naumann, G. O.** (2006). Ocular and systemic pseudoexfoliation syndrome. *American Journal of Ophthalmology*, 141, 921-937.
- Schlotzer-Schrehardt, U., Von Der Mark, K., Sakai, L. Y., Naumann, G. O.** (1997). Increased extracellular deposition of fibrillin-containing fibrils in pseudoexfoliation syndrome, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 8(5), 970-84.
- Schumacher, S., Schlotzer-Schrehardt, U., Martus, P., Lang, W., Naumann, G. O.** (2001). Pseudoexfoliation syndrome and aneurysms of the abdominal aorta. *Lancet* 357, 9253, 359-360.
- Segarini, P. R., et al.** (2001). The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. *The Journal of biological chemistry*, 276, 40659–40667.
- Shi-Wen, X., Pennington, D., Holmes, A., Leask, A., Bradham, D., Beauchamp, J. R., Fonseca, C., du Bois, R. M., Martin, G. R., Black, C. M., Abraham, D. J.** (2000). Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. *Exp Cell Res*, 259, 213-224.
- Shoji, J., Kitazawa, M., Inada, N., Sawa, M., Ono, T., Kawamura, M., Kato, H.** (2003). Efficacy of tear eosinophil cationic protein level measurement using filter paper for diagnosing allergic conjunctival disorders. *Japanese journal of ophthalmology*, 47(1), 64-68.
- Stolwijk, T. R., Kuizenga, A., Van Haeringen, N. J., Kijlstra, A., Oosterhuis, J. A., Van Best, J. A.** (1994). Analysis of tear fluid proteins in insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Ophthalmology (Copenhagen)*, 72, 357-62.
- Streeten, B. W., Gibson, S. A., Dark, A. J.** (1986). Pseudoexfoliative material contains an elastic microfibrillar-associated glycoprotein. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 84, 304–320.
- Streeten, B. W., Li, Z. Y., Wallace, R. N., Eagle, R. C., Keshgegian, A. A.** (1992). Pseudoexfoliative fibrilopathy in visceral organs of a patient with pseudoexfoliation syndrome. *Arch Ophthalmology*, 110, 1757–1762.
- Stuchell, R. N., Feldman, J. J., Farris, R. L., Mandel, I. D.** (1984). The effect of collection technique on tear composition. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 25, 374-7.
- Suh, W., Won, H., Kee, C.** (2015). The association of single nucleotide polymorphisms in the connective tissue growth factor gene with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *Acta Ophthalmologica*, 93, e682–e683.
- Sziklai, P., Suiveges, I.** (1988). Glaucoma capsulare in patients with open-angle glaucoma in Hungary. *Acta Ophthalmol, (Suppl)* 66, 90-92.

- Takehara, K.** (2000). Growth regulation of skin fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, 24, S70-S77.
- Tarkkanen, A.** (1962). Pseudoexfoliation of the lens capsule. *Acta Ophthalmol*, (Suppl) 71, 1-98.
- The Eye Diseases Prevalence Research Group.** (2004). Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Archives of Ophthalmology*, 122, 477-485.
- Thorleifsson, G., Magnusson, K.P., Sulem, P., et al.** (2007). Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science*, 317(5843), 1397-1400.
- Tomosugi, N., Kitagawa, K., Takahashi, N., Sugai, S., Ishikawa, I.** (2005). Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjögren's syndrome. *Journal of Proteome Research*, 4(3), 820-5.
- Tong, L., Zhou, L., Beuerman, R. W., Zhao, S. Z., Li, X. R.** (2011). Association of tear proteins with Meibomian gland disease and dry eye symptoms. *British Journal of Ophthalmology*, 95(6), 848-52.
- Tuncay, F. Y., Aktas, Z., Ergun, M. A., Ergun, S. G., Hasanreisoglu, M., Hasanreisoglu, B.** (2016). Association of polymorphisms in APOE and LOXL1 with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma in a Turkish population. *Ophthalmic Genet.*, 1-3.
- Van Der Meid, K. R., Su, S. P., Krenzer, K. L., Ward, K. W., Zhang, J. Z.** (2011). A method to extract cytokines and matrix metalloproteinases from Schirmer strips and analyze using Luminex. *Molecular Vision*, 17, 1056-63.
- Van Setten, G. B.** (1990). Epidermal growth factor in human tear fluid: increased release but decreased concentrations during reflex tearing. *Current Eye Research*, 9(1), 79-83.
- Van Setten, G. B., Blalock, T. D., Grotendorst, G., Schultz, G. S.** (2002). Detection of connective tissue growth factor in human aqueous humor. *Ophthalmic Res*, 34, 306-308.
- Van Setten, G. B., Blalock, T. D., Grotendorst, G., Schultz, G. S.** (2003). Detection of connective tissue growth factor (CTGF) in human tear fluid: preliminary results. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 81, 51-53.
- Versura, P., Nanni, P., Bavelloni, A., Blalock, W. L., Piazzini, M., Roda, A., Campos, E. C.** (2010). Tear proteomics in evaporative dry eye disease. *Eye (Lond.)*, 24(8), 1396-1402.
- Wang, W., He, M., Zhou, M., Zhang, X.** (2014). Ocular pseudoexfoliation syndrome and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 9(3), e92767.
- Weston, B. S., Wahab, N. A., Mason, R. M.** (2003). CTGF mediates TGF-beta-induced fibronectin matrix deposition by upregulating active alpha5beta1 integrin in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.*, 14(3), 601-10.
- Williams, S. E., Whigham, B. T., Liu, Y., et al.** (2010). Major LOXL1 risk allele is reversed in exfoliation glaucoma in a black South African population. *Mol. Vis.*, 16, 705-712.
- Wirostko, B. M., Curtin, K., Ritch, R., et al.** (2016). Risk for exfoliation syndrome in women with pelvic organ prolapse : a Utah project on exfoliation syndrome (UPEXS) study. *JAMA Ophthalmol.*, 134(11), 1255-1262.

- Wong, T. T., Zhou, L., Li, J., Tong, L., Zhao, S. Z., Li, X. R., Yu, S. J., Koh, S. K., Beuerman, R. W.** (2011). Proteomic profiling of inflammatory signaling molecules in the tears of patients on chronic glaucoma medication. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(10), 7385-91.
- Yalaz, M., Othman, I., Nas, K., Eroglu, A., Homurlu, D., Çıkıntaş, Z., Ashouri, A.** (1992). The frequency of pseudoexfoliation syndrome in the eastern Mediterranean area of Turkey. *Acta Ophthalmology (Copenhagen)*, 70, 209-213.
- Yalvaç, I., Önal, M.** (2001). *Temel Göz Hastalıkları*, 259-285. Glokom (1. Baskı). Editörler: Aydın, P., Akova, Y. A. Ankara: Güneş Kitabevi.
- Yang, M., Huang, H., Li, J., Li, D., Wang, H.** (2004). Tyrosine phosphorylation of the LDL receptor-related protein (LRP) and activation of the ERK pathway are required for connective tissue growth factor to potentiate myofibroblast differentiation. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18, 1920–1921.
- Yang, X., Zabriskie, N. A., Hau, V. S., et al.** (2008). Genetic association of LOXL1 gene variants and exfoliation glaucoma in a Utah cohort. *Cell Cycle*, 7(4), 521-524.
- Yazdani, S., Tousi, A., Pakravan, M., Faghihi, A. R.** (2008). Sensorineural hearing loss in pseudoexfoliation syndrome. *Ophthalmology*, 115(3), 425-429.
- Yilmaz, S. G., Palamar, M., Onay, H., et al.** (2016). LOXL1 gene analysis in Turkish patients with exfoliation glaucoma. *Int. Ophthalmol.*, 36(5), 629-635.
- Yoon, J. S., Choi, S. H., Lee, J. H., Lee, S. J., Lee, S. Y.** (2010). Ocular surface inflammation, and nerve growth factor level in tears in active thyroid associated ophthalmopathy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 248, 271-6.
- Yuksel, N., Anik, Y., Altintas, O., Onur, I., Caglar, Y., Demirci, A.** (2006). Magnetic resonance imaging of the brain in patients with pseudoexfoliation syndrome and glaucoma. *Ophthalmologica*, 220(2), 125-130.
- Zenkel, M., Kruse, F. E., Jünemann, A. G., Naumann, G. O. H., Schlötzer-Schrehardt, U.** (2006). Clusterin Deficiency in Eyes with Pseudoexfoliation Syndrome May Be Implicated in the Aggregation and Deposition of Pseudoexfoliative Material. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47(5):1982-1990
- Zhou, L., Beuerman, R. W., Chan, C. M., Zhao, S. Z., Li, X. R., Yang, H., Tong, L., Liu, S., Stern, M. E., Tan, D.** (2009). Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research*, 8(11), 4889–905.
- Zhou, L., Beuerman, R. W., Foo, Y., Liu, S., Ang, L. P., Tan, D. T.** (2006). Characterisation of human tear proteins using high-resolution mass spectrometry. *Annals Academy of Medicine Singapore*, 35(6), 400–7.
- Zhou, L., Beuerman, R. W.** (2012). Tear analysis in ocular surface diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31(6), 527-50.
- Zhou, L., Zhao, S. Z., Koh, S. K., Chen, L., Vaz, C., Tanavde, V., Li, X. R., Beuerman, R. W.** (2012). In-depth analysis of the human tear proteome. *Journal of Proteomics*, 75(13), 3877-85.

- Url-1:** <http://www.ortadoguhastaneleri.com.tr/saglik-kosesi/glokom-goz-tansiyonu-hastaligi/25> alındığı tarih: 06.12.2017
- Url-2:** <http://digitalhealthage.com/contact-lens-developed-to-track-pressure-changes-can-help-treat-glaucoma/> alındığı tarih: 05.12.2017
- Url-3:** <http://www.uniprot.org/uniprot/P29279> alındığı tarih: 24.12.2017
- Url-4:**
https://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&provider=MODBASE&template=1vexA&pmpuid=1001086419239&range_from=1&range_to=349&ref_ac=P29279&mapped_ac=P29279&zid=async alındığı tarih: 25.12.2017
- Url-5:** <https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/6#ideogram>'dan alındığı tarih: 24.12.2017
- Url-6:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/1431> alındığı tarih: 25.12.2017
- Url-7:** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?Term=ortholog_gene_1490%5bgroup alındığı tarih: 25.12.2017
- Url-8:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> alındığı tarih: 4.02.2016
- Url-9:** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6918698#fasta alındığı tarih: 05.10.2016
- Url-10:** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=9399005#fasta alındığı tarih: 05.10.2016



EKLER

EK 1 - Etik Kurul Onay Belgesi

EK 2 - Tüm Çalışma Grubunun Demografik Bilgileri

EK 3 - PEG hastaları, PES hastaları ve kontrollerin gözyaşı ve aközlerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyon tabloları



EK 1. Etik kurul onayı

HİZMETE ÖZEL

HİZMETE ÖZEL

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
ANKARA

KLN.ARŞ.ETK.KRL.: 50687469-1491- 44 -15/SEK.1677

KONU : GATA (KAEK 2015-07) Doç.Dr. Birsen
CAN DEMİRDÖĞEN'e Ait Kurul Raporu

İVEDİ
26 Ocak 2015

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİNE
ANKARA

İLGİ: GATA Y 66-2 (A) Gülhane Askeri Tıp Akademisi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Yönergesi.

İlgili Yönerge gereğince değerlendirilmek üzere GATA Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunulan Doç.Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN'e ait GATA KA EK-2015-07 kayıt numaralı ve "Psödoeksfollasyon Sendromu ve Psödoeksfollasyon Glukomu'nda Clusterin'in ve Bağ Dokusu Büyüme Faktörü'nün (CTGF) Rolünün Araştırılması" Klinik araştırması isimli Tek Merkezli başlıklı araştırma projesi ile ilgili, GATA Klinik Araştırmalar Etik Kurulu karar EK-A'dadır.

Rica ederim.



Mustafa GEREK
Profesör Hava Tabip Tuğgeneral
GATA Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

EK1
EK-A (2 Adet Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Karar Formu)

HİZMETE ÖZEL
Bağlanış Noktası Sı.Me.G.ÜNAL (TEL:2293)

HİZMETE ÖZEL

**GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

EK-A

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Psödoeksfoliasyon Sendromu ve Psödoeksfoliasyon Glokomu'nda Clusterin'in ve Bağ Dokusu Büyütme Faktörü'nün (CTGF) Rolünün Araştırılması
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	BMM-2014/003

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 06010 Keçiören / ANKARA
	TELEFON	0312 304 2293
	FAKS	0312 304 6370
	E-POSTA	etik@etik.gata.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr. Biseri CAN DEMİRDÖĞEN				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Biyomedikal Mikrodüğü				
	YARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-				
	DESTEKLEYİCİ	-				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		FAZ 2:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		FAZ 3:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		FAZ 4:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gözetimsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Klinik ilaç araştırması		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Klinik araştırması		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Diger ise belirtiniz:						
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>		

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	DİL		
				Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	12.01.2015	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	12.01.2015	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	DELGI RAPOR FORMU	12.01.2015	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	-	-	Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>



Etik Kurulu Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Tıp. Uzm. Mustafa GEREK
İmza:



Not: Etik kurul başvurusu her sayfada imzalanmış olması gerekmektedir.

**GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

EK-A

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Psödoekfoliyasyon Sendromu ve Psödoekfoliyasyon Glukomu'nda Clusterin'in ve Bağ Dokusu Büyüme Faktörü'nün (CTGF) Rolünün Araştırılması
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	BMM-2014/003

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Durum	Açıklama
	SKRİPTA		<input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		<input type="checkbox"/>	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU		<input type="checkbox"/>	
	ELAN		<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM		<input type="checkbox"/>	
	SONUÇ RAPORU		<input type="checkbox"/>	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		<input type="checkbox"/>	
	DiğER:		<input type="checkbox"/>	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2015/01 (KAEK-2015-07)		Tarih: (İlk değerlendirme tarihi: 21.01.2015)	
	TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Birsen CAN DEMİRDÖĞEN'in sorumlu araştırmacı, asistan Ece BAYRAK'ın yardımcı araştırmacı olduğu; GATA K.İg. Göz Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Tarkan MUMCUOĞLU 'nun koördinatör, Uzm.Dr. Gülhan ÖZGE'nin yardımcı araştırmacı olduğu "Psödoekfoliyasyon Sendromu ve Psödoekfoliyasyon Glukomu'nda Clusterin'in ve Bağ Dokusu Büyüme Faktörü'nün (CTGF) Rolünün Araştırılması" isimli Çok Merkezli Çalışma, 21 Ocak 2015 tarihinde gerçekleştirilen KAEK toplantısında proje öneri dosyası, bu dosyaya ait etik belge ve dokümanlar; araştırmacı/çalışmanın gereği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incedirilmiş olup, araştırmanın/çalışmanın gerçekleştirilmesinde tıbbi etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına karar verilmiştir. 25 Haziran 2014 ve 29041 sayılı Resmî Gazete'de yayımlananak yürürlüğe giren "İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik" kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Başkan Prof.Hv. Tıp.Tuğg. Mustafa GEREK						
Unvanı/Adı/Soyadı	Ünvanlık Alanı	Kurumu	Görev	Araştırma ile İlgili	Karar*	İmza		
Prof.Hv. Tıp.Tuğg. Mustafa GEREK	KBB AD	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof. Tıp.Kd. Alb. Fatih Mehmet MUTLU	Göz Hastalıkları AD.	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof. Tıp.Kd. Alb. Savaş DEMİRBİRAŞ	Genel Cerrahi AD.	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof. Tıp.Kd. Alb. Melik Cemal YEMEN	Kader Hist. Ve Doğan AD.	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof.Dr. Ecz.Kd. Alb. Yalçın ÖZKAN	Ecz.Bil.Mrk.	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof. Tıp.Kd. Alb. Nuri ARSLAN	Nöroloji Tıp AD.	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof.Hv. Tıp.Kd. Alb. Cevdet YILDIZ	Ortopedi ve Travmatoloji AD.	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Yrd.Doç. Tıp.Kd. Alb. Ergün KURT	Tıp Tarihi ve Deontoloji AD.	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof. Tıp.Kd. Alb. Selim KILIÇ	İlaç Sağlığı AD.	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Doç. Hv. Tıp.Kd. Alb. Melik SEYREK	Tıbbi Farmakoloji AD.	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Dr. Öğ. Yh. Osman ANKET	SAMYO (Sağ Mensubu Olmayan Üye)	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof.Dr. Osman ERDOĞUL	TOBB Etn. Üniversitesi Biyomedikal	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof.Dr. Şeref KÖMÜRCÜ	Memorial Ankara Hastanesi	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof.Dr. Mahmut KÖMÜRCÜ	Mıyancıbaşı Kadın Hast. Mh.1425 Cd.1450 Sk. Ulusoy Plaza No:5/59-1B Çankaya/Ankara	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>			İZİNLI
Öğ. Gör. Sağ. Kd. Bevç. Semra VARDOL	SAMYO (Hukukçu)	GATA K.İg.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			

* : Toplantıda Bulunma

ETİK KURU BAŞKANINI:
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Hv. Tıp. Tuğg. Mustafa GEREK
İmza: 

Not: Etik Kurulu başkanının her sayfa için ayrı ayrı imzasının olması gerekmektedir.

EK 2. Tüm Çalışma Grubunun Demografik Bilgileri

Tablo EK 2 : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
1	KONTROL	77	E	N	N	N	N	N
2	PES	68	E	N	N	N	N	N
4	PEG	75	E	N	N	N	N	N
8	PES	89	K	N	N	N	N	N
9	PES	76	K	N	N	N	N	N
10	PES	92	E	N	N	P	N	N
11	PEG	79	E	N	N	N	N	N
12	PES	77	E	N	N	P	N	N
13	PEG	70	K	N	N	P	N	N
14	KONTROL	71	K	N	N	N	N	N
15	KONTROL	68	K	N	N	N	N	N
16	PEG	85	K	P	N	N	N	N
17	KONTROL	69	K	N	N	P	N	N
18	KONTROL	79	E	N	N	N	N	N
19	PES	80	E	N	N	N	N	N
20	PES	82	K	P	N	N	N	N
21	PES	66	E	N	N	P	N	N
22	PES	74	K	P	P	P	N	N
24	PES	76	E	N	P	N	N	N
25	PES	79	K	P	N	P	N	N
26	PES	68	E	P	N	N	P	N
27	PES	81	K	N	N	N	N	N
28	PEG	84	E	N	N	N	N	N
29	PES	75	K	N	N	P	N	N
30	KONTROL	70	E	P	P	P	N	N
31	PES	70	K	N	N	P	N	N
32	PES	76	E	N	N	N	P	N
33	PEG	73	K	N	N	P	N	N
34	KONTROL	71	K	P	N	P	N	N
35	KONTROL	83	E	N	N	N	P	N
36	PES	70	E	N	N	N	N	N
37	PES	83	E	N	N	N	P	N
38	PES	72	K	P	N	N	N	N
39	PES	77	E	N	N	N	P	N
40	PES	81	K	N	N	P	N	N
41	PEG	83	E	P	N	P	P	N
42	PEG	83	E	N	N	N	P	N
43	KONTROL	65	E	N	N	N	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
44	KONTROL	68	K	N	N	P	P	N
45	KONTROL	70	E	N	N	N	N	N
46	KONTROL	73	K	P	N	P	N	N
47	PES	83	K	N	P	P	N	N
48	KONTROL	79	K	P	N	P	N	N
49	PEG	79	E	P	P	P	N	N
50	PES	76	K	N	N	P	N	N
51	PEG	67	E	P	N	P	P	N
52	PEG	71	K	P	P	N	P	N
53	PES	86	E	N	P	P	P	N
54	PES	86	E	N	N	N	N	N
55	PEG	68	K	N	N	N	N	N
56	KONTROL	86	E	N	N	P	N	N
57	PES	73	K	N	N	P	N	N
58	KONTROL	81	E	N	N	N	P	N
59	KONTROL	74	E	N	N	P	P	N
60	PEG	77	E	N	N	N	N	N
61	PES	77	E	N	N	N	N	N
62	KONTROL	80	E	N	P	P	N	N
63	PES	77	K	N	N	N	N	N
64	KONTROL	78	E	N	N	P	N	N
66	KONTROL	71	K	N	N	P	N	N
67	PEG	82	E	P	N	P	N	N
68	PES	75	K	N	P	N	N	N
69	PES	74	E	P	N	N	N	N
70	KONTROL	68	K	N	N	P	N	N
73	KONTROL	81	K	P	N	P	N	N
76	PES	92	E	N	N	N	N	N
77	PES	90	E	N	N	N	P	N
78	PEG	66	K	N	N	N	N	N
80	KONTROL	83	K	N	N	P	N	N
81	PEG	71	E	N	N	N	N	N
86	PEG	81	E	P	P	N	P	N
88	PEG	85	E	N	N	N	N	N
89	KONTROL	69	E	N	P	P	P	N
90	PEG	78	K	N	N	N	N	N
92	PEG	79	E	N	N	N	P	N
95	PEG	69	K	N	N	N	P	N
96	PES	79	K	N	N	P	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
97	PEG	79	E	N	N	P	P	N
98	PEG	78	E	N	N	N	P	N
99	PES	88	E	N	N	P	N	N
100	PES	71	K	N	N	N	N	N
101	PEG	73	E	N	N	N	P	N
102	PEG	83	E	N	N	P	N	N
103	PES	82	E	N	N	N	N	N
104	PES	64	K	N	N	P	P	N
105	PEG	73	K	N	N	P	N	N
106	PEG	75	E	N	N	N	N	N
107	PES	78	K	N	P	P	N	N
108	KONTROL	76	K	P	N	N	N	N
109	KONTROL	73	E	N	N	N	N	N
110	PES	76	E	N	N	N	P	N
112	PES	79	E	N	N	N	N	N
113	KONTROL	73	E	N	N	N	N	N
114	PEG	79	E	N	N	N	N	N
115	PES	70	K	N	N	P	N	N
116	PES	86	K	N	P	P	N	N
117	KONTROL	69	E	N	N	P	N	N
118	KONTROL	84	E	N	N	P	P	N
119	KONTROL	68	E	N	N	N	N	N
120	PEG	85	K	N	N	P	N	N
121	KONTROL	80	K	P	N	P	N	N
122	PEG	84	E	P	N	N	N	N
123	PEG	84	E	N	N	P	N	N
124	KONTROL	67	E	N	N	P	N	N
125	KONTROL	76	K	P	N	N	N	P
127	KONTROL	76	E	N	P	P	P	N
129	KONTROL	67	E	N	N	P	N	N
130	KONTROL	91	E	N	P	P	N	N
131	KONTROL	80	K	P	N	N	N	N
132	KONTROL	76	K	N	N	P	N	N
133	KONTROL	78	E	P	N	P	N	N
134	PEG	73	E	N	N	N	N	N
136	KONTROL	82	E	N	P	N	N	N
137	PEG	82	E	N	P	P	N	N
138	KONTROL	83	K	N	N	P	N	N
139	KONTROL	77	K	N	N	N	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
140	KONTROL	69	E	N	N	N	P	N
141	PEG	76	K	P	N	P	N	N
142	KONTROL	72	K	N	N	P	N	N
143	PES	88	E	P	N	P	P	N
144	KONTROL	73	E	N	P	P	N	N
145	PEG	77	E	P	P	P	N	N
147	PES	63	K	N	P	P	N	N
148	PEG	73	E	N	P	P	N	N
149	PEG	66	K	N	N	P	N	N
150	KONTROL	85	K	P	N	P	N	N
153	PEG	66	E	N	N	P	P	N
154	KONTROL	79	E	P	P	N	N	N
155	PES	82	E	P	P	N	N	N
156	PEG	70	K	N	N	N	N	N
157	PEG	76	K	N	N	P	N	N
158	PEG	73	K	P	N	P	N	N
159	KONTROL	66	K	N	N	N	N	N
160	KONTROL	79	E	N	N	N	P	N
161	PEG	70	K	N	N	N	N	N
162	KONTROL	80	E	N	N	N	N	N
163	PEG	85	E	N	N	P	N	N
164	PEG	83	K	N	N	P	N	N
165	PEG	89	K	N	N	N	N	N
166	KONTROL	71	K	N	N	P	N	N
167	PEG	71	E	N	P	P	N	N
168	KONTROL	90	K	P	P	P	N	N
169	PEG	76	K	N	P	P	N	N
170	PEG	78	K	N	N	N	N	N
171	PEG	74	E	N	N	P	P	N
172	PEG	72	E	N	P	N	P	N
173	PEG	75	K	N	N	N	N	N
174	PEG	67	K	N	N	N	P	N
175	KONTROL	66	K	N	N	N	N	N
176	PEG	69	K	N	N	N	N	N
177	PEG	82	K	N	N	P	N	N
178	PES	73	E	N	N	N	P	N
179	PEG	84	E	N	N	N	N	N
180	PEG	76	E	P	N	N	N	N
181	KONTROL	74	K	N	P	N	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
183	PEG	79	K	N	N	P	N	N
184	KONTROL	71	K	N	N	P	N	N
185	PEG	80	E	N	P	P	N	N
187	PEG	77	K	N	N	P	N	N
188	PEG	81	K	N	N	P	N	N
189	PEG	73	E	P	P	P	N	N
190	PEG	82	K	N	P	N	N	N
191	PEG	78	K	N	N	P	P	N
192	KONTROL	66	K	P	N	P	N	N
194	PEG	79	E	N	N	P	N	N
195	PES	79	K	N	N	P	N	N
196	PEG	78	K	N	N	N	N	N
197	PEG	66	K	N	N	N	N	N
198	PEG	76	E	N	N	N	N	N
199	PES	63	E	N	N	N	N	N
200	PEG	87	K	P	N	N	N	N
201	PEG	84	K	N	P	P	N	N
202	PES	83	K	N	N	P	N	N
203	PES	88	E	P	N	P	N	N
204	PEG	85	E	N	N	P	P	N
205	PEG	65	K	N	N	P	N	N
206	PEG	70	K	N	N	P	N	N
207	PEG	67	K	N	N	P	N	N
208	PEG	84	K	N	P	P	N	N
209	PEG	87	E	N	P	P	N	N
210	PEG	71	K	P	N	P	N	N
211	PEG	81	K	N	N	N	N	N
212	PES	75	E	P	N	P	N	N
213	PEG	55	K	N	P	N	N	N
214	PEG	69	E	N	N	P	N	N
215	KONTROL	76	K	N	N	N	N	N
216	PEG	77	E	P	P	P	N	N
217	PES	68	K	N	N	N	N	N
218	PEG	69	E	P	P	N	N	N
219	PES	81	K	N	N	P	N	N
220	PEG	70	K	P	P	N	N	N
221	PEG	84	E	N	N	N	N	N
222	PEG	72	K	P	P	P	N	N
223	PES	64	K	N	N	P	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
224	KONTROL	80	K	P	N	P	N	N
225	PEG	63	K	N	N	P	N	N
226	PEG	79	E	N	P	P	N	N
227	PEG	77	E	P	P	P	N	N
228	PES	78	K	N	N	P	N	N
229	KONTROL	54	K	N	N	P	N	N
230	PES	81	K	N	P	N	N	N
231	PES	86	E	P	N	P	N	N
232	PEG	75	E	P	P	N	N	N
233	PEG	79	E	P	N	N	N	N
234	KONTROL	52	K	P	P	P	N	N
235	KONTROL	78	K	N	P	N	N	N
236	KONTROL	71	K	N	N	P	N	N
237	KONTROL	79	K	P	P	N	N	N
238	PES	66	K	N	N	N	N	N
239	KONTROL	74	K	P	P	P	N	N
240	KONTROL	73	K	N	N	P	N	N
241	PEG	91	E	P	N	P	N	N
242	KONTROL	64	E	N	N	P	N	N
243	PEG	70	E	N	N	P	N	N
244	PES	71	E	N	P	P	N	N
245	PES	84	K	N	P	P	N	N
246	KONTROL	76	K	N	P	P	N	N
247	KONTROL	83	K	N	N	P	N	N
248	PEG	68	E	N	N	P	N	N
249	PES	66	E	N	N	N	N	N
250	KONTROL	85	K	N	P	P	N	N
251	KONTROL	87	K	N	N	P	N	N
252	PEG	64	E	N	N	N	N	N
253	PEG	95	E	P	N	P	N	N
254	PES	81	E	N	P	P	P	N
255	KONTROL	54	E	N	N	N	N	N
256	PES	63	E	P	N	N	N	N
257	KONTROL	82	E	P	N	P	N	N
258	PEG	61	E	N	P	N	P	N
259	KONTROL	78	K	N	N	N	P	N
260	KONTROL	72	E	N	N	P	P	N
262	KONTROL	53	K	N	N	N	N	N
263	KONTROL	71	K	N	N	P	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
264	KONTROL	76	E	P	N	N	N	N
265	PEG	65	E	P	N	N	N	N
266	PES	72	K	N	N	P	N	N
267	PEG	78	E	N	N	N	N	N
268	KONTROL	84	K	N	P	P	N	N
269	PEG	75	E	N	N	P	N	N
270	KONTROL	85	K	N	N	P	N	N
271	PEG	78	K	N	N	N	N	N
273	KONTROL	56	K	N	P	P	N	N
274	KONTROL	83	K	P	P	N	N	N
275	PES	78	E	N	P	P	N	N
276	KONTROL	83	E	P	P	P	N	N
277	PEG	79	E	N	N	N	N	N
278	PEG	84	E	N	P	P	N	N
279	PES	72	E	P	N	P	N	N
280	PEG	82	K	P	N	P	N	N
281	PEG	74	E	N	N	N	N	N
282	PES	86	K	N	N	P	N	N
283	PEG	82	E	N	N	P	N	N
284	KONTROL	67	E	N	P	N	N	N
285	PES	70	K	P	N	P	N	N
286	KONTROL	74	K	P	P	P	N	N
288	PES	81	E	N	N	P	N	N
289	KONTROL	74	K	N	N	P	N	N
290	PEG	74	E	N	N	N	N	N
291	KONTROL	74	K	N	N	N	N	N
292	PEG	93	K	N	N	P	N	N
293	PES	75	E	N	N	P	N	N
294	KONTROL	77	E	N	N	N	N	N
295	KONTROL	78	K	N	N	N	N	N
296	PEG	84	E	N	P	N	N	N
297	KONTROL	83	K	P	P	P	N	N
298	PEG	86	K	N	N	N	N	N
299	KONTROL	81	K	N	P	N	N	N
300	KONTROL	69	E	N	P	N	N	N
301	PEG	79	E	N	P	N	N	N
302	PES	82	K	N	P	P	N	N
303	KONTROL	80	K	N	N	P	N	N
305	KONTROL	82	K	N	P	P	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
306	PEG	71	E	P	N	N	N	N
307	KONTROL	86	K	N	P	P	N	N
308	KONTROL	104	K	N	P	N	N	N
309	KONTROL	81	E	N	P	N	N	N
310	PEG	61	E	N	P	P	N	N
311	KONTROL	69	E	N	N	P	P	N
312	PEG	79	K	N	N	P	N	N
313	PES	76	K	N	P	N	N	N
314	KONTROL	84	K	N	P	N	N	N
315	KONTROL	82	E	N	P	P	P	N
316	PEG	85	K	N	P	P	N	N
317	KONTROL	78	E	N	N	P	P	N
318	PEG	64	E	N	N	P	N	N
319	KONTROL	82	K	N	P	N	N	N
322	PEG	76	E	P	N	P	N	N
324	PES	71	E	N	P	P	N	N
325	KONTROL	73	E	N	N	P	N	N
326	PEG	70	E	P	N	N	N	N
327	PES	85	E	N	P	P	N	N
328	KONTROL	80	E	N	N	N	N	N
330	PES	72	K	N	P	N	N	N
331	PES	73	E	N	P	N	N	N
332	KONTROL	72	K	N	P	P	N	N
333	KONTROL	68	E	N	N	P	N	N
334	KONTROL	70	E	N	N	P	N	N
335	PES	75	K	N	P	P	N	N
336	KONTROL	86	E	P	N	N	N	N
337	KONTROL	71	E	N	N	P	P	N
338	PES	73	K	N	N	P	N	N
339	KONTROL	75	K	N	P	N	N	N
340	KONTROL	62	K	N	P	N	N	N
341	PES	68	K	N	P	P	P	N
342	KONTROL	81	E	P	N	P	N	N
343	PEG	61	K	N	N	N	N	N
344	PEG	70	E	N	P	N	N	N
345	PES	68	E	N	P	N	N	N
346	PES	74	E	N	P	N	N	N
347	KONTROL	70	E	N	P	P	N	N
348	PES	75	K	N	N	P	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
349	PES	87	E	N	N	P	N	N
352	KONTROL	74	K	N	P	N	N	N
353	KONTROL	91	K	N	P	N	N	N
356	KONTROL	79	E	N	N	P	N	N
359	PEG	86	E	P	N	N	N	N
360	PES	66	E	N	P	P	N	N
361	PES	63	K	N	N	P	P	N
362	PEG	79	E	N	N	P	N	N
363	PES	71	E	N	P	N	N	N
364	KONTROL	70	K	N	P	N	N	N
365	PEG	77	E	N	P	P	P	N
367	KONTROL	66	K	N	N	N	N	N
368	PEG	76	K	N	P	P	N	N
369	PES	63	E	N	N	P	N	N
370	KONTROL	74	K	P	N	N	N	N
371	PEG	77	E	N	P	P	N	N
372	KONTROL	66	K	N	N	N	N	N
373	PEG	67	K	N	N	N	N	N
374	PEG	76	E	P	N	N	N	N
375	KONTROL	74	E	N	N	P	N	N
376	PES	70	K	N	N	N	N	N
377	PEG	63	E	N	N	P	N	N
378	PEG	78	E	N	N	P	N	N
379	PEG	68	E	N	N	N	N	N
380	PES	68	K	N	N	N	N	N
381	KONTROL	71	K	N	N	N	N	N
382	PEG	63	E	N	N	N	N	N
384	PES	67	K	N	N	P	N	N
385	PES	83	E	N	N	P	N	N
386	PES	85	E	N	N	N	N	N
387	PEG	73	E	N	N	N	N	N
388	KONTROL	66	K	N	N	P	N	N
389	PEG	57	K	N	N	P	N	N
391	PES	76	E	N	N	N	N	N
392	PES	63	K	N	N	N	N	N
393	KONTROL	70	E	N	N	N	N	N
394	PEG	73	E	P	N	N	N	N
395	PEG	82	E	N	P	P	N	N
396	PEG	78	K	N	N	P	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
397	PES	76	E	N	N	N	N	N
399	KONTROL	66	E	N	N	N	N	N
400	PES	78	E	N	N	N	N	N
401	KONTROL	68	K	P	N	N	N	N
402	KONTROL	70	K	N	P	P	N	N
403	PES	77	E	N	N	P	N	N
404	PES	68	K	N	N	P	N	N
405	PES	66	K	N	N	P	N	N
406	KONTROL	71	K	N	N	N	N	N
407	PEG	63	K	N	N	N	N	N
408	PEG	71	K	N	N	N	N	N
409	PEG	61	E	N	N	N	N	N
410	PES	76	E	P	N	N	N	N
411	PES	76	K	N	N	P	N	N
412	KONTROL	66	E	N	N	P	N	N
413	KONTROL	76	E	N	N	N	N	N
414	PEG	66	E	N	N	N	N	N
415	KONTROL	70	E	N	N	N	N	N
416	PES	69	E	N	N	N	N	N
417	PES	68	K	P	N	N	N	N
418	PEG	80	K	N	P	P	N	N
419	PES	65	E	N	N	N	N	N
420	KONTROL	70	K	P	N	N	N	N
421	PES	70	K	N	P	P	N	N
422	PES	69	E	N	N	P	N	N
423	PES	70	E	N	N	P	N	N
424	PEG	76	K	N	N	N	N	N
425	PES	66	E	N	N	N	N	N
427	PES	63	K	N	N	N	N	N
428	PES	56	E	P	N	N	N	N
430	KONTROL	56	K	N	N	P	N	N
431	PES	70	E	N	N	N	N	N
432	PES	73	K	N	N	N	N	N
434	PES	69	E	N	N	N	N	N
435	PES	68	E	P	N	N	N	N
436	PES	71	E	N	P	P	N	N
437	PES	69	E	N	N	P	N	N
438	PES	70	E	P	N	P	N	N
439	PES	71	K	N	N	N	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
440	KONTROL	79	E	N	N	N	N	N
441	PEG	63	E	P	N	N	N	N
442	PEG	69	E	N	N	P	N	N
443	PES	67	E	N	N	P	N	N
444	PES	76	E	N	N	N	N	N
445	PES	69	E	P	N	N	N	N
446	PES	77	K	P	P	P	P	N
447	PES	77	E	N	P	P	N	N
448	PEG	79	K	N	N	N	N	N
449	KONTROL	80	E	N	N	P	N	N
450	PES	79	E	N	N	N	P	N
451	KONTROL	79	K	P	N	N	N	N
452	KONTROL	68	E	P	P	N	N	N
453	PES	78	K	N	P	P	N	N
454	PEG	59	E	N	P	P	N	N
455	PEG	69	K	N	N	P	P	N
456	KONTROL	76	E	N	N	N	N	N
457	PES	70	E	N	N	P	N	N
458	PES	69	E	N	N	N	N	N
459	PES	69	K	P	N	P	N	N
460	PES	70	E	P	N	N	N	N
461	PEG	66	K	N	N	P	N	N
462	PES	63	K	N	N	P	P	N
463	PES	56	K	N	N	P	N	N
464	PES	76	K	N	P	N	N	N
465	PES	63	K	P	N	P	N	N
467	PES	68	E	P	N	P	N	N
468	KONTROL	78	E	N	P	N	N	N
469	PES	70	K	N	N	N	N	N
470	PES	65	K	N	N	P	N	N
471	KONTROL	66	E	N	N	P	P	N
472	PES	66	E	N	P	P	N	N
473	PES	66	K	P	P	N	N	N
474	PES	69	K	P	N	N	P	N
476	PES	78	E	P	P	N	N	N
477	KONTROL	79	E	P	N	P	N	N
478	PES	70	K	N	P	P	N	N
479	PEG	69	E	N	P	P	N	N
480	PES	69	E	N	N	P	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
482	PEG	80	K	N	N	N	N	N
483	PEG	63	E	P	N	P	N	N
484	PES	70	K	P	P	N	N	N
485	PES	66	K	N	P	P	P	N
486	PES	70	K	P	P	N	N	N
487	PEG	70	E	N	N	P	N	N
488	PES	76	K	P	N	N	N	P
489	PES	72	K	N	N	P	N	N
490	PEG	79	E	N	N	P	N	N
492	PEG	73	E	N	N	P	N	N
494	PES	68	E	N	P	N	P	N
495	PES	70	E	P	N	P	N	N
496	PES	69	E	N	N	N	P	N
497	PES	73	E	P	N	P	N	N
498	PEG	68	E	P	P	P	N	N
499	KONTROL	71	K	N	P	N	N	N
500	KONTROL	71	K	N	N	N	N	N
501	PES	63	K	N	P	N	N	N
502	PEG	60	E	N	P	N	N	N
503	PES	68	E	N	N	P	N	N
504	PES	63	E	N	N	P	P	N
506	PEG	59	E	P	P	N	N	N
508	KONTROL	66	E	N	N	N	P	N
510	PEG	66	E	N	P	P	N	N
511	KONTROL	68	E	P	P	N	N	N
512	PES	78	E	P	N	N	P	N
514	PES	77	K	P	P	N	N	N
515	PES	71	K	P	N	P	N	N
518	PEG	70	E	N	N	P	N	N
519	PEG	63	K	N	N	N	N	N
520	PES	68	K	N	P	N	P	N
521	PEG	73	E	P	N	P	N	N
522	PES	68	K	N	N	N	P	N
523	KONTROL	68	K	P	N	N	P	N
524	KONTROL	66	K	N	N	N	P	N
525	KONTROL	68	E	N	N	P	P	N
527	PEG	68	K	P	P	N	N	N
528	PES	78	E	P	N	N	P	N
529	PES	71	K	N	N	N	P	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
530	PES	66	E	P	P	N	N	N
531	PES	68	E	N	N	P	N	N
532	PES	66	E	N	N	N	N	N
533	PES	69	E	N	N	N	N	N
534	PES	63	K	P	N	P	N	N
535	PES	68	K	P	P	N	N	N
536	PES	73	E	N	N	P	N	N
538	KONTROL	68	E	N	P	N	N	N
539	PEG	70	K	P	N	P	N	N
540	PES	66	K	P	P	P	N	N
541	PES	65	K	P	P	P	N	P
542	PES	63	E	P	N	P	N	N
543	PES	63	K	N	P	N	N	N
544	PES	68	K	N	N	N	N	N
545	KONTROL	94	E	P	N	P	N	N
546	PEG	69	E	N	N	P	P	N
547	KONTROL	69	E	N	P	P	N	N
548	PEG	66	K	P	P	N	N	N
549	KONTROL	66	K	N	N	P	N	N
550	PES	63	K	N	P	N	N	N
552	PES	70	K	P	P	P	N	N
553	PES	75	K	N	N	N	N	N
554	KONTROL	70	K	N	N	P	N	N
555	PES	68	K	N	N	P	N	N
556	KONTROL	70	K	N	N	N	N	N
557	KONTROL	66	K	N	N	N	N	N
558	KONTROL	68	E	N	N	P	N	N
559	PES	69	K	N	N	P	N	N
560	PEG	68	E	N	N	N	N	N
561	PEG	89	E	N	P	N	N	N
563	PES	70	K	P	P	P	N	N
564	PEG	73	E	N	N	N	N	N
565	PES	68	E	N	P	N	N	N
566	PES	70	E	N	P	N	N	N
567	PES	60	E	N	P	N	N	N
568	PES	61	E	N	N	N	N	N
569	PES	80	E	N	N	N	N	N
570	PES	58	K	N	P	N	P	N
571	PES	69	E	P	N	P	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
572	PEG	71	K	N	N	N	P	N
573	PES	60	K	P	N	P	N	N
574	PES	69	K	P	P	P	N	N
575	PES	66	E	N	P	N	N	N
576	PES	56	E	N	N	N	N	N
577	KONTROL	59	K	P	P	N	N	N
578	PEG	63	K	P	N	N	P	N
579	KONTROL	66	K	N	N	N	P	N
580	PES	63	K	P	P	N	N	N
581	KONTROL	68	K	N	N	P	N	N
582	PES	58	K	N	N	N	N	N
583	PES	68	E	N	N	N	N	N
584	PES	69	E	P	N	P	N	N
585	PES	76	K	P	N	N	N	N
586	PES	80	K	N	N	P	N	N
587	PES	70	E	N	N	P	N	N
588	PES	63	E	N	N	N	N	N
589	PES	65	E	P	N	N	N	N
590	PES	68	K	P	P	P	P	N
591	PES	68	E	N	P	N	N	N
592	PES	60	E	P	N	P	N	N
593	PEG	70	E	P	N	N	N	N
594	PEG	70	E	N	N	P	N	N
595	PEG	66	E	N	N	P	N	N
596	KONTROL	65	K	N	N	N	N	N
597	KONTROL	75	K	N	N	N	P	N
598	KONTROL	66	E	P	N	P	N	N
599	KONTROL	68	K	P	P	P	N	N
600	KONTROL	60	K	N	P	N	N	N
601	KONTROL	59	K	N	N	N	N	N
602	KONTROL	70	E	N	P	N	N	N
603	PEG	58	K	N	N	N	N	N
604	PEG	68	K	N	P	P	P	N
605	KONTROL	72	K	P	P	P	N	N
606	PEG	59	K	N	N	P	N	N
607	KONTROL	66	K	N	P	N	N	N
608	KONTROL	69	E	N	N	N	N	N
609	PES	63	E	N	P	P	P	N
610	PES	63	E	N	N	N	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
611	PES	68	E	P	N	N	N	N
612	PES	62	E	P	N	P	N	N
613	PES	78	K	N	P	N	P	N
614	PEG	72	E	N	P	N	N	N
615	PES	75	E	N	P	N	N	N
616	KONTROL	66	E	N	P	N	N	N
617	PEG	75	E	N	P	N	N	N
618	PES	70	E	N	P	N	N	N
619	PES	61	E	N	N	N	N	N
621	KONTROL	71	K	N	P	N	N	N
622	KONTROL	76	K	N	N	N	N	N
623	KONTROL	68	E	N	N	P	N	N
624	PEG	72	E	N	N	N	N	N
625	PES	66	E	P	N	P	N	N
626	KONTROL	81	K	N	N	N	N	N
627	PES	75	K	P	N	P	N	N
628	KONTROL	75	K	P	N	N	N	N
629	PEG	63	E	N	N	P	N	N
630	PEG	77	K	N	N	N	N	N
631	PES	85	K	N	P	N	P	N
632	PEG	73	E	N	N	N	N	N
633	PEG	83	K	N	N	N	N	N
634	PEG	84	E	N	P	P	N	N
635	KONTROL	68	E	N	N	P	N	N
636	KONTROL	66	E	N	N	N	N	N
637	KONTROL	55	E	N	N	N	P	N
638	PEG	58	K	P	N	P	N	N
639	PEG	76	K	P	P	P	N	N
641	KONTROL	66	E	P	N	P	N	N
642	KONTROL	61	E	N	N	N	P	N
643	KONTROL	55	E	P	N	N	P	N
644	PEG	68	K	N	N	N	P	N
645	PEG	68	E	N	N	P	P	N
646	KONTROL	61	E	N	P	P	N	N
647	PEG	81	E	P	P	N	N	N
648	KONTROL	63	K	P	N	P	N	N
649	PEG	62	E	N	N	N	P	N
650	KONTROL	73	E	P	N	P	N	N
651	PEG	66	K	P	P	P	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
652	KONTROL	70	E	N	P	N	N	N
653	KONTROL	68	K	N	N	N	N	N
654	PEG	81	E	P	P	N	N	N
655	KONTROL	78	E	N	P	N	P	N
656	KONTROL	65	K	P	N	P	N	N
657	KONTROL	61	K	N	N	N	P	N
658	KONTROL	71	K	P	N	N	P	N
659	KONTROL	73	E	N	N	N	P	N
660	KONTROL	51	K	N	N	P	P	N
661	KONTROL	56	K	N	P	P	N	N
662	KONTROL	65	K	P	P	N	N	N
644	PEG	68	K	N	N	N	P	N
645	PEG	68	E	N	N	P	P	N
646	KONTROL	61	E	N	P	P	N	N
647	PEG	81	E	P	P	N	N	N
648	KONTROL	63	K	P	N	P	N	N
649	PEG	62	E	N	N	N	P	N
650	KONTROL	73	E	P	N	P	N	N
651	PEG	66	K	P	P	P	N	N
652	KONTROL	70	E	N	P	N	N	N
653	KONTROL	68	K	N	N	N	N	N
654	PEG	81	E	P	P	N	N	N
655	KONTROL	78	E	N	P	N	P	N
656	KONTROL	65	K	P	N	P	N	N
657	KONTROL	61	K	N	N	N	P	N
658	KONTROL	71	K	P	N	N	P	N
659	KONTROL	73	E	N	N	N	P	N
660	KONTROL	51	K	N	N	P	P	N
661	KONTROL	56	K	N	P	P	N	N
662	KONTROL	65	K	P	P	N	N	N
663	KONTROL	66	K	N	N	N	P	N
664	KONTROL	59	K	P	N	N	P	N
665	KONTROL	54	E	P	N	N	N	N
666	KONTROL	71	K	P	N	N	P	N
667	KONTROL	61	E	N	N	N	N	N
668	KONTROL	63	E	N	N	N	N	N
669	KONTROL	74	K	P	N	P	N	P
670	KONTROL	63	K	N	P	N	P	N
671	KONTROL	68	K	N	N	P	N	P

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
672	KONTROL	58	E	N	P	N	P	P
673	KONTROL	68	K	P	P	N	N	P
674	KONTROL	78	E	P	N	P	N	P
675	PEG	66	K	N	N	P	N	N
677	KONTROL	71	E	N	N	P	P	P
678	PEG	78	K	N	N	N	N	P
679	PEG	70	E	P	P	N	N	P
680	KONTROL	66	E	P	N	N	P	P
681	KONTROL	77	E	N	P	P	N	P
682	KONTROL	73	K	P	N	N	N	N
683	KONTROL	63	E	N	N	P	N	N
684	KONTROL	67	K	N	N	N	N	N
685	PEG	65	E	N	P	N	N	P
686	KONTROL	69	E	P	N	N	P	P
687	PEG	57	K	N	N	P	P	N
688	PEG	71	E	P	N	P	N	N
689	PEG	76	E	N	N	N	N	N
690	KONTROL	63	K	N	N	P	P	N
691	KONTROL	67	E	N	P	P	N	N
692	PEG	61	E	P	P	N	N	N
693	PEG	63	K	P	N	N	P	N
694	PEG	68	K	N	N	N	P	N
695	KONTROL	78	K	N	N	P	N	N
696	PES	68	E	P	N	N	N	P
697	PEG	68	E	N	N	P	N	N
698	PEG	52	E	N	N	P	N	N
699	PEG	78	E	N	N	P	N	N
700	PEG	78	K	N	N	P	N	N
701	PEG	72	K	N	N	N	N	N
702	PEG	61	E	N	P	N	P	N
703	PEG	78	K	P	N	P	N	N
704	PEG	58	K	N	N	N	N	N
705	KONTROL	68	E	N	P	N	N	N
706	PEG	58	E	N	N	P	N	N
707	PEG	80	E	P	N	P	N	N
708	PEG	73	E	N	N	N	N	N
709	PEG	78	K	N	N	N	N	N
710	PEG	74	E	P	N	N	N	N
711	PEG	78	E	N	N	P	N	N

Tablo EK 2 (devamı) : 213 PEG hastası, 214 PEG hastası ve 215 kontrol bireyinden oluşan tüm çalışma grubunun demografik bilgileri. E: Erkek; K: Kadın; P:Pozitif; N:Negatif.

NO	PES/PEG/ Kontrol	Yaş	Cinsiyet	Diyabet	Kalp hastalığı	Hipertansiyon	Sigara	İnme
712	KONTROL	67	E	N	N	N	N	N
713	KONTROL	70	K	N	P	N	N	N
714	KONTROL	59	E	P	N	P	N	N
715	KONTROL	72	E	P	N	P	N	N

EK 3. PEG, PES ve kontrol gruplarında gözyaşı ve aközdeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu

Tablo EK 3.1 : PEG hastalarının gözyaşı ve aközlerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu.

		Aköz CTGF	Aköz total protein	Aköz CTGF oranı	Gözyaşı CTGF	Gözyaşı total protein	Gözyaşı CTGF oranı
Aköz CTGF	Pearson Correlation	1	-0.183	0.858(**)	0.226	0.730	0.199
	P		0.664	0.006	0.714	0.100	0.749
Aköz total protein	Pearson Correlation	-0.183	1	-0.624	-0.562	-0.569	-0.543
	P	0.664		0.098	0.324	0.239	0.344
Aköz CTGF oranı	Pearson Correlation	0.858(**)	-0.624	1	0.532	0.788	0.504
	P	0.006	0.098		0.356	0.063	0.386
Gözyaşı CTGF	Pearson Correlation	0.226	-0.562	0.532	1	0.109	0.999(**)
	P	0.714	0.324	0.356		0.862	0.000
Gözyaşı total protein	Pearson Correlation	0.730	-0.569	0.788	0.109	1	0.072
	P	0.100	0.239	0.063	0.862		0.909
Gözyaşı CTGF oranı	Pearson Correlation	0.199	-0.543	0.504	0.999(**)	0.072	1
	P	0.749	0.344	0.386	0.000	0.909	

** Korelasyon 00.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Tablo EK 3.2 : PES hastalarının gözyaşı ve aközlerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu.

		Aköz CTGF	Aköz total protein	Aköz CTGF oranı	Gözyaşı CTGF	Gözyaşı total protein	Gözyaşı CTGF oranı
Akoz CTGF	Pearson Correlation	1	0.134	0.414	-0.143	0.267	-0.132
	P		0.607	0.099	0.693	0.427	0.715
Aköz total protein	Pearson Correlation	0.134	1	-0.636(**)	-0.011	0.470	-0.093
	P			0.607	0.006	0.976	0.145
Aköz CTGF oranı	Pearson Correlation	0.414	-0.636(**)	1	-0.071	-0.091	-0.099
	P		0.099		0.006	0.845	0.789
Gözyaşı CTGF	Pearson Correlation	-0.143	-0.011	-0.071	1	-0.299	0.955(**)
	P		0.693	0.976		0.845	0.402
Gözyaşı total protein	Pearson Correlation	0.267	0.470	-0.091	-0.299	1	-0.531
	P		0.427	0.145	0.789		0.402
Gözyaşı CTGF oranı	Pearson Correlation	-0.132	-0.093	-0.099	0.955(**)	-0.531	1
	P		0.715	0.799	0.785	0.000	

** Korelasyon 00.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).

Tablo EK 3.3 : Kontrollerin gözyaşı ve aközlerindeki CTGF konsantrasyonu, total protein ve total protein içindeki CTGF oranlarının birbiri ile korelasyonu.

		Aköz CTGF	Aköz total protein	Aköz CTGF oranı	Gözyaşı CTGF	Gözyaşı total protein	Gözyaşı CTGF oranı
Akoz CTGF	Pearson Correlation	1	0.386	0.684(**)	-0.371	-0.132	-0.463
	P		0.084	0.001	0.235	0.652	0.130
Aköz total protein	Pearson Correlation	0.386	1	-0.295	-0.150	0.182	-0.250
	P			0.084	0.193	0.642	0.534
Aköz CTGF oranı	Pearson Correlation	0.684(**)	-0.295	1	-0.322	-0.161	-0.345
	P		0.001		0.193	0.307	0.582
Gözyaşı CTGF	Pearson Correlation	-0.371	-0.150	-0.322	1	0.444	0.944(**)
	P		0.235	0.642		0.307	0.148
Gözyaşı total protein	Pearson Correlation	-0.132	0.182	-0.161	0.444	1	0.255
	P		0.652	0.534	0.582		0.148
Gözyaşı CTGF oranı	Pearson Correlation	-0.463	-0.250	-0.345	0.944(**)	0.255	1
	P		0.130	0.434	0.272	0.000	

** Korelasyon 00.01 düzeyinde anlamlı (2 yönlü).



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Canan KOÇAN
Uyruğu : TC
Doğum Tarihi ve Yeri : 24.11.1988 BURSA
E-posta : canankocan.88@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
- **Yüksek lisans** : 2018, TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Proje Burslu Yüksek Lisans Öğrencisi

YABANCI DİL: İngilizce

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler :

- **Koçan, C.**, Öztepe, T., Özge, G., Mumcuoglu, T., Can Demirdögen, B. 2016. A study on the association between rs6918698 polymorphism in connective tissue growth factor gene and pseudoexfoliation syndrome, The 41st FEBS Congress, 3-8 Eylül, The FEBS Journal 283 (Suppl. 1), 374. (Kongre iptal edildiğinden sunum yapılamamıştır ancak bildiri FEBS Journal'da yayınlanmıştır)
- **Koçan C.**, Öztepe T, Can Demirdögen B, Özge G, Mumcuoğlu T. 2016. CTGF rs6918698 polimorfizmi ile psödoeksfoliasyon sendromu arasındaki ilişkinin incelenmesi, TBD Biyokimya Günleri, 2-5 Kasım, Sivas, Türkiye (Sözlü bildiri). Türk Biyokimya Dergisi; cilt 41(S3), S035.
- **Koçan C.**, Can Demirdögen B, Özge G, Mumcuoğlu T. 2017. CTGF rs9399005 ve rs12526196 polimorfizmleri ile psödoeksfoliasyon sendromu ve glokomun ilişkisi, İn vitro Diyagnostik- Biyobelirteçler Sempozyumu, 10-12 Mayıs, İzmir, Türkiye (Sözlü bildiri). Türk Biyokimya Dergisi; cilt 42(S2), S08.

- **Koçan C**, Can Demirdöğen B, Özge G, Mumcuoğlu T. 2017. The association between connective tissue growth factor (CTGF) rs6918698 polymorphism and pseudoexfoliation syndrome, and the effect of rs6918698 on aqueous humor CTGF concentration, 42. FEBS Congress, 10-14 Eylül. Kudüs, İsrail (Poster). The FEBS Journal.; vol.284 (S1) 102–403.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler :

- **Yakar G, Koçan C, Öztepe T, Özge G, Mumcuoğlu T, Can Demirdöğen B.** 2017. A study on the association between PON1 (Paraoxonase 1) 55L/M (rs854560) polymorphism and pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliative glaucoma, Erciyes Medical Genetics Day 2017, 11-13 Mayıs, Kayseri, Türkiye (Poster). Erciyes Med J; vol 39, issue 2: 69
- **Can Demirdöğen B, Yakar G, Göksoy E, Demirkaya S, Koçan C, Özge G, Mumcuoğlu T.** 2017. Relationship between paraoxonase 1 (PON1) promoter (-107T/C) and coding region polymorphisms (192Q/R and 55L/M) and Pseudoexfoliation syndrome, The 42nd FEBS Congress, 10-14 Eylül, Kudüs, İsrail (Poster). The FEBS Journal.; vol. 284 (S1) 104–392.