

**VİTİLİGO TANILI OLGULARDA *CTLA-4* ve *MYG1*
GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

Ayşen YILDIRIM

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. S. Handan YILDIZ
Tez No: 2015-019**

2015-Afyonkarahisar

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VİTİLİGO TANILI OLGULARDA *CTLA-4* ve *MYG1*
GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

Ayşen YILDIRIM

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. S. Handan YILDIZ

**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından 13.SAĞ.BİL.17 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez No:2015-019
2015-Afyonkarahisar**


KABUL ve ONAY

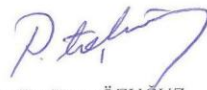
Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Genetik Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14.07.2015


Doç. Dr. S. Handan YILDIZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıbbi Genetik AD.
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Tıbbi Genetik AD.
Üye


Doç. Dr. Pınar ÖZUGUZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Dermatoloji AD.
Üye

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ayşen YILDIRIM'ın "Vitiligo tanılı olgularda *CTLA-4* ve *MYG1* Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi" başlıklı tezi 28.07.15 günü saat 16:00. Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimime vermiş olduğu destek ve katkılarından dolayı

Rektörümüz ve Anabilim Dalı Başkanımız

Sayın Prof. Dr. Mustafa SOLAK'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca sabır ve titizlikle bilgi, tecrübe ve desteklerini

esirgemeyen, bir aile bildiğim çok kıymetli hocalarım

Sayın danışmanım Doç. Dr. Saliha Handan YILDIZ' a, Sayın Doç. Dr. Müjgan

ÖZDEMİR ERDOĞAN'a, Sayın Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a

ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan TERZİ'ye

Tezimin gerçekleşmesinde emeği olan

Dermatoloji Anabilim Dalı'ndan hocalarım

Sayın Doç. Dr.Pınar ÖZUGUZ'a ve Sayın Doç. Dr. Seval DOĞRUK KAÇAR'a,

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında

yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen

Sayın Arş. Gör. Dr. Evrim Suna ARIKAN TERZİ'ye

Eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen

Sayın Uzm. Bio. Tevhide FISTIK'a ve Sayın Arş. Gör. Zafer SÖYLEMEZ'e

Eğitimim süresince yanımda olan ve desteklerini

canı gönülden hissettiğim arkadaşım

Uzm. Bio. Nermin AKÇALI'ya,

Ayrıca beni yetiştirip, bugüne gelmemi sağlayan en büyük destekçilerim değerli annem, babam ve sevgili kardeşime, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bio. Ayşen YILDIRIM

2015

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖNSÖZ	i
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER.....	vi
TABLolar	vii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Pigmentasyon	2
2.1.1. Melanosit Yapısı ve Fonksiyonu.....	3
2.1.2. Melanositlerin Dağılımı	5
2.1.3. Melanozomun Yapısı ve Fonksiyonu.....	6
2.1.3.1. Melanin Biyosentezinin Düzenlenmesi.....	6
2.1.3.2. Melanin Pigmentasyon Hastalıklarının Patogenezi	8
2.2. İnsanda Deri Pigmentasyonunun Düzenlenmesi	9
2.3. Vitiligo.....	10
2.3.1. Vitiligonun Yerleşim Yerine Göre Sınıflandırması.....	11
2.3.1.1. Lokalize Tip Vitiligo.....	12
2.3.1.2. Generalize Tip Vitiligo	12
2.3.1.3. Universal Tip Vitiligo	13
2.3.2. Vitiligonun Renk Farklılıklarına Göre Sınıflandırması	13
2.4. Vitiligonun Epidemiyolojisi	13
2.5. Vitiligonun Etiyopatogenezi.....	14
2.5.1. Patogenezi	14
2.5.1.1. Otoimmün Teori.....	14
2.5.1.2. Nöral Hipotez	19
2.5.1.3. Otositotoksik Teori ve Oksidatif Stres	20
2.5.2. Genetik Faktörler	23
2.5.2.1. <i>MYG1</i> geni: Melanosit Üretici Gen 1.....	27
2.5.2.2. <i>CTLA-4</i> geni: Sitotoksik T lenfosit İlişkili Antijen 4.....	28
2.6. Polimorfizm.....	29

2.7. Eş-zamanlı PCR Yöntemi	31
2.7.1. SYBR Green PCR Nedir?.....	31
2.7.2. Prob Temelli PCR Nedir?.....	32
3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER	34
3.1. Örnek Toplanması	34
3.2. Kullanılan kimyasallar	35
3.3. Genotipleme	35
3.3.1. <i>CTLA4</i> geni rs231775 test prensipleri	35
3.3.1.1. Real-Time PCR kullanarak double-dye hidroliz problemleriyle genotipleme	35
3.3.1.2. Primerdesign kit içeriği	37
3.3.1.3. Primerdesign kit protokolü.....	37
3.3.2. <i>MYG1</i> geni rs1465073 Polimorfizmi Test Prensipleri.....	39
3.3.2.1. LightCycler® 480 Real-Time PCR kiti	39
3.3.2.2. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması Ve Örneklerin Lightcycler Cihazına Yüklenmesi	40
3.3.2.3. Deneysel İşlemler.....	40
3.4. İstatistiksel analizler	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. Genotip verileri.....	45
4.1.1. <i>CTLA4</i> geni rs231775 polimorfizmine ait genotip ve alel frekansları.....	46
4.1.2. <i>MYG1</i> geni rs1465073 polimorfizmine ait genotip ve alel frekansları.....	48
5. TARTIŞMA	51
5.1. <i>CTLA4</i> geni rs231775 polimorfizmi ile Vitiligo hastalığının ilişkisi.....	51
5.2. <i>MYG1</i> geni rs1465073 polimorfizmi ile Vitiligo hastalığının ilişkisi.....	52
5.3. <i>CTLA4</i> geni rs231775 polimorfizmi ve <i>MYG1</i> geni rs1465073 polimorfizmi ile aile öyküsünün ilişkisi	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	56
ÖZET.....	58
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	68

SİMGELER ve KISALTMALAR

MYG1	Chromosome 12 Open Reading Frame 10
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DOPA	Levodopa
MSH	Melanocyte-stimulating hormone
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
IL	Interleukin family
TGF-β1	Transforming Growth Factor, Beta 1
TRP	Tyrosinase-Related Protein 1
HLA	human leukocyte antigen
HLA-DRB1	Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Beta 1
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
MBL2	Mannose-Binding Lectin 2
NLRP1	NLR Family, Pyrin Domain Containing
LPP	LIM Domain Containing Preferred Translocation Partner In Lipoma
UBASH3A	Ubiquitin Associated And SH3 Domain Containing A
C1QTNF6	C1q And Tumor Necrosis Factor Related Protein 6
RERE	Arginine-Glutamic Acid Dipeptide (RE) Repeats
GZMB	Granzyme B (Granzyme 2, Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Serine Esterase 1)
TRY	Trypsin
TNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CBP1	Cytochrome B pre-mRNA-processing protein 1
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GWAS	Genome Wide Association Study
Kb	Kilobaz
µl	Mikrolitre
ng	nanogram
nm	nanometre
OR	Odds Ratio
qRT-PCR	Real-time reverse-transcription PCR
rs	Reference SNP
RNA	Ribo Nükleik Asit
kDa	Kilo Dalton
GV	Generalize Vitiligo

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Derinin yapısı ve melanozom	4
Şekil 2.2. Melanosit ve keratinositlerin dendritik uzantıları	5
Şekil 2.3. Melanin biyosentezi	7
Şekil 2.4. Hipermelanozis	8
Şekil 2.5. Hipomelanozis	9
Şekil 2.6. <i>MYG1</i> geninin kromozomal lokasyonu	28
Şekil 2.7. <i>CTLA4</i> geninin kromozomal lokasyonu	29
Şekil 2.8. SYBR Green PCR prensibi	31
Şekil 2.9. TaqMan problemlerinin çalışma prensibi.	32
Şekil 2.10. FRET problemlerinin çalışma prensibi	33
Şekil 3.1. İlgili polimorfizmlere ilişkin genotiplerin alelik ayrılma prensibine göre belirlenmesi	39
Şekil 3.2. İlgili polimorfizmlere ilişkin genotiplerin erime eğrisi prensibine göre belirlenmesi	43

TABLULAR

Tablo 2.1. Fitzpatrick deri tipleri	2
Tablo 2.2. Pigmentasyonun düzenlenmesinde etkili faktörler	9
Tablo 2.3. Vitiligo sınıfları ve klinik özellikleri	11
Tablo 2.4. Vitiligonun renk farkına göre sınıflandırılması	13
Tablo 2.5. Vitiligo ile ilişkili otoimmün hastalıklardan bazıları	15
Tablo 2.6. Vitiligo ve ilişkili otoantikolar	16
Tablo 2.7. Vitiligo etyopatogenezinde etkili diğer faktörler	22
Tablo 3.1. DNA izolasyonu kit içeriği	34
Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar	35
Tablo 3.3. PrimerDesign kit içeriklerinin sulandırılması	37
Tablo 3.4. PrimerDesign reaksiyon karışımı	38
Tablo 3.5. PrimerDesign pozitif kontrollerin sulandırılması	38
Tablo 3.6. <i>CTLA4</i> geni rs231775 polimorfizmi amplifikasyon protokolü	39
Tablo 3.7. Reaksiyon mixinin hazırlanışı	41
Tablo 3.8. <i>MYG1</i> geni rs1465073 polimorfizmine ait genotip ilişkisi	43
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımı	44
Tablo 4.2. Vitiligo grubunun hastalık tiplerine göre dağılımı	44
Tablo 4.3. Ailede vitiligo öyküsünün cinsiyete göre dağılımı	45
Tablo 4.4. Hastalık başlangıç yaşı ve hastalık tipleri arasındaki ilişki	45
Tablo 4.5. rs231775 ve rs1465073 polimorfizmlerine ilişkim bazı veriler	45
Tablo 4.6. Kontrol ve vitiligo grubunda <i>CTLA4</i> geni rs231775 polimorfizmine ait genotip frekanslarının dağılımı	46
Tablo 4.7. Kontrol ve Vitiligo grubunda <i>CTLA4</i> geni rs231775 polimorfizmine ait alel frekanslarının dağılımı	46
Tablo 4.8. Hastalık tipleri ve <i>CTLA4</i> geni rs231775 polimorfizmine ait genotiplerin karşılaştırılması	47
Tablo 4.9. Hastalık tipleri ve <i>CTLA4</i> geni rs231775 polimorfizmine ait genotip risk analizi karşılaştırılması	47

Tablo 4.10. Aile öyküsü ile <i>CTLA-4</i> genotiplerinin risk hesaplaması	47
Tablo 4.11. Hasta ve kontrol grubunda <i>MYG1</i> geni rs1465073 polimorfizmine ait genotip frekanslarının dağılımı	48
Tablo 4.12. Kontrol ve Vitiligo grubunda <i>MYG1</i> geni rs1465073 polimorfizmine ait alel frekanslarının dağılımı	48
Tablo 4.13. Hasta ve kontrol grubunda risk alelinin varlığı ve yokluğunun dağılımı	49
Tablo 4.14. Hastalık tipleri ve <i>MYG1</i> geni rs231775 polimorfizmine ait genotiplerin karşılaştırılması	49
Tablo 4.15. Hastalık tipleri ve <i>MYG1</i> geni rs1465073 polimorfizmine ait genotip risk analizi karşılaştırılması.....	49
Tablo 4.16. Aile öyküsü ile <i>MYG1</i> genotiplerinin risk alelinin varlığı ve yokluğu arasındaki ilişki	50

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Vitiligo nedeni tam olarak bilinmeyen, deride melanosit kaybı sonucu gelişen, keskin sınırlı, beyaz maküllerle karakterize bir depigmentasyon hastalığıdır. Hastalık kişinin fiziksel görünümünde bozukluğa neden olduğundan hastaların toplumsal ilişkilerinde bozulmalara ve özgüvenlerinin gelişiminde yetersizliklere neden olabilmektedir.

Vitiligoda melanositler bilinmeyen bir mekanizma ile harap olmaktadır. Bu nedenle tipik bir vitiligo makülünde melanositler saptanamaz. Melanositlerin yıkımına neden olan hücresel ve moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Bununla birlikte vitiligonun etyopatogenezini açıklamaya yönelik değişik hipotezler öne sürülmüştür. Bunlar arasında en çok üzerinde durulanlar nöral hipotez, otositotoksik ve otoimmün hipotezdir. Otoimmün hastalıklar ile vitiligonun birlikte görülmesi, vitiligolu deride inflamatuvar değişikliklerin varlığı ve vitiligolu hastaların serumlarında çeşitli otoantikorların saptanması, vitiligo etyopatogenezinde immünolojik bir temel olduğunu düşündürmüştür.

Vitiligolu hastalarda saptanan bu otoantikorlar gelişmiş veya gelişebilecek bir sistemik otoimmün hastalık için önemli bir gösterge olabilir. Bu durum vitiligo hastalığının takibi süresince hedef organların düzenli olarak incelenmesi gerektiğini gösterir.

Çalışmamızda; Dermatoloji kliniğinde vitiligo tanısı kesinleştirilen 106 hasta ve 97 sağlıklı bireyden ayrıntılı anamnez ile elde edilen hastalığın klinik tipleri, başlangıç yaşı ve süresi ile hastalık öncesi stres varlığı, aile öyküsü, sigara kullanımı gibi veriler ile vitiligo ile ilgili olduğu düşünülen *MYG-1* (Melanosit Üretici Gen 1) geni rs1465073 ve *CTLA-4* (Sitotoksik T lenfosit İlişkili Antijen 4) geni rs231775 Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin (TNP) hastalık ile ilişkisini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pigmentasyon

Deri ve kılların pigmentasyonu, melanositlerde melanin sentezlenmesi ile oluşan ürünün epidermal ve folliküler keratinositlere dağılımı sonucunda ortaya çıkar. Deri rengini etkileyen birçok faktör vardır (Pişkin, 2011). Bunların başlıcaları şunlardır;

- Melanin pigmenti
- Hemosiderin pigmenti
- Derinin karotenoid içeriği
- Derinin kalınlığı
- Derinin ışığı kırışı
- Derinin ışığı absorpsiyon yeteneği
- Derinin kan damarları

Bunların içinde deri rengini belirleyen ana unsur melanin pigmenti'dir. Deri renk farklılıklarına göre altı sınıfa ayrılmaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Fitzpatrick deri tipleri (Ravnbak, 2008)

Deri tipi	Deri rengi	Güneşe karşı reaksiyon
I	Beyaz ten ve çiller var	Daima güneşte yanarlar
II	Beyaz ten	Genellikle yanarlar
III	Buğday ten	Bazı zamanlar yanarlar
IV	Kahverengi ten	Nadir yanarlar
V	Koyu kahverengi ten	Çok nadir yanarlar
VI	Siyah	Neredeyse hiç yanmazlar

Derinin melanin pigmentasyonu, çok sayıda "epidermal melanin ünitesi" tarafından sağlanır. Bir epidermal melanin ünitesi; bir melanosit ile onun ilişki içinde olduğu 36 adet keratinositten oluşur (Pişkin, 2011).

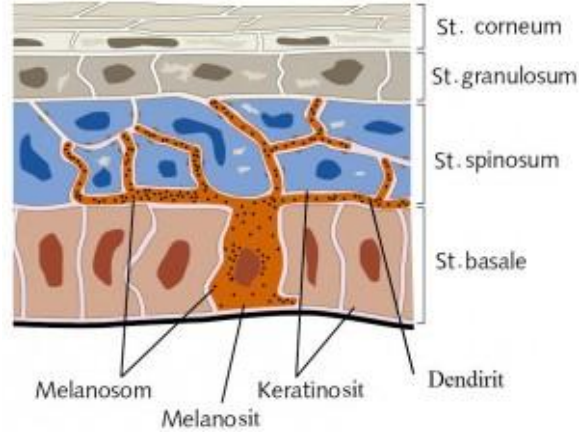
Melanosit, melanin pigmenti yapmakla görevli, dendritik uzantıları olan, keratinize olmayan bir hücredir. Embriyolojik gelişme esnasında melanoblastlar, nöral yarıktan mezenkim yoluyla epidermise gelirler ve melanosit haline geçerler. Bir kısmı kıl folliküllerinin gelişmesi esnasında derma içine sürüklenirler. Deri dışında merkezi sinir sistemi ve göz (retina, koryoid, korpus siliare, iris)'e de melanosit göçü olur. Doğumdan önce kıl folliküllerindeki ve epidermisdeki melanositlerin dışındakiler melanin yapımını durdurur (Pişkin, 2011).

Hiperpigmentasyon, hipopigmentasyon ve depigmentasyonla seyreden deri hastalıklarının temelindeki patofizyolojiyi anlamak için;

- Melanositin yapısı ve fonksiyonunun,
- Melanozom yapısı ve fonksiyonunun,
- Melanin biyosentezinin düzenlenmesinin bilinmesi gerekir.

2.1.1. Melanosit Yapısı ve Fonksiyonu

Melanositlerin görevi melanin pigmenti yapımıdır (Pişkin, 2011). Melanositlerde pigment yapımı "melanozom" adı verilen hücre içi organellerinde "Raper-Mason Yolu" da denilen bir dizi reaksiyon zinciri ile sentezlenir (Braun ve ark., 2000). Melanositler dendritik hücrelerdir. Dendritik olmaları keratinositlerle ilişkisini gösterir. Melanositler melanozomları dendritik uzantıları aracılığı ile keratinositlere iletirler. Keratinositlerin melanozom içeren dendritik uçları, aktif fagositozla melanozomları kendi sitoplazmaları içine alırlar. Derinin pigmentasyonu, ancak keratinositler içinde melanize olmuş melanozom bulunması ile mümkündür. Melanozomlar, nukleusların dışa bakan yüzlerini bir güneşlik gibi örtecek şekilde diziler ve hücreleri ışınların zararlı etkilerinden korurlar (Pişkin, 2011) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Derinin yapısı ve melanozom (Buzoğlu, 2015)

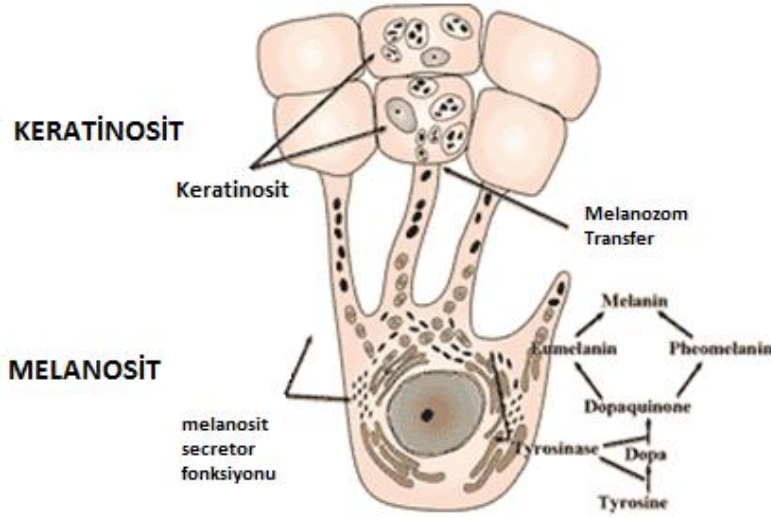
Melanin pigment yapımı tirozinden başlar. Melanozomlar, en önemli pigment sentezleyici enzim olan tirozinaz'ı içerirler. Tirozinaz enzimi aracılığıyla önce dopa sonra da dopa-chinone oluşur. Bu enzimatik oksidasyon sürecini, enzimatik olmayan bir dizi spontan oksidasyon zinciri tamamlar. Bu sırada oluşan ara ürünler olan indol türevlerinin katılması ile de melanin makromolekülü ortaya çıkar (Pişkin, 2011).

Normal melanositlerin tümünün tirozinaz enzimini sentezleme ve melanozom oluşturma özellikleri vardır. Ancak her melanositin, melaninini diğer bir hücreye transfer etme yeteneği yoktur. Örneğin, retina ve koryoiddeki melanositler sabittir (Denli ve ark., 2008).

İnsanlarda deride melanin pigmentasyonu iki basamakta gerçekleşir (Denlive ark., 2008).

- Birincisi melanosit içinde melanozomların oluşumu ve melanin üretimi (melanogenezis).
- İkincisi bu pigment granüllerinin epidermal keratinositlere transferi ve dağılımıdır.

Melanin, melanositlerdeki melanozomlar içinde sentezle birleştirilir, keratinositlere aktarılır ve epidermal yüzeye nakledilir (Şekil 2.2). Keratinositlere aktarılmış olan melanozomlarda melanin oluşturulamaz (Park ve ark., 2008).



Şekil 2.2. Melanosit ve keratinositlerin dendritik uzantıları (Dermamedics professional'dan değiştirilerek, 2015).

2.1.2. Melanositlerin Dağılımı

Melanositler, hemen her dokuda bulunabilirler. Sıklıkla epidermis, kıl follikülleri, dermis, göz, kan damarı etrafında bulunurlar. Melanositler epidermiste bazal lamina üzerine yerleşmişlerdir. Bazal tabakanın her 4-10 hücresine bir melanosit düşer (Pişkin, 2011).

Melanositlerin sayısı deride bir yerden diğerine değişir. Melanosit yoğunluğu, vücut bölgelerine göre değişmekle beraber ırklar arasında farklılık göstermez. Deri rengindeki ırksal farklılıkları keratinositlerdeki melanozomların dağılımı ve büyüklüğü belirler. Beyaz ve siyah renklilerdeki farklılıklar melanositlerde üretilen melanozomların miktarı ve yerleşimine bağlıdır (Denli ve ark., 2008).

Sağlıklı bir erişkinde epidermal hücre topluluğunun (güneş gören yerlerde iki kat daha yoğun olmak üzere) yaklaşık %3-5'i melanositlerden oluşmaktadır (Bleehen ve

ark., 1998). Ortalama yoğunluk $1000/\text{mm}^2$ dir (Pişkin, 2011). Yüz ve genital bölge en fazla sayıda melanosit içerir (Denli ve ark., 2008).

Melanosit sayısı 30 yaşından sonra, her yıl ortalama %1-2 azalır. Epidermal melanositlerde bu azalmaya karşılık aktivite artışı olur. Folliküler melanositlerin ise hem sayılarında hem aktivitelerinde azalma söz konusudur (Pişkin, 2011). Melanosit yoğunluğu güneşe maruz kalınan deri bölgelerinde diğer alanlara oranla 2 kat yüksektir (Bleehen ve ark., 2004).

2.1.3. Melanozomun Yapısı ve Fonksiyonu

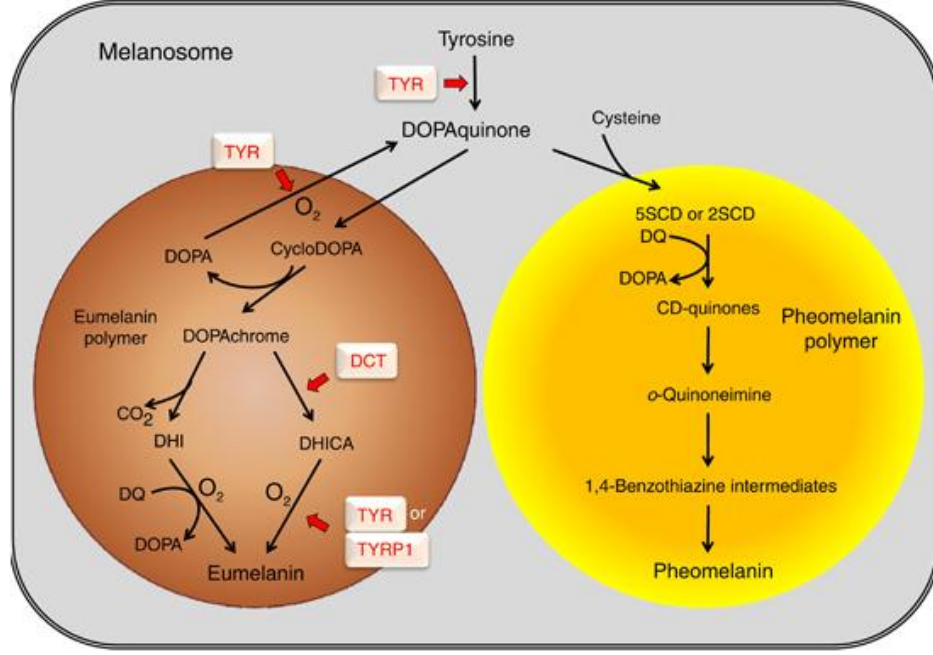
Melanozom, melanositin sitoplazması içindeki organeldir. Melanozom; tirozinaz enzimi aracılığıyla melaninin oluşturan özel sitoplazmik bir organeldir. Melanozomlar hem matriks proteinlerini hem de melanin biyosentezini düzenleyen primer enzim olan proteinleri ihtiva ederler (Denli ve ark., 2008).

2.1.3.1. Melanin Biyosentezinin Düzenlenmesi

Başlıca iki melanin tipi vardır:

Ömelanin, elips şeklindeki melanozomlarda yapılır. Siyah, kahverengi saç ve deri renginden sorumludur.

Feomelanin, küre şeklindeki melanozomlarda yapılır. Sarı, kırmızı saç ve deri renginden sorumludur. Ömelanin yapımı zincirinde dopa-chinone'dan sonraki oksidasyonda moleküle kükürt girmesi ile feomelanin oluşmaktadır (Pişkin, 2011).



Şekil 2.3. Melanin biyosentezi (Hearing, 2011)

Melanin yapımının biyokimyası tirozinaz enzimi çerçevesindedir, oldukça kompleks olan bu süreç tam olarak aydınlatılmamıştır. Melanin oluşumunda anahtar aminoasit tirozin veya hydroxyphenylalanine' dir. Melanozomlarda tirozin, 11q 14-21 nolu kromozomda kodlanmış bakır içeren bir enzim olan tirozinaz aracılığıyla ilk önce 3,4 dihydroxyphenylalanine (DOPA)' e dönüştür, sonra dopaquinone'u oksidasyonu için katalize eder, dopaquinone'dan sonra eumelanin ve pheomelanin yolları ayrılır (Şekil 2.3). Raper-Mason yolu olarak bilinen bir dizi reaksiyon zincirinden sonra melanin molekülü oluşur. Melanin tirozinden sentezlendiğinde eumelanin adını alır ve koyu kahverengi bir pigmenttir (Denli ve ark., 2008). Sentez, tirozin ve sistein ya da glutasyon üzerinden gerçekleşirse pheomelanin olarak adlandırılır ve sarı-kırmızı renkli bir pigmenttir (Nordlund, 1992).

2.1.3.2. Melanin Pigmentasyon Hastalıklarının Patogenezi

Melanin pigmentasyon hastalıkları morfolojik olarak ikiye ayrılabilir (Denli ve ark., 2008).

Hipermelanozis, deride melanin miktarındaki artışı tanımlar. Bu artış epidermisle sınırlıdır. Deri normalden daha koyu kahverengi görülür (Şekil 2.4). Dermisde olduğunda, mavi veya kurşuni gri görünümü olabilir. Hipermelanozis pekçok faktöre bağlı gelişebilir. Epidermisde melanin artması sonucunda hipermelanozis iki şekilde kendini gösterir (Denli ve ark., 2008).



Şekil 2.4. Hipermelanozis (<http://reference.medscape.com/features/slideshow/pigmentation>)

Melanositik hipermelanozis (Lentigo), epidermisde melanositlerin sayısal olarak artması ve bunun sonucu olarak melanin düzeyinde artma gözlenmesidir.

Melanotik hipermelanozis (Melazma), melanositlerin sayısında çok belirgin bir artış olmaksızın, melanin düzeyinde artış olmasıdır.

Hipomelanozis, melanositlerin nöral yarıktan göç etmesiyle başlayıp, melaninin stratum korneumla beraber atılmasıyla sonlanan bu sürece, çeşitli endojen ve eksojen faktörlerin ya melanosit sayısında ya da melanin miktarında azalma veya yok olma şeklindeki etkileriyle deride hipo- veya depigmentasyon gelişmesidir.

Hipomelanoziste deride pigment kaybı mevcuttur. Bu nedenle normal renkten daha beyaz, daha açık renkte gözlenir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Hipomelanozis (Afyon Kocatepe Üniversitesi Dermatoloji AD.)

2.2. İnsanda Deri Pigmentasyonunun Düzenlenmesi

Pigment üreten melanositlerin fonksiyonları, epidermal ve muhtemelen dermal hücreler tarafından etkilenmektedir. Keratinositler, Langerhans hücreleri, mast hücreleri ve fibroblastlar çeşitli sitokinler salgılayarak melanosit işlevleri üzerine etkili olabildiği, aynı zamanda pigment hücrelerinin de çeşitli otokrin faktörler üreterek kendi işlevlerini kontrol ettiği düşünülmektedir (Young ve Nordlund, 1992) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Pigmentasyonun düzenlenmesinde etkili faktörler (Young ve Nordlund, 1992)

Genetik faktörler
Solar etkiler
UV-A
Hormonal kontrol
Biyolojik modifiye ediciler
Basic fibroblast büyüme faktör (BFGF)
Histamin
İntersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1)
İnflamatuvar durumlar
İlaçlar
Hidrokinon
Monobenzol

Melanin yapımı, biyosentez yolağında rol oynayan çeşitli enzimlerin aktivitesinin kontrolünde gerçekleşen kompleks bir olaydır. Pigment yapımını kontrol eden hormonlardan en önemlileri, Lerner ve Takahashi tarafından keşfedilen melanosit stimüle edici hormondur (MSH). MSH, hipofiz hormonu olup omurgalılarda melanin üretiminde anahtar rol oynar.

2.3. Vitiligo

Vitiligo deride melanosit kaybı sonucu gelişen; keskin sınırlı, beyaz maküllerle karakterize bir depigmentasyon hastalığıdır. Hastalık dikkat çeken görünümünden dolayı eski çağlardan beri bilinmektedir. Vitiligo ilk kez M.Ö. 1500 yılında tanımlanmış ve küçük kusur, hata anlamındaki vitilum kelimesinden türetilmiştir (Arıcan, 2004). M.Ö. 1500-3000 yılları arasında Mısır belgelerinin bir koleksiyonu olan Ebers Papyrus'ta, vitiligo ile karıştırılan aynı zamanda da soluk bir şişlik olarak tanımlanan Lepra hastalığı ile arasındaki farklar üzerinde durulmuş ve beyaz maküllerin tanımı yapılmıştır (Kovacs S. O., 1998). Japon Shinto azizlerine ait, M.Ö. 1200'e ait vitiligo tanımları bulunmuştur. Bir Hint kitabı olan Manu Simitri'de (M.Ö.200) geçmekte olan Swetha Kusttha'nın beyaz hastalık anlamına geldiği ve bununla Vitiligo'nun kastedildiği sanılmaktadır. On dokuzuncu yüzyılın sonlarında Louis Brocq, vitiliginöz lezyonları pigment kaybı olarak tariflerken, Moritz Kaposi vitiligonun ilk histopatolojik bulgularını tanımlamıştır (Arıcan, 2004; Sharqui, 1984). Halk arasındaki adı "ala hastalığı"dır (Pişkin, 2011).

Vitiligo, etiyolojisi tam olarak bilinmeyen, herediter veya edinsel olabilen, spesifik olarak melanosit yıkımı ile seyreden; klinik olarak iyi sınırlı, değişik büyüklük ve lokalizasyonlarda, süt beyazı renginde, genellikle simetrik, bazen unilaterale olup dermatomal dağılım da gösterebilen depigmente maküllerle karakterize bir hastalıktır. Her boyutta rastlanılan lezyonlar genellikle çevreye doğru genişleyerek birleşirler (Kovacs, 1998).

Vitiligo her ne kadar vücudun herhangi bir bölgesinde görülebilse de, hastalığın en belirgin görülme yerleri yüz, ellerin dorsal kısımları, meme uçları, aksilla, göbek, sakrum, inguinal ve anogenital bölgedir.

Vitiligo genellikle çocukluk veya genç erişkin yaşta başlamakla birlikte, hastaların yaklaşık %50'sinde 20 yaşından önce başlar ve insidansı yaşla birlikte azalır (Lerner, 1959; Das, 1985). Vitiligo epidemiyolojisine ilişkin yapılan çalışmalarda hastalık insidansının %0,14- 8,8 gibi geniş aralık gösterdiği ortaya konmuştur (Mosher ve ark., 1999). Bazı kaynaklarda bu insidans oranı % 0.5-2 oranında verilmiştir (Metin ve ark., 1999).

Vitiligonun ailesel yatkınlığı ilk olarak 1933'de bildirilmiş olup hastalığın altta yatan genetik nedenleri üzerine çok sayıda çalışma yapılmış ve sonuçlar genetik faktörlerin vitiligonun gelişiminde önemli rolü olduğunu göstermiştir (Liu ve ark., 2005).

2.3.1. Vitiligonun Yerleşim Yerine Göre Sınıflandırması

Vitiligo, hastalığın yaygınlığına ve yerleşme bölgelerine göre sınıflandırılır (Karıncaoğlu ve ark., 2001) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Vitiligo sınıfları ve klinik özellikleri (Savill, 2015)

Vitiligo	Vitiligo alt tipleri	Klinik özellikler
Lokalize tip	Fokal	Bir alanda bir ya da daha fazla makül, fakat segmental yayılımı açık değildir.
	Segmental	Vücudun unilateral segmenti içeren bir ya da daha fazla makül
Generalize tip	Akrofasiyal	Yüzde Ve Kol Ve Bacakların Dış Kısımlarında Pek Çok Beyaz Alan Vardır.
	Vulgaris	Beyaz Alanlar Klasik Olarak Simetrik Yada Asimetrik Şekilde Dağılmıştır.
Universal tip		Tam Yada Tama Yakın Olarak Tüm Vücuda Yayılmıştır

2.3.1.1. Lokalize Tip Vitiligo

Fokal vitiligo; Lokalize, dermatomal olmayan, izole az sayıdaki depigmente maküller için kullanılan bir terimdir. Vitiligolu çocukların yüzde yirmisinde bu tip vitiligo vardır (Karıncaoğlu ve ark., 2001).

Segmental vitiligo; Asimetrik, dermatomal yerleşimli depigmente lezyonlardır. Bu özel tip vitiligo sabit seyirlidir ve otoimmün hastalıklarla birlikteliği yoktur (Karıncaoğlu ve ark., 2001). Segmental tipin, etkilenen alandaki sempatik sinirlerin disfonksiyonu sonucu oluştuğu; buna karşın non- segmental tipin ise immünolojik bir bozukluk olduğu bildirilmektedir (Aktan ve ark., 1998).

Segmental vitiligo generalize vitiligoya göre daha erken yaşlarda başlar ve ailesel değildir. Etkilenen hastalarda mevcut lezyonlara uzak bölgelerde veya simetrik olarak yenilerinin ortaya çıkması olası değildir. Bu tipte Koebnerizasyon karakteristik değildir (Karıncaoğlu ve ark., 2001).

2.3.1.2. Generalize Tip Vitiligo

Generalize vitiligo en sık rastlanılan vitiligo tipi olup, birkaç adetten yaygın maküllere kadar oluşabilen bilateral, simetrik lezyonlardır. En sık interfarangial eklemler, metakarpal/metatarsal eklemler, dirsekler ve diz gibi ekstensör yüzeylerde yerleşir. Diğer etkilenen alanlar, el bileği volar bölgesi, malleoller, umbilikus, lumbosakral bölge, anterior tibia ve aksilladır (Karıncaoğlu ve ark., 2001).

Vitiligo lezyonları gözler, burun, kulaklar, ağız ve anus gibi periorifisial bölgelerde de yerleşebilirler. Periungal tutulum tek başına veya mukozal tutulum ile birlikte görülür. Akrofasiyal vitiligo parmakların distal bölgeleri ile yüzde periorifisial alanların tutulumudur (Karıncaoğlu ve ark., 2001).

2.3.1.3. Universal Tip Vitiligo

Üniversal vitiligo ise tüm vücut yüzeyinin depigmentasyonu ile karakterizedir. Multipl endokrinopati ile birlikte en sık görülen vitiligo formudur (Karıncaoğlu ve ark., 2001).

2.3.2. Vitiligonun Renk Farklılıklarına Göre Sınıflandırması

Vitiligo lezyonları üzerindeki renk farklılıklarına göre de çeşitli varyasyonlar vardır (Baransü, 1994 ve Mosher, 1999) (Tablo2.4).

2.4. Vitiligonun Epidemiyolojisi

Vitiligo, ten rengi veya etnik kökene bakılmaksızın dünya nüfusunun yaklaşık %1'ini etkileyen yaygın bir deri hastalığı olarak bilinir (Srivastava, 1994 ve Perrot, 1973). Bu oran kültürel ve sosyal farklılıklara göre değişkenlik gösterebilir (Whitton, 2006). Hollanda'da yapılan bir çalışmada, katılımcıların % 50' sinde hastalığın 20 yaşından önce ortaya çıktığı bildirilmiştir (Westerhof, 1996).

Tablo 2.4. Vitiligonun renk farkına göre sınıflandırılması (Braun ve ark. 2000; Ortonne ve ark. 2003)

Renk farklılıklarına göre vitiligo çeşitleri	Klinik özellikleri
Trikrom vitiligo	Tipik vitiligomakül rengi ile normal deri rengi arasında açık kahverenginiçeren (üç ayrı renk) maküller için kullanılan terimdir.
Kuadrikrom vitiligo	Dört renk içeren maküllerdir; repigmente perifoliküler veya marjinal hiperpigmente lezyonlardır ve özellikle koyu renk deri tipinde görülür.
Pentakrom vitiligo	Beyaz, açık kahverengi, kahverengi hiperpigmente, mavi-gri hiperpigmente ve normal deri rengi olmak üzere beş rengi içeren lezyonlardır.
İnflamatuar vitiligo	Eritematöz, sınırları deriden kabarık tinea versikolor lezyonlarına benzer özelliktedir. Ancak vitiligo lezyonları tek başlarına klinik olarak inflamatuvar dermatozlara benzemezler.

Ülkemizde ise Dermatoloji polikliniğine başvuran hastaların %0.15-0.71'ini Vitiligo hastalarının oluşturduğu belirtilmiştir (Turgut, 1971 ve Metin, 1999). Bu hastaların

yaklaşık %25 kadarının 8 yaş altında olduğu, her iki cinsin eşit olarak etkilendiği kabul edilmektedir (Arıcan, 2004). Arıcan ve ark. (2004)'nın yaptığı bir diğer çalışmaya katılan 113 vitiligo hastasının %53.1'ini kadınlar, %46.9'unu erkekler oluşturmaktadır. Yine aynı çalışmada hastalığın başlangıç yaşı ortalaması erkeklerde 29.21, kadınlarda 33.43, ortalama 24.48 bulunurken; 20 yaş altı başlama oranı %49.6 olarak bulunmuştur. Diğer kaynaklarda ise hastalığın doğumdan 81 yaşına kadar görülebildiği bildirilirken, kadınlarda %73 gibi yüksek oranlar verilmiş ve bu yüksek insidans kadınların kozmetik sorunlara erkeklere oranla daha fazla ilgi göstermelerine bağlanmıştır (Mosher, 1999; Nordlund, 1982; Arıcan, 2000 ve Bologna, 1988).

2.5. Vitiligonun Etiyopatogenezi

Vitiligo etyolojisi net olarak bilinmemekle birlikte kompleks bir yapı gösterir. Melanosit yıkımı, infeksiyöz, kimyasal, nörokimyasal maddeler ile yada psişik stres, fiziksel travma gibi maddeler ile olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda genetik yatkınlığın yanında stres, sistemik hastalıklar ve fiziksel travma gibi birçok etkileyici faktörün varlığı gösterilmektedir (Pişkin, 2011).

2.5.1. Patogenezi

Günümüzde bu açıdan üç ana teori öne sürülmüştür (Arıcan, 2004).

2.5.1.1. Otoimmün Teori

Vitiligo patogenezinde en popüler olan teori otoimmün teoridir. Bu teoriye göre; melanositler, humoral ve hücrel immünitedeki değişimler sonucunda yıkılmaktadır (Bagherani, 2011 ve Sarıcaoğlu, 2012). Otoimmün teori, Vitiligo'nun çok sayıda otoimmün olduğu düşünülen hastalık ile klinik ilişkisi üzerine dayalı bir hipotezdir (Bleehen, 2004). Vitiligo, Addison hastalığı, diabetes mellitus, tiroid hastalıkları özellikle de Hashimoto tiroiditi ve Graves hastalığıyla birliktelik gösterir (Rezaei ve

ark., 2007) (Tablo 2.5). Asıl görevi canlıyı ultraviyole ışığından korumak olan melanositlerin immün sistem ile bağlantısı son yıllarda anlaşılmıştır (Dunn, 1986).

Tablo 2.5. Vitiligo ile ilişkili otoimmün hastalıklardan bazıları (Arıcan, 2004)

Adison hastalığı
Alopesia areata
Diabetes mellitus
Hipertiroidizm
Hipoparatiroidizm
Pernisiyöz anemi

Melanositler major histokompatibilite kompleksi (MHC) class1 ve 2 moleküllerini, intrasellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi adezyon moleküllerini ayrıca da interlökin IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokinleri ve transforming growth faktör (TGF)- β_1 'i de salgılamaktadır (Baransü, 1994). Ayrıca melanositlerin fagositoz yeteneklerinin yanı sıra T hücrelerine antijen ve antijenik peptidlerin sunulmasında da görev alıyor olabilecekleri düşünülmektedir (Van Den Wijngrd, 2001). Bu bulgular melanositleri immün sistem içine çekmekte ve vitiligonun immün sistemle bağlantısına daha çok ağırlık verilmesi gerektiğinin işaretlerini taşımaktadır.

Vitiligolu hastalarda hem humoral hem de hücrel immünite de değişiklikler olur. Humoral immüitenin olaya katılımı ilk olarak melanositlere karşı antikorların bulunması ile ortaya konulmuştur (Baransü, 1994). Otoimmün patogeneze ait en önemli kanıt vitiligolu hastalarda görülen otoantikorların gösterilmesidir. Vitiligo antikorları değişik melanosit antijenlerine (tirozinaz, tirozinaz ile ilişkili protein-1 ve 2) karşı yönelirler. Vitiligo antikorları genellikle hücre yüzeyinde lokalize olan 35 kDa, 40-45 kDa, 75 kDa, 80 kDa, 150 kDa pigment hücre antijenlerine afinite gösterirler. Yapılan bir çalışmada vitiligoda depigmentasyonun yaygınlığının melanositlere karşı oluşan antikorların seviyesi ve insidans ile iyi bir korelasyon gösterdiğini saptamışlardır. Bazı hastaların serumlarında melanositlere karşı

antikorlar ve artmış sıklıkla diğer otoantikorların (antipariyetal hücre antikor, antitiroid mikrozomal antikor ve antipariyetal hücre antikor gibi) varlığı otoimmün teoriyi destekler (Tablo 2.6)

Tablo 2.6. Vitiligo ve ilişkili otoantikorlar (Arıcan, 2004)

Vitiligolu hastalarda görülen otoantikorların listesi
Adrenal
Gastrik parietal
Mitokondriyal
Nükleer
Düz kas
Tiroid

Vitiligo antikorlarının, pigment hücrelerinin yıkımı sonucunda mı ortaya çıktığı yoksa pigment hücrelerinin yıkımına bu antikorların varlığının mı neden olduğu sorusu netlik kazanmamıştır (Rebat, 2008). Bu antikorların hastalığın ilerlemesinde önemli olduğu düşünülmektedir, çünkü bunların invitro şartlar altında melanositlere sitotoksik etkili olduğu bulunmuştur (Le poole ve ark., 1993; Kemp ve ark., 1997). Antimelanosit antikorların varlığının depigmente derinin aktivitesi ile birlikte olduğu saptanmıştır (Naughton ve ark., 1986 ve Harning ve ark., 1991).

Yapılan çalışmalar vitiligoda melanositlere karşı spesifik antikorların saptanmasına odaklanmıştır (Yavuz ve Yavuz, 2013).

Bu spesifik immün anormalliklerin hastalığın bir nedeni mi yoksa bir sonucu mu olduğu bunların melanositlere zarar mı verdiği yoksa başka bir nedenden kaynaklanan melanosit hasarlanmasını arttırdıkları ya da bağlantısız bir olay mı oldukları henüz bilinmemektedir.

Dikkat çeken melanositler için spesifik proteinler ile reaksiyon veren antikorlardır (Cui, 1992). Bu bağlamda araştırmalar tirozinaza karşı antikorların saptanması ve

tirozinaz ilişkili proteinler 1 ve 2'ye odaklanmıştır (TRP-1 ve TRP-2) (Yavuz ve Yavuz, 2013). Tirozinaz proteolitik sindirime karşı son derece dayanıklı bir glikoprotein olduğu için, immun yanıtın ortaya çıkarılmasında iyi bir aday olarak görülmektedir (Lang ve ark., 2001). Ayrıca tirozinaz, TRP-1 ve TRP-2'nin melanozomlara spesifik olarak kabul edilmesinin yanı sıra pigmentasyon oluşumunun kontrolünde anahtar proteinler olduğu görülmüştür (Westerhof, 2007). Nonsitotoksik ve antikeratinosit intraselüller antikorlar hastalığının aktivitesi ve şiddeti ile korelasyon gösterir.

Otoimmün hastalıklarla insan lökosit antijenleri (HLA) arasındaki ilişki bilinmektedir (Yang, 2005). Bu konu ile ilgili olarak farklı populasyonlarda yapılan çalışmaların, farklı sonuçlar verdiği gözlenmiştir. *HLA* bağlantıları vitiligoda T hücre aracılı immüniteyi destekleyen bir bulgudur. Taştan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *DRB1*03*, *DRB1*04* ve *DRB1*07* allelleri vitiligo ile ilişkilendirilmiştir (Taştan ve ark., 2004). Kemik iliği transplantasyonu veya lenfoma ve lösemi tedavisinde kullanılan lenfosit infüzyonlarından sonra vitiligo gelişimi rapor edilmiştir. Bu ise otoimmün teoriyi desteklemektedir (Alikhan ve ark., 2011). Vitiligolu hastalarda Melan-A/Mart1'e (melanosomal bir antijen) özgü CD8 pozitif T hücreleri periferal kanda yüksek oranda bulunmaktadır (Kemp ve ark., 2001; Moretti, 2003). CD4 ve özellikle CD8 (+) T hücreleri aktif hastalık boyunca melanosit hasarı ile ilişkilidir (Das, 2001). İmmünohistokimyasal çalışmalar generalize vitiligoda (CD3+, CD4+ ve CD8+ T hücreleri ile CD68+ makrofajlar dahil) immünositlerin tutulmuş derinin çevresinde de varlığını göstermektedir. Bu T hücre infiltrasyonu içinde önemli oranda CD8+ T hücreleri izlenmektedir (Kemp, 2001). Vitiligo lezyonlarının aktif kenarından alınan biyopsilerde immünojenik süreci destekleyen lenfositik infiltrat gösterilmiştir (Bahadır, 2006). Vitiligonun patogeneğinde hücrel immün süreçlere işaret eden güçlü kanıtlar vardır. Melanositler doğrudan otoproteolitik sitotoksik T hücreleri tarafından yıkılmaktadır (Lang ve ark., 2001). Otoproteolitik hipotezin temelinde yer aldığı düşünülen oksidatif stresin, hücre ölümüne yol açmak suretiyle, birçok patolojik olayda rol oynadığı bilinmektedir (Sabuncuoğlu, 2006). Glikoprotein 100 ve tirozinaza karşı reaktivite gösteren çok sayıda CD8+ sitotoksik lenfositler bildirilmiştir (Sarıcaoğlu, 2012).

Hastalarda periferik kanda T helper/ T supressör oranı azalmış olup naturel killer hücrelerinde artma mevcuttur (Bahadır, 2006). Vitiligoda yüksek frekansta fonksiyonu bilinmeyen spesifik protein (Melan A) CD8+ hücreler bulunur ve bu hastalığın yayılımı ve progresyonu ile korelasyon gösteriyor gibi görünmektedir. İnterlökin reseptör 2 (IL-2R)'nin serum seviyeleri invivo immün aktivasyonu moniterize etmek için kullanılabilir ve artmış seviyeler T hücre aracılı immün hastalıkla korelasyon gösterir. Vitiligo hastalarındaki çözünebilir IL-2R seviyesi kontrol grubuna göre belirgin artmıştır, bu durum T hücrelerinin aktivasyonunun vitiligo patogenezinin bir komponenti olabileceğini gösterir. Ayrıca melanositlerdeki intraselüler adezyon molekülü (ICAM-1) ve vasküler adezyon molekülü (VCAM-1) üretimini, Mononükleer hücrelerin IL-6 üretimi T hüceleri üzerinden melanosit kaybına neden olduğu görülmüştür (Denli ve ark., 2008; Rebat, 2008; Aktaş, 2009). Bu daha sonra lökosit-melanosit etkileşimini kolaylaştırır ve pigment hücresinin immünolojik hasarlanmasına yol açar (Denli ve ark., 2008; Rebat, 2008; Aktaş, 2009; Westerhof, 2007).

Hayvan modelleri kullanılarak vitiligo patogenezindeki otoimmün süreçler çalışılmıştır. Mutant Smyth türü tavuklar otoimmün vitiligo için üzerinde iyi çalışılmış hayvan modelidir (Rebat, 2008). Kuşların tüylerinde ve oküler dokularında gelişen hipomelanoz insanlardaki vitiligoya benzerdir. Ayrıca vitiligolu kedi, köpek ve atlarda 85 kd'luk pigment yüzey antijenlerine karşı antimelanosit antikolar tespit edilmesi otoimmün hipotezi destekleyen önemli kanıtlardır (Karıncaoğlu 2001). Vitiligo hastalarının serumlarında melanozomal proteinlere karşı antikolar olduğu rapor edilmiştir (Ochi ve DeGroot, 1969; Baharay ve ark., 1996; Kemp ve ark., 1997).

Vitiligo, apoptozu düzenleyen moleküllerin regülasyon bozukluğuna bağlı olarak da gelişebilir. Vitiligoda in vivo melanosit apoptozunun otoreaktif T hücreler veya makrofajlar tarafından indüklenebileceği bildirilmiştir (Gürkan, 2005).

2.5.1.2. Nöral Hipotez

Nöral hipotez, ilk defa Lerner daha sonra Cuchi tarafından tanımlanmıştır (Lerner, 1959; Cucchi, 2000). Melanositlerin ve nöral hücrelerin aynı embriyonik kresten gelmesi bu teoriyi desteklemektedir. Nöral hipotez sinir uçlarından salgılanan nörokimyasal mediatörlerin pigment hücrelerini tahrip ettiği görüşünü savunmaktadır (Orecchia, 2000). Sinir uçlarından salgılanan nörokimyasal mediatörler ile melanositlerin etkileşimi nöral hipotezin temelidir (Ongena, 2003). Klinik olarak segmental tutulumun olması, lezyonlu alanda terleme ve lokal ısı artışı, kanama zamanının uzaması, hastalığın emosyonel stres sonrasında başlayabilmesi bu hipotezi destekleyici bulgulardır. Ayrıca viral ensefalit, multiple skleroz, nörofibromatozis, Horner sendromu gibi sinir sistemini ilgilendiren bazı hastalıklara da vitiligonun eşlik ettiği görülür (Tayan, 1989; Moretti 2003; Karıncaoğlu, 2001). Lepramatöz lepra da artmış vitiligo prevalansı, melanogenezin sinirsel kontrolünün kaybı sonucu olabilir (Gürkan, 2005).

Vitiligolu hastaların %30'unda nöral faktörlerin rol oynadığı bildirilmiştir (Orecchia, 2000). Deride serbest sinir sonlanmaları ile melanositlerin ilişkisi ve bu ilişkideki olası araçlar iyi tanımlanmamış sadece bazı dokularda farklılıklar olduğu bilinmektedir (Aktaş, 2009). Bununla birlikte dokuda nöromediyatörler yoluyla yönetilen fizyolojik olaylar gösterilmiştir. Bu hipotezi destekleyen biyokimyasal bulgular ise; asetilkolinin depigmentasyona neden olması ve lezyon kenarındaki melanositlerde dopa oksidaz aktivitesinin baskılanmasıdır. Asetilkolin esterase aktivitesi repigmente deride görülürken, depigmente deride görülmemektedir. Artan asetilkolin hücreler için direk sitotoksik olabilir ve indirek olarak lokal vazokonstrüksiyon sonucu hipoksiye neden olabilir (Alikhan, 2011). Bazı çalışmalarda vitiligolu hastalarda asetilkoline bağlı depigmentasyon bildirilmiştir. Yaşlandıkça saçların beyazlaşmasının saçlarda kolinesteraz miktarının azalmasına dolayısıyla asetilkolin miktarının artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu durum artan asetilkolin miktarının depigmentasyona neden olabileceği bilgisini desteklemektedir (Tayan, 1989; Karıncaoğlu, 2001).

Tirozin hem epinefrin, hem de melanin sentezinde bir substrattır. Epinefrin ratlara enjekte edildiği zaman depigmentasyona neden olmaktadır. Epinefrin ve melanin prekürsörleri arasındaki kimyasal benzerlikler nedeniyle, epinefrin oluşumu esnasında sinir uçlarından salınan çeşitli ara ürünler melanositleri zedeleyici etkiye sahip olabilirler (Orecchia, 2000). Progresif ve yeni başlangıçlı vitiligolu hastalarda epinefrin ve norepinefrin metabolizma ürünleri olan homovalinilik asit ve vanilmandelik asit idrar seviyelerinde artış saptanmıştır (Yavuz ve Yavuz, 2013). Bu artış nöral teoriyi desteklemektedir.

2.5.1.3. Otositotoksik Teori ve Oksidatif Stres

Otositotoksik olayların vitiligonun patogenezinde rolü olduğu ilk olarak Lerner tarafından ileri sürülmüştür (Lerner 1959; Cucchi ve ark., 2000). Melanin sentezi sırasında ortaya çıkan tirozin analogları ve ara ürünler melanositler için oldukça toksiktir (Kovasc, 1998). Bu ara ürünlerden indol ve serbest radikaller melanositlerde birikerek hücre hasarına neden olur (Westerhof ve Wand, 2007). Melanin sentezinde fenilalaninden oluşan tirozin, tirozinaz ile dopa'ya, dopa'da dopakinon'a dönüşür. Bu sentez sırasında oluşan tirozin analogları ve aynı zamanda dopa, dopakrom gibi ara ürünler melanositlere toksik etki yapar. Normal melanositler bu ara ürünleri kendi koruma mekanizmalarıyla uzaklaştırır (Schallreuter, 2005).

Vitiligolu hastalarda bu koruyucu mekanizmaların bozuk olduğu ileri sürülmektedir (Westerhof ve Wand, 2007). Bu teoriyi destekleyen en önemli klinik bulgu, tirozin analogu olan bütülfenol ile temas eden işçilerin bir kısmında vitiligoya benzer kimyasal lökoderma oluşmasıdır (Mosher, 1999).

Bazı çalışmalarda melanositlere toksik etkili serbest radikal birikiminin, melanositlerde yıkıma yol açması iddia edilen oksidatif stres teorisini destekler (Denli ve ark., 2008). Stres işareti olarak da melanositlerdeki düz endoplazmik retikulum genişlemesi dahil olmak üzere tüm epidermal hücrelerde çeşitli derecelerde vakuolizasyon olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stres, katalaz gibi

antioksidan enzimlerle korunmadıkça invitro şartlar altındaki melanositlerin ölümüne neden olmaktadır (Schallreuter ve ark., 2003). Vitiligoda oksidatif stresin kanıtlanması depigmente epidermiste direkt olarak hidrojen peroksidin invivo ölçümü ile yapılır. İnvivo olarak noninvaziv Fourier transform spektroskopy ile depigmente epidermiste hidrojen peroksidin direk olarak ölçülerek vitiligoda oksidatif stresin olduğu kanıtlanmıştır. Topikal olarak psödokatalaz krem tedavisi alan hastaların %95'inde hastalığın ilerleyişi durdurulmuş ve yaklaşık %60'ında repigmentasyonun başladığı saptanmıştır (Schallreuter, 2005). Vitiligolu hastalarda hidrojen peroksit birikiminin biyokimyasal nedeni birçok araştırmanın hedefi olmuştur. İlk önce bu hastaların tüm epidermisinde düşük katalaz seviyesi olduğu gösterilmiştir (Westerhof ve Wand 2007; Kutlubay, 2011). Bununla beraber bu hastalarda katalaz seviyeleri düşmüş olsa da katalaz mRNA'sının ekspresyonu değişmemiştir.

Segmental vitiligoluların lezyonlu ve normal derisinde, ayrıca kültüre edilmiş melanositlerde epidermal H₂O₂ (Hidrojen peroksit) birikimine yol açan düşük katalaz düzeyleri saptanmıştır (Maresca ve ark., 1997; Passi ve ark., 1998). Kültüre edilmiş melanositlerin fizyolojik H₂O₂ konsantrasyonlarında dendritlerini kaybettiği gösterilmiştir. Melanin ve katekolamin sentezi arasındaki kompleks ilişkilerin H₂O₂ tarafından bozulabileceği ileri sürülmüştür (Gauthier ve ark., 2003; Schallreuter ve ark., 2001). İnvitro olarak N-asetil sistein eklenerek hidrojen peroksidin etkisi engellenebileceği gösterilmiştir (Schallreuter ve ark., 2005).

Wood ışığı ile muayenede, vitiligolu beyaz, sarı/yeşil veya mavimsi floresans gösterir. Bu klinik gözlemlerden yola çıkarak iki farklı okside pteridin birikiminin bu duruma yol açacağı düşünülmekte olup bunlardan 6-biopterin mavimsi floresansa, izomeri 7-biopterinin sarı/yeşil floresansa neden olmaktadır. Fazla miktarda 6 ve 7 biopterin üretimi vitiligolu hastalarda tetrahidrobiopterinin hemostazında bir metabolik defekti düşündürmektedir. Böylece hidrojen peroksit seviyelerinde artış olmaktadır (Sarıcaoğlu ve Bülbül, 2012).

Vitiligo etyopatogenezinde etkili ve netliğe kavuşmayı bekleyen birçok faktör vardır (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. Vitiligo etyopatogenezinde etkili diğer faktörler

Melanosit büyüme faktör eksikliği	Hipofiz bezinden salgılanan MSH (melanin uyarıcı hormon) deriye, göze, saçlara renk veren bir maddedir.
Melanositoraji hipotezi	Vitiligolu deride ekstraselüler matriks proteini olan tenaksin miktarında artış olur. Tenaksin, melanositlerin fibronektin adezyonunu engellereyerek yıkımına neden olur.
Apoptozis	Apoptozis regüle eden moleküllerinden Bcl-2 ve Bax proteinlerinin seviyelerinin deđişmesi vitiligoya sebep olabilir.
Homosistein metabolizma bozukluđu ve vitaminler	Homosistein metabolizması hem folik asit hemde vitamin B12 bağlıdır. Yaygın vitiligolu hastalarda homosistein seviyelerinde artış folik asit hemde vitamin B12 seviyelerinde azalış tespit edilmiştir.
Virusler	Human immunodeficiency virus (HIV)' li hastalarda vitiligonun daha yaygın seyrettiğini belirten çalışmalar mevcuttur.
Çinko metabolizması	Çinko potansiyel olarak antiapoptotiktir. Melanogenez sürecinde çok önemli eser elementtir. Çinko eksikliği hücrel aracılıklı imünitede bozukluğa neden olur. Melanosit stimüle hormon salınımında ve sentezinde rol oynar.
Psikolojik stres	Vitiligolu hastalarda yapılan çalışmada %40 vakada depresif ve benlik saygılarının düşük olduğu saptanmıştır.
Presipite edici ajanlar	Isı, ultraviyole ışını ve basınç gibi fiziksel travmalar sonrasında lezyonların başlaması veya yeni lezyonların gelişimi vitiligoda sık görülen bir olaydır.

2.5.2. Genetik Faktörler

Vitiligo'nun ailesel yatkınlığı 1933'de bildirilmiş olup hastalığın altında yatan genetik nedenler üzerine çok sayıda çalışma yapılmış ve sonuçlar genetik faktörlerin vitiligonun gelişiminde önemli rolü olduğunu göstermiştir (Baransü, 1994). Büyük ölçekli epidemiyolojik çalışmalar gösteriyor ki; birçok vitiligo örneği sporadiktir fakat, hastaların %15-20'sinde hastalıktan etkilenmiş bir veya daha fazla birinci derece akraba bulunur (Birlea ve ark., 2012). Olguların %25-30'unda aile hikayesi mevcuttur (Karıncaoğlu, 2001). Vitiligolu hastaların %30'dan fazlasında bir aile üyesinin ve %21'den fazlasında da birinci kuşak aile üyelerinin etkilenebildiği tespit edilmiştir (Majumder, 1993). Kim ve ark.'nın (1999) yaptığı çalışmada 1030 vitiligo olgusunun 120'sinde aile öyküsü bildirilmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise vitiligolu olgularda %12.4 oranında aile öyküsü belirtilmektedir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada Vitiligo'dan etkilenen bireylerin 1. derece akrabaları arasındaki prevalans değeri 4.5 katlık bir artış göstermektedir (Das ve ark., 1985).

Karakteristik olarak, örneklerin ailesel dağılımı, hastalığın poligenik ve multifaktöriyel olup non-mendeliyen bir kalıtım gösterdiğini destekler niteliktedir. Monozigotik ikizlerde konkordans oranı %23'tür, bu da genetik olan ve olmayan faktörlerin birlikte hastalığın patolojisinde önemli rol oynadığını gösterir (Birlea ve ark., 2012).

Hastalığın etiolojisinde genetik faktörün rol oynadığı konusunda şüphe yoktur (Bleehen ve Anstey, 2004). Çoğu araştırmacı vitiligo hastalığının multifaktöriyel ve poligenik geçişli olduğunu düşünmektedir (Arıcan, 2004).

Vitiligonun genetik temeline ilişkin ilk veriler Stüttgen, Teindel ve daha sonra Lerner tarafından yayınlanmıştır (Spritz, 2012). Pek çok çalışmada Vitiligo'nun Mendeliyen tek gen kalıtımı göstermediği fakat ailesel yatkınlık gösterdiği kaydedilmiştir. Bunun üzerine Stüttgen yıllarca "karmaşık miras" denilen modern genetik kavramında, hem resesif hem de dominant özelliklerin eşzamanlı olarak etki ettiğine dikkat çekmiştir.

Vitiligoda genetik faktörlerin rolü yakın akrabalar arasındaki olgularda sık kümeleme olduğu için uzun zaman önce kabul edilmiş ve Das tarafından yapılan genetik epidemiyolojik çalışmalar ile halen kabul edilen multifaktöryel ve poligenik kalıtım gösteren "kompleks hastalık" olarak değerlendirilmiştir (Spritz, 2011). Daha sonra, Das ve ark. (1985), Mendeliyen kalıtım göstermeyen Vitiligo olgularının sık ailesel kümelenme gösterdiğini bildirmiştir. Majumder ve ark. (1993), hastalığın resesif multilokus bir kalıtım modeli olduğunu önermiştir (Spritz, 2011). Diğer pek çok araştırmacı ise halen vitiligonun poligenik ve multifaktöryel kalıtmı olduğunu kabul etmektedir.

70'li yıllardan itibaren, vitiligoda sıklıkla *HLA* analizleri yapıldı ve söz konusu çalışmalarda çelişkili bulgular rapor edilmiştir. Daha sonra, diğer birçok aday gen ile vitiligo arasındaki ilişki çalışılmıştır. Yapılan pek çok çalışmada her ikisi de bağışıklık düzenleyicilerini kodlayan *PTPN22* ve *CTLA4*'ün hastalık ile ilişki gösterdiği sonuçları rapor edilmiştir (Spritz, 2011).

Vitiligonun genetiği üzerinde yapılan çalışmaların çoğu Generalize vitiligo (GV) üzerine yoğunlaşmıştır. GV etkilenen bölgelerden melanositlerin otoimmün kaybı sonucunda parçalı depigmentasyona sebep olan kompleks bir hastalıktır (Taieb ve Picardo, 2009; Birlea, 2011).

Çin'de ve Kafkas topluluklarında yapılan iki farklı ilişkilendirme çalışmasında, GV ile ilişkili en az 16 farklı lokus rapor edilmiştir (Jin ve ark., 2010; Quan ve ark., 2010). Bu genler bağışıklık sistemi regülasyonunda rol oynayan proteinleri kodlar ve/veya diğer otoimmün hastalıklara duyarlık ile ilişkilendirilmiştir (Jin ve ark., 2010; Quan ve ark., 2010).

İmmun fonksiyonları olan birçok *MHC*, *CTLA-4*, *PTPN22*, *IL10*, *MBL2* (mannose-binding lectin- 2) ve *NLRP1* (NLR Family, Pyrin Domain Containing 1) 'i içeren gen lokusları ile GV üzerinde genetik temelli ilişkilendirme ve bağlantı çalışmaları yapılmıştır (Birlea, 2012). Avrupa Beyaz ırkında GV hastaları ve etkilenmiş aile

bireyleri üzerinde GV riskine etkisi bulunan on farklı loküste büyük bir genom ilişkilendirme çalışması (GWA) yapılmıştır (Birlea, 2012). Bu genlerden yedi tanesi [*HLA-classI*, *HLA-classII*, *PTPN22*, *LPP* (Lipoma Preferred Partner), *IL2RA*, *UBASH* (Ubiquitin Associated And SH) *3A* ve *CIQTNF6* (C1q and Tumor Necrosis Factor Related Protein 6)] otoimmün hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. Diğer iki tanesi RERE [Arginine-Glutamic Acid Dipeptide (RE) Repeats] ve GZMB (Granzyme B) immün fonksiyonu olan proteinleri kodlar. Bir diğer gen ise melanin biyosentezinde anahtar rol oynayan ve büyük GV otoantijeni olan tirozinazı kodlayan *TRY* (Tirozinaz) genidir (Birlea ve ark., 2012).

Human lökosit antijenleri (*HLA*) ve vitiligo arasındaki ilişki üzerine yapılan çok sayıda çalışma değişik bulgular göstermiştir (Ortonne, 2003). Belirli *HLA* haplotipleri, vitiligoya ait aile öyküsü, hastalığın yaygınlığı, başlangıç yaşı ve populasyonun yaşadığı coğrafya ile güçlü olarak ilişkilidir (Zamani ve ark., 2001; Finco ve ark., 1991). *HLA* inceleyen vaka kontrol çalışmaları tutarlı şekilde göstermiştir ki; *HLA DR4* ile vitiligo arasında pozitif bir ilişki, *HLA DR3* ile negatif bir ilişki vardır. Rapor edilmiş diğer pozitif ve negatif ilişkiler ise *DW7*, *DR7*, *DR1*, *B13*, *A2*, *B21*, *CW6*, *DR53*, *A19* ve *DR52*'dir (Ortonne, 2003). *HLA* lokusunun *MHC Klas 2* bölgesinde bulunan gen polimorfizimi, tip1 diabetes mellitus ve juvenil başlangıçlı romatoid artrit gibi diğer otoimmün hastalıklarla da ilişkili bulunmuştur (Deng ve ark.,1995; Prahalad ve ark.,2001).

Kontrollerle karşılaştırıldığında kültüre vitiligo melanositlerinde DNA sentezi, tirozinaz aktivitesi ve UVB'ye cevapta anlamlı bir fark gösterilmemiş olmakla birlikte bu melanositlerde uzun süreli kültürlerde spesifik sitolitik değişiklikler görülmüştür. Bu melanositlerde herediter ve intrinsik bir defekt olabileceğini de düşündürmektedir (Catanet, 1997).

Segmental vitiligo GV'dan farklı olarak görülür. Genellikle sporadik ve unilaterale dağılım göstermesi, kendiliğinden gelişen mutasyonlar yüzünden somatik mozaizmin sebep olabileceği düşüncesine yol açar. Belki de bu genler

melanoblast/melanosit gelişimi veya korunması için önemlidir fakat bunların teyit edilmesi gerekir. Bu genler bir arada generalize vitiligo üzerinde genetik riskin nispeten küçük bir kısmını oluşturmaktadır (Birlea ve ark., 2012).

Generalize vitiligonun patogenezinde genetik faktörlerin varlığı için en kuvvetli kanıt hastaların yakın akrabaları ile yapılan çalışmalardır. Kafkas ırkına mensup hastaların kardeşlerindeki risk %6.1 olup bu Kafkas ırkına mensup popülasyondaki generalize vitiligonun %0.38'lik sıklığı üzerinden 16 kat artmış rölatif riski gösterir. Kardeşlerin yanısıra hastaların birinci derece akrabalarında da generalize vitiligo için benzer bir risk vardır. Kafkas ırkına mensup kişilerde %7.1, Pakistanlılarda %6.1 ve İspanyollarda %6.8 olup daha uzak akrabalarda riskler daha düşük bildirilmiştir (Alkhateeb ve ark., 2003; Laberge ve ark., 2005).

Generalize vitiligonun genetik komponenti olduğuna dair ilave bir kanıt da hastalığın başlangıç yaşı ile ilgili verilerden gelir. Çoğu sporadik olan Kafkas ırkına mensup vitiligo hastalarında hastalığın ortalama başlangıç yaşı 24.2 yıldır. Ancak çok sayıda aile bireyinin vitiligodan etkilendiği hastalarda hastalığın ortalama başlangıç yaşı daha erken olup ortalama 21.5 yıldır (Alkhateeb ve ark., 2003; Laberge ve ark., 2005).

Yapılan başka bir çalışmada erken başlangıçlı vitiligolu hastalarda etkilenmiş akraba sayısının artmaya eğilimli olduğunu ve hastalığın daha yaygın tutulum gösterdiğini düşündürmektedir. Bu bulgu erken başlangıçlı hastalığın patogenezinde nisbeten daha fazla bir genetik komponent olduğunu düşündürür (Majumder, 1993). Bu gözlemler yani ailesel vakalarda erken başlangıç yaşı ile artan genetik yakınlık ve genetik uzaklık arttıkça hastalık riskinin düşmesi poligenik kalıtımın karakteristik özellikleri olup yapılan çalışmalar en azından 3 veya 4 major lokusun kompleks interaktif bir halde vitiligodan sorumlu olabileceğini öne sürmektedir (Nath ve ark., 1994).

Erken başlangıçlı olan hastalarda (30 yaşından önce) vitiligo dominant bir kalıtım şekli izler. Resesif bir genotip ve belirli çevresel tetikleyiciler ile ortaya çıkan

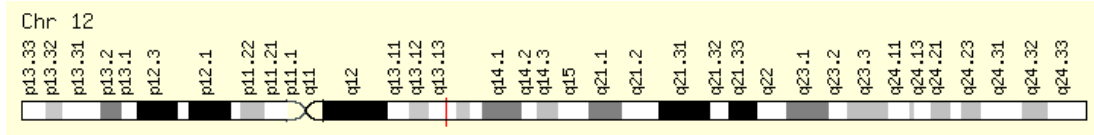
vitiligoya bir eğilim olması geç başlangıçlı vitiligonun kalıtım paternini açıklamaktadır (Huggins ve ark., 2005). Bu ve diğer veriler generalize vitiligoda major bir genetik komponentin varlığını desteklemektedir. Bunun yanısıra ikizlerle yapılan çalışmalar generalize vitiligonun patogenezinde genetik bileşenlerin önemli bir rolü olmakla birlikte nongenetik faktörlerin de oldukça önemli olduğunu göstermiştir (Spritz, 2006).

Bu güne kadar yapılan en geniş vitiligolu ikiz çalışmasında monozigotik ikizlerde generalize vitiligo için birliktelik %23 olarak rapor edildi. (Alkhateeb ve ark., 2003). Bu genel popülasyondaki riskten ve vitiligo hastalarının kardeşlerindeki %6.1'lik riskten çok daha büyüktür ve bu veriler de genetik bileşenlerin önemini desteklemektedir. Ancak birbirlerine benzeyen ikizlerin diğer tüm genleri de benzemekte olup bu sınırlı birliktelik aynı zamanda nongenetik, muhtemelen çevresel faktörlerin de önemli bir rol oynuyor olması gerekliliğini gösterir (Spritz, 2006).

2.5.2.1. MYG1 geni: Melanosit Üretici Gen 1

MYG1 vitiligo genetiği için aday bir gen olarak tanımlanmıştır (Philips ve ark., 2009). 12q13.13'de lokalizedir (Şekil 2.6) (Weizmann Institute of Science, 2015). *MYG1* proteini yüksek derecede korunmuştur ve mayalardan insana kadar tüm ökaryotlarda mevcuttur (Nepomuceno-Silva ve ark., 2004). *MYG1* deney hayvanlarının embriyonik gelişimi sırasında değişen bir ekspresyon paterni ve seviyesine sahiptir. Hayvan ve insan çalışmaları *MYG1*'in iki-dört hücreli hücre embriyolarından başlayan erken hücrel süreçlere ilaveten, yetişkinlerde patolojik durumlar ve stres şartlarına katıldığını göstermektedir (Philips ve ark., 2009). Bununla birlikte *MYG1*'in ekspresyonu normal hayvan dokularında stabildir ve sadece patolojik şartlarda değişmektedir (Hawse ve ark., 2003; Koks ve ark., 2004; Kingo ve ark., 2006). Dahası, *MYG1* ekspresyonu mitokondri ve nükleusta subselüler bölgede gösterilmiştir. *MYG1* mRNA'sının artması vitiligo ve atopik ekzama hastalarında hem normal deride hem depigmente bölgede gösterilmiştir (Sääf ve ark.,

2003). *MYG1* TNP olarak tanımlanmış on polimorfizme sahiptir ve bunlardan iki tanesi potansiyel olarak fonksiyoneldir. *MYG1*'in 119 bç upstream translasyon başlangıç bölgesinde yer alan ve promotör polimorfizmi olan bizim de çalışmış olduğumuz -119C/G (rs1465073) vitiligoya yakınlıkla ilişkilendirilmiştir (Philips ve ark., 2010). Bu da *MYG1* polimorfizmlerinin vitiligoda ne kadar güçlü bir rolü olduğunu göstermektedir. -119G alelinin kontrollere göre vitiligo hastalarında daha yaygın olduğu rapor edilmiştir (Philips ve ark., 2009; Diwivedi ve ark., 2013). Özellikle aktif vitiligo hastalarında durağan hastalara göre -119G alelinin artış gösterdiği, bunun da -119G alelinin hastalağın ilerlemesinde ne kadar önemli olduğuna dikkat çekilmiştir. İlâveten, GG ve CG genotipine sahip hastalarda artmış *MYG1* mRNA ekspresyonu olduğu, -119G alelinin hastalarda görülen artmış mRNA seviyelerinine sebep olmuş olabileceği bildirilmiştir. Benzer olarak, Philips ve ark. (2009), derideki artmış *MYG1* mRNA seviyeleriyle -119G alelini ilişkilendirmişler ve -119G aleli açısından homozigot hastalarda önemli derecede yüksek mRNA seviyesi rapor etmişlerdir.

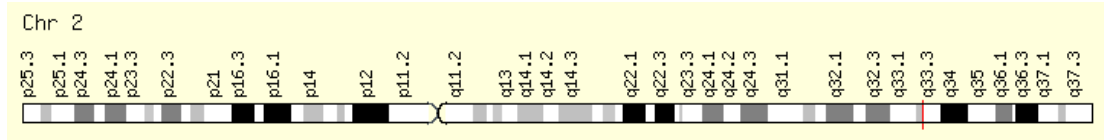


Şekil 2.6. *MYG1* geninin kromozomal lokasyonu (Weizmann Institute of Science, 2015).

2.5.2.2. *CTLA-4* geni: Sitotoksik T lenfosit İlişkili Antijen 4

CTLA4 2q.33'de lokalize olup, birçok otoimmün hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Kristiansen ve ark., 2000) ve immün sistemin negatif düzenleyici bir molekülünü kodlamaktadır (Solomon and Bluestone, 2001) (Şekil 2.7). İmmünoglobulin süper ailesine ait bir yüzey molekülü olup (Brunet ve ark., 1987) sadece aktif T hücrelerinde eksprese edilmektedir. *CTLA4* T hücre aktivasyonunun negatif düzenlenmesine ve T hücre apoptozunun kontrolüne katılmaktadır (Das ve ark., 2001). Birçok *CTLA4* polimorfik aleli otoimmün hastalıklara yakınlıkla ilişkilendirilmiş, bunlardan bazıları da vitiligoyla ilişkilendirilmiştir (İtrılı ve ark., 2005; Fattahi ve ark., 2005; Pehlivan ve ark., 2009). *CTLA4* ile ilgili sonuçların

yorumlanması zordur, çünkü meta analizlere göre *CTLA4*'ün vitiligo ile ilişkisi zayıf görünmektedir. Bunun sebebinin muhtemelen *CTLA4*'ün diğer otoimmün hastalıklarla olan ilişkisi olduğu öne sürülmektedir (Al-Shobaili, 2011). *CTLA4* geninde bulunan polimorfizmlerin sadece eşlik eden bir otoimmün hastalık mevcutsa vitiligoya yatkınlık oluşturduğu bildirilmektedir. Bu durum da vitiligonun iki ayrı formu olduğu ihtimalini arttırmaktadır. Bir grup vitiligo hastasında sadece melanositlerin otoimmün yıkımı sonucunda hastalık meydana gelmektedir (Kemp ve ark., 1999; Bloomhoff ve ark., 2005). Kısaca çalışmalar, vitiligonun herhangi bir otoimmün hastalıkla ilişkilendirilmediği durumlarda *CTLA4* polimorfizmlerinden etkilenmediğini göstermektedir.



Şekil 2.7. *CTLA4* geninin kromozomal lokasyonu (Weizmann Institute of Science, 2015).

2.6. Polimorfizm

2003 yılında insan genom dizisinin tamamlanmasıyla biyomedikal araştırmalar için yeni dönem başlamıştır. Bu durum, genetik varyasyonların ve gen ekspresyonunun tespit edilmesi için yüksek verimli teknolojilerin geliştirilmesi de dahil olmak üzere yaşam bilimlerinde eşi görülmemiş bir ilerlemeyi teşvik etmiştir. Genetiğin çalışılması “büyük veri bilimi” haline gelmiştir. Genetik araştırmalardaki en büyük hedeflerden birisi yaygın kompleks hastalıkların anlaşılması için genetik bilginin kullanılmasıdır. Bu hedefe yönelik ilk önemli adım yüzlerce özellik ve hastalıkla ilişki gösteren binlerce tek nükleotid polimorfizminin (TNP) tanımlanması olmuştur (Hofker, 2014).

Bir hastalığa ya da hastalığa yatkınlığa neden olan DNA dizisindeki varyasyonlar popülasyonda görülme sıklığına göre mutasyon ya da polimorfizm olarak adlandırılır. Dünyadaki birçok bireyin kromozomlarında aynı yerde bulunan DNA

dizileri birbirine benzerlik gösterir. Populasyonda iki birey arasında DNA'nın yaklaşık 1000 bç uzunluğundaki herhangi bir kısmı ortalama olarak sadece bir baz değişimi içerir. DNA dizisindeki varyasyonlar populasyonun %1'inden fazlasında meydana geliyorsa polimorfizm, %1'inden daha azında görülüyorsa mutasyon olarak adlandırılır. Mutasyonlar Mendelyen kalıtıma uyan nadir tek gen hastalıklarından sorumluyken polimorfizmler daha çok yaygın kompleks genetik bozukluklarla ilişkilidir. DNA dizi varyantlarının en yaygın tipi TNP'lerdir (Tebbut ve ark., 2007). TNP'ler insanlarda genetik polimorfizm çalışmaları, insan biyolojisi ve hastalıkların mekanizmalarını anlamak için eşsiz fırsatlar sunmaktadır (Angata, 2014).

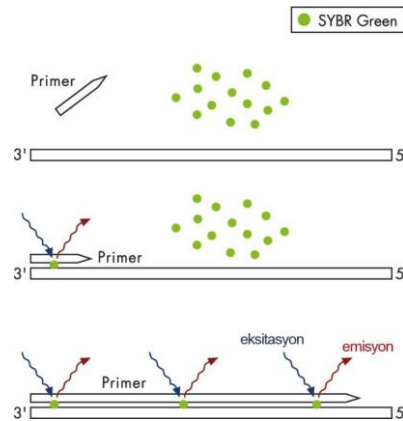
Vitiligo için muhtemel risk faktörü olan bazı genler, protein içinde bir amino asidin diğeriyle yer değiştirmesine (substitüsyon) neden olan TNP'leri içermektedir. Bazı değişimler kodon içinde bir bazın değişmesinden dolayı yaygın olarak "missense" mutasyondan kaynaklanmaktadır. TNP'lerin çok farklı sonuçları vardır. Bu değişimler valin yerine alanin geçmesi gibi protein içinde benzer amino asit değişimlerine neden oluyorsa, bu durum küçük bir protein modifikasyonu ile sonuçlanır. Zıt olarak, diğer substitüsyonlar protein yapısında modifikasyonla sonuçlanan disülfid bağlarında artış, hidrofobide ve yük kapasitesindeki değişimlere neden olur, sonuçta proteinin fonksiyonu ve diğer moleküllerle olan etkileşimi değişir. Bunlardan başka diğer iki substitüsyon tipi yaygın değildir fakat potansiyel olarak missense mutasyonlardan daha yıkıcıdır. Birincisi, glutamat gibi bir aminoasiti kodlayan bir kodonda meydana gelen bir substitüsyon, kodonun stop kodonu haline gelmesine neden olabilir (nullmutasyon veya nonsense mutasyon). Bu durum da sıklıkla çok az bir fonksiyona sahip turunke proteinlerin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. İkincisi, "splice-site" yani kesim bölgesi mutasyonlarıdır. Bu durumda intronu ekson bölgesinden ayıran bir bölgede substitüsyon meydana gelebilir ve bu durum intronik DNA'nın protein sentezine katılmasına ve proteinin doğal yapısından çok farklı oluşmasına neden olabilir.

2.7. Eş-zamanlı PCR Yöntemi

Eş-zamanlı PCR yöntemi araştırmalarda ve rutin uygulamalarda nükleik asitlerin miktar ve karakterizasyonunu belirlemek için altın-standart metod haline gelmiştir.Eş-zamanlı PCR'nin tipik kullanımı patojen belirlenmesi, gen ekspresyon analizleri, TNP analizleri, kromozom aberasyon analizleri ve son zamanlarda eş-zamanlı immüno PCR ile protein belirlenmesi gibi analizleri içermektedir (Kubista ve ark., 2006).

2.7.1. SYBR Green PCR Nedir?

Floresan bir boya olan SYBR Green I tüm çift dallı DNA molekülüne bağlanır, bağlandığı noktada belirli bir dalga boyunda floresan bir sinyal yayar (Şekil2.8). SYBR Green I'in emilimi ve yayılması sırasıyla 494 nm ve 521 nm'de olur ve tüm eş-zamanlı PCR teknolojilerinde kullanılabilir. SYBR Green I kullanıldığında belirlenme eş-zamanlı PCR'nin ekstensiyon basamağında olmaktadır. Sinyal yoğunluğu PCR ürününün artmasıyla her siklusta artmaktadır. SYBR Green boyasının kullanılması hedefe spesifik etiketli prob sentezlenmesine gerek kalmadan çok farklı sayıda hedefin analiz edilmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, spesifik olmayan PCR ürünleri ve primer dimerleri floresan sinyali etkilemektedir. Bu nedenle, SYBR Green boyaları kullanılırken yüksek PCR özgüllüğü gereklidir.

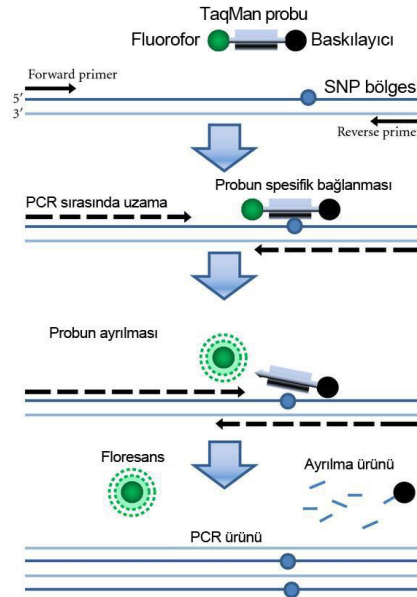


Şekil 2.8. SYBR Green PCR prensibi (Qiagen, 2015).

2.7.2. Prob Temelli PCR Nedir?

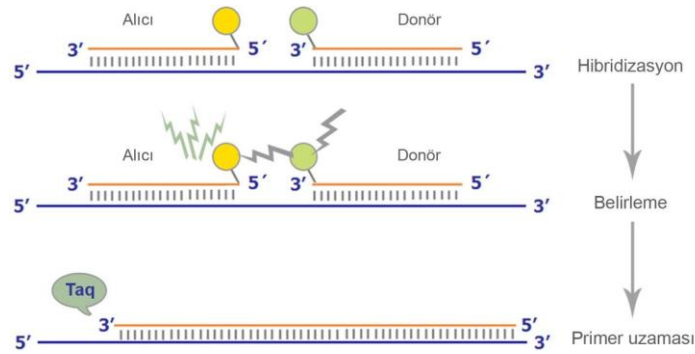
Floresan işareti problar sadece istenilen PCR ürününü belirlediği için yüksek hassasiyete sahip bir belirleme yöntemi sağlamaktadır. Bununla birlikte, sekansa spesifik problar kullanılırken PCR özgüllüğü de ayrıca önemlidir. İstenilen PCR ürününün miktarında bir azalmaya neden olabilecek spesifik olmayan PCR ürünleri ve primer dimerleri gibi amplifikasyon artefaktları oluşabilir. Reaksiyon bileşenleri için spesifik ürün ve reaksiyon artefaktları arasındaki rekabet analiz hassasiyet ve verimliliğiyle ayarlanabilir. Aşağıdaki problar prob temelli PCR yönteminde sıklıkla kullanılmaktadır:

TaqMan probları: Sekansa spesifik oligonükleotid probları florofor ve quencher (baskılayıcı) bir parça içermektedir. Florofor probun 5' ucuna ve quencher parça 3' ucuna bağlanır. PCR'nin birleştirilmiş annealing/ekstensiyon fazında Taq DNA polimerazın 5'–3' ekzonükleaz aktivitesi sayesinde florofor ve quencher parçalar birbirinden ayrılır ve prob parçalanır. Bu biriken PCR ürününün miktarıyla orantılı olan ve belirlenebilen bir floresan ışımaya sonuçlanır (Şekil2.9) (Qiagen, 2015).



Şekil 2.9. TaqMan probleminin çalışma prensibi (Bass ve ark., 2010).

FRET problemleri: FRET problemlerinin temeli enerjinin bir floresan boyadan diğer floresan boyaya transfer edilmesine dayanmaktadır. Sekansa spesifik olan iki ayrı oligonükleotid floresan olarak işaretlenmiştir. Upstream probu 3' ucunda donör moleküle sahipken, downstream probu 5' ucunda akseptör (alıcı) moleküle sahiptir. Problemler donör (verici) ve akseptör floroforları birbirine yakınlaştıracak şekilde hedef sekans üzerinde birbirine bitişik şekilde dizayn edilirler (Şekil 2.10). Prob bir kez bağlandığında floroforlar birbirine yaklaşır ve bu durum donör florofordan akseptör florofora farklı bir dalga boyunda sinyal yayan enerji transferini mümkün kılar. Bu nedenle sadece her iki prob bağlandığında floresans belirlenebilir. FRET problemleri melting curve (erime eğrisi) analizlerine izin vermektedir. Genotipleme, TNP belirlenmesi ve diğer mutasyon belirlenmelerinde son derece kullanışlıdır (Indiamart, 2014).



Şekil 2.10. FRET problemlerinin çalışma prensibi (Eurofins, 2014).

Eş-zamanlı PCR'de florogenik problemler için kullanılan boyalar: Sekansa spesifik problemlerle eş-zamanlı PCR için her birinin kendine has emilim ve yayılım aralığı olan Fluorescein, Oregon Green, FAM, SYBR Green I, TET, JOE, VIC, ROX gibi çeşitli floresan boyalar mevcuttur. Multipleks ve eş-zamanlı PCR yapmak için seçilen boyaaların yayılım spektrumları birbirinden yeteri kadar uzakta olup, kullanılan eş-zamanlı PCR'nin eksitasyon ve belirleme özellikleriyle uyumludur. Bu nedenle, multipleks PCR kurarken herhangi bir sinyal karışımını önlemek için mümkün olan en geniş kanal ayırımına sahip boyaaları kullanmak en iyi uygulamadır (Qiagen, 2014).

3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Örnek Toplanması

Çalışmaya, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı veya Akşehir Devlet Hastanesi Dermatoloji Polikliniği'ne Şubat 2014 ile Haziran 2015 tarihleri arasında başvuran Vitiligo tanısı almış 106 hasta ve 97 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Çalışma grubuna dahil olan bireylerin yaş aralığı 18-72 arasındaydı. Hasta grubunun 61'i kadın, 45'i erkek; kontrol grubunun ise 79'u kadın, 18'i erkek bireydi. Toplam 203 gönüllü bireye ait periferik kan örneği proje önerisine ilişkin bilgi verildikten sonra Afyon Kocatepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanan gönüllü olur formu imzalatılmasını takiben toplandı. Vaka grubu fiziki muayene ve Wood ışığı muayenesi ile vitiligo tanısı kesinleşen ve başka bir otoimmün hastalığın eşlik etmediği bireylerden oluşturuldu. Kontrol grubu ise herhangi bir dermatolojik yada otoimmün hastalığı bulunmayan sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Her iki gruba ait birey başına 2cc kan örneği pıhtılaşmayı önlemek için etiketlenmiş EDTA'lı tüpe alınarak DNA izolasyonu yapılmaya kadar +4 °C'de saklandı. DNA izolasyonunu takiben örnekler kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. DNA izolasyonu kit içeriği

Reagent Kartuşu
Örnek Tüpü
Elüsyon Tüpü
Pipet taşıyıcı
Pipet uçları

3.2. Kullanılan kimyasallar

CTLA4 geni rs231775 polimorfizminin analizleri için Primer Design snpsig (Qiagen, California) Real-Time PCR genotyping kiti, *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmi için ise LightCycler® 480 Real-Time PCR kiti kullanıldı. Analizler için kullanılan cihazlar Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Marka-Model
Rotor Gene Q	QIAGEN, Hilden, Germany
LightCycler® 480	ROCHE
Spektrofotometre	Nanodrop ND-1000 V.3.7
Santrifüj	Combi-spin FVL-2400N biosan
Mikropipetler	Thermo
Vorteks	Stuart
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu	Arçelik

3.3. Genotipleme

CTLA4 geni rs231775 ve *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmlerinin genotipleme çalışması Real- Time PCR yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

3.3.1. *CTLA4* geni rs231775 test prensipleri

3.3.1.1. Real-Time PCR kullanarak double-dye hidroliz problemleriyle genotipleme

Her bir genotipleme için, mevcut primer/prob karışımı incelenecek olan her iki genotipe homolog olan iki işaretli prob içermektedir. Hedef DNA'nın real-time PCR amplifikasyonu sırasında problemler varyant bölgeye bağlanmak için yarışır. DNA bağlanma bölgesine 100% homolog olan prob öncelikli olarak bağlanır ve PCR işlemi sırasında floresans bir sinyal verir. Bunu, yabancı tip sekansın bir kanaldan güçlü bir amplifikasyon sinyali verirken alternatif kanaldan çok zayıf bir sinyal vermesi takip eder. Homozigot varyant örnekleri tam olarak zıt bir sonuç verirler. Heterozigot örnekler her iki alel üzerinde her iki probun da bağlanacağı bölgeleri

içerdiklerinden her iki kanal boyunca ortada bir sinyal verirler. Bu üç muhtemel genotip son nokta floresanı (end point florescence)'nın karşılaştırılmasıyla çözülür. Birçok donanımda bu analiz otomatik olarak yapılmaktadır.

Pozitif Kontroller: Kitler her iki genotip için pozitif kontrol kalıbı içermektedir. Bunlar her iki genotip için kontrol sinyalleri ve paralel örnekler olarak çalışırlar. Test sırasında örneklere doğrudan uygun olan iyi bir pozitif kontrol sağlamak için, kontrol DNA'sı örnek DNA'sına benzer kopyada kullanılmalıdır.

Negatif Kontroller: Kontaminasyonun olmadığını konfirme etmek için, kitler her kullanıldığında negatif kontrol reaksiyonu kurulmalıdır. Bu sebeple, RNAaz/DNAaz içermeyen steril bir su kalıp yerine kullanılmalıdır. Çıkan negatif sonuç, işlem kurulurken reaktiflerin kontamine olmadığını göstermektedir. Eğer pozitif bir sonuç gözlenirse işlem tekrar edilmelidir. Kontaminasyonun olası sebepleri araştırılmalı ve uzaklaştırılmalıdır.

Sıcaklık Döngüsü Parametreleri (Thermocycling Parameters): Primer Design genotipleme kitleri için optimum döngü parametreleri iki basamaklı döngü prosedürüne sahiptir. Döngünün ilk basamağı optimal PCR amplifikasyonu için dizayn edilmiştir. Test örneklerinin çok düşük seviyelerde genomik DNA içerdiği durumlarda (örn. < 1 ng) bu ilk basamağa ilave döngüler eklenebilir. Döngünün ikinci basamağı prob ayırımı için optimaldir ve bu nedenle yüksek bir sıcaklıktadır. Floresans veri sadece amplifikasyon döngülerinin bu ikinci basamağında toplanabilir.

MasterMix Uygunluğu: Uygulama için Precision MasterMix doğru konsantrasyonlarda enzimler, nükleotidler, tamponlar ve tuzları içermektedir. Primer ve probun bağlanma (annealing) sıcaklıkları dikkatlice kalibre edilmiştir. Reaksiyon tamponundaki herhangi bir değişiklik testin performansını etkilemektedir.

3.3.1.2. Primerdesign kit içeriği

- Genotip Belirleme Karışımı (Genotyping primer/probe mix) (Kahverengi Kapak)
- Yabarı Tip Pozitif Kontrol kalıbı (Wild-type positive control template) (Pembe kapak)
- Mutant Tip Pozitif Kontrol Kalıbı (Mutant positive control template for each mutation) (Pembe kapak)
- RNase/DNase free water (RNase/DNase içermeyen steril su) (Beyaz Kapak)

3.3.1.3. Primerdesign kit protokolü

1. Kit içeriđinde bulunan her bir tüp açılmadan önce santrifüj edildi.
2. Tablo 3.3'e göre PrimerDesign kit içerikleri sulandırıldı.

Tablo 3.3. PrimerDesign kit içeriklerinin sulandırılması

Solüsyon	İçerik	Miktar
Genotip Belirleme Karışımı	Her iki genotipe ait işaretli problemler	50 µl
Yabarı Tip Pozitif Kontrol Kalıbı	Yabarı Tip Kalıp	550 µl
Mutant Tip Pozitif Kontrol Kalıbı	Mutant Tip Kalıp	550 µl

3. +4°C'de bekletilen soğuk blok üzerine 1,5 ml'lik RNase/DNase içermeyen tüp ve çalışılacak örnek kadar 0,1 ml'lik reaksiyon tüpleri yerleştirildi.
4. Yabarı ve mutant tip pozitif kontrol kalıpları için 2 adet fazladan 0,1 ml'lik tüp ile kalıp içermeyen negatif kontrol için 1 adet fazladan 0,1 ml'lik tüp hazırlandı.
5. 1,5 ml'lik RNase/DNase içermeyen tüpte reaksiyon sayısına göre Tablo 3.4'de verildiği şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3.4. PrimerDesign reaksiyon karışımı

Solüsyon	Reaksiyon başına miktar
2X Precision MasterMix (Enzim, nükleotidler, tuzlar, tampon çözelti içerir)	25 µl
Genotip Belirleme Karışımı	1 µl
DNAaz/RNAaz İçermeyen Steril Su	25 µl
Son hacim	51 µl

- Her bir 0,1 ml'lik reaksiyon tüpüne 15 µl reaksiyon karışımı dağıtıldı.
- Analiz edilecek örneklerdeki DNA miktarı (ng) ile kullanılacak pozitif kontrollerin miktarlarının benzer oranlarda olması için Tablo 3.5'e göre pozitif kontroller sulandırıldı.

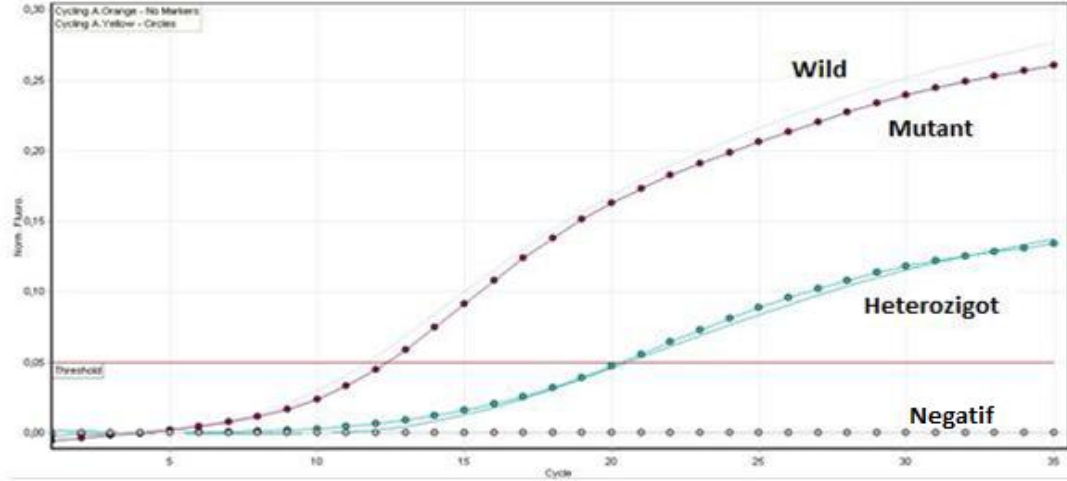
Tablo 3.5. PrimerDesign pozitif kontrollerin sulandırılması

Örneklerdeki DNA miktarı	Pozitif Kontrol Sulandırma Oranı
10 ng	1:25
5 ng	1:50
1 ng	1:250

- 0,1 ml'lik tüplere dağıtılmış her bir reaksiyon karışımı üzerine analiz edilecek DNA örnekleri sırasıyla 5'er µl dağıtıldı.
- Her çalışmada yabancı ve mutant tip pozitif kontroller ve negatif kontrol kullanıldı.
Pozitif kontroller yüksek kontaminasyon riski içermesinden dolayı analiz edilecek örneklerden ve negatif kontrolden sonra 5'er µl pipetlendi. Negatif kontrol için reaksiyon tüpünde son miktar 51 µl olacak şekilde 25 µl DNAaz RNAaz içermeyen steril su eklendi.
- 0,1'lik tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra 72'lik rotor sepetine yerleştirildi, sepet Rotor Gene Q cihazına takıldı ve ilgili amplifikasyon protokolü seçilerek program başlatıldı.
- CTLA4* geni rs231775 polimorfizmlerine ait amplifikasyon protokolleri Tablo 3.6'da verilmiştir.
- Polimorfizmlere ilişkin genotip sonuçları allelik discrimination (alelik ayrılma) prensibine göre belirlenmiştir (Şekil 3.1).

Tablo 3.6. CTLA4 geni rs231775 polimorfizmi amplifikasyon protokolü

	Basamak	Süre	Sıcaklık
	Enzim Aktivasyonu 1	2 dk	50 ⁰ C
	Enzim Aktivasyonu 2	5 dk	95 ⁰ C
45 döngü	Denatürasyon	15 sn	94 ⁰ C
	Ekstensiyon (Veri Toplanması)	60 sn	60 ⁰ C



Şekil 3.1. İlgili polimorfizmlere ilişkin genotiplerin alelik ayrılma prensibine göre belirlenmesi (Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıbbi Genetik AD.)

3.3.2. MYG1 geni rs1465073 Polimorfizmi Test Prensipleri

3.3.2.1. LightCycler® 480 Real-Time PCR kiti

MYG1 geni rs1465073 polimorfizmi genotipleme, LightCycler® 480 Real-Time PCR sisteminde (RocheDiagnostics, Vienna, Austria) LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe, kullanılarak yapılmıştır. DNA örneği Amplikon PCR döngüsünün annealing basamağında hibridize olan spesifik probler kullanılarak floresan ışıkla belirlenmiştir.

3.3.2.2. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması Ve Örneklerin Lightcycler Cihazına Yüklenmesi

Reaksiyon karışımı hazırlanmadan önce LightCycler 480 cihazı açıldı ve cihazın self-test yapması sağlandı. Daha sonra sisteme çalışılacak polimorfizmlerinin analizinde kullanılacak olarak protokol yüklendi. Hasta listesi girişi yapıldı ve sistem çalışma için hazır duruma getirildi. Reaksiyon karışımı için gerekli olan reaksiyon karışımı ve kontrol solüsyonu aşağıdaki işlem basamakları uygulanarak hazırlandı.

3.3.2.3. Deneysel İşlemler

- Kit kullanılıncaya kadar -20°C 'de bekletildi. Malzeme tekrar tekrar dondurup çözündürme işlemlerinden uzak tutuldu.
- PCR Master karışımları hazırlanmaya başlanmadan önce Light Cycler 480 açıldı ve cihazın self-test yapması sağlandı.

- **Denatürasyon basamakları**

Döngü Program Verisi	Değer
Döngü	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık hedefleri	Segment I
Hedef sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	95
İnkübasyon süresi (sn)	10
Sıcaklık geçiş oranı ($^{\circ}\text{C}/\text{sn}$)	20
İkinci hedef sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	0
Basamak boyutu ($^{\circ}\text{C}$)	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0
Yakalama modu	Yok

- **Amplifikasyon basamakları**

Döngü Program Verisi	Değer		
Döngü	45		
Analiz modu	Kantifikasyon		
Sıcaklık hedefleri	1	2	3
Hedef sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	95	60	72
İnkübasyon süresi (sn)	10	10	10
Sıcaklık geçiş oranı ($^{\circ}\text{C}/\text{sn}$)	20	20	20
İkinci hedef sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	0	0	0
Basamak boyutu ($^{\circ}\text{C}$)	0	0	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0	0	0
Yakalama modu	Yok	Tek	Yok

- **Erime Eğrisi Analizi**

Döngü Program Verisi	Değer		
Döngü	1		
Analiz modu	Erime Eğrisi		
Sıcaklık hedefleri	1	2	3
Hedef sıcaklık (°C)	95	40	85
İnkübasyon süresi (sn)	20	20	00
Sıcaklık geçiş oranı (°C/sn)	20	20	0.2
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0	0	0
Basamak boyutu (°C)	0	0	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0	0	0
Yakalama modu	Yok	Yok	Sürekli

- **Soğutma**

Döngü Program Verisi	Değer
Döngü	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık hedefleri	1
Hedef sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon süresi (sn)	30
Sıcaklık geçiş oranı (°C/sn)	20
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0
Basamak boyutu (°C)	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0
Yakalama modu	Yok

- Hasta listesi girişi yapıldı ve sistem hazır duruma getirildi.
- 1.5 ml'lik reaksiyon tüpünde reaksiyon sayısına göre çizelgede verildiği şekilde reaksiyon miksi hazırlandı (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Reaksiyon mixinin hazırlanışı

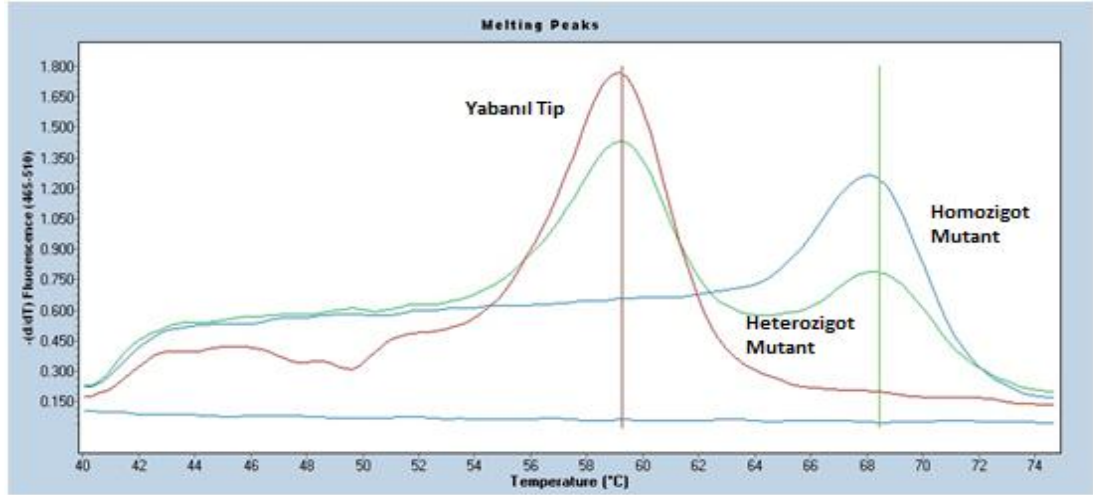
Reaksiyon mixinin hazırlanışı		Basamaklar
20 µl reaksiyon karışımı		LightCycler®480 Instrument
H ₂ O	13,4 µl	Block Type: 384 veya 96
Reagent Mix	1,0 µl	Detection Format: Simple Probe
FastStart DNA Master	2,0 µl	LightCycler®480 Instrument I: 483-533
MgCl ₂ (25Mm)	1,6 µl	LightCycler®480 Instrument II: 465-510
DNA	2 µl	
Toplam	20 µl	

- İçinde master mixin bulunduğu 1B (beyaz renkli kapak) tüpünün tamamı içerisinde FastStart enzimin bulunduğu 1A (kırmızı renkli kapak) tüpüne aktarılır. Bu karışım hafif el hareketleriyle karıştırıldıktan sonra spin yapılır.
- Reaksiyon miksi çalışılacak reaksiyon sayısına göre plate kuyucuklarına dağıtıldı.
- Platedeki her kuyucuğa 18 µl reaksiyon karışımı dağıtıldı.

- Platedeki kuyucuklarda hava kabarcığı olup olmadığı kontrol edildi. Hava kabarcığı oluşmuşsa plate uygulanan vibrasyon hareketiyle meydana gelen hava kabarcığı yok edildi.
- Her çalışmada bir negatif ve bir pozitif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol için ilk kuyucuğa 2 µl PCR grade su, pozitif kontrol için ise son kuyucuğa heterozigot genotipe sahip olduğu bilinen DNA örneğinden 2 µl eklendi.
- Diğer kuyucuklara analiz edilecek örnekler sırasıyla 2'şer µl dağıtıldı. Platedeki kuyucuklarda hava kabarcığı olup olmadığı tekrar kontrol edildi. Hava kabarcığı oluşmuşsa plate uygulanan vibrasyon hareketiyle meydana gelen hava kabarcığı yok edildi.
- Plate'in üzeri özel film tabakası ile hava almayacak şekilde kapatıldı.
- Plate Light Cycler 480 cihazına yerleştirilerek kapak dikkatlice kapatıldı ve program başlatıldı.
- Analiz işlemi, 45 döngü sonunda Light Cycler 480'e ait 4.0 analiz programı kullanılarak yapıldı.
- Tm (melting temperature)'deki +/- 1.5°C'lik sapmalar kabul edildi.
- Sonuçlar aşağıda verilen bilgilere göre değerlendirildi (Tablo 3.8) (Şekil 3.2).

Tablo 3.8. MYG1 geni rs1465073 polimorfizmine ait genotip ilişkisi (Roche, 2015)

	Erime pik sayısı	Erime pikine ait Tm
Homozigot wild genotip	1	59,5 °C
Heterozigot genotip	2	59,5°C ve 68,5°C
Homozigot mutant genotip	1	68,5 °C



Pik No	Genotip	Erime Pik Renkleri
1	Yabanıl Tip (CC)	Kırmızı
2	Heterozigot mutant (CG)	Mavi
3	Homozigot mutant (GG)	Yeşil

Şekil 3.2. İlgili polimorfizmlere ilişkin genotiplerin erime eğrisi prensibine göre belirlenmesi (Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıbbi Genetik AD.)

3.4. İstatistiksel analizler

İstatistik analizleri SPSS 20.0 programı kullanılarak yapılmıştır. *CTLA4* geni rs231775 ve *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmlerine ait allel ve genotip sıklıkları Vitiligo hastaları ve sağlıklı kontrollerde χ^2 testi ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Hardy-Weinberg dengesi hasta ve kontrol gruplarında χ^2 testi ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya, Vitiligo tanısı almış 106 hasta ve 97 kontrol dahil edildi. Çalışma grubuna dahil olan bireylerin yaş aralığı 18-72 arasındaydı. Hasta grubunun 61'i kadın, 45'i erkek iken kontrol grubunun ise 79'u kadın, 18'i erkek bireydi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımı

	Kadın n= 140	Erkek n=63	Toplam n=203
Vitiligo grubu	61	45	106
Kontrol grubu	79	18	97

Çalışma kapsamına alınan hastaların hastalıklarının başlangıç yaşı en erken 1, en geç 65 yaşlar arasında saptanmış olup ortalama başlangıç yaşı 17,64 olarak bulundu. Hasta grubunda vitiligo tipleri belli olan 91 hastanın 17 (%18,6)'si lokalize, 42 (%46,1)'si generalize, 32 (%35,1)'si ise universal tipte idi. Vitiligolu kadın hastaların 7 (%13,7)'si lokalize, 24 (%47,0)'ü generalize, 20 (%39,2)'si universal tipte iken; erkek hastaların ise 10 (%25)'u lokalize, 18 (%45)'i generalize, 12 (%30)'si universal tipte idi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Vitiligo grubunun hastalık tiplerine göre dağılımı

	Lokalize tip n= 17(%18,6)	Generalize tip n= 42(%46,1)	Universal tip n= 32(%35,1)	Toplam n= 91
Kadın	7 (%13,7)	24 (%47,0)	20 (%39,2)	51
Erkek	10 (%25)	18 (%45)	12 (%30)	40

Generalize tip vitiligo kadın hastalarda daha fazla görülmesine rağmen kadın ve erkek hastalar arasında vitiligo hastalığının tipi açısından dağılımda bir farklılık yoktu.

Çalışma kapsamına alınan hastaların tamamında pedigre analizi yapılarak aile öyküsü alındı. 106 olgunun 29'nun (% 27,4) ailesinde Vitiligo öyküsü bulundu.

Ailesinde vitiligo olan ve olmayan hasta grupları arasında kadın ve erkek hastalarda farklılık bulunmadı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Ailede vitiligo öyküsünün cinsiyete göre dağılımı

	Aile öyküsü var n=29	Aile öyküsü yok n=77	<i>p</i>
Kadın	16 (%26,2)	45 (%73,8)	0.827
Erkek	13 (%28,9)	32 (%71,1)	

Vitiligo tanısı almış ve hastalık tipleri belirlenmiş 91 hastada, başlangıç yaşı (30 yaş üstü ve 30 yaş altı) ile hastalık tipleri arasında ilişki olup olmadığı analiz edildi. Sonuç olarak, başlangıç yaşı ve hastalık tipleri arasında fark bulunmadı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Hastalık başlangıç yaşı ve hastalık tipleri arasındaki ilişki

Başlangıç yaşı	Lokelize tip n= 17(%18,6)	Generalize tip n= 42(%46,1)	Universal tip n= 32(%35,1)	<i>p</i>
30 yaş altı	10 (%15,4)	33 (%50,8)	22 (%33,8)	0,289
30 yaş üstü	7 (%26,9)	9 (%34,6)	10 (%38,5)	

4.1. Genotip verileri

Çalışmamızda, klinik olarak vitiligo tanısı almış olan 106 hasta ve 97 sağlıklı kontrolde *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmi; 106 hasta ve 94 sağlıklı kontrolde *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmine ilişkin genotipleme çalışması yapıldı. Tüm polimorfizmler hasta ve kontrol grubunda Hardy-Weinberg dengesindeydi ($p>0,05$). Polimorfizmlere ilişkin bazı veriler Tablo4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5. rs231775 ve rs1465073 polimorfizmlerine ilişkin bazı veriler

TNP	Gen	Lokalizasyon	Pozisyon	Risk Aleli	Yabancıl Alel
rs231775	<i>CTLA-4</i>	2q33.2	Ekzon	G	A
rs1465073	<i>MYG1</i>	12q13.13	Ekzon	G	C

4.1.1. *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmine ait genotip ve alel frekansları

CTLA4 geni rs231775 polimorfizminin genotip ve alel frekansları 106 vitiligo hastası ve 97 sağlıklı kontrolde incelendi. *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmi insanda AA, AG ve GG olmak üzere üç farklı genotip şeklinde bulunmaktadır. Kontrol grubunda AA genotipine sahip birey sayısı 40 (%41,2), AG genotipine sahip birey sayısı 44 (%45,4) ve GG genotipine sahip birey sayısı 13 (%13,4) olarak, hasta grubunda, AA genotipine sahip birey sayısı 52 (%49,1), AG genotipine sahip birey sayısı 45 (%42,5) ve GG genotipine sahip birey sayısı 9 (%8,5) olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları χ^2 testi kullanılarak karşılaştırıldığında genotip frekansları açısından fark gözlenmedi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Kontrol ve vitiligo grubunda *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmine ait genotip frekanslarının dağılımı

Genotip	Kontrol grubu (n=97)	Vitiligo grubu (n= 106)	p
AA	40 (%41,2)	52 (%49,1)	0,385
AG	44 (%45,4)	45 (%42,5)	
GG	13 (%13,4)	9 (%8,5)	

Kontrol grubunda A alelinin frekansı 124 (%63,91) ve G alelinin frekansı 70 (%36,09) olarak, hasta grubunda A alelinin frekansı 149 (%70,29) ve G alelinin frekansı 63 (%29,71) olarak bulundu. *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmine ait A ve G alel frekansları iki grup arasında χ^2 testi ile analiz edildi, alel frekansları arasında fark yoktu (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Kontrol ve Vitiligo grubunda *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmine ait alel frekanslarının dağılımı

Allel	Kontrol grubu n=194	Vitiligo grubu n=212	p
A	124 (%63,91)	149 (%70,30)	0.172
G	70 (%36,10)	63 (%29,71)	

Hasta grubunda hastalık tipi ve *CTLA-4* genine ait genotiplerin dağılımı incelendi. Hastalık tipleri ile *CTLA-4* geni rs231775 polimorfizmine ait genotiplerin ilişkisi olmadığı bulundu (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Hastalık tipleri ve *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmine ait genotiplerin karşılaştırılması

	AA (n=44)	AG (n=39)	GG (n=8)	<i>p</i>
Lokelize	9 (%52,9)	8 (%47,1)	0 (%0)	0,69
Generalize	20 (%47,6)	18 (%42,9)	4 (%9,5)	
Universal	15 (%46,9)	13 (%40,6)	4 (%12,5)	

Hasta grubunda, hastalık tipleri ile literatürde risk ile asoiasyon gösterdiği bildirilen G allelinin varlığı arasındaki ilişki karşılaştırıldı. Hastalık tipinin bireyin G alleli ile pozitif yada negatif bir ilişkisinin olmadığı ortaya koyuldu (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Hastalık tipleri ve *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmine ait genotip risk analizi karşılaştırılması

	Lokelize	Generalize	Universal	<i>p</i>
AA	9(%52,9)	20(%47,6)	15(%46,9)	0,91
AG,GG	8(%47,1)	22(%52,4)	17(%53,1)	

Ailesinde Vitiligo öyküsü bulunan olgular ile bulunmayan olgularda *CTLA-4* geni rs231775 polimorfizmindeki genotip frekansları χ^2 testi kullanılarak karşılaştırıldı. 106 olgunun 29'nun ailesinde Vitiligo öyküsü bulunurken, 77'sinin ailesinde Vitiligo öyküsü yoktu. Ailesinde vitiligo öyküsü olan ve olmayan hasta grubunda risk alelinin varlığı ve yokluğu karşılaştırıldığında fark yoktu (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Aile öyküsü ile *CTLA-4* genotiplerinin risk hesaplaması

	AA	AGGG	<i>p</i>
Aile öyküsü var	18 (%62,1)	11 (%37,9)	0.128
Aile öyküsü yok	34 (%44,2)	43 (%55,8)	

4.1.2. *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmine ait genotip ve alel frekansları

MYG1 geni rs1465073 polimorfizminin genotip ve alel frekansları 106 vitiligo hastası ve 94 kontrolde incelenmiştir. *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmi insanda CC, CG ve GG olmak üzere üç farklı genotip şeklinde bulunmaktadır. Kontrol grubunda CC genotipine sahip birey sayısı 13 (%13,8), CG genotipine sahip birey sayısı 43 (%45,7) ve GG genotipine sahip birey sayısı 38 (%40,4) olarak bulunurken, hasta grubunda ise CC genotipine sahip birey sayısı 39 (%36,8), CG genotipine sahip birey sayısı 19 (%17,9) ve GG genotipine sahip birey sayısı 48 (%45,3) olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları arasında χ^2 testi kullanılarak *MYG1* geni rs1465073 polimorfizminin genotip frekansı karşılaştırıldığında fark gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Hasta ve kontrol grubunda *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmine ait genotip frekanslarının dağılımı

Genotip	Kontrol grubu (n=97)	Vitiligo grubu (n= 106)	p
CC	13 (%13,8)	39 (%36,8)	
CG	43 (%45,7)	19 (%17,9)	0,00
GG	38 (%40,4)	48 (%45,3)	

Kontrol grubunda C alelinin frekansı 69 (%36,70) ve G alelinin frekansı 119 (%63,29) olarak, Vitiligo grubunda C alelinin frekansı 97 (%45,75) ve G alelinin frekansı 115 (%54,24) olarak bulundu. *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmine ait C ve G alel frekansları χ^2 testi kullanılarak analiz edildi. İki grubun alel frekansları arasında fark yoktu (Tablo 4.12)

Tablo 4.12. Kontrol ve Vitiligo grubunda *MYG1*geni rs1465073 polimorfizmine ait alel frekanslarının dağılımı

Allel	Kontrol grubu n=188	Vitiligo grubu n=212	p
C	69 (%36,70)	97 (%45,75)	
G	119 (%63,29)	115 (%54,24)	0,06

Hasta ve kontrol grubu arasında risk alelinin varlığı ve yokluğu, analiz edildiğinde anlamlı fark gözlemlendi ($p<0.05$). Risk alelinin varlığı hastalığa yatkınlığı 3.62 kat arttırdığı belirlendi. (OR:3.62; %95CI, 1.78-7.34) (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Hasta ve kontrol grubunda risk alelinin varlığı ve yokluğunun dağılımı

	CC	CG, GG	<i>p</i>	OR
Hasta	39 (%36,8)	67 (%63,2)	0.00	3.62
Kontrol	13 (%13,9)	81 (%86,2)		

Hastalık tipleri ve *MYG1* geni rs231775 polimorfizmine ait genotipler karşılaştırıldı ve fark gözlemlenmedi (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. Hastalık tipleri ve *MYG1* geni rs231775 polimorfizmine ait genotiplerin karşılaştırılması

	CC (n=33)	CG (n=16)	GG (n=42)	<i>p</i>
Lokalize	6 (%35,3)	0 (%0)	11 (%64,7)	0,25
Generalize	16 (%38,1)	9 (%21,4)	17 (%40,5)	
Universal	11 (%34,4)	7 (%21,9)	14 (%43,8)	

Hasta grubunda, hastalık tipleri ile risk alelinin varlığı ve yokluğu değerlendirildi. Hastalık tipleri ile G risk aleli arasında bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. Hastalık tipleri ve *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmine ait genotip risk analizi karşılaştırılması

	Lokalize	Generalize	Universal	<i>p</i>
CC	6 (%35,3)	16 (%38,1)	11 (%34,4)	0,94
CGGG	11 (%64,7)	26 (%61,9)	21 (%65,6)	

Ailesinde Vitiligo öyküsü bulunan olgular ile bulunmayan olgularda *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmi genotip frekansları karşılaştırıldı. 106 olgunun 29'nun ailesinde Vitiligo öyküsü bulunurken, 77'sinin ailesinde Vitiligo yoktu. Aile öyküsü olan ve olmayan gruplar ile risk alelinin varlığı ve yokluğu arasında ilişki yoktu (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. Aile öyküsü ile *MYGI* genotiplerinin risk alelinin varlığı ve yokluğu arasındaki ilişki

	CC	CGGG	<i>p</i>
Aile öyküsü var	12 (%41,4)	17 (%58,6)	0,65
Aile öyküsü yok	27 (%35,1)	50 (%64,9)	

5. TARTIŞMA

5.1. *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmi ile Vitiligo hastalığının ilişkisi

CTLA4 geni 2q.33'de lokalize 77 kb büyüklüğünde ve birçok otoimmün hastalıkla ilişkilendirilen bir gendir. *CTLA4* immün sistemin negatif düzenleyici bir molekülünü kodlamaktadır (Kristiansen ve ark., 2000; Solomon ve Bluestone, 2001). *CTLA4* geninin ürünü immünoglobulin süper ailesine ait bir yüzey molekülüdür ve sadece aktif T hücrelerinde eksprese edilmektedir (Brunet ve ark., 1987). *CTLA4* T hücre aktivasyonunun negatif düzenlenmesine ve T hücre apoptozunun kontrolüne katılmaktadır (Das ve ark., 2001).

Birçok *CTLA4* polimorfik aleli otoimmün hastalıklara yakınlıkla, bunlardan bazıları da vitiligoyla ilişkilendirilmiştir (İtirli ve ark., 2005; Fattahi ve ark., 2005; Pehlivan ve ark., 2009). Birlea ve ark. (2011), 1,392 hasta ve 2,629 kontrolle yaptıkları çalışmada, generalize vitiligonun *CTLA4* geni +49A/G (rs231775) polimorfizminin eşlik eden diğer otoimmün hastalıkların epidemiyolojisine sekonder etkisi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nin Colorado eyaletinde yapılan bir çalışmada 126 aileye mensup 712 generalize vitiligo hastasında *CTLA4* geni +49A/G'nin de aralarında bulunduğu beş polimorfizm incelenmiştir. Söz konusu araştırmada generalize vitiligo ile +49A/G polimorfizmi arasında genotip yada alel dağılımı açısından ilişki olmadığı rapor edilmiştir (LaBerge ve ark.,2008). Benzer olarak çalışmamızda da *CTLA4* geni +49A/G polimorfizmi genotip ve alel frekansları açısından vitiligo hastaları ve kontrol grubu arasında fark gözlenmemiştir.

Kemp ve ark. (1999), Kafkas kökenli hastalarla yaptıkları çalışmada *CLTA4* polimorfizmlerinin öncelikle diğer otoimmün hastalıkların eşlik ettiği vitiligo hastalığıyla asosiasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar İtirli ve ark. (2005)'larının yaptıkları çalışmada da bildirilmiştir. İlaveten Blomhoff ve ark. (2005), sadece eşlik eden bir otoimmün hastalığı olan vitiligo hastaları ile *CTLA4* polimorfizmleri arasında anlamlı ilişki rapor etmişlerdir. Zıt olarak Laberge ve ark. (2008), Amerikalı ve İngiliz ailelerle yaptıkları çalışmada *CTLA4* polimorfizmleri ile

generalize vitiligo veya vitiligo ilişkili diğer otoimmün hastalıklar arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir. Birlea ve ark. (2011) tarafından Roman kökenli olgu grubunda +49A/G polimorfizminin de dahil olduğu bazı polimorfizmler incelenmiş ve generalize vitiligo ile söz konusu polimorfizmler arasında ilişki olmadığı bildirilmiştir. Ancak yapılan çalışmaya göre vitiligo *CTLA4* polimorfizmleri arasında bir ilişki olmamasına rağmen, meta analiz sonuçlarına göre eşlik eden bir otoimmün hastalığı olan vitiligo hastalarıyla +49A/G polimorfizmi arasında önemli bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Birlea ve ark.,2009).

CTLA4 geninde bulunan polimorfizmlerin sadece eşlik eden bir otoimmün hastalık mevcutsa vitiligoya yatkınlık oluşturduğu bildirilmektedir. Bu durum vitiligonun iki ayrı formu olduğu hipotezini desteklemektedir. Bir grup vitiligo hastasında sadece melanositlerin otoimmün yıkımı sonucunda hastalık meydana gelmektedir (Kemp ve ark., 1999; Bloomhoff ve ark., 2005). Bir diğer grupta ise vitiligo diğer bazı otoimmün hastalıkların beraberinde ortaya çıkar (Birlea ve ark.,2009).

CTLA4 ile ilgili sonuçların yorumlanması zordur, çünkü meta analizlere göre *CTLA4*'ün vitiligo ile ilişkisi zayıf görünmektedir. Bunun sebebi muhtemelen *CTLA4*'ün diğer otoimmün hastalıklarla olan ilişkisidir. Vitiligonun herhangi bir otoimmün hastalıkla ilişkilendirilmediği durumlarda *CTLA4* polimorfizmlerinden etkilenmediği görülmektedir. Nitekim çalışmamızda yer alan olgu grubunu herhangi bir otoimmün hastalığın eşlik etmediği vitiligo vakalarından oluşturduğumuz için bizde literatüre paralel bulgular elde ettik. Bu çalışma *CTLA4* geni +49A/G polimorfizminin Türk toplumunda vitiligo hastalarında incelendiği ilk çalışma olduğundan literatüre katkı sunmaktadır.

5.2. *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmi ile Vitiligo hastalığının ilişkisi

MYG1 vitiligo genetiği için aday bir gen olarak tanımlanmıştır (Philips ve ark., 2009). 12q13.13'de lokalizedir (Weizmann Institute of Science, 2015). *MYG1*'in ekspresyonu normal hayvan dokularında stabildir ve sadece patolojik şartlarda

değişmektedir (Hawse ve ark., 2003; Koks ve ark., 2004; Kingo ve ark., 2006). *MYG1* mRNA'sının artması vitiligo ve atopik ekzama hastalarında hem normal deride hem depigmente bölgede gösterilmiştir (Sääf ve ark., 2003).

MYG1 ağırlıklı olarak ektoderm türevli dokularda eksprese edilmektedir. Epidermisde *MYG1*'in eksprese edilmesi bu genin derinin gelişimine katıldığını; bu nedenle deri hastalıklarında *MYG1*'in önemi bir rolü olduğunu desteklemektedir (Philips ve ark., 2009). Su ve ark. (2004), *MYG1* transkript seviyelerinin diğer dokulara göre deride ortalamanın altında olduğunu bildirmiş olmalarına rağmen, daha önceki çalışmalar *MYG1*'in vitiligo ve atopik ekzama hastalarının derilerinde upregüle olduğunu göstermiştir (Sääf ve ark., 2003; Kingo ve ark., 2006).

MYG1 TNP olarak tanımlanmış on polimorfizme sahiptir ve bunlardan iki tanesi potansiyel olarak fonksiyoneldir. *MYG1*'in 119 bç upstream translasyon başlangıç bölgesinde yer alan promotör polimorfizmi olan bizim de çalışmış olduğumuz -119C/G (rs1465073) polimorfizmi vitiligoya yakınlıkla ilişkilendirilmiştir (Philips ve ark., 2010).

Diwivedi ve ark. (2013), *MYG1* -119C/G polimorfizmini 846 vitiligo hastası ve 726 kontrol ile çalışmış ve bu polimorfizmin G alelinin hastalarda kontrole göre yüksek oranda bulunmasından dolayı söz konusu aleli vitiligoya ilişkilendirmişlerdir. Bu çalışmada *MYG1* mRNA ekspresyonunun vitiligo hastalarında kontrole göre arttığı bildirilmiştir. -119GG genotipine sahip hastalardaki artmış *MYG1* transkriptinden dolayı, *MYG1*'in vitiligonun otoimmün patogenezinde önemli rolü olduğu düşünülmüştür. Araştırmacılar, *MYG1* geni -119C/G polimorfizminin vitiligoya yakınlık oluşumu ve ilerlemesinde genetik bir risk faktörü olabileceğini öne sürmüşlerdir. İlaveten, Philips ve ark. (2010), *MYG1*-119C/G polimorfizminin *MYG1* regülasyonunda önemli bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Benzer olarak, çalışmamızda, vitiligo hastaları ve kontrol grubu arasında *MYG1* geni -119C/G polimorfizmi genotip frekansları karşılaştırıldığında gruplar arasında fark gözlenmiştir ($p < 0.05$). Diğer taraftan, alel frekansları açısından hasta ve kontrol grubu arasında fark gözlenmemiştir.

Diwivedi ve ark. (2013), aktif ve generalize vitiligo hastalarında stabil ve lokalize vitiligo hastalarına göre *MYGI* mRNA ekspresyonunun arttığını bildirmiştir. Çalışmamızda klinik olarak vitiligo tanısı almış hastalar lokalize, generalize ve universal olarak üç tipe ayrılmıştır. Hastalık tipleri arasında genotip frekansları açısından fark gözlenmemiştir. İlâveten, vitiligo tanısı almış ve hastalık tipleri belirlenmiş 91 hastada, başlangıç yaşı (30 yaş üstü ve 30 yaş altı) kategorize edilmiş ve hastalık tipleri ile başlangıç yaşı arasında ilişki olmadığı gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada 1-20 yaş grubu ile 21-40 yaş grubundaki hastalarda da kontrole göre *MYGI* mRNA ekspresyonunda artış gözlendiği bildirilmiştir. İlâveten, *MYGI* -119GG genotipine sahip hastalarda GC ve CC genotipine sahip hastalara göre daha erken hastalık başlangıcı olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar *MYGI*'in hastalığın başlangıç yaşı ile ilişkili olabileceğini ileri sürmektedir (Diwivedi ve ark., 2013). Ancak çalışmamızda *MYGI* geni -119C/G polimorfizminin vitiligo başlangıç yaşı ile ilişkisi olmadığı belirlenmiştir.

Vitiligo kompleks bir patogeneze sahiptir. Etyolojisinde melanositlerin otoimmün mekanizmalar ile yok edilmesinin yanı sıra melanositlere ait intrinsik defektler, antioksidan sistemlere ait yetersizlikler nedeni ile melanositlerin progresif kaybı, melanositlerin hayatta kalma kapasitelerinde azalma, transepidermal melanositoraji olarak tanımlanan melanositlerin transepidermal kaybı ve diğer nöral hipotezlerin desteklenmesi vitiligonun multifaktöryel poligenik bir hastalık olduğunu göstermektedir (Van den Wijngaard ve ark., 2000; Ongenae ve ark., 2003; Ortonne, 2008; Le Poole ve Luiten, 2008; Zhang ve ark., 2013). Otoimmünite vitiligo patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Çünkü vitiligo diğer otoimmün hastalıklarla sıkı bir ilişki göstermektedir. Genetik ilişkilendirme analizleri ve ekspresyon çalışmalarına göre *MYGI*'in diğer genetik ve çevresel faktörlerle etkileşim halinde olmasının vitiligonun gelişiminden sorumlu olabileceği bildirilmiştir.

Çalışmamız literatür ile uyumlu olarak *MYGI* geni -119C/G polimorfizminin vitiligoya yatkınlık ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Diğer taraftan çalışmamızda

literatürden farklı olarak hastalık tipleri ve başlangıç yaşı ile söz konusu polimorfizm arasında ilişki bulunmaması; çalışılan toplumların etnik farklılıkları, populasyon büyüklüğü ve çalışmanın yapıldığı coğrafi bölgede vitiligo oluşması üzerine etkili olan çevresel faktörlerin değişken olmasından kaynaklanmış olabilir.

5.3. *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmi ve *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmi ile aile öyküsünün ilişkisi

Literatürde vitiligo pozitif aile hikayesiyle ilişkilendirilmiştir ve dünya populasyonunun yaklaşık %0.5-1'ini etkilemektedir (Taieb, 2007). Vitiligonun genetik temeli mendelyen kalıtım modeli ile açıklanamaz. Bununla birlikte penetrans eksikliği, yatkınlık gösteren lokusların çokluğu ve genetik heterojenite varlığı hastalığın kalıtım modelinin ortaya konmasını zorlaştırmaktadır (Zhang ve ark., 2005). Vitiligoya yatkınlık için genetik faktörlerin önemi yapılan aile çalışmalarıyla ortaya konmuştur (Nordlund, 1997; Kim, 1998). Shajil ve ark. (2006), çalışma grubundaki vitiligo hastalarının %22'sinin aile hikayesi olduğunu, bunların da %14'ünün birinci derece akraba olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, Diwivedi ve ark. (2013) çalıştıkları vitiligo hastalarının %13.71'inde bir veya birden fazla etkilenmiş aile bireyi olduğunu bildirmişler, böylece genetik faktörlerin vitiligo patogenezinde ne kadar önemli olduğuna dikkat çekmişlerdir. Çalışmamızda, vitiligo hastalarının tamamında aile öyküsü alınmış, 106 olgunun 29'nun (% 27,4) ailesinde Vitiligo öyküsü bulunmuştur. *MYG1* geni -119C/G polimorfizmi ve *CTLA4* geni +49A/G polimorfizmi ailesinde vitiligo öyküsü olan ve olmayan olgular arasında risk aleli varlığı açısından analiz edildiğinde ilişki saptanmadı. Bu veriler vitiligonun kompleks bir hastalık olması nedeni ile genetik bileşeninin çok faktörlü ve hastalık oluşumunun çevresel etkenlere aşırı duyarlı olduğuna ilişkin pozitif yaklaşım sunmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada **CTLA4 geni rs231775** ve **MYG1 geni rs1465073** polimorfizmleri ile vitiligo hastalığı arasındaki ilişki genotip ve alel frekanslarının farklı gruplar arasındaki dağılımı analiz edilerek değerlendirilmiştir.

Çalışma bulgularımıza göre:

1. **CTLA4 geni rs231775** polimorfizmi genotip frekansı ile vitiligo hastalığı arasında ilişki belirlenmemiştir.
2. **CTLA4 geni rs231775** polimorfizmi alel frekansı ile vitiligo hastalığı arasında ilişki belirlenmemiştir.
3. **MYG1 geni rs1465073** polimorfizmi genotip frekansı ile vitiligo hastalığına yatkınlık arasında ilişki belirlenmiştir.
4. **MYG1 geni rs1465073** polimorfizmi alel frekansı ile vitiligo hastalığına yatkınlık arasında ilişki belirlenmemiştir.
5. **MYG1 geni rs1465073** polimorfizmi risk alelini taşımanın hastalığa yatkınlığı 3.62 kat artırdığı görülmüştür.
6. Hastalık başlangıç yaşı ile söz konusu polimorfizmler arasında ilişki saptanmamıştır.
7. Hastalık türleri ile polimorfizmler arasında ilişki saptanmamıştır.

Çalışma sonuçlarının, vitiligo tanısı alan hastaların ailelerine hastalığa yatkınlık açısından bilgilendirici olacağı düşünülmektedir. Çünkü vitiligo multifaktöriyel etiyojolojiye sahip kompleks bir hastalık olmasına rağmen herediter özelliği patogeneğinde majör bir risk faktörüdür. Vitiligo ilerledikçe fizyolojik ve psikolojik etkisi artmakta, bunu takiben hayat kalitesi düşmektedir. Bu durum hastaların hem kendileri ve hem de yakınları için yıkıcı etkiler yaratabilir. Bundan dolayı hastalığın erken teşhisi ve teşhisi takiben izlenmesi için potansiyel koruyucu tedbirlerin araştırılması önemlidir. Genetik yatkınlık alelleri bir bireyin vitiligoya olan

yatkınlđını tahmin etmede kullanılabilir. Ancak vitiligoya yatkınlık alellerinin rutin tanıda kullanılmasından önce populasyon temelli geniş kapsamlı çalışmalarla değerlendirilerek konfirme edilmesi önerilir.

ÖZET

Vitiligo deride melanosit kaybı sonucu gelişen; keskin sınırlı, beyaz maküllerle karakterize bir depigmentasyon hastalığıdır. Hastalık yaygınlığına ve yerleşme bölgelerine göre lokalize tip, generalize tip ve universal tip olmak üzere üçe ayrılır. Vitiligo etyolojisi net olarak bilinmemekle birlikte kompleks bir yapı gösterir. Genetik yatkınlık, stres, sistemik hastalıklar ve fiziksel travma gibi birçok etkileyici faktör vitiligoya neden olmaktadır. Çalışmamızda *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmi ve *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmi vitiligo tanısı almış 106 hasta ve 97 kontrolde değerlendirilmiştir. Hastaların hastalık başlangıç yaşı 1-65 yaş arasında değişmekte olup ortalama başlangıç yaşı 17,64 olarak bulundu. Çalışma kapsamına alınan ve vitiligo tipleri belli olan 91 hastanın 17 (%18,6)'si lokalize, 42 (%46,1)'si generalize, 32 (%35,1)'si ise universal tipte idi. Generalize tip vitiligo kadın hastalarda daha fazla görülmesine rağmen kadın ve erkek hastalar arasında vitiligo hastalığının tipi istatistiksel olarak farklı değildi ($p>0,05$). Genotiplendirme eş zamanlı PCR yöntemi ile yapılmıştır. *MYG1* geni rs1465073 ve *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmlerinde hasta ve kontrol arasında alel frekansları açısından istatistiksel fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). İlaveten *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmi hasta kontrol arasında genotip frekansı açısından değerlendirildiğinde fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Zıt olarak *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmi hasta kontrol arasında genotip frekansı açısından değerlendirildiğinde aradaki fark önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Çalışma sonuçlarımız değerlendirildiğinde literatür verileriyle uyumlu olarak *MYG1* geni rs1465073 polimorfizmi ile vitiligo arasında bir ilişki olduğu, *CTLA4* geni rs231775 polimorfizmi ile vitiligo arasında direkt bir ilişki olmadığı gözlenmiştir.

ABSTRACT

Vitiligo is a disease characterized by sharply limited white macular depigmentation as a result of melanocyte loss. Disease is divided into three types according to prevalence and localization as localized, general and universal. Etiology of vitiligo is unknown, but clearly shows a complex structure. Genetic predisposition, stress, many influencing factors such as systemic diseases and physical trauma causes vitiligo. In our study, *MYG1* gene rs1465073 and *CTLA4* gene rs231775 polymorphisms were evaluated in 106 patients diagnosed with vitiligo and 97 controls. Age of onset of illness of the patients ranged from 1-65 years and average age of onset was found 17.64. Ninety one patients diagnosed with vitiligo were characterized according to the vitiligo types and 17 patients (18,6%) was localized, 42 patients was (46,1%) generalized and 32 patients was (35,1%) was universal. Although generalized vitiligo was more frequent in females, there was no significant differences between females and males. Genotyping was performed using real time PCR method. There is no statistically significant differences between patients and controls in terms of allele frequencies of *MYG1* gene rs1465073 and *CTLA4* gene rs231775 polymorphisms. Beside, there is no statistically significant differences between patients and controls in terms of genotype frequencies of *CTLA4* gene rs231775 polymorphism. On contrary to this there is statistically significant differences between patients and controls in terms of genotype frequencies of *MYG1* gene rs1465073 polymorphism.

In conclusion, consistent with the literature data, there is a significant association between *MYG1* gene rs1465073 polymorphism and vitiligo. But there is no directly association between *CTLA4* gene rs231775 polymorphism and vitiligo.

KAYNAKLAR

- AKTAN, Ş., ŞANLI, B. (1998). Segmental ve Jeneralize Vitiligo: Klinik Özellikler. *T Klin J Dermatol*, 8:16-19.
- AKTAŞ, E. (2009). *Türkiye Klinikleri Dermatol- Special Topics*. 2;1-19.
- ALIKHAN, A, FELSTEN, L.M., DALY, M., PETRONIC ROSIC, V. (2011). Vitiligo: A comprehensive overview, *J Am Acad Dermatol*, 65:473-91.
- ALKHATEEB, A., FAIN, P.R., THODY, A. (2003). Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. *Pigment Cell Res*. 16(3): 208-214.
- ANGATA, T. (2014). Associations of genetic polymorphisms of Siglecs with human diseases. *Glycobiology*, 24: 785-793.
- ARICAN, Ö. (2004). Vitiligoda etyoloji, Patogenez ve Klinik. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, Cilt XV, 55-60.
- ARICAN, Ö., KOÇ, K., ERSOY, L. (2000). Türk popülasyonunda vitiligo, XVII. *Ulusal Dermatoloji Kongresi*, Antalya.
- BAGHERANI, N., YAGHOUBI, R., OMIDIAN, M. (2011). Hypothesis: Zinc can be effective in treatment of vitiligo, *Indian Journal of Dermatology*, 56(5):480-484.
- BAHADIR, S., YAYLI, S. (2006). Çocuklarda vitiligo: Epidemiyoloji ve etyoloji. *Türkderm*. 40:81-6.
- BAHARAV, E., MERIMSKI, O., SHOENFELD, Y., ZIGELMAN, R., GILBRUD, B., YECHESKEL, G. (1969). Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo, View Record in Scopus, *Clin Exp Immunol*, 84-88.
- BARANSÜ, O. (1994). Pigmentasyon bozuklukları. *Dermatoloji*. TÜZÜN, Y., KOTOĞYAN, A., AYDEMİR, E.H. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 555-560.
- BASS, C., NIKOU, D., VONTAS, J., DONNELLY, M.J., WILLIAMSON, M.S., FIELD, L.M. (2010). The vector population monitoring tool (VPMT): high-throughput dna-based diagnostics for the monitoring of mosquito vector populations. *Malaria Research and Treatment*, 190434
- BOLOGNIA, J.L. (1988). Biology of Hipopigmentasyon, *J Am Acad Dermatol*, 8:217-255.
- BIRLEA, S.A, SPRITZ, R.A, NORRIS, D.A., (2012). Genetics of vitiligo, WOLFF, K., KATZ, S., GOLDSMITH, L., GILCHREST, B.A, PALLER, A.S, LEFFELL, D.J. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, New York, 8. Baskı, 792.
- BİRLEA, S.A., JİN, Y., BENNETT, D.C., HERBSTMAN, D.M., WALLACE, M.R., MCCORMACK, W.T., KEMP, E.H., GAWKRODGER, D.J., WEETMAN, A.P., PICARDO, M., LEONE, G., TAİEB, A., JOUARY, T., EZZEDİNE, K., VAN GEEL, N., LAMBERT, J., OVERBECK, A., FAİN, P.R., SPRITZ, R.A. (2011). Comprehensive Association Analysis of Candidate Genes for Generalized Vitiligo Supports *XBPI*, *FOXP3*, and *TSLP*. *J Invest Dermatol*, 131(2): 371–381.
- BİRLEA, S.A., SPRITZ, R.A., NORRIS, D.A. (2011). Vitiligo. Wolff K., *Fitzpatrick' Dermatology in General Medicine*. 8. Baskı, McGraw-Hill; Newyork: 2011b. in press.

- BLEEHEEN S.S.,ROOK, A., CHAMPION, R.H., BURTON, J.L., BURNS, D.A. (1998). Disorders of Skin Colour.WILKINSON, D.S., EBLING, F.J.G., BREATHNACH, S.M., *Textbook of Dermatology*. Sixty Edition. Blackwell Science Ltd, UK, London. 1753-1815.
- BLEEHEEN, S.S, ANSTEY, A.V. (2004). Vitiligo. BURNS, T., BREATHNACH, S., COX, N., GRIFFITHS, C. *Rook's Textbook Of Dermatology*. Oxford, Blackwell Science, 39.53-39.57.
- BLEEHEEN, S.S, ANSTEY, A.V. (2004). Disorders of skin colour rook's textbook of dermatology. BURNS, T., BREATHNACH, S., COX, N., GRIFFITHS, C. *Oxford, Blackwell Science*, 39.1-39.15.
- BLOMHOFF, A., HELEN KEMP, E., GAWKRODGER, D.J., WEETMAN, A.P., HUSEBYE, E.S., AKSELSEN, H.E. (2005) CTLA4 polymorphisms are associated with vitiligo, in patients with concomitant autoimmune diseases. *Pigment Cell Res*, 18:55—8.
- BRAUN, O., PLEWIG, F.G., WOLF, H.H., WINKELMAN, R.K. (2000).Disorders Of Melanin Pigmentation..*Dermatology*,Berlin, Springer Verlag, 26:686-709.
- BRAUN, O., PLEWIG, F.G., WOLF, H.H., BURGDORF, W.H.C. (2000), *Dermatology*. Berlin, Springer Verlag. 1013-1042.
- BRUNET, J.F., DENIZOT, F., LUCIANI, M.F., ROUX-DOSSETO, M., SUZAN, M., MATTEI, M.G., GOLSTEIN, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature*. 328, 267–270.
- BUZOĞLU, H. (2015). [<http://www.hakanbuzoglu.com/deri-ve-derinin-yapisi/>] Erişim tarihi: 10.07.2015.
- CASTANET, J., ORTONNE, J.P. (1997).Pathophysiology of vitiligo. *Clin Dermatol*. 15(6): 845-851.
- CUCCHI, M.L., FRATTINI, P., SANTAGOSTINO, G., ORECCHIA, G. (2000). Higher plasma catecholamine and metabolite levels in the early phase of non-segmental vitiligo. *Pigment Cell Res*, 13: 28-32.
- CUİ, J., HARNING, R., MHENN BYSTRYN J.C. (1992). Identification of pigment cells antigens defined by vitiligo antibodies. *J Invest Dermatol* 98: 162-165.
- DAS, S.K, MAJUMDER, P.P, CHAKRABORTY, R., MAJUMDAR, T.K, HALDAR, B. (1985). Studies on vitiligo. I. Epidemiological profile in Calcutta, India. *Genet Epidemiol*, 2:71e8.
- DAS, P.K., VAN DEN WJNGAARD, R.M., WANKOWICZ-KALINSKA, A., LE POOLE, I.C. (2001) A symbiotic concept of autoimmunity and tumour immunity: lessons from vitiligo. *Trends Immunol*, 22:130-6.
- DENG, G.Y., MUIR, A., MACLAREN, N.K., SHE, J.X. (1995).Association of LMP2 and LMP7 genes within the major histocompatibility complex with insulin-dependent diabetes mellitus: population and family studies. *Am J Hum Genet*, 56(2): 528-534.
- DENLİ, Y., ACAR, A., MARAKLI, S.S., YÜCEL, A. (2008)*Dermatoloji*; Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul , 2:1465-1490.
- DENLİ, Y., YÜCEL, A., GÜNAŞTI, S., ACAR, M.A. (2008). Pigmentasyon Bozuklukları, TÜZÜN, Y., GÜRER, M.A., SERDAROĞLU, S., OĞUZ, O., AKSUNGUR, V.L.*Dermatoloji*, Cilt 2, 3. Baskı, Sf. 1445-1528.

- DERMAMEDİCS PROFESSIONAL. (2015). An overview of human pigmentation. [http://www.dermamedics.com/hyperpigmentation_id60.html].
- DUNN, J.,F. (1986). Vitiligo.*Am Fam Physician*,33:137-143.
- DWİVEDİ, M., LADDHA, N.C., RASHEEDUNNİSA, B. (2013). Correlation of increased *MYG1* expression and its promoter polymorphism with disease progression and higher susceptibility in vitiligo patients. *Journal of Dermatological Science*, 71, 195–202.
- EUROFINS (2014). LightCycler Probes For FRET Assays. Erişim: [http://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/optimised-application-oligos/qpcr-probes/lightcycler-probes.aspx]. Erişim tarihi: 11.04.2014.
- FATTAHİ, M.J., PEZESHKİ, A.M., EMAD, M., LOHRASB, M.H., SHAMSEDDİN, A., GHADERİ, A., DOROUDCHİ, M. (2005). Lack of Association between *ctla-4* A49G Polymorphism and Vitiligo. *IJI*, 2: 97-102.
- FİNCO, O., CUCCİA, M., MARTİNETTİ, M. (1991). Age of onset in vitiligo: relationship with HLA supratypes. *Clin Genet*, 39(1): 48-54.
- GAUTHİER, Y., MURİEL, C.A., TAİEB, A.A. (2003). Critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? *Pigment Cell Res*, 16:322-332.
- GÜRKAN, E. (2005). Vitiligoda melanokortin-1 reseptör geni polimorfizmleri sıklığı (tez). *Edirne: TÜ Tıp Fak*; 2005.
- HARNİNG, R., CUI, J., BYSTRYN, J.C. (1991). Relation between the incidence and level of pigment cell antibodies and disease activity in vitiligo. *J Invest Dermatol*.97:1078-80.
- HAWSE, J.R., HEJTMANCİK, J.F., HUANG, Q., SHEETS, N.L., HOSACK, D.A., LEMPICKİ, R., HORWİTZ, J., KANTOROW, M. (2003). Identification and functional clustering of global gene expression differences between human age-related cataract and clear lenses. *Mol Vis* , 9:515-37.
- HEARİNG, V.J. (2011). Determination of Melanin Synthetic Pathways. doi:10.1038/skinbio.2011.4.
- HOFKER, M.H., FU, J., WIJMENGA, C. (2014).The genome revolution and its role in understanding complex diseases.*Biochim.Biophys. Acta*, doi: 10.1016/j.bbadis.2014.05.002.
- HUGGİNS, R.H, SCHWARTZ, R.A, JANNİGER, C.K. (2005).Vitiligo. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*. 14(4): 137-42, 144-45.
- İTİRL, G., PEHLİVAN, M., ALPER, S., YÜKSEL, S.E., ONAY, H., ÖZKINAY, F., PEHLİVAN, S. (2005) Exon 3 polymorphism of *CTLA-4* gene in Turkish patients with vitiligo. *J Dermatol Sci*, 38: 225-7.
- INDIAMART, (2014). [http://trade.indiamart.com/details.mp?offer=2719511948], Erişim Erişim tarihi: 20.04.2014.
- JİN, Y., BİRLEA, S.A, FAİN, P.R. (2010). Variant of *TYR* and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. *New Engl J Med*. 362:1686-1897.
- KARINCAOĞLU, Y., DOĞAN, G. (2001).Vitiligo: Etiyopatogenez, Klinik ve Tedavi.*T Klin J Med Sci*, 21:200-209.
- KEMP, E.H., GAWKRODGER, D.J., MACNEİL, S. , WATSON, P.F., WEETMAN, A.P.,(1997). Detection of tyrosinase autoantibodies in vitiligo

- patients using ³⁵S-labelled recombinant human tyrosinase in a radioimmunoassay. *J Invest Dermatol*, 69–73.
- KEMP, E.H., GAWKRODGER, D.J., WATSON, P.F., WEETMAN, A.P. (1997). Immunoprecipitation of melanogenic enzyme autoantigens with vitiligo sera: evidence for cross-reactive autoantibodies to tyrosinase and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). *Clin Exp Immunol*. 109:495-500.
- KEMP, E.H., AJJAN, R.A., WATERMAN, E.A. (1999). Analysis of a microsatellite polymorphism of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene in patients with vitiligo. *Br J Dermatol*. 140:73–8.
- KEMP, E.H., WATERMAN, E.A., WEETMAN A.P. (2001). Immunological pathomechanisms in vitiligo. [<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01003362h.htm>].
- KEMP, E.H., AJJAN, R.A., WATERMAN, E.A., GAWKRODGER, D.J., CORK, M.J., WATSON, P.F. (1999). Analysis of a microsatellite polymorphism of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene in patients with vitiligo. *Br J Dermatol*, 140:73-8.
- KINGO, K., PHILIPS, M.A., AUNIN, E., LUUK, H., KARELSON, M., RÄTSEP, R., SILM, H., VASAR, E., KÕKS, S. (2006). *MYG1*, novel melanocyte related gene, has elevated expression in vitiligo. *J Dermatol Sci*, 44:119-22.
- KIM, S.M., CHUNG, H.S., HANN, S.K. (1998). The genetics of vitiligo in Korean patients. *Int J Dermatol*, 37:908–10.
- KOVACS, S.O. (1998). Vitiligo. *J Am Acad Dermatol*, 38: 647-666.
- KÕKS, S., LUUK, H., NELOVKOV, A., AREDA, T., VASAR, E.A. (2004). Screen for genes induced in the amygdaloid area during cat odor exposure. *Genes Brain Behav* 3:80-9.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A., ZORIC, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27(2-3):95-125.
- KUTLUBAY, Z., KEVSER UZUNÇAKMAK, T., ENGİN, B., TÜZÜN, Y. (2011). Vitiligo and Oxidative Stress; *J Turk Acad Dermatol*, 5 (4): 1154r1.
- KRISTIANSEN, O.P., LARSEN, Z.M., POCIOT, F. (2000). CTLA-4 in autoimmune diseases – a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun.* 1, 70–184.
- LABERGE, G., MAILLOUX, C.M., GOWAN, K., HOLLAND, P., BENNETT, D.C., FAÏN, P.R., SPRITZ, R.A. (2005). Early disease onset and increased risk of other autoimmune diseases in familial generalized vitiligo. *Pigment Cell Res.* 18(4): 300-305.
- LABERGE, G.S., BENNETT, D.C., FAÏN, P.R., SPRITZ, R.A. (2008). PTPN22 Is Genetically Associated with Risk of Generalized Vitiligo, but CTLA4 Is Not. *Journal of Investigative Dermatology*, 128, 1757–1762.
- LANG, K.S., CAROLÍ, C.C, MUHM, A., WERNET, D., MORIS, A., SCHITTEK, B. (2001). HLA-A2 restricted, melanocyte-specific cd8(+) t lymphocytes detected in vitiligo patients are related to disease activity and are predominantly directed against melana/Mart1. *J Invest Dermatol*. 116: 891-897.

- LE POOLE, I.C., DAS, P.K., VAN, D.E.N., WIJNGAARD, R.M., BOS, J.D., ANDWESTERHOF, W. (1993). Review of the etiopathomechanism of vitiligo: a convergence theory. *Exp Dermatol*. 2:145-53.
- LE POOLE, I.C., LUITEN, R.M. (2008). Autoimmune etiology of generalized vitiligo. *Curr Dir Autoimmun*, 10:227-43.
- LERNER, A. (1959). Vitiligo. *J Invest Dermatol*, 32:285-310.
- LIU, J.B., LI, M., YANG, S. (2005). Clinical profiles of vitiligo in China: an analysis of 3742 patients. *Clin Exp Dermatol*. 30(4): 327-331.
- MAJUMDER, P.P., NORDLUND, J.J., NATH, S.K. (1993). Pattern of familial aggregation of vitiligo. *Arch Dermatol*. 129(8): 994-998.
- MARESCA, V., ROCCELLA, F., CAMERA, E., DEL PORTO, G. (1997). Increased sensitivity to peroxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo. *J Invest Dermatol*, 109:310-313.
- METİN, A., GÜZELOĞLU, M., SUBAŞI, Ş., DELİCE, İ., ARICA, M. (1999). Van ve çevresinde vitiligo hastalığı. *T Klin Dermatoloji*, 9:22-26.
- MOSHER, D.B., FITZPATRICK, T.B., ORTONNE, J.B., HORİ, Y., (1999). Vitiligo, FITZPATRICK, T.B., FREEDBERG, I.M., EISEN, A.Z., WOLFF, K., *Dermatology in general medicine*, Newyork, McGraw-Hill , 5.Baskı, 949-960.
- MOUSAVI, M., ARMSTRONG, R.A. (2013). Genetic risk factors and age-related macular degeneration (AMD). *Journal of Optometry*, 6:176-184.
- MORETTI, S. (2003). Vitiligo. Orphanet Encyclopedia [<http://orpha.net/data/patho/GB/uk-vitiligo.pdf>].
- NAUGHTON, G.K., REGGIARDO, M.D., BYSTRYN, J.C. (1986). Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo. *J Am Acad Dermatol*, 15:978-81.
- NATH, S.K., MAJUMDER, P.P., NORDLUND, J.J. (1994). Genetic epidemiology of vitiligo: multilocus recessivity cross-validated. *Am J Hum Genet*. 55(5): 981-990.
- NEPOMUCENO-SILVA, J.L., DE MELO, L.D., MENDONCA, S.M., PAIXAO, J.C., LOPES, U.G. (2004). Characterization of *Trypanosoma cruzi* TcRj1 locus and analysis of its transcript. *Parasitology*, 129, 325–333.
- NORDLUND, J.J. (1992). Introductions to the biology of the pigment system. *Dermatology*. FLETCHER, J. Philadelphia, wb Saunders Company, 1421-1441.
- NORDLUND, J.J. (1997). The epidemiology and genetics of vitiligo. *Clin Dermatol*, 15: 875–8.
- NORDLUND, J.J. (1982). Vitiligo: It is important, *Arch Dermatol*, 118:5-8.
- OCHI, Y., DEGROOT, L.J. (1969). Vitiligo in Graves' disease *Ann Intern Med*, 935–940.
- ONGENAE, K., GEEL, N.V, NAEYAERT, J.M. (2003). Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Res*, 16:90-100.
- ORECCHIA, G.E. (2000). Vitiligo Neural pathogenesis. HANN, S., NORDLUND, J. *Oxford: Blackwell Science Ltd*.
- ORTONNE, J.P, BAHADORAN, P., FITZPATRICK, T.B. (2003). Hypomelanoses and hypermelanoses. FREEDBERG, I.M., EISEN, A.Z., WOLF, K. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. USA, McGraw-Hill, 836-881.

- ORTONNE, J. (2008). Vitiligo and other disorders of Hypopigmentation. BOLOGNIA, J., JORIZZO, J., RAPINI, R. *Dermatology*. Vol 1. 2nd. Spain: Elsevier, 913-20.
- PARK, H.Y., PONGPUDPUNTH, M., LEE, J., YAAR, M., Biology of melanocytes. (2008). WOLFF, K., GOLDSMITH, L.A., KATZ, S.I., *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, New York, 8. Baskı, 591-608.
- PASSI, S., GRANDINETTI, M., MAGGIO, F., STANCATO, A. (1998). Epidermal oxidative stress in vitiligo. *Pigment Cell Res*11:81-85.
- PEHLIVAN, S., OZKINAY, F., ALPER, S., ONAY, H., YUKSEL, E., PEHLIVAN, M., OZKINAY, C. (2009). Association between IL4 (-590), ACE (I)/(D), CCR5 (Delta32), CTLA4 (+49) and IL1-RN (VNTR in intron 2) gene polymorphisms and vitiligo. *Eur J Dermatol*, 19:126-8.
- PERROT, H. (1973). Vitiligo. Thyreopallisis et autominunization. *Lyon. Med.* 30:325-31.
- PHILIPS, M.A., VIKESAA, J., LUUK, H., JONSON, L., LILLEVALI, K., REHFELD, J.F., VASAR, E., KOKS, S., NIELSEN, F.C. (2009). Characterization of *MYG1* gene and protein: subcellular distribution and function. *Biol Cell*, 101:361-73.
- PİŞKİN, S. (2011). Derinin Pigmentasyonu. Erişim tarihi: 07.07.2015, Erişim [http://spiskin.trakya.edu.tr/deri_pig.html].
- PRAHALAD, S., KINGSBURY, D.J, GRIFFIN, T.A. (2001). Polymorphism in the MHC-encoded LMP7 gene: association with JRA without functional significance for immunoproteasome assembly. *JRheumatol*, 28(10): 2320-2325.
- QIAGEN (2015). Erişim: [[http://www.qiagen.com/resources/molecular-biology-methods/pcr/#What is probe-based PCR?](http://www.qiagen.com/resources/molecular-biology-methods/pcr/#What%20is%20probe-based%20PCR?)]. Erişimtarihi: 11.04.2015.
- QUAN, C., REN, Y.Q., XIANG, L.H. (2010). Genomewide association study for vitiligo identifies susceptibility loci at 6q27 and MHC. *Nat Genet.* 42:614-618.
- RAVNBAK, M.H. (2008).Objective determination of Fitzpatrick skin type. *Dan Med Bull* 2010; 57(8)B4153.
- REBAT, M.H., SUMAYAH, J. (2008). Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 7. Baskı.*The Mcgraw-Hill Companies* 616-622.
- REZAEI, N., GAVALAS, N.G., WEETMAN, A.P., KEMP, E.H. (2007). Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. *JEADV.* 21:865-76.
- SÄÄF, A.M., TENGVALL-LINDER, M., CHANG, H.Y., ADLER, A.S., WAHLGREN, C.F., SCHEYNIUS, A., NORDENSKJÖLD, M., BRADLEY, M. (2008). Global Expression Profiling in Atopic Eczema Reveals Reciprocal Expression of Inflammatory and Lipid Genes. *PloS One* 3:e4017.
- SABUNCUOĞLU, Y. (2006)Vitiligolu Olgularda Mhc Gen Polimorfizmleri, *Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi*, Tez No : 103.
- SALOMON, B., BLUESTONE, J.A. (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 225–252.
- SARICAOĞLU, H., BÜLBÜL, B.E. (2012).*Dermatoji Çeviri Kitabı; Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul. 1-913-20.

- SAVİLL, (2015). Vitiligonun sınıflandırması. Erişim tarihi: 07.07.2015, [<http://vitiligosuz.com/vitiligo-turleri-vitiligonun-siniflandirmasi.html>].
- SCHALLREUTER, K.U. (2005) . Vitiligo. In HERTL, M, Autoimmune diseases of the skin. pathogenesis, diagnosis, Management. *Wien*, 367-384.
- SCHALLREUTER, K.U., BEHRENS WILLIAMS, S., KHALIQ, T.P. (2003). Increased epidermal functioning wild-type p53 expression in vitiligo. *Exp. Dermatol*, 12: 268–277.
- SCHALLREUTER, U.K, MOORE, J., WOOD, J.M, BEAZLEY, W.D. (2001). Epidermal H₂O₂ accumulation alters tetrahydrobiopterin (6BH₄) recycling in vitiligo: identification of a general mechanism in regulation of all 6BH₄-dependent processes? *J Invest Dermatol*, 116:167-174.
- SHAJİL, E.M., AGRAWAL, D., VAGADIA, K., MARFATIA, Y.S., BEGUM, R. (2006). Vitiligo: clinical profiles in Vadodara, Gujarat. *Ind J Dermatol*, 51:100–4.
- SHARQUİE, K.E. (1984). Vitiligo. *Clin Exp Dermatolmal*, 9:117-126.
- SHOBAİLİ, H.A. (2011). Update on the genetics characterization of vitiligo. *International Journal of Health Sciences, Qassim University, Vol. 5, No. 2, Rajab 1432H*.
- SPRİTZ, R.A. (2006).The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *J Dermatol Sci*. 41(1): 3-10.
- SPRİTZ, R.A. (2011). The genetics of vitiligo, *J Invest Dermatol*. 131(E1): E18-E20.doi:10.1038/skinbio.2011.7.
- SPRİTZ, R.A. (2012). Six decades of vitiligo genetics: Genomewide studies provide insights into autoimmune pathogenesis, *J Invest Dermatol*. 132(2):268-273. doi:10.1038/jid.2011.321.
- SRIVASTAVA, G. (1994). Vitiligo Introduction. *Asian Clinic. Dermatol*, 1:1-5.
- SU, A.I., WİLTSHİRE, T., BATALOV, S., LAPP, H., CHİNG, K.A., BLOCK, D. (2004).A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 101, 6062–6067
- TAİEB, A., PİCARDO, M. (2009). Vitiligo. *Nengl J Med*. 360:160-9.
- TAİEB, A., PİCARDO, M., MEMBERS, V. (2007). The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the vitiligo European Task Force. *Pigment Cell Res*, 27–35
- TAŞTAN, H.B, AKAR, A., ORKUNOĞLU, F.E., ARCA, E., İNAL, A. (2004). Association of HLA class-I antigens and HLA class II alleles with vitiligo in a Turkish population. *Pigment Cell Res*, 17(2):181-184.
- TAYAN, R. (1989). 83 vitiligolu olgunun klinik özellikleri, HLA doku grubu antijenleri ve erken tedavi sonuçlarının değerlendirilmesi (tez). *İstanbul: İÜ Tıp Fak.*
- TEBBUTT, S.J., JAMES, A., PARE, P.D. (2007).Single-nucleotide polymorphisms and lung disease. *CHEST*, 131: 1216–1223.
- TURGUT, K. (1971). Vitiligoda psikolojik araştırma ve 250 vakanın tetkiki, *Haseki Tıp Bülteni*, 9: 152-156.
- VAN DEN WİJNGAARD, R.M., ATEN, J., SCHEEPMAKER, A. (2000). Expression and modulation of apoptosis regulatory molecules in human melanocytes: significancein vitiligo. *Br J Dermatol*, 143:573-81.

- WESTERHOF, W., BOLHAAR, B., MENKE, H.E. (1996). Resultaten van een enquête onder vitiligo patienten, *Ned Tjdschr Dermatol Venereol*, 6:100–105.
- WESTERHOF, W., WAND, M. (2007). The Authors, Journal Compilation; *Blackwell Munksgaard Pigment Cell Res.* 20: 345- 359.
- WHITTON, M.E., ASHCROFT, D.M., BARRET, C.W., GONZALEZ, U. (2005). Cochrane Database of systematic Reviews, Issue 1. Art. No.:CD003263. DOI: 10.1002/14651858.CD003263.pub3.
- YANG, S, WANG, J.Y, GAO, M., LIU, H.S, SUN, L.D, HE, P.P. (2005). Association of HLA-DQA1 and DQB1 genes with vitiligo in Chinese Hans. *Int J Dermatol* .44:10022-1027.
- YAVUZ, İ.H., YAVUZ, G.Ö. (2013). Vitiligo Patogenezi, Derleme.*Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 5 (3):114-125.
- YOUNG, M.A., NORDLUND, J.J. (1992). Basic biology of pigmentary system, DEMİS, D.J.,*Clinical dermatology*, Philadelphia, Lippincott Company, 2(11):1-12.
- ZAMANİ, M., SPAEPEN, M., SGHAR, S.S. (2001) .Linkage and association of HLA class II genes with vitiligo in a Dutch population.*Br J Dermatol*, 145(1): 90-94.
- ZHANG, B.X., LİN, M., Qİ, X.Y., ZHANG, R.X., (2013). Characterization of circulating CD8+T cells expressing skin homing and cytotoxic molecules in active non-segmental vitiligo. *Eur J Dermatol.*,(3):331-8.
- ZHANG, X.J., CHEN, J.J., LIU, J.B. (2005). The genetic concept of vitiligo. *J Dermatol Sci*, 39:137–46.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşen YILDIRIM
Doğum Yeri ve Tarihi : 27.06.1990
Yabancı Dili : İngilizce, YDS, 2014 (İlkbahar), Puan: 53,75
İletişim (Telefon/e-posta) : 0506 290 1015/ aysenika@gmail.com
Görev yeri : Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD

Öğrenim Bilgisi Derece	Birim	Yıl
Lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü	2007-2011
Yüksek Lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	2011- 2015

Görev	Birim	Yıl
Biyolog	Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	2014-

Projelerde Yaptığı Görevler :

1. “Viteligo Tanılı Olgularda *CTLA4* ve *MYG1* Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi” Afyon Kocatepe Üniversitesi BAPK Projesi, Yardımcı Araştırmacı, 13.SAĞ.BİL.17, 2014-.

Ulusal kongre, panel, konferans katılımları

1. Biyoloji Kongresi, 2010, Isparta
2. Erişkin yaşta görülen genetik hastalıklar sempozyumu. 06-07 Aralık 2013, İstanbul.
3. Akü Kanser Günleri. 9-10 Nisan 2015, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yaşam boyu Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezi.

Bildiriler:

1. M.Ö. Erdogan, T.Ş. Çankaya, A.M. Ulaşlı, S.H. Yıldız, E.S. Arıkan Terzi, T. Çavdar, K. Avcı, **A. Yıldırım**, M. Solak, “Ankilozan Spondilitli Hastalarda İnterlökin-23 Reseptör Geni rs11209032 Polimorfizminin İncelenmesi”, 11.Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Bildiri Kitabı, s.164, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.
2. K. Hekimler Öztürk, Z. Söylemez, F. Mutlu İçduygu, K. Avcı, **A. Yıldırım**, S. Kurtgöz, M. Elmas, S.H. Yıldız, “Tekrarlayan Gebelik Kaybı veya İnfertilite Endikasyonu İle Başvuran Olgularda Kromozomal Heteromorfizmlerin Değerlendirilmesi”, 11.Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Bildiri Kitabı, s.111, 24-27 Eylül 2014, İstanbul